

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750390

研究課題名(和文) 生体内RNA編集機構を利用した部位特異的変異導入法の開発

研究課題名(英文) Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilizing intracellular A-to-I RNA editing

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内には、転写後RNAの特定アデノシンがイノシンに変換される「A-to-I RNA編集機構」が存在する。これまで、生体内タンパク質の変異導入はDNAの改変により行われてきたが、生体内RNA編集を自在に操作できれば、RNAレベルで標的遺伝子に変異導入することが可能になる。本研究は、標的部位に特異的かつ効果的にA-to-I RNA編集を誘導する「編集ガイドRNA」を創出し、生体内RNA編集機構を利用したRNA変異導入における基盤的方法論を開発した。

研究成果の概要(英文)：Genetic engineering technologies for regulating intracellular target-gene function and/or expression have been widely used for basic research of vital biological phenomena. RNA mutagenesis has the potential to become a powerful gene-regulation methodology as an alternative to DNA mutagenesis. Adenosine-to-inosine (A-to-I) RNA editing that alters genetic information at the transcript level is an important biological process widely conserved in metazoans. Therefore, a versatile RNA mutagenesis method can be developed by taking advantage of intracellular the RNA editing mechanism. Here, we developed a novel guide RNA that is capable of inducing A-to-I mutations by guiding the editing enzyme, human adenosine deaminase acting on RNA.

研究分野：生体分子化学

キーワード：RNA編集 ガイドRNA RNA変異導入 in vitroセレクション 分子設計

1. 研究開始当初の背景

生物では通常、ゲノム中の遺伝情報が忠実に転写、翻訳されるが、しばしば転写後に情報が書き換えられる。この機構が RNA 編集である。中でも、アデノシン (A) がイノシン (I) に置換される「A-to-I RNA 編集」は、線虫から哺乳類まで広く保存されている (Nishikura K., et al., *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 321-349 (2010))。イノシンはタンパク質翻訳の際にグアノシンとして翻訳されるため、タンパク質翻訳領域に RNA 編集が生じた場合、合成されるタンパク質が DNA 情報とは異なる配列に置換される。また、近年のトランスクリプトーム解析の結果、A-to-I RNA 編集により、数多くの遺伝子が RNA レベルで情報変換されていることが明らかとなった (Peng Z., et al., *Nat Biotechnol.* **30**, 253-260 (2012))。

現在、変異タンパク質を用いた生体内タンパク質の機能解析は、一般的に DNA を改変することにより行われている。一方で、転写後 RNA への変異導入が可能になれば、標的タンパク質に対して一過的な変異の導入が可能となる。すなわち、細胞内における変異タンパク質の機能発現を時間的にコントロールできる。RNA 変異導入技術は、生体内でのタンパク質の機能や動態を明らかにする上で極めて強力なツールになるだろう。

生体内の A-to-I RNA 編集は、二本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミナーゼ (ADAR) が、RNA 上の特定アデノシンを脱アミノ化し、イノシンに変換することにより生じる。哺乳類では、編集活性を有する ADAR (ADAR1、ADAR2) は全身に発現しており、二本鎖 RNA 中の特定アデノシンを編集している (Pullirsch D. and Jantsch M.F., *RNA Biol* **7**, 205-212 (2010))。従って、これら ADAR の編集活性を任意の標的部位に誘導する方法は、RNA 変異導入法として展開できる。また、この RNA 編集機構を利用した RNA 変異導入法は、A-G 変異によるコドン変換によって、標的タンパク質の機能改変が可能である。

2. 研究の目的

本研究は、生体内 RNA 編集機構を利用した部位特異的 RNA 変異導入法を開発し、生体内タンパク質機能・発現制御に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、RNA 編集機構を利用した部位特異的 RNA 変異導入法を開発するにあたり、ガイド RNA に着目した。ガイド RNA は、機能性タンパク質を標的 RNA もしくは DNA に誘導する機能を持つ RNA であり、標的 RNA と相補的な配列を含む。そこで、RNA 変異導入法の基本技術として、天然型ヒト

ADAR (hADAR2) を標的部位に誘導し、A→I 変異を導入する「編集ガイド RNA」を構築することにした (図 1)。

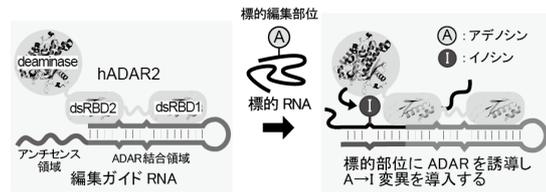


図1. 編集ガイド RNA

ライブラリー法による編集ガイド RNA の構築

本研究では、ADAR1、ADAR2 を用いた *in vitro* 編集反応及び、分子進化工学的手法を用いて、特別に設計した RNA ライブラリーから編集ガイド RNA の候補配列を選別した。まず、多様化した配列 (ランダム領域) と標的配列 5'-UCUAAA-3' (A: 標的編集部位) をステムループ構造で連結した「cis 型 RNA ライブラリー」を設計した。本設計では、A が特異的に編集された RNA が DNA に変換された時のみ、制限酵素 Xba I の認識配列 (5'-TCTAGA-3') を生じる。そのため、RNA 段階での選択に加え、DNA 段階での選択が可能になり、効率的に目的 RNA を選別できる。また、選択した RNA は、ループ部分を削除することで、標的認識領域を有する編集ガイド RNA に変換できる。

cis 型編集ガイド RNA のセレクションは以下の通りである。cis 型 RNA ライブラリーに対して、精製した ADAR1 及び ADAR2 (Macbeth, M. R. and Bass, B. L., *Methods Enzymol.* **424**, 319-331 (2007)) を用いて *in vitro* 編集反応を行った。次に、A-to-I RNA 編集識別型リボザイム (Fukuda, M., et al., *RNA* **20**, 392-405. (2014)) を用いて、標的部位が未編集の RNA を選択的に切断し、逆転写反応、PCR 後、制限酵素で切断反応を行い、電気泳動により切断フラグメントを回収した。回収した DNA を鋳型として DNA ライブラリーを再構築し、転写反応により再度 RNA ライブラリーを合成した。上記①～

の行程を繰り返し、標的編集部位が特異的に編集される cis 型 RNA 配列を選択した。ランダム領域の配列は、行程の切断フラグメントの DNA 塩基配列解析により決定した。

分子設計による編集ガイド RNA の構築

天然の RNA 編集基質 RNA を基に、編集ガイド RNA を分子設計により構築した。本研究では、hADAR2 の基質 RNA であるグルタミン酸受容 mRNA 前駆体 (GluR2 pre-mRNA) と、hADAR2 の二本鎖 RNA 結合ドメイン (dsRBD) との複合体構造 (Steffl, R. et al. *Cell* **143**, 225 (2010)) を基に、編集ガイド RNA を設計した。まず、特定位置で GluR2 RNA 構造を分断した。分断によって

生じる2つの RNA フラグメントは、標的 RNA と、ADAR 結合領域及び標的 RNA と相補的な配列を有するアンチセンス領域で構成される編集ガイド RNA のプロトタイプとして考えることができる。得られる編集ガイド RNA のアンチセンス領域と標的 RNA の相補鎖形成により、編集基質構造が形成されるため、標的編集部位に編集を誘導できる。従って、アンチセンス領域を標的 RNA に合わせて設計することで任意の部位に hADAR2 を誘導することが可能となる。上記設計コンセプトの妥当性を検証するため、編集ガイド RNA を構築し、組換え ADAR2 を用いた *in vitro* 編集アッセイにより、編集誘導能を評価した。

4. 研究成果

ランダム領域が 40 塩基からなる cis 型 RNA ライブラリーと ADAR1 を用いて、上記セレクションを行った結果、3 サイクル目の行程における Xba I 切断割合の上昇及び得られた cis 型 RNA クローンの標的部位が ADAR1 により編集されることを確認した。以上の結果は、本セレクション方法が効果的に機能することを示す。また同時に、cis 型編集ガイド RNA の構築に成功した。

一方で、分子設計により構築した編集ガイド RNA については、*in vitro* における編集誘導能を評価した。モデル標的 RNA を GFP mRNA とし、実験には A200 を標的とする編集ガイド RNA (ADg-rGFP_A200) を用いた (図 2A)。結果、標的編集部位は、編集ガイド RNA 非存在下 (no gRNA) ではまったく編集されなかったが、ADg-rGFP_A200 を添加することにより編集を示すシグナルが観測された。また、各反応時間で得られたクロマトグラムのピーク高の比 ($G/(A+G)$) より、編集割合を算出し、編集誘導効率を解析した (図 2B)。結果、ADg-rGFP_A200 の編集誘導効率は、アンチセンス領域のみ (3'-antisense) と比較して、明らかに向上することが明らかになった。以上の結果より、本設計により構築される編集ガイド RNA は、ADAR2 の編集活性を目的部位に誘導できることを明らかにした。ここまでの研究で用いた編集ガイド RNA は、ADAR 結合領域の 3' 側にアンチセンス領域が配置されるように設計した。次に、編集ガイド RNA 設計を多様化するために、5' 側にアンチセンス領域を配置したガイド RNA (ADg-rGFP_A200) を新たに設計し、編集誘導能を評価した。結果、従来設計で構築したガイド RNA と同様に、ADg-rGFP_A200 にも編集誘導活性が認められた (図 2B)。また興味深いことに、誘導効率は、アンチセンス領域は 3' 側よりも 5' 側に導入する方が高くなるという結果を得た。

以上の研究を通して、本研究では、複数の編集ガイド RNA 設計基盤を確立した。

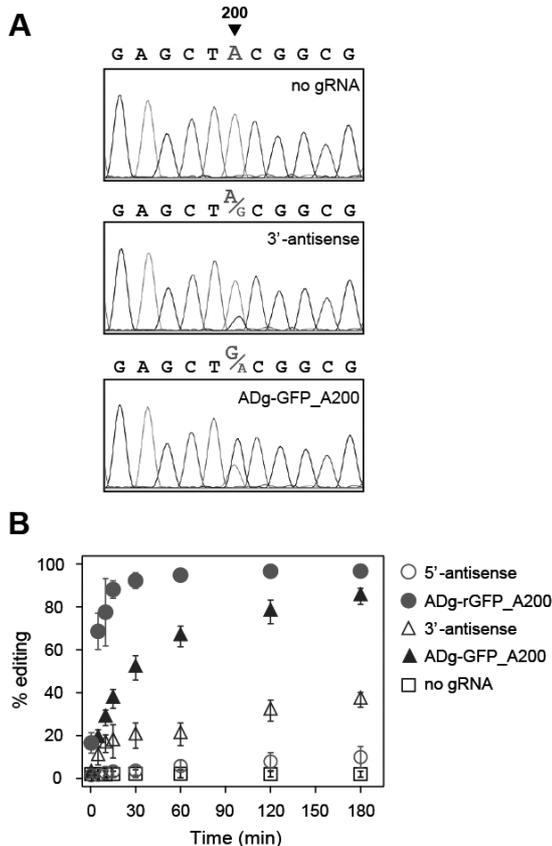


図 2. 編集ガイド RNA の RNA 編集誘導能評価

(A) 編集反応後の GFP mRNA のシーケンシングクロマトグラム (反応時間 120 min)。 (B) 各反応時間における標的編集部位 (A200: 黒矢印) の編集割合。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件) 全て査読あり

- (1) Fukuda, M., Oyama, Y., Nishitarumizu, A., Omura, M., Nose, K., Deshimaru, M. Identification of an RNA element for specific coordination of A-to-I RNA editing on HTR2C pre-mRNA *Genes to Cells*, **20**, 834-846 (2015)
- (2) Okuma, K., Koga, T., Ozaki, S., Suzuki, Y., Horigami, K., Nagahora, N., Shioji, K., Fukuda, M., Deshimaru, M. One-pot synthesis of dibenzo[b,h][1,6]naphthyridines from 2-acetylaminobenzaldehyde: application to a fluorescent DNA-binding compound. *Chem. Commun.* **50**, 15525-15528 (2014)
- (3) Fukuda, M., Kurihara, K., Yamaguchi, S., Oyama, Y., Deshimaru, M. Improved design of hammerhead ribozyme for selective digestion of target RNA through recognition of site-specific adenosine-to-inosine RNA editing. *RNA* **20**, 392-405 (2014)

[学会発表] (計 21 件)

Nose, K., Nishitarumizu, A., Umeno, H.,

Nakagawa, H., Deshimaru, M., Fukuda, M.
「Evaluating a molecular mechanism of the intracellular A-to-I RNA editing by analyzing a reaction behavior of ADARs in vitro and in the cell」
Pacifichem 2015
2015年12月18日(ホノルル、ハワイ)
Umeno, H., Nose, K., Nishitarumizu, A., Fukuda, M.
「Construction of artificial guide-RNAs for a site-directed RNA mutagenesis utilizing intracellular RNA editing by hADAR2」
Pacifichem 2015
2015年12月18日(ホノルル、ハワイ)
西垂水 梓、小山 唯、弟子丸 正伸、福田 将虎
「HTR2C pre-mRNA の編集における編集酵素 ADAR2 の dsRBD の役割」
第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会(BMB2015)
2015年12月2日(神戸ポートアイランド)
福田 将虎
「Novel strategies for regulation of RNA editing in cells」
平成27年度 化学系学境界東北大会
2015年9月12日(弘前大学文京キャンパス)(依頼講演)
梅野 紘充、西垂水 梓、野瀬 可那子、福田 将虎
「hADAR2 による RNA 編集を部位特異的に誘導する機能性 RNA の構築」
第9回バイオ関連化学シンポジウム
2015年9月10日(熊本大学工学部・黒髪南キャンパス)
野瀬 可那子、西垂水 梓、中川 裕之、弟子丸 正伸、福田 将虎
「細胞内 A-to-I RNA 編集における基質 RNA 発現量と編集効率の相関性」
第17回 RNA 学会年会
2015年7月16日(ホテルライフオー ト札幌)
梅野 紘充、西垂水 梓、弟子丸 正伸、福田 将虎
「ADAR2 による A-to-I RNA 編集を標的部 位特異的に誘導する機能性 RNA の構築」
第17回 RNA 学会年会
2015年7月15日(ホテルライフオー ト札幌)
西垂水 梓、小山 唯、弟子丸 正伸、福田 将虎
「セロトニン 2C 型受容体 pre-mRNA の RNA 編集における編集酵素 ADAR の標的部 位選択性と dsRBD の関係」
第17回 RNA 学会年会
2015年7月15日(ホテルライフオー ト

札幌)
尾村 美樹、弟子丸 正伸、佐藤 慎一、福田 将虎
「A-to-I RNA 編集阻害剤の構築を目指した化合物スクリーニング」
第37回 分子生物学会年会
2014年11月26日(パシフィコ横浜)
野瀬 可那子、中川 裕之、弟子丸 正伸、福田 将虎
「細胞内 A-to-I RNA 編集と転写の関係」
第37回 分子生物学会年会
2014年11月26日(パシフィコ横浜)
尾村 美樹、弟子丸 正伸、佐藤 慎一、福田 将虎
「細胞スクリーニングによる A-to-I RNA 編集阻害剤の構築」
第87回 日本生化学会大会
2014年10月17日(国立京都国際会館)
野瀬 可那子、中川 裕之、弟子丸 正伸、福田 将虎
「細胞内 A-to-I RNA 編集における基質 RNA 発現量と編集割合の関係」
第87回 日本生化学会大会
2014年10月17日(国立京都国際会館)
尾村 美樹、弟子丸 正伸、佐藤 慎一、福田 将虎
「細胞を基盤としたスクリーニングによる A-to-I RNA 編集阻害剤の構築」
第16回 RNA 学会年会
2014年7月23日(ウインクあいち)
野瀬 可那子、中川 裕之、弟子丸 正伸、福田 将虎
「基質 RNA 発現量に依存しない細胞内 A-to-I RNA 編集機構」
第16回 RNA 学会年会
2014年7月24日(ウインクあいち)
川本 崇仁、小山 唯、弟子丸 正伸、福田 将虎
「標的遺伝子発現を制御する核小体低分子 RNA の構築」
第36回 日本分子生物学会年会
2013年12月5日(神戸国際会議場)
小山 唯、弟子丸 正伸、福田 将虎
「A-to-I RNA 編集パターンを制御する HTR2C RNA の構造的要因の解明」
第36回 日本分子生物学会年会
2013年12月5日(神戸国際会議場)
小山 唯、弟子丸 正伸、福田 将虎
「RNA 編集が引き起す HTR2C mRNA の構造変化と編集パターンの関係」
第86回 日本生化学会大会
2013年9月12日(パシフィコ横浜)

(他4件)

[図書](計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：部位特異的RNA変異導入方法およびそれに使用する標的編集ガイドRNAならびに標的RNA - 標的編集ガイドRNA複合体

発明者：福田 将虎

権利者：学校法人 福岡大学

種類：特許

番号：特願 2015-140894

出願年月日：2015 年 7 月 14 日

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

なし

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし