

# 学位論文の要約

題目

Development of Sequence-Specific DNA Binders for the Therapy of Mitochondrial Diseases  
(ミトコンドリア病根治薬を目指した塩基配列選択的 DNA 結合性化合物の開発)

氏名 日高 拓也

## 1. Introduction

ミトコンドリア病は遺伝性の代謝疾患であり、核 DNA あるいはミトコンドリア DNA の変異によるミトコンドリアの機能障害により引き起こされる。成人において約 5000 人に 1 人の割合で発症し、その多様な症状は患者の Quality of Life を著しく損なうが、根治的療法はいまだなく対症療法が中心である。CRISPR/Cas9 や zinc finger nuclease、transcription activator-like effector nuclease (TALEN)のような遺伝子編集技術の進歩はミトコンドリア病の遺伝子治療の可能性を提示したが、発現ベクターのゲノムへのランダムな組換えやウイルスベクターの使用が課題となっている。そこで塩基配列選択的 DNA 結合能を有するピロールイミダゾールポリアミドを用いて DNA を制御することで、化学的アプローチによるミトコンドリア病の根本的治療の可能性を検討した。

## 2. Creation of a Synthetic Ligand for Mitochondrial DNA Sequence Recognition and Promoter-Specific Transcription Suppression

ピロールイミダゾールポリアミドによるミトコンドリア DNA の配列認識を可能にするため、ピロールイミダゾールポリアミドにミトコンドリア透過ペプチドを導入した MITO-PIP を開発した。MITO-PIP はミトコンドリア集積性を示し、DNA 融解温度測定による結合能評価では配列選択的 DNA 結合能が認められた。またミトコンドリア DNA にある Light strand promoter 内の mitochondrial transcription factor A (TFAM) 結合サイトを標的とした MITO-PIP は HeLa 細胞において下流遺伝子の発現を抑制し、培養細胞内におけるミトコンドリア DNA への配列選択的結合とそれによる転写制御が可能であることが示唆された。

## 3. Allele-Specific Replication Inhibition of Mitochondrial DNA by MITO-PIP Conjugated with Alkylation Reagent

ミトコンドリア DNA におけるグアニンからアデニンへの一塩基変異について、変異ミト

コンドリア DNA 選択的な複製阻害を実現するため、MITO-PIP にアデニン選択的 DNA アルキル化剤であるクロランブチルを導入した。HeLa S3 細胞にて同定された変異(m.8950G>A)を標的とした化合物は標的のアデニンを選択的にアルキル化することがキャピラリー電気泳動による評価で明らかとなった。またこの化合物を HeLa S3 細胞に処理して定量 PCR 法による正常型および変異型ミトコンドリア DNA の定量を行ったところ、変異型ミトコンドリア DNA の減少が認められた。

#### 4. Enhanced nuclear accumulation of pyrrole-imidazole polyamides by incorporation of the tri-arginine vector

ミトコンドリア DNA の変異に加え、核ゲノムの変異もミトコンドリア病治療における重要な標的である。これまでもピロールイミダゾールポリアミドの応用は核ゲノムを標的にしたものが多かったが、その核内輸送効率はさまざまな因子(例えば分子サイズや細胞種など)に影響され、十分な化合物が安定して核内に蓄積しないことがピロールイミダゾールポリアミドの細胞応用における課題となっていた。私はアルギニン残基 3 つからなるペプチドがピロールイミダゾールポリアミドの細胞内取り込みおよび核内輸送を促進することを明らかとした。SOX2 結合配列を標的としたピロールイミダゾールポリアミドを例として、転写抑制に必要な化合物濃度がトリアルギニンベクターの導入により格段に低減できることを示し、またこれまで輸送効率の問題により実現できていなかったがん遺伝子 *HER2* の発現抑制をトリアルギニン導入ピロールイミダゾールポリアミドにより達成した。