

Title	Studies on molecules binding to CUG trinucleotide repeat targeting Myotonic Dystrophy type 1
Author(s)	松本, 惇
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72656
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (松本 惇)

論文題名
 Studies on molecules binding to CUG trinucleotide repeat targeting Myotonic Dystrophy type 1
 (1型筋強直性ジストロフィーを標的としたCUGトリヌクレオチドリピート結合分子に関する研究)

論文内容の要旨

ヒトゲノム中の三塩基の繰り返し配列の異常伸長は一連の遺伝性の神経変性疾患トリヌクレオチドリピート病の原因になることが明らかとなっている。成人の8千人に1人程度が有するDMPK遺伝子中のCTGリピート配列の伸長は筋強直及び筋萎縮を特徴とする難病指定の1型筋強直性ジストロフィー(DM1)を発症する。CTGリピートから転写されて生じたmRNAのCUGリピートは、核内のスプライシング制御因子の一つ、MBNL1を捕捉し、凝集体を形成する。その結果、核内の活性MBNL1濃度の低下、及び特定遺伝子群の選択的スプライシング異常による遺伝子発現低下により、DM1病態発症につながる(図1左)。DM1は遺伝性疾患であるため根本的な治療法は存在せず、その症状緩和や発症抑制等の患者のQOLを改善する治療法が求められている。近年DM1モデルマウスでMBNL1の強発現によるスプライシングパターンの回復が示され(C. M. Chamberlain et al., *Hum. Mol. Genet.*, 2012, 21, 4645)、核内のMBNL1の機能回復がDM1の治療に繋がることが明らかとなった。本研究ではCUGリピート結合分子を開発し、結合分子によりCUGリピートに捕捉されたMBNL1を競合阻害し、凝集体から解離させることでMBNL1の機能回復を狙った治療戦略を計画した(図1右)。

によるスプライシングパターンの回復が示され(C. M. Chamberlain et al., *Hum. Mol. Genet.*, 2012, 21, 4645)、核内のMBNL1の機能回復がDM1の治療に繋がることが明らかとなった。本研究ではCUGリピート結合分子を開発し、結合分子によりCUGリピートに捕捉されたMBNL1を競合阻害し、凝集体から解離させることでMBNL1の機能回復を狙った治療戦略を計画した(図1右)。

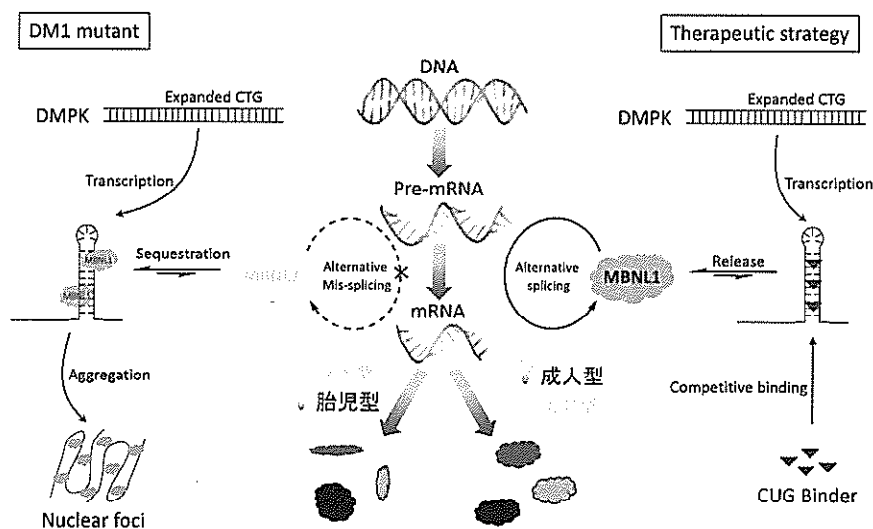


図1. 1型筋強直性ジストロフィー(DM1)発症機構(左)及びCUGリピート結合分子を用いた治療戦略(右)

Chapter 1ではチミンやウラシルの持つ水素結合ドナーとアクセプターが交互に並ぶ水素結合面を効果的に認識する分子ユニットとして1*H*-pyrrolo[3,2-*h*]quinolin-8-amine (PQA, 図2)の設計及びその誘導体の合成を行った。SPR測定・ITC測定の結果、PQA誘導体はd(CTG)₉に対して10 μM程度の見かけの解

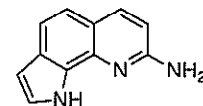


図2. PQAの構造式(Chapter 1)

離定数(K_D)での結合を示した。しかし、PQAリガンドはC-Cミスマッチを有するd(CCG)₉に対しても同程度の親和性を示したため、標的塩基の識別には更なる構造の最適化が必要であることが明らかとなった。

Chapter 2ではCUGリピートに選択的に結合する1,3-ジアミノイソキノリン誘導体PPDIQを開発した(図3)。CUGリピートに形成されるU-Uミスマッチのウラシルがフリップアウトした構造に着目し、その時に形成される空間をリガンドの結合サイトとして利用しシミュレーションソフトウェアMaestro上で分子設計を行った。SPR測定よりPPDIQはr(CUG)₉に $K_D = 1.6 \mu\text{M}$ で結合し、これは他のRNAリピート配列との親和性より20倍以上強く、PPDIQはCUGリピートに選択的に結合することが明らかとなった。また、PPDIQはシミュレーションで用いたRNA構造のように、ウラシルをフリップアウトさせた状態で複合体を形成していることがヒドラジンを用いたRNAのケミカルプロービングの結果より明らかとなった。また、種々の構造活性相関やシミュレーション、構造解析の結果から核酸塩基部位だけでなく周囲の官能基の認識を利用した、新たな分子設計への知見を得た。続いてMBNL1と放射標識したr(CUG)₉を混合して形成させた複合体をゲル電気泳動で解析した。PPDIQの添加によりMBNL1から解離したr(CUG)₉のバンド強度が上昇することから、*In vitro*においてPPDIQのMBNL1-CUGリピート複合体の形成阻害効果を確認した。

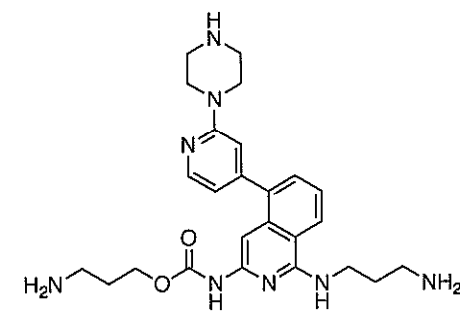


図3. PPDIQの構造式(Chapter 2)

Chapter 3では二分子のPPDIQをアミドリンカーで連結させた二量体DPPDIQ(図4)の開発と*In vivo*での生物活性評価を行った。DPPDIQはSPR測定からr(CUG)₉に対して $K_D = 200 \text{ nM}$ で結合し、PPDIQより効率的な結合を示した。また、DPPDIQはPPDIQとは異なるSPRプロファイルを示し、二量化によるr(CUG)₉との結合状態・複合体構造の変化が示唆された。DPPDIQをDM1患者から抽出された筋芽細胞に添加した際、DM1の特徴として表れるMBNL1とCUGリピートとの凝集体の解消が観察され、細胞内におけるMBNL1とCUGリピートの相互作用阻害効果が示唆された。続いてDM1モデル細胞・マウスにDPPDIQを投与したところ、MBNL1が関わる遺伝子の選択的スプライシングの改善が観測され、細胞内に加えて生体内でもリガンドによるMBNL1-CUGリピートの相互作用の阻害及びMBNL1の機能回復に成功した。これらの結果はDPPDIQがDM1治療薬開発へのリード化合物となりうることを示している。

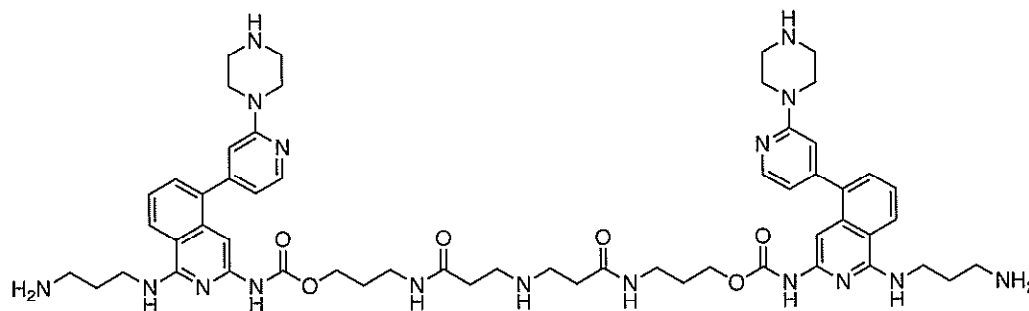


図4. DPPDIQの構造式(Chapter 3)

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (松本 惇)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	中 谷 和 彦
	副 査	教 授	梶 原 康 宏
	副 査	教 授	北 條 裕 信

論文審査の結果の要旨

申請者は、遺伝性疾患の一つ、1型筋強直性ジストロフィー(DM1)を引き起こすCUGトリヌクレオチドリピートに結合する低分子創製に関する研究に取り組み、以下の成果を上げている。

1) チミンやウラシルが持つ水素結合面を効果的に認識する分子ユニットPQAの設計及び合成

交互に並んだ水素結合ドナーとアクセプター間での分子間水素結合形成において、分子間の静電反発を低減させる水素結合形成モチーフとして、1H-pyrrolo[3,2-h]quinolin-8-amine (PQA)を設計・合成した。PQA誘導体は標的のCTGリピートに解離定数10 μ M程度の結合能を示した。しかし、PQAリガンドはCCGリピートに対しても同程度の親和性を示したため、標的塩基の識別には更なる構造の最適化が必要であることを明らかにした。

2) イソキノリンを基本骨格とした新規CUGリピート結合分子PPDIQの創製

CUGリピートのU-U mismatchesを結合部位とし、イソキノリンを基本骨格とした新規リガンドPPDIQを設計・合成した。PPDIQはCUGリピートに解離定数1.6 μ Mで結合した。また、一つのU-U mismatchesと1:1の結合量論比で複合体を形成していることを明らかにした。また、In vitro実験系において、PPDIQがCUGリピートとスプライシング因子MBNL1の複合体を解離させることも明らかにした。

3) PPDIQの二量体DPPDIQの創製及びDM1細胞及びマウスにおけるスプライシング異常の改善

CUGリピートへの結合能・選択性のさらなる向上を目指し、PPDIQを二量化したDPPDIQを設計・合成した。DPPDIQはPPDIQより約10倍強い結合能を有し、標的配列に対して高い結合選択性を示した。また、DPPDIQはDM1モデル細胞・患者細胞・マウスモデルにおいてMBNL1の機能回復を促し、疾患に特徴的な選択的スプライシングの異常を改善することを明らかにした。

上記の成果は、RNAの構造を認識する小分子リガンドが合理的に設計可能であることを実証し、更に、リガンドがCUGリピートに捕捉されたMBNL1を解放することで、スプライシング機能を回復させDM1の病態改善につながることを示唆することを明らかにしており、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。