

# HTR2C pre-mRNA の RNA 編集における RNA 編集酵素 ADAR2 の二本鎖 RNA 結合ドメインの役割

福田 将虎\*・西垂水 梓・緒方 悠岐・野瀬 可那子

(令和 5 年 5 月 15 日受理)

## Role of the double-stranded RNA-binding domain of the RNA-editing enzyme ADAR2 in RNA editing of HTR2C pre-mRNA

Masatora FUKUDA\*, Azusa NISHITARUMIZU, Yuki OGATA and Kanako NOSE

(Received May 15, 2023)

### Abstract

A-to-I RNA editing is a post-transcriptional modification in which specific adenosines (A) on RNA are substituted to inosines (I). The enzyme responsible for A-to-I RNA editing is the adenosine deaminases acting on RNA (ADARs), which consists of a deaminase domain (DD) and multiple double-stranded RNA binding domains (dsRBDs). HTR2C pre-mRNA has five RNA editing sites (A-E sites) within exon 5 corresponding to the second intracellular loop region, and this editing regulates key signaling in the brain through regulation of serotonin signaling. Although the RNA structure around the five editing sites of HTR2C pre-mRNA has been shown to affect the editing efficiency of those editing sites, the detailed RNA editing mechanism of ADAR have been still unclear. As an information on its molecular mechanism, we focused on the role of ADAR2 dsRBDs for RNA editing in the HTR2C pre-mRNA. In this study, *in vitro* editing analysis with dsRBD mutant ADAR2, which lacks the dsRNA-binding affinity of dsRBD, were performed against various modified HTR2C RNAs to reveal the effect of dsRBD binding to editing in each editing sites on HTR2C-pre mRNA. As a result, it was shown that the binding activity of dsRBD2 is essential for the editing activity of ADAR2, and that the effect of dsRBD1 differs depending on the editing site. Finally, we predicted dsRBD binding sites on HTR2C pre-mRNA based on editing efficiency results from editing analyzes using mutants of ADAR2 and HTR2C RNA.

**Keywords:** RNA editing, ADAR, double-stranded RNA binding domain, substrate recognition

### 1. 研究背景

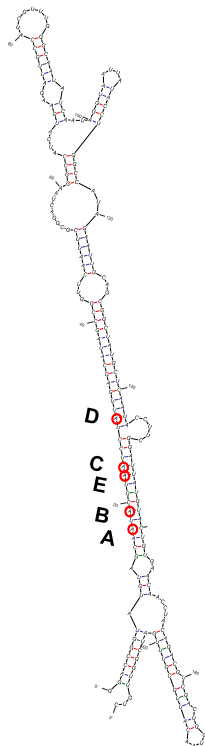
A-to-I RNA 編集は、RNA 上の特定アデノシン (A) がイノシン (I) に置換される転写後修飾の一つである [1-3]。mRNA 上で生じた I は、タンパク質翻訳においてグアノシン (G) として認識されるため、A-to-I RNA 編集により RNA レベルで遺伝情報が変換される。A-to-I RNA 編集機構は、ほぼ全ての高等生物に存在しており、ヒト生体内ではおよそ 300 万以上の RNA 編集部位がこれまでに同定されている [4]。A-to-I RNA 編集を担う酵素は、二本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミナーゼ (ADAR) であり、ヒト生体内では、ADAR1p110, ADAR1p150, ADAR2 の 3 種類のアリソフォームがある [5]。ADAR は、デアミナーゼ

ドメイン (DD) と複数の二本鎖 RNA 結合ドメイン (dsRBD) で構成されており、長い二本鎖 RNA 構造の中に位置する A を効率的に編集する。

G タンパク質共役型受容体であるセロトニン 2C 型受容体 (HTR2C) は、セロトニンとの結合により活性化し、G タンパク質を介したホスホリパーゼ C の活性化を通して、細胞内にシグナルを伝達する [6]。HTR2C の mRNA 前駆体 (HTR2C pre-mRNA) は、第 2 細胞内ループ領域に相当するエクソン 5 内に 5 カ所の RNA 編集部位 (A-E 部位) が存在する (Fig. 1)。この 5 カ所すべてが編集された mRNA から生じる VGV 型は、すべてが未編集の INI 型と比べて G タンパク質との結合効率が低下する [7]。また、HTR2C pre-mRNA の RNA 編集異常は、統合失調症などの精

神疾患やストレスと関連することも示唆されている [8]. さらに, HTR2C ノックアウトマウスが過食により肥満になることから, HTR2C pre-mRNA の RNA 編集は, エネルギー代謝の調節にも関与していることが示唆されている [9]. このように A-to-I RNA 編集は, アミノ酸コドン変換を通して HTR2C のシグナル伝達能を制御し, さまざまな生理機能の調節を行っている.

HTR2C pre-mRNA の 5 カ所の RNA 編集部位については, ADAR1 が主に A 部位, B 部位を, ADAR2 が D 部位を効率的に編集する. C 部位は ADAR1, ADAR2 どちらのアイソフォームにも編集される [10]. 生体内では ADARs の発現量の違いにより, この 5 カ所の編集部位の特徴的な RNA 編集パターンを形成することで, シグナル伝達を制御していると考えられている. したがって, この HTR2C pre-mRNA の RNA 編集パターンの形成機構は, HTR2C を介したシグナル伝達制御の理解において非常に重要である. これまで本研究室では, 5 カ所の RNA 編集部位の編集効率, ADAR の発現量のみならず, 編集部位周辺の RNA 構造に影響を受けることを報告した [11]. しかしながら, ADAR と HTR2C pre-mRNA の詳細な結合様式を含めこれらの RNA 編集の詳細な分子メカニズムは未だ明らかにされていない. そこで本研究は, ADAR2 による HTR2C pre-mRNA の RNA 編集における dsRBD の二本鎖 RNA 結合活性の役割を明らかにすることを目



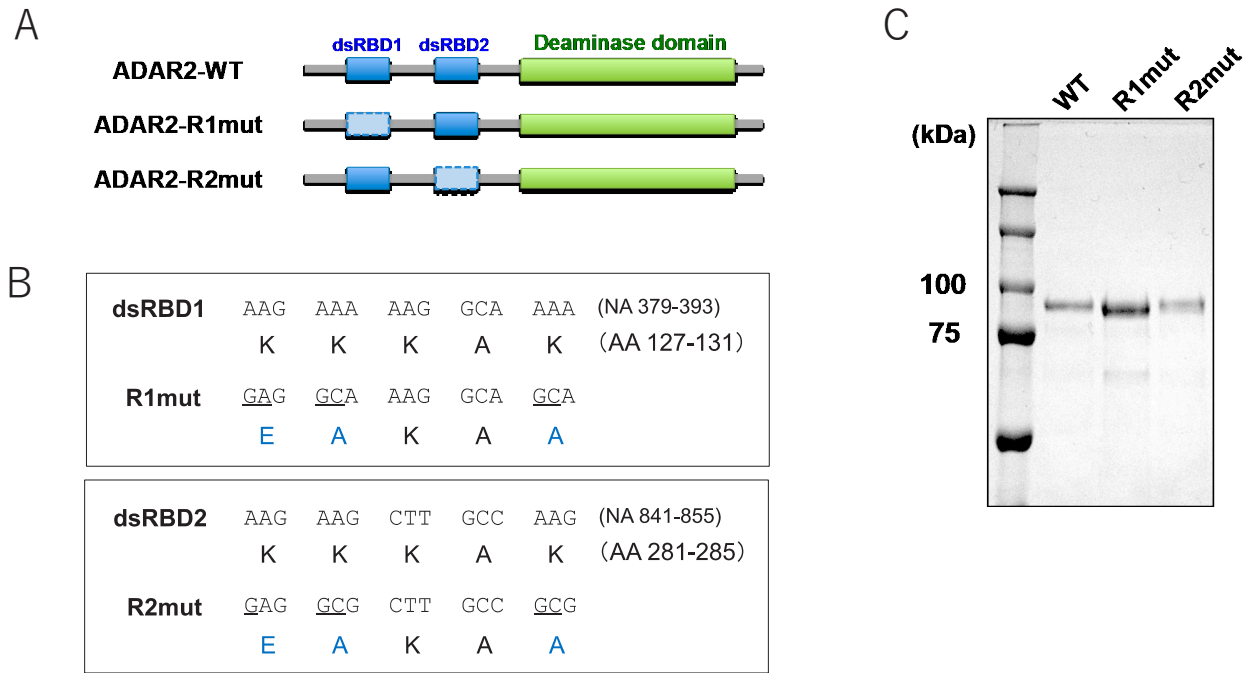
**Fig. 1** Secondary structure of HTR2C pre-mRNA around five editing sites. Each editing site (A-E) is circled.

的とした. 本研究では, dsRBD の二本鎖 RNA 結合活性を欠失させた変異体 ADAR2 タンパク質を用いた *in vitro* RNA 編集解析により, ADAR2 の HTR2C pre-mRNA の RNA 編集における dsRBD の結合モデルを考察した.

## 2. 実験方法

### 2.1 ADAR2 dsRBD 変異体の合成

ADAR2 の dsRBD1 及び dsRBD2 のそれぞれの結合親和性を欠如させた ADAR2 変異体を得るため, これまでに報告されている ADAR 変異体に関する文献 [12] を参考に, dsRBD に変異導入した ADAR2 変異体 (ADAR2-R1mut, ADAR2-R2mut) を設計した (Fig. 2A, B). 具体的なアミノ酸変異部位は, R1mut (127K → E, 128K → A, 131K → A), R2mut (281K → E, 282K → A, 285K → A) とした. 各種 ADAR2 dsRBD 変異体の組み換えタンパク質は, 酵母 (*S. cerevisiae*) 発現系を用いて合成した. まず, 野生型 ADAR2 (ADAR2-WT) をコードする DNA を鋳型に, 上記の dsRBD 変異を導入し, 酵母発現用ベクター (pYES2/NT\_A) にクローニングした. 得られた発現プラスミドを Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (ZYMO RESEARCH) を用いて, INVSc1 competent cell に形質転換し SD/-Ura 寒天培地上 (Clontech) で 2 日間 (30°C) 培養した. 得られたコロニーを SD 液体培地で 2 日間培養 (250 r/min, 30°C) した後, SD/-Ura Broth (Clontech) 100 mL に植菌し, 前培養 (240 r/min, 30°C) を 24 時間行なった. 前培養液を 1L の発現用培地 (MINIMAL SD BASE GAL/RAF と -Ura DO Supplement (Clontech) に加え, 一晚培養 (240 r/min, 30°C) した. 集菌した後, Buffer A [20 mM Tris-HCl, 5% グリセロール, 0.5 mM DTT, 0.01% Triton X-100, 750 mM NaCl, 35 mM イミダゾール] で洗浄し, 100 U Protease Inhibitor Cocktail を加えた後, ガラスビーズを体積 1:1 になるように加え, 冷室 (4°C) で氷冷しながらボルテックスにより破菌した (5 分間ボルテックス → 5 分間氷上でインキュベートを 6 セット). 破菌後の溶液を His Trap HP (GE Healthcare) を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製し, 回収したフラクション (1 mL) を Amicon Ultra Centrifugal Filters Ultracel -50 K を用いて濃縮した. 最終的に得られたタンパク質溶液に, 保存 Buffer [20 mM Tris-HCl, 20% グリセロール, 0.5 mM DTT, 0.01% Triton X-100, 100 mM NaCl] を体積比 1:1 となるように加え, -20°C で保存した. 最終的に得られたタンパク質は, SDS-PAGE により純度を確認した (Fig. 2C).



**Fig. 2** Preparation of ADAR2 mutants lacking dsRNA binding affinity by introducing mutations into the dsRBD.

(A) Domain structure of wild type ADAR2 (ADAR2-WT), dsRBD1-mutated ADAR2 (ADAR2-R1mut) and dsRBD2-mutated ADAR2 (ADAR2-R2mut).

(B) Amino acid sequences of dsRBDs for lacking dsRNA binding activity.

(C) SDS-PAGE analysis for purified ADAR2-WT and dsRBD mutants. Lanes indicate WT: ADAR2-WT, R1mut: ADAR2-R1mut, R2mut: ADAR2-R2mut. Molecular weight markers are shown in the leftmost lane.

## 2.2 HTR2C RNA の調整

HTR2C\_wt\_pUC18 を 鋳型 [11] とし, 0.3  $\mu$ M HTR2CsT7pro\_F01 プライマー (5'-CTAATACGACTC ACTATAGGATCGGTATGTAGC-3'), 0.3  $\mu$ M HTR2C\_R01\_XbaI プライマー (5'-GCTCTAGAGACAACCGATCAAACGCAATG-3') および 0.05 U/ $\mu$ L PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を含む 50  $\mu$ L の反応溶液中で PCR (変性 98°C, 10 秒, アニーリング 55°C, 15 秒, 伸長 68°C, 30 秒, 30 サイクル) により *in vitro* 転写反応の鋳型 DNA を合成した. 増幅産物をフェノール/クロロホルム処理および酢酸ナトリウム存在下のエタノール沈殿により精製した. 調製した鋳型 DNA を用いて, AmpliScribe™ T7 Transcription Kits (Epicentre) の操作手順に従い, 40  $\mu$ L の反応溶液中で 37°C, 3 時間 *in vitro* 転写反応を行った. 反応後, DNase I (2 U) を加え 37°C, 30 分で反応させ, 鋳型 DNA を分解した後, フェノール/クロロホルム処理および酢酸アンモニウム存在下のエタノール沈殿により転写産物の精製を行なった. 得られた RNA を 90% ホルムアミド水溶液に溶解し, 80°C, 3 分間の熱処理による変性後, 氷上で急冷し, 8M 尿素を含む 5% ポリアクリルアミド変性ゲルを用いた電気泳動により切り出し精製を行なった. 得られた RNA の濃度は吸光度により定量した.

## 2.3 *in vitro* RNA 編集評価

2 nM HTR2C RNA をアニーリング buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM NaCl) 中で, 80°C, 3 分間加熱した後, 15 分かけて 25°C まで冷却することによりアニーリング反応を行なった. 2 fmol RNA 複合体および各濃度に調製した ADAR2 タンパク質を RNA 編集反応溶液 (1 U/ $\mu$ L RNase Inhibitor, Murine (NEB), 20 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.01% TritonX-100, 5% glycerol) 中で 37°C, 2 時間反応させた. 編集反応後, フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により RNA を精製し, Prime Script™ RT reagent KIT (TaKaRa) の操作手順に従い, 2.5  $\mu$ M の HTR2C\_R01\_XbaI プライマー (5'-GCTCTAGAGACAACCGATCAAACGCAATG-3') を用いて逆転写反応を行った. 得られた cDNA を鋳型として, 0.3  $\mu$ M HTR2Cs\_F01 プライマー (配列 5'-GGATCGGTATGTAGC-3'), 0.3  $\mu$ M HTR2C\_R01\_XbaI プライマー および 0.05 U/ $\mu$ L Prime STAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を含む 10  $\mu$ L の反応溶液で PCR を行ない, cDNA を増幅した. 増幅産物を鋳型として, 0.25  $\mu$ M HTR2C\_seq\_R01 プライマー (5'-GCAATGTTACCAGGTCGACGTCTGTAGG-3') を用いて, Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit により DNA 塩基配列解析用サンプルを調整した. 反応溶液をエタノー

ル沈殿により精製した後、15  $\mu$ L の Hi-Di ホルムアミドに溶解し、95°C、3 分間変性させた後、氷上で急冷した。得られたサンプルの DNA 配列を、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により解析した。得られたシークエンスクロマトチャートから、解析ソフトウェア Sequence Scanner (Applied Biosystems) を用いて、A から E の各編集部位の A と G のピーク高を解析し、それぞれのピーク高の比  $G/(G+A)$  から各編集部位の RNA 編集割合を算出した。

### 3. 結果

#### 3.1 ADAR2 dsRBD 変異体を用いた RNA 編集解析

ADAR2 の HTR2C pre-mRNA の RNA 編集における 2 つの dsRBD の役割を明らかにするために、それぞれの dsRBD の二本鎖 RNA に対する結合親和性を欠如させた 2 種類の ADAR2 dsRBD 変異体 (ADAR2-R1mut, ADAR2-R2mut) を設計・合成した (Fig. 2)。HTR2C pre-mRNA の A-E 部位の 5 カ所の RNA 編集部位を含む周辺配列 (HTR2C RNA: 211 nt) (Fig. 1) に対して、合成した dsRBD 変異体および野生型 ADAR2 (ADAR2-WT) を用いた *in vitro* RNA 編集反応を行い、各編集部位の編集割合を解析した (Fig. 3)。ADAR2-WT の反応における各編集部位の編集割合は、A 部位: 0.43, B 部位: 0.13, E 部位: 0.15, C 部位: 0.64, D 部位: 0.98 であった。一方、dsRBD2 に変異を導入した ADAR2-R2mut は、全ての編集部位に対する編集活性が失われた (編集割合: < 0.1)。この結果は、

dsRBD2 の二本鎖 RNA 結合活性は、編集部位に関わらず ADAR2 の RNA 編集活性自体に大きく寄与していることを示している。また、dsRBD1 に変異を導入した ADAR2-R1mut では、A, B, E 部位に対する編集活性は失われたが、C 部位と D 部位では編集が観測された (C 部位: 0.2, D 部位: 0.97)。特に D 部位では、ADAR2-WT と同様の編集効率であったことから、dsRBD1 は D 部位の編集には関与していないことが示された。以上の結果より、ADAR2 による HTR2C pre-mRNA の 5 カ所の編集部位の編集は、dsRBD1 の二本鎖 RNA 結合活性が関与する部位とそうでない部位があることを明らかにした。

#### 3.2 変異体 HTR2C RNA を用いた RNA 編集解析

次に dsRBD の結合領域を特定するため、HTR2C pre-mRNA の二本鎖構造領域を段階的に削除した基質 RNA を用いて、先の実験と同様に *in vitro* RNA 編集解析を行なった。本実験で用いた HTR2C pre-mRNA 変異体を Fig. 4 に示した。まず、HTR2C pre-mRNA の 47-125 番目までを削除し、46C と 126G を連結することにより、編集部位から離れた構造領域を削除した HTR2C mut01 を得た。次に、HTR2C mut01 のループ配列 (GUUCGCAG) を安定なループ構造を形成するモチーフ配列 GAAA に置換し、HTR2C mut\_gaaaL を構築した。続いて、HTR2C mut\_gaaaL を基盤として、段階的に二本鎖構造を削除した変異体、HTR2C mut02, mut03, mut04 を設計した。これら各

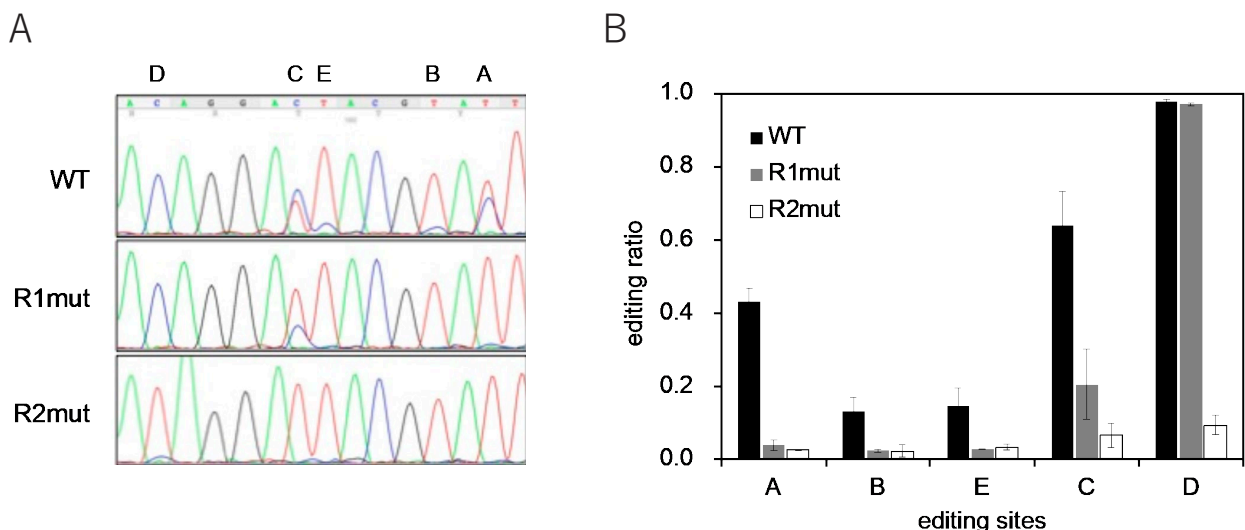
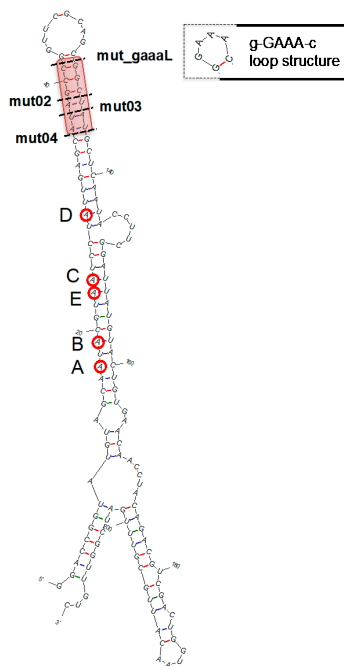


Fig. 3 *in vitro* RNA editing analysis of ADAR2 mutants to HTR2C pre-mRNA

(A) Sequence chromatograms around five editing sites in HTR2C pre-mRNA from editing reaction with ADAR2-WT (upper), ADAR2-R1mut (middle) and ADAR2-R2mut (lower). The position of each editing site is indicated by letters A-E on the top.  
 (B) Editing ratios at five editing sites in HTR2C pre-mRNA. Editing reactions were performed using ADAR2-WT (black), ADAR2-R1mut (gray), ADAR2-R2mut (white) The editing ratios shown were calculated from the peak heights for C and T generated from the sequencing chromatograms, as follows: (height of the C peak)/(height of T peak + height of C peak). The results are presented as averages with standard deviations from 3 independent experiments.

種変異体 HTR2C RNA に対して, ADAR2-WT および ADAR2-R1mut を用いて, 先の実験と同様の条件で *in vitro* RNA 編集反応を行なった (Fig. 5). HTR2C RNA と HTR2C mut01 の各編集部位の編集効率を比較すると, ADAR2-WT および ADAR2-R1mut のいずれの反応においても, B, C, D, E 部位では編集割合の大きな差は見られなかったが, A 部位の編集割合は HTR2C RNA よりも構造領域を削除した HTR2C

mut01 の方が高かった (Fig. 3B, Fig. 5A, B) [11]. 次に, ループ配列を置換した HTR2C mut\_gaaaL においては, A 部位の編集割合の変化はなかったが, C 部位および D 部位の編集割合は低下したことから, ループ配列も RNA 編集に少なからず影響することが明らかになった. また, 二本鎖構造領域を段階的に削除した HTR2C mut02, mut03, mut04 においては, いずれの編集部位も削除に伴って編集割合が低下し, 最も短くした HTR2C mut04 では全ての部位の編集シグナルがほとんど消失した. 以上の結果より, ADAR2 が HTR2C pre-mRNA の 5 カ所の編集部位を編集する際には, dsRBD がループ領域を含む今回削除した領域付近に結合していることが示唆される.



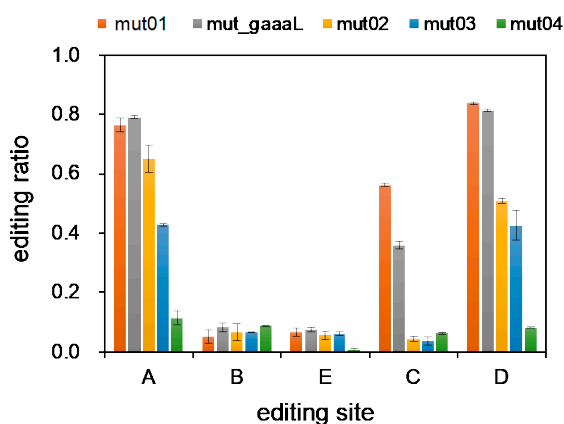
**Fig. 4** Secondary structure of modified HTR2C RNA (HTR2C mut01). The cleavage positions that generate each mutant are indicated by dashed lines. GAAA-loop structure is indicated in the box.

#### 4. 考察

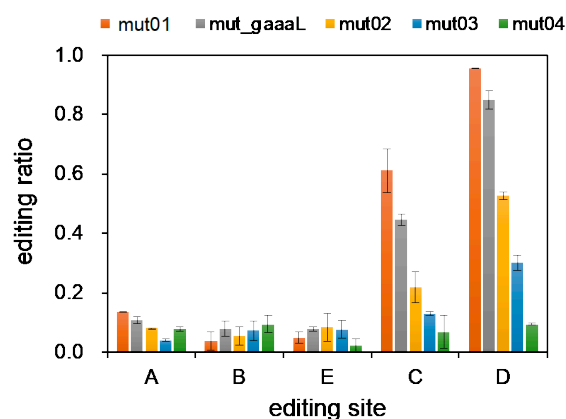
各種変異体 ADAR2 タンパク質と HTR2C RNA を用いた RNA 編集解析結果から, ADAR2 が HTR2C pre-mRNA を RNA 編集する際の dsRBD 結合モデルを予測した (Fig. 6).

まず, dsRBD2 について考察する. dsRBD2 の二本鎖 RNA 結合活性を欠失させると, 全ての部位での編集効率が大幅に低下したことから, HTR2C pre-mRNA の 5 カ所の RNA 編集には, dsRBD2 の結合が必須であると言える (Fig. 6A, B). また, 段階的に二本鎖構造を削除した HTR2C RNA に対する RNA 編集解析の結果では, 二本鎖構造を短くするにつれて編集割合が低下した. この結果は, 削除した二本鎖構造領域が全ての編集部位の RNA 編集に関与していることを示している. これらの結果を組み合わせると, ADAR2 が HTR2C pre-mRNA を RNA 編集する際

A



B



**Fig. 5** *in vitro* editing analysis with mutant HTR2C pre-mRNA and mutant ADARs (A) editing ratios at A-E sites in the reaction of ADAR2-WT to each modified HTR2C RNAs. (B) editing ratios at A-E sites in the reaction of ADAR2-R1mut to each modified HTR2C RNAs. The editing ratios shown were calculated from the peak heights for A and G generated from the sequencing chromatograms, as follows: (height of the G peak)/(height of A peak + height of G peak). The results are presented as averages with standard deviations from 3 independent experiments.

は、dsRBD2 が今回削除した二本鎖構造領域付近に結合することで、高効率な編集が行われると考えられる。すなわち、dsRBD2 の結合領域はループ構造を含めた編集部位に近い二本鎖構造領域にあると予想できる (Fig. 6A, B)。

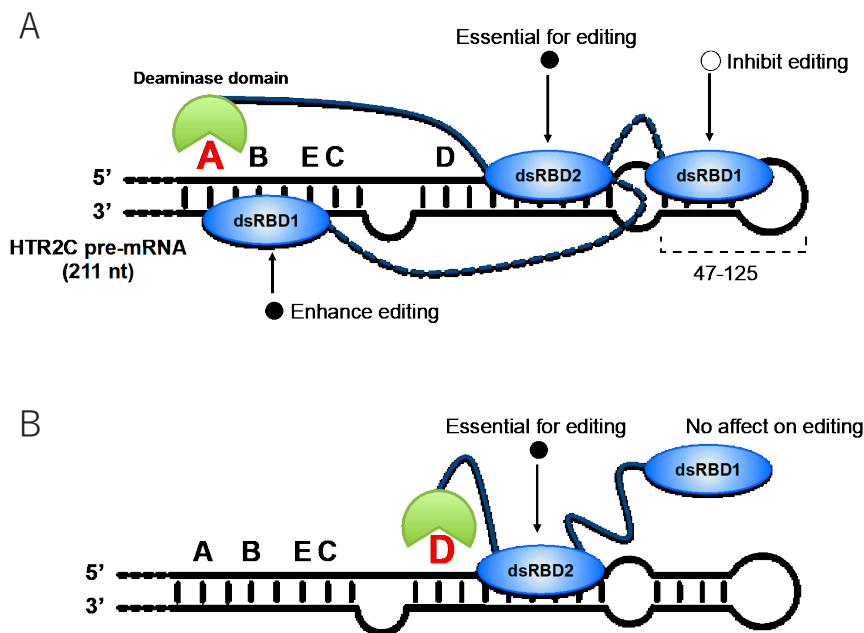
次に dsRBD1 について考察する。dsRBD1 の二本鎖 RNA 結合を欠失させた場合、D 部位の編集効率に大きな変化はなかったが、A 部位および C 部位においては編集割合が大きく低下した。この結果は、ADAR2 が HTR2C pre-mRNA を RNA 編集する際、編集部位によって dsRBD1 の結合の寄与度が異なることを示している。特に A 部位の RNA 編集は、dsRBD1 の二本鎖 RNA 結合活性の寄与度が高いことから、A 部位を RNA 編集する際には dsRBD1 がいずれかの領域に結合していると考えられる (Fig. 6A)。一方で、HTR2C pre-mRNA の 47-125 番目を削除すると、ADAR2-WT の A 部位に対する編集割合は大幅に上昇する。この結果は、dsRBD1 は 47-125 番目の領域と結合するが、その結合は A 部位の RNA 編集に対しては阻害的に働いていると考えられる。すなわち、ADAR2 が A 部位を RNA 編集する際は、dsRBD1 が RNA 編集反応に必要とされるいずれかの領域との結合と、阻害的に働く 47-125 番目の領域との結合が平衡して起こっていると予想できる (Fig. 6A)。

本研究の結果より、ADAR2 が HTR2C pre-mRNA の 5 カ所の編集部位を RNA 編集する際、dsRBD の結合

領域はそれぞれの編集部位によって異なることを明らかにした。ADAR2 の HTR2C pre-mRNA の RNA 編集には、dsRBD が複数箇所の領域に結合しながら、5 カ所の編集部位の RNA 編集パターンを形成していると考えられる。また、dsRBD の結合は ADAR の RNA 編集効率を上げるだけでなく、その編集効率を下げる役割も担っているという興味深い結果が得られた。D 部位の RNA 編集は、dsRBD2 の結合のみに依存するが、その際の dsRBD1 もいずれかの領域に結合していると考えられるのが妥当である (Fig. 6B)。しかしながら、編集効率を指標とした今回の評価系では、dsRBD1 の結合が D 部位の編集効率に影響しないため、実際の結合領域を特定することは困難である。また、A 部位の RNA 編集に必須の dsRBD1 の結合領域についても、少なくとも HTR2C pre-mRNA の 47-125 番以外の構造領域と相互作用していることは間違いないが、詳細な結合領域は特定できていない。ADAR2 の HTR2C pre-mRNA に対する RNA 編集機構の分子メカニズムの詳細を明らかにするためには、今後、フットプリント法など、RNA と dsRBD の結合を直接観測できる手法を用いて、dsRBD の結合領域を特定する必要がある。

### 謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 (課題番号: 19K05725) および、福岡大学研究推進部の研究経費 (課題番号: 201031) によるものである。



**Fig. 6** Predicted binding models of dsRBDs for editing into A and D sites on HTR2C pre-mRNA by ADAR2  
 (A) Binding model for dsRBD1 and dsRBD2 on editing at A-site.  
 (B) Binding model for dsRBD1 and dsRBD2 on editing at D-site.

## 参考文献

- [1] B.L. Bass, *Annu Rev Biochem*, **71**, 817 (2002).
- [2] S. Farajollahi, S. Maas, *Trends Genet*, **26**, 221 (2010).
- [3] S. Maas, A. Rich, *Bioessays*, **22**, 790 (2000).
- [4] E. Picardi, C. Manzari, F. Mastropasqua, I. Aiello, A. M. D'Erchia and G. Pesole, *Sci Rep*, **5**, 14941 (2015).
- [5] B.E. Wulff, K. Nishikura, *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **1**, 90 (2010).
- [6] Y. Kawahara, *Jikken-igaku*, **28**, 1628 (2010).
- [7] Q. Wang, P. J.O'Brien, C. Chen, D. C. Cho, J. M. Murray, K. Nishikura, *J. Neurochem.*, **74**, 1290 (2000).
- [8] S. Maas, Y. Kawahara, K. M. Tamburro, K. Nishikura, *RNA Biol.*, **3**, 1 (2006).
- [9] H. Schellekens, G. Clarke, I. B. Jeffery, T. G. Dinan, J. F. Cryan, *PLoS ONE*, **7**, e32266 (2012).
- [10] C. M. Burns, H. Chu, S. M. Rueter, L. K. Hutchinson, H. Canton, et al., *Nature*, **387**, 303 (1997).
- [11] M. Fukuda, Y. Oyama, A. Nishitarumizu, M. Omura, K. Nose, M. Deshimaru, *Genes Cells*, **20**, 834 (2015).
- [12] L. Valent and K. Nishikura, *J. Biol. Chem.*, **10**, 1074 (2007).

