

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03159

研究課題名(和文)哺乳動物内在性RNA依存的DNA塩基修飾の分子機構と制御破綻による疾患発症の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of mammalian endogenous RNA-dependent DNA base modification and disease pathogenesis due to dysregulation

研究代表者

櫻井 雅之(Sakurai, Masayuki)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・准教授

研究者番号：80809236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：生命のセントラルドグマでは、DNAから適宜必要な遺伝子をRNAへと転写して遺伝子情報がタンパク質へと翻訳される。本研究では、遺伝子情報担体であるDNAとRNAの塩基配列において、アデノシンからグアノシンへの変化と同様の効果を持つ、脱アミノ化によるイノシンへの塩基修飾(A-to-I編集)機構を対象とした。成果として、哺乳動物内在性として初となる、RNAがガイドするゲノムDNA配列編集機構となるA-to-I DNA編集とその破綻による細胞障害の分子機構を解明し、さらにこれまで見過ごされてきたイノシン化核酸を検出可能とする技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年CRISPRに代表される、ガイド核酸を用いた人為的ゲノム編集技術が広く利用されている一方、これまで哺乳動物細胞が内在的に備えるガイド核酸によるゲノム編集機構は未発見であった。研究対象であるA-to-I DNA編集はその初のものとなり、見過ごされてきたDNAの変異あるいは修復を担うことが想定され、今回はその一例を解明し報告した。その制御破綻はDNA配列異常を引き起こすため、がん化や遺伝子疾患の原因となりうる。本研究の成果の一つとして、そのようなA-to-I DNA編集部位がこれまで同定不可能であったものを打破し、その機序解明を加速するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have found that an enzyme named ADAR, originally discovered and considered as a double-stranded RNA-specific adenosine deaminase, can edit adenosine (A) into inosine (I) of RNA and even surprisingly, of DNA in RNA:DNA hybrid double strand. The fact indicates that even mammalian cells have endogenous genomic DNA editing system, which is guided by RNA:DNA hybrid strand formation and the ADAR. Since inosine can base pairs with cytidine(C), A-to-I editing has a similar effect on genetic information to mutation into guanosine (G). Thus, the A-to-I DNA editing can be considered an endogenous active DNA mutating or repairing mechanism. We revealed that A-to-I DNA editing activity by the ADAR was required for cell survival. Furthermore, we have invented a new technique for detecting and quantifying overlooked inosines in nucleic acids.

研究分野：核酸分子生物学

キーワード：イノシン ADAR A-to-I エディティング DNA 編集 RNA編集 RNA editing エピトランスクリプトーム 塩基修飾

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「生命のセントラルドグマ」である、DNA から適宜必要な遺伝子を RNA へと転写し、機能発現体であるタンパク質を産生する遺伝子発現の流れにおいては、各段階において多彩な発現調節機構が働くことにより、適切な遺伝子発現が維持される。この調節機構の1つに、遺伝子情報そのものである DNA と RNA の [A,G,C,T(U)] 4 種の塩基の化学構造を修飾する機構が備わっている。

本研究では、分子レベルにおける塩基化学構造の変化が最終的に寄与する生命現象の解明を研究主題とし、特にアデノシン(A)の脱アミノ化反応によるイノシン(I, Ino)と呼ばれる修飾に注目した。セントラルドグマにおいて必須となるワトソン・クリック型塩基対では、A はチミン(T)またはウリジン(U)と [A:T(U)] 対を、グアノシン(G)はシチジン(C)と [G:C] 対を形成する。しかし、A 脱アミノ化後の Ino は G と同様に C と塩基対を形成する。結果、A:T(U) から Ino:C へと塩基対が換わるために、遺伝子情報上では A から G への編集と同義となることから、A-to-I 編集機構と呼ばれる。

この機構は後生動物で発見され、これまで細胞内二本鎖 RNA を基質とする酵素 ADAR (Adenosine Deaminase Acting on dsRNAs) が担う。そのため、転写産物の遺伝子配列やスプライシング、タンパク質結合構造、翻訳効率、外来 RNA への自然免疫に深く関わる機能を持つ。これまでその名前の由来や経緯から、ADAR は二本鎖 RNA にのみ特異的に作用すると考えられてきた。しかしながら近年、我々の研究グループは ADAR が、RNA:DNA ハイブリッド鎖をも基質として RNA 鎖と DNA 鎖を A-to-I RNA および A-to-I DNA 編集することを発見している。この発見はゲノム DNA で A-to-I DNA 編集に起因する A から G への能動的な塩基編集機構が哺乳動物に内在することを示唆するものである。

研究代表者である櫻井は、これまで RNA 塩基の編集(塩基置換)と化学修飾、それを担う酵素の機能解明(Nat. Struct. Mol. Biol. 2017, Nat. Commun. 2016, Nat. Protoc. 2015, Genome Res. 2014, Cell 2013, Nat. Chem. Biol. 2010)を進めてきた。この過程で二本鎖 RNA 編集酵素と考えられていた ADAR (Adenosine Deaminase Acting on dsRNA: 二本鎖 RNA 特異的アデノシン脱アミノ化酵素)の基質特異性の再検証により ADAR が RNA:DNA ハイブリッド鎖(以下 RNA:DNA 鎖)をも基質とし、RNA 鎖だけでなく DNA 鎖のアデノシン(A)を脱アミノ化してイノシン(I)化修飾する A-to-I DNA 編集を発見した。DNA 中の I は DNA 複製期を経ると G に置換されるため、A-to-I DNA 編集機構はゲノムの A>G (グアノシン)変異導入機構の初期段階と考えられる。近年 CRISPR-Cas9 などガイド RNA 鎖を用いたゲノム編集(改変)法が利用されているが、これまで哺乳動物細胞が内在的に持つ、RNA によりガイドされるゲノム編集機構は発見されていなかった。よって DNA アデノシン脱アミノ化修飾こそ哺乳動物細胞内在性の、初の RNA ガイド性ゲノム編集機構と言える。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳動物細胞が備えている RNA:DNA 鎖を基質とした DNA のアデノシン脱アミノ化編集(A-to-I DNA 編集)の分子機構と生物学的意義の解明を行う。さらにこれを応用した新規人為的 DNA 編集法を開発することを目的とした。その成果により、能動的 DNA アデノシン脱アミノ化によるゲノム DNA の変異・修復の分子機構を解明し、がん化・疾患発症の原因を明らかにする。さらに新規 DNA 編集法への応用開発による、治療法開発と遺伝子工学技術の発展を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト・マウス細胞の RNA:DNA 鎖領域における A-to-I DNA 編集部位の同定と分子機構の解明を行う。次いでその生物学的意義と制御機構破綻によるがん化および炎症惹起の分子病態を明らかにする。最後に A-to-I DNA 編集機構を利用した新規ゲノム DNA 編集法を確立する。

【技術開発・発見】イノシン化核酸修飾に特異的な標識による検出および精製技術

本研究では始めに従来の RNA:DNA 鎖特異的抗体を用いて、培養細胞から精製した RNA および DNA の配列解析を行い、A-to-I 編集に起因する A>G 置換部位の検出を実施した。しかしながら RNA:DNA 鎖領域の特定ではシグナル/ノイズ比が比較的小さいため、決定的な領域特定が困難であることが見出された。また、DNA 中の I は非常に微量かつ一時的と想定され既存の技術では検出同定が極めて難しく、事実これまで発見されていない。そこで櫻井らが既に独自開発したイノシン同定技術(ICE 法)に基づくさらなる発展技術の開発に取り組んだ。ICE 法は、イノシン特異的なシアノエチル基付加反応を利用して PCR 反応を介しても G ではなく Ino であることを証明

する技術であり、97%の精度と次世代シーケンス解析への応用が可能である。本計画では RNA と DNA のどちらにも適用可能であり、イノシン特異的に蛍光標識またはタグ官能基標識する技術の開発を実施した。

【分子機構の解明】ADAR の編集能依存的な R-loop 解消によるがん細胞の生存維持

RNA:DNA 鎖形成部位が形成される最も有力な解析対象として、R-loop と呼ばれる構造に注目している。通常、転写によって新規合成された RNA 鎖は鋳型 DNA から即座に解離するが、一部の配列では RNA 鎖が鋳型 DNA と対合し安定な RNA:DNA 鎖を形成したまま留まる。この構造は R-loop と呼ばれ、ゲノム構造の不安定化要因となる。本計画では、A-to-I 編集を経た G への DNA 編集機構の意義が、能動的な A から G への変異導入か G から A への変異した部位に対する修復機構であるかの検証を目指した。始めに培養細胞で ADAR 発現抑制時の表現型解析により、DNA 損傷と細胞周期への影響を解析した。並行して、そのとき検出される細胞内の R-loop の定量、局在解析を行い、A-to-I RNA/DNA 編集酵素である ADAR との関係性の検証を実施した。

【応用開発】任意対象ゲノム部位への人為的 A-to-I DNA 編集導入技術

細胞外から核内移行促進修飾を施したガイド核酸を導入し、目的ゲノム配列部位で RNA:DNA 鎖を形成させ、内在の ADAR により A-to-I DNA 脱アミノ化編集を誘導して A>G への DNA 変異を導入する手法を確立する。これにより、ゲノム DNA 上の G>A/C>T の変異を修復することが出来る。同様に、A>G/T>C 方向の変異を導入することが可能となり、変異による開始コドンの消失と出現、終止コドンの破壊、スプライシングシグナルの改変、アミノ酸変異を任意の遺伝子に人為的に導入することが可能となる。複数の配列のガイド核酸を用いることで、同時に複数の点変異を導入が可能となる点、RNA のみの導入で発動できるという点で、既存の CRISPR-Cas9 法よりもさらに簡便な新規ゲノム編集法となることが想定され、この開発と検証を実施する。

4. 研究成果

【技術開発・発見】イノシン化核酸修飾に特異的な標識による検出および精製技術

ICE 法で達成した精度と次世代シーケンス解析への適応を損なわず、新たにイノシン特異的な蛍光標識による迅速かつ簡便な検出法と、タグ官能基標識による濃縮精製を可能にする手法の確立に成功し、特許申請を進めている(本件は特許申請のため、詳細情報を報告の時点で開示不可な知見を含む)。また実際に、ゲノム DNA 上のイノシン化部位の網羅的同定に取り組んでいる。適応対象としては細胞内在性の RNA を始め、細胞および組織から得た全ゲノム DNA を対象としている。さらに本技術は、これまで信頼性の高い存在証明が不可能であった RNA をゲノムとするウイルス種(コロナウイルス・インフルエンザウイルス・HIV を含むレトロウイルス)におけるイノシン化部位の検出を可能とするものであり、A-to-I RNA 編集と自然免疫の関係性の研究推進に効果的であり、現在は適用研究を進めている。

【分子機構の解明】ADAR の編集能依存的な R-loop 解消によるがん細胞の生存維持

ADAR 発現抑制時の細胞表現型として、H2AX および RPA32 や DNA-PKCs のリン酸化状態の上昇が観察され、DNA 損傷の増大と修復系の活性化を検出した。また、Cyclin B1, Histone3, CDC2, PLK1 のリン酸化状態の解析により、細胞周期のうち細胞分裂期における顕著な停止を明らかにした。同時に細胞表現型としてアポトーシスを示すことを細胞観察と PARP1 分解産物の増加により確認した。HeLa 細胞核内では、R-loop の局在が ADAR のものと一致し、ADAR 発現抑制時には R-loop 量が 3 倍以上増加することを見出した。この R-loop 量の増加は細胞外からの ADAR 発現導入によりキャンセルされ、かつ脱アミノ化活性不活化体ではそれがみられなかったことから、R-loop の増加解消には A-to-I 編集活性が必要であることを示した。

続いて、複数のヒト培養がん細胞種について、R-loop 特異的抗体を用いて DNA:RNA ハイブリッドの免疫沈降(DRIP)産物を解析した結果、顕著な R-loop 蓄積を示す領域の一つとして、テロメア領域が検出された。テロメア配列は一般に GGGTTA の繰り返し配列として知られているが、実際には相当数のバリエーション配列が存在する。また、テロメア領域からの転写産物として TERRA, ARRET と呼ばれるノンコーディング RNA が転写されている。これらが互いに DNA と RNA の相補鎖形成により、R-loop を形成した場合、ミスマッチを含んだ DNA:RNA ハイブリッドが形成される。ADAR 組み換え精製タンパク質とテロメア領域で形成される配列を模倣した DNA:RNA ハイブリッド鎖を基質として用いた試験管内 A-to-I 編集反応実験により、特にハイブリッド鎖においては A-C ミスマッチ塩基対における編集効率が極めて高いことが判明した。その編集の結果、A-C ミスマッチが I-C 塩基対に変換されることで、テロメア領域では DNA:RNA 鎖のミスマッチが解消される。一方、DNA:RNA ハイブリッドの RNA 鎖を分解する RNASEH2 複合体は A-C ミスマッチを有すると切断効率が著しく低下するが、I:C 塩基対に変換された基質は効率良い切断活性を示した。以上の結果から、ADAR はテロメア領域に形成された R-loop 領域の DNA:RNA ハイブリッドミスマッチを解消し、RNASEH2 複合体の切断を亢進することで、R-loop の形成を抑制し、ゲノムの安定

性に寄与していると考えられた。これらの知見から、テロメア伸長酵素陽性のヒト培養がん細胞では、ADAR がイノシン化活性により DNA:RNA 鎖のミスマッチを解消し、RNASEH2 と協調してテロメア領域内の R-loop 蓄積を回避し、ゲノム安定性に寄与することが示され、これを論文にて報告した(Nat. Commun. 2021)。

本研究では引き続き、WI38 細胞と IMR90 細胞などの非がん培養細胞において ADAR 抑制の効果の解析を進めた。これまでに非がん培養細胞では、その細胞表現型は細胞分裂期停止と細胞死に顕れるよりも、細胞老化として主に観察されることを米国 Wistar Institute の Zhang Rugang 博士、Kazuko Nishikura 博士らとの共同研究により解明し、論文報告を進めている(Nat. Cell Biol.)。

また、がん細胞では ADAR 発現抑制時に、抗がん剤かつ R-loop 増加作用をもつカンプトテシンに対して数百倍の感受性を示して細胞死に至ることを発見した。この結果から、ADAR の発現または機能抑制、または同様の効果を持つ化合物の探索により、効果的な抗がん療法の開発の可能性が見出された。以上の知見は ADAR が新たな抗がん剤のターゲットとなりうることを示唆しており、現在 ADAR 抑制の効果の顕在パターンががん細胞と正常細胞、またはテロメア伸長酵素の有無により分類可能か検証を進めている。

他方、ADAR の発現抑制時におけるトランスクリプトーム解析により、R-loop 領域がもつ特徴配列を転写開始部位として認識しうる転写因子タンパク質の mRNA が急激に増加することを見出した。この因子が ADAR 発現抑制時に見られる細胞応答の誘導に大きく関与している可能性が高いと考えられる。そこで本因子と R-loop 構造および細胞応答を結ぶ転写調節機構と転写産物の解明を、発展継続研究として進めている。

本研究項目の追加実施として、SARS-CoV-2 の増殖サイクルにおいて細胞質局在型 ADAR による自然免疫応答の一つでもある外来由来非自己二本鎖 RNA への結合による感知認識と編集による配列編集の効果について、研究を実施した。これまでにウイルス感染後の RNA 変異のうち A から G への変化の割合が高く、これをイノシン化によるものであるとの仮説は報告されているが、未だ実際に細胞内で一時的に起こるイノシン化および ADAR の直接関与を証明したものは無い。本追加研究では上記の ICE 法を用いてイノシンの検出を感染細胞内ウイルス RNA について実施したが、既存報告に基づいた想定よりも頻度および部位数ともに低い検出結果が得られた。本結果については継続して解析の規模と感度を向上してイノシン部位の同定を進めている。一方、感染細胞の遺伝子発現解析から、SARS-CoV-2 においては他種の報告されている RNA ゲノム型ウイルスと比べて、外来 RNA の感知によるインターフェロン応答が時間的に遅れて引き起こされる結果が得られた。これに基づき、ADAR が関わる外来由来の二本鎖 RNA を感知し応答する機構に対して、本ウイルスが持つ回避機構の着想を得て、研究を進めていく。

【応用開発】任意対象ゲノム部位への人為的 A-to-I DNA 編集導入技術

試験管内反応による確認の結果、編集酵素 ADAR が想定通り編集対象の 1 本鎖 DNA とガイド核酸で形成するハイブリッド二本鎖に結合することを確認した。また、対象 DNA 鎖の A 部位に対するガイド核酸側の特殊設計により、厳密に A-to-I DNA 編集部位を規定可能であることを確認した。続いて、細胞内の編集効率をリアルタイムで測定を可能とするため、対象の DNA または RNA で A-to-I 編集が起きた場合に緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するレポーターシステムを構築し、これをゲノム DNA に組み込んだ細胞株を樹立した。次に RNA を基礎として、核酸分解酵素に対する耐性を付加するための化学修飾を持つ人工ガイド核酸を複数種用意し、その細胞内寿命と局在を解析した。その結果、単なる RNA では 24 時間以内に大半が分解され、また局在を細胞質に示すことが判明した。本目標である人為的 A-to-I DNA 編集においては、高い編集効率と特異性の確保が重要となる。すなわち、ガイド核酸の細胞内寿命の保持・核内への効率の良い移行・対象 DNA 領域との相補鎖形成の特異性・ADAR との結合親和性・ADAR の脱アミノ化活性における編集対象アデノシンの配座の最適化が課題となることを見出された。そこで、ガイド核酸において化学修飾を含む RNA と DNA の混合構造とし、さらに特殊 3 次構造をとるアプタマー領域を付加して最適化を進めている。本件は疾患変異の治療技術および A-to-I 編集の機能解析技術として将来的に特許の取得および創薬化を目指して開発を継続する予定である。

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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shiromoto Yusuke, Sakurai Masayuki, Minakuchi Moeko, Ariyoshi Kentaro, Nishikura Kazuko	4. 巻 12
2. 論文標題 ADAR1 RNA editing enzyme regulates R-loop formation and genome stability at telomeres in cancer cells	5. 発行年 2021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/s41467-021-21921-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 Yang Yuxi, Okada Shunpei, Sakurai Masayuki	4. 巻 6
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 1~15
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 Shiromoto Yusuke, Sakurai Masayuki, Qu Helen, Kossenkov Andrew V., Nishikura Kazuko	4. 巻 26
2. 論文標題 Processing of Alu small RNAs by DICER/ADAR1 complexes and their RNAi targets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 1801~1814
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.076745.120	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 Sakurai, M.*(Corresponding Author), Okada, S., Ueda, H., and Y. Yang.	4. 巻 2181
2. 論文標題 Discovering RNA editing by chemical methods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 in press
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 -

1. 著者名 1.Hao, X., Shiromoto, Y., Sakurai, M., Havas, A., Wang, L., Berger, S., Adams, P.D., Nishikura K., Kossenkov, A.V., Liu,P., Zhang, R.	4. 巻 -
2. 論文標題 ADAR1 downregulation contributes to p16INK4a upregulation independent of RNA editing during senescence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	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) なし	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

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shiromoto, Y., Sakurai, M., Mizugushi,M., Ariyoshi,K., and Nishikura, K.
2. 発表標題 ADAR1 RNA editing enzyme regulates R-loop formation and genome stability at telomeres in cancer cells
3. 学会等名 VIRTUAL KEYSTONESYMPOSIA RNA Editing and Modifications: From Biology to Therapy (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakurai, M
2. 発表標題 RNA reincarnation
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakurai, M.
2. 発表標題 Technology to identify 5th nucleic acids base INOSINE in transcriptome
3. 学会等名 BIO JAPAN 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Shirotmo, Masayuki Sakurai, Moeko Mizuguchi, Kentaro Ariyosi, Kazuk Nisikura.
2. 発表標題 RNA編集酵素ADAR1によるR-loop形成抑制とGenome Stability維持機構
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 櫻井雅之, 岡田俊平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社 MSD メディカルサイエンスダイジェスト	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	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニューサイエンス社 MSD メディカル・サイエンス・ダイジェスト	5. 総ページ数 2
3. 書名 もう一つの遺伝子 "編集" - 哺乳動物が備える核酸塩基の編集機構	

1. 著者名 櫻井雅之、岡田俊平	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京理科大学 科学フォーラム サイエンスへの招待	5. 総ページ数 6
3. 書名 分子生物学と遺伝子の研究	

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 ニューサイエンス社 月刊「細胞」	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 ニューサイエンス社 BIO Clinica	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
---------	---------