

Z型RNA同定への挑戦とその生理的・病的意義の解明

大阪大学大学院医学系研究科神経遺伝子学教室

中濱 泰祐

1. 緒言

自然界に存在するRNA分子の多くは、相補性の高い部分で2本鎖を形成する性質があるが、そのほとんどは右巻きのA型である。左巻きのZ型RNAはA型と比べて不安定であるため、*in vitro*の非生理的条件下でしか再現することができておらず⁽¹⁾、生体内での存在証明はなされていない。一方で、Z型RNAへの結合ドメイン(ZBD α)を保有するタンパク質が複数報告されており、その一つにADAR1がある⁽²⁾。ADAR1は2本鎖RNA中のアデノシンをイノシンへと置換するRNA編集酵素であるが、この編集はADAR1が持つ2本鎖RNA結合ドメイン(dsRBD)と脱アミノ化ドメインによって触媒されるため、ZBD α のRNA編集における役割は不明である。しかし、RNA編集は全転写産物の85%、100万箇所以上にも生じていることから⁽³⁾、その基質の中にはZ型構造を形成し、ZBD α を介して編集が生じる部位が存在するのではないかと仮説を立てた。

一方、RNA編集には、内在RNAの2本鎖構造を緩めることで、センサー分子MDA5によって異物として認識されることを回避する効果がある⁽⁴⁾。この機構の破綻は、IFNの異常産生や脳症を特徴とするエカルディ・グティエール症候群(AGS)を引き起こすと考えられており、ADAR1やMDA5の遺伝子変異がAGS患者において多数同定されている^(5,6)。しかし、どの基質に生じるRNA編集が非自己化を回避するうえで必要なのかは明らかになっていない。そこでAGSの原因となるADAR1遺伝子点変異の多くは脱アミノ化ドメインに見つかっているものの、ZBD α 内にも見出されている点に注目し、ZBD α を介したRNA編集が内在RNAの非自己化回避の鍵となっているのではないかと着想した。

本研究では、ZBD α を介したRNA編集部位を特定することにより、未だに存在が証明されていない生体内Z型RNAを同定することを目指した。さらに、その編集がMDA5活性化回避に必要な不可欠であることを検証することで、その意義を明らかにし、最終的にAGSの発症病態を解明することを目的とした。

2. 研究方法

培養細胞を用いたZBD α のRNA編集に及ぼす影響の解析：

ゲノム編集にて全てのRNA編集酵素を欠損させたRaw264.7細胞に、野生型あるいはZ型RNAへの結合活性を欠損する変異型(ZBD α -Mut)ADAR1コンストラクトを導入し、RNAを抽出後、RNA-SeqにてRNA編集部位やその編集効率を網羅的に解析した。RNA編集によって生じたイノシンは、cDNAライブラリーの調整段階で構造的に近いグアノシンとして振る舞うため、ゲノム配列と比較してアデノシンからグアノシンへの置換が生じた部位をRNA編集部位とした。

ZBD α 不活化型変異ノックインマウスの表現型解析：

ZBD α -Mut ADAR1を発現するマウスをゲノム編集にて樹立し、その表現型解析を実施した。最初にZBD α -Mutマウスの生育を観察し、そのうえで、MDA5活性化の指標となるインターフェロン誘導遺伝子群(ISG)の発現レベルをqPCRにて定量した。また、AGSの主座である脳の解剖学的異常やアストロサイト、ミクログリアの活性化の有無について組織染色にて検証した。さらに、MDA5ノックアウト(KO)マウスと交配させることで、ZBD α -Mutマウスで認められた異常がMDA5活性化に起因するか検証した。

ZBD α を介したRNA編集部位の同定：

ZBD α -Mutマウスから脳を単離し、RNA-Seqにて編集部位及び編集効率を解析した。野生型と比較して編集効率の低下する部位リストを作成し、培養細胞で得られた情報と統合した。*in vitro*と*in vivo*で共通する編集効率低下部位については、当該領域のみをPCRで増幅し、サンガーシーケンス解析を実施することで、RNA-Seqでは検出できなかった近傍に存在する編集についても検討した。

3. 研究結果及び考察

培養細胞を用いたZBD α のRNA編集に及ぼす影響の解析

哺乳類におけるRNA編集は2つのADAR1 isoform(p110, p150)とADAR2によって触媒される⁽²⁾。全てのADARタンパクが2本鎖RNA結合ドメイン(dsRBD)と脱アミノ化ドメインを持つが、ZBD α を持つのはADAR1 p150のみである。ZBD α を介したRNA編集のみを精度良く同定するため、これら全てのADARを欠損するRaw264.7細胞を樹立し、野生型あるいはZ型RNAへの結合活性を欠損する変異型(ZBD α -Mut)ADAR1 p150を発現させたうえで、総編集部位数及び平均編集効率を算出した。その結果、ZBD α -Mut ADAR1 p150発現細胞におけるRNA編集が野生型に比べ有意に低いことが判明した(図1)。本結果は、特定の部位においてADAR1 p150

が効率的にRNA編集を実行するためには、ZBD α が必要であることを示している。

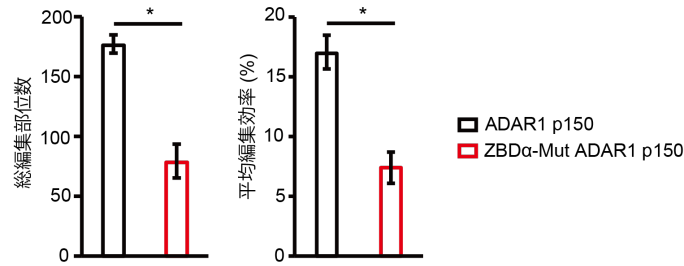


図1. ZBD α 不活化変異によるRNA編集の低下
総編集部位数(左)及び平均編集効率(右)。* $P < 0.05$

ZBD α 不活化型変異ノックインマウスの表現型解析:

ZBD α を介したRNA編集の生理的意義を解明するため、ZBD α -Mut ADAR1を発現するマウスをゲノム編集にて樹立し、その表現型解析を実施した。その結果、ZBD α -Mutマウスは著しい成長不良を伴う生後致死を示すことが判明した(図2A)。さらに、インターフェロン誘導遺伝子群(ISG)の一つである*Cxcl10*の発現が上昇しており、特に脳において顕著であった(図2B)。一方で、MDA5を欠損させると、ZBD α -Mutマウスが示す生後致死やISGの発現上昇は正常化しており、これらの異常はMDA5の活性化に起因することが明らかになった。ADAR1遺伝子変異によって引き起こされるAGSは脳症を主症状とし、インターフェロンの異常産生を伴う⁽⁶⁾。ZBD α -MutマウスにおけるISGの上昇が脳で最も顕著であったことから、次に脳の解剖学的異常やアストロサイト、ミクログリアの活性化の有無について調べた。その結果、大脳皮質、白質の菲薄化、脳室の拡大などの解剖学的異常に加え、アストロサイトやミクログリアの増生が認められた(図2C, D)。この結果は、ZBD α -MutマウスがAGS様の症状を呈すモデルとなり得ることを示唆している。

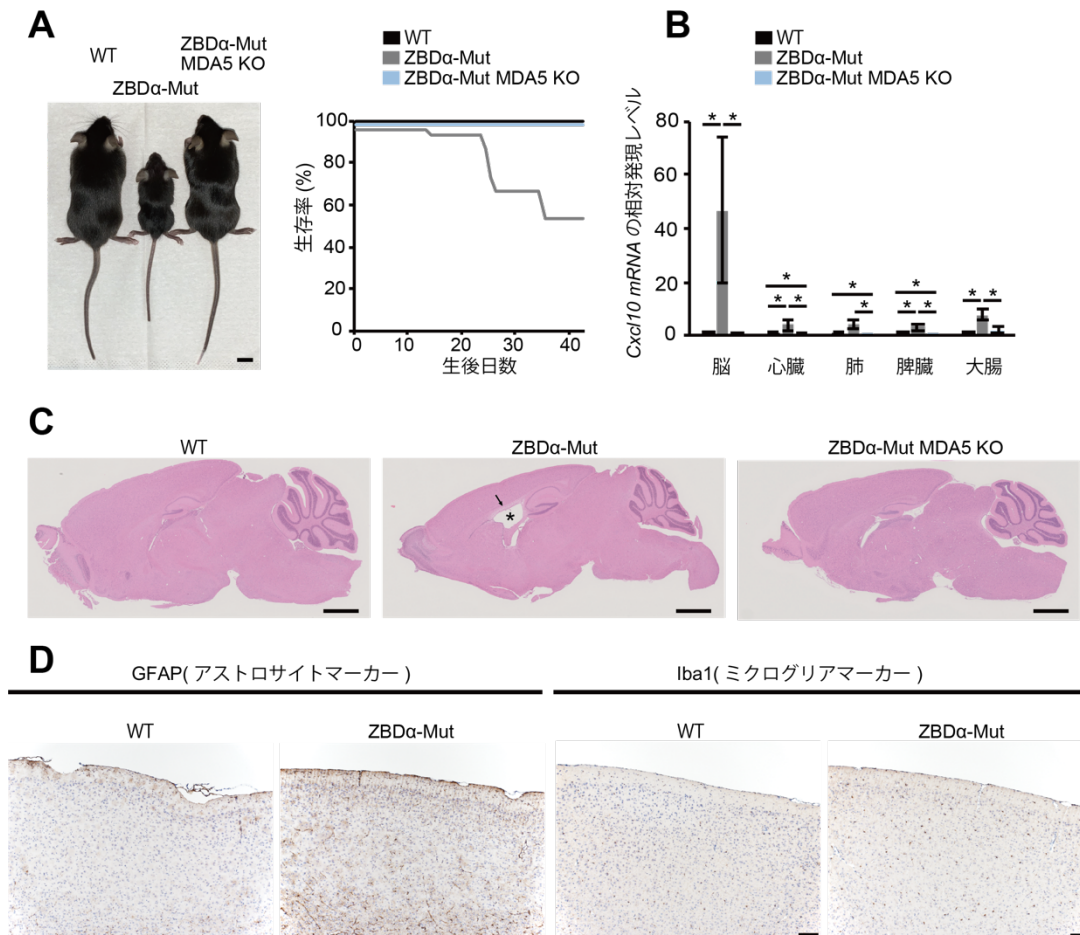


図2. ZBD α -Mutマウスが示すAGS様症状

- A. 写真(左)及び生存曲線(右)。
- B. マウス各臓器における*Cxcl10* mRNAの相対発現量。
- C. 脳のHE染色像(スケールバー:1.25mm)。* $P < 0.05$
- D. 大脳皮質の免疫染色像(左:GFAP、右:Iba1、スケールバー:100 μ m)。

ZBD α を介したRNA編集部位の同定:

*in vivo*においてZBD α を介したRNA編集部位を特定するため、ZBD α -Mutマウスの脳におけるRNA編集を

解析したところ、予想に反して総編集部位数や平均編集効率が有意に上昇していた(図3A)。そこで、ADAR1の発現レベルを調べたところ、ZBD α -MutマウスにおけるADAR1 p150量が上昇していることが明らかになった(図3B)。ADAR1 p150はインターフェロン誘導性プロモーターによって制御されているため⁽²⁾、ZBD α -MutマウスにおけるMDA5活性化がADAR1 p150の発現を誘導し、その結果、RNA編集が増加しているものと考えられた。本結果は、ZBD α -Mut ADAR1 p150が過剰量存在していれば編集効率を補償できることを示唆している。一方で、この補償効果が作用しているにも関わらず、ZBD α -MutマウスにおけるMDA5は活性化したままであったため、補償できない部位があり、その編集がMDA5活性化回避に必要と考えられた。そこで培養細胞と共通して有意に編集が低下する部位を絞り込み、そのうえで、RNAfoldにて予測された2本鎖構造内の全RNA編集をサンガーシーケンス法にて解析した。その結果、2本鎖構造中央では編集の低下が認められたが、一方で両端は編集が増加していることが判明した(図3C)。さらに、この編集低下領域はZ型構造予測ツールZ-huntにおいても高値を示しており、Z型構造を形成しているものと考えられた。

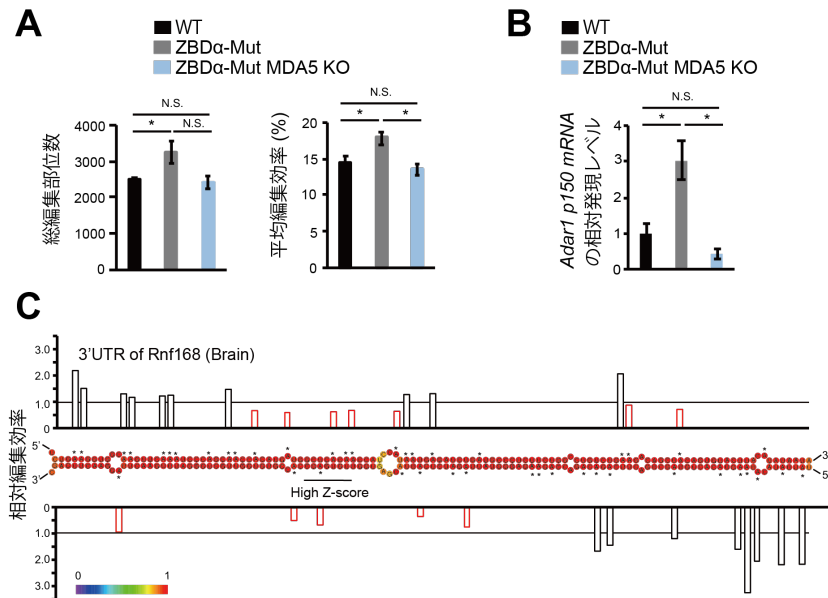


図3. ZBD α -MutマウスにおけるRNA編集

- マウス脳における総編集部位数(左)及び平均編集効率(右)。* $P < 0.05$
- マウス脳における*Adar1 p150* mRNAの相対発現量。* $P < 0.05$
- Rnf168 3' UTRにおける相対編集効率

4. 結語

本研究では、ADAR1のZBD α を介したRNA編集部位を同定し、その意義の解明を目指した。その結果、Z型RNAへの結合活性を欠損する点変異をノックインしたマウスがISGの上昇や脳の解剖学的異常などのAGS様症状を示すことが明らかとなった。また、編集が低下する部位を特定することにも成功しており、今後は同定した基質がZ型構造を形成するか否かを生化学的手法により検証する予定である。

最後に多大なるご支援を賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深く感謝申し上げます。

5. 参考文献

- Placido D. et al. A left-handed RNA double helix bound by the Z alpha domain of the RNA-editing enzyme ADAR1. *Structure*. 2007, 15:395-404.
- Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem*. 2010, 79:321-349.
- Athanasiadis A. et al. Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. *PLoS Biol*. 2004, 2:e391.
- Liddicoat BJ. et al. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science*. 2015, 349:1115-1120.
- Rice GI. et al. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet*. 2012, 44:1243-1248.
- Oda H. et al. Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. *Am J Hum Genet*. 2014, 95:121-125.

6. 本助成による発表論文

- Inoue M[#], Nakahama T[#], Yamasaki R, Shibuya T, Kim JI, Todo H, Xing Y, Kato Y, Morii E, Kawahara Y. An Aicardi-Goutières Syndrome-Causative Point Mutation in Adar1 Gene Invokes Multiorgan

- Inflammation and Late-Onset Encephalopathy in Mice. **J Immunol.** 2021, In press. (**#Co-first authors**)
2. **Nakahama T**, Kawahara Y. Deciphering the Biological Significance of ADAR1-Z-RNA Interactions. **Int J Mol Sci.** 2021, 22:11435.
 3. **Nakahama T**, Kato Y, Shibuya T, Inoue M, Kim JI, Vongpipatana T, Todo H, Xing Y, Kawahara Y. Mutations in the adenosine deaminase ADAR1 that prevent endogenous Z-RNA binding induce Aicardi-Goutières syndrome- like encephalopathy. **Immunity.** 2021, 54:1976-1988.
 4. Kim JI[#], **Nakahama T**[#], Yamasaki R, Costa Cruz PH, Vongpipatana T, Inoue M, Kanou N, Xing Y, Todo H, Shibuya T, Kato Y, Kawahara Y. RNA editing at a limited number of sites is sufficient to prevent MDA5 activation in the mouse brain. **PLoS Genet.** 17, e1009516, 2021. (**#Co-first authors**)
 5. Vongpipatana T[#], **Nakahama T**[#], Shibuya T, Kato Y, Kawahara Y. ADAR1 Regulates Early T Cell Development via MDA5-Dependent and -Independent Pathways. **J Immunol.** 204, 2156-2168, 2020. (**#Co-first authors**)
 6. **Nakahama T**, Kawahara Y. Adenosine-to-inosine RNA editing in the immune system: friend or foe? **Cell Mol Life Sci.** 77, 2931-2948, 2020.