



| | |
|--------------|--|
| Title | 非標準核酸構造を認識するタンパク質のプロテオミクスと機能解析に関する研究 |
| Author(s) | 伴, 勇輝 |
| Citation | 大阪大学, 2025, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/101719 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

| | |
|--|--------------------------------------|
| 氏名 (伴 勇輝) | |
| 論文題名 | 非標準核酸構造を認識するタンパク質のプロテオミクスと機能解析に関する研究 |
| 論文内容の要旨 | |
| <p>デオキシリボ核酸 (DNA) は生物の遺伝情報の保存及び伝播を担う生体高分子である。通常、生体内のDNAは大部分が安定的な二重らせん構造を形成するが、特定の塩基配列上では局所的にそれとは異なる非標準核酸構造を形成する。代表的な非標準核酸構造である四重鎖構造は、これを特異的に認識するタンパク質によって動的に構造制御され、遺伝情報の転写や翻訳、DNA複製といった多様な生体プロセスの調節に関与する。したがって四重鎖構造に結合する新規構造制御因子の探索とその相互作用解析は、これらプロセスの分子機構解明や、細胞機能調節における非標準核酸構造の役割を明らかにするうえで重要である。</p> <p>本研究では、シトシンが豊富な塩基配列上で形成される四重鎖構造であるi-motif構造に注目し、これを特異的に認識するヒト由来タンパク質の網羅的探索に向けて、反応性リンカーを介して生体直交性アルキン基で修飾したDNAプローブを調製した。これを利用する指紋標的濃縮法では、タンパク質がプローブに結合または近接した際にS_N2反応が起こり、アルキン基が不可逆的にタンパク質表面に転移する。タンパク質上のアルキン基の存在は、タンパク質がDNAプローブ近傍に存在した記録であり、いわば指紋として機能する。アルキン標識されたタンパク質を濃縮しプロテオーム解析を行った結果、多数のi-motif結合候補タンパク質を同定した。中でも、核小体構成タンパク質ヌクレオリン (NCL) の生化学解析を行ったところ、NCLがi-motif構造を特異的に認識し、その構造を緩めることを明らかにした。さらに、細胞内でi-motif構造に対する機能を大規模に解析可能な系を開発した。プロテオミクスによって同定されたタンパク質群に対してこの系を適用した結果、i-motif構造の制御に関与する有望な候補タンパク質を検出した。</p> | |

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 (伴 勇輝) | | |
|--------------|--------|------|
| 論文審査担当者 | (職) | 氏 名 |
| | 主査 教授 | 岩井成憲 |
| | 副査 教授 | 中西周次 |
| | 副査 教授 | 境慎司 |
| | 副査 准教授 | 山元淳平 |

論文審査の結果の要旨

本論文は、近年注目されている特殊なDNA構造の一つであるi-motifと呼ばれる4本鎖構造に結合するタンパク質に関する研究をまとめたものである。シトシンが並んだ配列に生じるi-motifについては、グアニンが並んだ配列に形成されるもう一つの4本鎖構造であるG4と比較すると構造が不安定であるため十分に研究されていなかった。

本論文の著者は、リガンドへの親和性を利用してタンパク質とi-motif DNAの複合体を獲得することができないのは結合が弱いため単離の際に複合体が解離してしまうことが原因ではないかと考え、指紋標的濃縮法と呼ばれる技術を応用してi-motif結合タンパク質を探索した。これはi-motif DNAに反応性のリンカーを介してアルキンを付け、タンパク質が結合するとアルキンがタンパク質に移ることを利用したもので、複合体が解離してもそのタンパク質を捕えることができる。得られたタンパク質の混合物のプロテオーム解析を行った結果、多数のi-motif結合候補タンパク質を同定することができた。

次に、得られた候補タンパク質群の中からヌクレオリン (NCL) というタンパク質を選び、それが試験管内における実験で実際にi-motif DNAに結合することを確認した。タンパク質が特殊な核酸構造に結合すると、そのタンパク質は構造を安定化させる場合と不安定化して構造を解消する場合がある。i-motifを形成する鑄型DNAに対するDNAポリメラーゼのプライマー伸長反応によりNCLの効果を調べたところ、このタンパク質はi-motifを緩める機能を持つことが明らかになった。

最後に、化学発光を触媒する酵素であるルシフェラーゼの遺伝子発現系を用いて細胞内でのNCLの機能を調べたところ、細胞内においてもNCLはi-motif構造を緩める働きをすることが示された。また、この方法を用いることにより、試験管内での結合実験ではポジティブな結果が得られなかつたいくつかのi-motif結合候補タンパク質が、細胞内ではi-motifに作用してその構造を緩める働きがあることが示された。

以上のように、本論文は有機化学、分子細胞生物学、プロテオミクス等の知識と技術を活用してタンパク質-DNA相互作用の解析を行ったものであり、得られた成果は特殊な核酸構造に関する生物学研究における今後の発展につながるものであるため、博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。