

氏 名 杵 洵 隆

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第434号

学位授与の日付 平成11年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 DNA結合蛋白質のスライディングの意義

論文審査委員 主 査 教 授 石濱 明
教 授 小川 智子
助 教 授 徳永 万喜洋
教 授 西村 善文（横浜市立大学）
助 教 授 加納 康正（京都薬科大学）

論文内容の要旨

生物ゲノムの構造形成や機能発現に関与する DNA 結合蛋白質は、大腸菌では約 250 種類が知られ、約 1,000 種類の大腸菌構成蛋白質の約 25% を占める。それらは全て DNA に結合して機能を発揮するが、その生理機能に応じて結合様式は多様であると推定されているが、実体は不明の部分が多い。転写調節因子は、制御をする特定遺伝子の特定部位に結合して機能を発揮するが、特異的複合体形成に至る過程については、幾つかのモデルが提唱されてきた。そのひとつに、蛋白質はまず DNA と非特異的に結合し、そこから DNA に沿って一次的に拡散する機構、いわゆる“スライディング”仮説がある。この仮説は最近、蛋白質を蛍光標識し、DNA 上での一分子の動きを観察する技術を利用して支持されてきた。しかし、スライディングについては定量的実験がすくなく、しかも蛋白質の種類に応じて、その意義が異なることが示唆されて、まだ明確ではない。申請者の所属する研究室では、先に大腸菌 RNA ポリメラーゼと、転写調節因子 CamR の DNA 結合過程を解析し、CamR 蛋白質では、スライディングによって特異部位へ接近し結合するが、特異部位からの解離過程ではスライディングによらないことを観察し、スライディングが結合速度のみを速め、結果として、特異部位との結合定数を高めていることを明らかにし、この現象を、「アンテナ効果」と名付けた。

申請者は、DNA 結合蛋白質の特定部位結合におけるアンテナ効果を実証する目的で、大腸菌トリプロファン合成系遺伝子群の転写調節因子 TrpR を研究対象として選択した。この転写因子については、従来、オペレーターを含む短鎖 DNA をプローブに利用すると、特異的 TrpR 部位への結合は、非特異的結合に比べて高々 200 倍程度強いと報告されていた。非特異的結合部位は、ゲノムのどこにでも結合できるとすると、大腸菌ゲノムのサイズから約 10^7 も存在すると推定され、特異的部位に比べて圧倒的に多い。しかし、TrpR は、細胞内 200 分子程度しかなく、支配下の遺伝子のオペレーターに特異的に結合できるのは、アンテナ効果を最大限に利用しているに違いないと予測したからである。アンテナ効果を測定するために、申請者は、同じ TrpR 結合部位配列を 1 個所にもつが、鎖長の異なる多数のプローブ DNA を構築して、それぞれへの TrpR の結合量を測定した。DNA 結合蛋白量を測定するのに、ゲルシフト法では、DNA-蛋白質複合体分離途中にも解離が進むので、溶液中で平衡状態にある DNA 結合蛋白量を測定できる、OH ラジカルフットプリンティング法を採用した。その結果、18bp から 5,200bp にプローブの鎖長が増えると、結合強度が約 10^4 倍に高まることが見事に実証された。アンテナ効果は、DNA のルーピングによる、遠距離 DNA の接近によっても起こる可能性がある。そこで、DNA 鎖途中に、アビジンをビオチンを介して結合させて蛋白質の移動を妨害するスライディングバリアーとし、この DNA に対して OH ラジカルフットプリント法を用いて、TrpR の DNA 親和性を測定したと

ころ、TrpR のアンテナ効果が解消された。従って、長鎖 DNA による結合強度の増加は、ルーピング効果ではないと結論された。

以上の実験の結果、転写因子 TrpR が実際にスライディングのアンテナ効果を利用して特異的 DNA シグナルに結合していることが実証された。本研究の成果は、TrpR を巡る従来の矛盾を解決したことに留まらず、アンテナ効果を利用して、生物が少量の調節蛋白で特異的な遺伝子制御を出来ることを予測した、先駆的研究である。

論文の審査結果の要旨

学位論文公聴会の直後、公聴会での講演の内容と、その後の公開討論で提起された諸課題、学位論文記載の内容と研究の背景などについて、討論形式で学力試験を実施した。その上で、論文内容を審査した。審査会では、審査員の質問には的確に応答し、また自らの研究に含まれる問題点についても妥当な考察をした。従って、学位授与に相応しい学力があると判定された。

本学位論文の研究は、細胞内含量の少ない転写因子が、スライディングのアンテナ効果を利用して特定遺伝子の調節シグナルに接近することを実証した、先駆的な定量的遺伝解析として高く評価できる。拠って、本論文の内容は、学位を授与するに相応しいと判定された。

なお、なお、申請者には既に修士課程から博士課程初期にかけて行った、大腸菌一本鎖 DNA 結合蛋白質に関する英文発表論文があり、英語能力についても、学位授与水準の能力を備えていると判断した。