



Title	Exploring small molecule regulation of cytosine deaminase efficiency on DNA repeat sequences
Author(s)	張, 陸艷
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101925
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 (Zhang Luyan)	
Title	Exploring small molecule regulation of cytosine deaminase efficiency on DNA repeat sequences (小分子によるDNAリピート配列上でのシトシンデアミナーゼ活性の調節)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>First, we elucidate the fundamental characteristics of repeat expansion disorders and common trinucleotide repeat diseases. It then focuses on the molecular mechanisms underlying these disorders, detailing the formation of slippage DNA and its role in repeat sequence expansion. Subsequently, the chapter transitions to the exploration of therapeutic strategies for repeat sequences. It introduces small-molecule drugs capable of binding to repeat sequences, followed by a discussion on cytosine deamination methods frequently encountered in repeat sequences. A detailed examination of research on APOBEC deaminases is also included.</p> <p>Next we introduce research on the catalytic substrate screening of APOBEC3A. For known repeat expansion disorders, it is necessary to identify hotspot sequences that can be deaminated by APOBEC3A for further studies. A DNA cleavage assay was designed, where DNA substrates catalyzed by APOBEC3A undergo cleavage, allowing the detection of products. It was further discovered that both CCG and TC motifs are excellent substrates for APOBEC3A. These experiments provide a theoretical foundation for subsequent studies involving small molecules binding to repeat sequences.</p> <p>Third, we conducted qualitative experiments on the deamination products of CCG repeat sequences. Small-molecule drugs were included in the experiments to assess their impact on deamination efficiency. First, we designed a time-course experiment to monitor the progress of APOBEC3A-catalyzed deamination of CCG repeat sequences over time. Next, we performed concentration-dependency experiments by introducing small molecules at varying concentrations to explore whether changes in small molecule concentration influence the deamination efficiency of CCG repeat sequences.</p> <p>Additionally, the DNA used in these experiments was designed to form either hairpin structures in single-stranded states or slippage structures in double-stranded states. Starting with single-stranded DNA, we investigated deamination under simplified structural conditions. Subsequently, more complex double-stranded DNA experiments were designed to evaluate the feasibility of repeat sequence deamination under biologically relevant conditions where complementary strands are present.</p> <p>We designed qualitative experiments on the deamination products of TTCCA repeat sequences. New small molecule compounds were used to test their effects on APOBEC3A-mediated deamination. Similarly, we designed time-course experiments and concentration-dependency experiments for TTCCA repeat sequences. Additionally, deamination experiments were performed on TTCCA repeat sequences in both single-stranded DNA and double-stranded DNA states. The aim was to evaluate the feasibility of deaminating TTCCA repeat sequences.</p> <p>Finally, we carried out qualitative experiments to analyze the deamination products of TTTCA repeat sequences. Small molecule compounds were employed to investigate their impact on APOBEC3A-mediated deamination. Here we designed time-course experiments and concentration-dependency experiments for TTTCA repeat sequences. The goal was to evaluate the feasibility of deaminating TTTCA repeat sequences under these conditions.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (Zhang Luyan)	
論文審査担当者	(職)
主査	教授
副査	教授
副査	教授
	氏名
	中谷 和彦
	北條 裕信
	山口 哲志

論文審査の結果の要旨

本論文は、ゲノム中のリピートの異常伸長により発症するリピート病に着目して、リピート配列に含まれるシトシンの脱アミノ化によるウリジンの生成が、リピートの異常伸長に対して抑制的影響を及ぼすのではないかという仮説を立て、リピート配列が形成する Slipped out 構造におけるシトシンのデアミナーゼによる反応を調べた研究をまとめたものである。デアミナーゼとして APOBEC3A を用い、DNA のミスマッチ塩基対に特異的に結合する低分子化合物を用いることにより、リピート配列が形成するヘアピン構造の特定領域への変異導入に成功している。

まず、APOBEC3A の良い基質となるリピート配列を調べ、CCG リピートを研究対象に選んだ。解析方法には、蛍光色素 FAM で標識した DNA を用い、シトシンの脱アミノ化により生じるウリジンを、ウラシル DNA グリコシラーゼを用いて除去、生じたアベーシックサイトを塩基性条件下にて処理して生じる切断フラグメントを、変性 PAGE により解析している。DNA フラグメントは標品となる DNA マーカーとの移動度を比較し、切断位置を特定している。また、次世代シーケンサーを用いて、切断位置を議論している。

実際には、CCG リピート配列を含み、異なる 2 次構造をとると予想される 2 種類の DNA を用いて、二次構造と切断位置を詳細に比較している。さらに、CCG リピートが形成するヘアピン構造に生じる C-C ミスマッチ塩基対に結合する分子 AmND と AmBzND を用いて、ミスマッチ結合分子の結合により APOBEC3A によるデアミナーゼ反応の効率の変化ならびに位置選択性を評価した。

その結果、CCG リピート中のシトシンの脱アミノ化は、C-C ミスマッチ結合分子が存在しない場合は、リピート全体で速やかに進行するが、AmND や AmBzND が存在するとヘアピンループ領域で主に進行するようになり、CCG 配列の二番目の C が脱アミノ化されることを明らかにした。さらに、二次構造の異なる 2 つの CCG リピート DNA の比較から、ヘアピン型の二次構造が動的に変化しやすい場合には、時間経過とともにシステム領域を含めて、複数のシトシンが脱アミノ化されていくのに対して、システム領域を安定化させた CCG リピートヘアピンでは、ヘアピンループに位置するシトシンが選択的に脱アミノ化された。このことから、システム領域に形成される C-C ミスマッチは低分子の結合により、APOBEC3A による脱アミノ化から保護されることがわかった。

以上のように、本論文は、CCG リピート中のシトシンの脱アミノ化を低分子によりその位置・領域を制御できることを示し、将来的には Slipped out 構造の多様性を制限することにより、リピート伸長を抑制できる可能性を示唆した研究として、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。