

# RNA・DNA編集によるゲノム安定性制御

東京理科大学 研究推進機構 生命医科学研究所 准教授 さくらい まさゆき 櫻井 雅之

## 概要

本稿ではアデノシンからイノシンと呼ばれる塩基への核酸塩基修飾を紹介する。これはゲノムには記載されていない遺伝子情報の変化を伴う制御機構であり、その全貌は解明されていない。我々は近年、RNAとDNAで形成される二本鎖がADARの基質となることを発見した。これらRNAおよびDNAの塩基編集が担うゲノムの安定性制御機構とその利用について最新の知見を紹介する。

## 生命のセントラルドグマの改造 A-to-I RNA 編集機構

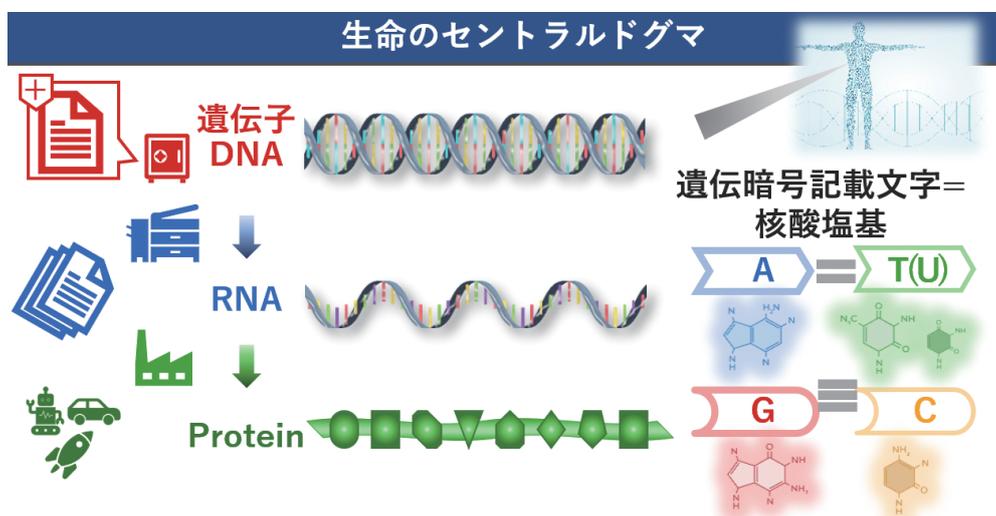
生命のセントラルドグマでは、DNA上の遺伝子情報がRNAへの転写を経た後にタンパク質へと翻訳される【図1】。その過程でDNAとRNAの塩基の化学構造を修飾するしくみが我々の細胞には備わっている。我々はその一つ、アデノシン(A)の脱アミノ化によるイノシン(I/Ino)への修飾(A-to-I編集)機構の研究に取り組んでいる【図2a】。

Ino化はグアノシン(G)への変化と同じ効果を持つため【図2b】、塩基配列が改造される。その効果

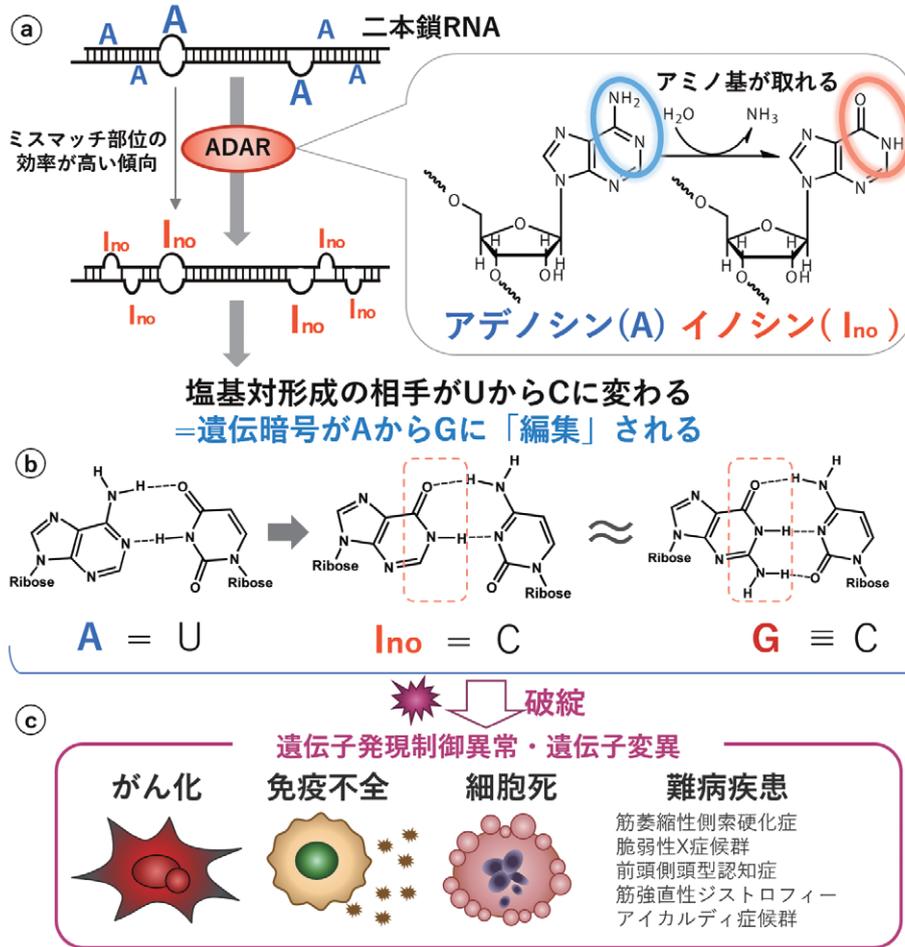
により核酸の情報と機能が最適調節され、破綻は細胞障害を引き起こす<sup>1)</sup>【図2c】。我々はInoの化学的性質を利用した網羅的同定法を開発し、ヒト脳の転写産物からおおよそ30,000部位のInoの同定をしてきた<sup>2)</sup>。その精度は97%と既存の技術では最も高く、Ino存在証明のゴールドスタンダードとして利用されている<sup>3)</sup>。現在、ヒトでは2,000遺伝子以上の転写産物、50,000箇所以上のIno部位が報告されている【図3a】。

## 新たな編集 A-to-I RNA : DNA 鎖の 編集機構を発見

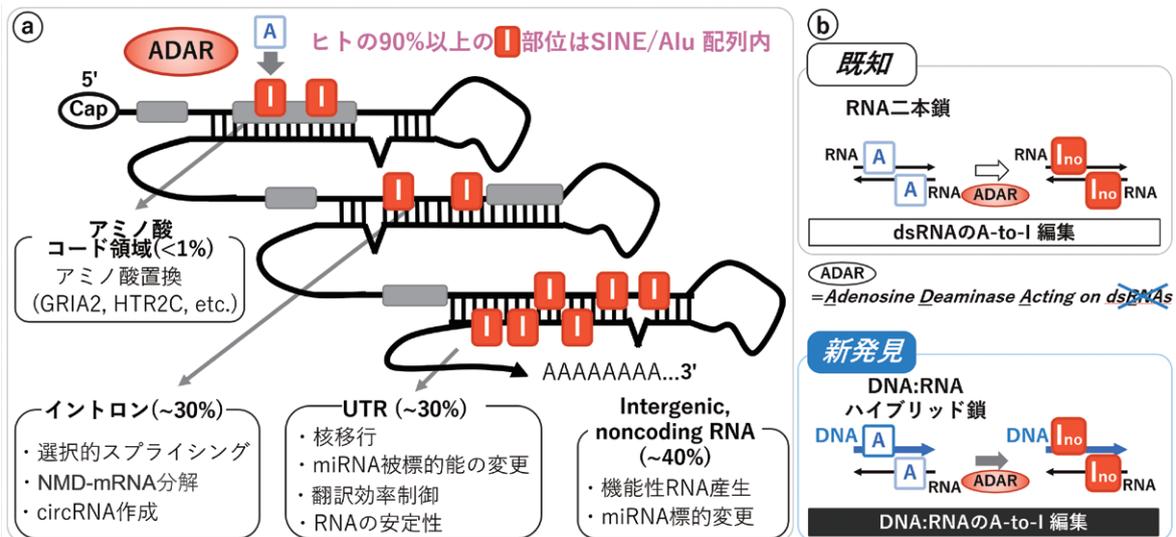
A-to-I編集は酵素であるADAR (Adenosine Deaminase Acting on dsRNAs)が担う。その名の通り、ADARは二本鎖RNAを基質とすると考えられてきた。しかし我々は再検証を進め、ADARがRNA:DNAハイブリッド鎖をも基質とし、RNAはもちろんDNAのAすらIno化することを発見した【図3b】。これはA-to-I編集による能動的な塩基編集が哺乳動物のゲノムDNAにも内在することを示唆している。



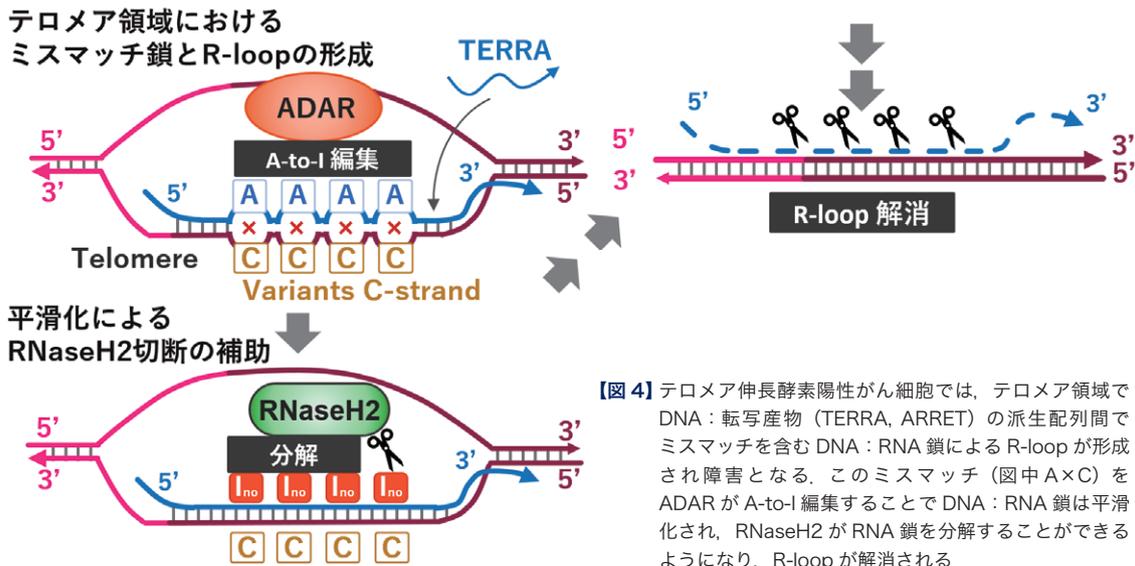
【図1】生命のセントラルドグマとDNA, RNAの核酸塩基対。



【図2】 ①アデノシン脱アミノ化酵素 ADAR によるイノシンへの A-to-I RNA 編集機構。 ②A-to-I RNA 編集の結果、Ino は G と同様に C と塩基対を形成する。 ③RNA 編集の破綻によって引き起こされる細胞障害。



【図3】 ①ICE-seq により同定した Ino 部位と機能例。 ②新発見した DNA : RNA ハイブリッド鎖を基質とする A-to-I DNA & RNA 脱アミノ化編集機構。



【図4】テロメア伸長酵素陽性がん細胞では、テロメア領域でDNA：転写産物（TERRA, ARRET）の派生配列間でミスマッチを含むDNA：RNA鎖によるR-loopが形成され障害となる。このミスマッチ（図中A×C）をADARがA-to-I編集することでDNA：RNA鎖は平滑化され、RNaseH2がRNA鎖を分解することができるようになり、R-loopが解消される。

### がん細胞のテロメア領域 A-to-I 編集の効果

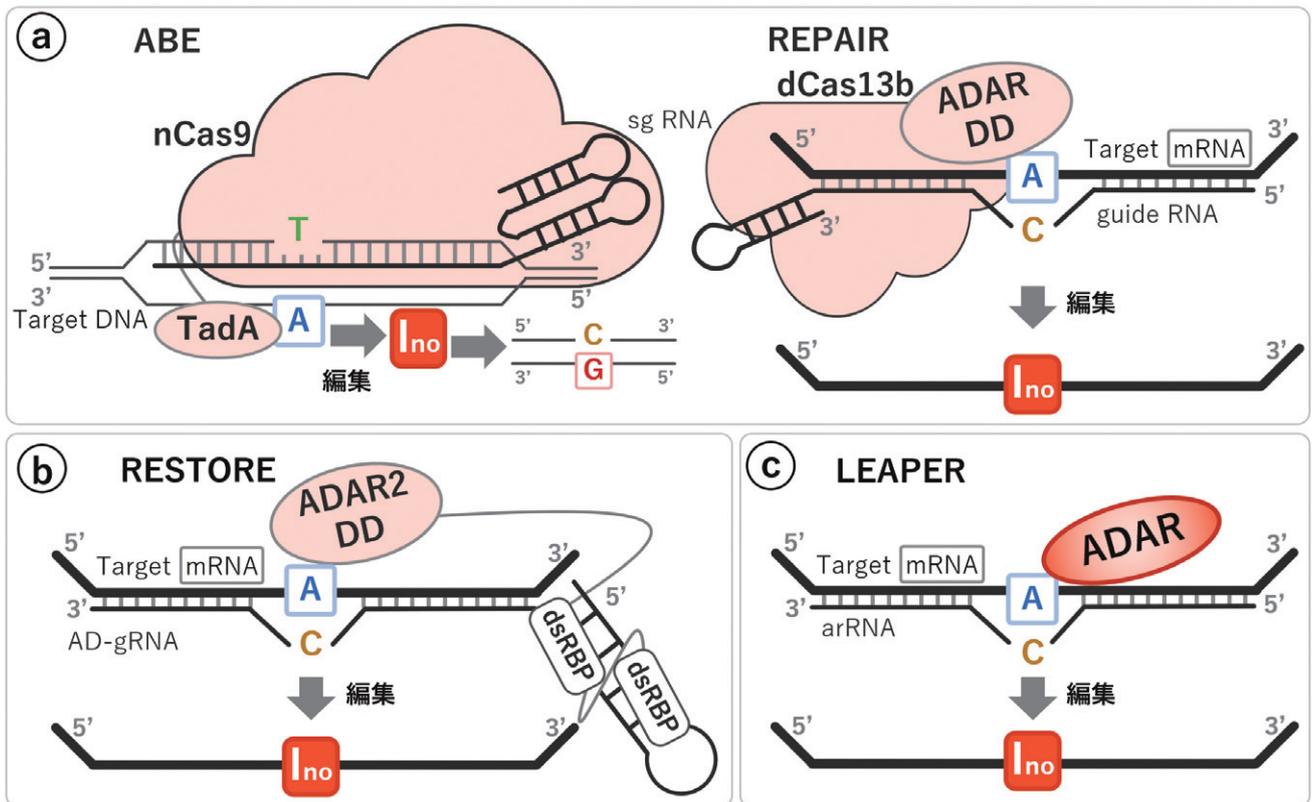
ゲノムDNA上では二本鎖DNAよりも安定なRNA：DNA鎖形成によるR-loop構造が生じ、細胞障害と関与する【図4】。今回我々は、ヒトがん化細胞の生存に必須となる、ADARのIno化活性依存的なテロメア領域R-loopの解消機構を解明した<sup>4)</sup>。細胞が、がん化して不死増殖能を獲得する機構の一つに、テロメア伸長酵素の発現と活性化がある。テロメア領域は5'-TTAGGG-3'/3'-AATCCC-5'の6塩基の基本配列が連続する染色体末端の領域である。近年、テロメア領域自体が転写の鋳型となった非コード性RNAであるTERRA(UUAGGGn)、ARRET(CCCUAA<sub>n</sub>)の存在が発見された。また、テロメアDNA、TERRA/ARRETでは、基本配列から1~2塩基置換された派生体が多分に存在する。通常、基本配列同士のテロメアDNAとTERRAあるいはARRETがミスマッチ塩基対を含まずにDNA：RNA鎖対合しR-loop構造が形成されるが、RNA分解酵素であるRNaseH2が即座にR-loopを解消し、テロメア伸長を維持する。一方、先述の派生体配列の場合、AxCミスマッチ塩基対を含むR-loopが形成される。RNaseH2はミスマッチを含むRNAを分解できないため、この型のR-loopは解消されず停滞し、テロメア維持障害を伴う細胞傷害が生じる。このような場合、ADARがA-to-I編集能によりDNA：RNA間のミスマッチを解消してRNaseH2の作用を補完し、R-loopを解消してゲノム安定性を維持するメカニズムを解明した<sup>4)</sup>【図4】。

### 人為的 A-to-I 編集技術の発展

近年では、Ino化を利用したRNA上でのA-to-I、あるいはDNAのA=T-to-IxTを経たG=C塩基対への人為的な塩基編集法（Base editor）が開発されている<sup>5,6)</sup>【図5a-c】。これらは一塩基置換の導入や修復に適しており、変異の実験的検証のみならず、遺伝子変異疾患の治療に向けた新たな核酸の創薬化として注目されている。すでに早老症のマウスモデルに対してBaseEditorによる異常修復術が報告されており<sup>7)</sup>、今後の発展が期待されている。

### おわりに

ADARによるA-to-I DNA編集機能は、相補配列を有する内在性RNA依存的なゲノムDNA編集現象を哺乳動物細胞が備えている一例として、ゲノム&遺伝子の恒常性を左右する新要素である。がん化や疾患、また分化に関わる後天的な遺伝子変異の発生に関わり得る現象である一方、これまでは同定が不可能なため見過ごされてきたおそれがある。我々は現在、このような部位を高感度かつ高精度に同定可能とする新技術の開発を進めている。このような革新的な先端バイオロジーでは、分子・細胞・組織・個体など研究対象のスケールはもちろん、核酸化学・生化学・免疫学、バイオインフォマティクス・機器開発など、一研究室の枠を越えた連携による多角的なアプローチが重要となってきた。



【図5】①ABE法とREPAIR法。どちらもCRISPR-Casシステムを応用し、酵素部位を脱アミノ化酵素ドメインと置換した技術。②RESTORE法ADARとガイド鎖複合体形成を促進するため二本鎖領域を持つ設計を利用した技術。③LEAPER法内在のADARが結合可能な短い人工かつ多様な塩基修飾を施したarRNA (ADAR-recruiting RNA) の導入のみでIno化を誘導する技術。

本研究はもちろん、研究界では専門分野を問わず好奇心あふれる若手研究者や学生の参加がこれまで以上に望まれている。本稿がそのような読者の好奇心を刺激する契機となれば幸いである。

## 謝辞

文章推敲および図表の作製補助にあたり、当研究室の中野美世子氏、久保田真依氏、市橋瑛斗氏に感謝申し上げます。本研究は、本大学若手助成金および中期計画推進費、JSPS 科研費、猪之鼻奨学会、武田科学助成、持田記念医学薬学助成、興和生命科学助成、アステラス病態代謝助成、MSD 生命科学がん助成、金原一郎記念助成、安田記念助成、日本対がん協会助成、難病医学助成、岸本基金助成、上原記念助成、東京生化学奨励、加藤記念難病助成、高松宮妃癌基金、三井住友信託銀行、小林財団、細胞科学財団、住友財団の助成、米国 Wistar 研究所 Nishikura Lab との共同研究を含みます。

## 【参考文献】

- 1) Nishikura K. "A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs." *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 17 (2): 83-96 (2016)
- 2) Sakurai, M., Ueda, H., & Suzuki T. "A biochemical landscape of A-to-I RNA editing in the human brain transcriptome." *Genome Res.* 24 (3): 522-34 (2014)
- 3) Suzuki, T., Ueda, H., & Sakurai, M. "Transcriptome-wide identification of adenosine-to-inosine editing using the ICE-seq method." *Nat. Protoc.* 10: 715-732 (2015)
- 4) Shiromoto, Y., Sakurai, M., & Nishikura, K. "ADAR1 RNA editing enzyme regulates R-loop formation and genome stability at telomeres in cancer cells." *Nat. Commun.* 12 (1): 1654 (2021)
- 5) Merkle, T., Merz, S., & Stafforst, T. "Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides." *Nat. Biotechnol.* 37 (2): 133-138 (2019)
- 6) Qu L, Yi Z, & Wei W. "Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs." *Nat. Biotechnol.* 37 (9): 1059-1069 (2019)
- 7) Koblan, L.W., Erdos, M.R., & Liu, D.R. "In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice." *Nature.* 589 (7843): 608-614 (2021)