

令和元年5月24日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01926

研究課題名（和文）細胞内シグナル伝達の一過的な制御を目指した新規RNA変異導入技術の開発と応用

研究課題名（英文）Development of the method for site-directed RNA editing to regulate target intracellular signal transduction

研究代表者

福田 将虎（Fukuda, Masatora）

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：90526691

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、RNA編集機構を利用した部位特異的RNA変異導入技術の開発を通して、細胞内タンパク質機能をRNAレベルで制御する新たな方法論を確立することを研究目標とした。これまでに、RNA編集酵素である二本鎖RNA特異的アデノシンデアミナーゼ（ADAR）の編集活性を目的部位に誘導し、標的部位に特異的なA-to-I RNA編集（アデノシンをイノシンに変換する）を導入可能なガイドRNA（編集ガイドRNA：AD-gRNA）を構築している。本研究では、従来型と同等の機能を有する短鎖型AD-gRNAの設計基盤の構築し、新たなRNA変異導入技術の基盤的方法論を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、医療や創薬に応用することができる新しい遺伝子改変技術を開発することを目的とした。これまでに本研究では、AD-gRNAと呼ばれる特殊な分子を用いて、RNA（ゲノムDNA（生物の設計図）の一部が写し取られた情報分子）を書き換えることで、一時的に生物の遺伝情報を書き換える技術、すなわちRNA編集技術を開発している。本課題では、従来のRNA編集技術をさらに高性能なものにするため、より短鎖（小さい）で機能する新たなAD-gRNAを開発した。得られた短鎖型AD-gRNAは、新しい疾患治療薬としての応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a methodology to regulate the target signal transduction in the cell by using site-directed RNA editing technology that utilizes endogenous RNA editing mechanism. In the previous our research, we have established basic methodology for site-directed RNA editing with the guide RNA (AD-gRNA) that could induce the RNA editing activity of adenosine deaminase acting on RNA into the target-site. In order to improve this site-directed RNA editing to apply for the regulation of intracellular signaling pathway, we newly designed the short-type AD-gRNA (shAD-gRNA) with the equal activity of the original gRNA. shAD-gRNAs succeeded in site-directed RNA editing in the intracellular environment and could be applied to the regulation of target gene expression in ADAR-expressing cells.

研究分野：生物分子科学

キーワード：RNA編集 ガイドRNA 遺伝子制御技術 分子設計 機能性RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術による遺伝情報の改変は、細胞内在性タンパク質の機能を明らかにする上で有効な手段として利用される画期的な方法論である。しかし、ゲノム改変の影響は細胞内で永続的に続くため、本来の細胞状態を変えてしまうことに加え、タンパク質機能を制御するタイミング及びその持続時間のコントロールが困難である。従ってゲノム編集技術は、シグナル伝達を代表とする「細胞内で一過的に生じる現象」を生きたままの状態の詳細に解析することには適していない。細胞内で起こる一過的なシグナル伝達の理解を深めるためには、「ゲノムを改変しない、内在性タンパク質機能を一時的に制御できる」汎用的かつ実用的な新しい技術の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は、RNA 編集機構を利用した部位特異的 RNA 変異導入技術の開発を通して、細胞内タンパク質機能を RNA レベルで制御する新たな方法論を確立することを最終目標とした。本研究ではこれまでに、RNA 編集酵素である二本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミナーゼ (ADAR) の RNA 編集活性を目的部位に誘導し、標的部位に特異的な A-to-I RNA 編集 (アデノシンをイノシンに変換する) を導入することができるガイド RNA (編集ガイド RNA: AD-gRNA) を構築している。そこで本研究では、編集ガイド RNA の配列及び細胞導入方法の最適化を通して、部位特異的 RNA 変異導入技術を確立し、細胞内標的タンパク質機能を一時的に制御する方法論を展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AD-gRNA 配列設計方法の確立

これまで構築した RNA 編集技術の細胞内での RNA 編集効率及び、標的部位選択性を向上させるため、従来よりも高機能化 AD-gRNA の構築を試みた。AD-gRNA は、hADAR2 と親和性を有し標的部位に対して効率的に RNA 編集を誘導するための「ADAR 誘導領域 (ARR)」と標的 RNA と相補鎖的な配列を有し標的編集部位を設定するための「アンチセンス領域 (ASR)」で構成される。また本設計では、ASR を ARR の 3' 末端に導入した 3' AS 型 AD-gRNA 及び、5' 末端に導入した 5' AS 型 AD-gRNA の 2 種類の AD-gRNA 基盤配列がある。そこで、それぞれの AD-gRNA 基盤配列の特性及び、編集誘導に必要な機能領域を特定した。その後、得られた結果をもとに、新たな AD-gRNA の設計方法を構築した。

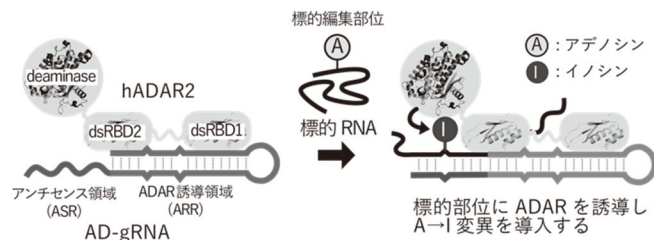


図 1. 編集ガイド RNA (AD-gRNA)

(2) AD-gRNA を用いた RNA 編集技術による標的遺伝子発現制御

AD-gRNA を用いた RNA 編集技術が、ヒト培養細胞内において標的遺伝子の発現制御が可能であるかを検証した。実験的にこれを実証するため、変異型 GFP (GFP_W58X) を利用した編集蛍光レポーターを構築した。GFP_W58X は、コーディング領域にあらかじめ UAG コドン (終始コドン) が導入されており、このコドンが RNA 編集誘導によって UIG コドン (トリプトファン) に変換された場合にのみ成熟型 GFP を発現する。同時に、AD-gRNA 配列設計に従い、同コドンを標的とする AD-gRNA (Adg-GFP_A173) を設計し、細胞内発現プラスミド (pAdg-GFP_A173) を構築した。編集レポーター発現プラスミド (pGFP_W58X)、pAdg-GFP_A173 及び、hADAR2 発現プラスミド (pADAR2) を、HEK293 細胞に形質導入した後、抽出した GFP_W58X mRNA の A173 における編集割合を解析した。また、蛍光顕微鏡により細胞内での RNA 編集依存的な GFP 発現を観察した。

4. 研究成果

(1) ASR と標的 RNA が形成する二本鎖領域における、AD-gRNA の編集誘導選択性 (オフターゲット編集) を *in vitro* 編集アッセイにより解析した。まず、オフターゲット編集を解析するため、標的アデノシン (A0) から 3 nt から 12 nt 離れた位置に、オフターゲット編集部位としてアデノシンを配置したモデル標的 RNA (An: A3-A12) を合成した。各種モデル標的 RNA に対して、組換え hADAR2 を用いた *in vitro* 編集反応を行ない、各部位の編集割合を解析した (図 2A)。結果、3' -AS ADg を用いた反応では、標的部位以外における高効率な RNA 編集が観測された (図 2A 3' AS ADg)。一方、5' -AS ADg を用いた編集反応においては、オフターゲット編集

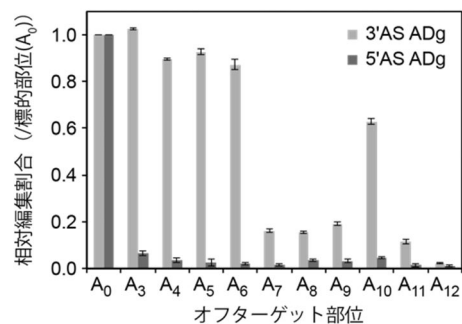


図 2. オフターゲット編集解析

はほとんど観測されなかった。以上結果より、5' AS 型 AD-gRNA は優れた編集選択性を有することを明らかにした。

(2) AD-gRNA を用いた RNA 編集技術により、標的遺伝子の機能発現を制御できるかを評価した。抽出した GFP_W58X のダイレクトシーケンスにより得られたクロマトグラムから、AD-gRNA により A173 が編集されていることを確認した (図 4b)。さらに、蛍光顕微鏡観察においては、pGFP_W58X と pADAR2 のみを形質導入した細胞では、蛍光を発する細胞は観測されなかったが、そこに pADg_GFP_A173 を形質導入することで、強い蛍光を発する細胞が多数観測された。以上の結果より、ヒト培養細胞において、AD-gRNA を用いた RNA 編集誘導により標的遺伝子の発現制御が可能であることを実証した。

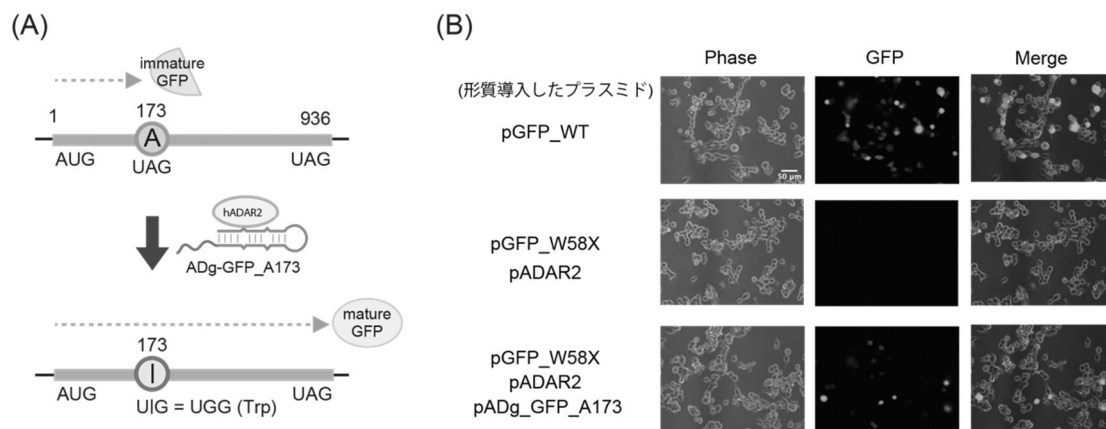


図 3. AD-gRNA を用いた RNA 編集技術による標的遺伝子発現制御

(A) 実験原理の概略図、(B) 各種発現プラスミドを形質導入した細胞の蛍光顕微鏡写真

(3) 本研究では、上記研究成果に加え、AD-gRNA の RNA 編集誘導に必要な機能領域を特定した。また、機能発現に必要な領域のみで構成される短鎖型 AD-gRNA の構築にも成功している。これらの結果より、RNA 編集誘導を原理とする新たな核酸医薬品の基盤分子として、AD-gRNA が適用可能であることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing.
Fukuda M, Umeno H, Nose K, Nishitarumizu A, Noguchi R, Nakagawa H.
Sci Rep. 7, 41478. (2017) doi: 10.1038/srep41478.
2. Synthesis and Fluorescence Properties of 1,1-Dimethyl-1,4-Dihydrodibenzo[b,h][1,6]naphthyridinium Iodides: Turn-on Type Detection of DNA
Okuma K, Oba A, Kuramoto R, Iwashita H, Nagahora N, Shioji K, Noguchi R, Fukuda M
European Journal of Organic Chemistry 6885. (2017) doi: 10.1002/ejoc.201701277

〔学会発表〕(計 26 件)

1. Kanako Nose, Masatora Fukuda, Development of functional RNA for site-directed RNA mutagenesis based on an A-to-I RNA editing, FIBER FUTURE COLLEGE Series 56 (招待講演), 2018
2. 福田 将虎, RNA 編集誘導を原理とする新規遺伝子改変・制御技術の開発, 有機合成化学協会九州山口支部第 30 回 若手研究者のためのセミナー (招待講演), 2018
3. 野瀬 可那子, 星野 莉奈, 福田 将虎, A-to-I RNA 編集を標的部位特異的に誘導するガイド RNA の設計と機能評価, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018
4. 星野 莉奈, 野瀬 可那子, 福田 将虎, A-to-I RNA 編集の翻訳開始点生成によるタンパク質翻訳制御, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018
5. Kanako Nose, Rina Hoshino, Masatora Fukuda, Identification of optimal structure and nucleotide sequences of AD-gRNA for an efficient site-directed A-to-I RNA editing, 第 45 回国際核酸化学シンポジウム, 日本核酸化学会第 2 回年会, 2018
6. 野瀬 可那子, 星野 莉奈, 増田 修樹, 福田 将虎, RNA 編集を標的部位に誘導する機能性

- RNA の設計と機能評価, 第 12 回バイオ関連化学シンポジウム, 2018
7. 野瀬 可那子, 星野 莉奈, 増田 修樹, 福田 将虎, RNA 編集を部位特異的に誘導するガイド RNA の設計と機能評価, 第 20 回日本 RNA 学会年会
 8. 福田将虎, 野瀬可那子, RNA 編集誘導を原理とする RNA 変導入核酸の開発, 日本核酸医薬学会第 4 回年会 (招待講演), 2018
 9. Kanako Nose, Rina Hoshino, Masatora Fukuda, Design and optimization of a guide RNA for site-directed A-to-I RNA editing, RNA2018
 10. Fukuda M., Nose K., Noguchi R., Morii T., Development of the site-directed RNA mutagenesis for regulating an energy production in the cell., The 8th International Symposium of Advanced Energy Science -Interdisciplinary Approach to Zero-Emission Energy - (招待講演), 2017
 11. 福田 将虎, 野瀬 可那子, 野口 龍磨, 星野 莉奈, 増田 修樹, デザイナー-RNA を用いた RNA 編集誘導を原理とする一過的遺伝子改変技術の開発, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)(招待講演), 2017
 12. 星野 莉奈, 野瀬 可那子, 福田 将虎, A-to-I RNA 編集による翻訳開始点の生成, 第 19 回日本 RNA 学会年会, 2017
 13. 野口 龍磨, 佐藤 慎一, 勝田 陽介, 片平 正人, 山置 佑大, 福田 将虎, A-to-I RNA 編集により誘起するグアニン四重鎖構造, 第 19 回日本 RNA 学会年会, 2017
 14. 野瀬 可那子, 野口 龍磨, 星野 莉奈, 増田 修樹, 中川 裕之, 福田 将虎, ヒト ADARs の編集活性を利用した RNA 変異導入法の開発, 第 19 回日本 RNA 学会年会, 2017
 15. 野口 龍磨, 勝田 陽介, 山置 佑大, 片平 正人, 佐藤 慎一, 福田 将虎, A-to-I RNA 編集により誘起する G カルテット構造, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 2017
 16. 野瀬 可那子, 野口 龍磨, 星野 莉奈, 増田 修樹, 中川 裕之, 福田 将虎, ADAR の編集活性を部位特異的に誘導するガイド RNA の構築, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 2017
 17. 野瀬 可那子, 梅野 紘充, 西垂水 梓, 野口 龍磨, 福田 将虎, イノシンの生理機能解明を目指した部位特異的 A-to-I RNA 編集誘導法の開発, 第 39 回 日本分子生物学会年会, 2016
 18. 梅野 紘充, 野瀬 可那子, 西垂水 梓, 野口 龍磨, 福田 将虎, hADAR2 による RNA 編集を部位特異的に誘導するガイド RNA, 第 39 回 日本分子生物学会年会, 2016
 19. 西垂水 梓, 小山 唯, 弟子丸 正伸, 福田 将虎, HTR2C pre-mRNA の A-to-I RNA 編集における ADAR2 の dsRBD の寄与, 第 39 回 日本分子生物学会年会, 2016
 20. 野口 龍磨, 佐藤 慎一, 勝田 陽介, 福田 将虎, A-to-I RNA 編集によるグアニン四重鎖構造の制御, 第 39 回 日本分子生物学会年会, 2016
 21. 西垂水 梓, 小山 唯, 弟子丸 正伸, 福田 将虎, HTR2C pre-mRNA の A-to-I RNA 編集における ADAR2 の二本鎖 RNA 結合ドメインの役割, 第 89 回 日本生化学会大会, 2016
 22. 福田 将虎, 野瀬 可那子, 西垂水 梓, 野口 龍磨, 梅野 紘充, RNA 編集機構を利用した部位特異的 RNA 変異導入を可能にするガイド RNA の構築, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016
 23. 梅野 紘充, 野瀬 可那子, 西垂水 梓, 野口 龍磨, 福田 将虎, ADAR の RNA 編集活性を標的部位特異的に誘導するガイド RNA の構築, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016
 24. 野口 龍磨, 佐藤 慎一, 勝田 陽介, 福田 将虎, A-to-I RNA 編集により誘起するグアニン四重鎖構造の設計と機能解析第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016
 25. 野瀬 可那子, 梅野 紘充, 西垂水 梓, 福田 将虎, A-to-I RNA 編集を利用した部位特異的な RNA 変異導入技術の開発, RNA フロンティアミーティング 2016, 2016
 26. Kanako Nose, Hiromitsu Umeno, Azusa Nishitarumizu, Ryoma Noguchi, Masatora Fukuda, Construction of guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilizing A-to-I RNA editing, RNA 2016, 2016

〔図書〕(計 2 件)

1. RNA 修飾機構を利用した RNA 編集技術の開発
福田 将虎, 実験医学 2018 年 12 月号 (五十嵐 和彦, 深水 昭吉), 3246-3251, 羊土社, 2018
2. RNA 情報を編集する新たな遺伝子改変・制御技術
野瀬可那子, 福田将虎, 実験医学 2018 年 6 月号 (西川博嘉), Next Tech Review, 1522-1528, 羊土社, 2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

1. 名称: オリゴヌクレオチド、その製造方法および標的 RNA の部位特異的編集方法
発明者: 福田将虎
権利者: 福岡大学、第一三共 (株)

- 種類：特許
番号：特願 2018-151757 (国内優先権主張出願)
出願年：2018 年 8 月 10 日
国内外の別： 国内
2. 名称：タンパク質標的核酸アダプター、その製造方法、及び標的タンパク質の検出方法
発明者：福田将虎
権利者：福岡大学
種類：特許
番号：特願 2018-128424
出願年：2018 年 7 月 5 日
国内外の別： 国内
3. 名称：オリゴヌクレオチド、その製造方法および標的 RNA の部位特異的編集方法
発明者：福田将虎
権利者：福岡大学、第一三共 (株)
種類：特許
番号：特願 2017-234341
出願年：2017 年 12 月 6 日
国内外の別： 国内

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://funcbio.com/>

6 . 研究組織

- (1) 研究分担者 なし
(2) 研究協力者 なし

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、研究者個人に帰属されます。