

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16037

研究課題名(和文)ゲノム構造Rループ形成のエピトランスクリプトミクス制御

研究課題名(英文) Epitranscriptomic regulation of genomic structure R-loop formation

研究代表者

岡田 俊平 (Okada, Shunpei)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教

研究者番号：40838372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム構造のRループの異常な蓄積は細胞に障害を起こすため、Rループを解消する機構は細胞にとって重要である。Rループ構造の解消にエピトランスクリプトミクスのひとつであるイノシン修飾が関わることを示唆されている。本研究では、Rループ上でのイノシン修飾部位を同定する技術の開発を進めた結果、イノシン塩基と特異的に反応する新規化合物を見出し、反応後のイノシン誘導体を有する核酸オリゴを生化学的に濃縮精製する条件を決定した。さらに、イノシン修飾反応を担う酵素ADAR1が解消するRループ領域を探索した結果、炎症応答に関わる転写因子領域のRループが検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により既存の手法では困難であったRループ上のイノシン化部位の同定への道が切り拓かれた。イノシン化部位が同定されれば、ヒトゲノムのRループ形成領域の全体像が分かり、Rループ解消の分子機構が明らかになる。Rループの解消の促進は細胞のガン化に関わり、一方、Rループの異常な蓄積は神経変性疾患や自己免疫疾患の発症に繋がる。それゆえ、イノシン修飾を介したRループの解消機構の解明はそれらの疾患の予防・治療法の開発に貢献することが見込まれる。

研究成果の概要(英文)： Since aberrant accumulation of R-loops in the genome structure can cause adverse effects on cells, the resolution mechanisms of R-loops are very important to cells. It has been suggested that inosine modification, one of the epitranscriptomic marks, is involved in the resolution of the R-loop structure. In this study, we aimed to develop a technique to identify inosine modification sites on the R-loop regions. We found a new compound that specifically reacts with inosine bases, and determined the conditions for biochemical enrichment and purification of nucleic acid oligos containing inosine derivatives after the reaction. Furthermore, we explored the R-loop regions resolved by the inosine modification enzyme ADAR1 and found that it resolves the R-loop of the region encoding a transcriptional factor involved in inflammatory responses.

研究分野：RNA分子生物学及び生化学

キーワード：Rループ DNA:RNAハイブリッド鎖 イノシン修飾 A-to-I RNAエディティング ADAR1

1. 研究開始当初の背景

一般に RNA は転写後に鋳型 DNA から即座に解離するが、時折、鋳型から解離せずに留まり続けた結果、DNA:RNA ハイブリッド鎖と一本鎖 DNA から成る R ループ構造が形成される。このゲノム構造は、ゲノムの不安定化により DNA 損傷や変異を誘発する。そのため、異常な R ループ構造の蓄積は細胞のガン化、細胞死、炎症の惹起を引き起こし、筋萎縮性側索硬化症等の神経変性疾患や自己免疫疾患との関連が示唆されている (Santos-Pereira J. M. and Aguilera A. *Nat. Rev. Genet.* 2015)。このような細胞の異常な表現型や疾患発症を防ぐために細胞には R ループ構造を解消する機構が備わっている。

RNA はゲノムからの転写後に様々な化学修飾(エピトランスクリプトミクス)を受けることで RNA の機能の調節や、プロセッシング及び翻訳等の遺伝子発現機構が制御されることが知られている。近年、このエピトランスクリプトミクスが R ループ構造の解消を制御することが報告されている (Marnef A. and Legube G. *Nat. Cell. Biol.* 2021)。エピトランスクリプトミクスの一つであるイノシン化修飾(A-to-I RNA エディティング)において、この RNA 修飾反応を担う酵素 ADAR1 が R ループ構造の解消に関与することが先行研究で報告されている (Shiromoto, Y. et al., *Nat. Commun.* 2021)。ADAR1 欠損による R ループ構造の異常な蓄積に伴い、DNA 損傷、体細胞分裂期の停止が生じることから、ADAR1 による R ループ形成の制御はゲノムの恒常性維持及び細胞分裂の進行において重要な役割を担うことが示されていた。加えて、試験管内反応で ADAR1 は DNA:RNA ハイブリッド鎖を基質として RNA 鎖のみならず、DNA 鎖側のアデノシン塩基をイノシン塩基へ変換すること (A-to-I DNA エディティング)が見出された。しかし、ADAR1 による A-to-I RNA/DNA エディティングがゲノム上のどの R ループ形成領域で生じて、どのような分子機構で R ループの解消するかについては明らかにされていなかった。

従来のゲノムワイドな R ループ構造の検出手法は、DNA:RNA ハイブリッド鎖に対して特異的な抗体を基に確立されているが、偽陽性率が高く、解像度が低いことが問題点として挙げられる。また、細胞あたりの染色体のコピー数は数個程度であるため、R ループ上で生じるイノシン化部位は細胞から抽出された全ゲノム DNA 中に僅かしか含まれないと予想される。従って、R ループ構造で生じる A-to-I RNA エディティング部位の検出には新たな検出手法の開発が必要である。

2. 研究の目的

代表者らは、これまでにアクリロニトリルとの反応によりイノシン塩基に特異的にシアノエチル基を付加することで生化学的にイノシン塩基を同定する技術を開発した (Okada S. et al. *Methods.* 2019)。本研究では、新たな化合物との反応によってイノシン化部位の濃縮精製や細胞内局在解析が可能な化学構造を導入する技術の確立を目指した (図 1A)。さらに確立した検出技術を応用して R ループ構造上におけるイノシン化

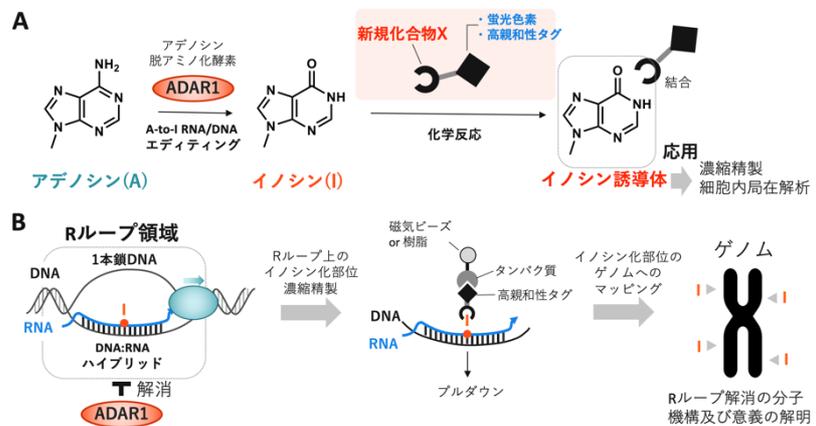


図1 Rループ領域内のA-to-I RNA/DNAエディティング部位の検出技術の開発

部位の同定を行い、ADAR1 によって解消される R ループ領域の特定を行う (図 1B)。得られた知見を基に ADAR1 による R ループ解消の分子機構や細胞内での意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イノシン塩基が有する化学特性を基に、イノシン特異的に反応する新規の化合物の絞り込みを行った。蛍光色素が結合した候補化合物とイノシン塩基を含む合成オリゴ(イノシンオリゴ)と反応させた後に反応産物を精製する。その後、電気泳動によりオリゴを分離し、蛍光強度を測定することで各化合物の反応性を評価した。

(2) 新規化合物がイノシン塩基のどの位置に結合するかを明らかにするために、上述の(1)と同様にイノシンオリゴに蛍光色素誘導体を反応させて検証を行った。

(3) 新規化合物の試薬濃度、反応時間、pH、反応後の精製方法の最適化を(1)と同様の実験系を用いて行った。

(4) 新規化合物のイノシン塩基への反応効率を既存のイノシン反応試薬と比較解析を行った。

(5) イノシン塩基が含まれる核酸を生化学的に濃縮するために、同定した化合物に高親和性のタグが付加された誘導体を選定し、RNA オリゴ中のイノシン塩基への反応性をプライマーエクステンションによって検証した。さらに、イノシン塩基オリゴに付加したタグに高い親和性を持つタンパク質が共有結合した磁気ビーズでプルダウンし、イノシン塩基オリゴの濃縮方法の検討を行った。

(6) ADAR1 が制御する R ループ領域を同定するため、siRNA の細胞導入により ADAR1 をノックダウンしたヒト神経膠芽腫細胞から total RNA を抽出し、リボソーム RNA を除去した後に RNA-seq (total RNA-seq) で解析を行った。また、遺伝子の発現変動の詳細に調べるために、ADAR1 ノックダウンを行ったヒト神経膠芽腫細胞及び結腸癌細胞の total RNA からポリ A 鎖をもつメッセージャー RNA (mRNA) を精製し、RNA-seq で解析を行った。

4. 研究成果

(1) 独自に絞り込みを行った複数の候補化合物を検証した結果、イノシンオリゴと反応後に高い蛍光強度を示す新規の化合物をひとつ見出した(化合物 X と呼ぶ)。化合物 X のイノシン塩基に対する反応効率はアデノシン塩基と比較して 5 倍以上を示していた。また、DNA と RNA オリゴのいずれの核酸にも同程度の反応効率を示していた。

(2) 化合物 X はイノシン塩基の特定の位置と結合することを確認した。

(3) 化合物 X の反応時間、試薬濃度、pH の最適化を行った結果、アデノシン塩基との比較で 10 倍以上の高い蛍光強度を示す条件を見出した。反応後の精製方法を検討した結果、アルコール沈殿と有機溶媒による抽出を組み合わせた方法が化合物を 90% 以上除去でき、最も精製効率が高いことが分かった。

(4) イノシン塩基に対する既存の蛍光色素付加試薬と比較をした結果、化合物 X の方が速い反応速度と最大の反応効率は約 3 倍程度の高さを示すことが明らかとなった。

(5) 新規化合物 X の高親和性タグ誘導体とイノシン塩基を含むオリゴを上述の研究成果(3)で最適化した反応条件下で反応させた結果、蛍光色素誘導体と同程度の反応速度及び反応効率でイノシン塩基と反応性を示すことをプライマーエクステンション法により確認した。また、ヒト培養細胞由来の total RNA と混合したイノシンオリゴを化合物 X の高親和性タグ誘導体と反応させた後に、タグと相互作用するタンパク質でプルダウンした結果、total RNA 中でもイノシンオリゴが 50% 程度の効率で反応を受けて、さらに 80% 以上の効率で濃縮精製されることが分かった。

(6) ADAR1 をノックダウンしたヒト神経膠芽腫細胞の total RNA-seq を解析した結果、炎症応答に関わる転写因子 A の 3' 非翻訳領域において転写 RNA 産物の増加が観察され、R ループ構造が蓄積していることが示唆された。それに応じて、転写因子 A の mRNA 発現量が 10 倍以上の顕著な増加を示すことを見出した。

さらに、ADAR1 或いは転写因子 A のノックダウン時のヒト神経膠芽腫細胞及び結腸癌細胞の RNA-seq の解析から、ADAR1 発現抑制時に転写因子 A に依存して発現増加を示す遺伝子を探索した。その結果、条件に合致する遺伝子として神経膠芽腫細胞で約 350 遺伝子、結腸癌細胞で約 1200 遺伝子が検出された。抽出された遺伝子の機能情報を調べると炎症の促進に関連する遺伝子が両細胞の RNA-seq で共通に含まれていた。以上の結果から、ADAR1 を介した R ループの解消機構は転写因子 A の発現を抑えて細胞内の異常な炎症を防いでいる可能性が示唆された。

(今後の展望) 以上の成果により、新規化合物 X を用いてイノシン化部位を有する DNA 及び RNA を濃縮精製して検出する技術が完成に近づいている。今後は、さらに検出技術の改善を進め、細胞から抽出されたゲノム DNA に応用して R ループ上のイノシン化部位のマッピングを行う必要がある。その結果と転写因子 A の 3' 非翻訳領域を含む R ループ領域との重複を取り、共通する一次配列や二次構造の特徴を分析することで、A-to-I RNA/DNA エディティングがどのような分子機構によって R ループ領域を解消しているかを解明する糸口が見えてくることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Noda Yuta, Okada Shunpei, Suzuki Tsutomu	4. 巻 13
2. 論文標題 Regulation of A-to-I RNA editing and stop codon recoding to control selenoprotein expression during skeletal myogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30181-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yang Yuxi, Okada Shunpei, Sakurai Masayuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Adenosine-to-inosine RNA editing in neurological development and disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 999 ~ 1013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15476286.2020.1867797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Takeo, Yashiro Yuka, Kikuchi Ittoku, Ishigami Yuma, Saito Hironori, Matsuzawa Ikuya, Okada Shunpei, Mito Mari, Iwasaki Shintaro, Ma Ding, Zhao Xuewei, Asano Kana, Lin Huan, Kirino Yohei, Sakaguchi Yuriko, Suzuki Tsutomu	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete chemical structures of human mitochondrial tRNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18068-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hojo Hiroaki, Yashiro Yuka, Noda Yuta, Ogami Koichi, Yamagishi Ryota, Okada Shunpei, Hoshino Shin-ichi, Suzuki Tsutomu	4. 巻 295
2. 論文標題 The RNA-binding protein QKI-7 recruits the poly(A) polymerase GLD-2 for 3' adenylation and selective stabilization of microRNA-122	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 390 ~ 402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakurai Masayuki, Okada Shunpei, Ueda Hiroki, Yang Yuxi	4. 巻 2181
2. 論文標題 Discovering A-to-I RNA Editing Through Chemical Methodology "ICE-seq"	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 113 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0787-9_8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

〔図書〕 計3件

1. 著者名 櫻井雅之、久保田真依、市橋瑛斗、岡田俊平、中野美世子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 細胞 (ニュー・サイエンス社)	5. 総ページ数 4
3. 書名 A-to-I RNAエディティングの基礎と最新知見	

1. 著者名 櫻井雅之、久保田真依、中野美世子、岡田俊平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 BIO Clinica (ニュー・サイエンス社)	5. 総ページ数 4
3. 書名 A-to-I RNA 塩基編集による疾患と対策技術	

1. 著者名 櫻井雅之、岡田俊平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 MSD メディカルサイエンスダイジェスト (ニューサイエンス社)	5. 総ページ数 4
3. 書名 A-to-I RNA 塩基編集による疾患と対策技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------