

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	JOSEPHBATH SAHAYA SHEELA VINODH
論文題目	Chemical biology studies on nucleic acid recognition, modification, and secondary structures (核酸の認識と修飾とその2次元構造のケミカルバイオロジー研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>序論</p> <p>核酸はデオキシリボ核酸 (DNA) とリボ核酸 (RNA) から成り、すべての生命体の重要な構成要素である。また、様々な細胞プロセスを核酸修飾が調節しており、修飾情報の解析によって、細胞内の核酸の役割を解明する上で重要な知見を得ることができる。特に、DNAは哺乳類の遺伝性物質として機能しており、細胞の核内において多くの重要な役割を果たしている。従って、特定のDNA配列を認識して結合する合成リガンドは、標的とする転写因子-DNA間で働く相互作用の阻害において有望であると考えられる。ピロールイミダゾールポリアミド (PIP) は任意に特定のDNA塩基配列特異性を設計することが可能な機能分子であり、標的の遺伝子発現を選択的に抑制することができる。今回、申請者はGLI1結合部位の特定の塩基対を標的とする新規の環状PIPを設計、合成した。環状PIPは細胞内のヘッジホッグ経路を阻害し、抗がん剤のtemozolomide (TMZ) と併用することで癌幹細胞の増殖を抑制した。また、単一分子レベルで長鎖RNA内のRNA修飾を検出するために、直接RNAナノポアシーケンシング技術を活用した。実際に、RNA修飾に向けた選択的化学プローブを使用して、合成RNA、および、マウストランスクリプトームにおけるイノシン、および、シュードウリジン修飾をマッピングすることに成功した。</p>			
<p>1. 核酸の塩基配列認識</p> <p>天然の転写因子の機能を模倣する人工転写因子の開発は、任意の遺伝子発現を特異的に調節できる可能性を有しており、医学や生物学の領域で関心が持たれている。その開発素材としてオリゴヌクレオチドは、特定の塩基配列を高い親和性で認識、結合することで、特定の遺伝子機能を調節することが可能であるが、生細胞への低い取り込み効率や、易分解性のために応用には制限がある。塩基配列特異的結合性を持つPIPは、生細胞に効果的に取り込まれるため、真核生物の標的遺伝子発現を阻害した例が報告されている。がん幹細胞 (CSC) は、がん組織内の細胞の小さな亜集団であり、転移、薬剤耐性、および再発に主要な役割を果たしている。そこで、癌幹細胞の増殖に主要な役割を持つヘッジホッグ経路を阻害するGLI1配列特異的な環状PIPを設計、合成した。環状PIPのDNA結合親和性は、従来多く報告されていたヘアピン型PIPよりも優れていた。結果として、環状PIPはGLI関連の機能を阻害し、神経膠芽腫、および、脳がん幹細胞に対するTMZとの併用治療は、TMZ単独と比較してアポ</p>			

トーススの増加を確認することができた。本知見によって、GLI1 を標的とする環状 PIP が CSC を抑制する上で有望な抗がん剤戦略となる可能性を示唆している。

2. ナノポアシーケンシングを活用する RNA 修飾の検出法

遺伝暗号の基となる標準塩基とは別に、修飾された非標準塩基を核酸は形成している。細胞内で核酸修飾は遺伝子発現の調節や制御に関連する重要な役割を果たしている。特に、RNA修飾は、新しい分野のエピトランスクリプトミクスを開いており、現在までに、170を超える異なるタイプの修飾が様々なコーディング、および、非コーディングRNAで同定されている。これまで薄層クロマトグラフィー、HPLC、質量分析を活用して、RNA修飾を同定していたが、これらの解析法は感度が非常に低く、大量のサンプルを必要としていた。2007年頃からの次世代シーケンシング (NGS) 技術の登場によって、低コストで多数の微量のサンプルを解析できるようになり、イルミナ、イオントレントなどのNGS技術が、RNA修飾の解析に応用されている。とりわけ、ショートリードシーケンシングでRNA修飾を特定する手法として、ナノポアシーケンシングによる直接RNAシーケンシングが効果的である。本研究では、イノシン (I)、および、シュードウリジン (Ψ) 修飾に対するアクリロニトリルの選択的反応性を利用して、シグネチャーエラープロファイルを人為的に誘導することで化学プローブベースの直接RNAシーケンスの解析法を提案した。配列特異的な化学プローブを利用して、*in vitro*で合成されたRNAとマウスの脳の両方で、Iと Ψ のRNA修飾を選択的に解析評価した。また、直接RNAシーケンシングに関連する低いカバー率の問題を克服するために、NanoICE-Seqプロトコルを実施した。さらに、コンセプトの実証を示すために、マウストランスクリプトーム内の複数のRNA修飾を特定した。将来的に申請者の提案した解析アプローチは、臨床での疾患関連エピトランスクリプトームの解明に役立つ可能性があると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

核酸の有する塩基配列やエピジェネティクスは、細胞内の核酸の機能解明において重要な生体情報である。申請者は本論文で環状PIPを基にしたTMZとの併用による癌幹細胞の増殖抑制と、ナノポアシーケンシングを用いた直接RNAシーケンシングについて研究している。機能分子開発やエピジェネティクス解析は、特定遺伝子発現の調節や制御に関連する基礎研究から応用研究まで、広範な研究領域で実施されている方法論である。特に、細胞内の遺伝子発現制御と核酸修飾情報の解析は、医学、細胞生物学分野における重要な命題となっている。

申請者は、新規のヘッジホッグ経路を阻害するGLI1配列特異的な環状PIPを設計、合成した。新規に合成された環状PIPは、従来のヘアピン型PIPと比べて、優れたDNA結合親和性があり効果的な遺伝子発現制御が確認された。さらに、抗がん剤のtemozolomide(TMZ)と併用して神経膠芽腫、および、脳がん幹細胞に対して細胞増殖阻害活性を評価することによって、環状PIPの抑制効果を示すことに成功した。細胞の核内に存在するゲノムDNAに対して環状PIPは効果的に作用しており、特定遺伝子発現を制御する合成リガンドとしての機能分子コンセプトは、実験結果によって示されている。

また、申請者はナノポアシーケンシングを用いた直接RNAシーケンシングについて研究した。一般論として、核酸の増幅作業を必要としないナノポアシーケンシング技術は直接核酸の配列を決定することを可能にすることに有用性がある。しかしながら、配列情報の膨大さ、ミスマッチエラーとして読み取られる修飾塩基、などの課題によって解析作業は煩雑な手間がかかっている。申請者は、イノシン (I)、および、シュードウリジン (Ψ) 修飾に対するアクリロニトリルの選択的反応性を利用した独自の配列情報データの解析によって、新しい直接RNAシーケンスの解析法を開発することに成功した。加えて、マウストランスクリプトーム内の複数のRNA修飾の特定に際しても申請者の解析手法は有効に機能しており、将来的なRNAの転写後修飾の解析に向けた応用が期待される。

以上、二つの核酸領域の研究である遺伝子発現を制御する機能分子、および、直接RNAシーケンシングの研究開発は、将来的な遺伝子制御戦略やエピジェネティクス解明に対して大きく寄与している。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年5月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際して、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。