

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 岡田 俊平

[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 転写後プロセスの一つである。二本鎖 RNA 特異的脱アミノ化酵素である

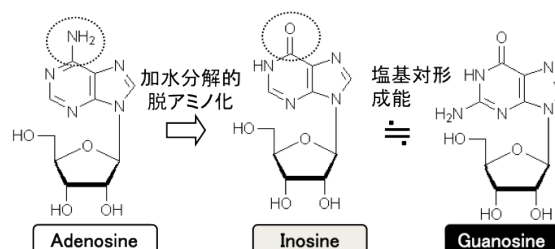


図 1 A-to-I RNA エディティングの反応機構

ADAR(Adenosine deaminase that acts on

RNA)が核内で二本鎖 RNA を認識しアデノシン(A)を脱アミノ化してイノシン(I)へと変換する(図1)。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。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。また近年、遺伝性対側性色素異常症(DSH)やアイカルディ・ゴーティエ症候群(AGS)と呼ばれる疾患患者からADAR1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DSH、AGSの発症機構と何らかの関連があると推測される。

当研究室ではこれまでに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、ヒト成人脳におけるイノシン化部位の網羅的探索を行った。その結果、約1300遺伝子のmRNA上に新規に約20,000箇所のイノシン化部位を同定した。その内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ていると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その詳細な機能については未知な部分が多い。

本研究では 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 に着目し、*Alu* 配列上でのイノシンクラスター形成機構の解明、ならびに遺伝子発現において果たす役割の解明を目的とした。

[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*, Type II; *Alu2*, Type III)、イノシン無し (None, 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の mRNA であっても ADAR1 の認識機構や反応効率、*Alu* 配列の塩基対合の組合せによって mRNA におけるイノシン化部位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* 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 種類の二本鎖 RNA 構造が相互に組変わる場合と、(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。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)。この結果は *Alu1*、2 の両方でイノシンクラスターが生じるためには RNA 二次構造の組換えが起きていることを示しており、核内の mRNA プロセッシングの過程で一旦形成された長い二本鎖構

造がエディティングされたのちに解け、再び別の領域と二本鎖形成す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* 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、細胞内には *Alu* 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 を加水分解した際のエネルギーを利用して二本鎖 RNA を巻き戻し、一本鎖 RNA にする活性(unwinding 活性)を持った蛋白質である。ADAR1 は核内で UPF1、RHA と呼ばれる RNA ヘリケースと相互作用することが報告されている。A172 細胞において UPF1、RHA 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 RNA エディティング効率を測定した。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の 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。UPF1 に関してはノックダウン時の変動が UPF1 の既知の機能である Nonsense-Mediated mRNA Decay(NMD)とは独立した現象であることを確認した。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、UPF1、RHA 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 UPF1 と RHA の RNA ヘリケースが *Alu* 配列による二本鎖 RNA の組換えに関与していることを示唆している。

第三章 UPF1 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 UPF1 の組換え蛋白質を取得し、RNA エディティングに対して UPF1 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 UPF1 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 UPF1、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 UPF1 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 UPF1 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参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。アデノシンが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。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 は動的構造変化を受け、さらにその構造変化は核内に存在する UPF1 によって引き起こされることによって 1 分子の *FOXRED2* mRNA 内の *Alu1*, 2 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に至ることが出来た。しかし、現在のところ UPF1 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* のエキソン化の防止や circular RNA の生合成に参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参与していることが推測される。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必要がある。今後は、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、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生物学的意義や生理的機能が解明されることを期待したい。