

細胞内在性塩基編集による変異率及び部位の検出と評価技術開発

CPOT # 21-A-38

東京理科大学/生命医学研究所

准教授：櫻井 雅之



研究概要

Key Words: # 低分子化合物, # 診断・検査, # DNA, # RNA, # A-to-I DNA編集

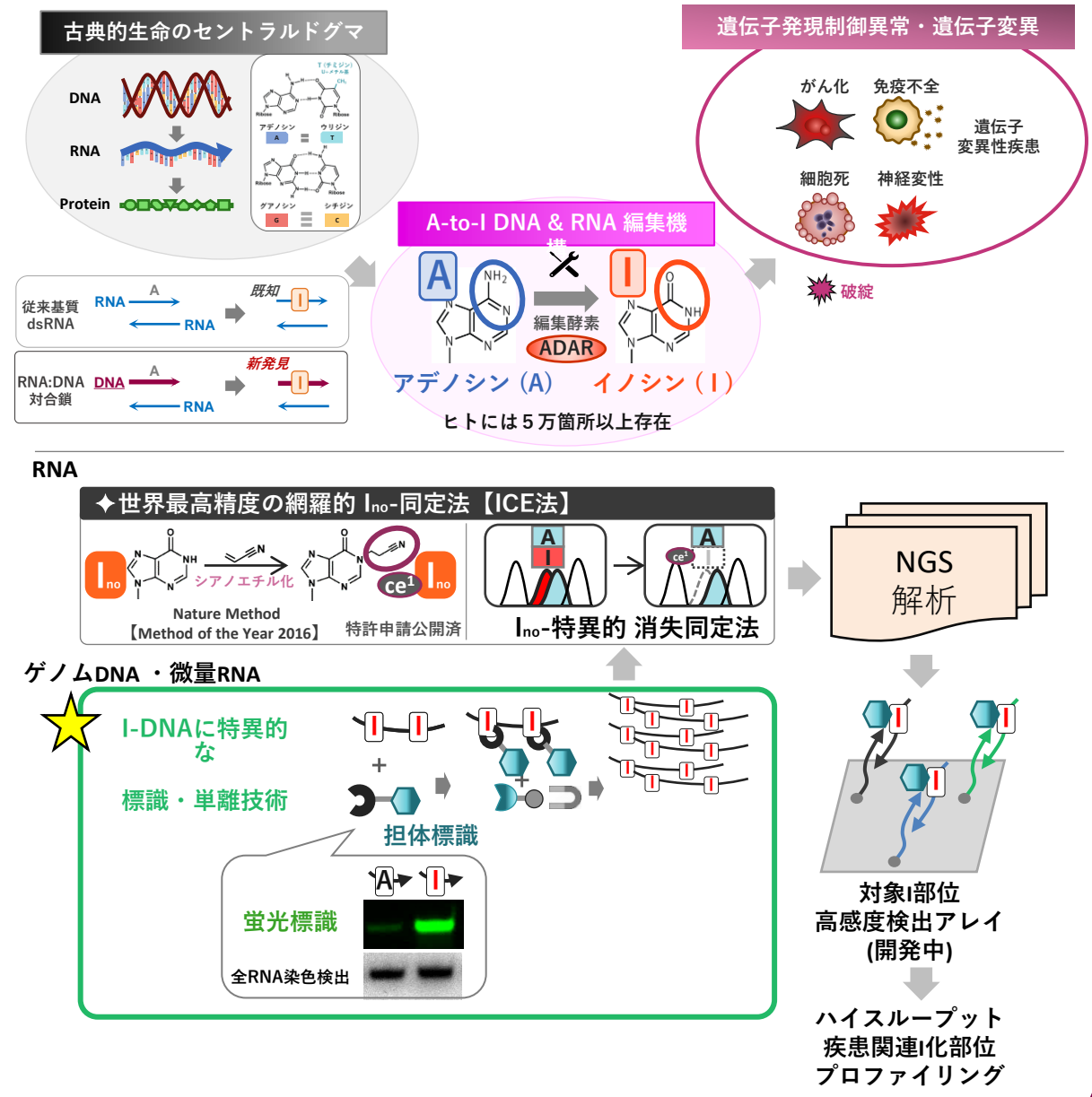
【概要】

RNA がガイドする DNA 上のアデノシン脱アミノ化編集によるイノシン化, A-to-I DNA 編集機構を対象とし、DNA 上のイノシン化部位に特異的な標識および精製法を開発した。(右図)

【背景】

我々の細胞には遺伝子を記載する DNA と RNA の塩基の化学構造を修飾する仕組みが備わっている。本研究では特にアデノシン (A) の脱アミノ化によるイノシン (I) への修飾 (A-to-I 編集) を対象とした。I は A,G,C,T(U) に続く第 5 の塩基であり、ヒト脳のトランスクリプトームでは 3万~5万箇所が A から I へと編集されている。イノシン化は A からグアノシン (G) への変化と同じ効果を持ち、核酸の情報と機能を調節している。A-to-I 編集は酵素である ADAR が担う。従来、A-to-I 編集はその酵素 ADAR の特性から、二本鎖 RNA でのみ起こると考えられていた。しかし近年、我々は RNA:DNA ハイブリッド鎖もまた基質となり、RNA はもちろん DNA の A すらイノシン化することを発見した。これは A-to-I 編集による能動的な塩基編集機構が哺乳動物のゲノム DNA に内在することを示唆している。

その先駆けとして、テロメア伸長酵素陽性のヒト培養がん細胞における A-to-I 編集の機能を解明した (Nat. Commun. 2021)。がんや遺伝子変異疾患の要因となる DNA 変異には、A-to-I DNA 編集機構の破綻によるものが存在すると想定される。本技術は、これまで見過ごされてきた DNA 上の A-to-I 編集部位の機能の解明のため、高感度・高精度・網羅的に同定する技術として開発した。



新規性・優位性

A-to-I 編集部位について、I と G を判別し実証する技術は既存のものでは上述の ICE 法 (特許申請済み) のみである。特に DNA 編集においてはその細胞当たりの分子数は極めて少ないため、検出には高い感度が必要となる。本技術では、第一にイノシン特異的な化学標識・濃縮精製を開発し (特許申請準備中)、次世代シーケンス解析による網羅的が可能である。一方、RNA 編集において、発現量の高い非編集 RNA の混在による感度低下を受けず、発現量の低い mRNA, lincRNA, microRNA などの編集プロファイルを得ることが可能である。

さらに、一度その存在証明をした任意の A-to-I DNA/RNA 編集部位においては、イノシン特異的な蛍光標識または濃縮精製後、マイクロアレイによりその編集の有無と割合のプロファイルを効率的に得ることが可能となる。

実用化提案

- 【産物】・検出技術のキット化、および編集プロファイルアレイ
- 【対象】・がん、遺伝子変異疾患
 - ・ A-to-I DNA または RNA 編集を起因とする疾患全般
 - ・ 個体差を規定する DNA または RNA 編集部位
- 【用途】・微量検体 (組織小片/血液/尿) 中の編集プロファイル
 - ・ 疾患関連 RNA (mRNA, microRNA 等) の編集プロファイル
 - ・ 疾患関連 DNA の編集プロファイル

発症前がん・遺伝子変異の要因となる DNA 編集の検出診断を目指す。

知財情報

特許: [RNA 中のイノシン化部位の検出方法]
 特願 2005-229335、特開 2008-259425 WO2007018169A1 (Aug 2006/8/7)
 試作実施: Nat Chem Biol 2010, Genome Res. 2014, 現在進行中
 受賞歴: NATURE METHODS METHOD OF THE YEAR 2016

連携への関心

- 製薬企業
- 医療/診断/分析 (機器)

関連文献

- Sakurai M, et al. (2021) Nat. Commun. 12:1654.
- Li X, et al. (2017) Nature Methods 14: 23-31.
- Sakurai M, et al. (2014) Genome Res. 24: 522-534.
- Sakurai M, et al. (2010) Nat. Chem. Biol. 6: 733-740.

Development of technology for detection and evaluation of mutation rates and sites by cellular endogenous base editing

Masayuki Sakurai, Ph.D.

Associate Professor, Research Institute for Biomedical Sciences,
Tokyo University of Science



CPOT #21-A-38

Summary

Key Words: #Small molecule, #Diagnostics/Lab test, #DNA, #RNA
#A-to-I DNA editing

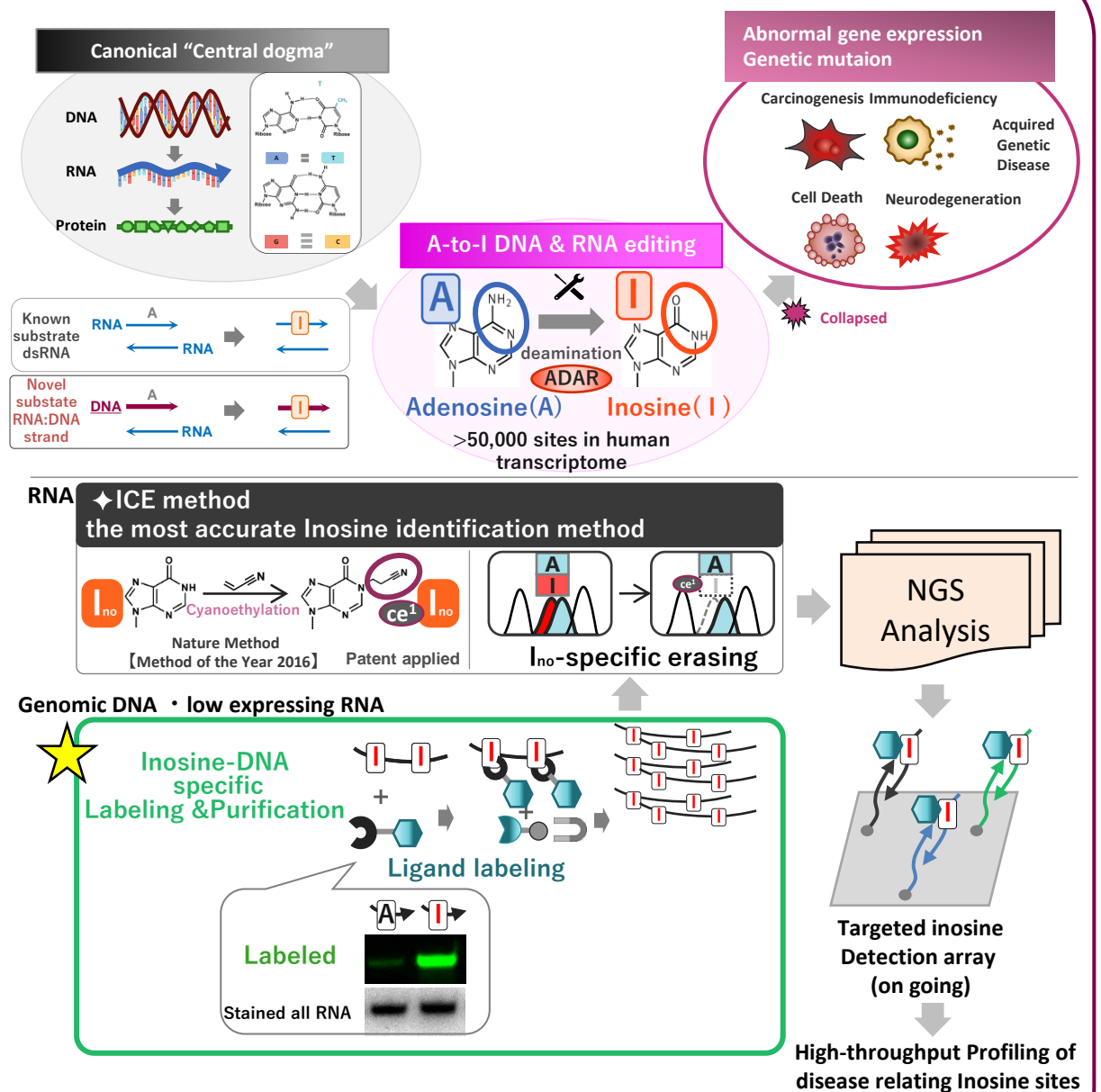
<Summary>

We have developed a new technology to identify inosine bases in DNA utilizing inosine-specific labeling & purification. The technology brings us new finding of A-to-I editing sites in DNA and RNA relating to cancer, genetic disease, and individual differences. (see the figure)

<Background>

Our cells have mechanism modifying the base structure of DNA and RNA. In this study, we focused on the inosine (I) produced by the adenosine (A) deamination by the ADAR enzyme. It is called as A-to-I editing. In human brain transcriptomes, more than 50,000 sites of A-to-I RNA editing have been reported. Since A-to-I editing has a similar effect of A-to-G alteration, it modulates DNA/RNA information and structure, resulting in various biological phenomena. The ADAR had been thought to edit only double-stranded RNAs. However, recently we found that even DNA:RNA hybrid double strand can be a substrate, and even A in DNA is edited to I. The fact indicates our cell have an innate genome DNA editing system regulated by guide RNA. We assume that certain DNA mutations causing carcinogenesis and genetic disease would be because of abnormal A-to-I DNA editing.

Thus, we here developed a new technology with high sensitivity and accuracy to systemically identify overlooked inosines in DNA to clarify those functions.



Innovation

The only existing technology to discriminate and demonstrate I and G for A-to-I editing sites is the ICE method described above. Especially in DNA editing, the number of molecules per cell is tiny, so high sensitivity is required. Therefore, we developed inosine-specific chemical labeling and enrichment/purification (patent application in preparation), followed by next-generation sequencing analysis. The technology made it possible to analyze inosines in low expressed mRNA, lincRNA, microRNA, etc., which are usually undetectable because of contamination by other non-edited RNAs. Furthermore, once any A-to-I DNA/RNA editing site is proven, it is possible to efficiently profile the presence/absence and percentage of editing by microarray after inosine-specific fluorescent labeling or enrichment and purification.

Expected Utility

Product · Detection kit, Editing profiling array.

Target · Cancer, Genetic Mutations.
· Diseases caused by abnormal A-to-I editing in RNA/DNA.
· DNA/RNA editing determining individual differences.

Usage: Profiling of A-to-I editing in DNA, mRNA, lincRNA, microRNA using a slight amount tissue/cell specimen, blood, urine, etc.

Early diagnosis for carcinogenesis and gene mutations.

IP Information

- Patent in JP: Applied 2005-229335 Opened 2008-259425
- Patent: WO2007018169A1(Aug 2006/8/7)
- Tested: Nat Chem Biol 2010, Genome Res.2014, on going
- Award: NATURE METHODS METHOD OF THE YEAR 2016

Partnering

- Pharmaceuticals
- Medical/Diagnosis/Research Devices

Reference

- Sakurai M, et al. (2021) Nat. Commun. 12:1654.
- Li X, et al. (2017) Nature Methods 14: 23-31.
- Sakurai M, et al. (2014) Genome Res. 24: 522-534.
- Sakurai M, et al. (2010) Nat. Chem. Biol. 6: 733-740.