



Title	Development of Programmable DNA- and RNA-guided proteins via click reaction and their application for RNA imaging in live cells
Author(s)	中村, 慎
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/103098
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

論文内容の要旨

氏名 (中村 慎)	
論文題名	Development of Programmable DNA- and RNA-guided proteins via click reaction and their application for RNA imaging in live cells (クリック反応を利用したプログラム可能なDNAおよびRNAガイドタンパク質の開発と生細胞内RNAイメージングへの応用)
論文内容の要旨	
<p>The CRISPR-Cas system, a groundbreaking genome editing tool, has transformed molecular biology by leveraging programmable guide RNAs to direct Cas proteins to specific nucleic acid sequences. Prior to CRISPR-Cas, genome editing relied on engineering complex DNA-binding proteins to achieve target specificity. In contrast, CRISPR-Cas system simplifies the process by employing complementary RNA for target recognition, offering unmatched speed and design flexibility. Building on this technological revolution, I developed RNA-guided GFP (RGG) and DNA-guided GFP (DGG), a versatile and programmable platform for nucleic acid targeting. These tools were created using a click chemistry strategy renowned for its efficiency and precision, conjugating azide-exposed engineered proteins with dibenzocyclooctyne (DBCO)-modified guide nucleic acids tailored to complement specific sequence. RGG and DGG, produced <i>in vitro</i>, demonstrated high conjugation efficiency selective binding to single-stranded nucleic acids in gel shift assays. Notably, RGG enables precise visualization of intercellular RNAs, such as <i>NEAT1</i> and Satellite III RNA, within living cells, whereas DGG does not. Further optimization of the system revealed that 3'-DBCO-modified 30-nt RNA is the most effective guide structure for RGG in cellular experiments. RGG outperforms existing RNA imaging tools in both specificity and efficiency, offering a customizable and robust system for RNA imaging and molecular analysis. These results highlight the power of direct conjugation between guide nucleic acids and proteins in achieving targeted functionality within living cells. This work paves the way for the development of new-generation tools capable of precise nucleic acid recognition and dynamic molecular modification, advancing our ability to interrogate and manipulate complex biological processes.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (中村 慎)	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 教授 鈴木 啓一郎
	副査 教授 佐々木 洋
	副査 教授 廣瀬 哲郎

論文審査の結果の要旨

RNAをガイドとして利用することで、標的RNAを容易に選択できる利点を含めて、本論文は、ガイドRNAに蛍光タンパク質を化学的に結合させることで、細胞内の特定RNAを生細胞中で可視化する新技術「RNA-guided GFP (RGG)」を開発したものである。従来法に比べて、構造がシンプルであるため、標的RNAの構造や機能を損なうことなく、高精度なRNAイメージングを可能にしている点が特長である。特に、クリックケミストリーと呼ばれる高効率かつ高選択的な化学反応を応用することにより、複雑な遺伝子改変を必要とせず、簡便にRNAを標的化できる技術を実現している。

本研究は、分子生物学・化学・バイオイメージングの融合による新たな手法を提案しており、その独創性は高く評価されるものである。以上の点から、本申請者は博士の学位を授与するにふさわしいと認める。

なお、チェックツール“iThenticate 2.0”を使用し、剽窃、引用漏れ、二重投稿等の確認を完了していることを申し添える。