

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05725

研究課題名(和文) RNA編集による新規遺伝子制御原理の探索

研究課題名(英文) Investigation of new principles for gene regulation by RNA editing

研究代表者

福田 将虎 (Fukuda, Masatora)

福岡大学・理学部・准教授

研究者番号：90526691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、A-to-I RNA編集による新たな遺伝子制御原理を探索することを目的とし、(1) RNA編集によるタンパク質翻訳に影響を与えるRNA構造体の誘起、並びに(2) RNA編集による5'非翻訳領域におけるタンパク質翻訳領域の生成に関する研究を実施した。研究項目(1)においては、RNA編集によりイノシンを含むG-quadruplex構造を誘起できること、及び、その構造形成がタンパク質翻訳を阻害することを明らかにした。また、研究項目(2)では、RNA編集により5'非翻訳領域に生じたAUIトリプレットが新たな開始コドンとして機能し、その結果、下流の翻訳が抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A-to-I RNA編集によりmRNA上で生じるコドン変換やRNAの二本鎖構造の安定化は、その後に翻訳されるタンパク質機能や発現量に影響することが知られている。本研究で実証した、A-to-I RNA編集によるイノシンを含むG-quadruplex構造が形成、及び、開始コドンの生成は、いまだ明らかにされていない新たなA-to-I RNA編集の遺伝子制御原理であり、生体内A-to-I RNA編集機構の理解に重要な情報を与える。また、本研究成果は、近年開発されたRNA編集技術による遺伝子機能制御法を拡張するものであり、医薬品開発を始めとする医療分野においても応用できる。

研究成果の概要(英文)：To explore new gene regulation principles by A-to-I RNA editing, this study evaluated (1) inducing RNA structures that affect protein translation by RNA editing, and (2) generating protein translation region by RNA editing in the 5'untranslated region. In research item (1), it was clarified that RNA editing can induce an inosine-containing G-quadruplex structure, and this structure formation inhibits protein translation. In research item (2), we clarified that the AUI triplet generated in the 5'untranslated region by RNA editing functions as a new start codon and the downstream translation is suppressed.

研究分野：生物分子化学

キーワード：RNA編集 G-quadruplex 遺伝子制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、RNA レベルで遺伝情報を改変する技術、すなわち RNA 編集技術の開発が進んできている。RNA 編集技術は、ゲノム編集とは異なりゲノム DNA を傷つけずに遺伝情報を制御できるという特徴から、特に医療・創薬分野への応用が大きく期待されている。

A-to-I RNA 編集機構は、編集酵素 ADAR により RNA 上のアデノシン (A) がリイノシン (I) に変換される RNA 修飾の一種であり、ヒト生体内ではかなり高い頻度で行われている (同定されている編集部位はおよそ 30 万部位)。mRNA の翻訳領域に生じたイノシンは、タンパク質翻訳の際にグアノシンとして認識されるという特徴がある。従って、A-to-I RNA 編集技術、すなわち任意の部位に RNA 編集を誘導する技術は、ゲノム DNA に記載された情報を RNA レベルで改変し、標的タンパク質機能を制御することができる。申請者はこれまでに、編集ガイド RNA (AD-gRNA) と名付けた独自の機能性 RNA を構築し、それを用いた RNA 編集技術の基盤的方法論を開発した (Sci. Rep. 2017)。一方で、生体内 A-to-I RNA 編集は上述のコドン変換だけではなく、スプライシングの制御や miRNA の成熟過程及び標的選択制御の制御など、多くの生理機能が報告されている。しかしながら、全ての編集部位の生理機能及びその原理が明らかにされている訳ではなく、A-to-I RNA 編集には未だ知られていない新たな遺伝子機能制御原理が存在している可能性が高い。従って、RNA 編集技術のポテンシャルを最大限に引き出すためには、A-to-I RNA 編集の遺伝子制御原理の全貌を知る必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目標は、RNA 編集による新たな遺伝子制御原理を探索することである。そこで本研究は、これまでに開発した RNA 編集技術を活用し、RNA 編集によるタンパク質翻訳に影響を与える RNA 構造体の誘起、及び、RNA 編集による 5' 非翻訳領域におけるタンパク質翻訳領域の生成について、モデル配列を用いた *in vitro* 実験により上記遺伝子制御原理を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

【研究項目】

連続したグアノシンが豊富に存在する RNA 配列領域では、グアニン 4 重鎖構造 (G-quadruplex: Gq) が形成されることが知られている。また近年では、mRNA 上で形成される Gq がタンパク質発現を抑制することが明らかになってきた。本研究は、イノシンとグアノシンの化学的構造の類似性に着目し、A-to-I RNA 編集によりイノシンを含む Gq (ICGq) 構造を誘起できると予想した。mRNA 上の ICGq が Gq と同様にタンパク質翻訳や逆転写反応を阻害するのであれば、A-to-I RNA 編集による新たな遺伝子制御原理が証明できる。そこで本研究では、A-to-I RNA 編集により、イノシンを含む Gq (ICGq) 構造を誘起する配列を設計し、A-to-I RNA 編集依存的に ICGq 構造が形成されるかどうかを検証した (図 1)。具体的には、ICGq 形成コア配列 (未編集) とルシフェラーゼ (Luc) mRNA を連結した、ICGq レポーター RNA を合成し、RNA 編集技術を用いて目的部位をイノシンに編集した後、ICGq 形成を RT ストップアッセイにより評価した。また同様のレポーター RNA を用いて、ICGq による翻訳阻害を *in vitro* 翻訳反応とルシフェラーゼアッセイにより評価した。

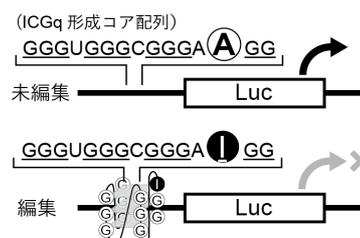


図 1. ICGq レポーターの設計

【研究項目】

ポリシストロニックな遺伝子は、上流遺伝子の発現が下流遺伝子の発現を制御している。そこで本研究では、mRNA 上の 5' 非翻訳領域に存在する AUA 配列を RNA 編集により AUI 配列に変換して開始コドンとして機能させ、新たな翻訳領域を生成することができるかどうかを検証した。まず、NanoLuc (NIuc) mRNA の開始コドン AUG を AUA に変異させたレポーター RNA を合成した (図 2)。次に、RNA 編集技術を用いて AUA 配列を AUI に編集し、*in vitro* 翻訳反応とルシフェラーゼレポーターアッセイにより、編集依存的な NIuc 発現量の変化を解析した。

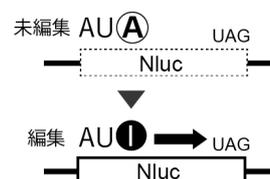


図 2. AUI レポーターの設計

4. 研究成果

【研究項目】

IcGq 形成コア配列を有するレポーターRNA (IcGq rep.A) に対して、ガイド RNA を用いた部位特異的 RNA 編集反応を行なった結果、目的部位を高効率に編集することができた (編集効率 95%)。また、上記反応を利用し、IcGq 形成配列を有するレポーターRNA (IcGq rep.I) を合成した。IcGq rep.A 及び IcGq rep.I に加え、Gq 形成配列を有する IcGq rep.G の 3 種類の RNA に対して、RT ストップアッセイを行なった (図 3A)。IcGq rep.A では、プライマーが 5' 末端まで伸長したことを示す 303 nt の停止ピーク (図 3A 白矢印) が観測された。一方、IcGq rep.G においては、完全長のピークは減少し、Gq 構造により逆転写伸長反応が阻害されたことを示す 266 nt のピーク (図 3A 黒矢印) が見られた。IcGq 形成配列を有する IcGq rep.I では、上記の完全長ピークも観測されたが、IcGq rep.G で見られた 266 nt における逆転写停止ピークがはっきりと観測された (図 3A、下段)。これらの結果は、A-to-I RNA 編集により IcGq 構造が誘起し、逆転写反応を阻害したことを示している。

続いて、IcGq rep.A 上で RNA 編集反応依存的に誘起した IcGq 構造が、Gq 構造と同様にタンパク質翻訳を阻害できるかどうかを評価した。IcGq rep.A および IcGq rep.G の編集反応前後で得られた RNA に対して *in vitro* 翻訳反応を行ない、ルシフェラーゼの翻訳量を発光強度測定により解析した (図 3B)。本実験では、レポーターとするルシフェラーゼ (Rluc) の下流に、IRES とレポーターとは異なるルシフェラーゼ (Fluc) を導入した。この設計により、Rluc/Fluc の相対発光強度値を比較することで、タンパク質発現量の差をより定量的に評価できる。編集反応前の RNA (図 3B, ADAR(-)) について、IcGq rep.A と IcGq rep.G の発光強度比を比較すると、IcGq rep.G の方が明らかに低い値を示した。この差は、IcGq rep.G は Gq 構造により翻訳反応が阻害されたためであると考えられる。編集反応前後の比較については、IcGq rep.G では大きな差は観察されなかったが、IcGq rep.A では RNA 編集反応依存的な明らかな発光強度比の低下が見られた。これらの結果は、A-to-I RNA 編集により誘起した IcGq 構造が翻訳反応を阻害したことを示唆している。以上の研究から、RNA 編集によってタンパク質翻訳に影響を与える RNA 構造体の誘起できることを *in vitro* のモデル実験により証明した。

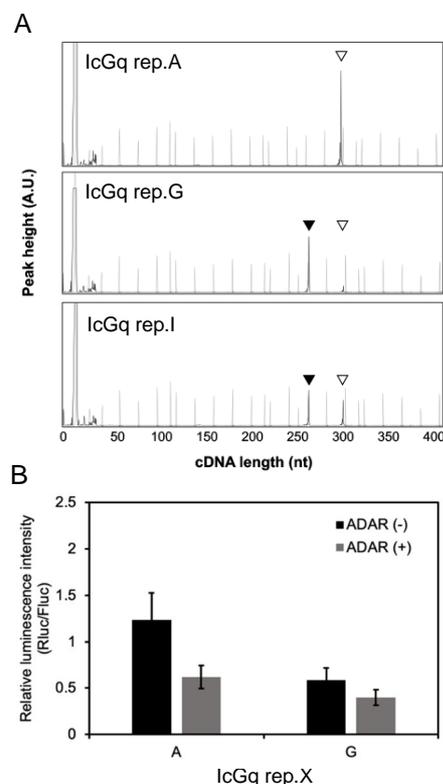


図 3. IcGq 構造形成による逆転写阻害と翻訳阻害

【研究項目】

設計した AUI レポーターRNA の AUA 配列を AUI 配列に編集するガイド RNA (gRNA) を設計・合成し、これを用いて AUI レポーターRNA に対して標的 RNA 編集反応を行なった結果、標的部位を高効率に編集することに成功した (編集効率: 92%)。また、gRNA 非存在下では、標的の RNA 編集は観測されなかった。次に、AUI レポーターRNA 上に、編集反応後に生じた AUI コドンが開始コドンとして機能するかを評価した。具体手には、*in vitro* 翻訳反応を行なった後、NIuc ルシフェラーゼ発現量を発光強度測定により解析した。本実験も上項の実験と同様に、NIuc ルシフェラーゼの下流に IRES-Fluc 配列を挿入したレポーターRNA を用い、発現量の比較は NIuc/Fluc の相対値で評価した (図 4)。gRNA 非存在下の編集反応では、AUG 配列と AUA 配列の発光強度比に大きな差がみられたが、gRNA 存在下で編集反応を行うことによって、その差は大きく縮まった。また AUG 配列は、gRNA 存在下の編集反応では発光強度比が低下した一方で、AUA 配列では発光強度比が顕著に増加した。これらの結果は、AUA 配列が gRNA 存在下の編集反応によって AUI 配列に変換され、生じた AUI コドンが開始コドンとして機能したことを示している。以上の結果より、非翻訳領域の AUA AUI 編集により新たな翻訳領域が生成できることを *in vitro* のモデル実験で実証した。

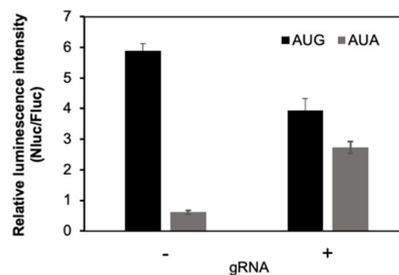


図 4. RNA 編集による開始コドンの生成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Pe Kathleen Beverly Alog, Yatsuzuka Kenji, Hakariya Hayase, Kida Tomoki, Katsuda Yousuke, Fukuda Masatora, Sato Shin-ichi	4. 巻 49
2. 論文標題 RNA-based cooperative protein labeling that permits direct monitoring of the intracellular concentration change of an endogenous protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e132 ~ e132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab839	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 福田 将虎	4. 巻 31
2. 論文標題 RNA編集核酸：A-to-I RNA編集を原理とする核酸医薬	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MEDCHEM NEWS	6. 最初と最後の頁 190 ~ 193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/medchem.31.4_190	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 Nose Kanako, Hidaka Kota, Yano Takashi, Tomita Yohei, Fukuda Masatora	4. 巻 31
2. 論文標題 Short-Chain Guide RNA for Site-Directed A-to-I RNA Editing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acid Therapeutics	6. 最初と最後の頁 58 ~ 67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/nat.2020.0866	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12件（うち招待講演 2件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 福田将虎、野瀬可那子
2. 発表標題 RNA編集技術の開発 - ゲノム編集とは異なるアプローチの遺伝子編集技術 -
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第6回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fukuda M., Hidaka K., Kurose R., Morii T.
2. 発表標題 Development of an RNA editing oligonucleotide to regulate the production and utilization of biological energy.
3. 学会等名 The 12th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田将虎
2. 発表標題 RNA編集技術と新たな核酸医薬
3. 学会等名 一般財団法人バイオインダストリー協会創薬モダリティ基盤研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田 洋平、勝田 陽介、山置 佑大、片平 正人、佐藤 慎一、福田 将虎
2. 発表標題 A-to-I RNA編集によるグアニン四重鎖形成を介した遺伝子制御
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masatora Fukuda, Kanako Nose, Yohei Tomita, Takashi Morii
2. 発表標題 Development of RNA editing technology for gene regulation involved in an intracellular energy production and utilization
3. 学会等名 The 11th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野瀬 可那子、日高 航大、富田 洋平、福田 将虎
2. 発表標題 短鎖RNAを用いた部位特異的A-to-I RNA変異導入技術の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田 洋平、佐藤 慎一、勝田 陽介、片平 正人、山置 佑大、福田 将虎
2. 発表標題 A-to-I RNA編集によるグアニン四重鎖構造を介した遺伝子制御モデル
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日高 航大、野瀬 可那子、富田 洋平、福田 将虎
2. 発表標題 A-to-I RNA編集を部位特異的に誘導する短鎖ガイドRNAの設計と機能評価
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanako Nose, Kota Hidaka, Yohei Tomita, Masatora Fukuda
2. 発表標題 Guide RNA for site-directed A-to-I RNA editing utilizing the activity of hADAR
3. 学会等名 CISNAC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanao Nose, Kota Hidaka, Yohei Tomita, Masatora Fukuda
2. 発表標題 Construction of the short chain guide RNA for site-directed A-to-I RNA editing
3. 学会等名 第46回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田 洋平、佐藤 慎一、勝田 陽介、片平 正人、山置 佑大、福田 将虎
2. 発表標題 グアニン四重鎖構造形成を介したA-to-I RNA編集による遺伝子制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日高 航大、野瀬 可那子、富田 洋平、福田 将虎
2. 発表標題 短鎖ガイドRNAを用いたA-to-I RNA編集技術の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------