

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	水谷 淳生
論文題目	転写凝縮体の構造動態に関する分子シミュレーション研究		
(論文内容の要旨)			
遺伝子発現は細胞のあらゆる活動に関与しており、その制御機構は細胞活動を理解するための根幹をなす。真核生物においては、プロモーター領域からゲノム配列上離れた位置にあるエンハンサー領域が、細胞種依存的な転写制御に寄与することが知られているが、一つのエンハンサー領域が複数の転写制御を担う機構など、詳細は明らかになっていない。最近、転写関連タンパク質の液液相分離による転写制御モデルが提唱され注目されている。このモデルでは、転写関連タンパク質がその天然変性領域を介した相互作用によって高密度な凝縮体を形成し、それを通じて転写を活性化する。in vitroの実験から、Oct4, Sox2, Nanog, MED1など複数の転写関連タンパク質がそれぞれ単体で凝縮体を作ることが判明している。本研究は、分子動力学シミュレーションを用いて、哺乳類胚性幹細胞で高発現するマスター転写因子Nanog, Oct4, Sox 2, Klf4の高密度系における凝縮体形成の構造動態を研究したものである。 まず、哺乳類のマスター転写因子の一つで、幹細胞の多能性維持に関与しているNanogについて、その凝縮体形成を解析した。アミノ酸1分子を1粒子で表す粗視化分子モデルを用いてNanogを表現し、Nanog 200分子を含むシステムについて分子動力学シミュレーションを行った。その結果、Nanogがトリプトファンリピート (WR) 領域間の相互作用を介してミセル状の構造を形成し、複数のミセル同士がDNA結合ドメインとN末端側天然変性領域による静電相互作用を介して集合し、凝縮体を形成していることを見出した。この凝縮体形成にはWR領域内のトリプトファンが必須であり、それをAlaに置換した変異体では凝縮体は形成されなかった。また、Nanogのミセル状の構造は、その表面に分布したDNA結合ドメインを介して複数のDNA断片同士を近づける働きをゆうすることを示した。Nanogのミセル状の構造はエンハンサー領域とプロモーター領域を空間的に近づけることができると考えられる。 次に、Nanogに関するシミュレーション研究を発展させて、胚性幹細胞での転写制御に関わる4つの転写因子Oct4, Sox2, Klf4, Nanog (OSKN)による凝縮体形成について、分子動力学シミュレーションによる解析を行なった。OSKN混合系のシミュレーションを行った結果、SKNは混合して凝縮体を形成する一方、Oct4はシミュレーションボックス中に急激に拡散した。SKN凝縮体の内部構造について詳細を調べた結果、Nanogの場合と同様のミセル状構造を形成し、それらが集まることで凝縮体を形成していることが明らかになった。混合系の場合、Klf4の天然変性領域、Sox2とNanogの疎水性のC末端側天然変性領域の相互作用を中心としたミセル構造が見いだされた。さらに、ミセル内の転写因子間相互作用の詳細な解析から、Klf4が足場として機能し、Sox2, Nanogと相互作用することでSKN 3つの転写因子が共同してミセルを形			

成していることが明らかになった。Klf4は他の転写因子と比べて長い天然変性領域を持ち、また多くの疎水的セグメントと荷電セグメントを持っていることから凝縮体形成の足場として機能できると考えられる。Oct4は、単独では凝縮体を形成しなかったが、Sox2やKlf4との相互作用を介して、SKN凝縮体に弱くリクルートされていることが分かった。混合凝縮体を形成することはそれぞれの分子の機能発現において有利に働くと考えられる。また、このような不均一な構成の理由としては複数の異なる局所環境の提供が考えられる。

本研究では、胚性幹細胞で重要な役割を果たす4つの転写因子Nanog、Oct4、Sox2、Klf4について、凝縮体形成の分子メカニズムを、アミノ酸残基分解能の粗視化分子動力学シミュレーションを用いて分析した。シミュレーションは先行研究で得られた実験結果を十分に再現し、ミセル構造などの凝縮体の内部構造について多くの情報を与えた。本研究は転写因子のみによる液液相分離に焦点を当てたが、転写凝縮体では、メディエーター、RNAポリメラーゼ等の天然変性領域や転写産物であるRNAも重要な役割を果たすと考えられるため、これらを含むより核内環境に近い状況でのシミュレーション研究が今後の課題となる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

水谷淳生氏の博士論文は、真核生物の核内において転写関連タンパク質等が形成すると考えられている液体性の凝縮体に着目し、哺乳類胚性幹細胞のマスター転写因子であるOct4, Sox2, Nanog, Klf4による凝縮体の構造と動態について、分子動力学シミュレーションによる研究を行い、結果の解析から凝縮体内にミセル状の内部構造を見出したものである。

第2章では、転写因子Nanogの形成する凝縮体の構造と動態を研究した。Nanogを200分子含んだシステムのシミュレーションを行った。まず先行研究のin vitro実験で報告されている凝縮体形成の臨界濃度を整合することを確認した。シミュレーション結果の解析から、凝縮体内部にミセル状の構造を見出した。変異体や塩濃度を変えた計算から、主にトリプトファンの繰り返し配列等からくる疎水的な相互作用によりミセル構造を形成し、複数のミセル同士が主に静電相互作用によって集合して凝縮相を形成していることが分かった。また、ミセル状の構造体は、DNA断片を接近させる機能を有することを示唆する結果を得た。

第3章では、4つの転写因子Oct4, Sox2, Nanog, Klf4の混合系における凝縮体の構造と動態を研究した。各転写因子を50分子ずつ含むシステムのシミュレーションを行った。Sox2, Nanog, Klf4の3転写因子は、混合した状態で凝縮体を形成したのに対して、大部分のOct4分子は凝縮体から離れ、稀薄相に広く分布した。凝縮体内部の構造分析から、3因子は混合し、2章のNanog単体系と同様のミセル状構造を呈することを見出した。ミセル状構造体において、3因子の分布は一樣ではなく、Klf4を中心(足場)として凝縮していることが分かった。また、3因子が作る凝縮体には、少数ながらOct4もリクルートされていることが分かった。

以上のように本論文は、これまで未解明であった転写因子混合系が形成する凝縮体の内部構造について、ミセル状の構造を見出し、Oct4, Sox2, Nanog, Klf4混合系における不均一な内部構造を明らかにした。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年7月19日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降