

RNA 修飾を識別し標的 RNA を切断する人工リボザイムの構築

福田 将虎¹⁾・栗原 圭¹⁾・弟子丸正伸¹⁾

(平成25年12月10日受理)

Ribozyme Design for Selective Target RNA Cleavage Depending on RNA Modifications

Masatora FUKUDA¹⁾, Kei KURIHARA¹⁾, and Masanobu DESHIMARU¹⁾

(Received December 10, 2013)

Abstract

Intracellular RNA modifications, such as substitutional RNA editing and 2'-O-methylation, play a crucial role in the regulation of biological processes. Cleavage of target RNA that depends on the specific site of RNA modification is a useful tool for analyzing and regulating intracellular processes related to these characteristic modification. Hammerhead ribozymes have been utilized as small catalytic RNAs for cleaving target RNA at a specific site. Here, we reveal a design strategy for a hammerhead ribozyme that specifically recognizes specific site of 2'-O-methylation and adenosine to inosine (A-to-I) and cytosine to uracil (C-to-U) substitutional RNA-editing sites. The initial editing-specific HHR, parental HHR, was designed to cleave 5' to the target-editing site. This HHR design provides Watson-Crick base pairing between the recognition base that is close to the cleavage site and adenosine or cytosine of the target-editing site. On the basis of this HHR, the recognition base was altered to pair only with the edited base, not with the unedited base. According to this rule, cytosine was used as a recognition base for A-to-I RNA editing-specific cleavage. Similarly, guanosine was changed to adenosine for C-to-U-specific cleavage. These designed ribozymes showed higher cleavage activity against both A-to-I edited *HTR2C* RNA fragments and C-to-U edited *APOB* RNA fragments than against the non-edited these RNAs *in vitro*. We also demonstrated that the ribozyme designed for A-to-I RNA editing recognition at the Q/R site on filamin A (*FLNA*) showed editing-specific cleavage activity against physiologically edited *FLNA* mRNA extracted from the cultured cells. The data in this study provided an experimental basis for the RNA editing-dependent degradation of specific target RNA *in vivo*.

1. 緒言

生体内RNAは、転写後にスプライシングや化学修飾などのプロセッシングを経て成熟し、本来の機能を発揮している。現在までに100種類以上のRNA修飾が報告されており、これらの修飾はタンパク質発現や細胞内局在などを始め、生体内の重要な生命現象を制御していると考えられている。中でも、RNA配列中のアデノシンを脱アミノ化しイノシンに変換するRNA編集 (A-to-I 編集) は、生命維持に必須のRNA修飾の一つである^{1,2}。現在までに同定されている生体内RNA編集のほとんどは非コードRNA上で生じているが、タンパク質

をコードする領域のRNA編集はコドンが変換されるため、編集後のRNAから翻訳されるタンパク質は遺伝情報とは異なるアミノ酸配列を有する。このようなRNA編集は、グルタミン酸受容体³やセロトニン2C型受容体 (*HTR2C*)⁴を始め多くの遺伝子で同定されており、RNA編集異常が神経疾患や精神疾患などを始め様々な疾患と深く関わっていることが現在明らかにされつつある^{5,6}。また、近年の大規模遺伝子解析技術の発展により、A-to-I編集を受ける数多くのmRNA及び非コードRNAが新たに同定されてきている^{7,8}。しかしながら、数多くのRNA編集が見いだされているにも関わらず、RNA編集の持つ生理的意義については未だ不明

1) 福岡大学理学部化学科, 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8 -19- 1

Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University, 8 -19- 1, Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

な点が多く残っている。これらRNA編集の詳細な解析を行うためには、生体内で部位特異的なRNA編集を制御する技術が必要である。そこで我々は、生体内で部位特異的な修飾を識別し、標的RNAを切断・除去する方法論に着目した。現在までに、生体内で標的RNAを切断する分子の一つとして、ハンマーヘッド型リボザイム (HHR)^{9,10}を基盤とする機能性RNAが開発されてきた¹¹⁻¹³。HHRとは、植物ウイルスなどで発見された自己切断反応を触媒する、およそ40ヌクレオチド程度からなる単純な触媒RNA (リボザイム) であり、配列設計により標的RNAの特定部位を切断することができる。またHHRは、標的切断部位が2'-O-メチル化修飾されている場合、標的RNAを切断できないことが既に報告されている¹⁴。本稿では、生体内RNA修飾を認識し切断するリボザイムの一般的な構築方法を確立することを目的とし、従来のHHRにRNA編集を識別する能力を新たに付加した「RNA修飾認識型リボザイム」の構築について報告する。

2. RNA 修飾を識別するリボザイムの設計と機能評価

本研究では、セロトニン2C型受容体 (HTR2C) の mRNA をモデル標的RNAとした。HTR2C mRNA前駆体 (HTR2C pre-mRNA) は、エクソンV内の特定の5カ所のアデノシン (AからE部位) が二本鎖特異的アデノシンデアミナーゼ (ADARs) によりイノシンに変換されることが既に明らかになっている⁴ (図1)。また近年、C部位に2'-O-メチル化修飾を誘導するbox C/D型 snoRNA (HBII52) が同定され、HTR2C pre-mRNAはA-to-I RNA編集のみならず、2'-O-メチル化されている可能性が示唆されている¹⁵ (図1)。そこで本研究では、

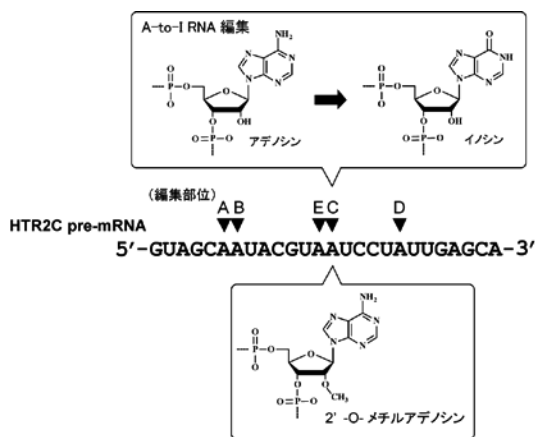


図1 セロトニン2C型受容体 (HTR2C) pre-mRNAのA-to-I RNA編集と2'-O-メチル化修飾
HTR2C pre-mRNAはAからE部位のアデノシンがイノシンに変換される (A-to-I RNA編集)。また、C部位は2'-O-メチル化修飾を受けることが示唆されている。

HHRを基盤としてHTR2C RNA上のC部位の2'-O-メチル化修飾及びA-to-I RNA編集を識別するリボザイムを構築することにした。HHRは、中央部に触媒活性を有するコア配列と、標的RNAと塩基対を形成し切断部位を決定する標的認識領域を有し、図2A中に示す切断部位で標的RNAを切断する (図2A)。つまり、標的認識領域の配列を改変するだけで、標的RNA上の特定部位を切断するHHRを構築することができる。まず、2'-O-メチル化修飾を識別するリボザイムを構築するにあたり、HHR固有の性質に着目した。HHRは切断部位が2'-O-メチル化修飾されていると標的RNAを切断できない。そこで、従来のHHRの設計方法に従い、HTR2C RNAのC部位が切断部位に一致するように標的認識領域を設計したHHR (HR-HTR2Cme) を作製した。この際、活性領域には、既に報告されているHH16の配列 (5'-CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA-3')¹⁶を用いた。次に、構築したHHRの切断活性を以下の方法を用いて評価した。まず、49ヌクレオチドの未修飾 (HTR2C) 及びC部位を2'-O-メチル化修飾したHTR2C RNA (HTR2Cme) を合成・精製し、³²Pで放射標識した。HR-HTR2Cmeは合成DNAを鋳型として*in vitro*転写反応により合成し、ゲル切り出しによる精製を行った。標識したRNA (~10 nM) に対して過剰のHHR (1 μM) をアニーリングバッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 100 mM NaCl) 中で混合し、80°C 3分間変性反応を行った後、25°Cまで15分かけて除冷することで、

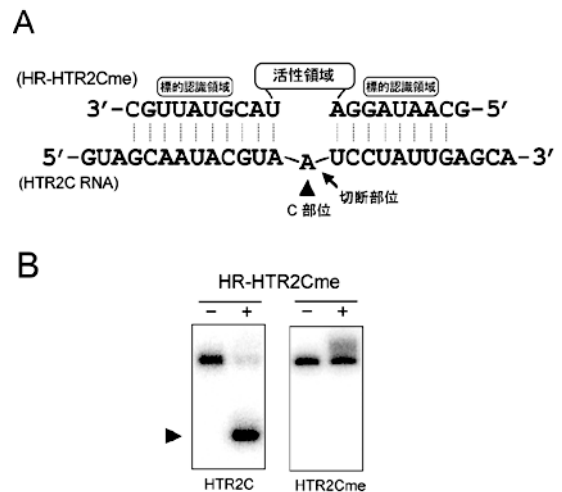


図2 ハンマーヘッド型リボザイムの概略図と2'-O-メチル化の識別

(A) ハンマーヘッド型リボザイムの模式図。標的認識領域は、標的RNAと塩基対を形成する。活性領域は5'-CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA-3'で形成される。C部位及び切断部位のヌクレオチドは黒三角および矢印で示す。(B) 未修飾のHTR2C RNA (HTR2C) とC部位を2'-O-メチル化修飾したHTR2C RNA (HTR2Cme) に対するリボザイムの切断活性。切断フラグメントは黒三角で示す。

標的RNAとHR-HTR2Cmeの複合体を形成させた。アニーリング反応後の溶液に、終濃度20 mMとなるようにMgCl₂を加え切断反応を開始し、37°C、1時間反応後、変性PAGE (8 M Urea, 8% ポリアクリルアミド)により切断バンド解析を行った。切断活性評価を行った結果、HR-HTR2CmeはHTR2Cに対しては高い切断活性を示したにも関わらず、予想通りHTR2Cmeに対しては切断活性を示さなかった (図2B)。以上の結果より、HHR固有の性質を利用することで、HTR2C RNA上のC部位の2'-O-メチル化修飾を識別するリボザイムを構築できることを明らかにした。

続いて、A-to-I RNA編集を識別するリボザイムの設計を行った。まず、従来のHHR設計方法に従い、標的編集部位の1塩基前のヌクオチド切断するよう標的認識領域の配列を設計した (図3A)。この設計では、標的RNA上の編集部位とHHRが塩基対を形成しない場合、切断活性が大幅に減少することが既に明らかになっている^{17,18}。そこで、編集部位と塩基対を形成する位置の塩基を編集認識塩基として、標的RNAが編集を受けた時、つまりイノシンの場合にのみ塩基対を形成するよう編集認識塩基をシトシンとしたリボザイム (HR-HTR2C-C) を設計した。上記設計により構築したリボザイムは、編集後の標的RNAを選択的に切断できると予想した。上記設計で、未編集RNAの切断のみを考慮するならば、通常は編集認識塩基のヌクオチドにはウリジンをを用いる。そこで、比較対象として編集認識塩基にウリジンを導入したリボザイム (HR-HTR2C-U) も同時に合成した。精製したHR-HTR2C-C及びHR-HTR2C-Uの、C部位がアデノシン (HTR2C)及びイノシン (HTR2C-edit) のHTR2C RNAフラグメントに対する切断活性評価を行った結果、HR-HTR2C-CはHTR2C-edit RNAに対して選択的な切断活性を示した (図3B)。一方、HR-HTR2C-Uは、HTR2C RNA、HTR2C-RNAの両方に強い切断活性を示し、HR-HTR2C-editと比較して編集識別能が著しく低下した (図3B、C)。この結果は、ウリジンはアデノシン、イノシンの両方と塩基対を形成できるということと一致する。以上の結果より、HHRの編集認識塩基の塩基対形成を利用した本設計により、標的部位のA-to-I RNA編集を効果的に識別できることを明らかにした。

3. 生体から抽出したRNAに対するA-to-I RNA編集認識型リボザイムの機能評価

本設計により構築したリボザイムが、合成RNAだけではなく、生体から抽出したmRNAに対しても適用可能であるかどうかを評価した。本実験では、標的RNAをFilamin A (FLNA) mRNAとした。FLNA mRNAは、ADAR2を過剰発現させた培養細胞内で特定のアデノ

シン (Q/Rサイト) が編集されることが既に分かっている¹⁹。そこで、同様の設計方法を用いてFLNAのQ/RサイトのA-to-I RNA編集を識別するリボザイム (HR-FLNA) を構築した。Q/Rサイトがアデノシン (FLNA-ade) 及びイノシン (FLNA-ino) のFLNA RNAフラグメントを合成し、HR-FLNAの切断活性を評価した。結果、HTR2C RNAと同様に、HR-FLNAは編集後のRNAに対して選択的な切断活性を示した (図4)。

続いて、構築したリボザイムが培養細胞から抽出したFLNA mRNAに対しても編集選択的な切断が可能であるかを図5Aに示す方法で評価した。まず、ADAR2を発現誘導可能な細胞 (Tet-ADAR2細胞) をドキシサイクリン存在下で培養し、トータルRNAを抽出した。RT-PCRによりQ/Rサイトを含むFLNA cDNAを選択的に増幅し、ダイレクトシーケンス法により、得られたDNAフラグメントの塩基配列解析を行った。塩基配

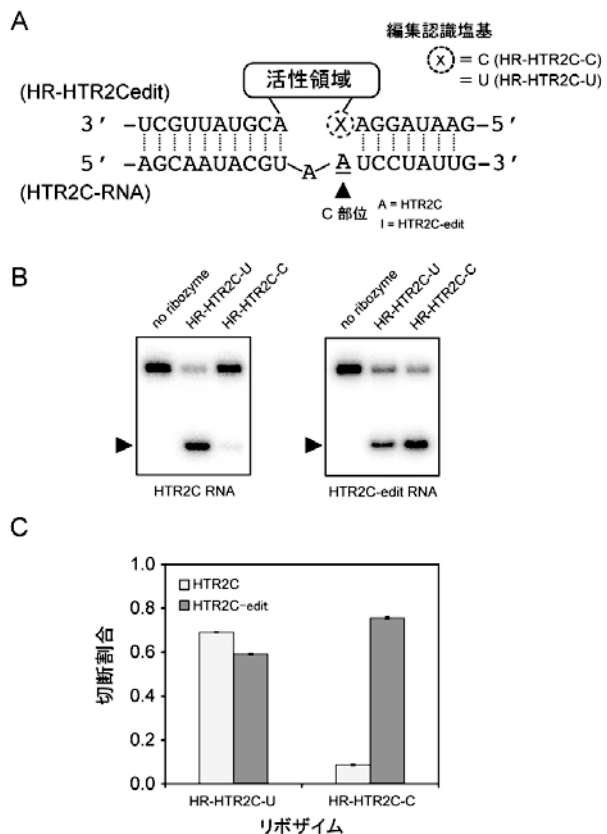


図3 A-to-I RNA編集を識別するリボザイムの設計と機能評価 (A) HTR2C RNA上のC部位のA-to-I RNA編集を識別するリボザイムの設計。編集認識塩基にシトシンを導入したリボザイム (HR-HTR2C-C) では、C部位がイノシンの場合にのみ塩基対を形成し切断活性を示す。Uを導入したリボザイム (HR-HTR2C-U) は、アデノシン、イノシン共に塩基対を形成できるので編集を識別することができない。(B) HR-HTR2C-C及びHR-HTR2C-Uの切断活性評価。C部位がアデノシン (HTR2C RNA) 及びイノシン (HTR2C-edit RNA) に対して、37°C、1時間の切断反応を行った後の電気泳動結果。(C) 各サンプルのバンド強度解析により切断割合を算出した結果。

列解析により得られたクロマトチャート上では、Q/R サイトが未編集の場合はアデノシン、編集後の場合はグアノシンのピークとして検出される。つまり、抽出したFLNAのQ/Rサイトの編集割合は、アデノシンとグアノシンのピーク高の比から算出することができ

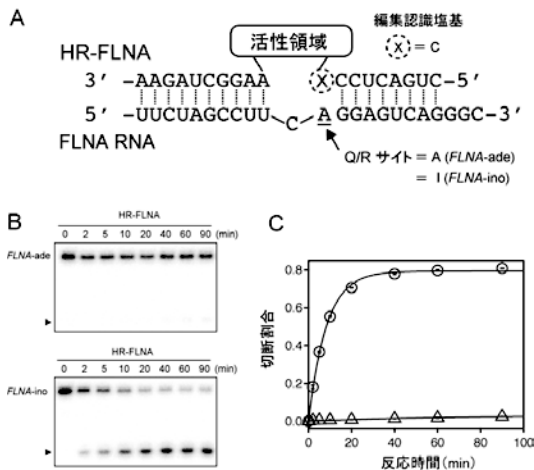


図4 FLNA RNAのA-to-I RNA編集を識別するリボザイムの設計と評価

(A) FLNA RNAのQ/R部位のA-to-I RNA編集を識別するリボザイムの設計。(B) 電気泳動によるHR-FLNAのFLNA-ade及びFLNA-inoに対する切断反応の経時変化。(C) 電気泳動後のバンド強度解析結果を基に算出した切断割合の経時変化。FLNA-adeは△、FLNA-inoは○で示す。

る^{20,21}。上記方法を用いて、本条件で培養した細胞から抽出したFLNA mRNAのQ/Rサイトの編集割合を算出した結果、編集割合は約65%であった。以上の結果より、編集前後のFLNA mRNAが混在するRNAサンプルを調整できたことを確認した。次に、HR-FLNAの編集選択的な切断を、編集割合解析法と切断反応を組み合わせることにより行った。抽出したトータルRNA 200 ngに対して、終濃度 1 μMとなるようにHR-FLNAを加え、切断反応を行った。この際、HR-FLNAが編集選択的にFLNA mRNAを切断するのであれば、編集後のFLNA mRNAはRT-PCRで増幅されないため、編集割合が低下する。切断反応開始後、1、3、6、24時間後のサンプルのQ/Rサイトの編集割合を解析した結果、経時的な編集割合の低下が観測できた。この結果は、本設計で構築したリボザイムは、短鎖RNAフラグメントのみならず、生体から抽出したRNAに対しても編集選択的に切断できることを示している。

4. 編集認識塩基を応用した C-to-U RNA 認識型リボザイムの構築

生体内にはA-to-I RNA編集だけではなく、特定のシトシンがウリジンに変換されるC-to-U RNA編集機構も存在する²²。Apolipoprotein B (Apo B) mRNA上の6666番目のシトシンは、ウリジンにRNAレベルで変換

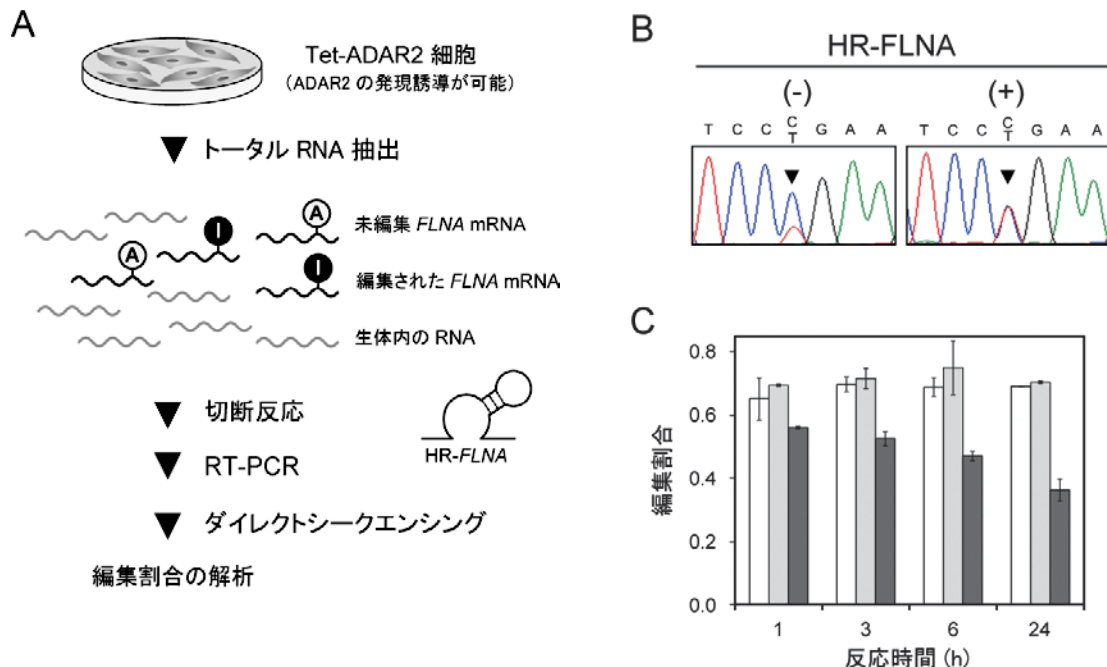


図5 細胞から抽出したFLNA mRNAに対するリボザイムの編集選択的な切断

(A) 抽出したmRNAの編集割合解析方法。(B) リボザイム存在下 (+)、非存在下 (-) で3時間切断反応を行った後、塩基配列解析により得られたクロマトグラムを示す。リバースのプライマーを用いて解析を行ったため、未編集はチミジン、編集後はシトシンとして表示される。赤色のピークが未編集、青色のピークが編集後のシグナルを示す。Q/Rサイトは黒三角で示している。(C) 切断反応時間に伴う編集割合の変化。編集割合は塩基配列解析で得られたクロマトグラムのQ/Rサイトのピークトップ比から算出した。HR-FLNA存在下で切断反応を行った時の編集割合の経時変化を黒棒で示す。比較対象として、リボザイム非存在下は白棒、HR-FLNAに変異導入し切断活性を欠失させたリボザイムで反応させて得られた結果を灰棒で示す。

されていることが既に報告されている²³。本設計のリボザイムの編集識別能は、編集認識塩基が塩基対を形成するかどうかで決まるため、C-to-U RNA編集の識別にも適用可能であると考えられる。アデノシンは、シトシンとは塩基対を形成しないが、ウリジンは塩基対を形成する。つまり、編集認識塩基にアデノシンを導入することで、A-to-I RNA編集の場合と同様に編集後のRNAを選択的に切断できるようになる。そこで、これまでの設計に従い、ApoB RNAのC-to-U RNA編集を識別できるリボザイム (HR-ApoB) を設計・構築した (図 6 A)。編集前後のApoB RNAフラグメントに対するHR-ApoBの切断活性評価を行った結果、HR-ApoBは編集後のRNAに対して選択的な切断活性を示した。以上の結果より、編集認識塩基を利用した本設計は、A-to-I RNA編集のみならず、C-to-U RNA編集の識別にも適用可能であることが明らかになった。

5. 結 言

本稿では、部位特異的なRNA修飾を識別し、標的RNAを切断する機能性分子の構築を目的とした。ハンマーヘッド型リボザイム (HHR) は、配列設計により標的RNA上の特定部位を切断できることに加え、標的切断部位が2'-O-メチル化されていると切断活性を示さない。この特性を応用し、HTR2C mRNA上のC部位の2'-O-メチル化を識別し、切断するリボザイムを構築した。また、標的RNAとの塩基対合が切断活性に影響する部位を編集認識塩基として利用し、A-to-I RNA編集及びC-to-U RNA編集を識別し、編集後のRNAを

選択的に切断するリボザイムの構築に成功した。本研究で用いた設計方法は、標的部位と編集認識塩基の組み合わせで切断活性を調節できることから、RNA編集だけではなく、部位特異的な変異の識別においても応用可能である。また、構築したリボザイムは短鎖合成RNAだけではなく、生体から抽出したRNAに対しても編集選択的な切断活性を示した。現在までに、細胞内でHHRを用いた遺伝子発現抑制が報告されていることから^{24,25}、本研究で構築したリボザイムも生体内での応用が期待できる。今後は、構築したリボザイム設計法を用いて、生体内でのRNA修飾選択的な標的RNA分解方法の構築を目指していきたい。

参考文献

- (1) Nishikura, K. *Annu Rev Biochem* **2010**, *79*, 321-49.
- (2) Farajollahi, S.; Maas, S. *Trends Genet* **2010**, *26*, 221-30.
- (3) Sommer, B.; Kohler, M.; Sprengel, R.; Seeburg, P. H. *Cell* **1991**, *67*, 11-9.
- (4) Burns, C. M.; Chu, H.; Rueter, S. M.; Hutchinson, L. K.; Canton, H.; Sanders-Bush, E.; Emeson, R. B. *Nature* **1997**, *387*, 303-8.
- (5) Englander, M. T.; Dulawa, S. C.; Bhansali, P.; Schmauss, C. *J Neurosci* **2005**, *25*, 648-51.
- (6) Dracheva, S.; Chin, B.; Haroutunian, V. *Neuroreport* **2008**, *19*, 379-82.
- (7) Park, E.; Williams, B.; Wold, B. J.; Mortazavi, A. *Genome Res* **2012**, *22*, 1626-33.
- (8) Peng, Z.; Cheng, Y.; Tan, B. C.; Kang, L.; Tian, Z.; Zhu, Y.; Zhang, W.; Liang, Y.; Hu, X.; Tan, X.; Guo, J.; Dong, Z.; Bao, L.; Wang, J. *Nat Biotechnol* **2012**, *30*, 253-60.
- (9) Uhlenbeck, O. C. *Nature* **1987**, *328*, 596-600.
- (10) Haseloff, J.; Gerlach, W. L. *Nature* **1988**, *334*, 585-91.
- (11) Goodchild, J. *Expert Opin Ther Targets* **2002**, *6*, 235-47.
- (12) Citti, L.; Rainaldi, G. *Curr Gene Ther* **2005**, *5*, 11-24.
- (13) Tedeschi, L.; Lande, C.; Cecchetti, A.; Citti, L. *Drug Discov Today* **2009**, *14*, 776-83.
- (14) Zoumadakis, M.; Tabler, M. *Nucleic Acids Res* **1995**, *23*, 1192-6.
- (15) Kishore, S.; Stamm, S. *Science* **2006**, *311*, 230-2.
- (16) Hertel, K. J.; Herschlag, D.; Uhlenbeck, O. C. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3374-85.
- (17) Zoumadakis, M.; Neubert, W. J.; Tabler, M. *Nucleic Acids Res* **1994**, *22*, 5271-8.
- (18) Werner, M.; Uhlenbeck, O. C. *Nucleic Acids Res* **1995**, *23*, 2092-6.

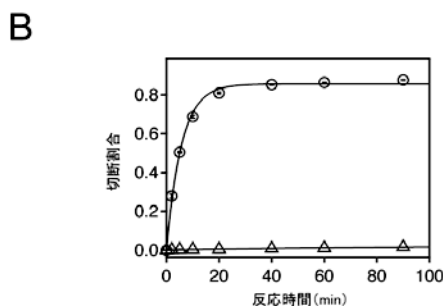
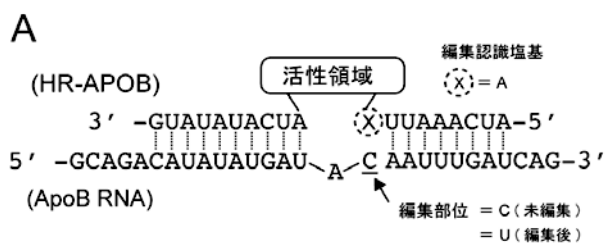


図 6 C-to-U RNA編集を識別するリボザイムの設計と機能評価 (A) ApoB RNAのC-to-U RNA編集を識別するリボザイム (HR-APOB) の配列設計。編集認識塩基はアデノシンを用いた。(B) HR-APOBの、未編集 (△) 及び編集後 (○) のApoB RNAに対する切断割合の経時変化。

- (19) Levanon, E. Y.; Hallegger, M.; Kinar, Y.; Shemesh, R.; Djinovic-Carugo, K.; Rechavi, G.; Jantsch, M. F.; Eisenberg, E. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33*, 1162-8.
- (20) Nurpeisov, V.; Hurwitz, S. J.; Sharma, P. L. *J Clin Microbiol* **2003**, *41*, 3306-11.
- (21) Eggington, J. M.; Greene, T.; Bass, B. L. *Nat Commun* **2011**, *2*, 319.
- (22) Blanc, V.; Davidson, N. O. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 1395-8.
- (23) Wang, A. B.; Liu, D. P.; Liang, C. C. *Exp Cell Res* **2003**, *290*, 1-12.
- (24) Torabian, S. Z.; de Semir, D.; Nosrati, M.; Bagheri, S.; Dar, A. A.; Fong, S.; Liu, Y.; Federman, S.; Simko, J.; Haqq, C.; Debs, R. J.; Kashani-Sabet, M. *Am J Pathol* **2009**, *174*, 1009-16.
- (25) He, P.; Zhu, D.; Hu, J. J.; Peng, J.; Chen, L. S.; Lu, G. X. *Mol Biol Rep* **2010**, *37*, 1597-604.