

| | | | |
|-------------|------------------------------|------|---------|
| 氏 名 (本 籍) | 山 崎 智 子 (東 京 都) | | |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (農 学) | | |
| 学 位 記 番 号 | 博 甲 第 2458 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成 12 年 7 月 25 日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | |
| 審 査 研 究 科 | 農学研究科 | | |
| 学 位 論 文 題 目 | 核酸と蛋白質の結合に対する両者の熱安定性と熱運動性の影響 | | |
| 主 査 | 筑波大学教授 | 工学博士 | 田 中 秀 夫 |
| 副 査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 宗 像 英 輔 |
| 副 査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 祥 雲 弘 文 |
| 副 査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 生 井 兵 治 |
| 副 査 | 生命工学工業技術研究所 DNA 情報研究室長 | 理学博士 | 鈴 木 理 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

生命は、その設計図であるゲノム DNA 情報の適切な制御によって、正常な機能を維持している。その本質的な過程である転写や複製等において、ゲノム DNA 分子と蛋白質の相互作用が重要な役割を担う。本研究では 100℃ に達する高温下に生育する超好熱性古細菌 Pyrococcus 属を主な対象とし、そのゲノム DNA 分子や蛋白質が高い熱安定性を達成するためにどの様に設計され、高温下で機能するために熱運動性がどの様に制御され、それが DNA と蛋白質の相互作用においてどのような意味を持つかを解明する事を目標とした。

(1) 蛋白質の熱安定性と熱運動性

2 種類の蛋白質（およびドメイン）を用いて、生育温度と熱安定性や熱運動性の関係について調べた。その結果、超好熱性古細菌の TATA binding protein (TBP) は、由来する生物の細胞内環境下、すなわち高温・高塩濃度下で最も安定であり、既に決定されている TBP の立体構造情報の検討からも、疎水性相互作用が熱安定化に寄与するという結論となった。また、2 つのドメインの間に挟まれた領域に、耐熱性の高い TBP ほどより大きなアミノ酸側鎖で占められている部位があり、立体障害により熱運動性が低下しているが、高温であることによって適切な運動性となる事が示唆された。亜鉛と結合することにより構造を形成する Zn フィンガードメインの熱安定性を調べた結果、超好熱性古細菌由来のものの方が常温生物由来のものより亜鉛との結合が強く、安定であることが示された。立体構造情報の検討により、このドメインは亜鉛結合以外に疎水性相互作用によって補強されており、その程度が強いほど安定化すると考えられた。

(2) DNA の熱安定性と熱運動性

超好熱性古細菌において、高温濃度は DNA の熱安定化に寄与している。それ以外に寄与する因子として、ここでは古細菌で多くみられるアデニンの N6 位のメチル化をはじめとした塩基の修飾が熱安定性に及ぼす影響を調べた。その結果、アデニンのメチル化は DNA をむしろ不安定化する事を見出した。逆にピリミジン塩基の C5 位のメチル基は DNA 二重らせん構造をわずかに安定化すると結論できた。また、各種生物のゲノム DNA 配列の解析から、生育温度の高い生物のゲノム DNA ほど固い傾向があり、TBP の場合と同様に、高温で分子の運動性が高められて適切となる事が示唆された。

(3) 核酸と蛋白質の結合に対する熱安定性と熱運動性の影響

TATA ボックス DNA は TBP との結合により大きく湾曲するため、結合特異性は DNA 分子の柔軟性に依存すると考えられる。ここでは柔軟性が異なると予想される様々な DNA 二重鎖と超好熱性古細菌 (*Pyrococcus* sp. OT3) 由来 TBP との結合実験を行い、結合・解離の速度定数および結合定数の比較を行った。その結果、結合定数は DNA が柔軟すぎても固すぎても小さくなり、強い相互作用を行うためには柔軟性が適切であることが必要であると考えられた。また、DNA-TBP 結合は温度が高いほど強まり、塩濃度が高いほど弱まる傾向を示した。DNA が湾曲した場合に内側となる主溝側のメチル基を除去して柔軟にすると TBP 結合が強くなり、逆にメチル基を導入して固くすると結合が弱くなった。すなわち、TATA 配列の柔軟性を規定する主要因は主溝側に存在するメチル基 (T 塩基のメチル基) による立体障害と考えられる。情報科学的にゲノム DNA 配列を検討したところ、生育温度の高い古細菌の TATA ボックスの塩基配列ほど固い配列となっており、配列による柔軟性の調整がなされていることが示唆された。

これらの結果を総合すると、本研究の主な対象である超好熱性古細菌のゲノム DNA 分子や蛋白質は、高温・高塩濃度の環境下で熱安定性を保っており、蛋白質は疎水性相互作用が強まるように立体構造が成り立っている。また、両者が生育条件下で適切な相互作用を行うために、その条件で適切な運動性となるように塩基配列やアミノ酸配列が調整されていることが結論された。このような制御により、DNA と蛋白質が生育条件下で安定に維持され、両者の相互作用が適切なレベルとなると結論できた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、超好熱性古細菌 *Pyrococcus* 属を主な対象として、その蛋白質や DNA が高温で安定に存在し、正常に機能できる仕組みを解明することを目標としている。そのために、蛋白質・DNA の両方について熱安定性と熱運動性の二面から検討し、それらが DNA-蛋白質結合系においてどのように影響するのかを調べている。その結果、高温で生育する古細菌ほど、蛋白質は疎水性相互作用が強まるようにアミノ酸配列が調整され、加えて立体障害により運動性が低くなるようにも調整されていることを明らかにした。また、各種古細菌中に Zn フィンガードメインを見出し、実際に亜鉛を結合して構造形成することや、その安定性にも疎水性相互作用が関与している事を確認した。DNA では塩基のメチル化等の修飾が熱安定性に及ぼす影響を詳細に調べ、アデニンの N6 位のメチル化は DNA を不安定化する一方、ピリミジンの C5 位のメチル基はわずかに熱安定化することを示し、超好安定化することを示し、超好熱性古細菌で DNA の熱安定化に効いているのは主に高い細胞内塩濃度であることを示唆した。また、情報科学的解析により、高温で生育する古細菌ほど柔軟性が低くなるように塩基配列が調整されていることを示した。次に DNA-蛋白質結合系として TATA ボックス DNA-TBP 結合を取り上げ、結合・解離反応の速度論的解析により、DNA の柔軟性が両者の結合の強さに影響し、柔軟性を規定する主要因が主溝側メチル基による立体障害であることを見出した。これらの事から生育環境下で反応が適切なレベルとなるように DNA, TBP 共に配列調整がなされていることを示した。本研究では近年になって発見されてきた超好熱性の古細菌を対象としており、既存の実験例が少ないため、結果の一般性については、更なる検討が必要である。しかし、ゲノム DNA 配列情報および DNA・蛋白質の立体構造情報と、分光学的手法による実験データを併せて解析することにより、生体高分子設計の理解に一步迫ることが出来たことは意義がある。本研究により得られた成果は、生体高分子の物理的性質、特に分子の柔軟性が持つ生物学的重要性を示したという点で高く評価できる。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。