

Title	遺伝子修復と遺伝子治療のための人工RNA編集システムの改良
Author(s)	李, 嘉睿
Citation	
Issue Date	2023-06
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/18709
Rights	
Description	Supervisor:芳坂 貴弘, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	LI, Jiarui
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 570 号
学位授与年月日	令和 5 年 6 月 23 日
論文題目	Improvement of artificial RNA editing system for genetic restoration and gene therapy
論文審査委員	芳坂 貴弘 北陸先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科 教授 高村 禅 同 教授 筒井 秀和 同 准教授 大木 進野 同 ナノマテリアルテクノロジーセンター 教授 堀家 慎一 金沢大学 疾患モデル総合研究センター 准教授

論文の内容の要旨

The enzymes in the adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) family have a deaminase domain (DD) that converts adenosine (A) into inosine (I), which functions as guanosine (G) during translation. In diseases caused by point mutations in genes, an important method for correcting RNA sequences and ultimately fine-tuning protein function is the artificial site-directed RNA editing.

In this study, I attempted to extend the MS stem-loop RNA to bind DD and guide RNA for the purpose of the editing efficiency of the MS2-ADAR1 RNA editing system. But the replacement of 6 X MS2 stem-loop RNA with 12 X MS2 stem-loop RNA was not valid due to the distance between the antisense part and the stem-loop part. My colleagues have developed a guide RNA that inserts stem-loops on both side of the complementary sequence of the target RNA, so I tried to improve the editing efficiency base on the 1-1 stem-loop guide RNA system. I increased the number of stem-loop on both sides and changed the paired base of the target nucleotide. The results showed that when the number of stem-loop on both sides was the same, the system showed high editing efficiencies in all conditions. In case of the paired base, when the paired base was U, the editing efficiency of this system was higher than other bases. These improvements might be very useful for treating genetic diseases that result from the G to A point mutation.

Our lab also developed the MS2-APOBEC1 system for restoring the T to C point mutation. It was used the deaminase domain of APOBEC1 (apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1) linked to the MS2 coat protein to perform the C to T deamination. I replaced the APOBEC1 catalytic domain with full-length human APOBEC3A and APOBEC3G. However, I can't detect any fluorescent signal from the cells transfected with the original guide RNA and APOBEC3A or APOBEC3G. I referred the natural substrate of APOBEC3A and APOBEC3G, so I designed the loop guide RNA for inducing loop structure on the target RNAs. I designed six types of guide RNAs to induce different lengths of loops for comparing the editing efficiencies. In all guide RNA conditions, I found that the 14nt loop guide RNA transfected with MS2-APOBEC3A or MS2-APOBEC3G could induce higher RNA editing efficiencies. I also used the D317W mutation of APOBEC3G transfected with the loop guide RNA. Even the D317W mutated APOBEC3G showed sequence preference to 5'-TC, the editing efficiencies were increased slightly. However, I couldn't detect any fluorescent signals from the cells that were transfected by the loop guide RNA and MS2-APOBEC1 system. For the application of guide RNA, it needs further optimization for improving the editing efficiency of the MS2-APOBEC system.

The proper application of the developed artificial deaminase system for the treatment of patients who have G-to-A or T-to-C mutations could open a new era in the field of treatment of genetic diseases.

Keywords: artificial RNA editing, base deamination, ADAR1, APOBEC, MS2 RNA

論文審査の結果の要旨

様々な遺伝性疾患が DNA 中の 1 塩基の変異、いわゆる点変異によって生じるが、それらの多くの疾患に対する治療法は存在しないのが現状である。LI 氏らは人為的な RNA 編集技術を用いて患者細胞中に発現する変異した mRNA を修復することによって疾患を治療する方法の開発を行っており、これまでに ADAR1 を用いた A→I(G)変換あるいは APOBEC1 を用いた C→U 変換に成功しているが、その変換効率は低いものだった。そこで LI 氏はまず、ADAR1 を利用した人工 RNA 編集システムの改良を目指した。人工 RNA 編集システムでは、A を脱アミノ化する酵素である ADAR 1 の活性部位に標的 RNA の変異塩基を提示させるために、標的付近の塩基配列に相補的な RNA を MS2 フェージの RNA 結合タンパク質を利用している。すなわち、酵素活性部位は MS2 の RNA 結合タンパク質との融合タンパク質とし、一方で相補的 RNA は MS2 由来の RNA と結合させていた。この相補的 RNA の両端に MS2 の RNA を結合させると比較的高い RNA 編集効率が得られていたが、LI 氏は相補的 RNA の両側の MS2-stem loop RNA の数の適正化を試み、両側の stem loop の数が同じ場合に高い編集効率が得られることを示した。また、相補的 RNA 配列の標的塩基と対になる塩基についても検証し、A に対合する塩基が U の場合に他の塩基に比べて編集効率が低いことを明らかにした。従来、酵素に標的塩基を提示するためには塩基対を形成しない塩基が好ましいと考えられており、これらの発見は、G から A への点変異に起因する遺伝性疾患の治療に有用な知見と考えられる。

一方、U から C への点変異を修復するための人工 RNA 編集システムでは、これまでに MS2-RNA 結合タンパク質に APOBEC1 の脱アミノ化酵素活性部位を融合させて、C から U への脱アミノ化を実現させていたが、LI 氏は完全長のヒト APOBEC3A あるいは APOBEC3G を利用したシステムを考案・開発した。当初、APOBEC1 で用いた guide RNA では標的である GFP 遺伝子の U→C 変異によって蛍光色を青色に変換させた BFP mRNA の変異した C を U に編集することができず、緑色蛍光を検出できなかった。しかし、APOBEC3A や APOBEC3G は 2 本鎖 RNA より 1 本鎖 RNA を標的基質として好むという結果を参考に、標的の BFP mRNA に loop 構造を誘導するための loop guide RNA を設計して用いることで、青色から緑色への変換に成功した。Loop 長による編集効率を比較するため、loop 長の異なる 6 種類の guide RNA を調製して確認したところ、14nt の loop 長を持つ guide RNA が最も高い RNA 編集効率を示した。また、他の研究グループが報告した APOBEC3G の D317W 変異体についても調べたところ、同様に loop guide RNA を用いることで C→U 編集効率がわずかに向上した。一方、MS2-APOBEC1 系は loop guide RNA を用いた場合には C→U 編集活性を示さないことが判明した。

以上、本論文は、疾患治療を目指して人工 RNA 編集システムの高効率化を試みたものであり、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に価値あるものと認めた。