

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	日高 拓也
論文題目	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)		
(論文内容の要旨)			
<p>ミトコンドリアは真核細胞における細胞内小器官の1つであり、特に細胞代謝において重要な機能を持つ。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。成人患者の場合、その80%がミトコンドリアDNAの変異により引き起こされるとされており、その根本的治療のためには、細胞内の変異ミトコンドリアDNA量を減らす必要がある。これまで変異配列選択的にDNAを切断するようプログラムされた制限酵素や zinc finger nuclease、transcription activator-like effector nuclease (TALEN)のようなヌクレアーゼをミトコンドリアに導入する手法が提案され、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の転写及び複製を制御することで、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。</p> <p>まず、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アルギニンとシクロヘキシルアラニンからなる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。アルギニンのみを導入したものでは核局在性が見られた一方、透過ペプチドを導入したMITO-PIPはミトコンドリア集積性を示した。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 (ND6) の発現を抑制し、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ことから、培養細胞内におけるMITO-PIPの配列選択的ミトコンドリアDNA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。</p> <p>次に、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、アデニン塩基に対し高い反応選択性をもつDNAアルキル化剤、クロランブシルをMITO-PIPに導入した。HeLa S3細胞にて同定された変異 (m. 8950G>A) に隣接する配列に結合するよう設計されたクロランブシル導入MITO-PIPは、新たに確立されたキャピラリー電気泳動によるin vitro評価において、標的のアデニン変異を選択的にアルキル化することが明らかとなった。この化合物をHeLa S3細胞に処理し、定量PCR法により正常および変異ミトコンドリアDNAの定量を行ったところ、変異ミトコンドリアDNAの減少が濃度依存的に認められた。これは従来分子生物学的アプローチでしか実現できなかったミトコンドリア病の遺伝子治療に対して化学的アプローチを提供し、より安全な遺伝子治療につながると期待される。</p>			

以上の研究ではミトコンドリアDNAの変異に着目していたが、核DNA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。これまでピロールイミダゾールポリアミドは、核内遺伝子の発現を制御する人工遺伝子スイッチとして応用されてきた。しかし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、標的となるDNA配列など)に影響され、in vitro評価で効果が見られた化合物でも、低い取込み効率により細胞評価では効果が得られない可能性がある。そこで、ピロールイミダゾールポリアミドの細胞内取込みおよび核内輸送を促進するトリアルギニンベクターを同定した。まず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、トリアルギニンベクターにより細胞取込みおよび核内輸送が促進されることをフローサイトメトリーおよび蛍光観察により示した。またトリアルギニンベクターの持つ正電荷により、負電荷をもつDNAと非選択的に相互作用する可能性が考えられたが、異なる配列を標的とするコントロール化合物を用いたゲルシフトアッセイにより、トリアルギニンベクターはピロールイミダゾールポリアミドの配列選択性を損なわないことを示した。さらに、下流遺伝子の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、細胞取込みの促進により細胞内機能が強化されることを明らかにした。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を用いてAP-2転写因子のDNA結合を阻害することにより達成した。このベクターは非常にシンプルな構造を持ち、ピロールイミダゾールポリアミドに簡単に導入できることから、多様な細胞応用を可能にすると期待される。

以上の研究はミトコンドリア DNA および核 DNA の人工的な転写・複製制御を実現し、ミトコンドリア病治療に対し新たな化学的アプローチを提供するものと考えられる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は細胞内小器官であるミトコンドリアの機能を制御するピロール-イミダゾールポリアミド(PIP)について生物化学的検討を行なったものである。ミトコンドリアは ATP 産生などを代表とする様々な細胞代謝機能に関わっており、その機能不全がミトコンドリア病とよばれる数多くの疾患の原因になっている。ミトコンドリアは独自の DNA をもっており、ゲノム DNA と協調しながら働いている。しかしミトコンドリアの機能と制御については不明な点が多く、そのためミトコンドリア病治療薬の開発はあまり進んでいない。

1 章では、DNA 塩基配列選択的結合分子である PIP をミトコンドリア DNA へ送達するため、PIP にミトコンドリア透過ペプチドを導入した MITO-PIP を合成し、ミトコンドリア集積性を検討した。その結果、ミトコンドリア透過ペプチドを導入した MITO-PIP は優れたミトコンドリア集積性を示した。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(ND6)の発現を抑制することが明らかとなった。

2 章では、変異ミトコンドリア DNA 選択的な複製阻害について検討した。特に、アデニン塩基に対して高い反応選択性をもつ DNA アルキル化剤、クロランブシルを MITO-PIP に導入し、細胞への作用を検討した。その結果、クロランブシル導入 MITO-PIP は *in vitro* の評価において、標的のアデニン変異を選択的にアルキル化することが明らかとなった。さらに、この化合物を HeLa S3 細胞に処理し、定量 PCR 法によって正常、および、変異ミトコンドリア DNA の定量を行ったところ、変異ミトコンドリア DNA の減少が濃度依存的に認められた。

3 章では、PIP の細胞内取込み、および、核内輸送を促進するトリアルギニンベクターを開発した。その研究成果の一環として、SOX2 結合配列を標的とする PIP にトリアルギニンベクターを導入することによって、細胞取込み、および、核内輸送が促進されることをフローサイトメトリー、および、蛍光観察を用いて確認した。また、トリアルギニンベクターは PIP の配列選択性を損なわないことや、下流遺伝子の転写抑制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明らかにした。さらに、トリアルギニン導入 PIP を用いて AP-2 転写因子の DNA 結合を阻害することによって、これまで輸送効率の問題により実現不可能だったがん遺伝子 *HER2* の発現抑制を達成した。このベクターは非常に単純な構造を持ち、PIP に簡単に導入できることから、将来的に多様な細胞応用を可能にすると期待される。

以上の研究は、ミトコンドリア DNA や核内 DNA の人工的な転写・複製制御を実現し、ミトコンドリア病治療に対して新たな化学的アプローチを提供するものであり、生物化学分野の発展に大きく寄与するものと考えられる。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、令和3年1月19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