The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on Trinucleotide Repeat Disease using Repeat-Binding Molecules
Author(s)	Li, Jinxing
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56051
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　Li Jinxing　）	
論文題名	Studies on Trinucleotide Repeat Disease using Repeat-Binding Molecules (リピート結合分子を用いたトリヌクレオチドリピート病に関する研究)

論文内容の要旨

The expansion of trinucleotide repeat (TNR) sequences in human genome caused more than 40 hereditary neurological disorders. The CAG repeat in the coding region of protein huntingtin caused Huntington disease. The toxic RNA, CUG repeat lead to Myotonic dystrophy type 1. Trinucleotide repeats RNA was an important target for drug development. To develop small molecules targeting the trinucleotide repeats, and to analyze the binding assay of repeats was a promising approach for treating these neurological disorders.

In Chapter 1, We designed, synthesized, and carried out the binding assay of 2,9-diaminoalky substituted linker-1,10-phenanthroline (**DAP**), which selectively bound to r(CUG)$_9$ repeat. **DAP** bound to r(CUG)n repeat in vitro by effecting the relative translational efficiency in dual-reporter luciferase assay. The structure-relationship study and simulation study gave the critical information of the proposed binding model, which **DAP** might be bind to r(CUG)$_9$ repeat of U-U mismatch region. **DAP** could be used as a lead motif for molecular structure modification. The modified dermic molecule **DDAP** was developed in Chapter 2, which dramatically increased the binding affinity of r(CUG)n repeat. Dermic molecule **DDAP** improved splicing defects in DM1 cell culture. **DDAP** was developed as a potential drug to figuring out the DM1. A systematic structure-binding study of **NA** to CAG repeats was conducted in Chapter 3. One derivative **NBzA** modified by incorporating an additional ring to the azaquinolone was found to bind to CAG repeat. All studies suggest **NBzA** is an important molecule for further improvements to achieve higher affinity and selectivity to r(CAG)n repeats. In Chapter 4, a series of phenanthroline dimeric molecule was developed. One derivative **APCD** selectively bound to d(CCG)n repeat. The molecular design, synthesis, and study of new molecule, 2-aminophenanthoroline selectively stabilized Cytosine-bulge containing duplex DNAs was described in Chapter 5. 2-aminophenanthoroline binding unit was a novel effective molecular element for the binding to single nucleotide bulge and base mismatch.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　LI JINXING,　リ　キンセイ　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	中谷　和彦
	副 査	教授	加藤　修雄
	副 査	教授	梶原　康宏

論文審査の結果の要旨

申請者は、リピート結合分子を用いたトリヌクレオチドリピート病に関する研究に取組み、以下の成果を上げている。

1）CUG リピート結合分子の設計及び合成

神経変成疾患の一つである Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) 発症の原因となる CTG リピートの転写産物である CUG リピートは、スプライシング因子である MBNL1 等を取り込む Toxic RNA として機能する。MBNL1 と競合して CUG リピートに結合する低分子は、DM1 の発症、症状の改善に効果を発揮する可能性を持つ。申請者は 2,9-dialkylaminophenanthroline(DAP)誘導体を設計、合成し、この分子と CUG リピートとの相互作用を表面プラズモン共鳴法 (SPR)、融解温度変化、CD スペクトル、滴定型等温熱量分析、ESI-TOF-MS 分析などにより解析し、DAP が CUG リピートに結合することを明らかにした。さらに、CUG リピートへの結合が及ぼす翻訳過程への影響を見積もるために、Renilla ルシフェラーゼとホタルルシフェラーゼの間にリピート配列を挿入したレポータアッセイ系を立ち上げ、DAP の CUG リピート配列への結合がリピート下流の翻訳を抑制することを明らかにした。また、対照化合物との比較により、２つのアミノアルキル置換基が CUG リピートへの結合に必要であることを示した。

2）CUG リピート結合分子の展開

申請者は DAP の CUG リピートへの結合は、生物活性を期待する上で不十分と判断し、より強い結合能のを持つ低分子の獲得を目指し、DAP の二量体の合成とその活性評価を進めた。合成した化合物の内、DDAP は CUG リピートを固定化したセンサーを用いる SPR 分析により、見かけ上の解離定数 51 nM を示す、CUG リピート結合分子で有ることを明らかにした。さらに、DDAP は DM1 細胞モデルにおいて、Atp2a1 splicing における Exon 22 のスキッピングを改善する効果を示すことを明らかにした。

3）CAG リピート結合分子の改良

CAG リピートに結合する分子 NA について、構造活性相関を詳細に検討し、芳香環部位を拡大した NBzA を合成し、その芳香環部位の効果が CAG リピート DNA と CAG リピート RNA では異なることを明らかにした。

4）シトシンバルジ結合分子の創製

三環性のシトシンバルジ結合分子を設計、合成し、三環性の構造がバルジ認識に効果的であることを示した。

上記の成果は、トリヌクレオチドリピート病に関わる DNA、RNA リピートに結合する小分子の合理的設計に繋がる貴重な実験結果を提示すると同時に、そのような分子を実際に創製できることを実証しており、高く評価できる。よって本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。