

学位論文の要約

題目 Development of DNA-binding Synthetic Molecules Toward Selective Gene Regulation and Cell Fate Control

(DNA 結合性合成化合物による選択的な遺伝子発現制御と細胞の運命制御の検討)

氏名 谷口 純一

序論

DNA は生物が遺伝情報を配列として保存し継承する媒体物質である。生命活動のためには、ゲノム DNA の機能単位である遺伝子が適切に発現調節される必要がある。ヒトのような多細胞生物では、ほぼすべての細胞が同一の配列のゲノム DNA を有しているにもかかわらず、細胞の種類によって異なる遺伝子発現パターンを示す。これは DNA の配列そのものだけでなく、DNA のメチル化やヒストンの翻訳後修飾によるエピジェネティックな制御によって遺伝子の発現パターンが決定されるからである。実際、幹細胞が特定の細胞系譜へ分化するのに重要なエピジェネティック制御や遺伝子発現制御が次々と明らかにされている。また、細胞内で転写因子を強制発現させることにより、遺伝子発現パターンを変化させて iPS 細胞をはじめとする様々な細胞を直接誘導できることもわかってきた。したがって細胞内で任意の DNA 配列を標的としエピジェネティック状態や遺伝子発現を制御できる技術は、細胞の運命制御を可能にするツールとして有効であると考えられる。この目的のため、配列選択的に DNA へ結合するプラットフォームとして Zinc finger や TALE、CRISPR/Cas9 といったタンパク質、またピロールイミダゾールポリアミド (PIP) のような合成化合物が開発・研究されている。

1. Distinct DNA-based epigenetic switches trigger transcriptional activation of silent genes in human dermal fibroblasts (DNA 結合性エピジェネティックスイッチ分子はヒト皮膚繊維芽細胞において発現していない遺伝子の転写を活性化する)

ヒストンのアセチル化は遺伝子発現の活性化状態と関連する。SAHA などのヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤は、間接的にヒストンのアセチル化を誘導するため、遺伝子発現を上昇させるための薬剤になりうる。しかし DNA 配列による遺伝子選択性は有さない。DNA 配列選択的な遺伝子発現を活性化する分子として、杉山らは SAHA と PIP を結合

させた化合物 SAHA-PIP を報告した。それぞれ異なる配列選択性を持つ 32 種の SAHA-PIP が合成されたが、そのほとんどの機能は未知であった。そこで本研究では 32 種の SAHA-PIP が細胞の遺伝子発現へ与える影響を調べることを目的とした。

ヒト皮膚繊維芽細胞へ各 SAHA-PIP を処理し、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。32 種のうち 26 種において、100 以上の遺伝子を 10 倍以上活性化したことがわかった。クラスタリング解析の結果、認識配列の異なる SAHA-PIP がそれぞれ別々の遺伝子群を発現上昇させたことが明らかとなった。次に遺伝子群の機能解析を行った結果、発現上昇した遺伝子のいくつかは特定の組織に関連することがわかった。これらの遺伝子は通常繊維芽細胞では発現しておらず SAHA-PIP によって効果的に活性化することが、定量 PCR によって確かめられた。

以上より SAHA-PIP は DNA 配列選択性の違いによって異なる遺伝子を発現上昇させることが明らかとなり、細胞の運命制御や疾病治療への応用可能性が示唆された。

2. A synthetic DNA-binding inhibitor of SOX2 guides human induced pluripotent stem cells to differentiate into mesoderm (DNA 結合性の SOX2 阻害剤はヒト人工多能性幹細胞から中胚葉への分化を誘導する)

ヒト人工多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) は体を構成する三胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) 全てに分化することのできる細胞である。これまでに、ヒト iPS 細胞の特定細胞系譜への分化させることを目的として、シグナル因子を作用させる方法や転写因子の導入により遺伝子発現を直接制御する方法など、様々な方法が開発されてきた。近年ではタンパク質などの生体由来因子を用いる代わりに合成化合物が多く利用されるようになっており、生体由来因子に比べて低コストであること、扱いが容易であること、外来生物由来の不純物が入らないことなどの長所を持つ。実際にタンパク質を標的としシグナル経路を調節する化合物が多く開発されてきた。一方、遺伝子発現を直接制御する化合物による分化誘導は達成されていなかった。そこで本研究では、特定の DNA 配列へ結合する化合物によるヒト iPS 細胞の分化誘導制御を目的とした。標的の分化として、遺伝子発現などの分子機構に関する知見が比較的多い中胚葉の誘導を選択した。

ヒト iPS 細胞から中胚葉への分化においては、転写因子 SOX2 の発現減少が重要であることが知られる。実際、SOX2 をノックダウンした際に中胚葉関連遺伝子の発現が上昇することが報告されている。このことに基づいて、SOX2 が結合する DNA 配列を標的とし、SOX2—DNA 結合を阻害する 2 つの PIP (PIP-S1、PIP-S2) を設計した。In vitro のゲルシフトアッセイにより、PIP-S2 が効果的に SOX2—DNA 結合を阻害することが確かめられた。そこで PIP-S2 を分化培地中でヒト iPS 細胞を処理したところ、PIP-S2 処理群において中胚葉マ

一カー遺伝子である **BRACHYURY** を含む種々の中胚葉関連遺伝子の有意な発現上昇が確認された。一方で **SOX2** の発現は減少した。このことから、**PIP-S2** がヒト iPS 細胞から中胚葉を誘導することが明らかとなった。次に、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行ったところ、**SOX2** が上流因子として予測され、**PIP-S2** が細胞内でも **SOX2** を阻害していることが示唆された。最後に、**PIP-S2** 処理によって得られた中胚葉に **Wnt/ β -catenin** 経路の阻害剤を処理し培養を継続した結果、分化誘導開始 12 日目に自発収縮を行う心筋細胞を得ることに成功した。

以上のことから、**PIP-S2** はヒト iPS 細胞で分化誘導を制御する初めての DNA 結合性合成化合物であることが示された。**PIP** の標的配列は変更可能であるため、本研究と同様の戦略により他の細胞系譜の分化誘導への応用も期待される。

3. Targeted acetylation of nucleosomes by introducing artificial histone codes of acetylation at specific DNA sequences (DNA 配列特異的な人工ヒストンコードの導入による標的ヌクレオソームのアセチル化修飾)

真核細胞のゲノムにおける領域特異的なヒストンアセチル化修飾は遺伝子発現活性化において重要な役割を果たしている。しかしながらヌクレオソーム選択的にアセチル化を人為的に制御する技術は確立されていない。細胞内でのアセチル化制御機構の一つに、アセチル化リジン選択的に結合するブロモドメインを介したアセチル化修飾の伝播が提唱されている。すなわち、**P300** などのブロモドメインを有するヒストンアセチル基転移酵素タンパク質は、そのブロモドメインが既存のアセチル化リジンへ結合し近傍のリジンに新規アセチル化修飾を導入するというものである。本研究ではこのアセチル化修飾の伝播システムを利用して標的ヌクレオソームへアセチル化修飾を導入する化合物の開発と評価を行った。

CBP/P300 のブロモドメインへ選択的に結合するブロモドメイン阻害剤と **PIP** を結合させることでブロモドメイン阻害剤—**PIP** コンジュゲート (**Bi-PIP**) を設計、合成した。再構成ヌクレオソームを用いた評価実験により、**P300** 存在下において **Bi-PIP** はその標的配列を有するヌクレオソームの **H3** を選択的にアセチル化した。すなわち、**Bi-PIP** は標的ヌクレオソームへ結合し、ブロモドメイン阻害剤を介した **P300** のリクルートによりアセチル化を促進したと考えられる。**Bi-PIP** は任意の DNA 配列へ配置可能な「人工ヒストンコード」と捉えることができ、人為的なエピジェネティック制御への応用が期待される。