

平成 26 年度  
博士論文

核内 RNA ヘリケースによる  
A-to-I RNA エディティングの制御機構

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻鈴木研究室

岡田 俊平

指導教員 鈴木 勉

## [序論]

A-to-I RNA エディティング(以下、RNA エディティングとする)とは後生動物に広く見られる RNA 転写後プロセッシングの一つである。二本鎖 RNA 特異的脱アミノ化酵素である ADAR(Adenosine deaminase that acts on RNA)が核内で二本鎖 RNA を認識し

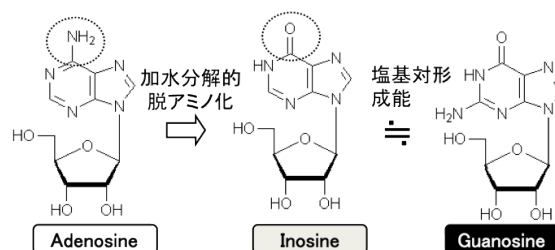


図 1 A-to-I RNA エディティングの反応機構

アデノシン(A)を脱アミノ化してイノシン(I)へと変換する(図 1) [1]。イノシンは化学構造上、グアノシン(G)と類似しているためシトシンと塩基対形成することが可能であり、mRNA のスプライシングや翻訳における暗号解読過程などにおいて I は G として認識される。その結果、RNA エディティングはしばしば選択的スプライシングやアミノ酸変化、miRNA ターゲット配列の編集などを引き起こすことが知られている[1]。ADAR ファミリータンパク質の 1 つである ADAR1 のノックアウトマウスは胚性致死となることが知られており、RNA エディティングは哺乳動物の発生の過程において重要な遺伝子発現調節に関与していると考えられる[2]。また近年、遺伝性対側性色素異常症(DSH)[3-5]やアイカルディ・ゴートイエ症候群(AGS)[6]と呼ばれる疾患患者から ADAR1 遺伝子に多数の病的変異が同定されており、ADAR1 による RNA エディティングの異常はこれらの疾患の発症機構と関連があると推測される。

哺乳動物の発生における A-to-I RNA エディティングの機能解明や疾患の発症機構の解析にはトランスクリプトームにおける精度の高い RNA エディティングの位置情報が必要である。従来の検出手法では I はシトシン(C)と塩基対を形成するため逆転写反応と PCR 反応を行うと I の位置は G に変換されることを利用して RNA の配列を解析した際にゲノムでは A の位置が RNA では A と G の混在が観察される場合、その位置の A を RNA エディティング部位と判定する。いくつかのグループはこの原理を Deep sequencing 技術に応用してゲノム DNA と RNA の配列の違いを網羅的に解析する手法(RNA-DNA differences, RDD)を確立し、ヒトのトランスクリプトームにおいて 6,000~23,000 箇所の RNA エディティング部位を報告している[7-9]。しかし、この手法では真のイノシンに由来する G と SNP、逆転写・PCR 反応やマッピングのエラーから生じる G と厳密に区別することが出来ないため多数の偽陽性を含む問題点が指摘されている[10-13]。そのような問題点を克服するために本研究室では生化学的にイノシン化部位を同定する技術(ICE 法:Inosine Chemical Erasing 法)を開発した[14, 15]。この手法ではアクリロニトリルと RNA を反応させ、I の N1 位を特異的にシアノエチル化修飾し、N<sup>1</sup>-シアノエチルイノシン(ceI)を生成する。ceI は逆転写反応時に cDNA の伸長を阻害するため、その後の PCR 反応時に I を含む RNA に由来する cDNA は増幅されない。従って RNA の配列を解析するとシアノエチル化修飾を行った場合、RNA エディティング部位の位置では I 由来の G の塩基が消失する。そしてトランスクリプ

トームにおける RNA エディティング部位の包括的な同定を行うために ICE 法をさらに Deep sequencing に応用した ICE-seq という手法を確立し、ヒト成人脳 RNA 中におけるイノシン化部位の網羅的探索を行った結果、約 1300 遺伝子の mRNA 上に約 20,000 箇所 of イノシン化部位を新規に同定し、既知部位と合わせると約 30,000 箇所 of RNA エディティング部位がヒトのトランスクリプトーム内に存在することを見出した[16] (発表論文 1, 2, 3)。その内訳を調べると 90% 以上がレトロトランスポゾンの SINE の一種である *Alu* 反復配列上に存在することが明らかになった。*Alu* 反復配列は 300 塩基ほどの長さを持ち、ヒトゲノムの約 11% を占め、霊長類の進化の過程で、転移増殖した結果、遺伝子間領域、イントロン、非翻訳領域(以下、UTR とする)への挿入が多く見られる。遺伝子領域に *Alu* 反復配列がセンス方向、アンチセンス方向で挿入されると RNA が転写された際に安定な長鎖の RNA 二次構造が形成され ADAR の基質として認識される。*Alu* 配列上におけるイノシン化部位はしばしば 20~50 箇所程度、密集した領域 (イノシンクラスター) を形成しており、このエディティングは主に ADAR1 によって修飾反応が行われているがイノシンクラスターの詳細な生成機構やその機能については未解明の部分が多く残されている。特にイノシンクラスターは mRNA の安定性、細胞内局在、翻訳制御に関わるシスエレメントが存在する mRNA 3'UTR に多く存在し、遺伝子発現調節への関与が推察される。従って、本研究では遺伝子発現調節への関与が期待される mRNA 3'UTR の *Alu* 配列上に形成されるイノシンクラスターに着目し、その詳細な生成機構の解明、ならびに細胞内での遺伝子発現において果たす機能の探求を目的とした。

## [本論]

### 第一章 核内における二本鎖 RNA の動的構造変化

当研究室の先行研究で *FOXRED2* の 3'UTR に存在する 2 つのセンス方向の *Alu* 配列(*Alu1*, *Alu2*) と 1 つアンチセンス方向の *Alu* 配列(*Alu3*) に多数のイノシン化部位が密集したクラスターが形成されていることを見出している。各イノシン化部位の修飾効率は様々で 10% から 90% の範囲に渡って観察される。これらの RNA エディティングの大部分は ADAR1 が責任酵素であることをヒト神経膠芽腫由来 A172 細胞におけるノックダウン実験により確認した。cDNA クローニングを用いた mRNA 1 分子ごとの解析を行うと 1037 分子の mRNA の解析の結果、*Alu1* と *Alu2* の領域の RNA エディティングパターンは 798 種類存在し、また mRNA 1 分子あたりのイノシン化部位の数も 0 個から 57 個まで様々で、mRNA 一分子におけるイノシン化部位の形成は多様性に富んでいることが分かった。また、RNA エディティングパターンをイノシンクラスターの存在で分類すると *Alu1* と 2 の両方にクラスターが生成(*Alu1* & 2, Type I)、*Alu1*、もしくは *Alu2* のいずれかにクラスターが生成(*Alu1* のみ、Type II; *Alu2* のみ、Type III)、イノシン無し(Type IV) の 4 つ

に分かれ、RNA の二次構造の組み方にいくつかのパターンが存在することが示唆された。これらの結果は同一遺伝子の mRNA であっても ADAR1 の認識効率や反応効率、二本鎖 RNA 形成における *Alu* 配列の組合せの違いにより RNA エディティングパターンの多様性が生み出されていることを示している。

さらに特にバリエーションの大部分の割合を占めていた Type I のパターンを生み出す RNA 二次構造について解析を行った。3'UTR と直前のイントロンに存在する *Alu* 配列の構成から考えると (1)*Alu1* と 3、*Alu2* と 3 の組合せで形成される 2 種類の RNA 二次構造が相互に組替わる場合と、(2)上流のイントロン内に存在するアンチセンス方向の *Alu* 配列(*Alu0*)を含めて *Alu0* と 1、2 と 3 の組合せで RNA 二次構造が形成される場合の 2 通りが Type I パターン生成に必要であると考えられた。そこで、イントロン内の *Alu* 配列(*Alu0*)を含まない FOXRED2 の 3'UTR をルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入したコンストラクトを作成し、A172 細胞へ導入してレポーター mRNA 上の RNA エディティングを解析した。*Alu1* と *Alu2* のシーケンス解析を行った結果、RNA エディティングが内在の mRNA と同様に起きていることが観察された。さらに、レポーター mRNA 一分子ごとの解析を行うと *Alu1* と *Alu2* の両方にイノシンクラスターが形成されている mRNA の存在が確認された(図 3b)。さらに、アンチセンス方向の *Alu3* を欠失させたコンストラクトを作成し培養細胞で発現させ、mRNA のシーケンス解析を行うと *Alu1*、2 における RNA エディティングは観察されなかったことから *Alu3* は *Alu1*、2 における RNA エディティングに必要な *Alu* 配列であると言える。以上の結果は *Alu1*、2 の両方でイノシンクラスターが生じるためには RNA 二次構造の組替えが起きていることを示しており、核内の mRNA プロセシングの過程で長鎖 RNA 二次構造において動的な構造変化が起きていることを意味している。

## 第二章 二本鎖 RNA 動的構造変化の制御因子の探索

*Alu* 配列の平均的長さは 300 nt であるため *Alu* 配列によって形成された二本鎖 RNA 構造は熱力学的に安定であると推測される。従って、細胞内に *Alu* 配列の二本鎖 RNA の構造変化を積極的に引き起こす因子の存在が示唆される。そのような因子の候補として RNA ヘリケースが考えられた。RNA ヘリケースとは ATP を加水分解して二本鎖 RNA を一本鎖 RNA に巻き戻す活性 (unwinding 活性)を持った蛋白質である。A172 細胞において核内に存在する RNA ヘリケースをノックダウンし、FOXRED2 3'UTR における 3 つの *Alu* 配列内に存在するイノシン化部位の修飾効率を測定した。その結果、3 つの *Alu* 配列内に存在するイノシン化部位の効率がコントロール siRNA を導入した時と比べて全体的に減少する傾向が観察された。ノックダウンした際の ADAR1 蛋白質、FOXRED2 mRNA 定常状態量を調べると変動は観察されなかった。さらに *Alu1*、2 を含む領域をクローニングし mRNA 1 分子ごとの RNA エディティングパターン解析を行った結果、RNA ヘリケースをノックダウンすると両方の *Alu* 配列で同時にイノシンクラスターが形

成されている Type I パターンが減少し、逆に片方の *Alu* 配列にのみクラスターが見られる Type II, Type III の割合の増加が観察された。この結果は RNA ヘリケースが *Alu* 配列による二本鎖 RNA の組替えに関与していることを示唆している。

### 第三章 RNA ヘリケースによる A-to-I RNA エディティング制御の分子機構

生化学的な解析から詳細な作用機構を明らかにするために ADAR1 と RNA ヘリケースの組換え蛋白質を取得し、RNA エディティングに対して RNA ヘリケースが果たす機能を *in vitro* で調べた。36bp の二本鎖 RNA をモデル基質とし、ADAR1 による *in vitro* RNA エディティング反応中に RNA ヘリケースを加えると濃度依存的に RNA エディティング効率の減少が観察された。また、RNA ヘリケースの濃度を一定にし、ATP を ADP や非加水分解型 ATP アナログに置換えて条件で反応を行い、エディティング効率を比較すると、ATP 存在下でのみエディティング効率の減少が観察された。さらに、unwinding assay を行うと RNA ヘリケース、ATP 存在下で基質二本鎖 RNA が unwinding されているのが観察された。以上の結果は RNA ヘリケースが ATPase 活性依存的に基質二本鎖 RNA を unwinding し、RNA エディティングを調節すること示している。従って細胞内で RNA ヘリケースは *Alu* 配列によって形成された二本鎖 RNA を unwinding することで動的構造変化を促進し、Type I のイノシンクラスターパターン形成に関与していることが示唆される。

### 第四章 A-to-I RNA エディティングによる miRNA 依存的翻訳制御の調節

多数のイノシンクラスターが観察される mRNA 3'UTR では miRNA と呼ばれる低分子の RNA が RISC を伴い 3'UTR の半相補的な配列を認識し、翻訳抑制が引き起こすことが知られている。アデノシンからイノシンへの編集により塩基対合が変化するため RNA エディティングにより miRNA による翻訳抑制を開始、もしくは解除することが報告されている[17, 18]。従って、当研究室で 3'UTR に同定した A-to-I RNA エディティング全体が miRNA の認識に与える影響の予測を情報科学的手法により行った。その結果、3'UTR の RNA エディティング領域内に 11,684 ペアの miRNA-ターゲット配列が予測され、RNA エディティングによって翻訳抑制が開始される組合せが 6,827 ペア、解除される組合せが 4,587 ペア存在することが予測された。この予測結果は 3'UTR における A-to-I RNA エディティングは遺伝子発現に大きな影響を及ぼす可能性を示唆している。

#### [結論と今後の展望]

本研究により、細胞内で *Alu* 配列による安定な長鎖二本鎖 RNA は RNA ヘリケースにより動的構造変化が促進され、1 分子の *FOXRED2* mRNA 内に存在する二つの *Alu* 配列

(*Alu1*, 2)において同時にイノシンクラスターが形成されることを見出した。以上の成果から核内RNAヘリケースによるA-to-I RNA エディティングの制御という新規概念を提唱することが出来た。しかし、現在のところRNAヘリケースが *unwinding* 活性を用いてRNA エディティングを制御することでどのような機能をもたらされるかについては明らかになっていない。第四章で述べたように3'UTRにおけるRNA エディティングはmiRNA 依存的翻訳抑制を調節する可能性が示唆されている。またイントロン内においてしばしば観察されるイノシンクラスターは異常な *Alu* 配列のエキソン化の防止[14]やcircular RNA[19]の生合成に関与していることが報告されている。従ってRNAヘリケースは3'UTR やイントロン内のイノシンクラスター形成を制御することによってこれらの遺伝子発現調節機構に関与していることが推測される。RNAヘリケースによるA-to-I RNA エディティングの制御が果たす機能の全容解明にはまずRNAヘリケースによって制御されるRNA エディティング部位をDeep sequencingを用いて網羅的に解析することが求められる。今後、RNAヘリケースによって制御されるイノシン化部位が網羅的に同定されて機能解析が進むことによりRNAヘリケースによってA-to-I RNA エディティングが制御されることの生物学的意義や生理的機能の全体像が明らかになることを期待したい。

#### [発表論文]

1. **Okada S.**, Sakurai M., Ueda H., Suzuki T.  
**Biochemical and transcriptome-wide identification of A-to-I RNA editing by ICE-seq**  
*Methods in Enzymology*, vol.560 (in press).
2. Suzuki T, Ueda H., **Okada S.**, Sakurai M.  
**Transcriptome-wide identification of adenosine-inosine editing using ICE-seq method**  
*Nature Protocols* vol.10, pp.715-732, 2015.
3. Sakurai M., Ueda H., Yano T., **Okada S.**, Terajima H., Mitsuyama T., Toyoda A., Fujiyama A., Kawabata H., Suzuki T.  
**A biochemical landscape of A-to-I RNA editing in the human brain transcriptome.**  
*Genome Research*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol.24, pp.522-534, 2014.

## [参考文献]

1. Nishikura, K., *Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 321-49.
2. Wang, Q., et al., *Stress-induced apoptosis associated with null mutation of ADAR1 RNA editing deaminase gene*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4952-61.
3. Tojo, K., et al., *Dystonia, mental deterioration, and dyschromatosis symmetrica hereditaria in a family with ADAR1 mutation*. Mov Disord, 2006. **21**(9): p. 1510-3.
4. Miyamura, Y., et al., *Mutations of the RNA-specific adenosine deaminase gene (DSRAD) are involved in dyschromatosis symmetrica hereditaria*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(3): p. 693-9.
5. Hayashi, M. and T. Suzuki, *Dyschromatosis symmetrica hereditaria*. J Dermatol, 2013. **40**(5): p. 336-43.
6. Rice, G.I., et al., *Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutieres syndrome associated with a type I interferon signature*. Nat Genet, 2012. **44**(11): p. 1243-8.
7. Li, M., et al., *Widespread RNA and DNA sequence differences in the human transcriptome*. Science, 2011. **333**(6038): p. 53-8.
8. Bahn, J.H., et al., *Accurate identification of A-to-I RNA editing in human by transcriptome sequencing*. Genome Res, 2012. **22**(1): p. 142-50.
9. Peng, Z., et al., *Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(3): p. 253-60.
10. Kleinman, C.L. and J. Majewski, *Comment on "Widespread RNA and DNA sequence differences in the human transcriptome"*. Science, 2012. **335**(6074): p. 1302; author reply 1302.
11. Lin, W., et al., *Comment on "Widespread RNA and DNA sequence differences in the human transcriptome"*. Science, 2012. **335**(6074): p. 1302; author reply 1302.
12. Pickrell, J.K., Y. Gilad, and J.K. Pritchard, *Comment on "Widespread RNA and DNA sequence differences in the human transcriptome"*. Science, 2012. **335**(6074): p. 1302; author reply 1302.
13. Piskol, R., et al., *Lack of evidence for existence of noncanonical RNA editing*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(1): p. 19-20.
14. Sakurai, M., et al., *Inosine cyanoethylation identifies A-to-I RNA editing sites in the human transcriptome*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(10): p. 733-40.
15. Sakurai, M. and T. Suzuki, *Biochemical identification of A-to-I RNA editing sites by the*

- inosine chemical erasing (ICE) method*. *Methods Mol Biol*, 2011. **718**: p. 89-99.
16. Sakurai, M., et al., *A biochemical landscape of A-to-I RNA editing in the human brain transcriptome*. *Genome Res*, 2014. **24**(3): p. 522-34.
  17. Wang, Q., et al., *ADAR1 regulates ARHGAP26 gene expression through RNA editing by disrupting miR-30b-3p and miR-573 binding*. *RNA*, 2013. **19**(11): p. 1525-36.
  18. Borchert, G.M., et al., *Adenosine deamination in human transcripts generates novel microRNA binding sites*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(24): p. 4801-7.
  19. Ivanov, A., et al., *Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals*. *Cell Rep*, 2015. **10**(2): p. 170-7.