JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	人為的RNA Editingを利用した遺伝コード修復法の開発
Author(s)	塚原，俊文
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書: 1-5
Issue Date	2016-06-01
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/13690
Rights	
Description	挑戦的萌芽研究，研究期間：2014～2015，課題番号：26670167，研究者番号：60207339，研究分野：生化学・分子生物学

Japan Advanced Institute of Science and Technology

様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 １ 日現在

機関番号：１３３０２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2015
課題番号：２６６７０１６７

研究課題名（和文）人為的RNA Editingを利用した遺伝コード修復法の開発

研究課題名（英文）Development of genetic code restoration by using artificial RNA editing

研究代表者
塚原　俊文（TSUKAHARA, Toshifumi）

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号：６０２０７３３９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：　RNA editing機構を模倣して細胞内で人為的かつ部位特異的な塩基の脱アミノ化を誘導するため、ADAR1の活性中心部位とguide RNAをMS2システムを介して結合させた。レポーター遺伝子として、EGFPのNonsense変異体を使用した。これら3つの遺伝子をHEK293細胞に導入し、酵素-RNA複合体を作成させたところ、変異EGFP mRNAが細胞内で修復され、緑色蛍光を発する細胞が観察された。RNAの変異修復は、RT-PCR後にRFLPとsequencingによって確認した。また、ADAR ファミリーのアイソフォームで脱アミノ化による修復効率の相違も調べた。

研究成果の概要（英文）：　To imitate RNA editing system for artificial and site-specific deamination of nucleic acid toward base-substitutions in vivo, we connected the active domain of ADAR1 with a guide RNA by using MS2 system. The nonsense mutated EGFP was used as a reporter gene. These 3 genes were transiently transfected into HEK293 cells at once. We observed green fluorescent cells in which parts of mutated EGFP mRNAs were restored in vivo. The genetic code restoration was confirmed by RT-PCR-RFLP and sequencing, respectively. We also compared efficiencies of RNA restorations by the site-specific deamination among ADAR family isoforms.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：Deaminase　RNA editing　MS2　活性ドメイン　guide RNA　遺伝子修復

１．研究開始当初の背景

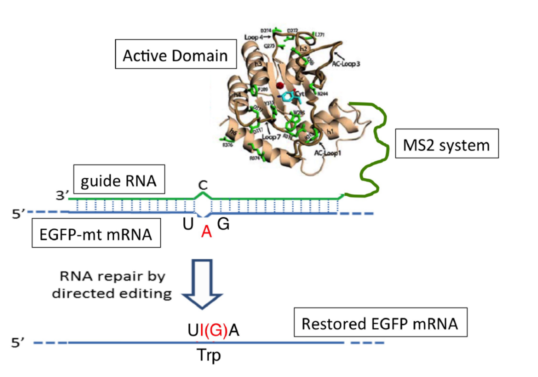
疾患の治療を RNA の転写後修飾によって行おうという試みがこれまでに多くなされてきた。例えば、トランススプライシングを利用した方法（Phylactou LA, *et al*. ***Nat Genet***. 18, 378-381, 1998)、エクソンスキップによって壊れたリーディングフレームを修復する方法（Kapsa R, *et al*. ***Lancet Neurol***. 2, 299-310, 2003)、アデノシンデアミナーゼによる変異修復法（Woolf TM, *et al*. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 92, 8298-8302, 1995）などである。しかしながらいずれの研究も未だ初歩的段階に留まっており、哺乳動物での変異修復治療は実現できていない。一方、低分子核酸による RNA 分子を標的とした疾患治療法としては、RNA 干渉やエクソンスキップの誘導を利用したものがあるが、前者は発現している遺伝子を抑制するもので、遺伝子変異を原因とする疾患には効果がない。また後者も、エクソンを強制的にスキップさせてリーディングフレームを修復するというもので、欠失させるエクソンが重要なドメインをコードしている場合には利用できない。一方、トリプルヘリックス鎖形成を介して核酸鎖を外来の DNA 鎖と組換えて修復するという試みも報告されているが（Chin JY. *et al*. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 105, 13514-13519, 2008)、現状では *in vitro* での組換え効率は 1%に遠く及ばず、実用化にはほど遠いのが現状である。

本研究のアイデアの源泉となった研究はデアミナーゼと RNA のコンジュゲートを介した RNA editing による変異修復法（Stafforst T & Schneider MS. ***Angewandte Chem***, 51, 11166-11169, 2012）である。この方法ではコンジュゲートの細胞内導入法に問題があった。私は細胞内 RNA の可視化に利用させる MS2 システムを利用すれば遺伝子の形で細胞に導入できると考え、本研究に取り組むこととした。MS2 システムは RNA ウイルスである MS2 のコートタンパク質がウイルスゲノム RNA の繰り返し配列に非常に強く結合することを利用し、細胞内 RNA の可視化やプルダウンに用いられるシステムである。理論的には一度結合した MS2 の RNA-タンパク質複合体は離れずに細胞内に存在する。このシステムを利用し、脱アミノ化酵素の触媒部位と標的 RNA に相補的な guide RNA を細胞内で結合させれば、Stafforst と Schneider と同様の効果（即ち塩基の部位特異的脱アミノ化）が期待できる。この方法は、細胞に２つの遺伝子を導入することによって変異 RNA の修復が可能であり、Stafforst と Schneider の方法に比べて大きな利点がある。

２．研究の目的

本研究は変異した RNA の遺伝コードを細胞内で人為的に修復して治療しようとする試みで、全く新しい遺伝性疾患治療法を提唱することを目的としている。

RNA editing はゲノム情報を読みとって合成された RNA を塩基配列特異的に脱アミノ化して遺伝子情報を変換する機構である。アデノシン(A)を脱アミノ化するとイノシン(I)となり、シチジン(C)を脱アミノ化するとウリジン(U)となる。I の相補的塩基は C であるため、遺伝情報上はグアノシン(G)と同義である。従って、この反応を利用して G→A 変異あるいは T→C 変異した変異ヌクレオチドを脱アミノ化する事ができれば、遺伝子を野生型に戻すことが可能となる。



① **Schematic representation of the RNA restoration.**

ADAR ファミリーの活性中心部位をクローニングし、MS2-RNA 結合部位との融合タンパク質を調製する。一方、ターゲット RNA に相補的な guide RNA は MS2-loop RNA と融合 RNA とする。両者を導入すれば細胞内で MS2 システムを介して酵素-RNA 複合体が形成され、ターゲット RNA の脱アミノ化を触媒し、変異を修復することができる。

生体内の RNA エディティング機構では、Adenosine Deaminase acting on RNA (ADAR) がターゲット RNA に相補的な guide RNA と共に作用して部位特異的な A の脱アミノ化を実現している。実際、Stafforst と Schneider は ADAR1 の触媒部位と guide RNA の化学的コンジュゲートによってアデノシンの人為的な部位特異的脱アミノ化に成功している。しかしながらこの方法は持続的投与が必要となる。そこで私は、細胞内 RNA の可視化に利用される MS2 のシステムを用いることとした。ターゲット部位に相補的な guide RNA の末端に MS2 ゲノム由来配列を結合し、一方では脱アミノ化酵素の触媒部位に MS2 コートタンパク質を融合させて共に細胞内で発現させれば、細胞内での恒常的な人為的で部位特異的な塩基の脱アミノ化が可能である。

３．研究の方法

(1) 標的 RNA モデル実験系の構築

蛍光タンパク質である EGFP 遺伝子の 58 番目のコドン TGG (W)を TGA(Stop)に変異させた。このクローンはナンセンス変異であるため、タンパク質は合成されないが、A が脱アミノ化すれば I となり、UGG と同義であるため蛍光タンパク質が合成できる。

(2)　MS2 コートタンパク質-脱アミノ化酵素触媒部位の融合タンパク質の構築

RNA の脱アミノ化を触媒する酵素、ADAR1 および 2 の触媒部位を PCR で増幅してクローン化し、MS2 コートタンパク質との融合タンパク質を構築した。

(3)　モデル実験系を標的とする MS2 ゲノム-guide RNA の融合遺伝子の構築

変異させた EGFP 遺伝子の変異点の A の前後 10 塩基程度に相補的に結合する guide RNA配列をデザインしてDNA合成した。なお、guide RNA では標的 A には相補的でない C が一般に使用されているため、T ではなく C を用いた。MS2 のゲノム繰り返し配列を guide RNA 前あるいは後ろに挿入した融合遺伝子を構築した。

(4)　*in vitro* での遺伝コード修復の研究

上記の(1)、(2)および(3)で構築した遺伝子を用いて *in vitro* で部位特異的脱アミノ化の評価を行った。(2)は転写後に翻訳しタンパク質とした。(3)の転写した RNA を(2)のタンパク質と合わせて人工的な guide RNA-脱アミノ化酵素とした。(1)を転写した mRNA にこの guide RNA-人工酵素複合体を作用させ、部位特異的な A の脱アミノ化を誘起した。処理後の mRNA を *in vitro* 翻訳し、緑色の蛍光が観察して A→I 変異、即ち遺伝コードの修復を確認した。

(5)　細胞内での遺伝コード修復の研究

前述の要領で *in vitro* での人為的部位特異的脱アミノ化に有効な人工酵素複合体クローンを用いて、次に細胞内での遺伝コード修復に関する研究を行った。(1)で作成した変異 EGFP 遺伝子をレポーターとして用い、同時に人工酵素複合体の構成要素である 2 つの遺伝子を HEK293 細胞に導入して蛍光の回復を観察した。蛍光が観察された実験群の細胞から RNA を単離し、逆転写後に RFLP やシークエンシングによって塩基置換の確認も行い、細胞内で遺伝コードが修復されていることを分子レベルでも実証した。

ADAR では guide RNA が相補鎖を作り、相補鎖中央のミスアニール部位の A が脱アミノ化される。様々な脱アミノ化酵素の触媒部位と guide RNA を組み合わせて人工脱アミノ化酵素複合体の創成を行い、それぞれの人工脱アミノ化酵素複合体の遺伝コード修復効率を比較することで、より効率の良い人工脱アミノ化酵素複合体の創成が可能である。

４．研究成果

人工酵素複合体による細胞内 RNA 修復

ADAR ファミリーにはアデノシンのデアミナーゼ活性を有する ADAR1 および 2 が存在する。この内、ADAR2 には選択的 splicing により long isoform と short isoform が存在し、さらに配列内に Alu 配列が挿入された isoform も存在した。これら isoform の活性中心部位と、これらを細胞内で guide RNA と結合させるための MS2 システムを構築した。デアミナーゼ活性中心-MS2 ペプチド及び guide RNA-MS2 stem-loop RNA の細胞内発現プラスミドを作成し、細胞に導入して両者が結合し、複合体を形成することを確認した。また、guide RNA-MS2 stem-loop RNA では、guide RNA を stem-loop の上流に挿入したプラスミドと下流に挿入したプラスミドの両方を準備した。

レポーター遺伝子として構築した前述の(1)ナンセンス変異を導入した EGFP プラスミド、人工酵素複合体を形成する(2)デアミナーゼ活性中心、(3)guide RNA を共に HEK293 細胞に導入した。すると、変異 EGFP mRNA が細胞内で編集（修復）され、緑色蛍光を発する細胞が蛍光顕微鏡で観察された。

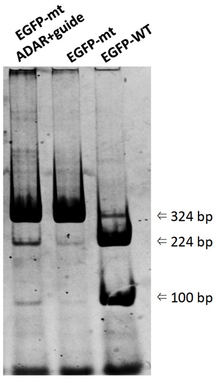
① Result of the RNA restoration experiment.

HEK293 細胞に ADAR1 活性中心、guide RNA およびナンセンス変異を導入した EGFP を同時に導入した。MS2-RNA を持たない guide RNA では蛍光がほとんど検出されないのに比べ、MS2-RNA を有する guide RNA を導入した細胞では緑色蛍光陽性の細胞が検出された。これは、細胞内で MS2 を介して人工酵素複合体が形成され、EGFP mRNA の変異 A が脱アミノ化されて遺伝コードが修復されたことを示唆する。

RNA の変異修復の確認

RNA の変異修復は、RT-PCR 後に RFLP と増幅断片をクローニング後の sequencing によって確認した。

上述の試料より RNA を単離し、逆転写 PCR によって増幅後、制限酵素 *Hae*III によって RFLP を行った。RNA が変異修復され、CCCUGGCCC となれば切断されるが、変異 RNA の配列である CCCUAGCCC は切断できない。右図②の様に、RNA 修復処理後の試料では切断された 224bp および 100bp

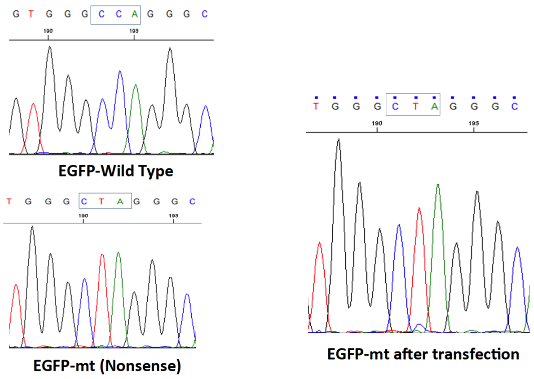


② Result of RT-PCR-RFLP after the RNA restoration.

RNA 修復を行った細胞から RNA を抽出し、*Hae*III による RT-PCR-RFLP を行った。野生型 EGFP と同様のバンドが確認され、変異の修復が示唆された。

のバンドが検出され、RNA の変異修復が確認された。

変異修復はシークエンシングによっても確認した。下図③に示した様に、変異点の A は人工酵素複合体プラスミドの導入によって、わずかながら C のピークを生じており、UAG→UGG と修復されていることが示された。



③ Result of sequencing after the RNA restoration.

上述の細胞から単離した RNA の RT-PCR 産物の配列を sequencing によって確認した。人工酵素複合体を導入した細胞では、変異 EGFP の相補鎖の CTA 配列の A のピークに小さいが C のピークが重なっており、変異 EGFP mRNA の一部が野生型の配列に修復されたことを示している。

ADAR ファミリーの脱アミノ化活性比較

前述した様に、ADAR ファミリーには様々なアイソフォームが存在している。それぞれの活性ドメインを単離し、その RNA 修復活性を比較したところ、ADAR1 ＞ ADAR2-long (-Alu) ＞ ADAR-long(+Alu) ＞ ADAR2-short の順に変異修復が確認された。

まとめ

本研究では、生体内の RNA editing 機構を模倣し、核酸塩基の脱アミノ化酵素 ADAR ファミリーの触媒部位とターゲット部位に相補的な guide RNA を細胞内に発現させ、酵素複合体の形成によって細胞内での人為的かつ部位特異的な塩基の脱アミノ化の実現を目指して研究を行った。脱アミノ化によって標的塩基を A→I あるいは C→U とすることができれば、結果として遺伝コードを修復することが可能であり、全く新しい遺伝性疾患の治療法となる。

ADAR1 の活性中心部位と、これらを細胞内で guide RNA と結合させるための MS2 システムを構築し、それらを HEK293 細胞に導入して細胞内でのデアミナーゼ-guide RNA 複合体の作成に成功した。レポーター遺伝子として EGFP にナンセンス変異を導入して、そのままでは蛍光を発しない変異体を作成し、上記のデアミナーゼ活性中心-MS2 ペプチド、MS2-guide RNA の発現プラスミドと共に HEK293 細胞に導入したところ、変異 EGFP mRNA が細胞内で脱アミノ化（編集＝修復）され、緑色蛍光を発する細胞が蛍光顕微鏡で観察された。RNA の変異修復は、RT-PCR 後に RFLP と増幅断片のシークエンシングによって確認した。いずれの結果も少なくとも一部の RNA では UAG 終止コドンが UGG へと修復され、EGFP タンパク質の合成が可能となっていることが示された。

また、ADAR ファミリーのアイソフォームによる脱アミノ化による修復効率についても検討した。これらアイソフォームの比較では、ADAR1 ＞ ADAR2-long(-Alu) ＞ ADAR-long(+Alu)＞ ADAR2-short の順に部位特異的脱アミノ化による RNA 修復が観察された。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 5 件）

1. Luyen, T Vu, Thanh KT Nguyen, Md Thoufic Anam Azad, <u>Hitoshi Suzuki</u>, <u>Toshifumi Tsukahara</u>; Chemical RNA Editing for Genetic Restoration: The Relationship between the Structure and Deamination Efficiency of Carboxyvinyl-deoxyuridine Oligodeoxynucleotides. *Chemical Biology & Drug Design*, **87**, (2016) 583-593. （査読有）

2. Luyen T Vu, Thanh TK Nguyen, Shafiul Alam, Takashi Sakamoto, Kenzo Fujimoto, <u>Hitoshi Suzuki</u> and <u>Toshifumi Tsukahara</u>; Changing Blue Fluorescent Protein to Green Fluorescent Protein Using Chemical RNA Editing as a Novel Strategy in Genetic Restoration. *Chemical Biology & Drug Design* **86**, (2015) 1242-1252. （査読有）

3. Shafiul Alam, Huong TT Phan, Mio Okazaki, Masahiro Takagi, Kozo Kawahara, <u>Toshifumi Tsukahara</u>, <u>Hitoshi Suzuki</u>; Computational extraction of a neural molecular network through alternative splicing. *BMC research notes* **7**,(**2014**)934. doi:10.1186/1756-0500-7-934. （査読有）

4. Shafiul Alam, <u>Hitoshi Suzukia</u>, <u>Toshifumi Tsukahara</u>; Alternative splicing regulation of APP exon 7 by RBFox proteins, *Neurochem International*, (2014) **78**, 7-17. （査読有）

5. <u>Hitoshi. Suzuki</u>, <u>Toshifumi Tsukahara</u>; A View of Pre-mRNA Splicing from RNase R Resistant RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, (2014), 9331-9342. （査読有）

〔学会発表〕（計０件）

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計１件）
名称：塩基置換手段をスクリーニングする方法
発明者：塚原俊文、藤本健造
権利者：国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学
種類：特許
番号：特願 2015-85414
出願年月日：2015 年 4 月 17 日
国内外の別： 国内

○取得状況（計０件）

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
塚原　俊文（TSUKAHARA TOSHIFUMI）
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授
研究者番号：60207339

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
舘野　賢（TATENO MASARU）
兵庫県立大学・院・生命理学研究科・教授
研究者番号：40291926

鈴木　仁（SUZUKI HITOSHI）
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・特任助教
研究者番号：00447690