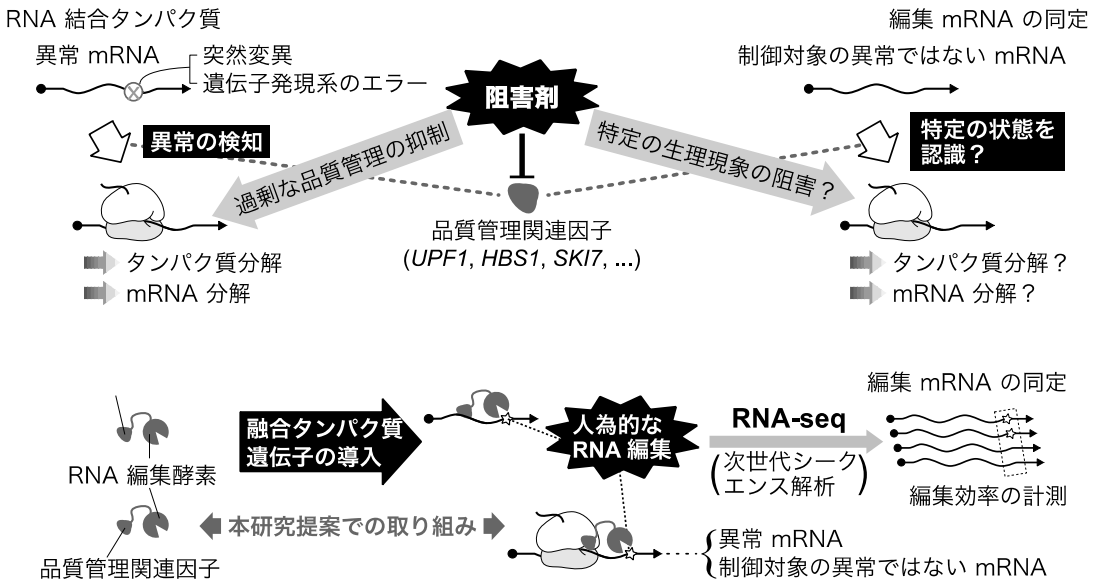
134　品質管理機構が異常ではないmRNAに及ぼす作用の探索	遠藤　慧

【目的】ヒトの遺伝的疾患の約 3 割は終止コドンに関連した変異に起因する。このような遺伝的疾患は症例が少なく治療法の研究も進展しにくいなか、終止コドンの認識機構や品質管理機構を創薬のターゲットにすることによって、多数の遺伝的疾患を包括的に治療しようとする研究が模索されている。一方で、mRNA 品質管理機構に関連した因子は異常な mRNA の検出、分解とは異なった細胞の生理機能に対しても一定の役割を果たしていると考えられている。しかし、品質管理機構の異常ではない mRNA への作用は未だ十分に解明されておらず、遺伝的疾患を治療するための品質管理機構の阻害がどのような副作用をどの程度引き起こし得るのか評価することも難しい。本研究課題では、異常ではない mRNA に対す mRNA 品質管理機構の役割を明らかにすることを目指して、mRNA の品質管理機構に関わるタンパク質因子がどの（正常な）mRNA に作用しているのか同定することを目的とする。

【方法】間接的にかつ一過的な mRNA-タンパク質因子間の相互作用を効率よくかつ網羅的に検出することを目指して、デアミナーゼによりアデニンがイノシンに、シトシンがウラシルに変換される mRNA 塩基配列の編集機構を応用した新規解析方法の開発に取り組んだ。具体的には、mRNA に結合するタンパク質をデアミナーゼと融合させて出芽酵母細胞に導入した後、細胞から全 RNA を抽出した。次世代シークエンサーを用いたアンプリコン解析によって、cDNA 中の RNA 編集による塩基置換を検出した。

【結果】本研究では、新規方法の第一段階として、細胞内の mRNA-タンパク質間の直接的な相互作用を RNA 編集と次世代シークエンサーを用いた配列解析により解析する方法の開発に成功した。本法により、mRNA あたり約 10%の塩基置換を検出できた。また、本法ではアデニン残基の次のシトシン残基が効率よく RNA 編集されることが判明した。

本研究の目的と方法の概要



134. 品質管理機構が異常ではない mRNA に及ぼす作用の探索

遠藤　慧

東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 生命分子遺伝学分野

Keywords：mRNA，転写後制御，品質管理，RNA 編集

緒　言

ヒトの遺伝的疾患の約 3 割は終止コドンに関連した変異に起因する［1］。例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィーでは、報告された変異のうち約 2 割が終止コドンに関連する。このような変異を含む mRNA は mRNA の品質管理機構によって異常な mRNA として検知され、速やかに分解される［2］。結果として異常なタンパク質の合成は妨げられているが、この応答が異常なタンパク質の合成よりも重篤な形質異常を引き起こすことも少なくない。このような遺伝的疾患は症例が少なく治療法の研究も進展しにくいなか、終止コドンの認識機構や品質管理機構を創薬のターゲットにすることによって、多数の遺伝的疾患を包括的に治療しようとする研究が模索されている［3］。一方で、mRNA 品質管理機構に関連した因子が細胞分裂周期［4］や脂肪生成［5］にも関与することが示唆されており、品質管理機構が異常な mRNA の検出､分解とは異なった細胞の生理機能に対しても一定の役割を果たしていると考えられている｡しかし、品質管理機構の異常ではない mRNA への作用は未だ十分に解明されておらず、遺伝的疾患を治療するための品質管理機構の阻害がどのような副作用をどの程度引き起こし得るのか評価することも難しい。本研究課題では、異常ではない mRNA に対する mRNA 品質管理機構の役割を明らかにすることを目指して、mRNA の品質管理機構に関わるタンパク質因子がどの（正常な）mRNA に作用しているのか同定することを目的とする。

近年、特定のタンパク質に結合した RNA を網羅的に解析する方法が開発され、精力的に解析が進展している。ところが、mRNA の品質管理に関わるタンパク質因子は、リボソームを含め翻訳装置を介して間接的にかつ一過的に特定の mRNA に作用しており、安定な複合体形成に依存した解析手法の適用が難しい。また、このようなタンパク質因子の有無による mRNA 量変化の網羅的解析［6，7］では、分解を伴わない制御は検出できない。そこで、間接的にかつ一過的な mRNA-タンパク質因子間の相互作用を効率よくかつ網羅的に検出することを目指して、デアミナーゼによりアデニンがイノシンに、シトシンがウラシルに変換される mRNA 塩基配列の編集機構［8］を応用した新規方法の開発に取り組んだ。

方法および結果

1. mRNA-タンパク質間の相互作用に伴う RNA 編集を出芽酵母の生育として判定する系の構築

我々はまず、例えば酵母ツーハイブリッドシステムのように、出芽酵母の生育（コロニー形成）によって RNA-タンパク質間の相互作用に依存した RNA 編集を判定する方法の開発を目指した。出芽酵母を用いた RNA 編集の検出方法として、酵母ツーハイブリッドシステムでも用いられている転写因子 Gal4 の活性を RNA 編集に依存して変化させる実験系が報告されている［9］。この系では、転写因子 Gal4 と、Gal に結合する阻害タンパク質 Gal80 を融合させた遺伝子を RNA 編集の検出レポーター遺伝子として用いており、Gal4 と Gal80 のコード領域の間には RNA 編集を受けると終止コドンが生成される配列が組み込まれている。このレポーター遺伝子からは通常 Gal4 と Gal80 の融合タンパク質が翻訳され、Gal80 によって Gal4 の機能は阻害されている。ところが、この遺伝子の mRNA が RNA 編集を受けると Gal80 の上流に終止コドンが生じて活性型の Gal4 のみが翻訳される。我々はこの系を改変して RNA 編集を介した特定の RNA-タンパク質間相互作用の検出を試みた。すなわち、RNA 編集を担うデアミナーゼを RNA 結合タンパク質 MS2 coat protein と融合させ、MS2 coat protein の結合モチーフである MS2 stem loop を Gal4 と Gal80 の間に挿入した。しかし、これらの融合タンパク質の発現ベクターを構築し、酵母ツーハイブリッドシステムで用いられている出芽酵母株 AH109 に導入しても、MS2 stem loop-MS2 coat protein 間の相互作用に依存した出芽酵母の生育の差を検出することはできなかった。

次に、マーカー遺伝子（*HIS3* ）が直接 RNA 編集されることによって出芽酵母の生育判定が可能な構築を試みた。RNA 編集によって開始コドンが生じることにより効率的にマーカー遺伝子が翻訳されるようになることを意図して、開始コドンを除去した *HIS3* 遺伝子のコード領域の上流に MS2 stem loop を挿入し、さらにその上流に *HIS3* 遺伝子とフレームが合うように ACG を 7 コドン連続で挿入したレポーター遺伝子を構築した（図 1a）。このレポーター遺伝子とデアミナーゼ-MS2 coat protein 融合タンパク質の発現ベクターを、出芽酵母株 BY4727 に導入した。融合タンパク質との共発現により RNA 編集が起こる結果 *HIS3* 遺伝子が翻訳され、ヒスチジン不含培地での生育が促進すると期待していた。しかし興味深いことに、期待とは全く反対の現象が観察された。すなわち、融合タンパク質を発現させた場合に、出芽酵母のヒスチジン不含培地での生育が悪化した。

2. 次世代シークエンサーを用いたアンプリコン解析による RNA 編集の検出

期待とは逆の結果ではあったものの出芽酵母の生育に違いが観察されたため、細胞内で何かしらの反応が生じていることが示唆された。そこで、出芽酵母内で発現しているレポーターmRNA の配列解析を実施した。まず、対数増殖期の出芽酵母を破砕し、全 RNA を抽出して精製した。次に、抽出した全 RNA から poly (dT) プライマーを用いて mRNA のみを逆転写し、cDNA を合成した。さらに合成した cDNA を鋳型にし、アンプリコン解析に必要なアダプター配列が付加された *HIS3* 遺伝子特異的なプライマーを用いて、レポーターmRNA の転写開始点付近から 450 塩基の領域を増幅した。精製した PCR 産物の塩基配列を次世代シークエンサーMiSeq を用いて解析し、配列解析の正確性が高かった 2～3 万配列を抽出して塩基置換の頻度を解析した。MS2 coat protein のみ（図 1b）やデアミナーゼのみ（図 1c）を発現させた場合にはレポーターmRNA の 0.6%のみでしかシトシン残基からウラシル残基への塩基置換が検出されなかったのに対して、MS2 coat protein とデアミナーゼの融合タンパク質を発現させた場合（図 1d）にはレポーターmRNA の 9.5%で塩基置換が検出された。また、1 残基あたり最大 2%の塩基置換が検出された。

配列解析した領域のうち全てのシトシン残基のうち 26 箇所では RNA 編集による塩基置換が検出されたが、残りの 65 箇所では検出ノイズと同程度の塩基置換しか検出されなかった。そこで、RNA 編集が起こる条件を明らかにすることを意図して、RNA 編集が観察されたシトシン残基と観察されなかったシトシン残基の 2 グループにわけ、その前後の配列を解析した（図 2）。すると、RNA 編集を受けたシトシン残基の 1 塩基上流は全てプリン残基であった。特に、シトシン残基の 1 塩基上流がアデニン残基である 23 箇所のシトシン残基のうち 22 箇所で RNA 編集が検出されていた。さらに、RNA 編集が検出されなかった残りの 1 箇所も MS2 stem loop の内部に位置していた。

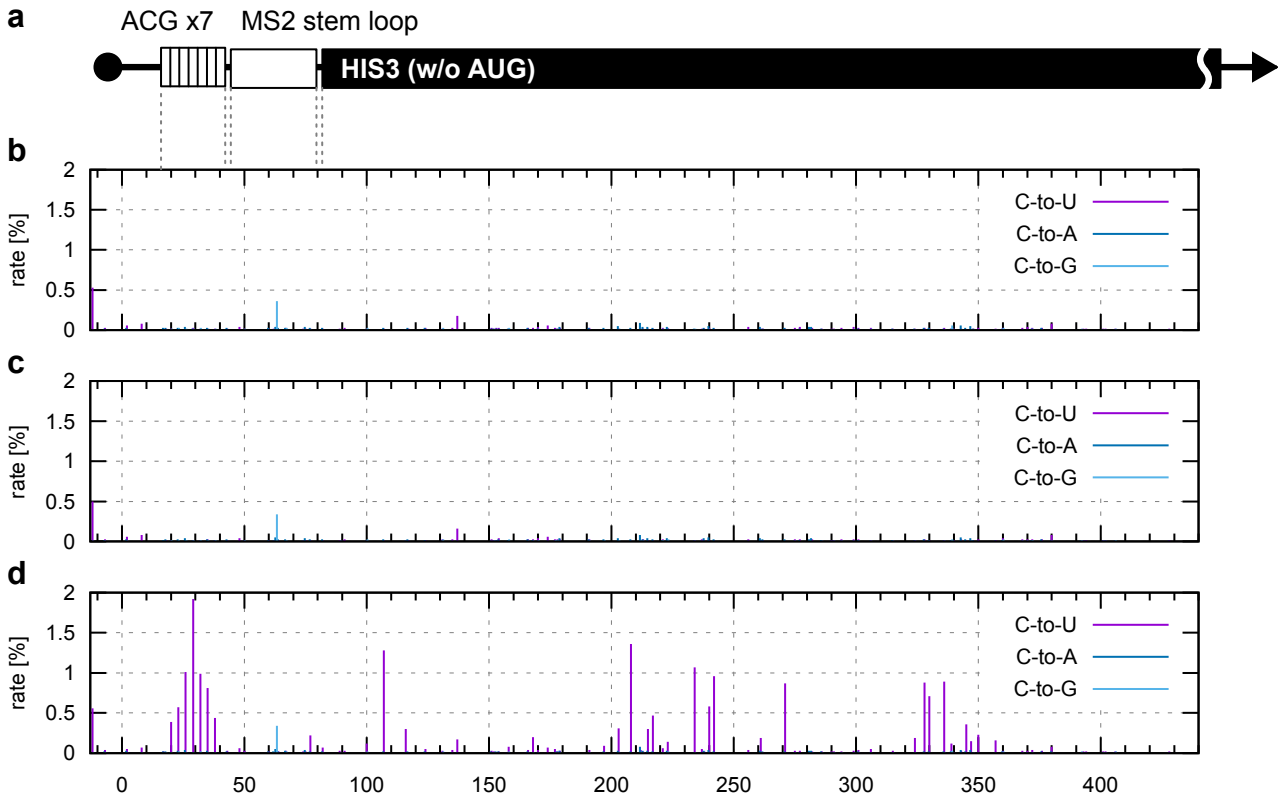


図 1. アンプリコン解析による RNA 編集の検出

a) レポーター mRNA の構成。

b) MS2 coat protein を発現させた場合の塩基置換の検出頻度（%）。

c) デアミナーゼを発現させた場合の塩基置換の検出頻度（%）。

d) MS2 coat protein とデアミナーゼの融合タンパク質を発現させた場合の塩基置換の検出頻度 （%）。

```
# % edited site (26)
-6: T ( 15) C ( 30) A ( 26) G ( 26)
-5: T ( 23) C ( 23) A ( 26) G ( 26)
-4: T ( 23) C ( 15) A ( 38) G ( 23)
-3: T ( 26) C ( 23) A ( 38) G ( 11)
-2: T ( 11) C ( 42) A ( 23) G ( 23)
-1: T (  0) C (  0) A ( 84) G ( 15)
 0: T (  0) C (100) A (  0) G (  0)
 1: T ( 15) C ( 15) A ( 53) G ( 15)
 2: T ( 19) C ( 19) A ( 30) G ( 30)
 3: T ( 15) C ( 19) A ( 46) G ( 19)
 4: T ( 26) C ( 26) A ( 26) G ( 19)
 5: T ( 19) C ( 19) A ( 30) G ( 30)
 6: T ( 19) C ( 34) A ( 34) G ( 11)
```

```
# % NOT edited site (65)
-6: T ( 21) C ( 12) A ( 35) G ( 30)
-5: T ( 16) C ( 21) A ( 30) G ( 30)
-4: T ( 15) C ( 32) A ( 29) G ( 23)
-3: T ( 21) C ( 13) A ( 24) G ( 40)
-2: T ( 23) C ( 21) A ( 30) G ( 24)
-1: T ( 36) C ( 32) A (  1) G ( 29)
 0: T (  0) C (100) A (  0) G (  0)
 1: T ( 23) C ( 26) A ( 30) G ( 20)
 2: T ( 21) C ( 30) A ( 26) G ( 21)
 3: T ( 32) C ( 13) A ( 27) G ( 26)
 4: T ( 16) C ( 27) A ( 27) G ( 27)
 5: T ( 16) C ( 23) A ( 32) G ( 27)
 6: T ( 20) C (  9) A ( 38) G ( 32)
```

図 2. RNA 編集の周辺配列依存性

RNA 編集が観察されたシトシン残基（左、26 残基）と観察されなかったシトシン残基（右、65 残基）について、シチジン塩基を基準（0）に、上流側 6 塩基（−6 〜 −1）と下流側 6 塩基（1 〜 6）の配列分布を抽出した。我々の実験系では、直前（−1）がプリン残基、特にアデニン残基、のシチジンに特異的な RNA 編集が観察された。

3. 次世代シークエンサーを用いたトランスクリプトーム解析による RNA 編集の検出

ここまでの研究で、RNA 編集と次世代シークエンサーを用いた配列解析により、細胞内の mRNA-タンパク質間相互作用を解析できることが明らかになった。そこで次に品質管理機構に関わる因子が結合する mRNA を網羅的な検証に取り組んだ。まず、品質管理機構に関わる因子のなかでも、特定の異常な mRNA だけでなく mRNA 一般に相互作用し、かつ mRNA に直接結合することから、HRP1 をモデルとして実証実験を行うこととした。配列解析に先立ち HRP1 とデアミナーゼの融合タンパク質が本来の活性を持つか確認した。HRP1 の欠損株を作製して融合タンパク質が HRP1 の欠損を相補するか検証したところ、融合タンパク質はもとの HRP1 より活性は劣るものの一定の活性を示すことが示された。そこで、HRP1 とデアミナーゼの融合タンパク質を発現させた出芽酵母から全 RNA を抽出して精製し、トランスクリプトーム解析を行った。しかし明らかな RNA 編集は検出されなかった。

考　察

本研究では、間接的にかつ一過的な mRNA-タンパク質因子間の相互作用を効率よくかつ網羅的に検出する方法の開発へ向けた第一段階として、細胞内の mRNA-タンパク質間の直接的な相互作用を RNA 編集と次世代シークエンサーを用いた配列解析により解析する方法の開発に成功した。本法では、RNA 編集により mRNA 中にある“AC”配列の塩基置換が検出された。“AC”配列は平均的には 16 塩基に 1 箇所存在するため、本法は多様な mRNA とタンパク質の相互作用検証に用いることができると期待される。また、今回の相互作用部位である MS2 stem loop から 200 塩基程度下流のシトシン残機でも RNA 編集が検出されている。広い範囲にわたって RNA 編集が検出されることから、mRNA 上の 1 塩基あたりの塩基置換の頻度は最大でも 2%程度ではあったが、mRNA あたりでは 10%近くの塩基置換が検出されており、十分高い検出感度が期待できる。

現在までに、品質管理に関連する因子が結合する mRNA を、トランスクリプトーム解析によってゲノムワイドに探索する実験には成功していない。現在、HRP1 の代わりに、これまでに我々の研究室で研究が進められており、細胞株や各種変異体などの実験材料が豊富な品質管理機構関連因子の SKI7［10］に注目して研究を進めている。SKI7 とデアミナーゼの融合タンパク質を発現させたときに、酵母ゲノム上に挿入された品質管理の対象となる異常 mRNA のレポーターmRNA が RNA 編集されるか、本研究によって方法が確立したアンプリコン解析によって検証する実験を進めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 生命分子遺伝学分野教授の伊藤耕一博士である。同研究室の都竹亜紀子氏および中田絵理子氏には、本研究の実施にあたって分子生物学実験にご協力いただいた。この場をかりて謝意を表する。

文　献

1) Kurosaki T, Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. J Cell Sci. 2016 Feb 1;129(3):461-7. doi: 10.1242/jcs.181008. Epub 2016 Jan 19. Review. PubMed PMID: 26787741; PubMed Central PMCID: PMC4760306.

2) Simms CL, Thomas EN, Zaher HS. Ribosome-based quality control of mRNA and nascent peptides. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2017 Jan;8(1). doi: 10.1002/wrna.1366. Epub 2016 May 18. Review. PubMed PMID: 27193249; PubMed Central PMCID: PMC5116004.

3) Martin L, Grigoryan A, Wang D, Wang J, Breda L, Rivella S, Cardozo T, Gardner LB. Identification and characterization of small molecules that inhibit nonsense-mediated RNA decay and suppress nonsense p53 mutations. Cancer Res. 2014 Jun 1;74(11):3104-13. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2235. Epub 2014 Mar 24. PubMed PMID: 24662918; PubMed Central PMCID: PMC4040335.
4) Azzalin CM, Lingner J. The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. Curr Biol. 2006 Feb 21;16(4):433-9. PubMed PMID: 16488880.
5) Cho H, Kim KM, Han S, Choe J, Park SG, Choi SS, Kim YK. Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. Mol Cell. 2012 May 25;46(4):495-506. doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.009. Epub 2012 Apr 12. PubMed PMID: 22503102.
6) Hurt JA, Robertson AD, Burge CB. Global analyses of UPF1 binding and function reveal expanded scope of nonsense-mediated mRNA decay. Genome Res. 2013 Oct;23(10):1636-50. doi: 10.1101/gr.157354.113. Epub 2013 Jun 13. PubMed PMID: 23766421; PubMed Central PMCID: PMC3787261.
7) Guydosh NR, Green R. Dom34 rescues ribosomes in 3' untranslated regions. Cell. 2014 Feb 27;156(5):950-62. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.006. PubMed PMID: 24581494; PubMed Central PMCID: PMC4022138.
8) Licht K, Jantsch MF. Rapid and dynamic transcriptome regulation by RNA editing and RNA modifications. J Cell Biol. 2016 Apr 11;213(1):15-22. doi: 10.1083/jcb.201511041. Epub 2016 Apr 4. Review. PubMed PMID: 27044895; PubMed Central PMCID: PMC4828693.
9) Lellek H, Welker S, Diehl I, Kirsten R, Greeve J. Reconstitution of mRNA editing in yeast using a Gal4-apoB-Gal80 fusion transcript as the selectable marker. J Biol Chem. 2002 Jun 28;277(26):23638-44. Epub 2002 Apr 25. PubMed PMID: 11976346.
10) Horikawa W, Endo K, Wada M, Ito K. Mutations in the G-domain of Ski7 cause specific dysfunction in non-stop decay. Sci Rep. 2016 Jul 6;6:29295. doi: 10.1038/srep29295. PubMed PMID: 27381255; PubMed Central PMCID: PMC4933942.