

京都大学	博士（生命科学）	氏名	平井 悠吾
論文題目	テロメアシーディングを用いた単一ヒトテロメア複製機構の分子生物学的解析		
（論文内容の要旨） 染色体末端は、遺伝情報を安定に維持するため、テロメアと呼ばれる機能的な高次構造を形成している。正常細胞では、細胞分裂を重ねる度に、テロメア DNA の短小化が起こり、いずれ非可逆的な増殖停止状態を迎える。一方、多くのがん細胞では、テロメラーゼ反応によりテロメア DNA の短小化を防ぐことで、無限回数の細胞分裂を保証している。このようにテロメアの機能は、細胞増殖と密接な関係がある。それゆえ、テロメアが細胞増殖の過程においていつどのように複製されているかについて理解することは、生物学的に意義深い。しかしながら、従来のヒト細胞を用いたテロメア複製機構の解析では、詳細な分子機構は明らかにされてこなかった。その原因としては、一つのヒト細胞には多数の染色体末端があり、かつ個々のテロメアを識別することが容易でないため、全てのテロメアを対象とした一般的な生化学的手法では、全テロメアの平均的な挙動しか明らかにできない点が挙げられる。 本研究では、ヒト細胞におけるテロメア複製機構の解明を目指し、まず、単一テロメアの挙動を追跡することが可能な解析材料の作製を行った。細胞に対してテロメア繰り返し配列を含む DNA 断片を遺伝子導入すると、新規な染色体末端を形成することが知られている(テロメアシーディング)。この際、導入する DNA 断片に含まれるユニーク配列によって、新規に形成されるテロメア(シーディングテロメア)を特異的に標識することが可能となる。そこで、HeLa 細胞に対してテロメアシーディングを行い、単一のシーディングテロメアをもつ細胞の樹立を行った。得られた細胞を用いることで、数ある染色体末端のうち単一のテロメアに焦点を当てた解析が可能となった。さらに、以下のような新規解析手法の検討を行った。まず、クロマチン免疫沈降法について、クロマチンの断片化操作を制限酵素による消化によって行う改良法を開発し、テロメア上で起こる出来事を高感度で検出することを可能にした。また、ブロモデオキシウリジン(BrdU)の取り込み実験により新生 DNA をパルス標識し、抗 BrdU 抗体を用いた免疫沈降によって単離する系を確立し、シーディングテロメアの複製時期やテロメラーゼによるテロメア合成時期を検出することを可能にした。 以上の解析材料および解析手法を用いて、まずシーディングテロメアが、DNA合成期の比較的短い間に複製することを明らかにした。次に、テロメラーゼによるテロメアDNAの伸長反応が、テロメアの半保存的複製後に行われることを示唆する結果を得た。また、テロメラーゼ触媒サブユニットTERTが、テロメアDNAの複製完了以前よりテロメアへとリクルートされる可能性を示した。更には、このTERTのテロメアへのリクルート機構が、テロメア1本鎖DNA結合タンパク質POT1によって負に制御されていることを見いだした。これらの結果は、ヒト細胞におけるテロメア領域のDNA合成反応やテロメラーゼ反応に関する時間的・空間的な制御機構の理解につながるものと期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、「テロメアシーディングを用いた単一ヒトテロメア複製機構の分子生物学的解析」と題され、第一章 序論、第二章 実験材料および実験手法、第三章 実験結果、および、第四章 考察からなる。第一章では、先ず、真核生物細胞が細胞あたり多数のテロメアをもち、それらのDNA配列が互いに類似していることから、細胞周期にわたるテロメアの挙動を、その総体として観察することの困難さを指摘し、特定のテロメアに注目して解析することの重要性を指摘している。次に、テロメアシーディング法によって、ユニークな配列を有するテロメアを細胞に導入することで、この問題の解決を図ろうとする本研究の目的を述べている。第二章において、研究手法を述べた後、第三章において研究成果を報告している。すなわち、HeLa細胞にテロメアシーディング法によって特定の配列からなる単一テロメアを導入することに成功したことを確認し、その細胞を用いてシーディングテロメアのDNA複製がS期前～中期におこることを示している。次に、抗BrdU抗体がBrdUを取り込んだ1本鎖DNAを認識することを利用して、シーディングテロメア末端に存在する1本鎖テロメアDNAが、S期中期とS期後期～G2期の二つの独立した時期に起こることを示し、前者はDNA複製反応、後者はテロメレース反応によって起きていることを示唆する結果を報告している。最後に、制限酵素を用いた新しいクロマチン免疫沈降法を開発し、これによって、テロメレースがS期前半よりテロメアにリクルートされていることを示している。以上の結果より、第四章においては、テロメアDNAが複製装置とテロメレースによって細胞周期のどの時期に合成されるのかを議論し、本研究の将来的な展望を述べている。以上の成果は、テロメアDNAの複製機構のさらなる理解に大きく寄与するものである。従って、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

平成24年2月3日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日