九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

^<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)

KYUSHU UNIVERSITY

氏　　名	納富亮大朗
論　文　名	^{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
論文調査委員	主　査　　九州大学　教授　　王子田　彰夫 副　査　　九州大学　教授　　大嶋　孝志 副　査　　九州大学　教授　　平井　剛 副　査　　九州大学　准教授　麻生　真理子

論 文 審 査 の 結 果 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（^{5m}C）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、^{5m}C 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、これからなる ^{5m}CG 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 ^{5m}CG 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ていた。

本論文では、研究室で報告された CG 塩基対を認識可能な ^{Me}AP-ΨdC の構造を基に ^{Me}AP-d(Y-H)を開発した。この人工核酸は ^{Me}AP-ΨdC で考えられた ^{5m}C 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。^{5m}CG 塩基対への親和性を向上させるために、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 Amino-dAN は一部の TFO 配列において ^{5m}CG 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な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, ^{5m}CG 塩基対のみを高い親和性で認識した。この目的の人工核酸の開発について、機能性分子としてのさらなる展望、類似研究へ今回の結果がどう貢献できるのかについて議論及び審査を行った。

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ていた。まずは、^{5m}C 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ていた。標的遺伝子には *RASSF1A* を設定し、その高メチル化されたプロモーター領域を標的として ^{5m}CG, 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-Z が設定した *RASSF1A* メチル化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 *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 MCF-7 細胞にトランスフェクションし、24 時間培養した後、RT-PCR によって *RASSF1A* の遺伝子転写産物を定量した。その結果、TFO をトランスフェクションした細胞では *RASSF1A* 遺伝子の転写量が増加し、人工核酸を含む TFO-Z は天然型である TFO-T より有意に標的遺伝子の転写を活性化した。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、ウエスタンブロッティングによる RASSF1A タンパクの定量を行っていた。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ていた。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。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ていた。その結果、TFO-Z をトランスフェクションした細胞では細胞周期・アポトーシスに関連する多く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。この結果について、TFO による標的遺伝子の転写活性化効果をさらに向上させるための工夫や条件最適化について議論及び審査を行った。

以上の論文審査の過程をもって博士の学位に値すると認める。