

Title	細胞におけるDNA修復反応の蛍光検出に関する研究
Author(s)	梶, 達也
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34535
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (梅 達 也)	
論文題名	細胞におけるDNA修復反応の蛍光検出に関する研究
論文内容の要旨	
<p>近年、molecular beacon (MB) の原理を多様に応用して、生命現象に関わる様々な物質ないしは反応が蛍光により検出されている。このような蛍光検出法は、<i>in vitro</i>アッセイの簡便化や迅速化に貢献するだけでなく、生体内反応の可視化や臨床診断への応用が期待されている。本論文は、酸化DNA損傷であるチミングリコール (Tg) に対する塩基除去修復 (BER) 反応および紫外線DNA損傷である(6-4)光産物に対するヌクレオチド除去修復 (NER) 反応を細胞内で蛍光検出するためのプローブ、ならびにこれらを用いた蛍光検出法の信頼性を向上させるトランスフェクションレポーターについて記述したものである。はじめに、BERの開始段階であるDNAグリコシラーゼ/APリナーゼによる鎖切断反応を検出するためのプローブの開発を行った。プローブはMBの原理を応用して、中央にTgを含む13塩基対のヘアピン型DNAを基本骨格とし、その両末端にフルオレセインとDabcylを取り付けたものである。また細胞内での非特異的な分解を抑制するために、両末端およびループ部分にphosphorothioateを使用した。このプローブを用いて、細胞抽出液ならびに細胞内におけるBERの鎖切断反応を蛍光検出することに成功した。その過程において、フルオレセインを繋ぐリンカーに結合したリン酸ジエステル結合が細胞内で切断されることを発見し、この反応を利用してMB型のプローブが細胞に導入されたかどうかを確認するトランスフェクションレポーターの開発を行った。最後に、NERにおける鎖切断段階を検出するためのプローブの開発を行った。直鎖型および環状型のプローブを設計して細胞におけるNERの検出を行ったところ、後者を用いた場合に細胞内におけるNERの鎖切断反応を蛍光検出することが可能であった。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (梅 達 也)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	岩 井 成 憲
	副 査	教 授	北 山 辰 樹
	副 査	教 授	田 谷 正 仁
	副 査	准教授	倉 岡 功

論文審査の結果の要旨

DNAは生体内外の種々の要因により化学反応を受けるため、その化学構造は常に変化する可能性がある。しかしながら、すべての生物においてDNA修復機構が機能することにより正常な遺伝情報の伝播が維持されている。酸化損傷のような比較的小さい化学構造の変化に対しては塩基除去修復（BER）が、紫外線損傷のような比較的大きい構造変化に対してはヌクレオチド除去修復（NER）が働く。DNA修復の研究は、主として試験管内における生化学的実験により調べられてきた。NERに関してはそれが機能しない遺伝性疾患である色素性乾皮症（XP）が存在し、被検者の細胞に紫外線照射を行って放射性同位元素を取り込ませる方法がXPの診断法として知られている。

申請者は、モレキュラービーコン型プローブを用いて細胞中におけるこれらのDNA修復反応を蛍光により検出する方法を開発した。損傷を認識して鎖切断を起こすDNAグリコシラーゼ/APリナーゼによるBERについては酸化損傷を有するヘアピン型オリゴヌクレオチドを用い、リン酸ジエステル結合をフォスフォロチオエート結合に変換することによって細胞中でのヌクレアーゼ耐性をもたせたが、その際に蛍光色素や消光剤のリンカー中のリン酸部分にも修飾が必要であることを見出した。また、その部分の分解を利用して、偽陰性の結果を防ぐためのトランスフェクションレポーターを開発した。NERに関しては、直鎖状のDNAでは非特異的分解により修復反応を検出できなかったため、プラスミド型のプローブを作製して紫外線損傷塩基ならびに細胞の修復能に依存した蛍光の検出に成功した。

本研究で開発された方法により、DNA修復の研究が大きく進展することが期待される。また、細胞のNER能の蛍光検出はXPの診断への応用が可能であるだけでなく、従来法のように細胞を紫外線照射しないためNERを特異的に解析する方法として基礎研究にも有用である。よって、博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。