

学位論文の要約

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)

氏名 朝光 世煌

0. 序論

DNA は通常ワトソン・クリック塩基対を組んで二本鎖 DNA 形成し、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ことができる合成リガンドは、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。本研究では 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、塩基配列や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。

1. **Sequence-specific DNA alkylation and transcriptional inhibition by long-chain hairpin pyrrole imidazole polyamide-chlorambucil conjugates targeting CAG/CTG trinucleotide repeats**
(CAG/CTG リpeat配列を標的とした長鎖ヘアピン型 PIP-クロラムブシルコンジュゲートによる配列選択的アルキル化と転写阻害)

ゲノム上には無数の反復配列が存在する。ある特定の位置に存在する反復配列は、通常の本鎖DNAからヘアピン構造を形成する性質を持ち、そのリpeat数の増加を促進させる。拡張したリpeat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。そこで我々は上記の遺伝子疾患の原因リpeatである CAG/CTG リpeat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からなる。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 ($K_D = 11$ 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、*in vitro* 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。

2. Ligand-Mediated G-Quadruplex Induction in a Double-Stranded DNA Context by Cyclic Imidazole/Lysine Polyamide (環状イミダゾール・リシンポリアミドによる二本鎖 DNA 上におけるグアニン四重鎖構造の誘起)

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し得る。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いだした。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 (デュアル DNA 結合性ハイブリッド分子によるグアニン四重鎖と近接二本鎖の同時結合)

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、好適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。