

氏 名	なか い となう 中 井 唱
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3114 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 物 理 学 ・ 宇 宙 物 理 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Discrete/Continuous Folding Transition in a Single DNA Chain in the Presence of Oppositely-Charged Macroions (巨大イオン存在下での DNA 1 分子の連続・不連続折り畳み転移)
論文調査委員	(主 査) 教 授 吉 川 研 一 教 授 小 貫 明 教 授 太 田 隆 夫

論 文 内 容 の 要 旨

本学位論文は全5章からなっており、タンパク質などのマクロイオンによる巨大 DNA の凝縮転移を物理的側面から研究したものである。第1章では研究の動機ならびに本分野における過去の研究についての紹介を行っている。第2章では長鎖 DNA とコアヒストンから再構成したクロマチンにおける凝縮相転移・相分離についての研究の結果を報告している。第3章ではヌクレオソーム構造の塩濃度や温度依存性に関する研究の報告を行っている。第4章では様々な重合度の poly-L-lysine による DNA 凝縮についての研究結果を報告している。最後に第5章では全体の総括を行い、今後の展望を述べている。以下、各章の要旨を述べる。

第1章では研究の動機と本分野における過去の研究について述べている。DNA 高次構造転移に関する研究は遺伝子機能との関連からこれまでに数多くの研究がなされてきており、3 価のカチオンであるスベルミジンなどによって DNA 鎖がドーナツ状の凝縮体を形成することが知られている。しかし、ヒトをはじめとする真核生物のゲノムにおいて DNA は種々のタンパク質とクロマチンと呼ばれる複合体をつくり、階層構造をもって核内に折り畳まれており、その構造形成メカニズムや詳細な構造については未解明な部分が多い。タンパク質や電解質高分子などの巨大イオンによる DNA 凝縮について知見を深めることが重要課題である。また本章ではこれまでに分かっている DNA やヒストンタンパクの構造・物理的特性などに関する過去の研究を紹介している。

第2章では、まず長鎖 DNA を用いてクロマチンを再構成する方法について述べ、ヌクレオソーム数の増加に伴ってヌクレオソームの密な部分と疎な部分に相分離するという実験結果を報告している。次に、ヌクレオソーム間の相互作用をその距離分布から導出し、自由エネルギー計算から相分離構造の安定性を説明した結果を述べている。このような相分離現象は、ヌクレオソーム間の引力領域が、その排除体積に比べて非常に狭い範囲であることに起因すると結論付けている。本章の内容は、*Europhysics Letters* 誌で公表されている。

第3章では、ヌクレオソームにおいて高塩濃度で DNA がヒストンから解離する現象のメカニズムを、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた実験と自由エネルギー計算による理論の両面から解明した結果について述べている。塩化ナトリウム濃度の増加に伴い DNA がヒストンから外れるが、0.3 M 付近から解離が始まり、0.75M ではほぼ全てのヒストンが解離状態にあることを AFM 観察により明らかにした。また 0.7M 塩化ナトリウム存在下で 20°C~40°C の範囲で温度を変化させ、温度上昇によりヌクレオソーム数が増加することを見出した。これは、DNA とヒストンがヌクレオソームを形成している方が溶液中の小イオンも含めた系のエントロピーが大きい事を示しており、理論計算による検証を行なった。

第4章では凝縮剤の価数を変化させた時の DNA 凝縮転移様式や凝縮構造の違いについて蛍光顕微鏡を用いた 1 分子観測実験の結果について述べている。凝縮剤として、poly-L-lysine の 3, 5, 9, 92, 981 量体を用いた。3, 5, 9 量体では DNA は広がったランダムコイル状態からコンパクトな状態に凝縮する際に、2 状態の共存状態を経る不連続転移を示すが、92, 981 量体では共存状態は見られず、凝縮剤の増加に伴い DNA のサイズが徐々に減少する緩慢転移で、凝縮構造は

3, 5, 9 量体で見られるものよりやや膨潤した構造であった。また、価数が小さいときは価数が1増加するごとに転移に要する lysine のモノマー量が1ケタずつ減少していくが、92, 981量体では DNA のリン酸基と等しい lysine のモノマー量で凝縮が起こる。このように、lysine の重合度に応じて2種類の凝縮様式があることを明らかにした。本章の内容は、*Biomacromolecules* 誌に公表予定である。

第5章では、全体の総括とこれからの展望について述べている。今後考えられる実験、この研究を行うに際して起こってきた問題点、そして、今後取り組むべき課題を論じている。

論文審査の結果の要旨

本論文はたんぱく質などのマクロイオンによる巨大 DNA の構造転移の様相を、実験・理論な両面から追究した研究をまとめている。これまで DNA の凝縮に関して数多くの実験・理論的研究が行われてきたが、そのほとんどにおいては、短鎖 DNA を用いたものであり、全長が100キロ塩基対を越えるような巨大な DNA の高次構造転移に関する研究は遅れている。しかしながら、原核・真核を問わず地球上の生物のゲノム DNA は、メガ塩基対以上の大きさであることを考えると、長鎖 DNA の巨大イオンによる構造転移の研究を進めることには生命科学的に大きな意味があると考えられる。一方、負に荷電した DNA は、水環境中ではひも状の空間相関を持つ中性プラズマとしての性質を有しており、これが、更に正に荷電したマクロイオンとどのような相互作用を閉めるのかといった問題は、物理学としても未解明の課題である。本学位論文は、このような未解明の重要な問題に切り込んだものとなっており、意義深い。以下にその具体的な意義を述べる。

本論文の第2章においては長鎖 DNA から再構成したクロマチンの凝縮相転移・相分離現象について述べている。本論文では100キロ塩基対の長鎖 DNA を用いて再構成したクロマチンの構造転移に関しての研究が報告されている。その中で、DNA 一分子あたりのヌクレオソーム数の増加に伴いクロマチンが密な部分と疎な部分に相分離することを見出している。これは数百個のヌクレオソームを含む系に特徴的な現象であり、従来の短鎖 DNA を用いた実験では見られなかった。さらに、原子間力顕微鏡像の解析によりヌクレオソーム間の実効的な相互作用ポテンシャルを求め、それを基に自由エネルギーが二つの極小を示すことを明らかにしている。これは、相分離構造が、ランダウ流の対称性に基づく議論では、ミクロな系の一次相転移として記述できることを示しており、この研究領域に新しい視点を持ち込んだものとなっている。この手法により自由エネルギーによる定量的な取り扱いが可能となったことで、ヒストンを化学的に修飾したときの構造転移挙動についても予見が可能であり、一般的な物理モデルを構築したと言える。実際の生体内においてもクロマチンはコンパクトな部分とややルーズな部分に相分離しており、生物学的にも意義深い結果であると言える。

第3章においては、ヌクレオソーム構造の塩濃度・温度依存性についての一分子観測実験を行い、溶液中の塩などの小イオンの影響を取り入れてヌクレオソーム形成メカニズムを説明するモデルを構築した。ヌクレオソーム形成が高温で促進されるという本研究の実験結果は、従来の Poisson-Boltzmann 理論の枠組みでは説明できない現象であるが、対イオン放出に伴う並進エントロピー利得を考慮することで、ヌクレオソーム形成は系のエントロピーを増大させることが理論的にも記述できた。以上のように、本研究は荷電高分子とマクロイオンの複合体形成の本質をとらえた物理的描像を示したと言える。

第4章においては、カチオン性凝縮剤の価数による DNA 構造転移様式の変化について述べている。poly-L-lysine の重合度を変え、長鎖 DNA の折り畳み転移を2つのパターンに分類し系統的に論じている。短い poly-L-lysine では DNA は不連続な凝縮転移を起こす一方で、長い poly-L-lysine では徐々に DNA が折り畳まれるということや、凝縮構造や転移点についても大きな差異があるということが述べられている。マクロイオンによる DNA の折り畳みは、低分子カチオンによるものとは本質的に異なったダイナミクスを持つことを明らかにした。また生物学的な観点からは、この研究は、原核生物ゲノムにおけるスperlミジンやスperlミンによる DNA 凝縮と、真核生物ゲノムにおけるタンパクを用いた DNA 凝縮との違いにも言及しうるものである。

以上に述べた点から総合的に判断し、本学位申請論文は独創性の高い優れたものとなっている。また物理学をはじめとする基礎的学問に関する学識には優れたものがあると判定した。以上のことより、本論文は博士（理学）の学位論文として十分学問的価値を有すると判断した。また、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。