

## RNA塩基脱アミノ化編集酵素が司るRNA： DNA対合鎖の制御破綻による難病の分子病態機構解明



東京理科大学生命医科学研究所 講師 櫻井 雅之

### 【要 旨】

本研究対象であるアイカルディ症候群、脆弱性X症候群、前頭側頭型認知症、筋萎縮性側索硬化症では、共通して核酸の構造変化を制御する遺伝子群の変異が原因の1つに挙げられています。これは疾患の発症となる細胞傷害が、核酸構造の制御破綻に起因することを示しています。遺伝子の本体である核酸、すなわちDNAやRNAには一般に知られる4種の塩基だけでなく、そこに化学修飾を施して特殊な機能を持たせる機構が存在し、その機能の一つに構造の制御があります。よって修飾と構造変化を理解し応用することで、現時点では困難である原因遺伝子群への対処以外の方法で、異常核酸構造を解消して疾患に対策することが可能となります。本研究では、基礎であり先端でもある、核酸の分子生物学という観点から難病発症機構の解明とその対策法の開発に取り組み、難病克服への礎となる研究成果を得ました。

### 【背 景】

対象疾患においてその発症要因として、一部のゲノム領域でRNA鎖が鋳型DNAと対合して二本鎖DNAよりも安定なRNA：DNAハイブリッド鎖を形成したまま留まり、DNAセンス鎖は一本鎖のままとなる(図A)、R-loop構造の形成が知られています。これは、ゲノム構造の不安定化や転写産物成熟化阻害を引き起こし、正常な遺伝子発現の破綻と細胞傷害を引き起こします<sup>1</sup>。しかし疾患病態及び正常細胞内のR-loop形成部位やそのタイミングと解消機構についての病態と結びつける知見は不十分であるのが現状でした。一方、我々は近年、二本鎖RNA特異的な塩基編集酵素と考えられていたアデノシン脱アミノ化酵素ADAR(図B)が、RNA：DNAハイブリッド鎖のRNAのみならず、DNAも編集可能であることを発見し、アデノシンをイノシン化((A-to-I RNA&DNA編集)することを発見しました<sup>2</sup>(図B, C)。先述のAGS疾患の原因遺伝子としてもADAR遺伝子が報告されており<sup>1</sup>、本研究ではADARによるA-to-I DNA編集機構とR-loopをキーワードに、難病の分子病態解明に取り組みました。

### 【研究成果】

まずADAR発現抑制時の細胞動態の解析を行い、ADARの発現抑制がDNA損傷・細胞周期停止・細胞死を誘導することを細胞内各機構の指標タンパク質の変動解析より見出し、ADARがDNA損傷抑制/修復促進に関与することを明らかにしました(図D左)。さらに培養細胞内ではADAR発現抑制時にRNA：DNAハイブリッド鎖量が3倍以上増加し、ADAR遺伝子再導入によりこの増加が正常に復帰する結果を得ました(図D右)。以上の知見はADARによるA-to-I編集機構が細胞内R-loopの制御に関わり、DNA損傷及び修復機構と細胞周期制御に深く関与していることを示しており、この破綻が疾患の発症原因の1つである知見を得ました。また、ADAR発現抑制時における遺伝子の網羅的発現変動解析を、複数の細胞種において進めています。特に、細胞傷害応答性を持つEGR1遺伝子の発現が、ADAR発現抑制時に極めて迅速に高発現を示すことを見出しました。近年EGR1遺伝子は痛み及び炎症、また概日リズムを制御する上流遺伝子としての報告が相次いでおり、ADARによるA-to-I DNA編集とR-loop状態の変化にตอบสนองして、これらの表現型を制御し、病態の発現に関与していることが考えられます。

続いて、本細胞内性A-to-I DNA編集機構を利用し、人工ガイドRNAの細胞外からの導入による任意ゲノムDNA部位における脱アミノ化ゲノム編集法の開発を進めました。厳密にA-to-I DNA編集部位を規定可能な設計規則を試験管内反応による解析の結果見出しました(図E)。さらに本現象が培養細胞内でも惹起可能であることを検証するため、緑色蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子を利用して、脱アミノ化により塩基置換が生じた陽性細胞が緑色蛍光を発して顕微鏡で迅速かつ簡便に検出可能となるシステムを構築しました。

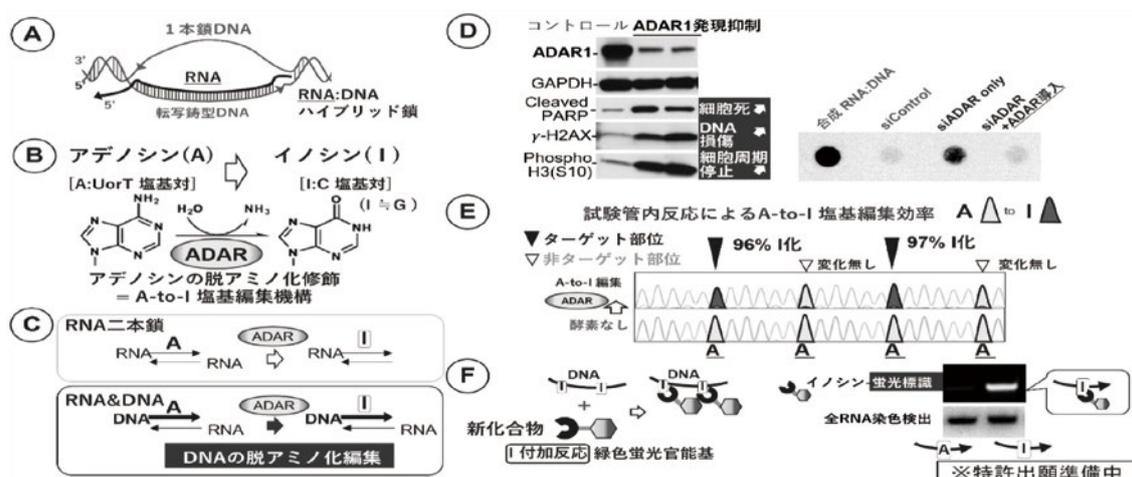
本研究にあたり、我々は核酸鎖に存在するイノシン部位を化学修飾することで次世代シーケンスを用いて高精度かつ網羅的に同定する手法を開発していました (ICE-seq)<sup>3-6</sup>。しかしながら、DNA中のイノシンは非常に微量かつ一時的であり、なおも検出同定が難しいことが判明しました。この難点を打開するために我々は更に新たにイノシン特異的な化学修飾反応を利用したイノシン標識技術の開発に取り組みました。現在までに、候補化合物の選別を行い、少なくとも一種で、極めて短時間でRNA及びDNA鎖中のイノシン特異的な付加反応を起こすことを見出し、すでにイノシン特異的な核酸鎖の蛍光標識に成功しました (図F：本結果は特許申請予定です)。これら一連のDNA鎖内イノシンの検出同定法<sup>3-6</sup>及び標識法 (図F) の確立により、イノシンをADAR結合の足跡として捉えて、その結合部位を特定し、詳細な分子機構解明への手がかりを得ることが可能となります。今後のさらなる反応条件の最適化の後、本技術を用いてイノシンを有する細胞内転写産物の蛍光標識による局在解析と核酸中のイノシン定量と精製が可能となり、より詳細なADARとA-to-I RNA/DNA編集機構によるR-loopの制御と、これに起因する難病の発症機構及び対策法開発へ貢献が期待できます。

### 【共同研究者・謝辞】

本研究は米国Wistar研究所Dr. Kazuko Nishikuraと城本悠助博士とは東京理科大学薬学部生命創薬科学科 和田猛研究室との共同研究を含みます。本助成をいただいた難病医学研究財団及び関係者の皆様に、深く感謝申し上げますとともに、今後も研究成果による社会還元を志す所存です。

### 【文献】

1. Santos-Pereira, J., Aguilera, A. (2015). R loops: new modulators of genome dynamics and function *Nature Reviews Genetics* 16 (10), 583-597. [DOI: 10.1038/nrg3961.; PMID: 26370899] (2015)
2. 櫻井雅之「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」MSDメディカル・サイエンス・ダイジェスト (ニューサイエンス社) 45: 576-577 (2019)
3. Sakurai, M., Yano, T., Kawabata, H., Ueda, H., and Suzuki, T. "Inosine cyanoethylation identifies A-to-I RNA editing sites in the human transcriptome." *Nat. Chem. Biol.* 6: 733-740 [DOI: 10.1038/nchembio.434, PMID: 20835228] (2010).
4. Sakurai, M., Ueda, H., Yano, T., Okada, S., Terajima, H., Mitsuyama T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Kawabata, H., and Suzuki, T. "A biochemical landscape of A-to-I RNA editing in the human transcriptome. *Genome Res.* 24: 522-534 [DOI: 10.1101/gr.162537.113, PMID: 24407955] (2014).
5. Li X., Xiog, X., and Yu C. "METHOD OF THE YEAR 2016 : Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications." *Nature Methods* 14: 23-31 [DOI:10.1038/nmeth.4110, PMID: 28032622] (2017).
6. 櫻井雅之, 長谷川拓巳, 中山宏紀「【RNA修飾の解析法】簡易検出法から網羅的解析まで」特集：RNAが修飾される！エピトランスクリプトームによる生命機能と疾患の制御 *実験医学* (羊土社) 36: 3212-3216 [ISBN 978-4-7581-2514-7] (2018).



図：(A) RNA:DNAハイブリッド鎖により形成されたR-loop構造。(B) ADARによるアデノシン脱アミノ化-イノシン化。(C) 新発見したRNA:DNA鎖を基質とするA-to-I脱アミノ化編集機構。(D) ADAR発現抑制による細胞表現型とRNA:DNA鎖の増加と外来ADAR導入による増加-解消復験。(E) ガイドRNA:DNA鎖を基質としたA-to-I DNA編集を起こす部位の規定制御例。(F) 新化合物を利用したイノシン特異的な蛍光標識法と電気泳動によるイノシン特異的な蛍光標識の検出結果。