

^<5m>CG塩基対を認識し3本鎖DNAを形成可能にする人工核酸の開発とメチル化DNAを標的とした新たな人工的遺伝子発現制御法への展開

納富，亮大朗

<https://hdl.handle.net/2324/7182414>

出版情報：Kyushu University, 2023, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：

権利関係：Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名 : 納富 亮大朗

論文題名 : 5mCG 塩基対を認識し 3 本鎖 DNA を形成可能にする人工核酸の開発とメチル化 DNA を標的とした新たな人工的遺伝子発現制御法への展開

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

3 本鎖 DNA は、3 本鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO) によって 2 本鎖 DNA を部位特異的に認識することで形成する高次構造であり、アンチジーン法 (遺伝子転写阻害) をはじめゲノム標的ツールとして幅広い展開が期待されている。天然核酸で構成される TFO は、2 本鎖 DNA 中の GC や AT 塩基対に対して核酸塩基が安定な水素結合を介して認識を行うが、CG および TA 塩基対に対して安定な水素結合を形成できる天然の核酸塩基が存在しないため、これらの障害部位を含む配列では安定な 3 本鎖 DNA 形成が阻害されてしまう。そのため、任意の 2 本鎖配列に対して安定な 3 本鎖 DNA を形成するためには、障害部位を認識可能な人工核酸の開発が必要である。一方で、DNA 内のシトシン塩基がメチル化修飾されて発生する 5-メチルシトシン (5mC) は、生体内でエピジェネティックに遺伝子発現を調節しているため、 5mC を含む 2 本鎖 DNA を標的とする戦略は新たな核酸医薬への展開が期待できる。しかし、これからの 5mCG 塩基対もまた 3 本鎖 DNA 形成の障害部位であるため、本研究では 5mCG 塩基対を認識可能な人工核酸を開発し、3 本鎖 DNA 形成配列をメチル化 DNA 領域まで拡張することを目的とした。

本研究では、当研究室で報告された CG 塩基対を認識可能な $\text{MeAP-}\Psi\text{dC}$ の構造を基に MeAP-d(Y-H) を開発した。この人工核酸は $\text{MeAP-}\Psi\text{dC}$ で考えられた 5mC のメチル基との立体障害を回避することを目的としたが、その親和性は低かった。 5mCG 塩基対への親和性を向上させるために、本研究では新たに 2-アミノ-2'-デオキシネブラリン (dAN) を基本骨格とした dAN 誘導体を開発した。この中で Aminoethyl-dAN は一部の TFO 配列において 5mCG 塩基対を高い親和性で認識したが、その親和性は配列に依存し塩基対選択性にも課題が残った。そこで、この dAN 誘導体のリンカー構造を最適化することで配列一般的に高い親和性での認識を期待した dN 誘導体を新たに開発した。この中で水素結合ユニットとしてグアニジノ基を導入した Guanidino-dN は、任意の配列で CG, 5mCG 塩基対のみを高い親和性で認識した (Fig. 1)。

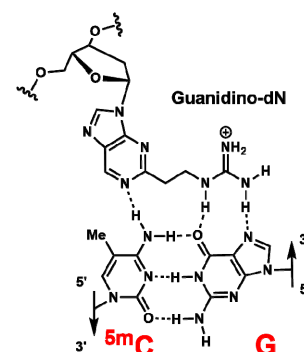


Fig. 1 5mCG 塩基対を安定に認識可能なGuanidino-dN

この人工核酸の開発によりメチル化 DNA 領域を標的とした 3 本鎖 DNA 形成が可能になったため、3 本鎖形成を用いた新たな応用研究を行った。まずは、 5mC を標的とする TET 酵素の活性

を標的配列への 3 本鎖形成によって阻害できることを実証し、人工核酸を含む TFO による 3 本鎖 DNA 形成がメチル化 DNA 領域へのタンパク質の接近を阻害することを明らかにした。この結果から、次にゲノム遺伝子を標的とした TFO による人工的な遺伝子発現制御を実施した。標的遺伝子には *RASSF1A* を設定し、そのプロモーター領域を標的として CG 塩基対の相補位置に Guanidino-dN を組み込んだ TFO-Z を合成した。この TFO が設定した *RASSF1A* プロモーターの標的配列に安定な 3 本鎖 DNA を形成できることをゲル電気泳動によって明らかにし、その安定性は Guanidino-dN の代わりに T を含む天然型 TFO-T よりも高かった。この TFO を HeLa 細胞にトランスフェクションし RT-PCR によって *RASSF1A* の遺伝子転写産物を定量したところ、人工核酸を組み込んだ TFO は高濃度で *RASSF1A* の転写量を減少させ、遺伝子転写抑制効果を示した (Fig. 2)。

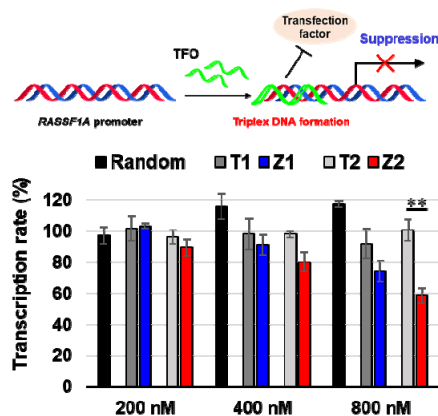


Fig. 2 TFOによるHeLa細胞での遺伝子転写抑制

次に、*RASSF1A* のプロモーター領域の CpG 部位が高メチル化状態にある A549 細胞と MCF-7 細胞において、同じ TFO をトランスフェクションし *RASSF1A* の遺伝子転写産物を定量した。その結果、人工核酸を含む TFO-Z をトランスフェクションした A549 細胞では *RASSF1A* 遺伝子の転写量が増加し、MCF-7 細胞の場合には TFO-Z は約 4.5 倍まで *RASSF1A* 遺伝子の転写を活性化した (Fig. 3)。TFO-Z によって大幅な標的遺伝子の活性化を示した MCF-7 細胞に対するさらなる調査として、ウェスタンブロッティングによる *RASSF1A* タンパクの定量を行った。

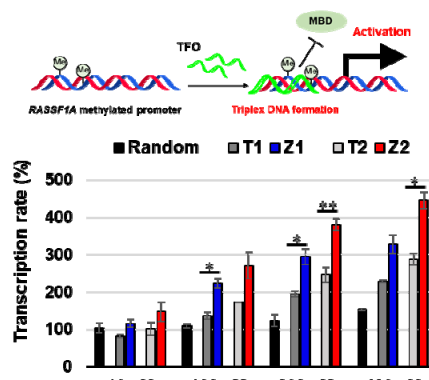


Fig. 3 TFOによるMCF-7細胞での遺伝子転写活性化

その結果、TFO-Z をトランスフェクションした細胞では *RASSF1A* タンパク量の増加が確認された。本研究で標的とした *RASSF1A* は癌抑制遺伝子であり、細胞増殖やアポトーシスに関わっている。そのため、TFO によるこの遺伝子発現の活性化が癌細胞の増殖に与える影響を調査した。その結果、TFO-Z をトランスフェクションした細胞では MCF-7 細胞に対して増殖抑制効果を示した (Fig. 4)。この抑制効果の原因を探るために、RNA-seq による大規模な遺伝子変動を解析した。その結果、TFO-Z をトランスフェクションした細胞では乳癌のアポトーシスを誘引する方向にいくつかの遺伝子発現が変動しており、その影響で MCF-7 細胞への増殖抑制効果を示した可能性がある。

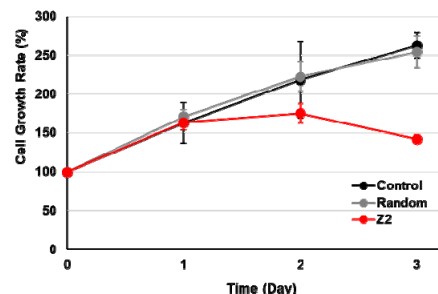


Fig. 4 TFOによるMCF-7細胞への増殖抑制効果

今後は、本研究で開発した人工核酸をもとにさらなる 3 本鎖 DNA 形成配列の拡張が進み、新たな核酸医薬創出への展開につながることを期待する。