

## 博士学位論文審査結果要旨

平成 30年 1月 25日

研究科、専攻名 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻

学位申請者氏名 BAY, DANİYAH HABIBALLAH T

論文題目 G-quadruplex structures as transcriptional regulators in *Dele* and *Cdc6* CpG islands, and as targets for DNA methylation detection (*Dele*と*Cdc6*グアニン四重鎖構造を介した転写制御機構の解析とグアニン四重鎖構造を利用したメチル化DNA検出法の開発)

### 審査結果の要旨

平成30年1月18日に東京工科大学において、学位申請者 BAY, DANİYAH HABIBALLAH T の博士学位審査公開発表会が開催され、以下の要旨に示す博士論文に関する発表と関連する質疑応答が行われた。

グアニン四重鎖(G-quadruplex: G4)とは4つのグアニン塩基がフーグスティーン型塩基対により形成される平面構造が2つ以上、スタッキング相互作用によって重なった構造であり、テロメアや遺伝子転写開始点上流、CpG アイランドで多数発見されている。先行研究により、マウスゲノム中のCpGアイランドから1998個のG4構造形成配列が同定された。その内10個のG4 (*Jard2*, *Foxa2*, *Chd4*, *Ntpcr*, *Med4*, *Bmi1*, *Wt1*, *Sp130*, *Cdc6*, and *Dele*) に関してはG4構造形成をCDスペクトル測定法やDMSフットプリンティング法により確認されているが、その遺伝子発現制御に与える影響は不明であった。また、いくつかのG4はその配列中のCpGのシトシンがメチル化されると、その構造が安定化することが報告されている。つまり、メチル化によってG4構造が安定化したことを簡便に検出すれば、DNAメチル化を簡便に検出できると考えられた。そこで、本研究ではマウスCpGアイランド中から同定された10個のG4構造の転写に与える機能を解析すること、G4構造を利用したメチル化DNA検出法を開発すること目的とした。

はじめに、10個のG4構造形成配列の転写に与える影響をレポーターアッセイにより解析した。その結果、*Foxa2*, *Chd4*, *Ntpcr*, *Med4*, *Cdc6*, *Dele* G4はエンハンサー活性を示すことが明らかになった。さらに*Cdc6*と*Dele* G4はプロモーター活性も示すことが明らかになった。さらに、G4構造に特異的に結合する化合物70TDを用いたレポーターアッセイの結果、70TDを加えると*Cdc6*と*Dele* G4のエンハンサー活性が阻害されることが明らかになった。CDスペクトル測定の結果70TDが*Cdc6* G4又は*Dele* G4に結合してもその構造に変化が無かったことから、70TDは*Cdc6* G4又は*Dele* G4構造に結合するタンパク質との相互作用を阻害していることが示唆された。

続いて、G4構造がメチル化されるとその構造が安定化することに着目し、新規DNAメチル化レベル測定法の開発を行った。本研究ではG4構造がメチル化により安定化すると、それが鋳型に含まれる場合DNAポリメラーゼによる伸長反応がG4構造上で停止すると想定した。つまり、メチル化されている場合はPCR増幅効率するため、定量PCR法を用いてPCR増幅効率を測定すれば簡便

にメチル化レベルを測定できると想定した。*VEGF*と*RET*プロモーター中のG4構造形成配列を含む領域をPCRで増幅し、それをDNAメチル化酵素によりメチル化した。そのPCR産物を鋳型に定量PCRを行った所、鋳型のメチル化レベル依存的にPCR増幅効率が減少することが示された。G4構造形成配列に変異を導入した鋳型を用いた場合は、PCR増幅効率はメチル化レベルに依存しないことから、G4構造がメチル化されるとPCR増幅効率が減少することが示された。つまり、定量PCRを行うだけで、*VEGF*と*RET*G4構造形成配列中のメチル化レベルを測定できることが示された。

最後に、G4結合タンパク質を介した*Cdc6*と*Dele*G4の転写制御機構やメチル化G4の遺伝子発現制御に与える影響に関する考察が述べられた。

本論文では*Cdc6*と*Dele*G4がエンハンサー活性とプロモーター活性を示すことを明らかにした。これらの遺伝子はアポトーシスに関連することが報告されており、今後*Cdc6*や*Dele*G4を標的とすることにより、アポトーシス異常に関連する疾患の治療薬の開発が期待できるものであった。メチル化によるG4構造の安定化を利用したメチル化DNAレベル測定法はこれまでのメチル化DNAレベル測定法と比較すると非常に簡便な方法であった。ヒトゲノムDNA中には70万箇所のG4構造形成配列が含まれることが報告されており、今後*VEGF*や*RET*G4以外の領域のメチル化レベルも本手法によって測定できることが期待された。

上記の研究に対する博士學位論文審査公開発表での発表および質疑応答は妥当なものであり、筆記試験の結果も合格と判定するに十分な点数であった。以上のことより、審査委員会は、本論文の著者に対して、博士（工学）の学位を授与するに十分な学識と能力を有していることを認めることとした。

審査委員 主査

東京工科大学 教授 軽部 征夫

