



Title	Study on novel naphthyridine tetramers targeting GGGGCC repeat
Author(s)	Lu, Yihuan
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/72659">https://hdl.handle.net/11094/72659</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## Abstract of Thesis

Name ( Yihuan Lu )	
Title	Study on novel naphthyridine tetramers targeting GGGGCC repeat (GGGGCCリピートを標的とする新規ナフチリジンテトラマー創製に関する研究)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Abnormal expansion of GGGGCC (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>) repeat in <i>C9orf72</i> gene is the common genetic cause of two devastating neurological diseases, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). Development of effective small molecules targeting G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat may prove a promising strategy for diseases diagnosis, regulation and/or treatment.</p> <p>We first described the development and evaluation of ligands targeting DNA (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub>. An array of G-G mismatches is present in hairpin d(G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, which is the target of our molecules. Using naphthyridine carbamate dimer (NCD) as an effective G-G mismatch binder, we designed and synthesized novel naphthyridine carbamate tetramers (NCTXs), <i>p</i>-NCTB and NCTPU with extended linkers, targeting multiple guanines in d(G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> repeat. NCTPU both bound to single G-G mismatch and d(G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> without big difference. <i>p</i>-NCTB bound to DNA G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat where two 5'-CGGG-3'/5'-CGGG-3' sequences in hairpin duplex of G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat were simultaneously recognized by <i>p</i>-NCTB to provide an inter-strand binding complex with short repeat sequence. Increasing repeat lengths of G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat allowed <i>p</i>-NCTB to bind through an intra-strand binding mode with a higher binding affinity than short G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat. And the intra-strand binding complex showed higher thermal stability than the inter-strand complex. Moreover, <i>p</i>-NCTB showed binding selectivity to long G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat. These results suggested <i>p</i>-NCTB would be a good ligand targeting expanded G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat that are causative of ALS/FTD.</p> <p>Binding of ligands to RNA G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat was also examined. The ligands showed favorable binding to RNA hairpin G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat, which was similar with the binding of ligands to DNA G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat. 5'-CGGG-3'/5'-CGGG-3' in RNA hairpin G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat is responsible for ligand binding.</p> <p>After the binding evaluation of ligands to DNA and RNA G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeats, we</p>	

explored the ligands' effect on G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat transcription in vitro. NCD, *p*-NCTB and NCTPU showed inhibition effect on G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat transcription. NCTPU showed inhibition even on short repeat sequence. *p*-NCTB showed inhibition selectivity to long GGGGCC repeat transcription. The longer the repeat sequence, the stronger effect of *p*-NCTB. The toxicity assay revealed lower toxicity of *p*-NCTB and NCTPU than NCD. These results suggested *p*-NCTB would be an effective ligand which could selectively inhibit long G<sub>4</sub>C<sub>2</sub> repeat transcription with low cellular toxicity.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 ( Lu Yihuan )		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 教授	中谷和彦
	副査 教授	深瀬浩一
	副査 教授	高尾敏文

## 論文審査の結果の要旨

学位申請者 Lu Yihuan 君は、遺伝性の筋萎縮性側索硬化症(ALS)/前頭側頭型認知症(FTD)の原因となる異常伸長した GGGGCC6 塩基反復配列(G4C2 リピート)を標的とする新規分子の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) DNA の GGGGCC リピート配列に結合する新規ナフチリジン四量体の創製及び結合評価

種々のナフチリジン四量体を設計・合成し、新規ナフチリジン四量体 p-NCTB が、DNA の G4C2 リピート配列に結合することを見出した。p-NCTB は、G4C2 リピート配列の形成するヘアピン型二次構造のうち、G-G ミスマッチを含む 5'-CGGG-3'/5'CGGG-3' を認識すること、2つのヘアピン構造を含む鎖間複合体を形成すること、反復数の大きい G4C2 リピートに選択的な結合特性を有することを明らかにした。

## 2) DNA の GGGGCC リピート配列とナフチリジン四量体の結合様式解析

DNA の G4C2 リピート配列に対する p-NCTB の結合様式を、質量分析、ヒドロキシルアミンを用いる構造プロービング等により解析を行った。認識部位である 5'-CGGG-3'/5'CGGG-3' に対して、1:1 の化学量論比をもち、シトシン塩基がフリップアウトした複合体であることを明らかにした。

## 3) DNA の CGG リピート配列に結合する新規ナフチリジン四量体の結合評価

p-NCTB は、孤立した CGG 配列には結合しないこと、鎖間複合体形成により CGG リピート配列に結合することを見出した。

## 4) RNA の GGGGCC リピート配列とナフチリジン四量体の結合評価

p-NCTB が、RNA の G4C2 リピート配列に結合することを見出した。RNA の G4C2 リピート配列が形成するヘアピン型二次構造を認識し、鎖間複合体を形成することを明らかにした。

## 5) ナフチリジン四量体による GGGGCC リピート配列の転写抑制

RNA の G4C2 リピートは、毒性 RNA として働き ALS/FTD に病理機構に重要であると考えられる。p-NCTB を用いて、in vitro 転写過程における G4C2 リピート RNA 産生に対する抑制効果を検討した。p-NCTB は、G4C2 リピート配列に依存した転写抑制効果を示し、長鎖リピートほど効果的に抑制することを見出した。

上記の成果は、G4C2 リピート配列をもつ DNA および RNA を標的とする分子創製を実現し、さらに、合成分子により G4C2 リピートの転写を阻害できる事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。