

Title	遺伝子修復と遺伝子治療に向けたRNA編集用人工酵素システムの開発
Author(s)	Azad, Md. Thoufic Anam
Citation	
Issue Date	2018-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/15337
Rights	
Description	Supervisor:塚原 俊文, マテリアルサイエンス研究科, 博士

氏名	Md Thoufic Anam AZAD		
学位の種類	博士(マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 443 号		
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 23 日		
論文題目	Development of artificial enzymes system for RNA editing towards genetic restoration and gene therapy		
論文審査委員	主査 塚原 俊文	北陸先端科学技術大学院大学	教授
	芳坂 貴弘	同	教授
	藤本 健造	同	教授
	筒井 秀和	同	准教授
	堀家 慎一	金沢大学	准教授

論文の内容の要旨

Adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) family enzymes consist of double-stranded RNA binding domains (dsRBDs) and a deaminase domain (DD) that convert adenosine (A) into inosine (I) acting as guanosine (G) during translation. Site-directed RNA editing is an important technique for correcting gene sequences and ultimately tuning protein function.

In this study, I engineered the DD of adenosine deaminase acting on RNA (ADAR1) and the MS2 system to target specific adenosines, with the goal of correcting G-to-A mutations at the RNA level. For this purpose, the ADAR1-DD was fused downstream of the RNA-binding protein MS2, which has an affinity for the MS2 RNA. I checked the binding affinity of artificial enzyme system by Biacore™ X100. To direct editing to specific targets, I designed guide RNAs complementary to target RNAs. The guide RNAs directed the ADAR1 deaminase to the desired editing site, where it converted adenosine to inosine. To provide proof of principle, I used an allele of EGFP bearing a mutation at the 58th amino acid (TGG), encoding Trp, into an amber (TAG) or ochre (TAA) stop codon. In HEK-293 cells, this system could convert stop codons to read-through codons, thereby turning on fluorescence. I confirmed the specificity of editing at the DNA level by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and sequencing, and at the protein level by western blotting. The editing efficiency of this enzyme system was ~5%.

Further, I tried to compare the deaminase activity of ADAR1-DD and different isoforms of ADAR2-DD. The guide sequence was fused with MS2 stem-loop. As a target, mutated amber (TAG) stop codon at 58 amino acid (TGG) of EGFP was used. After transfection of the above three factors in HEK 293 cells, varying degree of the fluorescence signal was observed. Regarding ADAR2 isoforms, 120 bp consisting the Alu-cassette present in the middle of the DD. ADAR2-long without Alu-cassette showed much higher fluorescence signal than the ADAR2-long with Alu-cassette.

According to the I-TASSER (Iterative Threading Assembly Refinement) data, inserted Alu-cassette result longer coil in the middle of the deaminase domain. Due to insertion of the Alu-cassette, the distance between residues after 203 is increased dramatically. The ligand binding site i.e. nucleic acid binding capacity also largely differ due to the insertion of the Alu-cassette. Another isoform ADAR2-short which is approximately 81 bp shorter at C-terminal, the fluorescence signal was undetectable. A single amino acid substitution of ADAR2-long (E488Q) renders the enzyme more active than the wild types. The fluorescence microscopic image and fluorescence spectra analysis are suggesting that ADAR1-DD is more active than ADAR2-long-DD. In the result of Western blot and sequencing, I found that ADAR1-DD is the most active deaminase than any other DDs. To my knowledge, this is a complete biological approach for the comparative study of ADARs-DD that gives important information on the rational use of DD in the future application for therapeutic purposes.

Regarding guide length, 21 bp guide found more functional and regarding the position, upstream guide is more efficient. The editing efficiency can be increased approximately 16%. Double mutated ochre (TAA) stop codon can be converted to (TGG) with 5' adenosine preference. Off-target editing increase with the increase of efficiency to the targeted adenosine. I believe that this system could be used to treat genetic diseases resulting from G-to-A point mutations.

Keywords- ADARs, MS2 RNA, RNA editing, stop codon, genetic diseases.

論文審査の結果の要旨

遺伝子の変異によって様々な疾患が生じるが、特にナンセンス変異と呼ばれる、アミノ酸をコードするコドンから終止コドンへの変異は、変異点以降のタンパク質合成がストップするため、多くの疾患の原因となっている。本論文は生理的現象であるRNA編集の機構を利用して、ナンセンス変異したRNAの遺伝コードを細胞内で修復する方法に関する研究である。

RNA編集は転写後修飾の一種であり、同じ遺伝子からいくつかの異なるタンパク質を産生させるメカニズムで、ヌクレオチドの挿入、欠失、または置換によって遺伝コードを変換する。哺乳動物細胞では、Adenosine (A) およびCytosine (C) をInosine (I) およびUracil (U) に編集されるが、Iは塩基対形成によってGuanosine (G) と同等の役割を果たす。本論文ではAからIの編集を触媒する酵素であるAdenosine Deaminase Acting on RNA (ADARs)を利用した人工酵素で細胞内のRNA修復を試みた。

部位特異的にRNA上のG-to-A変異の修復を触媒する人工酵素開発のため、ADAR1 deaminase domainをMS2 systemを介して標的RNAに相補的なguide RNAと結合させた。

即ち、deaminase domainとMS2 coatタンパク質との融合タンパク質ベクターと、guide RNAとMS2 loop RNAを結合したベクターを構築した。これらを細胞に導入すると、細胞内でguide RNA-deaminase複合体が形成される。標的としては、EGFPの58番目のアミノ酸Trp (TGG) にナンセンス変異 (TAGおよびTAA) を導入した。HEK293細胞に上記の3種のベクターを導入したところ、いずれの終止変異の導入でも蛍光を発する細胞が観察され、変異の修復が示唆された。RNAの変異修復は制限断片長多型 (RFLP) および塩基配列決定によっても確認し、この人工酵素系での修復効率は約5%であった。さらに、ADAR1とADAR2のdeaminase活性を同様の実験系で比較した。ADAR2には選択的splicingとAlu配列の挿入によって複数のisoformが存在するが、塩基配列決定による定量的な解析によって、ADAR1>ADAR2-Alu-SDM>ADAR2-Alu>ADAR2+Alu-SDM>ADAR2+Alu>ADAR2Shortの順に部位特異的なRNA修復活性を有していた。また、guide RNAのデザインについても考察を行い、相補的塩基長が21塩基のguide RNAの修復効率が低いことも示した。

現在までのところ、修復効率は低いものの、この研究によって、RNAを修復するという全く新しい遺伝性疾患の治療法の可能性が拓かれ、これまで治療法の無かった多くの疾患への応用が期待できる。以上、本論文は、細胞内での人為的なRNA修復を触媒する人工酵素複合体について開発し、その疾患治療の可能性を示したものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士 (マテリアルサイエンス) の学位論文として十分価値あるものと認めた。