

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	みのしま まさふみ 蓑島 維文
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成22年 3月 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 ・ 専 攻	理学研究科化学専攻
(学位論文題目) Design of Sequence-Specific DNA Binding Molecules for Regulation of Gene Expression (遺伝子発現制御に向けた配列特異的 DNA 結合分子の設計)	
論 文 調 査 委 員	(主査) 杉山 弘 教授 三木 邦夫 教授 藤井 紀子 教授

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏 名	蓑 島 維 文
論文題目	Design of Sequence-Specific DNA Binding Molecules for Regulation of Gene Expression (遺伝子発現制御に向けた配列特異的 DNA 結合分子の設計)		
(論文内容の要旨)			
DNA に結合する小分子はDNA に関わる機能を阻害することから、現在も抗がん剤などの薬剤として使われている。これらの中でも、抗生物質のディスタマイシンを基に設計されたピロールーイミダゾールポリアミドはDNA の塩基配列を自在に認識する興味深い性質を有している。本論文において申請者は、ピロールーイミダゾールポリアミドの性質を利用し、狙った配列でのアルキル化反応が細胞内の遺伝子発現制御を引き起こすことができるかどうかを目指し以下の[1]～[4]の内容について研究を進めた。 [1] アルキル化剤の塩基配列認識能の拡張 申請者は、細胞内で内在性の遺伝子発現を抑える選択性を出すためには、認識できる塩基配列の数を上げることが重要だと考え、「アルキル化能を有するポリアミド」－「ポリアミド」間でのヘテロダイマーを形成する系を設計した。その結果、2分子の共存下で最長10塩基対を認識するDNA アルキル化の観察に成功した。 [2] ポリアミドの結合におけるシトシンメチル化の影響 ピロールーイミダゾールポリアミドは転写因子のDNA に対する結合を阻害することにより、遺伝子発現を制御することが示されている。転写因子はプロモーター領域に結合するが、この領域にあるシトシンーグアニン繰り返し配列中のシトシン塩基の多くにはメチル化が起こっている。そこで申請者はポリアミドの結合がシトシンのメチル化によってどのように影響するか表面プラズモン共鳴法を用いて評価した。その結果、シトシンのメチル化によってポリアミドの結合が3倍程度上昇するということが明らかとなった。 [3] がん細胞で発現している特徴的な遺伝子を狙ったアルキル化剤の設計 がん細胞で発現している特徴的な遺伝子を狙うアルキル化能を有するポリアミドの開発を行った。標的とした遺伝子の1つはヒストンH4遺伝子であり、一部のがん細胞での過剰発現が示されている。申請者はヒストンH4遺伝子のコード領域を基に配列を設計し、米国、スクリプス研究所のGottesfeldグループと共同で細胞毒性、遺伝子の発現について評価した。その結果、ポリアミドによるアルキル化がヒストンH4遺伝子の発現を顕著に低下させ、強い活性が出たことが明らかとなった。 [4] ポリアミドとアルキル化剤のコンジュゲート体の種々の設計と比較評価 申請者はアルキル化剤として <i>seco</i>-CBI ならびにクロラムブシルを用い、ポリアミドと連結させ種々のコンジュゲート体を合成した。それぞれのコンジュゲート体について DNA アルキル化能、配列特異性、細胞毒性を調べ比較した。その結果、クロラムブシルを連結させたポリアミドはその連結位置によって異なる反応性と配列特異性を示した。クロラムブシルを連結させたポリアミドは <i>seco</i>-CBI を連結させたものと同等の DNA に対する反応性を示したが、細胞毒性は大きな差があることが明らかとなった。			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

細胞内の2本鎖DNA鎖を共有結合によりアルキル化したり、DNA鎖を切断するブレオマイシンなどの化合物が、臨床において抗がん剤として広く使われている。しかしこれらの抗がん剤はDNA塩基配列の識別能がないためにがん細胞だけでなく正常細胞に対して同様に強い毒性を示し、重篤な副作用を引き起こすという深刻な問題を引き起こしている。

ゲノムプロジェクトの完了と分子生物学の急速な進歩によって、がんや遺伝病を含む多くの疾病がDNA配列レベルで理解されるようになってきた。これらのゲノム情報を生かした診断、治療、予防が期待され、これに向けての研究が急速に進んでいる。申請者が合成に用いているPy-Imポリアミドは、抗生物質によるDNAの塩基配列の読み取り機構を詳しく解析することによって生まれた画期的な分子である。

申請者は、本論文においてPy-ImポリアミドにCBIやクロラムブシルなどのアルキル化剤に結合させ、パートナー分子が存在する時にのみヘテロダイマーを形成し、配列特異性を有する新規アルキル化剤の合成に成功した。さらに、これらのアルキル化剤が高いDNA配列特異性とがん細胞への強い細胞増殖抑制能を持つことを示した。またスクリプス研究所のゴテスフェルド博士のグループとの共同研究を実施し、生細胞中で、ヒストンH4C遺伝子の二本鎖領域を標的とするアルキル化剤の開発し、配列特異的遺伝子発現の制御にも成功している。また、Py-Imポリアミドがメチル化されたシトシンを含む配列にも強く結合することも初めて実験的に証明し、DNAがエピジェネティックな修飾を受けていても、Py-ImポリアミドがDNAに結合することができ遺伝子スイッチとして利用できることを示した。

また、ゲノム上の特定遺伝子に対する選択性を獲得するためには、より長いDNA塩基配列を認識するアルキル化剤の開発が必須である。申請者が示した新規アルキル化剤の合成は、ポリアミド部分の固相合成法と有機的に組み合わせることによって、これまでの研究においてネックとなっていたアルキル化ポリアミド合成の複雑さと煩雑さを一挙に解決した。これによって、これまでと比べ飛躍的に長い塩基配列を認識するアルキル化剤の合成が可能となり、長鎖DNAを選択的にターゲッティングするアルキル化を可能にした画期的な研究とすることができる。また、この手法により多種多量のポリアミド合成も同時に可能となり、アルキル化剤としての用途だけでなく、遺伝子診断ツールや特定遺伝子の発現の選択的制御剤など、Py-Imポリアミド研究の応用の幅を大きく広げた。

これらの結果は学位論文として価値のある研究と言える。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22年1月20日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。