

ICLAMP法：
イノシン化学標識&アフィニティ分子精製ICLAMP method: Inosine Chemical Labeling
& Affinity Molecular Purification東京理科大学
研究推進機構 生命医科学研究所 准教授

櫻井 雅之

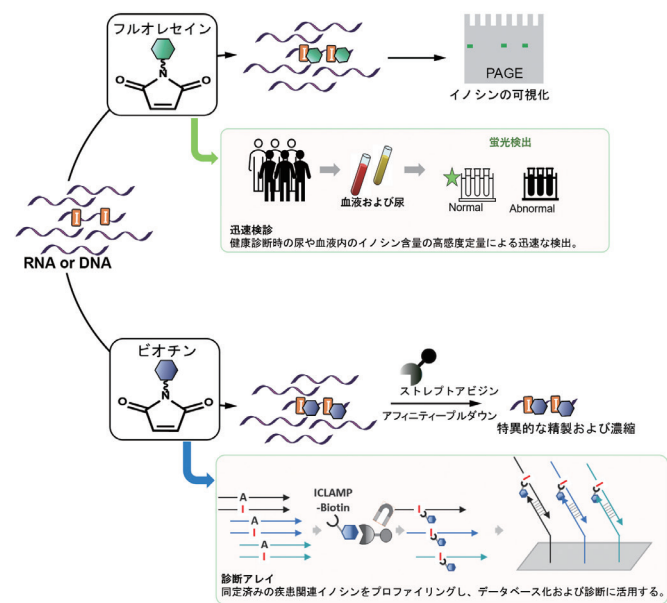
Masayuki Sakurai

研究概要

近年のシーケンシング技術やバイオインフォマティクスの急速な進展により、アデノシンからイノシン(A-to-I)へのRNA編集に関する理解が大幅に深まりました。従来、A-to-I RNA編集は主にRNAにおける現象として認識されていましたが、最近の研究では、RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)がDNA:RNAハイブリッド鎖をも編集できることが明らかになりました。しかし、DNAおよび希少発現RNA中でのイノシン化部位とその機能ほとんど解明されていません。この未知の領域を探るため、我々はDNAおよびRNA中の希少なイノシン編集部位を特定するための精密な生化学的手法を開発しました。

研究成果

本研究では、イノシン編集の検出と特異的な標識のために、ICLAMP (Inosine Chemical Labeling & Affinity Molecular Purification) 技術を開発しました。特に、マレイミドを基盤とした化学標識法を用い、イノシンを含むRNAおよびDNA分子を効果的に標識することに成功しました。フルオレセイン結合マレイミドを用いることで、RNAおよびDNA中のイノシンを蛍光により高感度で検出できることを確認しました。また、ビオチン結合マレイミドを利用した親和性を生かした精製により、イノシンを含む核酸分子の選択的濃縮を実現しました。



マレイミド基を利用した化学標識は、RNAおよびDNA中のイノシンを標的とし、A-to-I編集部位を同定します。フルオレセインの結合により可視化が可能となりました。さらにビオチンの結合によってストレプトアビジンを介した濃縮が可能となり、核酸修飾の検出と解析が向上しました。この技術により、健康診断時に尿や血液中のイノシン含量を高感度に定量し、早期診断に利用することが可能です。また、イノシンを濃縮精製後、診断アレイを用いてイノシン含量を高感度で検出し、疾患関連イノシンマーカーを開発し利用することができます。

従来・競合との比較

- 従来では、官能基追加に複雑な人工合成手順が必要でした。
- 従来の人工合成化合物は反応性が不安定で、反応効率が低下します。
- マレイミドには官能基を持つ市販誘導体が豊富で、5種類以上が入手可能です。
- 直接入手可能なマレイミド誘導体は、反応性が高く、特異性も強いです。
- 従来の方が2日以上かかるのに対し、我々の方法はわずか1時間で完了します。

想定される用途

- RNA編集の効率と定量を評価する検出キットを提供し、核酸医薬開発を支援。
- A-to-I編集を検出する診断キットを作成し、疾患の早期診断や精度向上に貢献。

実用化に向けた課題／企業など研究パートナーに期待すること

我々の目標は、本反応試薬のキット化から販売であり、市場は核酸医薬開発分野と医学系基礎研究を考えております。また、本反応機構を利用した次世代シーケンシング法およびマイクロアレイ法によるイノシン検出技術への拡大を進めており共同研究による支援を頂けましたら幸いです。

今後の展開

今後は特許の PCT 出願を経て国内移転を進めます。開発としては FITC-マレイミドによる細胞内のイノシンを含む核酸の局在検出、液体試料中のイノシン含量の定量を実施します。ビオチンマレイミドの用途としては NGS による希少発現 RNA または DNA におけるイノシンの同定を行います。また、選別したイノシン化部位をハイスループットに定量解析可能なマイクロアレイの開発を ICLAMP 法の利用により推進します。

■知的財産権：特願2023-175606 (2023-10-10 出願) 発明の名称：イノシン塩基の標識方法、イノシン塩基の検出方法、核酸の配列決定方法、イノシン塩基を含む核酸の濃縮方法、イノシン塩基標識剤、及びキット JST特許出願支援制度(PCT)：S2023-0543-N0 発明の名称：A Novel Technique to Explore Adenosine Deamination via Inosine Chemical Labeling and Affinity Molecular Purification
■活用した公的資金事業等の名称：AMED橋渡し研究推進事業シーズA (代表) 2022 基盤研究B (一般) (代表) 2022-2024 基盤研究B (一般) (代表) 2019-2021 研究活動スタート支援 (代表) 2018 挑戦的研究(開拓) (分担) 2024-2026

POINT

- RNA・DNA中のイノシン編集部位を高感度かつ正確に検出。
- FITC-マレイミドでイノシンを効率的に標識し、高精度の蛍光解析を実現。
- ビオチン-マレイミドを使用し、イノシンを含む核酸分子の選択的精製に成功。
- 新技術で希少なA-to-I編集部位を発見し、RNA編集機構の理解が進展。