

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	河本 佑介
論文題目	Synthesis and Biological Evaluation of Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes for Visualization of Telomeres (テロメアを可視化するピロール・イミダゾールポリアミドプローブの合成と生物学的評価)		
(論文内容の要旨)			
<p>ピロール・イミダゾールポリアミド(Py-Imポリアミド)は<i>N</i>-メチルピロールと<i>N</i>-メチルイミダゾールがアミド結合を介してつながった化合物で、塩基配列を認識しながら2本鎖DNAの副溝に配列特異的に結合することが知られている。2001年、Laemmliらによりテロメア繰り返し配列を標的とした蛍光性Py-Imポリアミドプローブにより、細胞のテロメア部位を可視化する手法が報告された。この方法では、テロメアの可視化に用いられることの多い蛍光in situハイブリダイゼーション法に必要な変性が不要であり、またテロメアの構造を保つことの可能な穏和な条件で簡便にテロメアを染色することができる。本研究で申請者はPy-Imポリアミドを用いたテロメア染色法の応用を目指し、Py-Imポリアミドプローブの簡便な合成法の開発を行い、また認識配列を伸ばした新たなPy-Imポリアミドプローブを合成し、テロメアに対する特異性の向上を試みた。</p>			
1, ヒトテロメアを標的としたタンデムヘアピン型ピロール・イミダゾールポリアミドプローブの新規合成法の開発			
<p>蛍光色素を連結したタンデムヘアピン型の Py-Im ポリアミドにより、化学固定した細胞のテロメアを特異的に染色する手法が報告されている。しかしこの Py-Im ポリアミドは合成が困難であるため、Py-Im ポリアミドを用いたテロメアの研究は行われてこなかった。本研究で申請者はタンデムヘアピン型 Py-Im ポリアミドの合成を簡便するため、ポリアミドの各ヘアピン部位の半分に相当する building block を液相中で合成し、それを固相合成に導入することを試みた。その結果、テロメア繰り返し配列 (TTAGGG)_n 中の 1 2 塩基対を標的としたタンデムヘアピン型 Py-Im ポリアミドを簡便に合成することに成功した。以降、このポリアミドはヘアピン部位 2 部位からなるため、タンデムダイマーと称する。蛍光ラベル化タンデムダイマーPy-Im ポリアミドプローブを用いることで、化学固定したマウス MC12 細胞及びヒト HeLa 1.3 細胞のテロメアを穏和な条件で染色することに成功した。また 4 種類の蛍光 Py-Im ポリアミドプローブを合成し、細胞染色によりその比較を行った。さらにこのポリアミドプローブを用いることで、申請者はテロメアに結合する shelterin 複合体の量とテロメアの長さは相関があることを見出した。</p>			
2, テロメア配列中の 18 塩基対を標的としたタンデムトリマー型ピロール・イミダゾールポリアミドプローブ			
特定の DNA の配列に結合する分子は、ゲノム DNA の可視化及び遺伝子発現の研究			

において重要である。そのような分子の標的配列を伸ばすことで、特異性の向上が予想される。これまで申請者はテロメア繰り返し配列中の12塩基対を標的とした蛍光性タンデムダイマー型 Py-Im ポリアミドの簡便な合成法を開発し、またそのポリアミドは穏和な条件でヒトのテロメアを可視化する蛍光プローブとして用いることが可能であることを見出してきた。本研究で申請者は更なるテロメア特異性の向上のため、三つのヘアピン部位からなるタンデムトリマー型 Py-Im ポリアミドを設計し、またその合成に成功した。タンデムトリマー型 Py-Im ポリアミドは、論文発表時点でこれまでの Py-Im ポリアミドで報告されている16塩基対よりさらに長い18塩基対を狙った物である。タンデムトリマー型 Py-Im ポリアミドを前述の12塩基対を狙ったタンデムダイマーと比べて、テロメア配列の認識能が高く、非特異的結合に由来するバックグラウンドを減らして細胞のテロメアを染色できることが分かった。

3, テロメア繰り返し配列中の24塩基対を、タンデムテトラマー型ピロール・イミダゾールポリアミドプローブで狙う

これまでの研究で申請者は二つのヘアピン部位からなりテロメア繰り返し配列中の12塩基対をタンデムダイマー型Py-Imポリアミドの簡便な合成法を開発し、また蛍光ラベル化したポリアミドプローブで化学固定した細胞のテロメアを穏和な条件で染色することに成功した。さらにより特異的なテロメア染色に向けて構造の最適化と標的配列の伸長を行ってきた。本研究ではテロメア配列を狙った、四つのヘアピン部位からなるタンデムテトラマー型Py-Imポリアミドの合成に成功した。この新たなポリアミドは有機合成可能で核酸を除いたDNA結合分子の中で、最長の24塩基対を標的としている。蛍光基でラベル化したタンデムテトラマー型Py-Imポリアミドプローブは、これまでのPy-Imポリアミドプローブより高い特異性を持ってテロメアを染色できることが分かった。申請者はさらに次世代シーケンサーを用いた解析により、このタンデムテトラマーはクロマチン構造を取っているゲノム中でテロメア繰り返し配列に結合することを確認した。

(論文審査の結果の要旨)

テロメアは染色体末端に位置するDNA-タンパク複合体であり、そのDNAは(TTAGGG)_nの反復配列からなる。その長さは細胞分裂や疾患と関連があるため、テロメアを可視化する技術は、テロメアの機能解析や疾患の治療において有用である。

申請者はDNAの副溝に塩基配列特異的に結合するPy-Imポリアミドを用いて、テロメアを可視化する技術の研究を行ってきた。まず申請者はテロメア繰り返し配列中の12塩基対を狙ったタンデムダイマー型Py-Imポリアミドの合成法を開発した。そして合成したPy-Imポリアミドの蛍光ラベル化体により、変性操作を経ることなく固定細胞のテロメアを穏和な条件で可視化することに成功した。

次に申請者は、テロメア染色におけるテロメア以外の箇所への非特異的結合を減らしてより特異的にテロメアを可視化する研究を行った。申請者は新たにテロメア繰り返し配列中の18塩基対を標的としたタンデムトリマー型Py-Imポリアミドを合成した。このポリアミドにより、前述のタンデムダイマーより非特異的結合を減らしてテロメアを染色することに成功した。

最後に申請者は更なるテロメア特異性の向上のため、テロメア配列中の24塩基対を標的としたタンデムテトラマー型Py-Imポリアミドの設計・合成を行った。このポリアミドは、これまでに報告されている核酸を除いたDNA結合性合成分子の中で最長の、24塩基対を標的としたものである。申請者はこのテトラマーを用いて前述のダイマー、トリマーより特異的に、テロメアを可視化することに成功した。また次世代シーケンサーを用いた解析により、このテトラマーはゲノム中でテロメア繰り返し配列を認識してそこに結合することを示した。

以上、本論文で申請者はテロメアを標的としたPy-Imポリアミドの合成法を開発し、またその合成法により新たにタンデムトリマー、テトラマー型Py-Imポリアミドの合成に成功したことを報告した。特にタンデムテトラマーは、核酸を除いた中で最長のDNA結合性合成分子である。また申請者はこのPy-Imポリアミドを用いて細胞内のテロメアを、穏和な条件で染色することに成功し、さらにタンデムテトラマーは最も高いテロメア特異性を示すことを報告している。一連の研究は、比較的長いPy-Imポリアミドの合成法とPy-Imポリアミドを用いた新たなテロメア染色法を提示するものであり、Py-Imポリアミドの応用範囲の拡大とテロメアの生物学的研究及び疾患の診断技術の開発につながるものと考えられる。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30年1月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降