JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	遺伝性疾患の修復のための植物のU-to-C RNA編集酵素の同定と解析
Author(s)	RUCHIKA
Citation	
Issue Date	2022-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/17773
Rights	
Description	Supervisor:塚原　俊文, 先端科学技術研究科, 博士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

氏名	Ruchika			
学位の種類	博士（マテリアルサイエンス）			
学位記番号	博材第 535 号			
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 24 日			
論文題目	Identification and analysis of the U-to-C RNA editing enzyme in plants for restoration of genetic disoders.			
論文審査委員	主査	塚原　俊文	北陸先端科学技術大学院大学	教授
		芳坂　貴弘	同	教授
		高村　禅	同	教授
		筒井　秀和	同	准教授
		伊藤　正樹	金沢大学大学院	教授

論文の内容の要旨

RNA editing is a post-transcriptional molecular process through which cells can be describe as site-specific changes in the nucleotide sequences within an RNA molecule that has been transcribed by RNA polymerase enzymes. Among various types of RNA editing, Adenine-to-Inosine, A-to-I(G), Cytidine-to-Uridine, C-to-U and Uridine-to-Cytidine, U-to-C are the most common. Studies have already revealed the mechanisms for A-to-I and C-to-U RNA editing which are generally caused by ADARs and APOBEC-AID deaminase family, respectively. However, the transaminase enzymes responsible for “Reverse” U-to-C editing is not yet discovered, although it is the abundant phenomenon in lower plant species like hornworts and rare in animals. Here I examined the U-to-C RNA editing in *Arabidopsis* tissues at different developmental stages of growth. In this study, the high-throughput RNA sequencing (RNA-seq) of 12-day-old and 20-day-old *Arabidopsis* seedlings was performed. The results showed that DEGs were expressed to higher levels in 12-day-old seedlings than in 20-day-old seedlings. Additionally, pentatricopeptide repeat (PPR) genes were also expressed at higher levels as indicated by the log2FC values. RNA-seq analysis of 12-day and 20-day-old Arabidopsis seedlings revealed candidates of U-to-C RNA editing events. Sanger sequencing of both gDNA and cDNA confirmed the seven U-to-C RNA editing sites.

Further, I investigated the U-to-C RNA editing-related genes in *Arabidopsis* tissues and the effects on mRNA stability, with a special focus on PPR proteins. Here, I have demonstrated the effects of the “reverse” RNA editing on the mRNA stability for all seven edited genes. In addition, the nuclear PPR gene (AT2G19280) in 12-day-old seedlings of *Arabidopsis thaliana* was also identified with U-to-C RNA editing. The U-to-C RNA editing sites were found in the untranslated region (3’ UTR) of the mature mRNA and affect its secondary structure. Then, the correlation between U-to-C RNA editing-related genes and their mRNA abundance were examined. Furthermore, I investigated the effects of U-to-C RNA editing in Arabidopsis using the transcription inhibitor actinomycin D (Act D). The addition of Act D to the cell suspension culture of transgenic Arabidopsis generated by Agrobacterium-mediated transformation showed that single nucleotide base conversion adversely affected the mRNA secondary structure and stability.

Pentatricopeptide repeats (PPR) proteins are act as sequence-specific RNA-binding proteins within mitochondria and chloroplasts in almost all land plants. Genome-wide analysis of the hornworts, *Anthoceros agrestis*, revealed the PPR proteins in this species contain unique C-terminal DYW-like domains with specific signatures. In present

work, I have explored the study on three different variants of C-terminal PPR proteins of hornworts, GRP-type, DRH- type and DYW-types. I investigated the RNA editing events by cloning the Hornworts PPR genes. A bacterial expression system was developed in which the Hornworts specific PPR protein variants were cloned with PPR56 (truncated DYW), *Physcomitrella patens* (moss) editing factor. We measured the gene expression levels of DYW variants. In addition, we demonstrated the functional homology of DYW domains with APOBEC1in human cells.

The MS2 system were initially developed with ADAR1 and APOBEC1 for A-to-I(G) and C to-U RNA editing, respectively. In this study, an expression system was designed with PPR56, *Physcomitrella patens* (moss) editing factor. We engineered an artificial RNA editing mechanism by combining the deaminase domain of plant derived PPR56 with a guideRNA (gRNA) which is complementary to target mRNA. As a target RNA, we used RNA encoding blue fluorescent protein (BFP) which was derived from the gene encoding GFP by a single T-to-C substitution. Upon transient expression of both components (PPR56 and gRNA), we confirmed the restoration of sequence of GFP revealing an editing efficiency of up to 85-100%, while previous developed system with APOBEC1 only showed about 20 % editing efficiency. Furthermore, we identified that the C-terminal E2-DYW domain of PPR56 is sufficient for C-to-U conversion in the MS2 system.

Lastly, I introduced a non-sequencing approach for the rapid detection of RNA editing using a portable micro-Temperature gradient Gel Electrophoresis (μTGGE). This is based on the principle of electrophoresis, which use temperature to denature the samples as it moves across the polyacrylamide gel. In this method, a fragment of double-stranded DNA when heated, forming a gradient of double-stranded DNA to partially separated strands to completely separated single-stranded DNA. A sample of RNA editing with different nucleotide bases show the different melting profiles because of their different melting profile. Here, we demonstrated the difference between the melting profiles for edited and non-edited (wild type) RNAs. Reproducibility was evaluated from measuring the pattern similarity scores (PaSS) between the band patterns obtained with the edited and non-edited RNAs. This tool is providing a simple, and cost-effective method for detecting even a single base modification in RNAs. We expect that our rapid analyzing tool will foster further discoveries in this rapidly expanding field of molecular biology.

Keywords: U-to-C RNA editing, *Arabidopsis thaliana,* PPR56, DYW domains, hornworts, RNA-seq

論文審査の結果の要旨

RNA 編集は遺伝子が転写された後に塩基の挿入・欠失や置換によって遺伝情報を書き換える現象であり、生物に広く認められる現象である。植物ではミトコンドリア及び葉緑体が有する独自の DNA にコードされた遺伝子に C⇒U あるいは U⇒C RNA 編集が認められているが、核ゲノムにコードされた遺伝子の RNA 編集については報告が少なく、またその機能も明確ではなかった。一方、当研究室で行った植物の RNA 編集に関与する PPR タンパク質遺伝子の解析で、核ゲノムにコードされる PPR タンパク質 mRNA が U⇒C RNA 編集を受けていることが判明していた。そこで本論文では発達段階の異なるシロイヌナズナに発現している全 RNA の塩基配列解析を行い、1 塩基置換を調べたところ、U⇒C RNA 編集を受けたと思われる遺伝子は 20 日苗に比べ 12 日苗で多くなっていた。この内、核ゲノムにコードされる 7 つの遺伝子について RT-PCR 後に塩基配列を調べ、いずれも U⇒C RNA 編集であることを確認した。しかし多くの U⇒C RNA 編集はタンパク質に翻訳されない領域で発生していた。次に

U⇒C RNA 編集の生理的意義を明らかにするため、上記 7 つの遺伝子の経時的な発現変化を調べたところ、いずれも U⇒C RNA 編集に伴って発現が減少していた。そこで U⇒C RNA 編集の有無によってｍRNA の安定性を確認し、いずれも U⇒C RNA 編集の結果、mRNA が早く分解されることが判明した。この結果は核ゲノムコード遺伝子における U⇒C RNA 編集とその生理的意義を明らかにした最初の報告となった。

植物における C⇒U RNA 編集は PPR タンパク質の C 端に存在する DYW ドメインによる C の脱アミノ化の結果であることが判明しているが、U⇒C RNA 編集の機構については未解明である。本論文ではその機構解明を目指し、U⇒C RNA 編集が多く観られるツノゴケの PPR タンパク質についても研究し、ツノゴケでは DYW ドメインに相同性はあるが C 末端が GRP あるいは DRH となっているタンパク質が多く存在していることを明らかにした。これら異性体は強制的な発現を行っても細胞内での発現が極めて低かったため U⇒C RNA 編集活性は確認されなかったが、DYW 型については極めて高い C⇒U 変換効率を示すことが判明した。これを用いて HEK293 細胞でほぼ 100%の C⇒U 変換効率を示す人為的 RNA 編集システムを構築することに成功した。このシステムを導入した細胞と未導入の細胞の全 RNA 塩基配列解析を行って標的以外の塩基置換を調べたところ、従来の編集システムに比べてもより低い off-target 効果であることが判明し、T>C 変異を原因とする疾患治療に適した編集システムであることが示された。その他、本論文では温度傾斜電気泳動による簡便な RNA 編集（1 塩基置換）の検出にも成功している。

以上、本論文は核ゲノムコード遺伝子の U⇒C RNA 編集の生理的意義の一端を明らかにし、また遺伝子治療を目指した人為的 RNA 編集システムの飛躍的改良をもたらしたものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。