

152. Z 型 RNA 同定への挑戦とその生理的・病的意義の解明

中濱 泰祐

大阪大学 大学院医学系研究科 神経遺伝子学教室

Key words : ADAR1, Z 型 RNA, AGS, RNA 編集, MDA5

緒 言

ADAR1 は 2 本鎖 RNA 中のアデノシンをイノシンへと置換する RNA 編集を触媒し、この化学修飾は全転写産物の 85%以上にも及ぶ [1]。ADAR1 ノックアウト (KO) マウスは、インターフェロンの異常産生を伴う胎生致死を示すことが知られていたが、その理由は長らく不明であった [2]。しかし最近になり、2 本鎖 RNA センサー分子 MDA5 との 2 重 KO マウスを作製すると胎生致死が回避され、インターフェロンの産生も正常化することが報告された [3]。MDA5 は本来ウイルス由来の 2 本鎖 RNA を認識するセンサーだと考えられてきたが、これらの知見は、内在する 2 本鎖 RNA が MDA5 によって異物として認識される危険性があり、RNA 編集は 2 本鎖構造を変えることで 2 本鎖 RNA が異物として認識されることを回避する機構であることを示唆している [4]。興味深いことに、ADAR1 や MDA5 における遺伝子変異は、インターフェロンの異常産生や脳症を特徴とするエカルディ・グティエール症候群 (AGS) を引き起こすことが報告されており [5, 6]、ヒトにおいても同様の機構が存在すると考えられている。しかし、ヒトで 100 万カ所以上にも及ぶ各 RNA 編集部位のイノシン化効率は、組織や発達時期によって多様であり、編集されなければ MDA5 によって非自己として認識される内在 2 本鎖 RNA は特定されていない。

そこで、AGS の原因となる ADAR1 遺伝子点変異が Z 型 RNA 結合ドメイン (ZBD) にも見いだされている点に注目し、Z 型構造を含む 2 本鎖 RNA の編集が、MDA5 経路活性化回避の鍵を握っているのではないかと仮説を立てた。本研究では、RNA 編集を指標に生体内 Z 型 RNA を同定することに挑戦する。また、ADAR1 遺伝子に Z 型 RNA 結合能欠損型点変異をノックインしたマウスを解析し、Z 型 RNA に生じる RNA 編集異常が AGS 病態の本質であることを明らかにする。

方 法

1. RNA 編集完全欠損株の樹立および RNA 編集部位の網羅的同定

ADAR1 あるいは ADAR2 を標的とする guide RNA と Cas9 を発現する all-in-one ベクターを Raw264.7 細胞に導入し、RNA 編集完全欠損 Raw264.7 細胞株を樹立した。この細胞株に、野生型あるいは Z 型 RNA 結合能欠損 (W197A) 変異型 ADAR1 コンストラクトを導入し、24 時間後に RNA を抽出した。編集部位のイノシンは逆転写中にグアノシンと認識されるため、RNA-Seq にてアデノシンからグアノシンへの変化が生じた部位や頻度を網羅的に解析した。

2. Z 型 RNA 結合能欠損変異型 ADAR1 ノックインマウスの樹立および表現型解析

Z 型 RNA 結合能欠損変異型 ADAR1 ノックイン (W197A KI) マウスは大阪大学医学部付属動物実験施設にて樹立した。最初に、W197A KI マウスが正常に生育するかどうかを検証し、インターフェロン誘導遺伝子群 (ISG) の発現レベルを qPCR にて定量し、野生型と比較した。加えて、MDA5 ノックアウト (KO) マウスを W197A KI マウスと交配させることで、MDA5 活性化の有無を検証した。AGS の主症状は脳症であることから、脳について HE 染色を行い、解剖学的な異常の有無を調べた。さらに、アストロサイトやミクログリアの活性化の有無を検証するため、これらのマーカーである Iba1 や GFAP 抗体を用いて、免疫染色を実施した。

結果および考察

1. ADAR1 の Z 型 RNA 結合ドメインを介した RNA 編集効率の決定

哺乳類において、アデノシンからイノシンへの RNA 編集は ADAR1 と ADAR2 によって触媒される [7]。このため、*ADAR1* と *ADAR2* を 2 重で欠損する (dKO) Raw264.7 細胞株を樹立し、野生型あるいは Z 型 RNA 結合能欠損 (W197A) 変異型 *ADAR1* コンストラクトを導入し、その編集効率を評価する系を立ち上げた。その結果、W197A 変異型では、野生型に比べ RNA 編集率が低下し、総編集箇所も有意に減少していることが明らかになった (図 1)。この結果は、ADAR1 によって生じる RNA 編集の多くが、Z 型 RNA 結合ドメイン (ZBD) を介していることを示唆している。

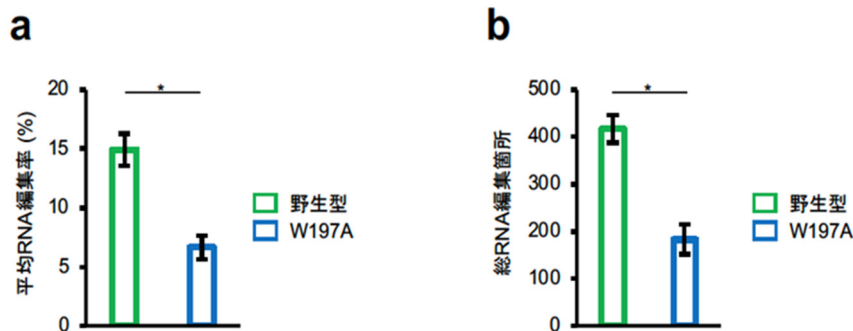


図 1. W197A 変異による RNA 編集効率の低下

a) 野生型あるいは W197A 変異型 *ADAR1* による平均 RNA 編集率。

b) 野生型あるいは W197A 変異型 *ADAR1* による総 RNA 編集箇所。

Mann-Whitney *U*-test, **P* < 0.05。

2. Z 型 RNA 結合能欠損変異型 *ADAR1* ノックインマウスの樹立

ZBD を介した RNA 編集の生理的意義を明らかにするため、*ADAR1* 遺伝子に W197A 変異をノックインした (W197A KI) マウスを樹立した。その結果、本マウスが著しい発育不良を伴う生後致死を示すことが明らかになった (図 2a, b)。ADAR1 による RNA 編集は、内在する RNA が *MDA5* によって異物として認識されることを回避するための RNA 修飾である。このため、W197A KI マウスを *MDA5* KO マウスと交配させたところ、これらの異常は完全に正常化し (図 2a, b)、*MDA5* の異常活性化が生じている可能性が示唆された。

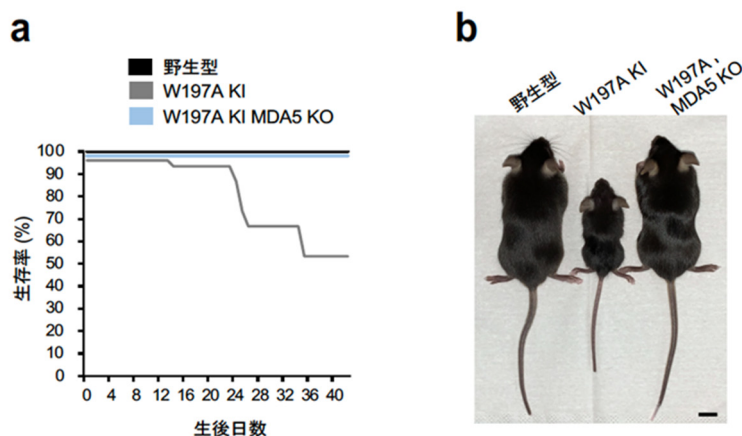


図 2. W197A KI マウスが示す生後致死

a) 野生型、W197A KI、W197A KI *MDA5* KO マウスの生存曲線。

b) 野生型、W197A KI、W197A KI *MDA5* KO マウスの写真。

3. W197A KI マウスにおける MDA5 活性化の有無の検証

さらに、実際に W197A KI マウスにおいて MDA5 が活性化しているかどうかを明らかにするため、MDA5 の下流で誘導されるインターフェロン誘導遺伝子群 (ISG) の発現レベルを定量した。その結果、様々な臓器において MDA5 に依存する ISG の発現上昇が認められ、特に脳において顕著であった (図 3)。AGS の主座は脳であることから、W197A KI マウスが AGS 症状を再現する可能性が示唆された。

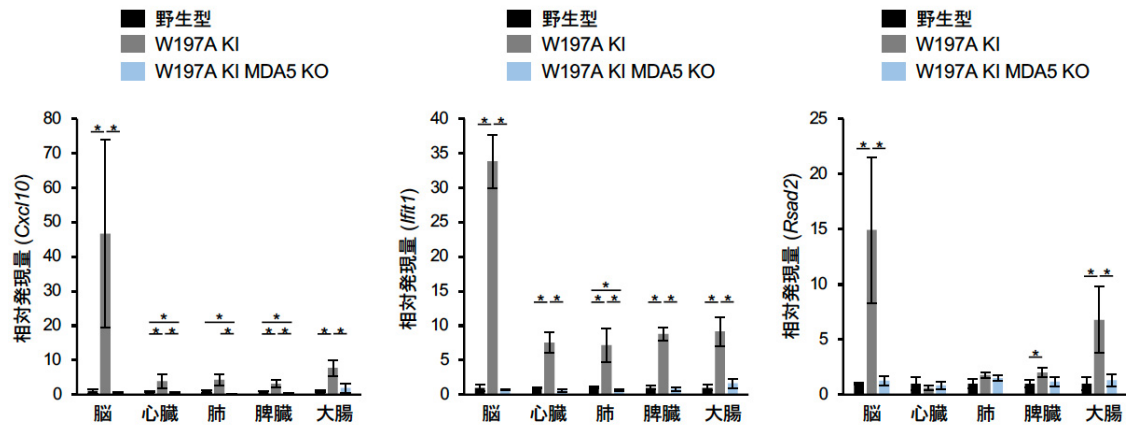


図 3. W197A KI マウスにおける ISG の発現上昇

野生型、W197A KI、W197A KI *MDA5* KO マウス各種臓器における
Cxcl10、Ifit1、Rsad2 mRNA の相対発現量。
Mann-Whitney *U*-test, **P*<0.05。

4. W197A KI マウス脳における解剖学的異常の有無の検証

W197A KI マウスにおいて、脳で特に顕著に ISG の発現上昇が認められたため、HE 染色にて解剖学的な異常の有無について検証を行った。その結果、大脳皮質、白質の菲薄化に加え、側脳室、第四脳室の拡大が認められた (図 4)。

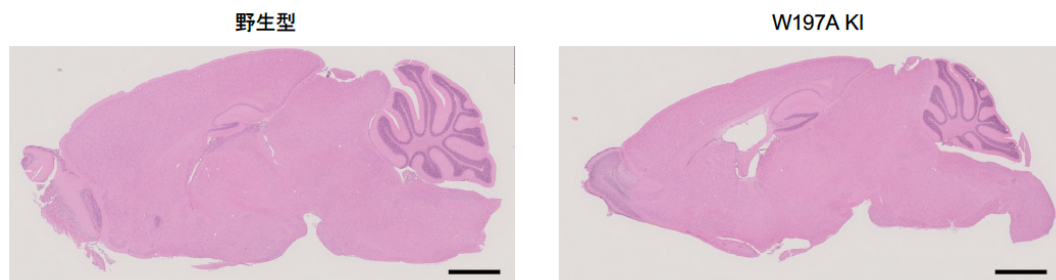


図 4. W197A KI マウスが示す脳の解剖学的異常所見

野生型、W197A KI マウス脳の HE 染色像 (スケールバー : 1.25 mm)。

5. W197A KI マウス脳におけるグリオシスの有無の検証

さらに、アストロサイト、ミクログリアのマーカーである GFAP、Iba1 の免疫染色を実施したところ、これらの細胞数が有意に上昇していることが判明した (図 5)。特にアストロサイトの増加は顕著であった。AGS 患者ではアストロサイトーシスが認められること、インターフェロンなどの炎症性サイトカインの産生細胞がアストロサイトであることが報告されており [8]、本結果は、W197A KI マウスが AGS 様脳症を示す有用なモデルとなり得ることを示唆している。

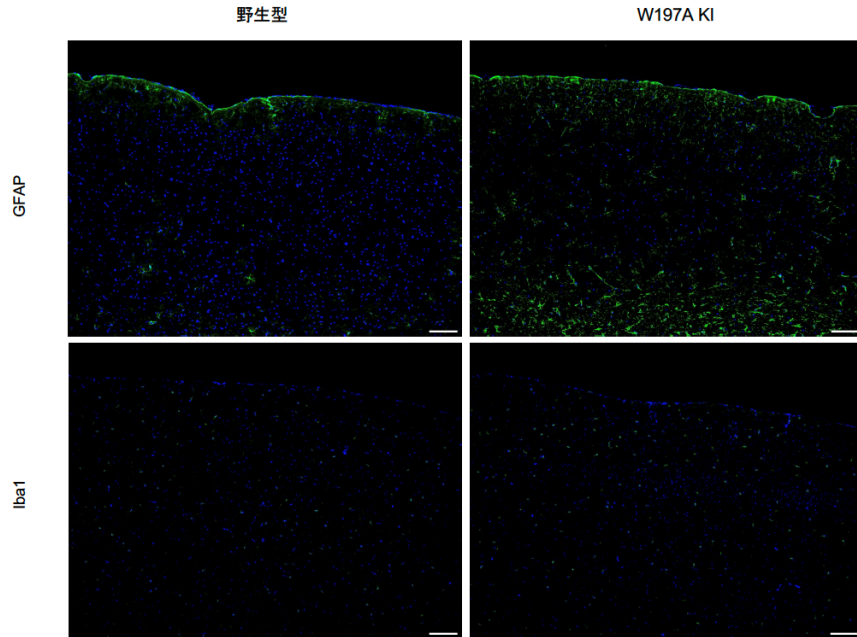


図 5. W197A KI マウスが示すグリオシス
野生型、W197A KIマウス大脳皮質の免疫染色像。
上段：GFAP、下段：Iba1（スケールバー：100 μ m）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院医学系研究科神経遺伝子学研究室の加藤有己、井上真生、河原行郎である。

文 献

- 1) Athanasiadis A, Rich A, Maas S. Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. PLoS Biol. 2004 Dec;2(12):e391. doi: 10.1371/journal.pbio.0020391. Epub 2004 Nov 9. PMID: 15534692.
- 2) Wang Q, Khillan J, Gadue P, Nishikura K. Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. Science. 2000 Dec 1;290(5497):1765-8. doi: 10.1126/science.290.5497.1765. PMID: 11099415.
- 3) Pestal K, Funk CC, Snyder JM, Price ND, Treuting PM, Stetson DB. Isoforms of RNA-Editing Enzyme ADAR1 Independently Control Nucleic Acid Sensor MDA5-Driven Autoimmunity and Multi-organ Development. Immunity. 2015 Nov 17;43(5):933-44. doi: 10.1016/j.immuni.2015.11.001. PMID: 26588779.
- 4) Liddicoat BJ, Piskol R, Chalk AM, Ramaswami G, Higuchi M, Hartner JC, Li JB, Seeburg PH, Walkley CR. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. Science. 2015 Sep 4;349(6252):1115-20. doi: 10.1126/science.aac7049. Epub 2015 Jul 23. PMID: 26275108.

- 5) Rice GI, Kashner PR, Forte GM, Mannion NM, Greenwood SM, Szyrkiewicz M, Dickerson JE, Bhaskar SS, Zampini M, Briggs TA, Jenkinson EM, Bacino CA, Battini R, Bertini E, Brogan PA, Brueton LA, Carpanelli M, De Laet C, de Lonlay P, del Toro M, Desguerre I, Fazzi E, Garcia-Cazorla A, Heiberg A, Kawaguchi M, Kumar R, Lin JP, Lourenco CM, Male AM, Marques W Jr, Mignot C, Olivieri I, Orcesi S, Prabhakar P, Rasmussen M, Robinson RA, Rozenberg F, Schmidt JL, Steindl K, Tan TY, van der Merwe WG, Vanderver A, Vassallo G, Wakeling EL, Wassmer E, Whittaker E, Livingston JH, Lebon P, Suzuki T, McLaughlin PJ, Keegan LP, O'Connell MA, Lovell SC, Crow YJ. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet.* 2012 Nov;44(11):1243-8. doi: 10.1038/ng.2414. Epub 2012 Sep 23. PMID: 23001123.
- 6) Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai T, Ohara O, Fujita T, Heike T. Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. *Am J Hum Genet.* 2014 Jul 3;95(1):121-5. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.06.007. PMID: 24995871.
- 7) Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:321-49. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-105251. PMID: 20192758.
- 8) van Heteren JT, Rozenberg F, Aronica E, Troost D, Lebon P, Kuijpers TW. Astrocytes produce interferon-alpha and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8, in Aicardi-Goutières syndrome. *Glia.* 2008 Apr;56(5):568-78. doi: 10.1002/glia.20639. PMID: 18240301.