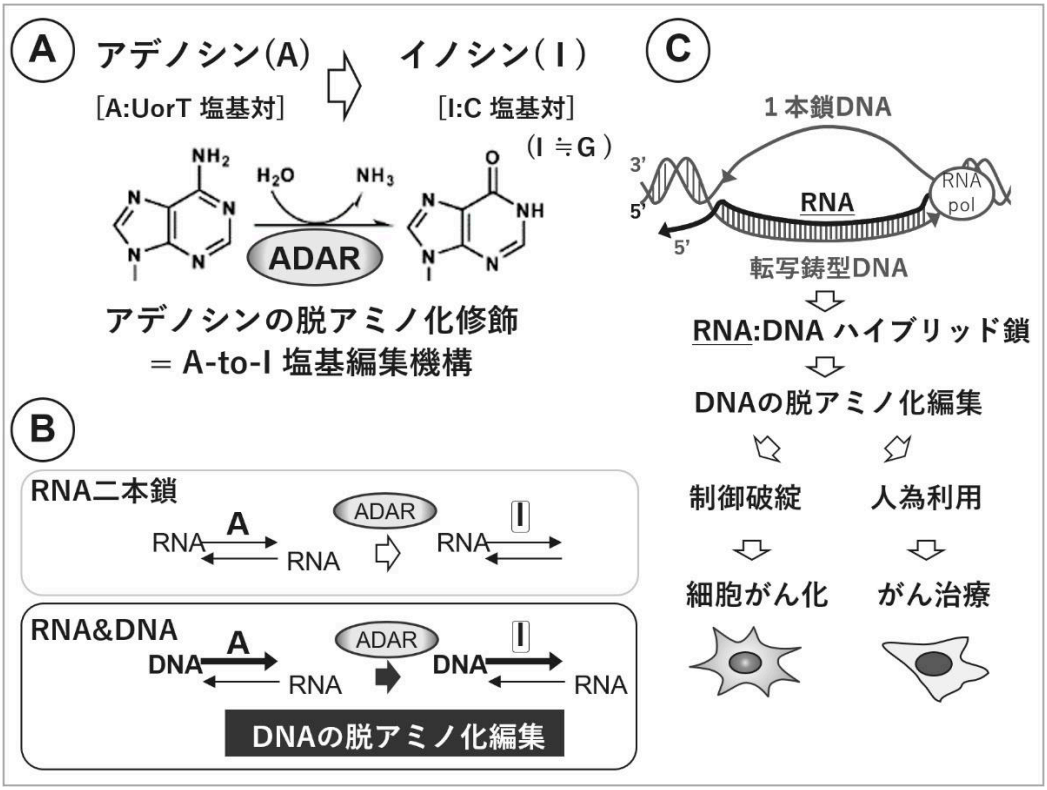
36　哺乳類内在性RNA依存的DNA編集機構の解明と利用	櫻井　雅之

【目的】「生命のセントラルドグマ」である DNA から適宜必要な遺伝子を RNA へと転写し、機能発現体であるタンパク質を産生する遺伝子発現の流れにおいては、各段階において多彩な発現調節機構が働くことにより、適切な遺伝子発現が維持される。この調節機構の 1 つに、遺伝子情報そのものである DNA と RNA の［A、G、C、T（U）］4 種の塩基の化学構造を修飾する機構が備わっている。我々は、これまで二本鎖 RNA のみを基質とすると考えられていたアデノシンを脱アミノ化してイノシンへと修飾（A-to-I 脱アミノ化編集、図 A）する酵素である ADAR（Adenosine Deaminase Acting on double-stranded RNA）が、RNA : DNA ハイブリッド鎖をも基質として RNA のみならず DNA のアデノシンをも脱アミノ化編集することを発見した（図 B）。これは哺乳動物細胞内在性として初の RNA がガイドするゲノム配列編集機構と考えられる。本研究では、この仮説の検証による哺乳動物細胞内在機構として初の、RNA がガイドするゲノム配列編集機構となる、DNA : RNA ハイブリッド鎖を基質とした DNA のアデニン塩基脱アミノ化編集の分子機構と生物学的意義の解明と、遺伝子工学への応用利用、検出技術の開発を目的として実施した（図 C）。

【方法と結果】本研究では、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た。さらに ADAR 発現抑制及び ADAR 遺伝子再導入による RNA : DNA ハイブリッド鎖量の変動解析により、ADAR 発現抑制時に 3 倍以上増加することの再現性を確認した。続いて、本機構を利用して人工ガイド RNA の導入によるゲノム DNA 脱アミノ化編集によるゲノム編集法開発に取り組み、厳密に A-to-I DNA 編集部位を規定可能な設計規則を見出した。最後に、既存手法では難しい、超微量細胞内 DNA 鎖におけるイノシン部位の同定を目指し、核酸鎖内のイノシン部位に対する特異的標識法の開発に成功した。以上、機構の解明・利用技術の開発・同定技術の開発により、さらに新たな意義の解明が期待できる。

哺乳類内在性 RNA 依存的 DNA 鎖 A-to-I 脱アミノ化機構



36. 哺乳類内在性 RNA 依存的 DNA 編集機構の解明と利用

櫻井　雅之

東京理科大学 生命医科学研究所 分子病態学研究部門

Key words：核酸塩基編集，アデノシン脱アミノ化，イノシン，RNA：DNA ハイブリッド鎖，R-loop

緒　言

我々は、これまで二本鎖 RNA のみを基質とすると考えられていたアデノシンを脱アミノ化してイノシンへと修飾（A-to-I 脱アミノ化編集、図 1A）する酵素である ADAR（Adenosine Deaminase Acting on double-stranded RNA）が、RNA：DNA ハイブリッド鎖をも基質として RNA のみならず DNA のアデノシンをも脱アミノ化編集することを発見した（図 1B）[1]。これは哺乳動物細胞内在性として初の RNA がガイドするゲノム配列編集機構と考えられる。アデノシン（A）の脱アミノ化により生じるイノシン（I）はグアノシン（G）と化学構造が似ており、G と同様にシチジン（C）と塩基対を形成する。よって、この DNA アデノシンの脱アミノ化による A-to-I 編集現象は、正しいゲノム配列が A であり I へと変わる場合は能動的な変異導入機構、また逆に G>A 変異を起こした部位の A に対して G へと戻す修復機構であるという二通りの仮説の着想に至った。

本研究では、この仮説の検証による哺乳動物細胞内在機構として初の、RNA がガイドするゲノム配列編集機構となる DNA：RNA ハイブリッド鎖を基質とした DNA のアデニン塩基脱アミノ化編集の分子機構と生物学的意義の解明と、遺伝子工学への応用利用、検出技術の開発を目的として実施した。

方法および結果

1.　ADAR 発現抑制時の細胞動態の解析

始めに、ADAR 発現抑制時のアデノシン脱アミノ化機構解消時における詳細な細胞表現型を同定するべく、マーカー遺伝子のウェスタンブロッティングによる発現量変動解析（図 1C）とフローサイトメトリーによる細胞周期の解析を HeLa 培養細胞にて行った。その結果、細胞表現型として ADAR 発現抑制時にはγH2AX だけでなく RPA32 や DNA-PKCs のリン酸化状態の上昇が観察され、DNA 損傷の増大と修復系の活性化が明らかとなった（図 1C）。さらに Cyclin B1 だけでなく、Histon3、CDC2、PLK1 のリン酸化状態の解析結果から、細胞周期のうち、顕著に細胞分裂期における停止が明らかとなった（図 1C）。同時にこれら表現型に伴ったアポトーシスを示す PARP1 分解産物の増加を確認した（図 1C）。

2.　ADAR 発現抑制及び ADAR 遺伝子再導入による RNA：DNA ハイブリッド鎖量の変動解析

がん化した細胞では亢進した細胞生存性と RNA 転写による RNA：DNA ハイブリッド鎖（R-loop）の形成が顕著であることが知られていた [2]。そこで我々は特異的抗体を用いて HeLa 培養細胞核内で R-loop の局在が ADAR のものと一致することを確認し、R-loop 量が RNAi 法による ADAR 発現抑制時に 3 倍以上増加することの再現性を確認した（図 1D）。さらに ADAR 発現抑制時に細胞外部より遺伝子を導入することにより、内在 ADAR 発現抑制による RNA：DNA ハイブリッド鎖量の増加がキャンセルされ、ネガティブコントロール条件と同程度まで復帰する結果が得られた（図 1D）。

3.　人工ガイド RNA の導入によるゲノム DNA 脱アミノ化編集によるゲノム編集法開発

一方、人為的に細胞外からガイド RNA を細胞内へ導入し、目的ゲノム配列部位で RNA：DNA 鎖形成による内在の ADAR 依存的 DNA アデノシン脱アミノ化を引き起こし A-to-I 編集を経た G への DNA 塩基置換導入法への確立を進めた。化学合成した DNA 鎖を鋳型とし、ガイド RNA の設計によるリコンビナント ADAR による脱アミノ化の

試験管内における反応効率解析の結果（図 2A）、厳密に A-to-I DNA 編集部位を規定可能な設計規則を見出した。続いて本現象が培養細胞内でも起こることを簡便に検出可能とするため、緑色蛍光タンパク質（GFP）発現プラスミドの一部に DNA アデノシン脱アミノ化対象部位を挿入し、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検出可能となるシステムを構築した（図 2B）。

4. 核酸鎖内のアデノシン脱アミノ化によるイノシン部位に対する特異的標識法の開発

本研究に先立ち、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クエ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た（ICE-seq）[3〜9]。しかしながら、DNA 中のイノシンは非常に微量かつ一時的と想定され、なおも検出同定が難しいことが判明した（図 3A）。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を進めた。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た（図 3B）。本結果は特許申請予定である。

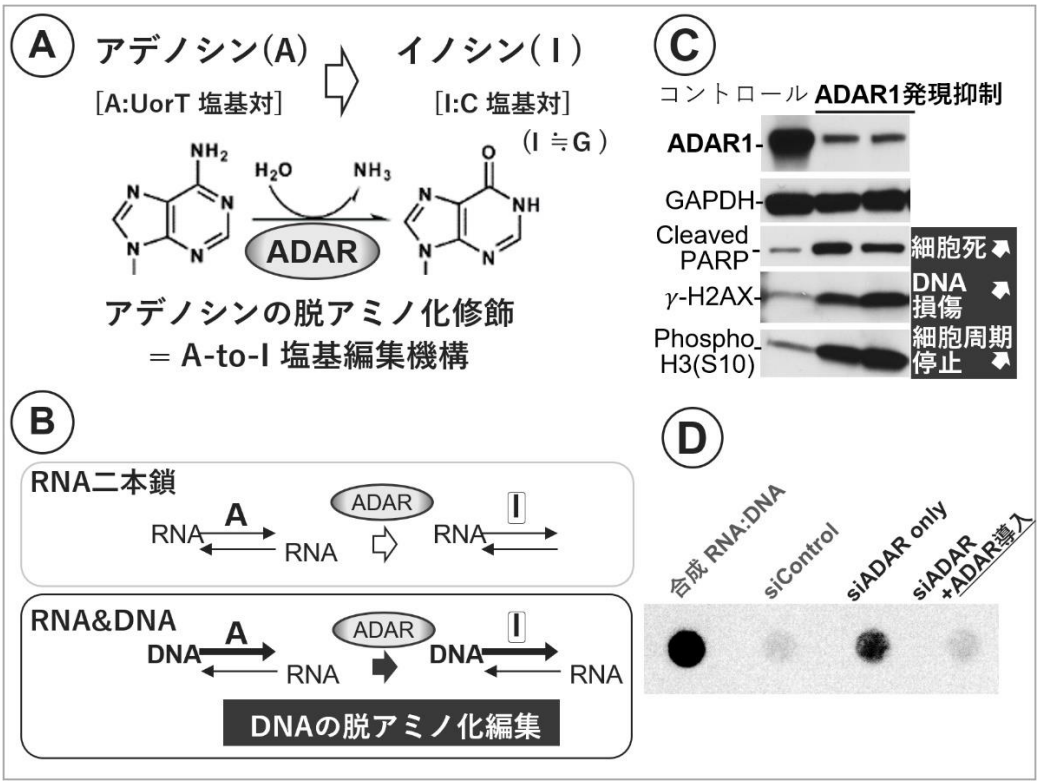


図 1. ADAR 発現抑制時の細胞動態と RNA：DNA ハイブリッド鎖

A）ADAR によるアデノシン脱アミノ化によるイノシンへの（A-to-I）塩基編集機構。

B）新規に発見した RNA：DNA ハイブリッド鎖における DNA の脱アミノ化編集。

C）ADAR 発現抑制時における細胞死、DNA 損傷、細胞周期停止を示す指標タンパク質発現変化。

D）RNA：DNA ハイブリッド鎖抗体を用いた ADAR 発現時及び外部よりの導入による細胞内ハイブリッド鎖量の復帰定量解析結果。

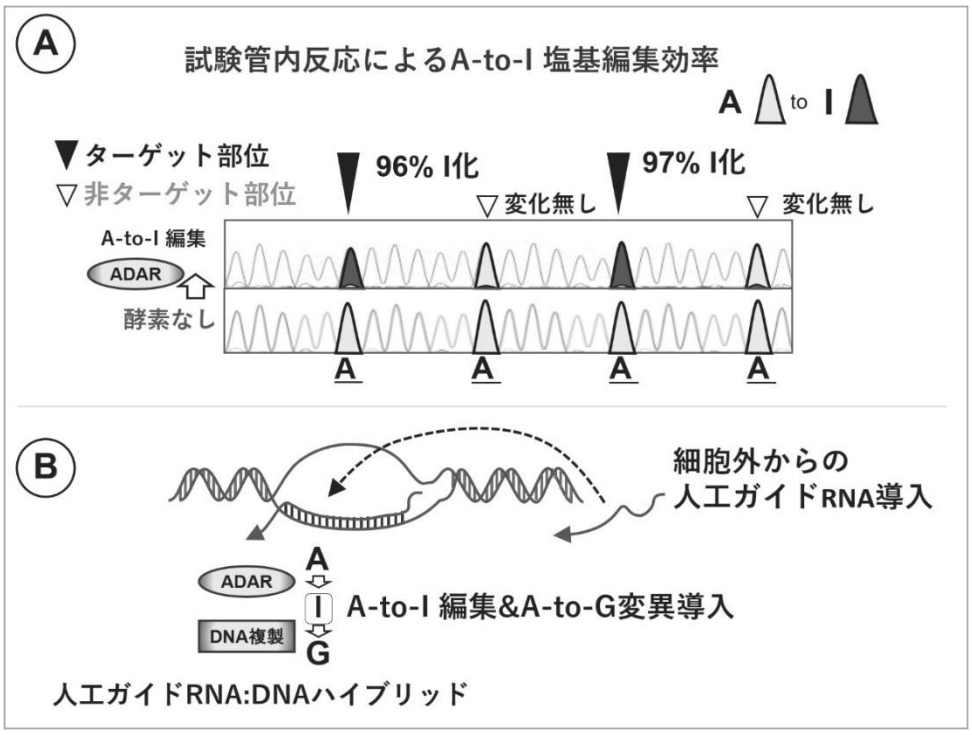


図2. A-to-I DNA編集機構を利用した新規ガイドRNA依存的内在性DNA編集技術の開発

A) 合成 DNA を対象としたリコンビナント ADAR と合成ガイド RNA を用いた試験管内 A-to-I DNA 編集実験解析による RNA デザインの最適化結果。

B) 培養細胞内にガイド RNA 依存的 A-to-I DNA 編集実験モデル。

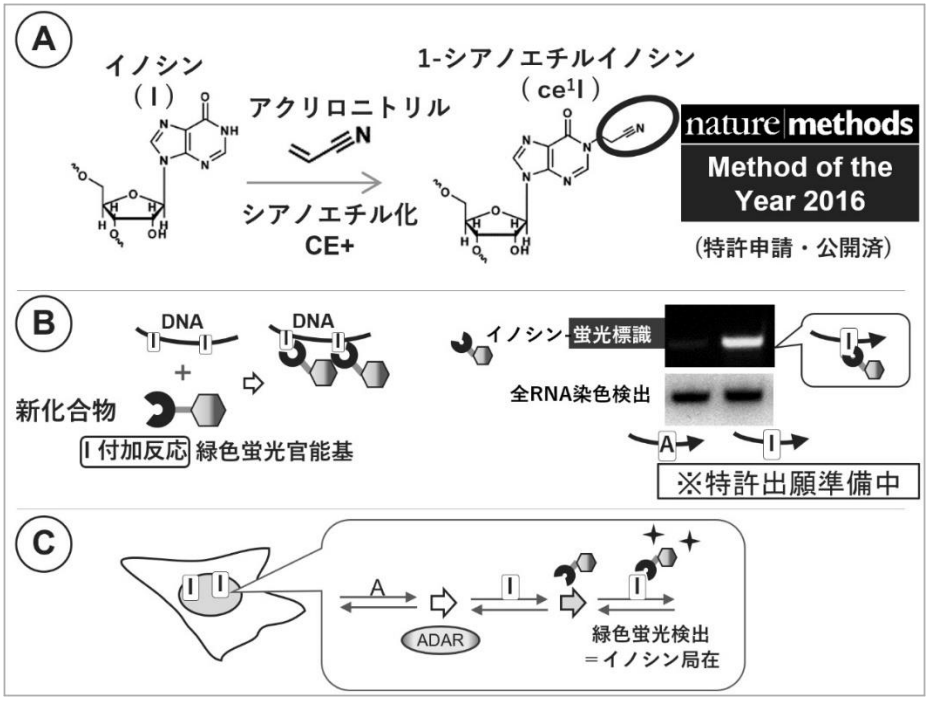


図 3. 我々が開発した核酸鎖内におけるイノシン部位の同定法と新規検出法

A) 我々が過去に開発した次世代シークエンスを利用したイノシン同定法（ICE-seq）。

B) 本研究で新規に探索開発した、イノシン特異的標識法とその結果。

C) イノシン特異的標識法の利用例 : 細胞内のイノシン含有核酸の蛍光標識による局在解析。

考　察

ADAR 細胞発現抑制時の細胞動態の解析結果、および細胞内 R-loop の変動解析結果から、DNA 制御に損傷と細胞周期、また R-loop の解消に ADAR が関与していることが明白となった。上述の結果を踏まえると、DNA：RNA ハイブリッド鎖における A-to-I DNA 脱アミノ化編集機構は、現時点では G>A 変異を起こした部位に対する RNA ガイド性修復機構であると考えられる。すなわち、細胞は G>A 変異が起こりやすい DNA 部位で RNA 転写を活性化しておき、DNA 配列のバックアップコピーとして常に一定量の RNA を維持し、いざ G>A 変異が起きた場合、変異前の正配列をもつ RNA がガイド鎖として変異 DNA 部位周辺領域と塩基対合ハイブリッド鎖が形成される。その結果、変異部位では DNA（A）×RNA（C）のミスマッチ対となる。そして ADAR による A-to-I DNA 脱アミノ化編集が起こり、編集後の I は C と塩基対を組む原理から DNA 複製過程を経ると元の G へと置換修復されるという機構の存在が想定できる。また、特にがん細胞では、ADAR の発現抑制が DNA 損傷・細胞周期停止・細胞死を誘導する傾向を我々は見出しており、これは ADAR が DNA 損傷抑制/修復促進に関与し、細胞のがん化への関与を示している。

試験管内 A-to-I DNA 脱アミノ化編集反応による編集効率の高いガイド RNA 配列設計への知見が得られた。上記の通り現在は GFP を利用したレポーターシステムを構築して細胞内における、ガイド RNA の導入による人為的 A-to-I DNA 編集機構の確立に取り組んでいる（図 2B）。内在性ゲノム変異部位への適用対象の一例としては、膵臓がんの原因となる *K-RAS* 遺伝子の G35A 変異型をもつ培養細胞の変異部位を、G へと修復する系の構築を進めている。

本研究の当初の段階では、ゲノム DNA 中のイノシン部位の特定を行うため、培養細胞溶出液から RNA：DNA 鎖特異的抗体、及び ADAR による免疫沈降法により RNA：DNA 鎖の精製を行い、次世代シークエンス解析を行った。ところが既存の一般的な解析方法では免疫沈降反応時の非特異吸着が原因と考えられる高いノイズのため、Signal/Noise 比が低く、決定的な領域同定が困難であることが判明した。そこで早稲田大学の浜田博士らとともに特殊アルゴリズムを用いて、次世代シークエンス結果の再解析を進めている。さらにこの一連の DNA 鎖内イノシンの検出同定法［3～9］及び標識法（図 2A、B）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る。今後はより効率的かつ特異性の高い反応条件の探索と、反応効率と非特異反応率の検証を進める。本技術の確立により、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（図 3C）や、核酸中のイノシン定量と精製が可能となる。

共同研究者・謝辞

研究 1 と 2 は米国 Wistar 研究所の Dr. Kazuko Nishikura と城本悠助博士と、研究 3 と 4 は早稲田大学理工学術院の浜田道昭博士と東京理科大学薬学部生命創薬科学科の和田猛研究室との共同研究である。

文　献

1) 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)

2) 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)

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) Suzuki, T., Ueda, H., Okada, S., and Sakurai, M. “Transcriptome-wide identification of adenosine-to-inosine editing using the ICE-seq method.” Nat. Protoc. 10: 715-732 [DOI: 10.1038/nprot.2015.037, PMID: 25855956] (2015).
6) Okada, S., Sakurai, M., Ueda, H., and Suzuki, T. “Biochemical and Transcriptome-Wide Identification of A-to-I RNA Editing Sites by ICE-Seq” Methods Enzymol. 560: 331-335 [DOI: 10.1016/bs.mie.2015.03.014, PMID: 26253977] (2015).
7) 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).
8) Helm, M., and Motorin, Y. “Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: predict and validate.” Nat. Rev. Genet. 18: 275-291 [DOI: 10.1038/nrg.2016.169, PMID: 28216634] (2017).
9) 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).