

氏名（本籍）	ヨウ ウケイ YANG YUXI（中国）
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	甲第1330号
学位授与の日付	2024年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Inosine chemical labeling and molecular purification of edited RNA & DNA using maleimide (マレイミドによる塩基編集を持つ核酸におけるイノシンの化学標識と分子精製技術の開発)

論文審査委員	(主査) 教授 後飯塚 僚
	教授 北村 大介 教授 中村 岳史
	准教授 櫻井 雅之 教授 秋本 和憲

論文内容の要旨

The investigation of Adenosine-to-Inosine (A-to-I) editing, a crucial base modification process catalyzed by Adenosine Deaminase that Acts on double-stranded RNA (ADAR), has significantly advanced with recent sequencing and bioinformatics developments. This process, which transforms adenosine into inosine, alters base pairing in genetic codes and affects transcript functions across various biological features.

Although most existing research on A-to-I editing is focused on double-stranded RNA, emerging evidence also indicates its occurrence in RNA:DNA hybrids. However, RNA:DNA hybrid substrates have been overlooked in the search for A-to-I editing targets. To decipher the complexities of gene regulation on the genomic DNA and transcribed RNA, and its impact on human diseases, it is required to establish a new technique that can identify and analyze such hidden base editing mechanisms.

To address this, we have developed a novel biochemical approach, termed

Inosine Chemical Labeling and Affinity Molecular Purification (ICLAMP). A key breakthrough of our study is the first-time demonstration that maleimide can chemically react with inosine. We explore maleimide as a scaffold for inosine labeling. Given the established use of maleimide in protein modifications, a diverse range of maleimide derivatives are available. Utilizing fluorophore-conjugated maleimide, we confirmed their efficiency and specificity in labeling inosine within nucleic acids. With biotin-conjugated maleimide, we purified RNA and DNA containing inosine.

The adaptability of maleimide derivatives allows for innovative inosine labeling, effectively purifying RNA and DNA samples containing inosine. ICLAMP holds the promise for high sensitivity in detecting low-abundance inosine sites and offers significant advantages over existing methods. The combination of ICLAMP with next-generation sequencing could provide a versatile platform for identifying novel A-to-I editing sites in both RNA and DNA, potentially illuminating their biological roles and implications in human cells.

論文審査の結果の要旨

生命のセントラルドグマである、DNA から適宜必要な遺伝子を RNA へと転写し、機能発現体であるタンパク質を産生する遺伝子発現の流れにおいては、各段階において多彩な発現調節機構が働くことにより、適切な遺伝子発現が維持される。この調節機構の 1 つに、遺伝子情報そのものである DNA と RNA の [A,G,C,T(U)] 4 種の塩基の化学構造を修飾する機構が備わっている。しかし、ヒトやマウスなど哺乳動物を含む後生動物では、オリジナルのゲノム配列から、細胞内の酵素により配列の編集が行われる現象がある。本研究ではアデノシン(A)の脱アミノ化反応によるイノシン(I, Ino)と呼ばれる修飾に注目している。セントラルドグマにおいて必須となるワトソン・クリック型塩基対では、A はチミン(T)またはウリジン(U)と [A:T(U)] 対を、グアノシン(G)はシチジン(C)と [G:C] 対を形成する。しかし、A 脱アミノ化後の Ino は G と同様に C と塩基対を形成する。結果、A:T(U) から Ino:C へと塩基対が換わるために、遺伝子情報上では A から G への編集と同義となることから、A-to-I 編集機構と呼ばれる。さらに近年、二本鎖 RNA 特異的アデノシン脱アミノ化酵素 (ADAR) が RNA:DNA ハイブリッド鎖をも基質として RNA 鎖と DNA 鎖を A-to-I RNA および A-to-I DNA 編集する活性を有することが見出されている。これはゲノム DNA で A-to-I DNA 編集に起因する A から G への能動的な塩基編

集機構が哺乳動物に内在することを示唆するものである。また Inosine (DNA)の塩基部分はヒポキサンチンとして、自然発生的な脱アミノ化による変異源として存在は検出されていた。しかしこれまで、DNA上のイノシン部位を同定する試みは行われていない。これはDNAの単一領域は一細胞内に2分子しか存在せず解析可能な感度を持つ技術が存在しないこと、さらにPCR増幅を経た場合イノシンはGに置換されてしまうため、既存の技術ではイノシンを検出することが不可能であることに起因する。これまでにイノシン特異的なシアノエチル基付加反応を利用してPCR反応を介してもGではなくInoであることを証明する技術(ICE法)を所属研究室は開発している。しかしながら、そのイノシン検出の感度(深度)は、一般的なトランスクリプトーム解析と同じく、各転写産物の発現量に依存していた。今回の目標はゲノムDNAにおけるイノシン同定あるいは発現量が微弱な制御性ノンコーディングRNAであるため、最適解としてはイノシンを持つ核酸群の濃縮精製法の確立である。

しかし上述のシアノエチル化は、付加官能基が非常に安定で反応しないため、イノシンに対して追加での蛍光やタグによる標識、精製は難しい。そこで本研究では、これらの難点を解決するべく、イノシンの化学的性質を利用した標識精製法の開発を行った。そこで本研究ではRNAとDNAのどちらにも適用可能であり、イノシン特異的に蛍光標識またはタグ官能基標識する技術の開発を進めた。

成果として、イノシンに対して特異的に反応する化学試薬マレイミドを見出し、上述のシアノエチル化では不可能であった、イノシン塩基特異的な蛍光あるいはタグ官能基の付加による標識を実現し、特許出願に至っている。内容として、はじめに蛍光標識したマレイミドによるイノシン特異的な標識を確認し、つづいてこの反応系を用いたイノシン特異的な反応性の証明と、反応効率の最適化検証を完了した。次にビオチンをイノシン特異的に標識することで、核酸のプール内から、イノシンを含む核酸鎖のみを単離精製することを可能とした。発展性として、本技術は蛍光標識による細胞内あるいは試料内のイノシン含量が簡易測定可能とした。さらに本成果は次世代シーケンスに適応可能であることを証明しており、将来的にはヒトおよびマウスにおけるマイナーRNAおよびDNAにおける新規イノシン部位を次世代シーケンスにより網羅的に同定することを可能としたものである。

このように本研究の成果は、イノシン化学標識による結合精製法(inosine-chemical labeling and affinity molecular purification) ICLAMP法、すなわち新規にマレイミドをイノシン特異的修飾剤として利用することで、既存の技術を優に超える特異的な標識効率と精度を達成するものである。さらにビオチン化によるイノシン濃縮と検出法を利用可能とするものであり、将来的にはDNAにおけるイノシン化部位の発見など、本研究内容が与える研究発展への効果は絶大である。従って、本論文は博士(理学)の学位論文として十分に価値があるものと判定する。