



Title	Studies on DNA Structure-Specific Recognition by Proteins and Its Application to Proteomics
Author(s)	寺井, 悠馬
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82323
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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 (寺 井 悠 馬)	
論文題名	Studies on DNA Structure-Specific Recognition by Proteins and Its Application to Proteomics (タンパク質によるDNA構造特異的な認識とそれを用いたプロテオミクスに関する研究)
論文内容の要旨	
デオキシリボ核酸 (DNA) は生命の遺伝情報を担う生体高分子であり、安定的な二重らせん構造を形成している。しかし、内在性および外来性の要因は核酸塩基の化学構造やDNAトポロジーを変化させ、損傷DNAや四重鎖構造を形成する。生体機能を調節するために、生物はこれらのDNA構造を特異的に認識するタンパク質を有しており、複数の分子間相互作用を介してDNA-タンパク質複合体が形成される。その相互作用解析はDNA-タンパク間で働く分子間力の同定、さらには未知のDNA結合タンパク質の発見に貢献することが期待される。 本論文では、紫外線損傷DNAを光依存的に修復する(6-4)光回復酵素の基質認識の解明に向けて、人工核酸塩基を含むオリゴヌクレオチドと変異型酵素を用いた結合実験により、(6-4)光回復酵素で高く保存されているアルギニン側鎖がクーロン力とCH-π相互作用を介してDNA結合を担うことを明らかにした。タンパク質によるDNA構造の認識には強い相互作用だけでなく弱い相互作用も重要であることを発見した経緯から、高結合能に依存しないDNA-タンパク質間相互作用解析は未知のDNA結合タンパク質の発見に繋がると考え、DNA結合タンパク質を非可逆的にプローブ分子で標識可能なタンパク質修飾法を設計した。モデルタンパク質であるCPD光回復酵素に対して、CPD光回復酵素の光補集能を向上可能な蛍光分子を修飾させた結果、プローブ分子の非可逆的修飾だけでなくCPD光回復酵素の光依存的DNA修復能の向上にも成功した。シトシン四重鎖構造を認識するタンパク質の探索に向けて、開発したタンパク質修飾法を利用することで標的タンパク質をプローブ分子で特異的に修飾した。修飾タンパク質を対象としたプロテオーム解析の結果、これまでシトシン四重鎖構造に結合することが報告されていない複数の核酸結合タンパク質を検出した。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (寺 井 悠 馬)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	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、タンパク質によるDNAの通常とは異なる化学構造や立体構造の認識に関する研究をまとめたものである。著者はタンパク質-DNA間の弱い相互作用に着目し、タンパク質複合体においてこれまでほとんど報告がなかったCH- π 相互作用の形成を報告した。また、タンパク質がDNAを認識する際の弱い相互作用を検出する方法を開発し、それをDNAの特殊な構造の検出に応用した。

本論文の著者はまず、光を使って紫外線損傷DNAを修復する(6-4)光回復酵素の基質認識について研究した。N末端から410番目のアルギニンを置換した変異体タンパク質の調製と目的に応じて修飾を施した基質DNAの合成を行い、それらを用いることによりアルギニン側鎖と基質の間にCH- π 相互作用が形成されていることを明らかにした。

次に、CPD光回復酵素という別のDNA修復酵素をモデルタンパク質として、反応性のリンカーを介してDNAと標識化合物をつないだ基質を合成し、それを用いて酵素-基質複合体の形成に依存してタンパク質を特異的に標識する方法を開発した。標識化合物として光捕集分子を使用することにより、DNA修復活性を向上させることに成功した。

最後に、このタンパク質標識法をi-motifと呼ばれるDNAの特殊な構造を認識するタンパク質のスクリーニングに応用した。i-motifを形成するDNAに反応性のリンカーを介してビオチンを結合させ、ヒト培養細胞の核抽出液を使ってプルダウンアッセイを行った結果、これまでにi-motifに結合することが報告されていない複数のタンパク質が検出された。

以上のように、本論文は有機化学と分子生物学の両方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、得られた成果は分子細胞生物学の研究において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。