

# 自然免疫の異常活性化を回避する RNA 編集部位の同定

大阪大学大学院医学系研究科神経遺伝子学

中濱 泰祐

## 背景・目的

生体には、ウイルスなどの異物の侵入を迅速に感知し、排除に働く自然免疫が備わっている。自然免疫は、異物に共通した分子構造を認識しており、2本鎖RNAもその一つである。しかし、2本鎖RNAは、宿主由来の転写産物内においても形成されるため、これが異物として誤認されることを防ぐための機構も存在する。2本鎖RNA中のアデノシンをイノシンへと置換するRNA編集はその主要な機構であり (Liddicoat et al, Science, 2015)、ADAR1とADAR2によって触媒される転写後修飾の一種である。また、ADAR1には同じ遺伝子座から異なるプロモーターを使って転写されるp150とp110の2つのisoformが存在しており、ADAR1 p110とADAR2は核に局在する一方で、ADAR1 p150は細胞質に局在する (Nishikura, Annu Rev Biochem, 2010)。ADAR1 p150のみを選択的に欠損させたマウスは自然免疫応答が異常亢進して胎生致死となるが (Ward et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2011)、我々は、ADAR1 p110やADAR2を欠損させたマウスではこうした異常が認められないことを以前報告した (Kim et al, PLoS Genet, 2021)。すなわち、ADAR1 p150によるRNA編集のみに自然免疫応答の異常亢進を防ぐ効果があることがわかってきた。

通常の2本鎖RNAは安定な右巻き (A型) 構造を形成するが、左巻き (Z型) は不安定であり、生体内に存在するかは長らく不明であった。一方で、Z型RNAへの結合 ( $Z\alpha$ ) ドメインを持つタンパクが複数存在しており、ADAR1 p150もその一つである (Chiang et al, Front Immunol, 2020)。そこで申請者は、ADAR1 p150のZ型RNAへの結合活性を喪失させるW197A変異を $Z\alpha$  ドメイン内にノックイン (KI) したマウスを樹立したところ、本マウスが自然免疫応答の異常活性化を伴う致死性を示すことを見出した (Nakahama et al, Immunity, 2021)。この知見は、基質内に形成されるZ型構造を標的としたRNA編集が、自然免疫応答の異常亢進を回避させていることを示唆しているが、具体的な基質は特定されていない。このため、本研究では、ADAR1 p150選択的なRNA編集基質を同定することを通じて、自然免疫応答を引き起こす内在2本RNAを特定することを最終目標とした。

## 結果・考察

### Z型RNAセンサー分子の活性化の有無の検証：

哺乳類においては、ADAR1 p150の他に細胞質センサー分子ZBP1が $Z\alpha$  ドメインを保有する。A型インフルエンザウイルス (IAV) などが感染すると、ZBP1がその $Z\alpha$  ドメイン依存的に細胞死を誘導するため、ウイルス由来のZ型RNAを感知する機能を持つと考えられている (Zhang et al, Cell, 2020)。そこで、Adar1<sup>W197A/W197A</sup>マウスにおいてもZBP1が活性化しているのではないかと考え、ZBP1を欠損させたところ、Adar1<sup>W197A/W197A</sup>マウスが示す致死性が正常化することが明らかになった (図1)。この結果は、ZBP1による内在Z型RNAの認識を、ADAR1 p150が $Z\alpha$  ドメインを介して防いでいることを示唆している。

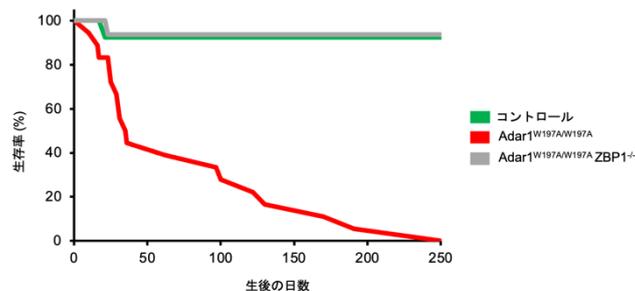


図1. Adar1<sup>W197A/W197A</sup>マウスが示す致死性はZBP1を欠損させることでレスキューされる

### Azin1 mRNAがADAR1 p150特異的に編集されるか否かの検証：

ADAR1 p110とADAR2を2重で欠損させた(ADAR1 p150のみを発現する)マウスを用いた我々の解析から、Azin1 mRNAがADAR1 p150特異的な基質の一つであることが示唆されていた(Kim et al, PLoS Genet, 2021)。本編集は、Azin1 mRNAの翻訳領域内に生じ(S/G部位)、アミノ酸配列を変化させることから、編集型Azin1の生物学的意義については複数の報告があった(Chen et al, Nat Med, 2013)。一方で、Azin1 mRNAにおけるRNA編集制御機構については未解明であったため、本研究においてはその詳細について調べた。最初に、ADAR1 p150特異的エクソン及びプロモーターをゲノム編集にて欠損させたADAR1 p150<sup>-/-</sup>マウスを樹立した。本マウスから様々な臓器を単離し、Azin1 mRNAの編集レベルを定量したところ、編集は完全に消失していた(図2)。一方で、ADAR1 p110特異的に編集されるBlcap mRNA内のY/C、Q/R部位は影響を受けていなかった。以上から、Azin1 mRNA内のS/G部位が確かにADAR1 p150特異的に編集されることが明らかとなった。

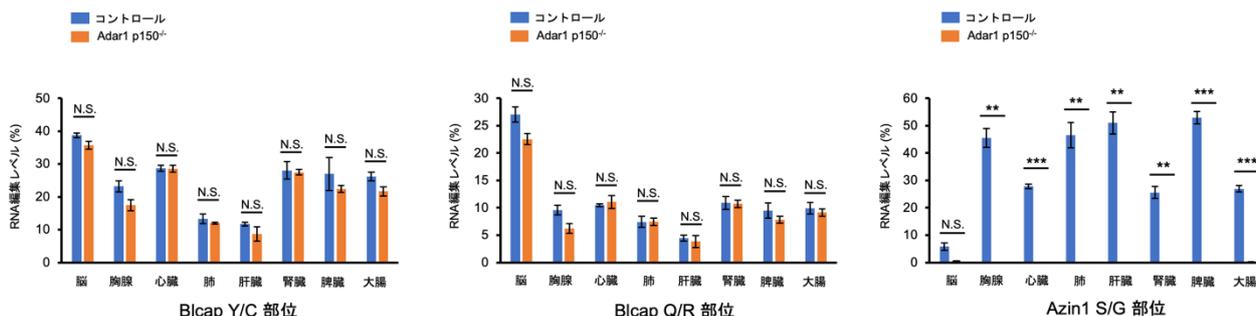


図2. Azin1 mRNA内のS/G部位はADAR1 p150特異的に編集される

### Azin1 mRNAの2本鎖形成機構の解明：

Azin1 mRNA内のS/G部位はExon11に局在する。この編集部位を含む領域がどのように2本鎖を形成するか明らかにするため、Exon10-Intron10-Exon11、Exon11、Exon11-Intron11-Exon12をそれぞれクローニングした3つのレポーターコンストラクトを作製し(図3)、ADAR1 p150を高発現するRaw264.7細胞に導入した。RNA回収後、導入したレポーターmRNAに生じた編集を定量したところ、Exon11-Intron11-Exon12のみでRNA編集が生じていた(図3)。また、本レポーターにおいて、Intron11がスプライスアウトする前のpre-mRNA内には編集は生じていなかった(図3)。以上から、Exon11内のS/G部位はExon12と2本鎖を形成することによってADAR1 p150によるRNA編集を受けていることが明らかになった。また、Intron11の存在はこの2本鎖形成を阻害すると考えられ、スプライシング後の細胞質移行がADAR1 p150特異性の決定要因となっていると考えられた。

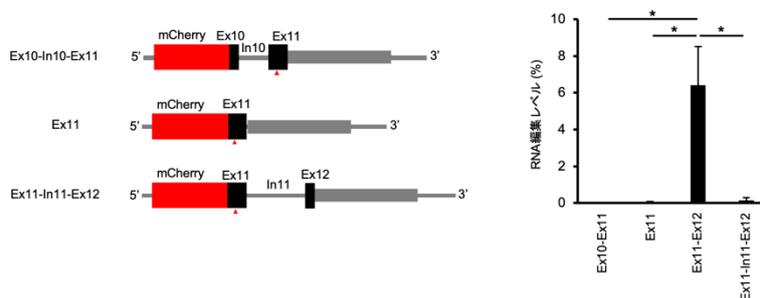


図3. Azin1 mRNAの編集はスプライシング後に異なるexon間で2本鎖構造を形成することにより生じる

### ADAR1 p150の細胞質局在の重要性の検証：

ADAR1 p150は細胞質に局在するが、ADAR1 p110とADAR2は核に局在する。Azin1 mRNA内に生じる編集はスプライシング後に生じるため、ADAR1 p150の細胞質局在が関与すると考えられた。そこで、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、野生型あるいは核外移行シグナル(NES)を欠損させた変異型ADAR1 p150を導入し、内在するAzin1 mRNAの編集レベルを定量した。その結果、野生型に比べ、NES欠損型ADAR1 p150ではAzin1 mRNAにおける編集レベルが有意に低下していた(図4)。一方で、Z

$\alpha$ ドメイン内にW197A変異を持つ変異型ADAR1 p150ではRNA編集レベルが維持されていたため(図4)、ADAR1 p150のZ型RNA結合活性ではなく、細胞質局在が本編集に重要であると考えられた。

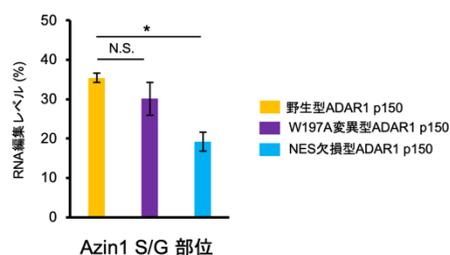


図4. Azin1 mRNAの編集にはADAR1 p150の細胞質局在が重要である

## 結語

本研究では、Adar1<sup>W197A/W197A</sup>マウスが示す致死性が、ZBP1を欠損させることによって改善されることを見出した。本知見は、生体内にも確かにZ型構造を形成する2本鎖RNAが存在し、ZBP1による認識をADAR1 p150が防いでいることを示唆している。本研究では、Azin1 mRNAのS/G部位がADAR1 p150特異的に編集されることを明らかにしたが、期待に反して、本編集はADAR1 p150の細胞質局在に依存することが判明した。ADAR1 p150特異的な基質はAzin1以外にも複数特定できていることから、今後はこうした基質に生じる編集がZ $\alpha$ ドメインに依存するかを検証し、ZBP1を活性化する内在Z型RNAの特定を目指す。

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。

## 参考文献

1. Chen L. et al. Recoding RNA editing of AZIN1 predisposes to hepatocellular carcinoma. *Nat Med.* 2013, 19:209-16.
2. Chiang C. et al. The Role of the Z-DNA Binding Domain in Innate Immunity and Stress Granules. *Front Immunol.* 2020, 11:625504.
3. Kim JI. et al. RNA editing at a limited number of sites is sufficient to prevent MDA5 activation in the mouse brain. *PLoS Genet.* 2021, 17:e1009516.
4. Liddicoat BJ. et al. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science.* 2015, 349:1115-1120.
5. Nakahama T. et al. Mutations in the adenosine deaminase ADAR1 that prevent endogenous Z-RNA binding induce Aicardi-Goutières-syndrome-like encephalopathy. *Immunity.* 2021, 54:1976-1988. e7.
6. Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem.* 2010, 79:321-349.
7. Ward SV. et al. RNA editing enzyme adenosine deaminase is a restriction factor for controlling measles virus replication that also is required for embryogenesis. 2011, 4:108(1):331-6.
8. Zhang T. et al. Influenza Virus Z-RNAs Induce ZBP1-Mediated Necroptosis. *Cell.* 2020, 180:1115-1129. e13.

## 本助成による発表論文

1. RNA editing of AZIN1 coding sites is catalyzed by ADAR1 p150 after splicing  
Xing Y\*, **Nakahama T\*#**, Wu Y, Inoue M, Kim JI, Todo H, Shibuya T, Kato Y, Kawahara Y#. (Co-first author\*, Corresponding author#)  
*J Biol Chem.* 2023 Jul;299(7):104840.
2. The RNA-editing enzyme ADAR1: a regulatory hub that tunes multiple dsRNA-sensing pathways  
**Nakahama T**, Kawahara Y.  
*Int Immunol.* 2023 Mar 14;35(3):123-133.