

氏 名 佐々木 飛鳥

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2084 号

学位授与の日付 平成 31年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Analysis of telomeric chromatin using pyrrole-imidazole
polyamide probe

論文審査委員 主 査 教授 木村 暁
教授 荒木 弘之
教授 平田 たつみ
教授 鐘巻 将人
主任研究員 眞貝 洋一 理化学研究所

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 Sasaki, Asuka

論文題目 Analysis of telomeric chromatin using pyrrole-imidazole polyamide probe

Mammalian telomeres consist of a long array of repetitive sequence (TTAGGG) and cap chromosome ends to maintain chromosome stability. Without the telomerase activity that can elongate the telomeres, the telomere length shortens every cell division. Upon reaching a critical short length, the telomeres trigger cellular senescence, which can suppress abnormal cell growth relating to tumorigenesis. Telomerase reactivation circumvents the growth limitation by the telomere-dependent senescence and leads to immortalization. Induction of recombination between telomeres, termed alternative lengthening of telomeres (ALT), can also lead to a similar effect leading to immortalization and tumorigenesis. In this thesis, to investigate telomeres in cancer cells by imaging, proteomics, and RNA interactome, I performed two projects: telomere visualization in tissue sections and isolation of telomere-associated noncoding RNAs.

Initially, I report a development of a telomere-visualization method in mouse and human tissue sections using PI polyamide probes. PI polyamides are DNA binding compounds that can be designed to target predetermined DNA sequences. To visualize telomeres in cultured cells and tissue sections, fluorescent in situ hybridization (FISH) method has been used as a 'standard' method. However, this method needs a DNA denaturation step for probe hybridization by harsh heating and formamide treatments, and carries the risk of destroying cellular structures which make it difficult to co-stain telomeres with a protein using an antibody. Because PI polyamides bind to the target sequences in the minor groove of double-stranded DNA without denaturation step, this compound is compatible with immunostaining and has an advantage compared to FISH method. As

collaboration with HiPep Laboratories and Prof. Sugiyama's group at Kyoto University, a fluorescent PI polyamide probe (HPTH-59) that target the mammalian telomere sequence with high specificity was developed. I showed that HPTH-59 visualized telomeres not only in cultured cells but also in mouse and human frozen tissue sections. Double staining with HPTH-59 and antibodies were performed. By quantitatively measuring the telomere length in clinical tissues from an esophageal cancer patient, I found that a cell population positive for a proliferation marker, Ki-67 protein, had shorter telomeres than do the Ki-67-negative cells in non-tumor tissue sections. From these results, I propose that PI polyamides are promising alternative for telomere labeling in cell biology as well as clinical research.

Next, I investigated the chromatin composition of telomeres. Telomeric DNA is three-dimensionally organized as chromatin, where nucleosomes are associated with non-histone proteins and RNAs. It still remains unclear how the telomeric chromatin structure regulates telomere maintenance because of limited information of telomeric chromatin composition. Although various methods were previously developed to identify telomere-binding proteins, there is still no reliable technique for unbiased identification of both proteins and RNAs including non-coding RNAs (ncRNAs) associated with telomeric chromatin. Since HPTH-59 polyamides bind to telomere DNA with high affinity in a mild condition, I expected that HPTH-59 enable us to analyze telomeric chromatin not only by imaging but also by affinity purification for proteomics and RNAomics.

To dissect the telomeric chromatin composition, I show a novel approach of locus-specific chromatin purification using a telomere-targeting PI polyamide, and named PI polyamide-based proteomics and RNA-omics of isolated chromatin segments (PI-PRICH). By applying PI-PRICH to mouse erythrocytes leukemia (MEL) cells, I was able to identify proteins known to associate with telomeres such as shelterin complex (TRF1,

TRF2, POT1, and TIN2) using mass spectrometric analysis. At the same time, I also extracted RNA fraction associated with telomeric chromatin followed by next generation-sequencing (NGS) for comprehensive identification of telomeric chromatin-associated RNAs. PI-PRiCh highly enriched (>500-folds) the well-known telomerase RNA component (TERC) and telomeric repeat-containing RNA (TERRA) bound to the telomeres.

To identify ncRNAs associated with the telomeres in human ALT cell in which telomeres are highly recombinogenic, I compared ncRNAs in ALT cells with those in telomerase positive cells. I found that several intronic ncRNAs specifically identified in ALT cells. A possible physiological role of the intronic ncRNAs will be discussed.

Finally, from my studies I emphasize that understanding the nature of telomeric chromatin in different types of cancers from various angles is important for basic and clinical aspects. In addition, I anticipate that PI polyamide will be a powerful tool for chromatin imaging and the chromatin composition analysis of other regulatory sequences.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 佐々木 飛鳥

Title
論文題目 Analysis of telomeric chromatin using pyrrole-imidazole polyamide probe

出願者である佐々木飛鳥さんは、ヒトやマウスの染色体の末端領域（テロメア）に選択的に結合する化合物を活用して、テロメア領域を従来よりも簡便かつ高感度で可視化することに成功し、さらに細胞内でテロメア領域に会合するタンパク質や RNA を回収・同定することにも成功した。

佐々木さんが用いた化合物は蛍光色素が連結されたピロール・イミダゾールポリアミド「TH-59」とその誘導体である「HPTH59」（以降 TH-59 と総称する）である。この化合物は、指導教員である前島教授らがテロメア領域を検出するために開発したものである。佐々木さんはこの化合物を用いて組織内のテロメアを検出することができることを示した。従来テロメアの検出に用いられてきた FISH (fluorescent in situ hybridization) 法は激しい変性処理を伴うため、抗体との共染色は難しかったが、本化合物を用いることによってこれらが簡便にできるようになった。さらに、佐々木さんは TH-59 を用いてテロメアを可視化した際のシグナル強度とテロメアの長さに相関があることを示した。テロメアの長さが比較的短いヒト培養細胞 (HeLaS3) と長い細胞 (HeLa1.3) を用いて、TH-59 で検出した際のシグナル強度を比較したところ、テロメアが長い細胞からのシグナルが強いことを見出した。がん細胞ではテロメアが短くなることが知られているので、本検出方法はがん細胞を見分けることができると期待された。実際に佐々木さんはヒトのがん細胞を含む組織切片を TH-59 で染色することにより、がん細胞（抗 Ki67 抗体陽性細胞）とそうでない細胞を比較して、TH-59 のシグナル強度ががん細胞で低いことを見出した。佐々木さんが確立した方法は、新たなテロメア検出法として有効であり、がん細胞の検出など応用的な価値も高い。

さらに、佐々木さんは TH-59 を用いて、テロメア領域に会合するタンパク質や RNA を回収・同定することに挑戦した。TH-59 は、従来のテロメア会合因子の探索方法で用いられてきたプローブとは異なり、非特異的に RNA に結合することはない。佐々木さんは TH-59 のこの特徴を生かして、テロメア領域に会合する RNA を同定することを狙った。そして、ホルムアルデヒドで固定した細胞の染色体を抽出・断片化した後に、デスチオビオチンが連結された TH-59 を作用させて結合因子群を濃縮する手法を開発した。佐々木さんは開発した手法を PI-PRICH (PI polyamide-based proteomics and RNA-omics of isolated chromatin segments) と名付けた。この手法を MEL (マウス白血病由来) 細胞に適用したところ、既知のテロメア会合タンパク質および RNA の同定に成功し、本手法の妥当性が示された。

本手法で、テロメアに会合する RNA が同定できたことから、佐々木さんはテロメア領

域が、テロメラーゼ（テロメア合成酵素）の活性化によって維持されている細胞(HeLa1.3)と、遺伝的組換えによって維持されている ALT(alternative lengthening of telomeres)細胞(U2-OS)について、テロメア領域に会合している RNA に違いがないかを検討した。すると、ALT 細胞のテロメア領域から PI-PRICH 法で回収した RNA にはイントロン由来の非コード RNA がいくつか特異的に含まれていた。ALT 細胞ではテロメア領域が非テロメア領域と組換えを起こしていることが知られている。このことから佐々木さんは、ALT 細胞で得られたイントロン由来の非コード RNA は、対応するイントロン近傍にテロメア配列が DNA 組換えで挿入されたことを示唆しているのではないかと考えた。実際に、佐々木さんは同定された非コード RNA に対応する DNA 配列とテロメア配列が ALT 細胞の染色体では DNA 組換えにより隣接して存在していることを実験的に証明した。さらに、染色体末端のテロメア領域と、本研究で同定した非コード RNA が蓄積する領域が核内で共局在することを発見した。このことは、テロメア領域が染色体内部の領域と特異的に相互作用しているという ALT 細胞の新規な特徴を示唆する。この共局在を検討する実験においては、本研究の前半部で開発した細胞内でのテロメア可視化手法が効果的に用いられた。

本研究は、老化やがん化と関係が深いテロメアの機能解析を大きく前進させる画期的な成果である。研究の一部はすでに英文国際誌に受理されている。学位論文は明快な英語で書かれている。以上の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。