

学位論文の要約

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)

氏名 河本 佑介

序論

ピロール・イミダゾールポリアミド(Py-Im ポリアミド)は *N*-メチルピロールと *N*-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。

1, Development of a New Method for Synthesis of Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes Targeting Human Telomeres

蛍光色素を連結したタンデムヘアピン型 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。この手法により合成した蛍光ラベル化 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 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 複合体内の TRF1 タンパクの量とテロメアの長さは相関があることを見出した。

2, Tandem trimer pyrrole-imidazole polyamide probes targeting 18 base pairs in human telomere sequences

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 1 2 塩基対を標的とした蛍光性タンデムヘアピン型 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 ポリアミドをこれまでのタンデムヘアピンと比べることで、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, Targeting 24 bp within Telomere Repeat Sequences with Tandem Tetramer Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes

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示した。