



Title	Investigation of Selective Inhibition of DNA Processing Enzymes by Small Molecules and Its Potential Application
Author(s)	Ulhusna, Anisa
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/93024
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

Abstract of Thesis

Name (Anisa Ul'Husna)

Title

Investigation of Selective Inhibition of DNA Processing Enzymes by Small Molecules and Its Potential Application
(小分子によるDNAプロセッシング酵素の選択的阻害効果の探求とその応用)

Abstract of Thesis

Nucleotide Repeat Diseases are a group of genetic disorders characterized by the non-canonical expansion of particular nucleotide sequence, that most of it are manifested into neurodegenerative or muscular disorder. The pathological mechanism of nucleotide repeat disease depends on the specific sequence within repeat unit and the gene in which it is located. The mechanism can be categorized into three molecular level: genome level, transcriptome level and proteome level. Amongst those classifications, the genome level is considered the most important aspect, as all of the manifested diseases originate from it. Hence, the development of therapeutic strategies targeted at mitigating the underlying causes of Nucleotide Repeat Diseases at the genomic level is of utmost importance. This entails preventing the expansion of nucleotide repeat sequences, which is a critical aspect in managing these disorders effectively.

One of the genome-level therapeutic strategies developed involves targeting specific metastable structures frequently observed in repeat sequences using small molecules. In our laboratory, we have rationally designed a small molecule called Naphthyridine Azaquinolone (NA) with the specific aim of targeting hairpin structures bearing guanine-adenine mismatches in CAG repeat sequences. Previous reports have shown that NA is capable of inducing contraction of CAG repeats in mouse brain cells. However, the exact mechanism through which NA achieves this effect requires further investigation, as several aspects of it remain unclear. This research aims to gain insights into the mechanism by which NA induces contraction. Specifically, we focus on two aspects: first, how NA interacts with Base Excision Repair (BER) enzymes involved in repeat instability, and second, whether NA can bind to the hairpin structures formed in transcribed repeat sequences. Additionally, we also investigate another small molecule called Naphthyridine Carbamate Dimer (NCD), which has the ability to bind to the guanine-guanine mismatches occurring in CGG repeat hairpins.

In Chapter 2, our results demonstrate that both Naphthyridine Carbamate Dimer (NCD) and Naphthyridine Azaquinolone (NA) can inhibit the activity of Base Excision Repair (BER) enzymes, including UNG2, hSMUG1, and APE1. We thoroughly investigate the inhibition effect, examining aspects such as time-course activity and concentration dependency. The key finding is that NCD and NA can also bind to uracil-bearing triads, expanding their substrate range and broadening their role in regulating repeat instability by disrupting BER processes. In Chapter 3, our findings reveal that NA induces the formation of R-loop structures through its complex formation with CAG hairpins during transcription. The enzymatic assays we performed further provide indirect evidence of NA's ability to form complexes with CAG hairpins in the transcription process. These results contribute to a comprehensive understanding of how NA functions in the cell to induce CAG repeat contraction, which is crucial for the development of small molecule-based nucleic acid therapeutic strategies.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (ANISA ULHUSNA)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	中谷 和彦
	副 査	教授	村田 道雄
	副 査	教授	高尾 敏文
	副 査	准教授 (九州大学)	村田 亜沙子
論文審査の結果の要旨 本論文は、特定の配列の異常伸長を特徴とする遺伝子疾患の一つであるトリヌクレオチド・リピート病における異常伸長の抑制さらには短縮メカニズムについて、リピート配列に結合する低分子有機化合物を用いてそのメカニズムの一端を解明すること、さらには、ゲノムレベルでトリヌクレオチドリピート病の症状改善や根治を目標とした治療戦略に対する新たな知見を得ることを目的とした研究を纏めている。三章からなり、第一章は研究背景について、第二章はリピート結合分子による DNA 修復酵素機能の阻害について、第三章では、低分子による転写時に生じる R-Loop 構造の誘導に関する研究内容を纏めている。 所属する研究室で開発されていた、CAG 反復配列中のアデニン-アデニンミスマッチを有するヘアピン構造に結合する分子ナフチリジン-アザキノロン (NA) が、ハンチントン病マウスモデルの脳線状体の CAG リピートを短縮するという研究結果が得られており、その際には分子 NA が修復酵素の機能を阻害していることが示唆されていた。この考察を元に、第一章では、NA および、CGG 反復配列中のグアニン-グアニンミスマッチに結合するナフチリジンカルバメート (NCD) が、それぞれ標的 DNA 配列に結合した際に、修復酵素機能に対して、どのように影響するかを調べている。対象とした CGG/CGG および CAG/CAG のシトシンを脱アミノ化したウリジンを含む配列に対して、NCD と NA が結合することにより、ウリジンを除去する UNG2 や hSMUG1、さらには、ウリジンを除去したことにより生じる AP サイトを取り除く酵素 APE1 の、塩基除去修復 (BER) 活性を阻害することを示した。 転写中に生じる R-Loop 構造では、非テンプレート側の DNA が一本鎖状態となる。CAG リピート配列が非テンプレート鎖である場合には、NA が CAG リピート上に形成されるヘアピンと複合体を形成することにより、R-Loop 構造形成を誘導する可能性が示唆されていた。第三章ではこの可能性を明らかにするため、異なるリピート長の CAG/CTG 領域をもつプラスミドを用意し、CTG 鎖をテンプレートとして転写する場合の R-Loop 形成について詳しく調べている。その結果、NA の存在下で RNase A/RNase H 処理により消失するスミアなバンドが存在することを見出し、NA が転写過程において非テンプレート鎖上の CAG ヘアピンと複合体を形成する可能性を間接的に示した。この事実は NA が細胞内でどのように機能し、CAG リピートの収縮を誘導するのかについての包括的な理解に貢献するものである。 以上のように、本論文は低分子によるリピート修復過程における修復酵素機能の阻害、並びに、転写時の R-Loop 形成に関与することを調べた研究として、理学に寄与するところが大きい。 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。			