



TITLE:

Elucidation of the Molecular Mechanisms of Gene Expressions-Epigenetics Regulation by Chemical Biology(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sato, Shinsuke

CITATION:

Sato, Shinsuke. Elucidation of the Molecular Mechanisms of Gene Expressions-Epigenetics Regulation by Chemical Biology. 京都大学, 2020, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2020-09-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13369>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

(続紙 1)

| | | | |
|--|--|----|-------|
| 京都大学 | 博士 (理 学) | 氏名 | 佐藤 慎祐 |
| 論文題目 | Elucidation of the Molecular Mechanisms of Gene Expressions-Epigenetics Regulation by Chemical Biology (ケミカルバイオロジーによる遺伝子発現-エピジェネティクス制御の分子機構の解明) | | |
| (論文内容の要旨) <p>遺伝学は、DNA 配列の情報を研究する分野であり、親から子に遺伝子を受け継ぐ生物学的現象と遺伝子発現のメカニズムを研究する。対照的に、エピジェネティクスは、次世代への遺伝情報の伝達と DNA のヌクレオチド配列を変えずに遺伝子発現の調節を研究する分野である。主に DNA シトシンのメチル化修飾、ヒストンの化学修飾、ポリコームタンパク質およびクロマチンリモデリング因子がエピジェネティックな現象に関与していることが明らかになっている。</p> <p>本研究では、ピロールイミダゾールポリアミドと DNA オリガミ法を用いて、遺伝子発現とエピジェネティクス制御の分子メカニズムを解明することを試みた。ヒストン修飾を調節する化合物をピロールイミダゾールポリアミドにコンジュゲートし、ヒトの皮膚細胞の多能性関連遺伝子の活性化に成功した。さらに、メチルシトシンを含む DNA を標的とするピロールイミダゾールポリアミドを合成した。このピロールイミダゾールポリアミドは、DNA 上の TET1 タンパク質の結合を阻害することを明らかにした。また、原子間力顕微鏡(AFM)によって、TET1 タンパク質が、メチル化の有無にかかわらずリラックスした二本鎖 DNA に優先して結合することが示された。</p> <p>1. 「ヒト線維芽細胞の多能性遺伝子群をオンにする小分子の同定」</p> <p>HDAC 阻害剤は抗腫瘍活性を有し、細胞の再プログラミングを積極的に調節することが報告されている。ただし、これらの小分子はゲノム DNA の特定の遺伝子に選択的に作用できない。本研究では、HDAC 阻害剤 SAHA と結合した 32 のピロールイミダゾールポリアミドのライブラリを合成した。ヒト線維芽細胞を各 SAHA-PIP で処理し、評価した。興味深いことに、マイクロアレイ分析と q-PCR 分析では、SAHA-PIP (I) が Oct4、Sox2、MET 関連の遺伝子の発現レベルを主に増加させることが判明した。ChIP-qPCR および ChIP-seq により、SAHA-PIP (I) がリプログラミング遺伝子のアセチル化を増強することが確認された。DNA 配列選択性と HDAC 阻害能を持つ SAHA-PIP (I) は、リプログラミング遺伝子のプロモーター領域のアセチル化を誘導し、その結果、これらの遺伝子発現が増加することが示唆された。このツールは、遺伝子を遺伝子スイッチとして活性化するのに役立つことが期待される。</p> | | | |

2. 「mCGG サイトに向けたヘアピンピロールイミダゾールポリアミドの配向設定」

β -アラニンによるピロールの置換がいくつかのヘアピンピロールイミダゾールポリアミドの配向を変えることが報告されているが、ヘアピンピロールイミダゾールポリアミドの配向の選択性の分子基盤は不明である。本研究では、一連のヘアピンピロールイミダゾールポリアミドを合成し、メチル化 DNA への結合親和性と配向の優先順位を調べた。DNA の融点測定により、mCGG を順方向で認識すると予想された 5 つのヘアピンピロールイミダゾールポリアミドが、逆方向で DNA に結合することが明らかになった。これらの知見に基づき mCGG を逆向きに認識する 5 つのピロールイミダゾールポリアミドを設計した。Im / β ペアを含む 2 つのピロールイミダゾールポリアミドが優先的に mCGG に逆方向に結合していることが示された。また逆向きに結合するヘアピンポリアミドは、メチル化 DNA への TET1 結合の阻害に成功した。この研究は、順方向で認識が難しい場合に利用できる結合性ピロールイミダゾールポリアミド設計への道を拓いた。

3. 「DNA オリガミナノチップにおける TET を介した酸化プロセスの直接観察と分析」

DNA のメチル化と脱メチル化は、遺伝子発現の後成的制御において重要な役割を果たしている。TET 酵素はシトシンの 5-メチル基を一連の酸化反応で脱メチル化することが報告されているが、脱メチル化の分子機構は完全には理解されていない。DNA の酸化プロセスと構造因子の関係を解明するため、5mC を含む dsDNAs (二本鎖 DNA) を DNA 折り紙ナノチップに組み込み、TET による 5mC 酸化を解析した。TET 酵素の反応とその挙動は、原子間力顕微鏡(AFM)を使用した生化学分析と単一分子観察によって検討した。まず TET が dsDNA を DNA ナノチップ内の緊張した状態とリラックスした状態で酸化するかどうかを調べた。その結果、TET は 5-酸化メチルシトシンの修飾タイプに関係なく、リラックスした基質を好むことが明らかになった。驚くべきことに、TET 酵素はヘミメチル化部位より完全メチル化部位を好んだ。この分析により、高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)によるスライディングやストランド間の移動など、TET の動的な動きを直接観察することもできた。さらに、チミン DNA グリコシラーゼを介した塩基除去修復プロセスは、DNA ナノチップで特徴付けられた。このようにして、脱メチル化の酵素反応を可視化することに成功した。これは、ナノスケールでの DNA 脱メチル化機構の直接観察とその分子特性の評価に役立つ可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

エピジェネティクスとは、DNAの塩基配列情報によらない遺伝子発現制御であり、近年、ヒストン化学修飾やDNAのメチル化修飾が担っていることが報告されている。エピジェネティクスはがん、細胞のリプログラミング等、多くの生命現象に関与しており、その遺伝子発現制御機構の解明は重要である。本論文で申請者は、様々なDNA配列特異的結合性ピロールイミダゾールポリアミドを合成し、*in vitro*や細胞にて評価した。また、DNAオリガミフレームとAFMを用いて、TETタンパクのDNAへ結合やその動的ふるまいを観察した。

第1章では、ピロールイミダゾールポリアミドにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(SAHA)を連結したライブラリーを作製した。その後、ヒト繊維芽細胞を使用してスクリーニングを行った。なかでもSAHA-PIP(I)は、多能性遺伝子Oct3/4、Sox2、Nanog等を活性化していることを明らかにした。本研究では、従来のHDAC阻害剤SAHAだけでは達成できないゲノム配列特異的なアセチル化誘導を行い、初めてヒト多能性遺伝子の活性化に成功した。

第2章では、mCGG配列を認識する配列ピロールイミダゾールポリアミドを合成し、そのDNAへの結合方向性、熱安定性、親和性を評価している。従来法では順配向で標的DNAに結合するポリアミドのみを設計するが、申請者は逆配向で結合するポリアミドも同様に合成評価した。その結果、標的DNAに対して最も高い熱安定性、親和性を示したのは逆配向で結合するポリアミドであることを明らかにした。また、そのポリアミドがTETタンパクのメチル化DNAへ結合するのを阻害することをゲルシフトアッセイにて評価した。これらのことからポリアミドを設計する際に、順配向だけでなく、逆配向で設計する重要性を示した。

第3章では、DNAオリガミフレームとAFMにより、TETタンパクのメチル化DNAへの結合や動的な振舞いを観察した。申請者は、TETタンパクがリラックスした2本鎖DNAやフルメチル化DNAに好んで結合することをAFM観察により明らかにした。また、高速AFMにより、TETタンパクが物理的な過程でメチル化CpG間をスライディングすることや鎖間でジャンピングすることを観察することに成功した。

以上、申請者が新規に合成したピロールイミダゾールポリアミドによるエピジェネティクス遺伝子発現制御やDNAオリガミフレームと高速AFMによるエピジェネティック制御タンパクの直接観察は、ケミカルバイオロジー分野の発展に大きく寄与すると考えられる。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る。また、令和2年7月17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