

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02067

研究課題名(和文) 遺伝コード修復治療の研究-人為的RNA編集によるRNAの変異修復

研究課題名(英文) Research of Genetic Code Restoration Therapy-Restoration of Mutated RNAs by Artificial RNA Editing

研究代表者

塚原 俊文 (Tsukahara, Toshifumi)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・名誉教授

研究者番号：60207339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：人為的RNA編集ツールの改良を行い、guide RNAの最適化やAPOBEC3AやDYWドメインを酵素として用いることでRNA編集効率が50%以上となる様に改善し、さらに疾患例への適用としてT>C変異を原因とするmacularマウスの修復にも成功した。U C RNA編集が顕著なツノゴケよりDYWドメインに相同性を有するGRPおよびDRHドメインを単離し、それぞれアミノ基供与体依存的なU CおよびG A変換活性を有していることを明らかにした。さらにRNA認識にPPR56を利用することでGRPあるいはDRHを用いたHEK293細胞内でのU CおよびG A RNA変換が可能である事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた様々な結果によって、RNA内の変異塩基の脱アミノ化あるいはアミノ転移によって遺伝コードを変換するRNA編集を人為的に再現することで、点変異したRNAを標的に、遺伝コードを細胞内で部位特異的に変換・修復による疾患治療が可能であることが示され、編集効率の高い人為的RNA編集ツールの開発で、A I(G)およびC U RNA編集では疾患治療に有効なレベルのツール開発に成功した。さらにツノゴケ由来のGRPあるいはDRHドメインによってHEK293細胞内でのU C及びG A変換にも成功した。GRP及びDRHドメインについては世界初の発見であり、学術的にも高い意義が認められる。

研究成果の概要(英文)：Artificial RNA editing tools were improved by optimizing guide RNAs and using APOBEC3A, 3G, and the DYW domain of a hornwort PPR protein as enzymes to achieve RNA editing efficiencies of more than 50%, and were also successfully applied to disease cases by C-to-U restoration of the mutated ATP7a mRNA in the cells from a macular mouse due to T>C mutations. GRP and DRH domains are homologous to the DYW domain and were isolated from hornwort, which exhibits significant U C RNA editing. Then, it was found to possess amino group donor-dependent U C and G A conversion activities, respectively. Furthermore, using PPR56 for RNA recognition showed that U C and G A base conversion are possible in HEK293 cells using GRP or DRH domains.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：RNA編集 遺伝コード修復 デアミナーゼ ツノゴケ DYWドメイン GRPドメイン DRHドメイン PPR56

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

転写によって発現した mRNA の一部は生体内で化学的修飾を受け、遺伝コードが変化する。例えばヒト・アポリポタンパク質 B は C \Rightarrow U 変換によって CAA が終止コドン UAA に変換されることで組織特異的な APOB48 アイソフォームの発現を制御する。このような現象は RNA 編集と呼ばれ、生体で広く存在している。RNA 編集では転写された RNA のアデノシン (A) あるいはシチジン (C) が部位特異的に脱アミノ化され、結果としてイノシン (I) あるいはウリジン (U) に変換される。I の相補的塩基は C であるため、この反応によって遺伝コードが A \Rightarrow G 変換あるいは C \Rightarrow U 変換することになる。我々はこの RNA 編集を触媒する酵素を相補的な RNA を利用して標的 RNA にリクルートすることで人為的で塩基配列特異的な RNA 編集を誘導することができるのではないかと考えた。

我々は細胞内 RNA 標識に利用される MS2 システムを用いて RNA 編集を触媒する酵素である ADAR1 あるいは APOBEC1 の活性部位タンパク質と標的に相補的な RNA を細胞内で発現させ、自己組織化させることで人為的に塩基配列特異的な RNA 編集の誘発を実現した。しかしながら、実際の疾患試料や動物を対象とした研究には至っておらず、また U \Rightarrow C RNA 編集の実現にも至っていなかった。U \Rightarrow C RNA 編集は植物、特にツノゴケで顕著な RNA 編集であることから、植物の RNA 編集研究に実績を有する京都大学の竹中瑞樹准教授と遺伝性疾患の治療研究に実績を有する国立精神・神経医療研究センター神経研究所の青木吉嗣部長を分担研究者として人為的 RNA 編集を利用した疾患治療法開発研究を開始した。

CRISPR-Cas9 を用いるゲノム編集は DNA 二本鎖の切断を伴うため、意図しない変異である off-target 変異への懸念が存在する。RNA 編集は RNA を切断しない塩基修飾反応であり、また一時的な情報分子である mRNA はたとえ off-target による意図しない変異が生じた場合でも細胞内機構によって素早く分解されると考えられるため安全性の高い遺伝子編集法であるとされている。特に人為的な U \Rightarrow C RNA 編集が可能となれば、全ての終止コドンの第一塩基は U であるため、多くのナンセンス変異を原因とする疾患への治療の可能性が拓かれる。点変異を原因とする疾患は全遺伝性疾患の 11% を占めるとされているが、本研究は未だ治療法の確立していない多くの稀な遺伝性疾患への治療法を提供するものであり、人為的 RNA 編集による疾患治療法実現の先駆けとなるものである。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子の点変異を原因とする疾患に対する治療法として、人為的な RNA 編集を利用して、発現している変異 RNA の遺伝コードを塩基配列特異的に修復して疾患を治療するという、mRNA の遺伝コード修復による疾患治療法の確立を目的とした。

点変異で機能が失われた遺伝子であっても mRNA の発現は野生型と同様であるはずであり、不必要な組織・細胞には発現することはない。また、変異によって未成熟終止コドンを生じた mRNA は Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD) によって素早く分解されるため、ナンセンス変異を原因とする疾患では病因遺伝子産物がごくわずかしかなら発現していないが、未成熟終止コドンが U \Rightarrow C 変換によって NMD を回避することで十分量のタンパク質発現が期待できる。本研究は患者の変異した RNA の点変異を細胞内で修復することによって疾患を治療する方法を確立しようとするものである。

具体的には (a) C \Rightarrow U RNA 編集を利用した治療法の確立、および (b) U \Rightarrow C RNA 編集を触媒する酵素-RNA 複合体の創成とそれを利用した遺伝コード修復、を目的とした研究を実施した。また、劣性遺伝形式の疾患では対立遺伝子の片方が正常であれば疾患は発症しないことから、RNA の修復効率 50% 以上の実現を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

下記の研究小テーマを遂行して、人為的 RNA 編集を利用して点変異を原因とする患者 mRNA の遺伝コードを細胞内で修復する方法を確立することを目指した。

(a) C \Rightarrow U RNA 編集を利用した変異 mRNA の修復治療法の確立

我々は既に APOBEC1 の活性部位を MS2 システムを介して標的に相補的な guide RNA と結合させた酵素-RNA 複合体である人為的 RNA 編集ツールによって細胞内 RNA の C \Rightarrow U 変換に成功していた (Bhakta S *et al.*, *Scientific Reports*, (2020), 10, 17304)。Guide RNA の発現プロモーターを CMV からより高発現が期待できる U6 を用いて発現上昇させることを試みた。疾患標的として P-type ATPase 遺伝子の T \Rightarrow C 変異を原因とする macular マウスを用いた。Macular マウス由来の初代培養細胞系を対象に、病因遺伝子の銅イオントランスポーターである P-type ATPase の

変異点に相補的な guide RNA を設計・構築・導入して APOBEC1 を変異点に誘導し、C⇒U 変換を引き起こす事を試みた。変異修復の可否は PCR-RFLP と塩基配列決定で検証し、さらに銅イオン要求性酵素である Cytochrome C Oxidase 活性でも検証した。

(b) U⇒C RNA 編集を触媒する酵素-RNA 複合体の創成とそれを用いた変異 mRNA 修復

(b-1) 植物の U⇒C RNA 編集触媒タンパク質の同定

植物の RNA 編集を触媒するのは Pentatricopeptide repeat (PPR) PPR タンパク質の C 末端に存在する DYW ドメインであることが判明していたが、U⇒C RNA 編集が顕著に観られるツノゴケから DYW ドメインと高い相同性を持つが C 末端が DYW ではない新規の PPR タンパク質 2 種類の遺伝子が報告されたことから、まずそれら 2 つのドメイン (GRP および DRH) の機能を解明することとした。

PPR56 は *nad4* mRNA を標的とする事が判明しているため、DYW ドメインの代わりに GRP あるいは DRH ドメインを挿入した PPR56-GRP および-DRH を *nad4* プラスミドと共に大腸菌に形質転換し、培養後の *Nad4* mRNA の塩基配列を確認することで GRP あるいは DRH ドメインの RNA 編集活性を調べた。

(b-2) ツノゴケ GRP および DRH ドメインを用いた人為的 RNA 編集ツールの開発

まず GRP および DRH ドメインを用いて MS2 システムを利用した人工酵素-RNA 複合体を構築し、人為的 RNA 編集の可否を検討した。標的 mRNA としてナンセンス変異を導入した EFPR あるいは開始コドン ATG を GTG に変異させた EGFP プラスミドを用いた。

残念ながら MS2 を利用した人為的 RNA 編集には成功しなかった。そこで次に PPR56 を RNA 認識ドメインとして PPR56-GRP あるいは -DRH を構築したツールを用いた。先の変異 EGFP を標的とするため、標的塩基 (U または G) の直前に PPR56 認識配列である UUAU- GACGGUAUCUCU 配列を挿入して標的 RNA とした。導入した変異 EGFP-mRNA に U⇒C あるいは G⇒A RNA 編集が誘導されれば、EGFP mRNA が修復され、結果として緑色蛍光を発することで人為的 RNA 編集の可否が判定できる。

4. 研究成果

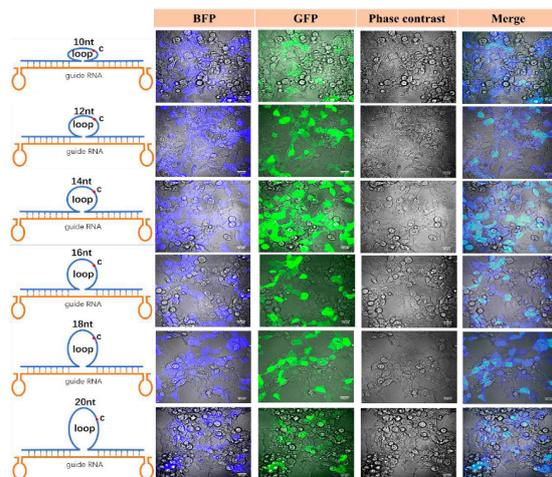
我々はこれまでに ADAR1 および APOBEC1 の活性部位と標的 RNA に相補的な guide RNA を MS2 システムを介して結合させることで人為的 RNA 編集ツールを創成し、塩基配列特異的な細胞内 RNA の A⇒I (G) および C⇒U 変換の誘導に成功していたが、その RNA 編集効率はさほど高くなかった。そのため、より RNA 編集効率の高い酵素活性の検索を行った。

APOBEC/AID ファミリー遺伝子には 11 種の遺伝子が存在している。従来の研究で活性が高いとされているヒト APOBEC3A と APOBEC3G を単離し、APOBEC1 と同様の人為的 RNA 編集ツールを構築したが、これまでの guide RNA を用いた実験では RNA 編集を観察することができなかった。様々な guide RNA を設計・構築して検討を行い、これら両酵素では標的塩基である C が一本鎖となる様な loop 構造を形成する様に guide RNA を設計すると高い RNA 編集活性が得られることが判明した。(図 1 参照)

図 1: 標的塩基の領域に loop 構造を形成させる guide RNA を用いた APOBEC3A による人為的 RNA 編集の結果

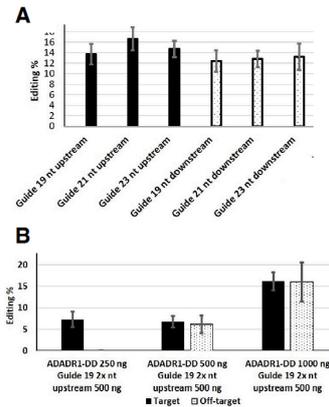
図左に示した様に、標的 C を中心に各塩基数のギャップを挿入して loop 構造となる guide RNA を用いて APOBEC3A の人為的 RNA 編集活性を確認したところ、14 塩基の loop 構想の時に最大の編集効率を示した。なお、APOBEC3G を用いた場合も同様であった。

また、ADAR1 を用いた人為的 RNA 編集ツールでは様々な guide RNA を作成してその適正化を検討し、相補的塩基長については 21 nt > 23 nt > 19 nt と編集効率に変化することおよび、guide RNA の相補領域では off-target 編集は検出されなかったが、標的の 50 nt 下流で検出されることを明らかにした。また、編集効率は導入



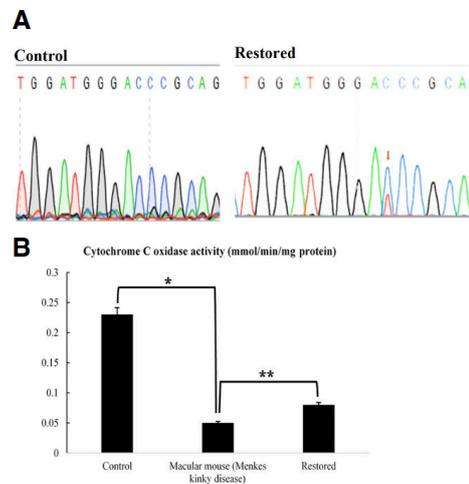
したデアミナーゼの量に比例したが、off-target 変異は導入した guide RNA の量には反比例した。(図 2 参照) これらの結果は APOBEC1 でも同様であった。

図 2: A) 様々な相補的塩基長を MS2-RNA の上流あるいは下流に挿入した guide RNA を用いた人為的 RNA 編集の効率。B) 酵素-MS2 融合タンパク質の量に対応した編集効率と off-target 変異。いずれの実験も ADAR1 を酵素として用いた。



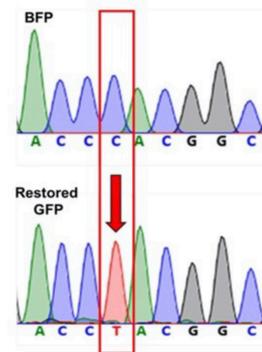
さらに、guide RNA の標的配列に相補的な配列の両端にそれぞれ 1 つの MS2-loop RNA を付加した改良型 guide RNA によって A→I(G) および C→U の細胞内変換効率は共に 50% を超えるレベルに達し、人為的な RNA 編集による疾患治療の実現が可能となった。次に、実際の疾患症例を対象とした人為的 RNA 編集を試みた。銅代謝異常によって重篤な中枢神経障害をきたす X 染色体劣性遺伝形式の Menkes 病モデルである macular mouse の線維芽細胞を対象に銅イオントランスポーターである ATP7a 遺伝子の T>C 変異の修復を試み、変異の約 35% が U に修復され、さらに銅要求酵素である Cytochrome C Oxidase 活性の上昇も確認された。この結果によって我々の人為的 RNA 編集ツールを用いた実際の疾患における変異 mRNA の修復が可能であることが実証された。(図 3 参照)

図 3: A) 人為的 RNA 編集による ATP7a mRNA の変異修復の結果。B) 銅イオン要求性 Cytochrome C Oxidase 活性の上昇の確認。



植物由来の RNA 編集システムの利用の検討に関しては、植物では PPR タンパク質の C 末端に存在する DYW ドメインが C の脱アミノ化を触媒することが判明していたため、我々は U→C RNA 編集が顕著に観察されるツノゴケの PPR タンパク質に注目し、ツノゴケ由来 PPR タンパク質遺伝子から DYW ドメインと DYW に相同性を有する 2 つのドメイン (GRP および DRH) 遺伝子断片を単離し、PPR56 とその標的遺伝子 *nad4* を利用した大腸菌アッセイ系で RNA 編集活性を調べた。ツノゴケ由来の DYW はシロイヌナズナ由来に比べ C→U 変換活性が高いことが明らかとなった。そこで、これまでに ADAR1 や APOBEC1 を用いて RNA 編集酵素-RNA 複合体の創成に成功した MS2 システムを介して guide RNA と結合させた。この植物由来の人為的 RNA 編集ツールを HEK293 細胞に導入したところ、非常に効率の良い C→U 変換が認められ、ほとんどの変異 RNA が修復されることが判明した (図 4 参照)。この結果によって、本法の実用化に向けた壁の一つがクリアされたと考えられ、人為的な RNA 編集による点変異 RNA の修復疾患治療法は実用化レベルに近づいたと判断した。

図 4: ツノゴケ DYW を酵素として用いた人為的 RNA 編集の結果。APOBEC1 の代わりにツノゴケ DYW を用いて T>C 点変異 EGFP の導入によって青色蛍光を発する HEK293 細胞を対象に RNA 編集を実施した。ほぼ全ての変異 C が U に修復された。

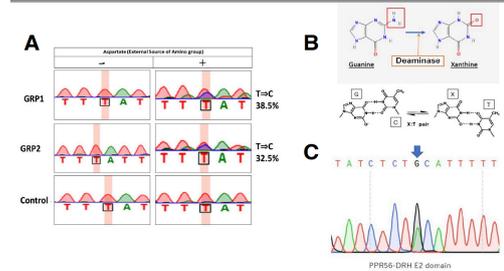


一方、ツノゴケ PPR タンパク質の GRP および DRH 遺伝子断片の RNA 編集活性を PPR56 を用いた大腸菌アッセイ系で検討するため、両プラスミドによって形質転換した大腸菌から RNA を単離し、*nad4* mRNA の配列を確認したところ、GRP ドメインにはアミノ基供与体としてアスパラギン酸を添加した場合に U→C RNA 編集活性が、DRH ドメインには G から A への変換が確認された。後者は A→I(G) RNA 編集と似た機構と考えられ、G を脱アミノ化してキサントシン (X) とし、X が U とともに塩基対形成するために遺伝コードは A として認識されたという仮説を示唆している。今後、さらなる検証実験が必要ではあるが、X が C だけでなく U あるいは T とともに塩基対形成することは既に知られ、また実際に我々が X 含有合成 oligonucleotide を鋳型として PCR 増幅し、

その産物を cloning したところ、X 塩基が A に変換した clone が検出されたことから強く支持されると考えている。

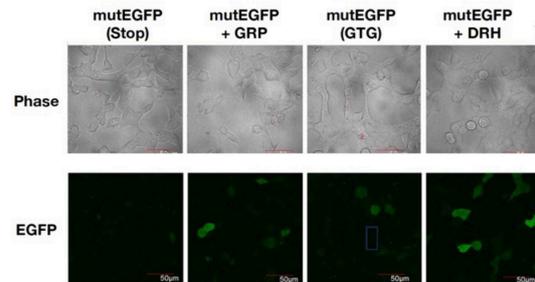
これらの結果はいずれも世界初の発見であり、特に U⇒C RNA 編集活性については多くのナンセンス変異を原因とする疾患への応用が可能となると期待される。さらに、DRH ドメインが G⇒A 変換を触媒することは、他の生物も含めてこれまで知られていない機構であった。先に述べた様に、この変換は G を脱アミノ化して X とすることで、遺伝コードは A として認識されるという新たな RNA 編集の可能性がある。以上の様にツノゴケ由来の RNA 編集活性を利用した人為的 RNA 編集ツール開発の可能性が明らかとなった。

図 5: A) PPR56-ツノゴケ GRP によるアスパラギン酸依存的 U⇒C RNA 編集。 B) グアニンとキサンチンの化学構造と塩基対形成。 C) PPR56-ツノゴケ DRH による G⇒A 塩基変換。



そこで、GRP あるいは DRH ドメインを利用した人為的 RNA 編集ツールの開発を試みた。まず従来の MS2 システムの実験系を用いて GRP あるいは DRH ドメインによる RNA 編集を試みたが、残念ながら相補的 RNA 鎖を用いるこの実験系では HEK293 細胞でのポジティブな結果は得られなかった。そこで、標的 RNA の認識に PPR56 を利用することとし、ナンセンス変異導入 EGFP あるいは開始コドン ATG を GAG に変換した EGFP の上流に PPR56 認識配列を挿入し、PPR56-GRP あるいは同-DRH 融合タンパク質遺伝子と共発現させたところ共に弱いながらも緑色蛍光が検出された。(図 6 参照)

図 6: PPR56-GRP あるいは-DRH を用いた HEK293 細胞を対象とした人為的 RNA 編集の結果。方法の項に記した様に、EGFP にナンセンス変異導入あるいは開始コドン ATG を GTG に変異させた変異塩基を標的とするため、その上流に PPR56 認識配列が挿入された mRNA を標的とした。酵素-RNA 複合体を作用させたところ、微弱ではあるが共に緑色蛍光が確認され、ヒト細胞内での人為的塩基変換が実証された。



この結果は GRP によって終止コドンの U が変換されたこと、さらには DRH によって開始コドンが修復されたことを示唆する。今後の改良が必要ではあるが、人為的 U-to-U あるいは G-to-A RNA 変換が可能であることが示された。

本研究は、RNA 内の C 塩基のアミノ基を脱アミノ化して U とする生体内機構である RNA 編集と同様の反応を人為的に再現することで、点変異した RNA を標的に、細胞内で部位特異的な脱アミノ化あるいはアミノ転移を誘起し、遺伝コードを変換・修復する方法を確立することを最終的な目的に、より実用的な人為的 RNA 編集ツールの開発を行い、A⇒I (G) および C⇒U RNA 編集では疾患治療に有効なレベルのツール開発に成功し、さらに HEK293 細胞内での U⇒C あるいは G⇒A 変換にも成功した。以上の様に、本研究の成果により、人為的 RNA 編集を利用した様々な点変異を原因とする疾患の治療が可能である事が明らかとなり、疾患治療への期待が高まった。

これまでの研究成果としては、塚原らは、MDPI の *IJMS*、*Genes*、*Applied Sciences* 誌等に、竹中らは *Nature Catalysis*、*Plant Cell* 誌等、青木らは *Commun. Biol*、*Mol Ther Nucleic Acids* 誌等にそれぞれ研究成果を発表しており、また我々と竹中の共著論文も準備中である。実用化の面では、2021 年度に申請した U⇒C 変換に関する特許について、JST の支援によって PCT 出願も行い、海外における権利化の可能性も開拓した。さらに予想外なことではあったが、本研究によってこれまで知られていなかった G を脱アミノ化して X とし、遺伝コードとしては A と認識される機構を明らかにし、その特許も出願した。今後、動物実験によって人為的 RNA 編集による遺伝コード修復の検証が必要であるが、既に青木らによって遺伝子導入用のアデノ随伴ウイルスベクターの構築も進行している。本研究の計画年度内には実施に至らなかったが、今後も研究を継続することで人為的 RNA 編集による疾患治療を実現する所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計29件（うち査読付論文 28件 / うち国際共著 11件 / うちオープンアクセス 23件）

1. 著者名 Ruchika, Toshifumi Tshukahara, Manish Biyani	4. 巻 -
2. 論文標題 A Nonsequencing Approach for the Rapid Detection of RNA Editing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiment	6. 最初と最後の頁 3591-v
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/63591-v	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 Saifullah, N Motohashi, T Tsukahara, Y Aoki	4. 巻 4
2. 論文標題 Development of Therapeutic RNA Manipulation for Muscular Dystrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genome Editing	6. 最初と最後の頁 863651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgeed.2022.863651	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 Saifullah, T Tsukahara	4. 巻 24
2. 論文標題 Integrated analysis of ALK higher expression in human cancer and downregulation in LUAD using RNA molecular scissors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 1785-1799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12094-022-02835-6	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 Saifullah, T Tsukahara	4. 巻 8
2. 論文標題 Integrated analysis of the clinical consequence and associated gene expression of ALK in ALK-positive human cancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e09878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e09878	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 S Bhakta, T Tsukahara	4. 巻 13
2. 論文標題 C-to-U RNA Editing: A Site Directed RNA Editing Tool for Restoration of Genetic Code	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 13091636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13091636	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 該当する

1. 著者名 J Mo, G Fan, T Tsukahara, M Sakari	4. 巻 23
2. 論文標題 The Role of the Exonic lncRNA PRKDC-210 in Transcription Regulation by Junling Mo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci	6. 最初と最後の頁 232213783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232213783	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 J Li, T Oonishi, G Fan, M Sakari, T Tsukahara	4. 巻 13
2. 論文標題 Increasing the Editing Efficiency of the MS2-ADAR System for Site-Directed RNA Editing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Appl. Sci.	6. 最初と最後の頁 13042383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app13042383	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 Mary Chesshyre, Deborah Ridout, Yasumasa Hashimoto, Yoko Ookubo, Silvia Torelli, Kate Maresh, Valeria Ricotti, Lianne Abbott, Vandana Ayyar Gupta, Marion Main, Giulia Ferrari, Anna Kowala, Yung-Yao Lin, Francesco Saverio Tedesco, Mariacristina Scoto, Giovanni Baranello, Adnan Manzur, Yoshitsugu Aoki, Francesco Muntoni	4. 巻 13
2. 論文標題 Investigating the role of dystrophin isoform deficiency in motor function in Duchenne muscular dystroph	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 1360-1372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcsm.12914	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 該当する

1. 著者名 Tsukasa Tominari, Yoshitsugu Aoki	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical development of novel therapies for Duchenne muscular dystrophy-Current and future	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 12691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ncn3.12691	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 Ayako Maeda, Sachi Takenaka, Tenghua Wang, Brody Frink, Toshiharu Shikanai, Mizuki Takenaka	4. 巻 111
2. 論文標題 DYW deaminase domain has a distinct preference for neighboring nucleotides of the target RNA editing sites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Journal	6. 最初と最後の頁 756-757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.15850	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 Sachiko Toma-Fukai, Yuto Sawada, Ayako Maeda, Hikaru Shimizu, Toshiharu Shikanai, Mizuki Takenaka, Toshiyuki Shimizu	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural insight into the activation of an Arabidopsis organellar C-to-U RNA editing enzyme by active site complementation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Cell	6. 最初と最後の頁 koac318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac318	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 -

1. 著者名 Ruchika, Tsukahara Toshifumi	4. 巻 571
2. 論文標題 The U-to-C RNA editing affects the mRNA stability of nuclear genes in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 110 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.098	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 Bhakta Sonali, Tsukahara Toshifumi	4. 巻 149
2. 論文標題 Double MS2 guided restoration of genetic code in amber (TAG), opal (TGA) and ochre (TAA) stop codon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 109851 ~ 109851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.enzmictec.2021.109851	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 Ruchika, Okudaira Chisato, Sakari Matomo, Tsukahara Toshifumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome-Wide Identification of U-To-C RNA Editing Events for Nuclear Genes in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 635 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10030635	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 Rahman Md Mahbubur, Reza A.S.M. Ali, Khan Muhammad Ali, Sujon Khaled Mahmud, Sharmin Rokshana, Rashid Mamunur, Sadik Md Golam, Reza Md Abu, Tsukahara Toshifumi, Capasso Raffaele, Mosaddik Ashik, Gobe Glenda C., Alam AHM Khurshid	4. 巻 278
2. 論文標題 Unfolding the apoptotic mechanism of antioxidant enriched-leaves of Tabebuia pallida (lindl.) miers in EAC cells and mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Ethnopharmacology	6. 最初と最後の頁 114297 ~ 114297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jep.2021.114297	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 該当する

1. 著者名 Takenaka Mizuki, Takenaka Sachi, Barthel Tatjana, Frink Brody, Haag Sascha, Verbitskiy Daniil, Oldenkott Bastian, Schallenberg-Ru?dinger Mareike, Feiler Christian G., Weiss Manfred S., Palm Gottfried J., Weber Gert	4. 巻 4
2. 論文標題 DYW domain structures imply an unusual regulation principle in plant organellar RNA editing catalysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Catalysis	6. 最初と最後の頁 510 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41929-021-00633-x	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 該当する

1. 著者名 Takenaka Mizuki	4. 巻 2363
2. 論文標題 Quantification of Mitochondrial RNA Editing Efficiency Using Data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 263 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1653-6_18	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Tone Yuichiro, Mamchaoui Kamel, Tsoupra Maria K., Hashimoto Yasumasa, Terada Reiko, Maruyama Rika, Gait Michael J., Arzumanov Andrey A., McClorey Graham, Imamura Michihiro, Takeda Shin'ichi, Yokota Toshifumi, Wood Matthew J.A., Mouly Vincent, Aoki Yoshitsugu	4. 巻 31
2. 論文標題 Immortalized Canine Dystrophic Myoblast Cell Lines for Development of Peptide-Conjugated Splice-Switching Oligonucleotides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acid Therapeutics	6. 最初と最後の頁 172 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/nat.2020.0907	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 該当する

1. 著者名 Nogami Ken'ichiro, Maruyama Yusuke, Sakai-Takemura Fusako, Motohashi Norio, Elhussieny Ahmed, Imamura Michihiro, Miyashita Satoshi, Ogawa Megumu, Noguchi Satoru, Tamura Yuki, Kira Jun-ichi, Aoki Yoshitsugu, Takeda Shin'ichi, Miyagoe-Suzuki Yuko	4. 巻 30
2. 論文標題 Pharmacological activation of SERCA ameliorates dystrophic phenotypes in dystrophin-deficient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1006 ~ 1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab100	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 該当する

1. 著者名 Jiarui Li, Guangyao Fan, Matomo Sakari, Toshifumi Tsukahara	4. 巻 19
2. 論文標題 Improvement of C to U RNA editing 1 using an artificial MS2 APOBEC system,	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 2300321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biot.202300321	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 該当する

1. 著者名 Md Thoufic Anam Azad, Umme Qulsum, and Toshifumi Tsukahara, Genes,	4. 巻 14
2. 論文標題 Examination of Factors Affecting Site-Directed RNA Editing by the MS2-ADAR1 Deaminase System	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14081584	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 該当する

1. 著者名 Hidenori Kojima, Taketaro Sadahiro, Naoto Muraoka, Hiroyuki Yamakawa, Hisayuki Hashimoto, Ryota Ishii, Masahiko Goshu, Yuto Abe, Yu Yamada, Koji Nakano, Seiichiro Honda, Ryo Fujita, Tatsuya Akiyama, Yoichi Sunagawa, Tatsuya Morimoto, Toshifumi Tsukahara, Hiroyuki Hirai, Keiichi Fukuda and Masaki Ieda	4. 巻 18
2. 論文標題 MEF2C/p300-mediated epigenetic remodeling promotes the maturation of induced cardiomyocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1274–1283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2023.05.001	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 Jiarui Li, Tomoko Oonishi, Guangyao Fan, Matomo Sakari and Toshifumi Tsukahara,	4. 巻 13
2. 論文標題 Increasing the Editing Efficiency of the MS2-ADAR System for Site-Directed RNA Editing,	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Science	6. 最初と最後の頁 2383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app13042383	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 該当する

1. 著者名 Umme Qulsum, Md Thoufic Anam Azad, Toshifumi Tsukahara	4. 巻 63
2. 論文標題 Identification of Zinc Finger (ZnF) Genes that Undergo Tissue-specific Alternative Splicing in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Egyptian Journal of Botany	6. 最初と最後の頁 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21608/ejbo.2023.189961.2247	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 該当する

1. 著者名 Bayer-Csaszar, E., Jorg, A., Hartel, Brennicke, A., Takenaka, M	4. 巻 65
2. 論文標題 The Gating Domain of MEF28 is Essential for Editing Two Contiguous Cytidines in nad2 mRNA in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 pcad087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad08	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 該当する

1. 著者名 Otake M, Imamura, Enya S, Kangawa A, Shibata M, Ozaki K, Kimura K, Ono O, Aoki Y	4. 巻 7
2. 論文標題 Severe cardiac and skeletal manifestations in DMD-edited microminipigs: an advanced surrogate for Duchenne muscular dystrophy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-024-06222-5	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 Kunitake K, Motohashi N, Inoue T, Suzuki Y, Aoki Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Characterization of CD90/Thy-1 as a crucial molecular signature for myogenic differentiation in human urine-derived cells through single-cell RNA sequencing.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-52530-5	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 Motohashi N, Minegishi K, Aoki Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Inherited myogenic abilities in muscle precursor cells defined by the mitochondrial complex I-encoding protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death Dis.	6. 最初と最後の頁 689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-023-06192-2	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 Watanabe N, Tone Y, Nagata T, Masuda S, Saito T, Motohashi N, Takagaki K, Aoki Y, Takeda S	4. 巻 20
2. 論文標題 Exon 44 skipping in Duchenne muscular dystrophy: NS-089/NCNP-02, a dual-targeting antisense oligonucleotide.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Ther Nucleic Acids.	6. 最初と最後の頁 102034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2023.102034	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 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 2件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Ruchika, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Development of bioengineered MS2 system for restoration of genetic code
3. 学会等名 Nano today (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ruchika, Chisato Okudaira, Matomo Sakari, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Genome-wide identification and analysis of U-to-C RNA editing events in Arabidopsis thaliana by transcriptome sequencing
3. 学会等名 3rd Annual Plant Biology and Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ruchika, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Development of RNA editing system using hornwort specific DYW type PPR proteins,
3. 学会等名 Harnessing the plant Microbiome (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ruchika, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Effect of U-to-C RNA editing on the mRNA half-life of PPR protein
3. 学会等名 5th World Plant Genomics and Plant Science Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saifullah, Matomo Sakari, Takeshi Suzuki, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 RNA guided CRISPR-Cas protein downregulates the oncogenic driver ALK expression in human lung cancer cell
3. 学会等名 54th annual European Human Genetics Conferenc (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Artificial RNA editing for genetic cord restoration
3. 学会等名 BIOLOGICS AND BIOSIMILARS; ADVANCES IN MEDICINAL CHEMISTRY & PHARMACOLOG (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Artificial RNA Editing toward Treatment for Diseases Caused by Point Mutation
3. 学会等名 Gene and Cell Technology Conference 2023 ((招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 酵素、複合体、組換えベクター、遺伝性疾患治療薬及びポリヌクレオチド	発明者 塚原俊文、	権利者 北陸先端科学技術大学院大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/ 47410	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 酵素、複合体、組換えベクター、遺伝性疾患治療薬及びポリヌクレオチド	発明者 塚原俊文、Ruchika	権利者 北陸先端科学技術大学院大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-210380	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	竹中 瑞樹 (Takenaka Mizuki) (10796163)	京都大学・理学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	青木 吉嗣 (Aoki Yoshitsugu) (80534172)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・部長 (82611)	

	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
研究協力者	川原 弘三 (Kawahara kozo)		
研究協力者	緑川 淳 (Midorikawa Atsushi)		

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
---------	---------