

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	李 岳
論文題目	Chemical biology studies on the structures and biological functions of nucleic acids (核酸の構造と生物活性についてのケミカルバイオロジー研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>In this thesis, we mainly focus on the DNA G-quadruplex structures as well as RNA/DNA triplex formed by long non-coding RNA with duplex DNA and their regulatory functions in the process of transcription, replication, epigenetics and human diseases. Structural characterization in vitro was performed and the biological functions of these structures were also explored.</p>			
<p>1. Photoreactivity of the linker region of two consecutive G-quadruplexes formed by human telomeric DNA</p> <p>Photoreaction method has been developed by our lab to probe the local structure of DNA including A-form DNA, B-form DNA, Z-form DNA, G-quadruplex, and DNA-protein complex. The specificity and efficiency of photoreaction are mainly dependent on the structural features of DNA. In the current study, we report the application of a photoreaction method for probing the two consecutive G-quadruplexes formed by human telomeric DNA. Distinct photoreaction efficiencies were found between two consecutive G-quadruplexes formed by eight TTAGGG repeats in K⁺ and Na⁺ solutions, suggesting the different higher-order structures formed in K⁺ and Na⁺ solutions. This method can be applied on the detection of higher-order G-quadruplexes formed by long telomeric repeats.</p>			
<p>2. Effect of ATRX and G-quadruplex formation by VNTR sequence on α-globin gene expressions</p> <p>ATR-X syndrome (alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) is caused by mutations in chromatin-remodeler ATRX. ATRX mutations and G-quadruplex formation by the VNTR sequence can be linked to alpha-thalassemia found in ATR-X patients. We investigated the G-quadruplex and i-motif formation of VNTR CGC(GGGCGGG)n. The promoter region without the VNTR sequence showed approximately two folds higher luciferase activity than the promoter region harbouring VNTR sequence, suggesting the potential gene down-regulatory role by the formed G-quadruplex structures. G-quadruplex stabilizers hemin and TMPyP4 reduced the luciferase activity whereas expression of ATRX led to a recovery in reporter activity. Our results</p>			

demonstrate that stable G-quadruplex formation by the VNTR sequence downregulates the expression of alpha-globin genes and that ATRX might bind to and resolve the G-quadruplex.

3. G-quadruplex formation in the promoter region of mouse imprinted gene Xlr3b

Another server feature of ATR-X syndrome is mental retardation. Mouse model of mutated ATRX have been constructed and the molecular mechanism of mental retardation in mouse have been investigated. Expression of imprinted gene Xlr3b has been identified in the mouse with abnormal spine morphology. We found that ATRX mutations are related to the loss of CpGs methylation in the promoter regions of Xlr3b gene but no other genes in Xlr3 family. By comparing the promoter sequences of Xlr3 gene family, G-quadruplex-forming sequence was found exclusively in the promoter of Xlr3b gene. It can form stable parallel G-quadruplex structure in vitro and stable G-quadruplex formation can downregulate the gene expression of Xlr3b gene. Therefore, we proposed that G-quadruplex-forming sequence and ATRX function are important in the repression of Xlr3b imprinted gene. The regulatory functions of G-quadruplex-forming sequence also suggested the probability of countering the abnormal expression of Xlr3b gene in ATR-X syndrome by G-quadruplex ligands.

4. RNA/DNA triplexes formation by Xist long non-coding RNA

The specific binding of ATRX to the repeat A region of Xist RNA provided an alternative molecular mechanism of mental retardation which is related to the abnormal expression of X-linked genes. Xist RNA plays important regulatory roles in the process of XCI (X chromosome inactivation). We proposed the triplex formation between Xist RNA and DNA duplex in the X chromosome. Preliminary experiments in vitro suggested that polyadenines sequence appears to form triplex with corresponding DNA. We also proposed that symmetric sequences are quite important in the formation of triplex between lncRNAs and duplex DNA. In the following steps, we will focus on the repeat A region and investigate its binding affinity towards ATRX and triplex formation. The in vivo studies of triplex formation by mouse Xist RNA will also be performed. We anticipate that triplex formation may help explain the spreading, location and regulatory mechanism of Xist RNA during XCI.

(論文審査の結果の要旨)

グアニンに富む核酸配列はグアニン四重鎖 (G 四重鎖) という構造を形成することができる。代表的な配列はヒトテロメアの (TTAGGG)_n 反復配列とプロモーター領域のグアニンに富む配列である。細胞外においてヒトテロメアの反復配列が様々な G 四重鎖を形成できるが、細胞内における構造は未だ不明である。最近、プロモーター領域の G 四重鎖は細胞内の遺伝子発現を調節することが証明された。多くのヒトの疾患は、ゲノム DNA における反復配列によって引き起こされている。この反復配列による G 四重鎖の形成はいくつかのヒトの遺伝子疾患を引き起こすことが分かっている。したがって、G 四重鎖は疾患を治療する薬剤の一つの標的となりうる。本研究では G 四重鎖と相互作用する小分子を開発し、遺伝子発現を調節できることを示した。

申請者は末端 FAM 標識された DNA を用いて、光反応によって DNA 構造を解析できることを示した。この方法を用いて G 四重鎖のループ構造によって異なる光反応効率が観察され、テロメアによって形成される G 四重鎖のループ構造を調べることを明らかにした。また、分子シミュレーションを用いて 2 つの G 四重鎖のモデルを作成し、その構造と光反応効率の関係を検討した。この方法は、細胞におけるテロメアによって形成される G 四重鎖を検出するために利用できることを示した。

ATR-X 症候群は ATRX タンパク質の変異により引き起こされる。ATRX タンパク質はクロマチンリモデラーとして、クロマチンレベルで遺伝子発現を調節することが明らかにされている。申請者は ATR-X 症候群の二つの重要な症状、 α -サラセミアと精神遅滞の分子機構について特に、ATR-X 症候群における G 四重鎖の役割の検討を行った。すなわち、プロモーター領域のグアニンに富む核酸配列が G 四重鎖を形成し、 α -グロビン遺伝子の発現を調節することを示した。また疾患 ATRX マウスモデルからも精神遅滞症に関する X1r3b 遺伝子の発現がプロモーター領域の G 四重鎖形成により制御されることを示した。また、G-四重鎖リガンドを用いて、これらの遺伝子発現を調節できることを示した。G-四重鎖リガンドは ATR-X 症候群に対する治療薬としての可能性を秘めている。

さらに、ATRX タンパク質の結合が最近明らかになった Xist RNA による X 染色体の不活性化と ATR-X 症候群の関係についても検討し、Xist RNA の三本鎖形成と X 染色体不活性化の分子機構を提案した。

以上、本論文は、光反応を用いて、ヒトテロメア DNA によって形成される 2 つの連続の G 四重鎖の構造を確認できることを示した。また、ATRX 症候群における G 四重鎖形成の役割を示した。この研究は ATRX 症候群に対する治療方法の開発に貢献すると考えられる。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成 28 年 1 月 12 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果、合格と認められた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降