

氏名	のせ かなこ 野瀬 可那子		
学位の種類	博士（理学）		
報告番号	甲第 1856 号		
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Development of the Site-directed RNA Editing Utilizing Intracellular A-to-I RNA Editing （細胞内 A-to-I RNA 編集を利用した部位特異的 RNA 編集技術の開発）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	倉岡 功
	（副査） 福岡大学	教授	小柴 琢己
	福岡大学	准教授	福田 将虎

内容の要旨

【目的】

ヒト生体内には、RNA 中のアデノシン (A) をイノシン (I) に変換する A-to-I RNA 編集機構が存在し、生体の恒常性維持や疾患と密接に関わっている。A-to-I RNA 編集は、RNA 編集酵素である二本鎖 RNA 特異的アデノシンデミネラーゼ (ADAR) が行っており、これまでに 300 万箇所以上の RNA 編集部位が同定されている。タンパク質翻訳において、イノシンはグアノシン (G) として認識されるため、A-to-I RNA 編集は RNA の段階で遺伝情報を変換できる。RNA 編集機構は、タンパク質機能調節や miRNA を介した遺伝子発現制御、自然免疫など、数多くの生理的役割を担っていることが明らかになっているが、それ以外にもさまざまな生体プロセスの制御に関わっていることが予想される。A-to-I RNA 編集の生理機能の全貌を理解するためには、生体内において RNA 上に生じるイノシンの機能を詳細に解析する必要がある。そこで本研究は、生体内で任意の部位に A-to-I RNA 編集を誘導する方法論、すなわち部位特異的 RNA 編集技術に着目した。RNA 編集技術により、各遺伝子に対する RNA 編集の影響を合成生物学的な側面から広く解析できるようになる。また同時に、RNA 編集技術はゲノム編集技術とは異なる遺伝子改変技術として、基礎研究に留まらず疾患治療や医薬品開発など社会に役立つ技術としての応用展開が期待される。本研究では、A-to-I RNA 編集の生理的意義の解明及び医療技術展開を最終目的とし、簡便かつ高効率な RNA 編集技術を開発することを目的とした。

【方法】

本研究は、高効率かつ高い特異性を備えた A-to-I RNA 編集技術を開発するため、天然型

ヒト ADAR (hADAR) の編集活性を誘導する機能性 RNA (編集ガイド RNA: AD-gRNA) を構築した。

(AD-gRNA の配列設計)

hADAR の編集基質であるグルタミン酸受容体 (GluR2) pre-mRNA を基盤として、目的機能を有する AD-gRNA を設計した。さらに、上記で得られた基本骨格の各種配列変異体の合成と機能評価実験を組み合わせ、編集誘導に必要な領域を特定し、結果として短鎖型 AD-gRNA (shAD-gRNA) を得た。

(AD-gRNA の機能評価)

*in vitro*における AD-gRNA の編集誘導効率は、組み換え hADAR2 を用いた *in vitro* 編集反応により解析した。標的部位の編集割合は、編集反応後の標的 RNA を鋳型として RT-PCR を行い、ダイレクトシーケンシングにより解析した。培養細胞内での AD-gRNA の編集誘導能評価は、HEK293 細胞をはじめとする各種培養細胞に、hADAR、AD-gRNA および標的遺伝子の発現プラスミドをトランスフェクションし、一定時間培養した後、抽出した標的 RNA の編集割合を上記方法で解析することにより行った。内因性 hADAR の RNA 編集誘導活性を評価する際は、hADAR 発現プラスミドを加えない条件で解析を行った。また、GFP および Luciferase に変異を導入し、標的部位の編集を蛍光または発光により検出できる編集レポーター RNA を構築し、これらを用いて RNA 編集による遺伝子機能制御を評価した。

【結果と考察】

本設計で得られる AD-gRNA は、標的部位を設定するアンチセンス領域 (ASR) と ADAR との親和性を有する ADAR 誘導領域 (ARR) で構成される。また本研究では、天然基質配列を基盤として得られる 3' -AS AD-gRNA に加え、ASR と ARR の接続位置を変更した 5' -AS AD-gRNA の 2 種の基本骨格を得た。上記設計に従って構築した各種 AD-gRNA は、ASR に設定した任意の標的部位に対して RNA 編集を誘導できることを *in vitro* 編集解析により明らかにした。また、培養細胞内においても RNA 編集誘導活性を確認した。以上の結果より、RNA 編集技術の基盤となる方法論を構築した。一方で、2 種の AD-gRNA 骨格の編集誘導特性は異なっていた。そこで変異体 ADAR2 を用いた *in vitro* 編集解析を通して、それぞれの AD-gRNA は高効率な編集のために異なるタンパク質ドメインが必要であることを明らかにした。さらに、標的部位周辺のおフターゲット編集を解析した結果、異なる編集パターンが得られた。以上結果は、2 種の AD-gRNA 骨格 に対する ADAR2 の結合様式がそれぞれ異なることを示している。続いて、配列および長さの異なる各種 AD-gRNA 変異体の編集誘導活性を評価し、編集誘導に必要な配列領域を解析した。上記実験結果より、AD-gRNA と同程度またはそれ以上の編集誘導活性を有する短鎖型の shAD-gRNA を構築することに成功した。得られた shAD-gRNA は、AD-gRNA と比較しておフターゲット編集が低減した。shAD-gRNA は、内因性 hADAR の編集活性を誘導し、標的遺伝子の発現を制御できることを、編集レポーター RNA を用いた実験により証明した。以上より、短鎖で機能する RNA 編集核酸の基本

配列設計を確立した。

【結論】

本研究は、cis型の基質RNAをtrans型にすることでRNA編集核酸を構築するという新たな設計戦略を考案し、その正当性を実験により証明した。得られた研究成果は、RNA編集核酸の配列設計およびRNA編集技術の基盤的方法論を提供した。また、編集誘導特性の異なる2種のAD-gRNA骨格は、多様なRNA編集核酸が設計可能であることを示した。さらに、AD-gRNAよりも短鎖かつ標的部位周辺の編集特異性が高いshAD-gRNAを構築することに成功し、更なる高機能なRNA編集核酸の構築方法を示した。本研究で得られたAD-gRNAおよびshAD-gRNAは、内因性hADARの編集活性を標的部位に誘導できることを実証しており、本方法論が医療や創薬研究に応用できる可能性を示した。以上より、本研究は細胞内A-to-I RNA編集を利用した部位特異的RNA編集技術の基盤的技術を開発した。

審査の結果の要旨

本博士学位申請論文は、生体内のA-to-I編集酵素ADARを用いて、新規の機能性RNAを設計し、生体内のRNA上の遺伝情報の書き換えが選択的に可能であることを示したものであった。1章では、A-to-I編集酵素ADARが行うA-to-I RNA編集機能およびゲノム編集技術との相違その有効性、さらに部位特異的なRNA編集技術の基盤と応用技術に述べ、2章においては、編集酵素ADAR2によるRNA編集の構築方法とその機能性RNAの作成に関して、3章においては、ヒト細胞において、より高効率かつ特異性の高いRNA編集技術を構築するために、より汎用性の高い機能性RNAのデザインと構築方法を示した。

以上の論文は、ヒト生体に存在するADARタンパク質の機能であるRNA編集機能を用いて、RNA情報を改変する機能性RNAの設計および構築を可能としたことを示した。これらの結果は、ヒト細胞における新規の生物化学分野の構築および核酸医薬技術などに貢献するものであり、博士論文の要件を十分に満たすものと評価できる。

本審査の内容は、令和3年1月26日午前10時より、理学部9号館922教室において、さらに新型コロナウイルス感染防止のため遠隔視聴するためWebEXを用いて、公聴会形式にて発表された。公聴会において、会場にて12名、WebEXにて12名、計24名が参加し、質疑応答が行われた。質疑においては、生物における本質的なRNA編集の生物学的意義やゲノム編集との相違および応用技術に関して議論された。また、実験技術的な問題点およびヒトにおける機能性RNAとの相違などに関しても質疑がなされたが、それぞれ適切に回答した。最終的には、主査1名および副査2名により審査され、全員一致で合格とした。