

Title	Toward Elucidating the Function of Non-canonical DNA Structures using Selective DNA-interacting Ligands(Abstract_要旨)
Author(s)	Asamitsu, Sefan
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2019-03-25
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k21584
Right	学位規則第9条第2項により要約公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	朝光 世煌
論文題目	Toward Elucidating the Function of Non-canonical DNA Structures using Selective DNA-interacting Ligands (選択的DNA結合性リガンドを用いた非標準型DNA構造の機能解明へ向けて)		
(論文内容の要旨)			
<p>DNAは通常ワトソン・クリック塩基対を組んで二本鎖構造を形成しており、遺伝情報の担い手として細胞核内に存在している。一方で、近年の研究により、DNAが二本鎖とは別の非標準型の高次構造をとることがわかってきた。興味深いことに、この非標準型DNA構造はがんや遺伝子疾患と深く関わっていることが明らかになってきており、疾患治療ターゲットとしても注目されている。このようなDNAの高次構造を識別し特異的に結合する合成リガンドは、疾患メカニズム解明のための化学ツールや治療薬としての応用が期待できる。本論文ではDNAヘアピン構造やグアニン四重鎖構造が遺伝子発現に与える影響に着目し、DNA塩基配列特異的に結合することができるピロール・イミダゾールポリアミド (PIP) を基盤とした、リピート塩基配列や高次構造を特異的に認識することが可能な合成分子の創生とそれらを用いた疾患関連遺伝子の発現調節に関する研究を行った。</p>			
1. Sequence-specific DNA alkylation and transcriptional inhibition by long-chain hairpin pyrrole imidazole polyamide-chlorambucil conjugates targeting CAG/CTG trinucleotide repeats			
<p>ゲノム上には無数のリピート配列が存在する。ある特定の位置に存在するリピート配列は、通常の二本鎖DNAからヘアピン構造を形成する性質を持ち、そのリピート数の増加を促進させる。拡張したリピートに由来する異常な転写産物によってハンチントン病や筋強直性ジストロフィーといった遺伝子疾患を発病する。当該遺伝子の発現を抑制し、異常転写産物の産出を抑えることが治療効果につながると考えられる。</p> <p>そこで申請者は上記の遺伝子疾患の原因リピートであるCAG/CTGトリプレットリピート配列に選択的に結合しアルキル化することが可能な合成分子PIP-クロラムブシルコンジュゲート (以下、コンジュゲート) を設計・合成した。このコンジュゲートはリピート配列に結合するよう設計したPIP部位とDNA架橋剤であるクロラムブシルで構成した。まず合成したコンジュゲートの標的リピート配列への結合能を表面プラズモン共鳴法 (SPR法) によって評価し、高い結合能を有することを確認した ($K_D = 11 \text{ nM}$)。次にリピート配列特異的アルキル化能をDNA切断アッセイにより評価したところ、リピート配列優先的なアルキル化が確認できた。このリピート配列優先的なアルキル化が転写に与える影響を調べるために、<i>in vitro</i>系の転写実験を行った。その結果、コンジュゲートを作用させることによりリピート配列領域でRNAポリメラーゼの進行が阻害されることが分かった。これらの結果は、本研究で設計・合成したコンジュゲートの、CAG/CTGリピート由来疾患の新規治療薬剤としての可能性を提示している。</p>			

2. Ligand-Mediated G-Quadruplex Induction in a Double-Stranded DNA Context by Cyclic Imidazole/Lysine Polyamide

非標準型DNA構造の一つであるグアニン四重鎖（以下、G4）は、ゲノム上に広く存在することが知られており、DNAの転写・複製・修復などの過程で形成することが知られている。このG4はがん遺伝子のプロモーター領域に多く存在しがんと関連が示唆されており、この構造に結合するG4結合性リガンドは新たな薬剤としての可能性を秘めている。

本研究では、G4構造に特異的に結合する合成リガンドの開発を行った。前項で言及したPIPの骨格を利用して、4つのイミダゾールと2つのリシンからなる環状イミダゾールリシンポリアミド（以下、cIKP）を設計・合成した。このcIKPに対してSPR法を用いたG4結合能・選択性評価を行った結果、cIKPは通常の二本鎖DNAには結合せず、種々のG4構造に対して解離定数 $K_D = 4-90$ nMという高い結合能をもつことを見出した。さらにcIKPは二本鎖DNAの状態からG4構造を誘起する効果を持つことをゲルシフトアッセイにより確かめた。この実験結果は、cIKPがゲノム上の比較的不安定なG4でも強く安定化し、より効果的はG4安定化による遺伝子発現抑制が期待できることを示唆している。

3. Simultaneous Binding of Hybrid Molecules Constructed with Dual DNA-Binding Components to a G-Quadruplex and Its Proximal Duplex

前項の結果を踏まえて、特定のG4に対する選択性を獲得したG4結合性リガンドの開発を目指した。その戦略として、標的G4に近接した二本鎖DNAを選択的に認識するようデザインしたPIPと前述したcIKPとを連結させたハイブリッド分子を設計・合成した。その結果、最適なリンカー長を持つハイブリッド分子において、G4と近傍二本鎖DNAとを同時に認識することができることを見出した。この分子をより詳細に評価したところ、最も結合する可能性のあるoff-target DNAと比較して、標的G4対して約4.5倍の結合能を持つことを見出した。さらにこの効果的な結合による遺伝子発現抑制効果をG4形成が示唆されているc-myc遺伝子のプロモーター用いたin vitro 転写系で評価した。その結果、cIKP単体では遺伝子抑制効果は見られなかったのに対し、ハイブリッド分子では60%程の遺伝子抑制効果が観測された。このことはハイブリッド分子のG4と二本鎖DNAへの同時結合が効果的に転写因子の結合を阻害していることを意味した。このハイブリッド分子によるリガンド設計戦略は、PIP部位の設計を変えることにより任意のG4の選択的ターゲティングを行うことができる可能性がある点でさらなる展開が期待できる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ゲノム上には通常のB型二重らせん構造以外に多くの非標準型DNA構造が形成されることが知られており、がんなどといった多くの疾患との関連性が明らかになってきている。しかしながらこれらの詳細な分子メカニズムは未だされていない部分が多く、疾患治療薬・診断薬の開発の障壁となっている。本論文では塩基配列特異的に二本鎖DNAに結合するピロール・イミダゾールポリアミド (PIP) を分子基盤として、ゲノム上の特徴的な塩基配列や特殊構造に特異的に結合する合成分子の開発研究を行った。

第一章では、トリプレットリピート病と呼ばれる遺伝子疾患に見られるトリヌクレオチドリPEAT DNA配列を選択的にアルキル化することができるPIP-クロラムブシルコンジュゲートの開発を行った。その中でコンジュゲートによるリピート優先的なアルキル化によって、責任遺伝子上のリPEAT領域でRNA合成を阻害することを無細胞系において確認した。本研究はPIPがトリヌクレオチドリPEAT配列に対してデザイン可能であることを示し、疾患治療薬や疾患メカニズムの解明を可能とする分子ツールとしての応用が可能であることを提示した。

第二章では、PIPの骨格を利用することによって、がんや神経疾患の創薬ターゲットとして注目されているDNAの高次構造、グアニン四重鎖構造 (G4) に特異的に結合することができる合成分子、環状イミダゾール・リシンポリアミド、cIKPを開発した。このcIKPは二本鎖DNAと平衡関係にあるG4配列を正しく認識し結合することができ、疾患治療薬や分子プローブとしての発展が期待できる。また本研究は二本鎖DNA結合性のPIPがDNAの高次構造を特異的に認識するようデザイン可能であることを示したものであり、PIPの分子ツールとしての機能を拡張させた点においても意義深い。

第三章では、PIPの持つ塩基配列選択性とcIKPのG4特異性を組み合わせることによって、ゲノム上の特定G4構造の選択的ターゲティングに関して検討した。これらの結合モチーフを好適リンカーによって連結させたハイブリッド分子が、ゲノム上の最も結合の可能性のあるオフターゲットDNAと比較して、標的G4に対して4.5倍もの選択性を持つことを見出した。またこのハイブリッド分子による効果的な遺伝子発現抑制効果を実証した。本研究における新しいリガンド設計戦略によって、今まで実現できなかったゲノム上の個々のG4構造の識別を可能にした点は特筆に値する。

以上のように、本論文において、疾患に関連するDNAの塩基配列・構造を選択的に認識することができる新規合成リガンドの設計・合成を行い、その有用性の評価を行った。本研究によって創生されたりガンドやそのリガンド設計戦略は、非標準型DNAを作用機序とする様々な疾患を解明するケミカルツールや医薬品の開発研究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、平成31年1月15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