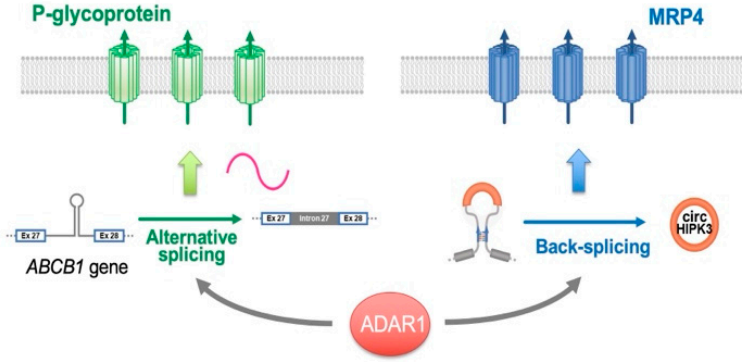
8　RNA編集の時刻変動を基軸にした時間薬物療法	小柳　悟

【目的】薬物の吸収・分布・代謝・排泄に関わるトランスポーターやチトクローム P450（CYPs）などの活性には大きな個人差が認められ、薬物治療の最適化における妨げのひとつになっている。過去 30 年近くにわたり、これら分子の DNA シーケンス解析を中心に様々な検討が行われてきたが、その個人差の原因は十分に解明されていない。一方、我々は生体機能の 24 時間周期の変動を制御する「時計遺伝子」によって、トランスポーターや CYPs、受容体など「薬効関連分子」の発現に時刻変動が引き起こされることを見出し、薬物の効果や体内動態が同一個体内でも時刻によって変容することを明らかにしてきた。また、最近の研究で RNA 編集酵素（ADAR）が DNA の変化をともなわずに RNA の配列を時刻依存的に書き換え、薬効関連分子の発現・機能に概日リズムを引き起こすことを見出している。本研究では ADAR による RNA 編集を基軸に、薬物の効果・体内動態に時刻による変動が生じる機序について検討を行った。

【方法】実験には自由摂食・摂水、明暗周期条件下（明期 7:00～19:00）で飼育した ICR 雄性マウスおよび同様の環境下で飼育した雄カニクイザルを用いた。また、培養ヒト腎近位尿細管上皮細胞（RPTECs）に ADAR1 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを感染させることで、ADAR1-knockdown (KD) RPTECs を作製した。概日時計機構の同調実験では、RPTECs を 100 nM dexamethasone に 2 時間曝露し、時計遺伝子の発現リズムを指標にモデルの妥当性を確認した。各動物組織および培養細胞から調製したサンプルを対象に、mRNA 発現量は RT-PCR 法、タンパク質発現量は Western blotting 法で測定した。また、サンガー法でシーケンス解析し、RNA 編集の有無を確認した。

【結果】マウス、カニクイザルに腎臓および概日時計機構を再構築した RPTECs においても ADAR1 の発現は有意な 24 時間周期の変動を示し、本酵素の発現リズムに応じて特定の遺伝子の RNA 上のアデノシンは時刻依存的にイノシンへと変換されていた。ADAR1-KD の RPTECs を対象に本酵素の有無によって発現が制御をうける薬物輸送トランスポーターの探索を行った。その結果、P 糖タンパク質 (P-gp) をコードするヒト *ABCB1* mRNA の発現低下および Multidrug Resistance Protein-4（MRP4）をコードするヒト *ABCC4* mRNA の発現上昇が観察された。この原因について解析したところ、ADAR1 は P-gp をコードする *ABCB1* 遺伝子のイントロン 27 のスプライシング効率を時刻依存的に変容させ、その発現と薬物輸送活性に概日リズムを引き起こしていることが明らかになった。また、ADAR1 は *HIPK3* 遺伝子におけるバックスプライシングにも影響を及ぼし、環状 RNA である circHIPK3 の産生制御を介して MRP4 の翻訳および発現量に個体差が生じることが示唆された。概日時計機構を再構築した RPTECs において P-gp の発現は ADAR1 のリズムによって時刻依存的に変動したが、同細胞で MRP4 の発現には概日リズムが認められなかった。これは ADAR1 による MRP4 の発現制御を仲介する環状 RNA が細胞内で安定的に存在するためだと考えられた。これらの結果は、腎臓からの薬物排泄における投薬時刻の違いや個人差についての新たなメカニズムを示唆するものであり、ADAR1 は時計遺伝子とは異なる機構で薬効の効果や体内動態に関わる分子の発現や概日リズムを制御していることが明らかになった。

RNA 編集酵素（ADAR1）による近位尿細管における薬物排泄トランスポーターの発現制御



8. RNA 編集の時刻変動を基軸にした時間薬物療法

小柳　悟

九州大学大学院 薬学研究院 薬剤学分野

Key words：概日リズム，RNA 編集，時間薬物療法

緒　言

神経の活動性をはじめ、ホルモン分泌や代謝酵素の活性など、様々な生体機能には 24 時間を一周期とする概日リズムが認められる。このようなリズムは「時計遺伝子」とよばれる一連の遺伝子群によって形成される転写･翻訳の Feedback Loop 機構が中心となって引き起こされ、個々の細胞レベルでリズムを発振している［1］。哺乳類動物における概日リズムの中枢は視床下部の視交叉上核に位置し、自律神経や副腎皮質ホルモンなどを介して、他の脳部位や末梢組織における個々の細胞内の時計遺伝子の発現リズムを同調させ、生体機能の概日リズムを引き起こしている［2］。一方、薬物が投与された部位から作用部位に移行するにはいくつもの「関門」があり、投与された全量の薬物が作用部位（病巣部位）に到達することはない。生体に投与された薬物は、投与部位から「吸収」され脈管系に入り、その一部が作用部位に到達（分布）して効果を発揮する。また、これと同時に一部の薬物は肝臓などに発現する酵素によって「代謝」を受けたり、腎臓から尿中へと「排泄」されたりする。近年の研究から、時計遺伝子は薬物の体内動態や感受性に関わる薬物輸送トランスポーターの発現や代謝酵素の活性に影響を与え、その効果に投薬時刻の違いによる差異を引き起こすことが明らかになってきた［3］。

DNA から転写された RNA は、スプライシングや修飾などのプロセシングを経て、それぞれの機能を発揮する。RNA のプロセシングの中でも RNA 塩基の置換・挿入・欠損により遺伝情報が書き換えられるものは「RNA 編集」とよばれるが、Adenosine Deaminase Acting on RNA（ADAR）酵素が触媒する RNA 上のアデノシンからイノシンへの変換は、ヒトの生体内で最も高頻度に認められる RNA 編集である［4］。翻訳の際に RNA 上のイノシンはグアノシンとして認識されるため、ゲノム情報とは異なるアミノ酸配列への置換やタンパク質の構造変化が起こる。そのため、ADAR による RNA 編集は DNA の配列変化を伴わずに「①タンパク質のアミノ酸の置換」「②スプライシングバイリアントの形成変化」「③mRNA からタンパク質への翻訳率の減少」などを引き起こし、タンパク質の活性や機能に影響を及ぼす［5］。過去の研究において、マウスの肝臓におけるアデノシンからイノシンへの RNA 編集は ADAR 活性の概日リズムによって時刻依存的に変動することが報告されている［6］。我々は、サルの腎臓や概日リズムを再構築したヒト近位尿細管上皮細胞を用いて、ADAR の発現や RNA 編集活性が霊長類の細胞内でも 24 時間周期の変動を示すことを見出した。本研究では、ADAR による RNA 編集活性の概日リズムが薬物の効果・体内動態にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的として、腎臓における薬物輸送トランスポーターの発現に焦点をあて検討を行った。

方　法

1. 実験動物

実験には自由摂食・摂水、明暗周期条件下（明期 7:00～19:00）で飼育した ICR 雄性マウスおよび同様の環境下で飼育した雄カニクイザルを用いた。各動物から一日の中の異なる時点に腎臓を採取し、サンプルとした。

2. ADAR1 ノックダウンヒト腎近位尿細管上皮細胞株の作製および概日時計機構の同調

培養ヒト腎近位尿細管上皮細胞（RPTECs）に ADAR1 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを感染させることで、ADAR1-knockdown（KD）RPTECs を作製した。概日時計機構の同調実験では、RPTECs を 100 nM dexamethasone (DEX) に 2 時間曝露し、時計遺伝子の発現リズムを指標にモデルの妥当性を確認した。

3. mRNA およびタンパク質発現量の測定と mRNA 安定性の評価

RPTECs から総 RNA およびタンパク質を抽出した後、mRNA 発現量は RT-PCR 法、タンパク質発現量は Western blotting 法で測定した。mRNA 安定性の評価は RPTECs に actinomycin D を 5 μ M で曝露し、経時的に RNA を抽出した。cDNA を作製後、目的とする遺伝子に特異的なプライマーで PCR を行い、PCR 産物をエチジウムブロマイド入りのアガロースゲルで電気泳動した後に UV を照射することで定量した。

4. RNA 編集部位の探索

目的とする遺伝子の exon および intron の配列を対象に、ゲノム DNA もしくは RNA から逆転写で得られた cDNA を鋳型にして PCR で増幅した。得られた PCR 産物をサンガー法でシーケンス解析し、RNA 編集の有無を確認した。

5. 半定量的 RT-PCR によるスプライシングの評価

目的とする遺伝子の exon および intron の配列を挿入した minigene ベクターを RPTECs にトランスフェクトし、抽出した RNA から cDNA を作製した。Minigene 特異的なプライマーで PCR を行い、PCR 産物をエチジウムブロマイド入りのアガロースゲルで電気泳動し、UV を照射することで定量した。

6. 統計解析

独立多群間の比較には一元配置分散分析法（One-way ANOVA）および Tukey-Kramer's post hoc test を用いた。また、独立 2 群間の比較には Student's t-test を用いた。有意水準 5%以下を有意な差とした。

結果および考察

1. 腎細胞における ADAR1 発現の概日リズムと RNA 編集の時刻変動

マウスおよびカニクイザルの腎臓において ADAR1 の発現は有意な概日リズムを示したが、主要な時計遺伝子の一つである *Period2* の機能不全マウスの腎臓ではリズムが消失した。このことから、ADAR1 の発現リズムは概日時計分子による制御下にあることが示唆された。また、概日時計機構を再構築した RPTECs においても ADAR1 の発現は有意な 24 時間周期の変動を示し、本酵素の発現リズムに応じて特定の遺伝子の RNA 上のアデノシンは時刻依存的にイノシン（シーケンス解析ではグアノシンとして検出）へと変換されていた（図 1）。これらの結果から、ADAR1 による RNA 編集活性にも概日リズムが引き起こされていることが明らかになった。

2. ADAR1 によって発現が制御される薬物輸送トランスポーターの探索

ADAR1-KD の RPTECs を対象に本酵素の有無によって発現が制御をうける薬物輸送トランスポーターの探索を行った。その結果、P 糖タンパク質 (P-gp) をコードするヒト *ABCB1* mRNA の発現低下 [7] および Multidrug Resistance Protein-4 (MRP4) をコードするヒト *ABCC4* mRNA の発現上昇が観察された [8]。これらのうち、カニクイザルの腎臓で P-gp および ADAR1 の発現にも同位相の概日リズムが認められたことから、ヒト腎細胞でも P-gp と ADAR1 の発現が概日リズムを示すことが示唆された。この仮説を検証するため、DEX 曝露で概日時計機構を再構築した RPTECs を用いて検討したところ、P-gp の発現とその薬物輸送活性には概日変動が認められたが、ADAR1-KD によりそれら変動は消失した。RPTECs における *ABCB1* mRNA の安定性には概日変動

が認められ、ADAR1-KD によってその安定性は低下したことから、本 RNA 編集酵素は *ABCB1* mRNA の安定性の制御を介して P-gp の概日リズムに影響を及ぼしていることが示唆された。

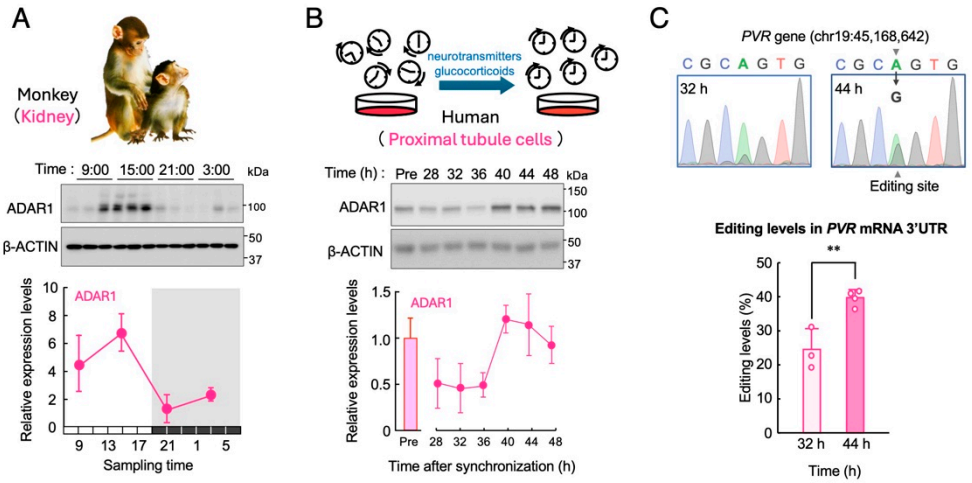


図 1. サル腎臓およびヒト近位尿細管細胞における ADAR1 発現および RNA 編集活性の概日リズム

A) サルの腎臓における ADAR1 の発現リズム。

B) 概日時計機構を再構築したヒト近位尿細管細胞における ADAR1 の発現変動。

C) 概日時計機構を再構築したヒト近位尿細管細胞における RNA 編集活性の時刻変動。いずれの図も平均値と標準偏差で示す。$^{**}P<0.01$（Student's t-test）。

3. ADAR1 による RNA 編集部位の同定と薬物輸送トランスポーターの発現制御機構の解析

ADAR1 は約 50 塩基対以上の 2 本鎖 RNA 上のアデノシンをイノシンに変換する酵素であるが、RPTECs における *ABCB1* 遺伝子の転写産物上に有意な編集部位は検出されなかった。一方で、ADAR1 は約 50 塩基対以上の 2 本鎖 RNA 構造に結合して、RNA 編集活性非依存的に遺伝子発現を制御することも知られていることから［9］、*ABCB1* 遺伝子転写産物の RNA の 2 次構造をインシリコ解析したところ、27 番目のイントロン部分が約 280 塩基対の強固な 2 本鎖構造をとることが示された。ADAR1-KD の RPTECs では *ABCB1* 遺伝子転写産物の安定性は低下していた。そこで、*ABCB1* 遺伝子転写産物のスプライシング過程に着目して解析した結果、ADAR1-KD によって *ABCB1* の選択的スプライシングが誘導され、27 番目のイントロンが保持された状態の不安定な転写産物（mRNA）が産生することが明らかになった。さらに概日時計機構を同調した RPTECs では 27 番目のイントロンが保持された状態の転写産物の産生割合に時刻依存的な変動が認められた。27 番目のイントロンが保持された状態の転写産物はナンセンス変異依存 mRNA 分解機構（NMD）の標的となる不安定な転写産物であり、NMD の阻害により ADAR1-KD RPTECs での P-gp 発現量が増加したことから、P-gp 発現の概日リズムは *ABCB1* mRNA の成熟過程の時刻による変動に起因することが示唆された。

一方、ADAR1 は circHIPK3 という 1 本鎖の「環状 RNA」の産生制御を介して MRP4 のタンパク質発現にも影響を及ぼすことが明らかになった。環状 RNA は 1 本鎖のリング状 non-coding RNA で、back-splicing と呼ばれる特殊な splicing で生成され、microRNA を吸着して翻訳抑制活性を阻害する「スポンジ」として機能するが［10］、ADAR1 はその編集活性によって circHIPK3 の産生時の back-splicing を抑制し、そのスポンジを阻害することが明らかになった。また、circHIPK3 は MRP4 の翻訳制御に関わる microRNA miR-381-3 との相補配列を有していた。このことから、ADAR1-KD の RPTECs で認められた MRP4 の発現上昇は「ADAR1 の活性低下 → circHIPK3 の産生増加 → microRNA（miR-381-3）の吸着 → MRP4 の翻訳効率上昇」のスキームで生じていることが示唆された。

4. ADAR1 の概日リズムと薬物輸送トランスポーター発現制御の時刻変動解析

概日時計機構を再構築した RPTECs において、P-gp の発現は ADAR1 のリズムによって時刻依存的に変動したが、同細胞で MRP4 の発現には概日リズムが認められなかった。環状 RNA は 5'および 3'末端を有しない環状構造であれることから、生体内ではエンドヌクレアーゼなどによる分解を受けずに安定的に存在することが指摘されている。実際に、概日時計機構を再構築した RPTECs において、circHIPK3 の含量には時刻による変動は認められなかった。このことから、ADAR1 の RNA 編集活性が概日変動を示しても、circHIPK3 の安定性がその変動を打ち消し、MRP4 の発現に時刻による変動が生じなかったと考えられた。これらの所見は、腎臓からの薬物排泄における投薬時刻の違いによる差異についての新たなメカニズムを示唆するものであり、ADAR1 は時計遺伝子とは異なる機構で薬効の効果や体内動態に関わる分子の発現や概日リズムを制御していることが明らかになった。

謝　辞

本研究の遂行に関しては、九州大学大学院医学研究院附属ヒト疾患モデルセンター教育・研究支援センターから技術的なサポートを頂きました。

文　献

1) Brancaccio M, Enoki R, Mazuski CN, Jones J, Evans JA, Azzi A. Network-mediated encoding of circadian time: the suprachiasmatic nucleus (SCN) from genes to neurons to circuits, and back. J Neurosci. 2014 Nov 12; 34(46):15192-9. PMID: 25392488 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3233-14.2014.

2) Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. Cell. 1998 Jun 12;93(6):929-37. PMID: 9635423 DOI:10.1016/s0092-8674(00)81199-x.

3) Dallmann R, Okyar A, Lévi F. Dosing-time makes the poison: Circadian regulation and pharmacotherapy. Trends Mol Med. 2016 May;22(5):430-445. PMID: 27066876 DOI:10.1016/j.molmed.2016.03.004.

4) Patterson JB, Samuel CE. Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. Mol Cell Biol. 1995 Oct;15(10):5376-88. PMID: 7565688 DOI:110.1128/MCB.15.10.5376.

5) Nigita G, Veneziano D, Ferro A. A-to-I RNA editing: current knowledge sources and computational approaches with special emphasis on non-coding rna molecules. Front Bioeng Biotechnol. 2015 Mar 25;3:37. PMID: 25859542 DOI:10.3389/fbioe.2015.00037.

6) Terajima H, Yoshitane H, Ozaki H, Suzuki Y, Shimba S, Kuroda S, Iwasaki W, Fukada Y. ADARB1 catalyzes circadian A-to-I editing and regulates RNA rhythm. Nat Genet. 2017 Jan;49(1):146-151. PMID: 27893733 DOI:10.1038/ng.3731.

7) Omata Y, Yamauchi T, Tsuruta A, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. RNA editing enzyme ADAR1 governs the circadian expression of P-glycoprotein in human renal cells by regulating alternative splicing of the ABCB1 gene. J Biol Chem. 2021 Jan-Jun;296:100601. PMID: 33781748 DOI:10.1016/j.jbc.2021.100601.

8) Omata Y, Okawa M, Haraguchi M, Tsuruta A, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. RNA editing enzyme ADAR1 controls miR-381-3p-mediated expression of multidrug resistance protein MRP4 via regulation of circRNA in human renal cells. J Biol Chem. 2022 Aug;298(8):102184. PMID: 35753353 DOI:10.1016/j.jbc.2022.102184.

9) Eggington JM, Greene T, Bass BL. Predicting sites of ADAR editing in double-stranded RNA. Nat Commun. 2011;2:319. PMID: 21587236 DOI:10.1038/ncomms1324.
10) Yang L, Wilusz JE, Chen LL. Biogenesis and Regulatory Roles of Circular RNAs. Annu Rev Cell Dev Biol. 2022 Oct 6;38:263-289. PMID: 35609906 DOI:10.1146/annurev-cellbio-120420-125117.