

論文審査の結果の要旨

氏名 西村正宏

本論文では、主要ながん抑制転写因子である p53 による特異的な DNA 配列の認識機構を、生化学的手法および構造生物学的手法により解析している。本論文は第 1 章「General introduction」、第 2 章「Material and methods」、第 3 章「Results and discussion」、第 4 章「General discussion」の計 4 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、関連の先行研究が記述されている。真核生物におけるゲノム DNA の収納機構であるクロマチンは、基本繰り返し単位であるヌクレオソームがリンカー DNA によって繋がれた beads-on-a-string 構造を形成して核内に収納されている。ヌクレオソームは、ヒストン 8 量体の周りに約 145 塩基対の単位でゲノム DNA が巻き付いた円盤状の構造体であり、ヌクレオソーム中の DNA はヒストンタンパク質と強く結合することで、転写因子など DNA 結合タンパク質の DNA への結合に阻害的に働いている。一方で、パイオニア転写因子と呼ばれる一群の転写因子は、ヌクレオソームを形成した状態で標的 DNA 配列に結合することが可能である。パイオニア転写因子によるヌクレオソーム結合は、細胞の運命を制御する上で不可欠であるが、その詳細な分子機構は不明である。p53 はパイオニア転写因子群の 1 つと考えられており、これまでの p53-DNA 複合体の結晶構造解析の結果から、p53 は四量体を形成して直線状の DNA 構造を認識することが知られている。本章では、これらの背景を踏まえ、パイオニア転写因子 p53 によるヌクレオソーム中での DNA 認識機構の解明という研究目的を提起している。

第 2 章は材料と方法であり、p53 の精製、DNA の精製、ヒストンの精製、ヌクレオソームの再構成と精製、各種生化学的解析の方法、クライオ電子顕微鏡解析の方法について詳細に記述されている。

第 3 章は結果と考察であり、第 1 項「Biochemical analysis of the p53 binding to the nucleosome」、第 2 項「Structural analysis of the p53 bound to the nucleosome」から構成されている。第 1 項では、まず、p53 が DNA 配列

非依存的に、リンカーDNA部分を介してヌクレオソームに結合し、4種類の複合体が生じることを生化学的解析から示している。さらに、p53は標的DNA配列を含むヌクレオソームに対して、特異的に結合した複合体を形成することを見出している。欠失変異体を用いたプルダウンアッセイとゲルシフトアッセイにより、p53がそのN末端アミノ酸領域を介してヒストンH3-H4複合体に直接結合することを明らかにしている。第2項では、p53-ヌクレオソーム複合体の低温電子顕微鏡法による立体構造解析について述べられており、p53がヌクレオソーム内の標的配列に結合する機構を立体構造として解明している。相補的に、ヒドロキシラジカルフットプリント実験により、p53-ヌクレオソームにおけるp53の結合DNA領域の解析が行われている。

第4章は総合討論であり、第1項「Biochemical properties of the pioneer transcription factor p53 binding to the nucleosomes」、第2項「Insights into the chromatin opening by the pioneer transcription factor p53」から構成されている。第1項では、生化学的解析を通じて明らかとなったp53によるヒストン結合やDNA配列非特異的ヌクレオソーム結合といった性質が、パイオニア転写因子に共通のものである可能性が議論されている。第2項では、本研究で明らかになったp53-ヌクレオソーム複合体の構造とこれまでに報告されているパイオニア転写因子-ヌクレオソーム複合体構造との比較から、パイオニア転写因子群におけるヌクレオソームDNA認識機構の共通性と多様性が議論されている。またp53-ヌクレオソーム複合体構造から、p53による標的DNA配列結合がクロマチンの高次構造に与える可能性について言及されている。

本論文は、これまで未解明であったp53によるヌクレオソームDNAの認識機構を明らかにしたものであり、細胞運命の決定に関与するパイオニア転写因子の作用機序の理解に貢献するものであると認められる。なお本論文は、有村泰宏博士、野澤佳世博士、滝沢由政博士、胡桃坂仁志博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となり研究が遂行されており、その寄与は十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。

最終試験の結果の要旨

氏名 西村 正宏

成績 合格

本委員会は、論文提出者に対し令和4年1月12日、学位論文の内容及び関連事項について、口頭試験を行った。

その結果、論文提出者は、生物科学特に生化学・構造生物学について博士(理学)の学位を受けるにふさわしい十分な学識をもつものと認め、審査委員全員により合格と判定した。