

Title	酵素-RNA複合体を用いた新規細胞内変異RNAの修復法の開発と応用
Author(s)	塚原, 俊文
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書: 1-10
Issue Date	2020-06-01
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/16740">http://hdl.handle.net/10119/16740</a>
Rights	
Description	基盤研究(B) (一般), 研究期間: 2017 ~ 2019, 課題番号: 17H02204, 研究者番号: 60207339, 研究分野: 分子生物学

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02204

研究課題名(和文) 酵素-RNA複合体を用いた新規細胞内変異RNAの修復法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of novel in-vivo-RNA restoration method by using enzyme-RNA complexes.

研究代表者

塚原 俊文 (Tsukahara, Toshifumi)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：60207339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)： 遺伝子の点変異を原因とする疾患に対する治療法として、変異したRNAの遺伝コードを部位特異的に修復する方法の開発研究を行い、細胞内でのA→I(G)或いはC→U変換を触媒する人工酵素複合体の開発に成功した。この酵素複合体は標的RNAに相補的なguide RNAによってRNAの変異点に特異的に作用することができ、細胞内で40%程度の変異RNA修復が可能であった。疾患モデルとしてmacularマウスを対象に、初代培養線維芽細胞の変異したP型ATPase RNAの遺伝コード修復にも成功し、実際にmacularマウスではほとんど活性が検出できないシトクロムCオキシダーゼ活性の回復を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子変異の修復法としてゲノム編集技術が脚光をあびているが、患者体内で変異したDNAだけを正確に改変出来る技術は確立されておらず、現状では体外でゲノム編集し正しく改変された細胞を体内に戻す方法でしか疾患を治療できない。本研究は遺伝性疾患の多くを占める点変異を原因とする疾患への治療法として変異したRNAを細胞内で修復するという新しい治療法の開発研究である。我々は本研究において細胞内で約40%の変異RNAを修復することに成功し、またモデルマウスを対象に実際の疾患にも適用可能であることを示した。本研究が提案するRNAの遺伝コード修復は様々な遺伝性疾患の治療法に新しいパラダイムを提供する。

研究成果の概要(英文)： To treat diseases caused by point mutations in the gene, we have developed a site-specific repairing method for genetic codes of the mutated RNAs, and succeeded in developing an artificial enzyme complex that catalyzes A→I(G) or C→U conversions in cells. The enzyme complex was able to act specifically on the mutated points of RNA by guide RNAs complementary to the target RNAs, and was able to repair about 40% of the mutated RNAs in cells. We also successfully repaired the genetic code of mutated P-type ATPase RNA in primary cultured fibroblasts derived from macular mice as a disease model, confirming the restoration of cytochrome C oxidase activity, whose activity is almost undetectable in macular mice.

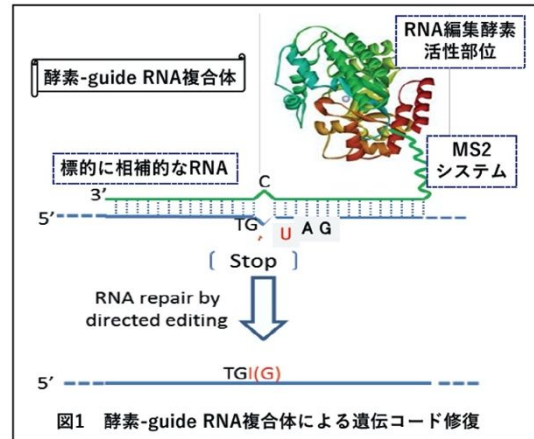
研究分野：分子生物学

キーワード：RNA editing 人工酵素複合体 遺伝コード修復 ADAR1 APOBEC1 脱アミノ化 Macularマウス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

RNA の転写後修飾によって遺伝子疾患の治療を行う試みには、trans splicing を利用した方法 (Phylactou LA, et al. Nat Genet, 18, 378-381, 1998)、三重鎖を介した DNA への変異導入法 (Ricciardi AS, et al. Methods Mol Biol, 1176, 89-106, 2014) などがある。しかしいずれの研究も未だ初歩的段階に留まっており、哺乳動物細胞内での変異修復は実現できていない。研究代表者らは、相補的塩基鎖を介して光結合性官能基を標的塩基である C の近傍に提示し、光化学的に標的 C を脱アミノ化する方法を用いて遺伝コード修復研究を行ってきた。緑色蛍光タンパク質 (GFP) から T C 点変異によって生じる青色蛍光タンパク質 (BFP) をモデルとして、BFP-mRNA の部位特異的脱アミノ化によって GFP に戻す研究を行い、既に in vitro で BFP-mRNA を化学的に脱アミノ化して翻訳後に緑色蛍光の観察に成功し、また脱アミノ化誘起用のオリゴ DNA 鎖のデザインの最適化も行った (Vu LT, et al. Chem Biol Drug Design, 86, 1242-1252, 2015 & 87, 583-593, 2016)。しかし、低分子核酸による疾患治療には持続的投与が必要であった。一方、高等生物には RNA editing 機構が存在し、部位特異的な核酸塩基の脱アミノ化によって C U (または A I 即ち G) の遺伝コード変換を実現していることから、人為的な RNA editing を用いて点変異を有する RNA を修復する遺伝子治療も提案された。Montiel-Gonzalez らは Adenosine deaminase acting on RNA2 (ADAR2) の活性部位を相補的塩基鎖である guide RNA を使って標的塩基の近傍に提示することで、部位特異的脱アミノ化に成功した (Proc Natl Acad Sci USA, 110, 18285-90, 2013)。研究代表者らも同様に ADAR1 を利用した酵素-RNA 複合体によって部位特異的な遺伝コード修復に成功していた (図 1 参照)。しかし、これらの方法は G A 変異以外には適用できないため、異なる機構による変異修復法の開発が望まれていた。



### 2. 研究の目的

ADAR と同様に RNA editing を触媒する酵素である APOBEC/AID は通常、C U を触媒するが、ADAR とは異なり、基質特異性が低く、A も認識して A I (G) を触媒することが知られている (Niavarani A, et al. PLOS One, 2015)。この事実は、標的と相補的な guide RNA の設計によって A の脱アミノ化も誘導できると考えられる。そこで本研究では、我々が ADAR1 を用いて創成したのと同様に、APOBEC/AID の活性部位に guide RNA によって部位特異性を付与することで C U だけでなく A I をも触媒する人工酵素を創成することを目的とした。さらに、脱アミノ化の逆反応であるアミノ基付加 (転移) 反応を触媒する酵素の創成も目指した。また、従来の細胞内 RNA 修復効率を遺伝子治療に応用可能な段階にまで高め、実際の疾患例への応用の可能性を確認することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 人為的 RNA editing 触媒酵素複合体の創成と RNA 修復の評価方法

RNA editing 触媒酵素として ADAR1 と APOBEC1 を選び、HEK293 細胞の RNA から逆転写 PCR によって酵素活性中心の cDNA を得、pCS2-MT-MS2HB-ADAR1 および APOBRC1 を構築した。標的として EGFP にナンセンス変異を導入したプラスミド、あるいは GFP の T C 変異によって蛍光色が青色となった BFP 発現プラスミドを構築した。なお、後者は HEK293 細胞に導入後、G418 を用いて恒常的発現細胞株を選択した。EGFP あるいは BFP の変異点周辺の相補配列を MS2-loop RNA と融合させた guide RNA とした。HEK293 細胞あるいは BFP 発現細胞に酵素-MS2 融合タンパク質および guide RNA プラスミドを導入し、2 日後に蛍光発現を共焦点顕微鏡で観察するとともに、RNA を抽出し RT-PCR-RFLP と塩基配列決定によって RNA 修復を確認し修復効率を求めた。

#### (2) U C 変換を触媒する酵素の検索

APOBEC1 の活性中心に部位特異的な変異誘導を行い、アミノ基供与体となりうるアミノ酸に交換することでアミノ転移反応の可否を検討した。標的にはナンセンス変異を導入した EGFP を用いた。一方、ツノゴケでは U C RNA editing が顕著に観察されることから、これを触媒する酵素の同定を目指して高等植物で C U RNA editing を触媒する PPR タンパク質について網羅的解析を行った。

#### (3) 人為的 RNA editing 触媒酵素複合体の改良

RNA 修復効率の向上を目指し、核移行シグナルを付加したプラスミドも構築した。また、MS2 タンパク質に部位特異的な変異を導入し、より結合力の強い N55K 変異体を作成した。さらに MS2-loop RNA6X の他、12X、および相補鎖の両端にそれぞれ 1X を付加した WMS2 を作成した。また、プロモーターについても CMV の他、U6 を用いた。

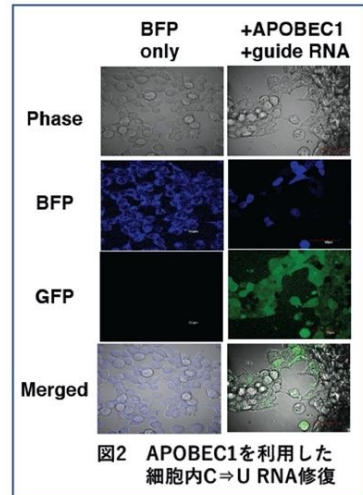
#### (4)Macular マウスを対象とした RNA 修復治療研究

P 型 ATPase 遺伝子に T C 変異を有する macular マウスを RNA 修復の対象とした。変異点近傍の配列を元に guide RNA を設計・構築し、APOBEC1 と共に macular マウス由来線維芽細胞に導入し、細胞内 RNA の遺伝暗号変換を試みた。細胞内 RNA を回収し、塩基配列決定によって RNA 修復効率を検証した。

#### 4 . 研究成果

##### (1)人為的 RNA editing 触媒酵素複合体の創成と RNA 修復の確認

ADAR1 および APOBEC1 の deaminase 活性部位と guide RNA を MS2 システムを介して細胞内で結合させ、人工酵素複合体を構成させるためのプラスミド構築をした。これらを標的 RNA と共に細胞に導入して蛍光観察によって RNA 修復の可否を確認後、試料より RNA を単離し RNA 修復効率を求めた。ADAR1 による Amber 変異修復ではナンセンス変異によって欠失していた緑色蛍光の発現が確認された。RT-PCR-RFLP や塩基配列決定による修復効率を検証したところ数%~12%であった。一方、APOBEC1 による C U 変換効率は GFP の T C 変異によって青色蛍光を呈する BFP の恒常的発現細胞を対象に RNA 修復を試みたところ、緑色蛍光の発現が確認された(図2 参照)。同時に青色蛍光も減少しており、RNA 修復効率は約 30%であった。さらに APOBEC1 と guide RNA を導入して遺伝コードを修復した細胞とコントロール細胞に発現する全 RNA を RNA-Seq によって解析し、Off-target 効果を調べたところ、ヒトゲノムデータと比べた両者の点変異にほとんど差は無く、Off-target 効果は無視できるレベルであると結論した。この結果は人為的 RNA editing による遺伝コード修復が疾患治療に適用可能であることを示唆した。



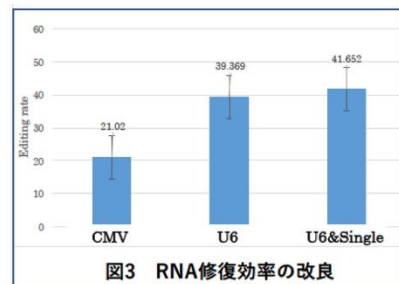
##### (2)U C 変換を触媒する酵素の検索

APOBec1 活性部位にアミノ転移(付加)反応触媒活性を持たせるため、活性中心の近傍に存在し、直接触媒活性には関わらないと考えられるアミノ酸をリストアップし、これらアミノ酸を部位特異的変異導入によって塩基性アミノ酸に変換し、アミノ転移活性の有無を検討した。これまでに 10 種の変異体を作成したが、有効な変異体は得られなかった。

一方、ツノゴケの PPR タンパク質では C の脱アミノ化を触媒する DYW ドメインの他に GRP および DRH ドメインを持つ PPR タンパク質を同定した。現在、これらドメインの機能について解析を行っている。

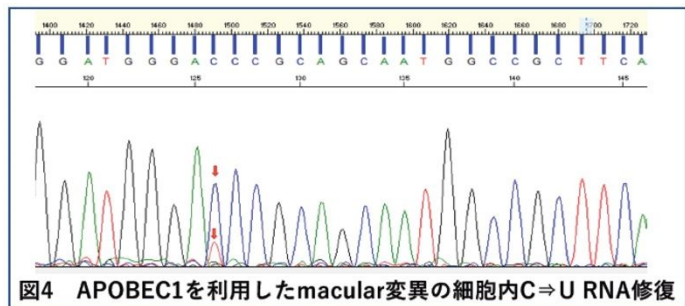
##### (3)人為的 RNA editing 触媒酵素複合体の改良

核移行シグナルの有無は RNA 編集効率に変化をもたらさなかった。また、N55K 変異の MS2 タンパク質と野生型にも差は見られなかった。一方、相補鎖の両端に 1X を付加した double MS2 では顕著に RNA 修復効率が向上し、30%を超える修復効率を示した。Guide RNA 量が増加すると RNA 修復効率が高くなるとの結果が示されたため、従来の CMV プロモーターに代えてより強い U6 プロモーターで guide RNA を発現させたところ、RNA 修復効率は 40%程度まで高まった。さらに人工酵素と guide RNA のプラスミドを融合させた 1 プラスミドシステムでは RNA 修復効率がさらに向上した(図3 参照)。



#### (4)Macular マウスを対象とした RNA 修復治療研究

P 型 ATPase 遺伝子に T C 変異を有する macular マウスを動物における RNA 修復の対象として、初代培養線維芽細胞を確立した。変異点近傍の配列を元に guide RNA を設計・構築し、APOBEC1 と共に macular マウス由来線維芽細胞に導入し、細胞内 RNA の遺伝暗号変換を試みた。細胞内 RNA を回収し、塩基配列解析を行ったところ、図 4 に示した様に人工 RNA 編集酵素システムを導入した細胞では C U 変換が確認され、ダブルピークを示し、遺伝暗号修復が立証できた。変換効率は約 20%程度であり、シトクロム C オキシダーゼ活性の回復も確認できた。また、(3)と同様に人工酵素と guide RNA のプラスミド



を融合させた 1 プラスミドシステムの構築も行い、従来の方法より変換効率が優れていることも確認した。この 1 プラスミドシステムの開発によって遺伝子治療用のベクター開発が容易となった。現在は、macular mouse 個体を対象とした遺伝子治療実験の準備中である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saifullah and Toshifumi Tsukahara	4. 巻 12
2. 論文標題 Genotyping of single nucleotide polymorphisms using the SNP-RFLP method.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience Trends	6. 最初と最後の頁 240 - 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/bst.2018.01102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Umme Qulsum and Toshifumi Tsukahara	4. 巻 12
2. 論文標題 Tissue-specific alternative splicing of pentatricopeptide repeat (PPR) family genes in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience Trends	6. 最初と最後の頁 569 - 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/bst.2018.01178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saifullah, Satoshi Fuke, Hiroshi Nagasawa and Toshifumi Tsukahara	4. 巻 66
2. 論文標題 Single nucleotide recognition using a probes-on-carrier DNA chip.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 73 - 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2144/btn-2018-0088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Md. Thoufic Anam Azad, Umme Qulsum, Toshifumi Tsukahara	4. 巻 19
2. 論文標題 Comparative Activity of Adenosine Deaminase Acting on RNA (ADARs) Isoforms for Correction of Genetic Code in Gene Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 31 - 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1566523218666181114122116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Vu Luyen Thi, Tsukahara Toshifumi	4. 巻 11
2. 論文標題 C-to-U editing and site-directed RNA editing for the correction of genetic mutations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience Trends	6. 最初と最後の頁 243 ~ 253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/bst.2017.01049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Azad Md T A, Bhakta S, Tsukahara T	4. 巻 24
2. 論文標題 Site-directed RNA editing by adenosine deaminase acting on RNA for correction of the genetic code in gene therapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 779 ~ 786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/gt.2017.90	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasithorn Wanna-Udom, Minoru Terashima, Hanbing Lyu, Akihiko Ishimura, Takahisa Takino, Matomo Sakari, Toshifumi Tsukahara, Takeshi Suzuki	4. 巻 524
2. 論文標題 The m6A methyltransferase METTL3 contributes to Transforming Growth Factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells through the regulation of JUNB	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 150 - 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umme Qulsum, Md Thoufic Anam Azad, Toshifumi Tsukahara	4. 巻 62
2. 論文標題 Analysis of Tissue-specific RNA Editing Events of Genes Involved in RNA Editing in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plant Biology	6. 最初と最後の頁 351 - 358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12374-018-0452-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sonali Bhakta, Toshifumi Tsukahara	4. 巻 in press
2. 論文標題 Artificial RNA editing with ADAR for gene therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Toshifumi Tsukahara, Md Thoufic Anam Azad, Sonalo Bhakta, Matomo Sakari
2. 発表標題 Artificial RNA editing enzymes for RNA restoration in vivo
3. 学会等名 alaysia-Japan Joint International Conference 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshifumi Tsukahara, Md Thoufic Anam Azad, Sonalo Bhakta, Matomo Sakari
2. 発表標題 Site-Directed RNA Editing of Mutated RNAs by Artificial Enzymes
3. 学会等名 BIT's 9th World Gene Convention-2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 盛 真友、塚原 俊文
2. 発表標題 RNAメチル基転移酵素METTL3の転写共役機構
3. 学会等名 Hokuriku RNA Club 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Md Thoufic Anam Azad, Hitoshi Suzuki, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Comparative activity of adenosine deaminase acting on RNA (ADARs) isoforms for correction of genetic code in gene therapy.
3. 学会等名 日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sonali Bhakta, Md Thoufic Anam Azad, Matomo Sakari and Toshifumi Tsukahra.
2. 発表標題 Genetic code restoration by ADAR1 in Ochre (TAA) stop codon.
3. 学会等名 日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Umme QuIsum, John Munene, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 1.Alternative Splicing of RNA Editing Pentatricopeptide Repeat (PPR) Family Gene in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Umme QuIsum, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 2.Tissue-specific Alternative Splicing of RNA Editing Related Family Genes in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年



1 . 発表者名 Md Thoufic Anam Azad, Sonali Bhakta, Toshifumi Tsukahra
2 . 発表標題 Artificial enzyme system for treatment of genetic disorders.
3 . 学会等名 Smart knowledge/ smart information/ smart materials workshop 2017 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Sonali Bhakta, MD Thoufic Anam Azad and Toshifumi Tsukahra
2 . 発表標題 Artificial RNA editing in Ochre (TAA) Stop codon for restoration of genetic code by using ADAR1 deaminase
3 . 学会等名 JAIST World Conference 2018 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Umme Qulsum, Toshifumi Tsukahara
2 . 発表標題 3.Analysis of tissue-specific alternative splicing of P-subfamily PPR genes in Arabidopsis thaliana.
3 . 学会等名 JAIST World Conference 2018 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Toshifumi Tsukahara, Sonali Bhakta, Md. Thoufic Anam Azad
2 . 発表標題 Genetic Code Restoration by Using Artificial RNA Editing for G to A mutated mRNAs
3 . 学会等名 World Congress of Molecular & Cell Biology ( 招待講演 ) ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Sonali Bhakta, Md. Thoufic Anam Azad, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Artificial RNA Editing in (BFP) Blue Fluorescence Protein (Derivative of GFP) by Using APOBEC1 Deaminase for Restoration of Genetic Code
3. 学会等名 World Congress of Molecular & Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saifullah, Matomo Sakari, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Application of CRISPR-Cas13 machinery to disease treatment
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sonali Bhakta and Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Genetic code restoration by using APOBEC1 artificial cytidine deaminase
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 John MW Munene and Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Investigation of tissue-specific alternative splicing of Organelle RNA Recognition Motif(ORRM) family genes in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 タンパク質を生合成させる方法および未成熟終止コドンの修飾方法	発明者 塚原 俊文、盛 真 友、田中 龍太	権利者 北陸先端科学技 術大学院大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-018379	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----