

# 論文内容の要旨

## 論文題目 ヒト mRNA における新規 RNA エディティング部位の網羅的探索

氏名

櫻井 雅之

### 序論

ヒトゲノム配列の精密化が完了し、タンパク質遺伝子の総数が約 22000 個と見積もられた。これは従来予測されていた約 35000 個を大幅に下回り、ショウジョウバエ( 20000 個 )や線虫( 19000 個 ) の遺伝子数と大きな差がないという衝撃の事実であった。また、マウスとはタンパク質遺伝子配列の 99%が相同性を持つと言われている。このことからゲノム情報単独や mRNA の転写制御による量的な変化だけでヒトの脳機能に代表される高次生命現象を説明することはもはや不可能である。遺伝情報発現機構の理解には転写後プロセッシングによる mRNA の質的な変動や機能性 RNA による調節機構の解明が不可欠である。

A-to-I RNA エディティングは RNA の転写後プロセッシングの一種であり、二本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミナーゼ(ADAR; adenosine deaminase acting on RNA)により、RNA の二本鎖領域におけるアデノシン(A)が脱アミノ化してイノシン(I)へと修飾される機構である(図 1)。I はその構造上シチジン(C)と塩基対を組み、塩基情報としてはグアノシン(G)のように振舞うため、A から G へと RNA の遺伝情報が変化することになる。哺乳動物には、ADAR1 ~ 3 の 3 種類のファミリーが存在し、脳をはじめとして広く組織全体で発現している。

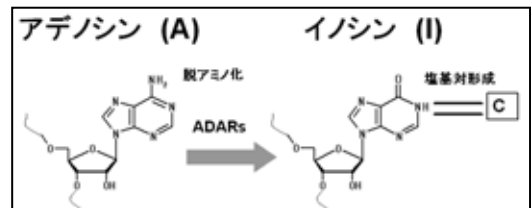


図 1 A-to-I RNA エディティング反応機構

mRNA における A-to-I RNA エディティングは、遺伝暗号の変化(アミノ酸変化)、選択的スプライシングの制御、二次構造の変化、mRNA の分解や局在制御などに関与している(図 2)。哺乳動物における

A-to-I RNA エディティングの例としてはグルタミン酸受容体のサブユニット B(GluR-B)、セロトニンレセプター(5-HT<sub>2c</sub>)、アデノシンデアミナーゼ 2 (ADAR2)自身の mRNA などが知られている。GluR-B mRNA では ADAR2 によりエキソン 11 番中の A が I へとエディティングされ、アミノ酸配列がグルタミンからアルギニンへと変化する。この変化が受容体のカルシウム透過性を調節して正常な神経機能を維持している。近年では高頻度で I 化された二本鎖 RNA が様々なタンパク質と複合体を形成し、この RNA の分解、核外輸送阻害、I-RNA 依存的タンパク質リン酸化活性が報告されている。また、マイクロ RNA 前駆体におけるエディティングも発見され、さらには RNA エディティングと RNA 干渉が拮抗すると言う興味深い概念が提唱されている。

これまでに知られている A-to-I RNA エディティング部位はわずか数種類の mRNA 中に偶発的に見つかったものに過ぎない。一方、ADAR は脳で高発現しており、ヒト脳の mRNA には 17000 塩基に 1 塩基の割合で I が存在すると見積もられている。これらのことから A to I RNA エディティングはより普遍的な機構として存在し、トランスクリプトームの複雑性を増加させ、脳機能に代表される高次生命現象と関連している可能性がある。

以上のことから私は A-to-I RNA エディティングによる遺伝情報発現制御機構が、転写後から翻訳の段階における mRNA 転写後プロセッシング機構や機能性 RNA による調節機構の制御に深く関わっていると考えた。そこで本研究ではこの概念に基づき、ヒト mRNA の新規 RNA エディティング部位を網羅的に同定することを目指した。

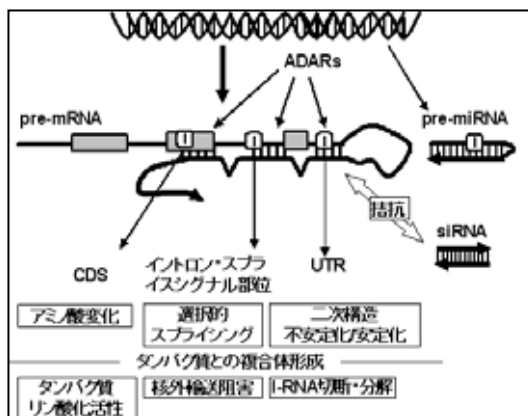


図 2 A-to-I RNA エディティングの機能

## 結果と考察

### 1) 簡便・高感度なRNA中のI検出技術の開発

これまで mRNA 中の I 部位を判別には matched-tissue 法が用いられてきた。これは同一個体の同一組織から得られた RNA (cDNA として増幅) とゲノムで相当する領域の配列を比較する方法である。I は C と塩基対を形成するため、mRNA から逆転写・PCR 増幅を経ると cDNA 中の I 相当部位には G が取り込まれている。ゆえにエディティング部位ではゲノム上の塩基が A であるにも関わらず、cDNA 上では G または A/G の混在となっている。この手法の問題点として、I に由来する G の混在と、反応時のエラーや対立遺伝子由来の一塩基多型(SNP)、多重遺伝子、偽遺伝子を原因とする I に由来しない G の混在との判別が不可能な点が挙げられる。また、同一組織由来の RNA とゲノムが必要であるため、貴重・微量なサンプルを解析するのは難しい。

本研究では以上の問題を解決し、簡便・高感度でサンプルに制限されず I 部位を検出・証明が可能な新規 I 部位

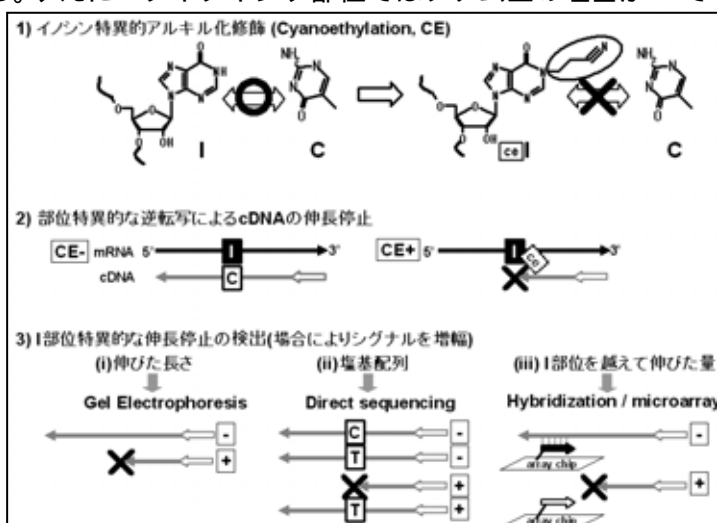


図 3 ICE (Inosine Chemical Erasing) 法の概要

同定技術: ICE (Inosine Chemical Erasing) 法の開発に取り組んだ。この手法の原理は次の3段階から成る(図3)。(1)化学試薬(現段階ではアクリロニトリル)によるRNA中のIに対して特異的な修飾を施す。通常IはCと塩基対を形成するが、アクリロニトリルを反応させるとIの1位が特異的にシアノエチル(CE)化され、Cとの塩基対形成が阻害される。(2)逆転写によるcDNAの伸長反応を行う。CE化未処理のRNA(CE-)ではIに対してCを取り込んでcDNA伸長が進むが、CE化したRNA(CE+)ではCE化されたI(ce-I)に対してCが取り込まれずに伸長が手前で停止する。(3)cDNAのI部位特異的な伸長停止を検出する。検出法としては(i)cDNAの長さを比較する。(ii)cDNAの塩基配列を読みCが取り込まれていないことを確認する。(iii)I部位上流側に設計したプローブを用いてI部位を越えて伸長したcDNAを定量して比較する方法が挙げられる。

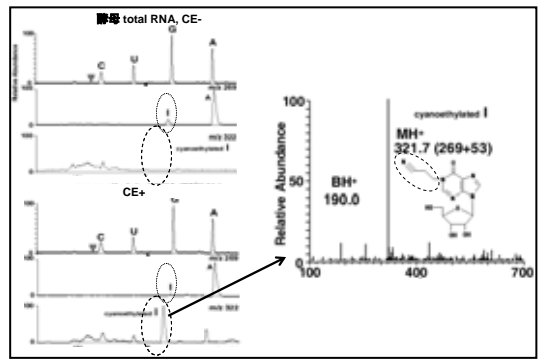


図4 I特異的シアノエチル化修飾のLC/MS解析

まずCE化の条件検討を酵母及びマウスのtotal RNAを用いて行い、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)法により解析した結果、ほぼI特異的なCE化に成功した(図4)。

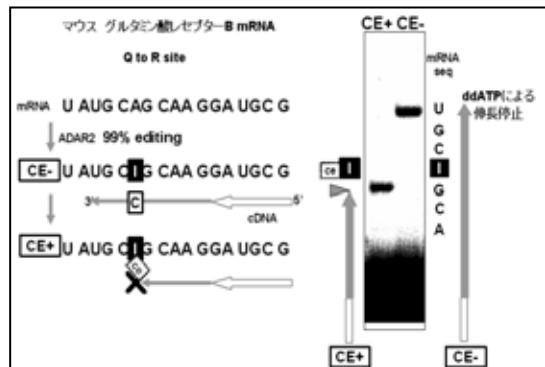


図5 cDNAのI部位特異的な伸長停止の検出

次にマウス total RNAを用いてGluR-B mRNAに対してプライマー伸長法を行ったところ、CE-ではI部位を越えてcDNA伸長が進んだが、CE+ではI部位の一塩基手前でのcDNA伸長停止が確認できた(図5)

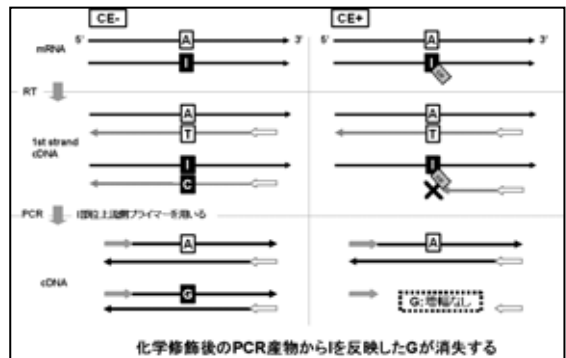


図6 Iに由来する由来Gシグナル消失原理

さらに検出感度を向上させるため、エディティング候補部位をはさんで上流・下流にプライマーを設計し、下流より逆転写したcDNAをPCRにより増幅した。ce-Iにより伸長停止したcDNAには、上流プライマーの相補領域が存在せず、PCRの鋳型にはならないため、PCR増幅後のcDNA配列をCE±で比較すると、CE-では候補部位がA/G混在(もしくはG)であるのに対し、CE+ではAのみ(もしくは増幅無し)となる(図6)。この場合はCE- cDNAにおけるGはIを反映したものであり、候補部位におけるIの存在が証明される。一方、混在比率に変化が無い場合、候補部位にIは存在しないと確実な判断を下すことができる。実際にこのような挙動を示すことをマウス5-HT<sub>2c</sub>R mRNAで確認した(図7)。この解析に必要なtotal RNAの量は一領域当たり100ng以下であり、十分実用に耐えうる。

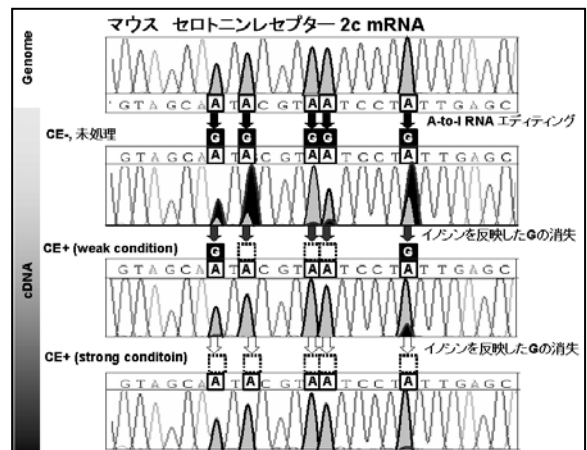


図7 ICE法によるI部位の検出

## 2) 遺伝子情報データベースを利用した新規RNAエディティング候補部位の網羅的抽出及びICE法によるスクリーニング

EST/ゲノムデータベース上では、A-to-I RNA エディティング部位ではゲノム上の塩基がAであるにもかかわらず、cDNA 上では G または A と G の混在となっていると考えられる(図 8)。そこで私はヒト EST データベース約 440 万配列とゲノムの比較から A/G 置換部位を抽出して既知の SNP 部位を除去し、マウスとの共通項をとることで約 7 万箇所を抽出した。この中からさらにノイズの除去と絞込みを行い、エディティング優先的に約 200 箇所抽出した。これら候補部位のスクリーニングを ICE 法により試みたところ、新規エディティング部位を 31 遺伝子(226 箇所)程度同定することに成功した。

これら新規エディティング部位は各 mRNA の 3'UTR 領域に位置していた。そのうち 7 種類の遺伝子(ZBTB24, RAB11FIP4, F11R, PSMB2, ENDOGL1, PAICS)について mfold プログラムによる二次構造予測を行った結果、全ての部位が長い二本鎖領域に存在

していた。エディティング部位の分布は 200 塩基内に 2~7 箇所存在するケースが多いが、中には ACSL6 のようにほぼ 100% I 置換部位が 1 箇所存在するという場合や、FLJ23322 のように 200 塩基内に 30 箇所ものエディティング部位が存在する場合も発見された。また分子間二本鎖領域を形成しうる APAF1, EB-1 mRNA のセンス・アンチセンス対領域における RNA エディティングがみつかった(図 9)。さらに脳特異的なエディティングが ENDOGL1 mRNA で見つかった。

### 結論

本研究では微量 RNA 中の I を同定する手法(ICE 法)の開発を行った。これまでは非常に困難であった I の存在の証明を、ICE 法では RNA 試料のみで行うことが可能である。I 同定法として ICE 法と代替可能なものは今のところ知られていない。続いて RNA エディティング候補部位のデータベースを構築し、ICE 法を用いてスクリーニングを進めた結果、これまでに 226 箇所のエディティング部位の同定に成功した。同定された部位では近傍で高頻度のエディティングが起きているものやセンス・アンチセンスペア領域に存在するもの、また組織特異的なエディティングが起きているものも見付き、遺伝子制御機構との関わりが示唆された。

展望として、ICE 法をマイクロアレイへ応用することによりゲノムワイドなエディティング部位の同定が可能であると考えられる。また新規エディティング部位の機能解析から、RNA エディティングが支配する新しい遺伝子発現制御機構の全貌解明が期待される。

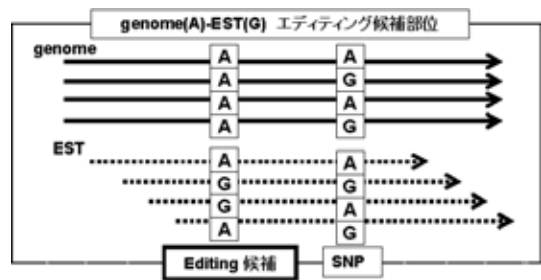


図 8 EST データベースに見られる RNA エディティング候補部位

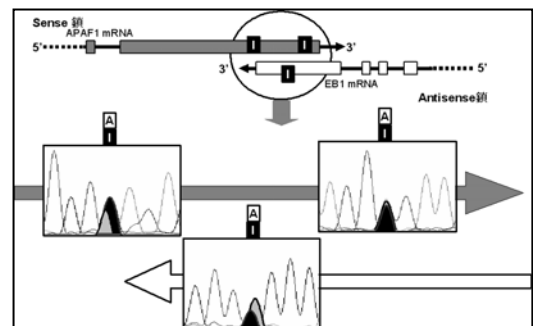


図 9 センス・アンチセンスペア領域における RNA エディティング部位