

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650006

研究課題名(和文) i-RNA切断酵素によるイノシン化RNAの分子制御機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms and functions of i-RNase activity

研究代表者

倉岡 功 (Kuraoka, Isao)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：60335396

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)：アデニンの脱アミノ化は、DNAのみならずRNAおよびその前駆体でも生じる。その生じた産物は、細胞に障害を与えると考えられる。我々は、アデニンの脱アミノ化産物(イノシン)を含むRNAを特異的に切断する酵素を発見した。

この研究の目的は、この酵素がどのような生物学的意義を持つかを明らかにすることであった。様々なRNA/DNA基質を用いて解析した結果、この酵素はRNA修復に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Deamination of adenine occurs in DNA, RNA, and their precursors. The generated deaminated products are potentially mutagenic because of their structural similarity to natural bases. We found that human endonuclease V (i-RNase) recognizes and cleaves inosine-containing RNA.

In this study, to figure out the characters of the endonuclease activity, a series of RNA/DNA substrates was employed. Our data indicated that this enzyme is involved in RNA repair.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA 損傷

1. 研究開始当初の背景  
RNA 編集は、ゲノム情報のエピジェネティックな修飾および転写・翻訳機構のコントロールによる遺伝子発現において重要な機能を有している。その中でアデニンからイノシンの脱アミノ化反応 (A-to-I RNA 編集) は、遺伝情報の変換による多様性の獲得にも重要であると考えられる。なぜならば、遺伝情報においては、A-to-I RNA 編集により生じたイノシンは構造上グアニンとして扱い、mRNA のもつ遺伝情報を直接変換することができるからである。事実、非コード RNA の一つマイクロ RNA において 20% 近くのイノシン変換が行なわれており、脱アミノ化反応の異常が、様々な疾患に関与することが示唆されている。また、高度な機能を有し複雑な遺伝子発現が必要とされる脳において、多くのイノシンを含む RNA が発見されていることから、アデニンからイノシンの脱アミノ化の重要性を示唆している  
このイノシンを有する RNA の切断酵素活性は以前から発見されてきた<sup>1</sup>。また、RISC のサブユニットの一つ Tudor-SN がその酵素活性を増強することもわかっていた<sup>2</sup>。しかし、イノシンを有する RNA が切断される生物学的意義は不明であり、また、直接切断する酵素は不明であった。我々は、このイノシンを有する (i-RNA) を選択的に切断できるエンドヌクレアーゼ酵素 i-RNA 切断酵素を発見した<sup>3</sup>。
2. 研究の目的  
このイノシンを含む RNA を切断する酵素 (i-RNA 切断酵素) が、ヒト細胞のいつどこで機能するのか？また、どんなタンパク質と相互作用し、また RNA 上にイノシンが生じ、どのようにしてこの酵素で切断され、また切断されたイノシンを含む RNA がどのような経路をたどるのか？i-RNA 切断酵素によるイノシンを有する RNA の切断の生物学的意義を解明することを目的とした。
3. 研究の方法  
(1) i-RNA 切断酵素の生化学的解析  
我々は i-RNA 切断酵素の cDNA を得、組換えタンパク質およびその切断活性のない変異タンパク質を調整している。この酵素がどのような基質を認識しているかを様々な構造 RNA を用いて RNA 結合活性および RNA 切断活性を解析する。  
(2) i-RNA 切断酵素複合体の解析  
FLAG-6His を付加した i-RNA 切断酵素の安定発現細胞を樹立し、機能するタンパク質複合体として細胞抽出液より

精製を行なう。精製された複合体の構成因子を質量分析により同定し、i-RNA 切断酵素の制御機能の全体像を明らかにする。

(3) i-RNA 切断酵素の生物学的役割の解明

CRISPR-CAS システムを用いて欠損細胞を樹立し、細胞の生育にどのような影響が表れるか？もしくは RNA 編集にどのような影響が示されるか等を解析し、細胞内でのこの酵素の機能を探索する。またウイルスのミミックとして dsRNA を細胞に導入し、その挙動を解析する。

引用文献

- ① Scadden AD. *EMBO J* 2001
- ② Scadden AD. *Nat Struct Mol Bio* 2005
- ③ Morita Y. *Nat Commun* 2013

4. 研究成果

(1) 生化学的解析

様々な RNA 基質を作製し、i-RNA 切断酵素の切断活性を解析した。その結果、この酵素は少なくともイノシンを有する RNA のみしか特異的に切断活性が観察されなかった。また RNA の水酸基が活性に重要であることが明らかになった。面白いことに、その切断活性は切断周辺の塩基配列により異なることを見出した。ADAR 酵素による RNA 編集にも塩基特異性は存在するが、この配列依存性は異なっているためこの i-RNA 切断酵素は RNA 編集酵素により導入されたイノシンよりむしろ非特異的に生じたイノシンを切断することに重要であることが示唆された。

(2) i-RNA 切断酵素複合体の解析

FLAG タグおよび His タグを付加した i-RNA 切断酵素安定発現ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞を樹立し、樹立された細胞を大量培養、細胞質分画の抽出液から、それぞれのタグを利用してアフィニティー精製によって複合体として i-RNA 切断酵素を精製した。しかしながら、この複合体を SDS-PAGE ゲルで展開した結果、このタンパク質は複合体として存在しないことが明らかとなった。

(3) i-RNA 切断酵素の生物学的役割の解明

CRISPR-CAS システムを用いて欠損細胞を樹立し、細胞の生育にどのような影響が表れるか？もしくは RNA 編集にどのような影響が示されるか等を解析する予定ではあったが、現在までにこの HEK293 細胞においては、i-RNA 切断酵素欠損細胞は樹立できなかった。このことはこの酵素が細胞に必須であることを示唆している。

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 10 件)

- ① FEN1 participates in repair of the 5'-phosphotyrosyl terminus of DNA single-strand breaks. Kametani Y, Takahata C, Narita T, Tanaka K, Iwai S, Kuraoka I Carcinogenesis 37(1) 56-62 2016 年 DOI : 10.1093/carcin/bgv159
- ② Bisnaphthalimidopropyl diaminodicyclohexylmethane induces DNA damage and repair instability in triple negative breast cancer cells via p21 expression. Barron GA, Goua M, Kuraoka I, Bermano G, Iwai S, Kong Thoo Lin P Chemico-biological interactions 242 307-315 2015 年 DOI : 10.1016/j.cbi.2015.10.017
- ③ Diversity of Endonuclease V: From DNA Repair to RNA Editing. Kuraoka I Biomolecules 5(4) 2194-2206 2015 年 10.3390/biom5042194
- ④ Epigenetic modifications in DNA could mimic oxidative DNA damage: A double-edged sword. Ito S, Kuraoka I DNA repair 32 52-57 2015 年 DOI : 10.1016/j.dnarep.2015.04.013
- ⑤ Repair synthesis step involving ERCC1-XPF participates in DNA repair of the Top1-DNA damage complex. Takahata C, Masuda Y, Takedachi A, Tanaka K, Iwai S, Kuraoka I Carcinogenesis 36(8) 841-851 2015 年 DOI : 10.1093/carcin/bgv078
- ⑥ An in vitro method for detecting genetic toxicity based on inhibition of RNA synthesis by DNA lesions.

Sonohara Y, Iwai S, Kuraoka I Genes and Environment 37:8 2015 年 DOI : 10.1186/s41021-015-0014-8

- ⑦ The SLX4 complex is a SUMO E3 ligase that impacts on replication stress outcome and genome stability. Guervilly JH, Takedachi A, Naim V, Scaglione S, Chawhan C, Lovera Y, Despras E, Kuraoka I, Kannouche P, Rosselli F, Gaillard PH Molecular cell 57(1) 123-137 2015 年 DOI : 10.1016/j.molcel.2014.11.014
- ⑧ Frequencies of mutagenic translesion DNA synthesis over cisplatin-guanine intra-strand crosslinks in lacZ plasmids propagated in human cells. Fujikawa Y, Kawanishi M, Kuraoka I, Yagi T Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis 770 23-28 2014 年 DOI : 10.1016/j.mrgentox.2014.05.006
- ⑨ Fluorescence detection of cellular nucleotide excision repair of damaged DNA. Toga T, Kuraoka I, Watanabe S, Nakano E, Takeuchi S, Nishigori C, Sugawara K, Iwai S Scientific reports 4 5578 2014 年 DOI : 10.1038/srep05578
- ⑩ Guanine- 5-carboxylcytosine base pairs mimic mismatches during DNA replication. Shibutani T, Ito S, Toda M, Kanao R, Collins LB, Shibata M, Urabe M, Koseki H, Masuda Y, Swenberg JA, Masutani C, Hanaoka F, Iwai S, Kuraoka I Scientific reports 4 5220 2014 年 DOI : 10.1038/srep05220

[学会発表] (計 18 件)

- ① Kuraoka I Function of Human Endonuclease V: From DNA to RNA The Gordon Research Conference DNA damage, Mutation & Cancer 2016 年 3 月 14 日

- ベンニユラ(米国)
- ② 倉岡功 ヒトエンドヌクレアーゼ V は RNA 修復に関与する。日本分子生物学会第38大会 2015年12月4日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ③ 倉岡功 メチルシトシンの酸化体における DNA 障害 日本環境変異原学会第44大会 2015年11月28日 九州大学(福岡県福岡市)
- ④ KIM Jungin, 岩井成憲, 倉岡功 ヒトエンドヌクレアーゼ V の機能的解析 第44回日本環境変異原学会大会 九州大学(福岡県福岡市)
- ⑤ 園原由依菜, 岩井成憲, 倉岡功 RNA 合成阻害に基づいた in vitro における DNA 損傷検出法の構築 第44回日本環境変異原学会大会 九州大学(福岡県福岡市)
- ⑥ 黒田真未, 岩井成憲, 倉岡功, 岡田賢治 Human EEPD1 の細胞内局在の解析 第44回日本環境変異原学会大会 九州大学(福岡県福岡市)
- ⑦ Kuraoka I A NER synthesis step involving ERCC1-XPF participates in DNA repair of the TOPI-DNA complex Structure-Specific Endonucleases in Genome Stability Meeting 2015年11月5日 ブルノ(チェコ共和国)
- ⑧ 倉岡功 ヒト DNA エンドヌクレアーゼ V は、イノシンを含む RNA を切断するリボヌクレアーゼである。日本遺伝学会第87大会 東北大学(宮城県仙台市)
- ⑨ Kuraoka I A nucleotide excision repair synthesis step involving ERCC1-XPF endonuclease participates in repair of the topoisomerase I-DNA complex Zing Conferences - Genomic Integrity 2015年8月5日 ケアンズ(オーストラリア)
- ⑩ KIM Jungin, 岩井成憲, 倉岡功 ヒト Endonuclease V におけるイノシン化 RNA 切断活性の機能解析 日本 RNA 学会第15回年会 2015年7月15日 ホテルライフオーツ札幌(北海道札幌市)
- ⑪ Kuraoka I Epigenetic DNA modification 5-carboxylcytosine forms G·T mismatch mimicking-base pairs and induces an apoptosis via MMR 4th Asian Conference on Environmental Mutagens 2014年12月12日 コルカタ(インド)
- ⑫ 倉岡功、渋谷 敏博、岩井 成憲 メチルシトシン酸化誘導体が導く複製機構の障害 日本環境変異原学会第43回大会 2014年12月5日 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)
- ⑬ 岡田賢治, 岩井成憲, 倉岡功 Human EEPD1 はヌクレアーゼ活性を有する日本環境変異原学会第43回大会 2014年12月5日 一橋大学一橋講堂(東京都

- 千代田区)
- ⑭ 松田雪恵, 岩井成憲, 倉岡功 イノシンを含む RNA の新たな検出方法の確立 日本環境変異原学会第43回大会 2014年12月5日 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)
- ⑮ 倉岡功 5-メチルシトシンとその酸化誘導体における複製システムの統合的理解 第87回日本生化学会大会 2014年10月15日 京都国際会議場(京都市)
- ⑯ 倉岡功 5-メチルシトシンの酸化誘導体における複製システムの障害 日本放射線影響学会第57回大会 2014年10月3日 かがしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)
- ⑰ 倉岡功 ヒト Endonuclease V は iRNA 切断酵素である 日本 RNA 学会第14回年会 2014年6月23日 ウィンクあいち(愛知県名古屋)

[その他]

- ① 倉岡功 2015年ノーベル賞を読み解く 化学賞 DNA 修復機構の発見 遺伝情報を安定に維持するためのしくみ 化学70(12) 12-17 201
- ② 倉岡功 修復機能の多様化 生産と技術 67(4) 81-84 20

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉岡 功 (Kuraoka Isao)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授  
研究者番号：60335396

(3) 連携研究者

岩井 成憲 (Iwai, Shigenori)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授  
研究者番号：10168544