RNA依存的ゲノム塩基編集変異によるがん化と炎症

東京理科大学 研究推進機構生命医科学研究所 分子病態学研究部門

櫻井 雅之

［背景］

核酸の塩基修飾はこれまでRNAで主に発見されており、中でもmRNAにおいては、アデノシン(A)脱アミノ化反応によるイノシン(I)塩基への修飾が部位数と存在量ともに最も多いことが、近年の核酸配列解析技術の発達により明らかにされてきた(図A)。イノシンはグアノシン(G)と構造が似ているA:T(U)からI(=G):Cへ塩基対形成能が変わる。そのため見かけ上遺伝子情報がAからＧへと編集されることから、この修飾はA-to-I 編集と呼ばれる。この変化はRNAの高次構造や細胞内局在、スプライシングパターン、mRNAの安定性、アミノ酸変化によるコードするタンパク質の機能調節、タンパク質への翻訳効率をも制御する。このような制御機構はゲノムには記載されていないが、単なるON-OFFではなく即座に遺伝子の機能活性をFine-tuningして細胞が生存するための臨機応変な対応に必要不可欠な機構である。

［着想］

報告者はRNAのA-to-I編集を担う酵素であるADAR (Adenosine Deaminase Acting on dsRNA: 二本鎖RNA特異的アデノシン脱アミノ化酵素) の機能再検証により、これがDNA:RNAハイブリッド鎖をも基質とし、ある条件化ではRNAのみならずDNA鎖のアデノシンすら脱アミノ化修飾することを発見した(図B,C)。ADARによるRNA編集は、線虫からハエ、脊索動物で見られ、哺乳動物、特にヒトなど霊長類で突出して発見されている。よって、報告者の発見はRNAによってガイドされるゲノム配列編集機構がヒトにも内在する可能性を示している。この場合、DNAにおけるA-to-I編集機構はAからGとほぼ同義の塩基の置換、すなわちDNAの塩基置換と捉えることができる。

この観点から生じる最初の疑問は編集の対象となるDNA:RNAハイブリッド鎖がいつ、どこで形成されているかである。最も可能性の高い対象として報告者は今回、R-loopと呼ばれる構造に着目した。通常、転写によって新規合成されたRNA鎖は鋳型DNAから即座に解離するが、一部の配列ではRNA鎖が再び鋳型DNAと対合して二本鎖DNAよりも安定なRNA: DNAハイブリッド鎖を形成したまま留まり、DNAセンス鎖は一本鎖のままとなる (図B)。この構造はR-loopと呼ばれ、ゲノム構造の不安定化や転写産物のプロセシング阻害を引き起こし、DNA損傷や変異、複製ストレスを誘起して細胞死や炎症の原因となるため、新たな危険因子として注目されている。ヒトではR-loopの形成が自己免疫疾患であるアイカルディ・グチエール症候群(AGS)・運動失調動眼失行症2型(AOA2)・脆弱性X症候群(FXS)・前頭側頭型認知症(FTD)・筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの重大難治疾患の原因となることが報告されている(図B)。

［目的］

以上をふまえ本研究計画では、このDNA編集機構が細胞集団にとって害または益であるかを探求することを第一の目的とした。第二に、このDNA編集の適切な制御が破綻した場合、細胞のがん化、細胞死、そして細胞傷害による炎症が引き起こされると考えられ、この検証を目的とした。

［目標１］ゲノム編集(アデノシン脱アミノ化修飾)によるがん化機構の解明

ADARによるハイブリッド鎖のDNA編集は細胞に内在するRNA依存的DNA変異導入機構とも考えられる。これは生命にとってがん化の要因であり脅威のはずである。それ故、正常細胞ではこの機構によるDNA編集変異を最小限に抑える機構が存在すると考えられるが、そのような研究はこれまで全く行われてきていなかった。しかしその抑制機構の破綻ががん化を引き起こす事は想像に難くなく、事実、報告者はがん患者に特有なADAR1遺伝子上の変異を見出している。他方、DNA編集をガイドするRNAが細胞や組織、また時期ごとに多様な発現の違いを示し、能動的なゲノム塩基置換による多様性の産生と適切な生命活動、またはDNA変異の修復機構として貢献することが想定された。本計画ではこの点を考慮し、DNA編集の生命に与える影響として負と正の両側面を想定した研究解析を進めた。

［成果１－１］ADAR発現抑制及びADAR遺伝子再導入によるR-loop量変動の復帰実験

がん化した細胞では亢進した細胞生存性とRNA転写により、顕著なR-loopの形成が知られている。今回報告者は、予備的成果で得ていた、R-loop特異的抗体を用いてHeLa培養細胞核内でR-loopの局在がADARのものと一致することを確認し(図C)、R-loop量がRNAi法によるADAR発現抑制時に3倍以上増加することの再現性を確認した(図D)。そして新たに、ADAR発現抑制時に外部よりADAR遺伝子を導入することにより、内在ADAR発現抑制によるR-loop量の増加がキャンセルされ、ネガティブコントロール条件と同程度まで

復帰する結果が得られ(図D)、細胞内R-loopの制御にADARが関与していることがより明白となった。

[成果１－２]免疫沈降法解析と次世代シークエンスによる解析

上記結果を受けて、R-loop形成部位とADARの作用部位の特定を進めるため、ヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293Tを用いて、RNAi法によるADAR遺伝子の発現抑制有無条件下で培養後、DNA及びRNA成分を抽出精製した。次いでR-loop抗体を用いて免疫沈降を行ったのち、得られたRNA鎖またはDNA鎖の配列解析を次世代シークエンス法により解析を行った(図E)。

並行して、Flagタグ付加ADARを導入した同培養細胞でFlagタグ抗体を用いた免疫沈降を行い、同様に得られたRNA鎖またはDNA鎖の配列解析を行った(図E)。この際に同時にFlagタグ免疫沈降産物からに含まれるタンパク質種のウェスタンブロッティングによる検出解析により、RNaseH1, RNaseH2ABC, DHX9, DHX21などRNA:DNA鎖分解酵素や二本鎖を巻き戻すヘリケース群がADARと複合体を形成していることを発見した(図F)。

二通りの次世代シークエンス法による配列解析の結果からは、R-loopと思われる領域候補が検出されたが、免疫沈降反応時の非特異吸着が原因と考えられる高いノイズのため、Signal/Noise 率が低くなってしまうことが、現状法では回避不可能であるとの判断に至った(図E)。そこで解決策の1つとして、追加のR-loop特異的な免疫沈降法による精度向上を目的として、上記複合体タンパク質のうち最もR-loopに関わると判断した、RNaseH2ABC複合体を利用して、RNA分解能を失活する変異を導入してR-loopへの結合を安定化したFlagタグ付加発現系の作製を進めている。

[成果１－３]ウェスタンブロッティングおよびフローサイトメトリーによる細胞表現型解析

予備的成果では、R-loop形成を促進する抗がん剤であるカンプトテシン添加時と同様に、ADAR1発現抑制時においても、がん細胞はDNA損傷を伴う分裂期での細胞周期停止と細胞死を示し(図G,H)、両処理によりカンプトテシンへの感受性が数百倍に増加することを見出していた。

本研究成果では、ADAR発現抑制時のR-loop増加現象の原因または結果となる細胞表現型をさらに詳しく同定するべく、マーカー遺伝子のウェスタンブロッティングによる発現量変動解析(図G,H)とフローサイトメトリーによる細胞周期の解析(図I)をHeLa培養細胞にて行った。その結果、細胞表現型としてADAR発現抑制時にはγH2AXだけでなくRPA32やDNA-PKCsのリン酸化状態の上昇が観察され、DNA損傷の増大と修復系の活性化が明らかとなった。さらにCyclin B1だけでなく、Histon3、CDC2、PLK1のリン酸化状態の解析結果から、細胞周期のうち、顕著に細胞分裂期における停止が明らかとなった(図G,H)。同時にこれら表現型に伴ったアポトーシスを示すPARP1分解産物の増加を確認した(図G)。加えて、ADAR発現抑制とR-loop増加作用を持つ抗がん剤であるカンプトテシン添加時の細胞周期をフローサイトメトリーにより解析し、細胞分裂期における細胞周期停止を確認し(図I)、R-loop量がカンプトテシンとADAR発現抑制同時処理時に最も増加することを見出した(図J)。

[成果１－４]ADAR発現抑制時の核型異常の検出

上記ADAR発現抑制が引き起こすDNA損傷と細胞分裂期停止によるアポトーシスの原因あるいは結果と推察される、異常な細胞核型を示す細胞集団率の上昇をHeLa細胞の顕微鏡観察実験により見出した。

[考察と展望１]

以上の研究成果から、ADARがRNA:DNA鎖の解消に寄与していること、またその発現減少によりR-loopの蓄積によるDNA損傷を含めた細胞傷害が引き起こされることを解明した。一方、がん化した細胞においてはADARの発現または活性を抑制することで、R-loopの蓄積が既に多いがん細胞の死を引き起こす抗がん剤であるカンプトテシン類の投与量を極めて低く抑えることが可能であることが示唆された。これはADARを対象とした創薬の有効性を示したものである。

[目標２] ADAR1活性異常が引き起こすAGS疾患における炎症惹起の分子機構解明

自己免疫疾患であるAGSではADAR1遺伝子の変異がインターフェロン(IFN)応答を引き起こすことが原因とされている。Adar1ノックアウトマウスは胚発生時に組織発達不全により死に、内在性の二本鎖RNAの増加がIFN応答を引き起こすことが原因と考えられている。しかし未だに原因となるRNA群は同定されていない。一方AGSの原因となる変異遺伝子にはRNASEH2などR-loop解消遺伝子群が報告されている。そこで本計画ではIFN応答惹起機構として、R-loopの蓄積が引き金となる仮説を立てた。第一に、切断を受けたDNA:RNAハイブリッド鎖がIFNを惹起する経路、第二に、R-loopの一本鎖センスDNAから新規に転写されたアンチセンスRNAがDNA:RNAハイブリッド鎖のRNAと新たに二本鎖RNAを形成してIFNを惹起する経路である(図K)。ADAR1はこれら経路に対して抑制的に働いていると考えられる。

本計画では、野生型とAdar1ノックアウトマウスの胚発生過程におけるR-loopの形成部位と頻度をIFN応答と共に解析し、R-loopに起因するIFN応答の原因核酸構造とアンチセンス鎖転写因子の同定と、AGS患者に重複して発見されている遺伝子変異を導入したADAR1変異体を用いて、R-loop解消機構への効果を解析し、AGS発症の分子機構を解明することを目指し、始めに培養細胞におけるADAR発現抑制とIFN誘導機構の解明を進めた。

[成果２－１]ゲノム＆RNA編集異常が引き起こすAGS疾患における炎症惹起の分子機構解明

HeLa細胞株を用いてADARをRNAi法により発現減少させ、その際のIFN誘導状況を解析した。まずHeLa

細胞ではそもそもIFN応答が起きにくいことが問題点として明らかとなったが、それでもIFN応答の若干の増加が確認された(図L)。また、報告者自身が先行研究時に報告公開したADAR発現抑制時の次世代シークエンスデータの解析により、顕著に特ADAR発現抑制時に顕著に増加する遺伝子として、特徴的な転写因子群Xを見出した(図K, M)。この結果から申請時に提案した、「R-loopの一本鎖センスDNAから新規にアンチセンスRNAの転写が活性化され、DNA:RNAハイブリッド鎖側のRNAと、より安定な二本鎖RNA構造形成が新たに促されてIFNを惹起する経路」仮説が支持された。現在さらなる検証実験に向けてこの転写因子の発現抑制および遺伝子導入実験系の準備を進めている。

［考察と展望２］
以上の結果からは、これまで知られていなかった新しいRNA:DNA鎖の蓄積による炎症応答経路同定への知見と、またR-loopを原因とする難治性疾患への新たな対処・創薬への手がかりが得られた。

［謝辞］
本研究成果はWistar研究所Prof. Kazuko Nishikura，城本悠助博士との共同研究による部分を含みます。本研究は当研究室所属スタッフと学生により、現在進行系の形で知見を積み重ね、本研究計画の目標の完全達成へと進んでいます。最後に、研究環境を立ち上げるまさに研究費の必要な段階での本助成をいただけたことにより、このような円滑な研究環境を築くに至り、円滑な研究推進を行うことが出来ました。本助成と財団の皆様には深く感謝を申し上げます。

［成果報告文献］
櫻井雅之　「もう一つの遺伝子 ”編集” – 哺乳動物が備える核酸塩基の編集機構」
MSD メディカル・サイエンス・ダイジェスト (ニューサイエンス社) 45: 576-577 (2019)

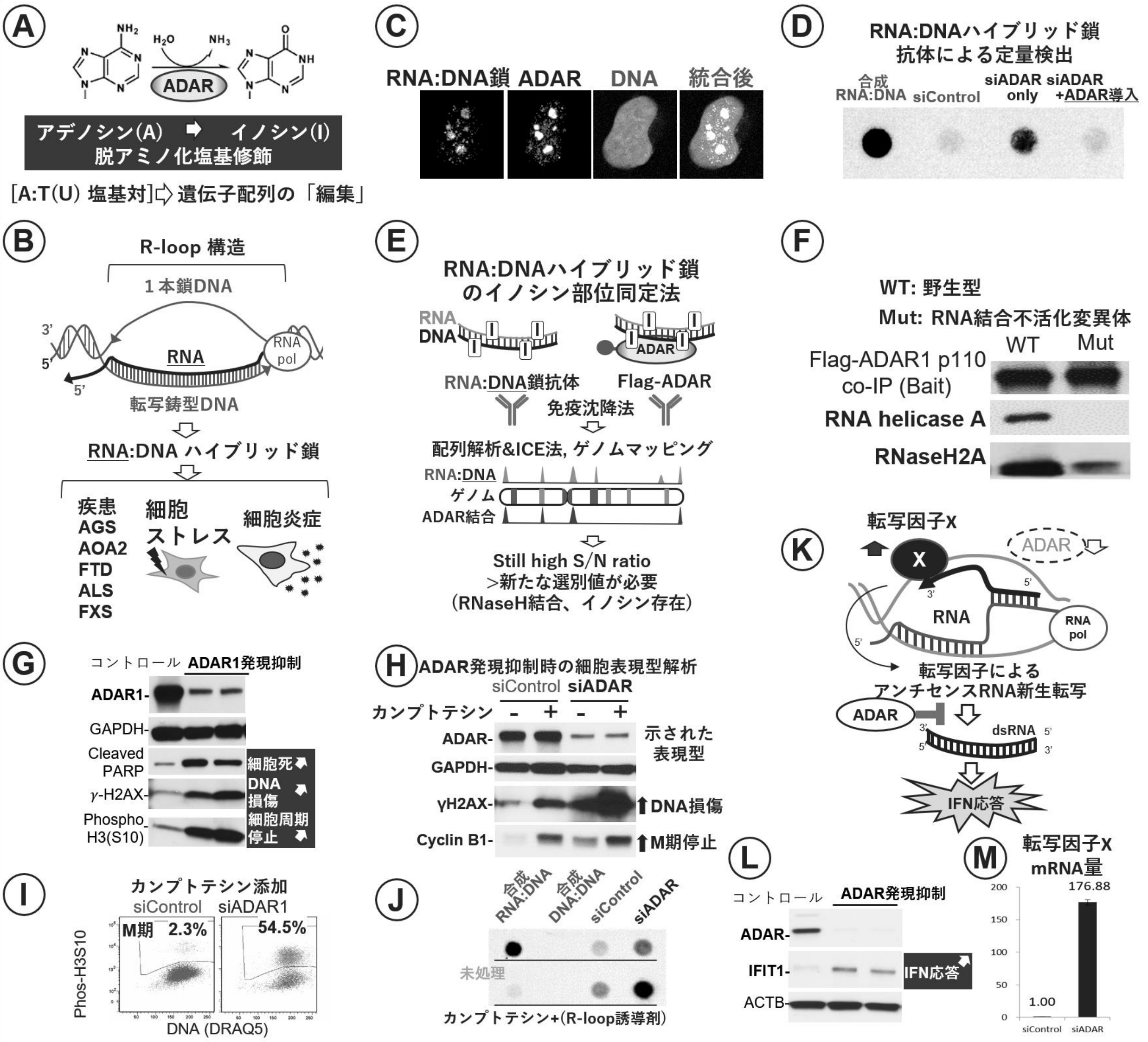

図1:(A) ADARによるA-to-I 塩基編集機構. (B) R-loop構造と細胞傷害. (C) HeLa細胞核内のR-loopとADAR1の局在重複と (D)ADAR1発現抑制によるR-loop量の増加及び細胞外ADAR導入による復帰実験結果. (E) R-loopの免疫沈降によるゲノム上部位とRNA編集部位同定法と現状の問題点及び解決策. (F) HEK293T細胞でのFlag-ADAR1免疫沈降によるRNA helicase AとRNaseH2A検出.
(G) HeLa細胞でのADAR1発現抑制による細胞死、DNA損傷、細胞分裂期停止の確認. (H) カンプトテシンの添加及びADAR1発現抑制によるDNA損傷、細胞分裂期停止のウェスタンブロッティングによる確認と(I)フローサイトメトリーによる細胞周期の集団解析、(J)R-loop量の検出.
(K) R-loop構造1本差センスDNA鎖を鋳型とした転写因子群Xによる新生アンチセンス鎖転写による細胞傷害仮説. (L) HeLa細胞でのADAR発現抑制時におけるIFN応答増加確認. (M)定量RT-PCRによるADAR発現抑制時の転写因子X mRNAの急激な増加.