

氏 名	ルッケル フランソワ ヴァロタン Luckel Francois Valentin
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2977 号
学位授与の日付	平成 18 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	Relationships between higher-order conformation and transcriptional activity in DNA (DNA の高次構造転移と転写活性)
論文調査委員	(主 査) 教 授 吉 川 研 一 助教授 瀬 戸 秀 紀 教 授 小 貫 明

論 文 内 容 の 要 旨

本学位論文は 2 部 6 章からなっており、長鎖 DNA 高次構造と転写活性の相関についての研究を主題としている。第 1 部では、転写活性に及ぼす、水溶液環境パラメータの変化によって引き起こされる DNA 高次構造転移の影響を論じている。第 2 部では、DNA の長さやナノ粒子の粒径の変化させて、DNA とカチオン性ナノ粒子との複合体を形成させ・複合体の高次構造と転写活性の相関関係を実験的に調べたものである。

第 1 部は第 2 章から第 4 章よりなる。DNA 分子は生体細胞に存在し、ヌクレオチドの配列により遺伝子情報を保持する長い荷電高分子である。遺伝子コードは大量の情報を持っており、従来の主たる学説では、DNA と酵素やタンパク間の特異性、すなわち、「鍵—鍵穴」式の複雑なネットワークによって遺伝子活性の制御が行われるとされてきた。しかしながら、このような学説の中では DNA 分子の高次構造変化は考慮に入れられていない。ゲノム DNA を含む長鎖 DNA 分子は、長く弛緩した状態と小さく折り畳まれた状態との間で可逆的に高次構造変化をすることが知られている。この遷移は、直鎖状 DNA の場合は一次相転移であり、凝縮剤として多価カチオンや水溶性高分子を用いた環境要因によって引き起こされる。転写の鋳型となる DNA の長短、ねじれ、リンキング、空間、塩基組成によって、その高次構造転移の様相が異なり、それに伴って転写活性も変化すると予想される。なかでも本研究では短鎖 DNA では見られないが、長鎖 DNA の場合には高次構造転移によって転写活性が抑制されることを発見した。すなわち、DNA 鎖が数万倍の密度変化により小さく折り畳まれると、転写反応に必要な酵素やタンパクを排除するのである。

次に、これまでの研究を更に発展させて、環状 DNA と直鎖状 DNA の異なる挙動に関して研究を行った。環状と直鎖状ともに構造転移を起こし、それに伴って著しく転写活性が抑制されたが、その過程は、直鎖状 DNA が明らかな一次相転移を示し完全に転写活性を失活させ、環状 DNA は高次構造転移が連続的で、直鎖状よりゆるい構造に凝縮され、転写活性も完全に失活するには至らなかった。荷電高分子としての DNA の高次構造、特にゲノム DNA をはじめとする巨大な DNA の高次構造が転写活性の制御に大きな影響を及ぼすという、生物的な意義を見出したことは、高分子物理学的に意味があるのみならず、生命科学の発展にも貢献するような貴重な成果であると言える。

第 3 章の内容は *Biophysical Chemistry* 誌で、第 4 章は *FEBS Letters* 誌において公表されている。

第 2 部は第 5 章からなっており、DNA とカチオン性ナノ粒子の複合体形成時における、高次構造と転写活性の相関に関する研究である。DNA とカチオン性ナノ粒子との複合体は、真核細胞に見られる DNA とヒストンとの複合体をモデルとみなすことができる。またこのような系は遺伝子治療への応用への展開も期待される。長鎖 DNA と直径 10~40nm のナノ粒子において、DNA の長さやナノ粒子の粒径を変えながら複合体の高次構造を制御し、各々状態における転写活性を測定した。また、注目すべきは転写した RNA を蛍光色素でラベルし、極めて微小なスケールにおいて DNA 単一分子レベルでの可視化にも成功した点である。遺伝子治療に欠かせない、DNA ベクターの生化学的な性質を明らかにするシステムを創造したことは、非常に意義深い。

論文審査の結果の要旨

本論文は、荷電高分子である DNA の高次構造転移を、転写という生化学的性質との相関で論じたものである。これまで、物理学的な見地から荷電高分子の振る舞いを理解する研究は数多くなされている。また、DNA からメッセンジャー RNA への転写の現象も生物学及び分子生物学的見地から、大いに研究されている。しかしながら、これらの物理的観点と生物学的意味を結びつけた研究はこれまで極めて少なく、未明のことが多く残されている。以下、本研究の意義を具体的に述べる。

第 1 部における遺伝子の転写に関する理解は、従来、巨大な荷電高分子である DNA を細かく断片化して、暗号解読を行うことが主流であったため、本来の荷電高分子としての振る舞いが全く見られず、結果として見落とされてきていた。そのため、細部における遺伝子と酵素の特異性のみがクローズアップされ、あたかも、その制御理論が全てであるかのように認識されている。しかし、現実の細胞スケールを考慮すると、相対的に分子の熱揺らぎの効果が高くなるため、DNA と特定の酵素の特異的な結合が必ずしも忠実には行われないことが容易に推察できる。よって、細胞内で行われている非常に特異的な現象が、一般論として論じられている可能性がある。本研究では、純化した 4 形態の DNA（直鎖状／環状：長鎖／短鎖）を用いて、溶液中のスペルミン濃度を上昇させることによる凝縮状態への変化と、それに伴う転写活性の遷移を実験的に検証したものである。結果、短鎖 DNA は緩慢な凝縮転移を起こすが、その他の形態の DNA においては、急激な凝縮転移を起こした。すなわち、一次相転移を引き起こすことが明らかとなった。さらに、DNA の高次構造の変化に応じて転写活性を測定したところ、DNA の高次構造の変化と同期するように転写活性も減少し、直鎖状の長鎖 DNA においては、全く失活してしまうことを見出した。細胞内で十分な長さを持った DNA の物性を理解した上での、実験的な検証に則った転写システムの解明は、生命現象を物理学的側面から研究した数少ない研究であるとともに、本実験系は、特にウイルス等に代表される原核細胞のモデルとしても捉えることができるため、生命を本質的に理解する上での基礎的な研究成果であり、非常に意義深いものである。

第 2 部における DNA とナノ粒子との複合体を対象とした研究は、真核細胞の遺伝子の形をモデル化したものである。DNA 及びナノ粒子のサイズを変化させることによって複合体の高次構造を制御し、それぞれについて転写活性を計測した。DNA がナノ粒子と複合体を凝縮する溶液環境へ変化させると、DNA のみで見られたような一次相転移を示すことなく、緩慢な変化によって凝縮していくこと、さらに、転写活性も緩慢な変化によって減少していき、全く失活させるには至らないことが明らかとなった。さらに、ナノ粒子の粒径に依存して、小さいものほど、緩やかに活性が減少していくことを明らかにした、これらのことは、複合体の構造特性と生命現象との相関を明らかにしたことである。すなわち、このモデルを本来の遺伝子構造である DNA と DNA 結合タンパクの振る舞いへ置き換えることによって、遺伝子本来の構造の意味を理解する上での極めて重要な要因の一つが解明されたといえる。本研究で導かれた結果は、基礎的な研究としても勿論であるが、その域に留まらず、遺伝子治療等のナノ・マイクロバイオテクノロジー分野への貢献が示唆されるものであり、応用面からも評価すべき研究である。

以上に述べた点を総合的に判断すると、本学位申請論文は優れたものとなっており、学位を取得するに値するものであると評価した。物理学をはじめとする基礎的な学問に関する学識も、優れたものと評価した。このことから、博士（理学）の学位論文として学問的価値を十分にもつものであると判断し、合格と認めた。