

博士学位論文審査要旨

2022年1月14日

論文題目： Study on the higher-order structure of DNA and gene expression
(DNA 高次構造の多様性と遺伝子発現活性)

学位申請者： 西尾 天志

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 大江 洋平

副査： 生命医科学研究科 准教授 貞包 浩一朗

副査： 京都大学化学研究所生体機能化学研究系 准教授 佐藤 慎一

要旨：

ゲノム DNA 上の塩基配列に関する膨大な知見が蓄積する一方で、ゲノム DNA の動的な変化(高次構造)と機能との関連を追究する研究はその重要性にも関わらず遅れている。細胞内のゲノム DNA は、その長さが数十 μm から数 cm にも及ぶ巨大分子であり、物理化学的性質の違いから、長鎖 DNA では短鎖 DNA では見られない数千倍以上の密度変化を伴う折り畳み転移(高次構造の変化)が生じる。そのため、一分子レベルでの長鎖 DNA の大局的な構造変化と遺伝子機能との関連を調べることは重要である。本論文では、様々な要因に由来する DNA 高次構造の変化を系統的に追究し、DNA 高次構造と遺伝子発現活性との相関について明らかにすることを目的とした研究成果を、全7章にまとめた。

第1章には研究背景と各章の研究計画とその成果の概要をまとめた。第2章では、ポリアミンによって引き起こされる DNA の高次構造変化が、遺伝子発現活性に促進と阻害の二相性効果を引き起こすという新たな知見を示している。具体的には、ポリアミンが低濃度の場合、DNA は緩い凝縮構造(flower-like 構造)を形成し、遺伝子発現が促進された。一方、高濃度になると、DNA 分子はタイトに凝縮し、遺伝子発現が完全に阻害された。また、スペルミジン (SPD)とその構造類似体で抗腫瘍活性を有するノルスペルミジン (NSPD)の作用を比較し、SPD は NSPD より強く遺伝子発現を促進し、NSPD はより低濃度で強く発現を阻害することが明らかとなった。発現の促進時に観察された flower-like 構造についても、SPD 存在下ではより多分子が凝集し巨大であったが、NSPD 存在下では小さく、より低濃度で完全に凝縮することから、DNA 高次構造と遺伝子発現活性の密接な関係を示唆する結果が得られた。第3章では、SPD と Na^+ 及び K^+ 共存下における無細胞系遺伝子発現活性について研究し、 K^+ は Na^+ に比べて、SPD による遺伝子発現活性の促進作用をより増強することを明らかにした。この成果は、地球上には Na^+ が豊富に存在するにも関わらず、生物の細胞内には K^+ が豊富に存在する理由に迫る重要な知見である。第4章では、DNA の鎖長が遺伝子発現活性に及ぼす影響について言及している。ここでは無細胞系遺伝子発現の鋳型として鎖長の異なるレポーターDNA を用いると、ターゲット遺伝子が同数のとき、鎖長が 1.7 キロ塩基対(kbp)の DNA に比べて、25.7 kbp の DNA は 1000 倍以上高い発現効率を示すことを発見した。この結果は、生物のゲノム DNA が多くのノンコーディング領域を含む巨大分子である理由の解明にも繋がり得る研究成果であると期待される。第5章では、沸点近傍温度に生育する超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* が生合成する特異な分岐型ポリアミンと、一般的な直鎖型ポリアミンが、様々な温度条件下で導く DNA 高次構造変化について検討した。その結果、室温で直鎖型ポリアミンは DNA セグメントが平行に配列した Flower-

like構造を導く一方、分岐型ポリアミンはDNAセグメントが架橋したMesh-like構造を導いた。さらに、80℃の高温条件では、分岐型ポリアミン存在下でのみDNAがセグメント上に直径10-50 nmの特殊なマルチループ構造を形成することを発見した。こうした特殊なDNA高次構造は、本来DNAが熱変性するほどの高温環境において、超好熱菌が遺伝子機能を維持するメカニズムの一端に寄与するものと期待される。第6章では、第5章で取り扱った5価の分岐型、直鎖型の二種のポリアミンとDNAの間における相互作用の違いについて、光ピンセットを用いた発展的な実験とモンテカルロシミュレーションを活用した理論考察を行い、それぞれのポリアミンについて分子レベルでのDNAとの相互作用の違いについて検討を行なった結果をまとめている。最終の第7章では、結論として本論文における研究成果をまとめ、得られた結果から導かれる結論及び、期待される発展性等について記した。

以上のように、本論文では、DNAの高次構造変化と遺伝子発現等の遺伝子機能との密接な関係を示唆する種々の結果を示した。このような特定の塩基配列に依存しない、非特異的な相互作用に基づく遺伝子制御メカニズムは、ゲノムDNAの本質的な遺伝子機能の一端であると考えられ、今後、がん化や細胞分化等のメカニズム解明にも繋がり得る研究成果であると期待される。よって、本論文は、博士(工学)(同志社大学)の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2022年1月14日

論文題目： Study on the higher-order structure of DNA and gene expression
(DNA 高次構造の多様性と遺伝子発現活性)

学位申請者： 西尾 天志

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 大江 洋平

副査： 生命医科学研究科 准教授 貞包 浩一朗

副査： 京都大学化学研究所生体機能化学研究系 准教授 佐藤 慎一

要旨：

本論文提出者は、2019年4月より本学大学院生命医科学研究科博士課程（後期課程）に在学しており、各年度において優れた研究成果を挙げている。また、本研究科修了に必要な所定の単位を修得するとともに、英語の語学試験にも合格しその能力が十分であることが認定されている。

本論文の主要部分は、ChemPhysChem（2018年掲載）、Scientific Reports（2019年掲載）、PLOS ONE（2020年掲載）、Scientific Reports（2021年掲載）に提出者が筆頭著者として、Colloid and Polymer Science（2018年掲載）、International Journal of Molecular Sciences（2021年掲載）に共著者として掲載済みとなっている。

2022年1月14日13時30分より約1時間にわたり提出論文に関する学術講演会（博士論文公聴会）が開催され、提出者の講演とそれに引き続き活発な質疑応答がなされた。提出者の説明により研究内容が学問的に優れていることを審査委員一同が確認した。公聴会終了後、提出論文に関係した学問的諸問題について、審査委員による口頭試問を実施し、提出者が博士学位授与にふさわしい能力を有することを確認した。よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目： Study on the higher-order structure of DNA and gene expression
(DNA 高次構造の多様性と遺伝子発現活性)

氏名： 西尾 天志

要旨：

近年、ゲノム解析技術の発展により、ゲノム DNA 上の塩基配列に関する膨大な知見が蓄積してきている。しかし、生物が同一の塩基配列情報から、多様な形態・機能を有する細胞を適材適所に作り出しているメカニズムは未解明である。細胞周期に応じて染色体 DNA が著しい形態変化を示すことなどから、「一次元的な塩基配列情報」に加えて、「ゲノム DNA の動的な変化」を調べることが、細胞分化やガン化のメカニズム解明に向けた重要課題であると認識されつつある。これに関して、DNA のメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化など、DNA 分子の局所的な変化を調べるエピジェネティクス研究が急増してきている。しかしながら、階層的な視点でのゲノム DNA の動的な変化(高次構造)と機能との関連を追究する研究はその重要性にも関わらず遅れている。

細胞内のゲノム DNA は、その長さが数十 μm から数 cm にも及ぶ巨大分子であり、細胞周期のみならず、細胞分化やがん化などにより、著しくその大局的な形態を変化させていることは広く知られている。DNA は semiflexible polymer としての性質を有しており、生化学や分子生物学分野の研究で一般的に用いられる 1 キロ塩基対(kbp)程度の長さの DNA と、ゲノム DNA のような長鎖 DNA では物理化学的な性質が全く異なる。具体的には、長鎖 DNA がフレキシブルなひものように振る舞う一方で、短鎖 DNA は硬い棒状の振る舞いを見せる。そのため、長鎖 DNA では短鎖 DNA では見られない、数千倍以上の密度変化を伴う折り畳み転移(高次構造の変化)が生じる。つまり、短鎖 DNA のみを用いて行われる研究においては、生体内におけるゲノム DNA の本質的な挙動の全容を把握できていない可能性が高いと言える。従って、一分子レベルで長鎖 DNA の大局的な構造変化を追究し、その遺伝子機能との関連を調べることは、生命科学分野における今後に残された重要な研究課題であると言える。

本論文では、蛍光顕微鏡や原子間力顕微鏡(AFM)を用いた DNA 一分子観察手法を活用することで、様々な要因に由来するゲノムサイズ DNA の高次構造変化を系統的に追究し、遺伝子発現活性との相関について明らかにすることを目的としている。論文は全 7 章から構成され、生体小分子ポリアミンやアルカリ金属イオンの濃度、DNA の鎖長、さらには温度変化など、DNA 高次構造や遺伝子活性に影響し得る細胞内外の様々な要因を取り上げて研究を行った結果を各章で論じている。以下に各章の記載内容について概説する。

第 1 章は、序論として本論文全体を通しての研究の背景と目的を明らかにし、さらに各章における研究目的の要約を記した。

第 2 章では、ポリアミンによる DNA 高次構造の変化と遺伝子発現活性への影響に着目した研究について記した。ポリアミンは地球上の全ての生物種が保有するカチオン性の生体小分子で、細胞機能と密接に関わっていることで知られる。また、そのカチオン性から DNA や RNA、タンパク質など様々な生体分子と相互作用することでも知られており、我々のこれまでの研究から長鎖 DNA の折り畳み転移を引き起こすことが明らかとなっている。第 2 章では、ヒトも保有する一般的なポリアミン、スペルミジン(SPD)と、その構造類似体で抗腫瘍活性を有するノルスペルミジン(NSPD)の無細胞系遺伝子発現活性に対する影響を調べた。その結果、いずれのポリアミンを作用させた場合でも、ポリアミン濃度に応じて発現活性に促進と阻害の二相性効果が生じ

ることが明らかとなった。さらに、SPD では NSPD より発現活性の促進が強く、一方で NSPD はより低濃度で強く発現を阻害することが明らかとなった。また、促進および阻害が顕著なポリアミン濃度における DNA 高次構造への影響について、AFM を用いた DNA 一分子観察手法を活用し調べたところ、SPD 存在下では DNA が巨大な flower-like structure を形成する一方で、NSPD 存在下では同様の DNA 高次構造を示すものの、その面積は小さく、さらに SPD よりも低濃度で DNA の完全な凝縮を引き起こすことが明らかとなった。flower-like structure は DNA が緩く凝縮した高次構造であり、ポリアミンの正電荷によって DNA リン酸基の負電荷が中和され減少し、同じく負電荷を帯びた RNA ポリメラーゼの塩基へのアクセスを有利にすると考えられる。そのため、より大きな flower-like structure を形成させる SPD 存在下においては発現活性がより強く促進されたものと考えられる。一方で、ポリアミン濃度が高い場合、DNA がタイトに凝縮してしまい、RNA ポリメラーゼの DNA 塩基に対するアクセスを完全に遮断すると考えられる。そのため、より低濃度で DNA を完全に凝縮させる NSPD は、SPD より低濃度で発現の阻害を引き起こしたのと考えられる。以上のように第 2 章では、DNA の高次構造と遺伝子発現活性が密接な関係にあることを示唆する極めて重要な研究成果を記した。

第 3 章では、第 2 章の発展的研究として生体ポリアミン SPD と Na⁺及び K⁺共存下における無細胞系遺伝子発現活性についての研究を記した。本研究を通して、Na⁺及び K⁺と共存する条件下で SPD 単体に比べて遺伝子発現活性を強く促進すること、加えて、同じ 1 価のアルカリ金属イオンであっても、K⁺は Na⁺に比べて、SPD による遺伝子発現活性をより増強することが明らかとなった。蛍光顕微鏡による DNA 一分子観察や、¹H NMR を用いたポリアミンの DNA に対する結合親和性の解析によって、Na⁺が K⁺よりも DNA に対して高い結合親和性を有しており、結果として Na⁺はより強く DNA と SPD の相互作用を阻害する傾向にあることが示された。そのため、K⁺との共存下にある方が第 2 章で記述したような SPD の遺伝子発現活性に対する促進作用がより増強され、高い発現活性を示したと考えられる。この成果は、地球上には Na⁺が豊富に存在するにも関わらず、地球上生物の細胞内には K⁺が豊富に存在する理由に迫る重要な知見である。

第 4 章では DNA の鎖長が遺伝子発現活性にどのような影響を及ぼすのかについて調べた研究を記している。無細胞系遺伝子発現の鋳型として鎖長の異なるレポーター DNA を用いると、鎖長の長い DNA でより高い発現活性が得られることが明らかとなった。例えば、ターゲット遺伝子の数が同数のとき、鎖長が 1.7 キロ塩基対(kbp)の DNA に比べて、25.7 kbp の DNA は 1000 倍以上高い発現効率を示すことを発見した。加えて、AFM を用いて無細胞系遺伝子発現用 Buffer 中の DNA 高次構造を観察すると、25.7 kbp の DNA は緩く収縮した構造を示し、DNA セグメント周辺に RNA ポリメラーゼ等が局所的に高い濃度で存在することが明らかとなった。生物のゲノム DNA は全長が数十 μm から数 cm という巨大分子であり、その配列には多くのノンコーディング領域も含まれる。しかしながら、それらのノンコーディング領域の詳細な役割は未だ多くの部分が未解明である。本研究成果は、こうした未解決課題の解明にも繋がり得る研究成果であると考えている。

第 5 章では、発展的な研究課題として、異なる温度条件下におけるポリアミンが導く DNA 高次構造変化について記した。ここでは、沸点近傍温度に生育する超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* が生合成する特異な分岐型ポリアミンと、一般的な直鎖型ポリアミンが導く DNA 高次構造変化について、AFM による DNA 一分子観察を行った。その結果、室温においては、直鎖型ポリアミンが Flower-like structure の凝縮構造を導く一方で、分岐型ポリアミンは DNA セグメントが架橋した Mesh-like structure の凝縮構造を導き、更に、80℃の高温条件において、分岐型ポリアミン存在下でのみ、DNA が直径 10-50 nm の特殊なマルチループ構造をセグメント状に形成することを発見した。沸点近傍温度は本来 DNA が熱変性してしまうほどの高温条件であり、超好熱菌がこうした環境においても遺伝子機能を維持するメカニズムの一端に、こうし

た特殊な DNA 高次構造変化が寄与しているものと期待される。

さらに第 6 章では、第 5 章で取り扱った 5 価の分岐型、直鎖型の二種のポリアミンと DNA の間における相互作用の違いについて、光ピンセットを用いた発展的な実験とモンテカルロシミュレーションを活用した理論考察を行い、それぞれのポリアミンについて分子レベルでの DNA との相互作用の違いについて検討を行なった結果をまとめている。

第 7 章では、結論として本論文における研究成果をまとめ、得られた結果から導かれる結論及び、期待される発展性等について記した。

以上のように本学位論文を通して、DNA の高次構造変化が遺伝子発現等の遺伝子機能と密接に関わっていることを示唆する結果を明らかにしてきた。こうした、特定の塩基配列に依存しない、非特異的な相互作用に基づく遺伝子制御は、ゲノム DNA の本質的な遺伝子制御メカニズムの一端であると考えられる。故に、本研究で得られた知見は、細胞分化やがん化メカニズムに迫る、本質的な遺伝子制御メカニズムの解明に繋がる礎となる成果であると考えられる。