

## RNA 上の”U”を”C”に書き換える技術を開発

～新しい遺伝子治療技術の確立へ期待～

### ポイント

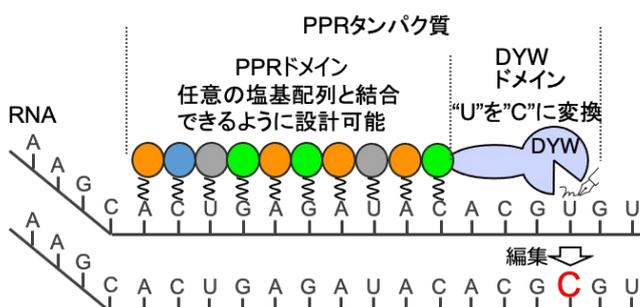
- ① ゲノム編集技術<sup>\*1</sup>の登場以来、医療、農業などの分野で細胞内の DNA 塩基配列を改変する手法の開発が加速しています。一方、ゲノムと同じく塩基配列で構成されている RNA の編集方法は限定的であり、特に書き換えられる塩基配列の種類に制限がありました。
- ② 私達は、これまで存在しなかった RNA の塩基配列”U”を”C”に書き換える技術の開発に世界で初めて成功しました。
- ③ “U”を”C”に書き換える技術は、1 塩基の変異により発症する病気の治療に応用することができます。今後、効率よく体内で作用させる技術開発や、間違っただ書き換えが起きないかどうかといった安全性に関する研究開発などを進めていくことで、新しい遺伝子治療技術になることが期待されます。

### 概要

私達の体を構成している細胞ひとつひとつには、A,C,G,T の 4 種類の文字で構成された文字列がゲノム DNA として保管されています。この文字は塩基と呼ばれ、その並び（配列）はヒトの体を構成するために必要な情報になります。細胞は、ゲノムから配列をコピーし A,C,G,U の 4 つの塩基で構成された RNA を作りだします。そこから生産されるタンパク質が正確に機能することで細胞は正常に活動できます。しかし、文字列が書き換わる（変異）と様々な病気を発症します。そのような病気を治療するためには、ゲノムあるいは RNA 上で文字列を変更する技術が必要となります。これまでの技術では、RNA 配列の”C”を”U”、あるいは”A”を”G”に書き換える（以下、編集技術）ことしか出来ませんでした。病気の原因となる変異は多様なため、他の方向への編集技術が望まれています。本研究では植物細胞の RNA 編集メカニズムに着目し、これまでに無かった”U”から”C”へ編集する技術を開発し、それがヒト細胞でも機能することを実証しました。

九州大学大学院農学研究院の中村崇裕教授とエディットフォース株式会社の一瀬瑞穂、Bernard Gutmann、八木祐介らとの共同研究グループは、植物細胞において RNA の塩基編集を司っている PPR(Pentatricopeptide repeat)タンパク質に着目し、”U”を”C”に編集する人工 PPR タンパク質をデザインしました。さらに、PPR タンパク質を改良し、大腸菌、ヒト細胞で任意の RNA 配列上の”U”を”C”に編集できることを実証しました。この技術を応用すれば、希望する位置の塩基配列を狙って編集することが可能になるため、例えば C から U(T)の 1 塩基変異が原因である病気に対して人工の PPR タンパク質を設計し効果を実証することができれば、新しい遺伝子治療方法になると期待されます。

本研究成果は、2022 年 9 月 15 日に科学雑誌 *Communications Biology* に掲載されました。



### PPR タンパク質を用いた塩基編集方法

PPR タンパク質は、RNA 配列と結合する PPR ドメインと”U”から”C”に塩基編集する DYW ドメインからなります。PPR ドメインは好きな配列に結合するように設計が可能です。そのため、編集したい箇所に応じた PPR タンパク質を作成することができ、様々な C>T 変異に対して修復可能な技術になります。

## 【研究の背景と経緯】

ゲノム編集技術は、ヒトの疾患に関する研究に革命をもたらし、治療標的の発見など様々な新たな可能性を切り開いています。しかし、直接ゲノム編集技術を医療応用する際には、ゲノムの望ましくない変異が大きナリスクにもなりえます。RNA 編集技術は、ゲノム配列を変えずに変異を修復することが可能であるため、より安全な方法を提供することができます。これまでの RNA 編集技術は、主に A から G もしくは、C から U への編集ができましたが、他の方向への編集技術はありませんでした。DNA の変異は、一般的に C から T が生じやすく、そのような変異を修復するためには T(U)から C というこれまでとは逆の方向への編集技術が必要でした。

九州大学とエディットフォース株式会社は、以前から結合する塩基配列をデザインすることができる PPR タンパク質技術の開発を行っています。PPR タンパク質は、植物で見つかった RNA 結合タンパク質で、一つの種に数百種類がコードされている巨大なタンパク質ファミリーです。35 アミノ酸の PPR モチーフが連なっているタンパク質であり、1つの PPR モチーフは1つの塩基と結合します。結合する塩基は35 アミノ酸の中の3箇所のアミノ酸の組み合わせで決定することができるため、結合させたい塩基に対応した PPR モチーフを塩基数と同じ数連結させれば好きな塩基配列と結合する RNA 結合タンパク質を作ることができます。この技術を応用した RNA 編集技術を開発してきましたが、U から C への置換はできませんでした。

この PPR タンパク質は、植物の葉緑体・ミトコンドリアで”C”を”U”に変換する RNA 編集タンパク質として機能することが知られていました。このようなタンパク質は、RNA 配列を認識して結合する PPR ドメインと、結合した RNA の特定箇所の塩基を編集するための DYW ドメインという2つのパーツで構成されています。これまでに解析された全ての DYW ドメインは”C”を”U”に編集する活性を持つことが分かっていました。一方で、シダなどの下等植物においてはゲノム上で”T”(RNA では U)の箇所が RNA では”C”に変わる現象が知られていたため、この逆方向の編集にも PPR タンパク質が関わっているだろうと考えました。

## 【研究の内容と成果】

植物細胞において RNA 編集を司っている PPR(Pentatricopeptide repeat)タンパク質に着目し、”U”を”C”に編集する活性を持つものを探索しました。シダ植物などの下等植物の PPR タンパク質の配列を調べた結果、他とは違ったタンパク質配列を持つ PPR タンパク質を見つけ、それらの配列の保存性から特徴的な部分を抜き出し人工的な DYW ドメインを複数設計しました。この DYW ドメインと人工的に配列特異性を付与した PPR ドメインを融合したタンパク質遺伝子を作成しました。これらを、大腸菌もしくはヒト培養細胞で発現させ標的 RNA 塩基が C から U もしくは U から C のどちらの方向に編集されるか調べました。その結果、これらの DYW ドメインが U から C の活性を持つことを証明しました。

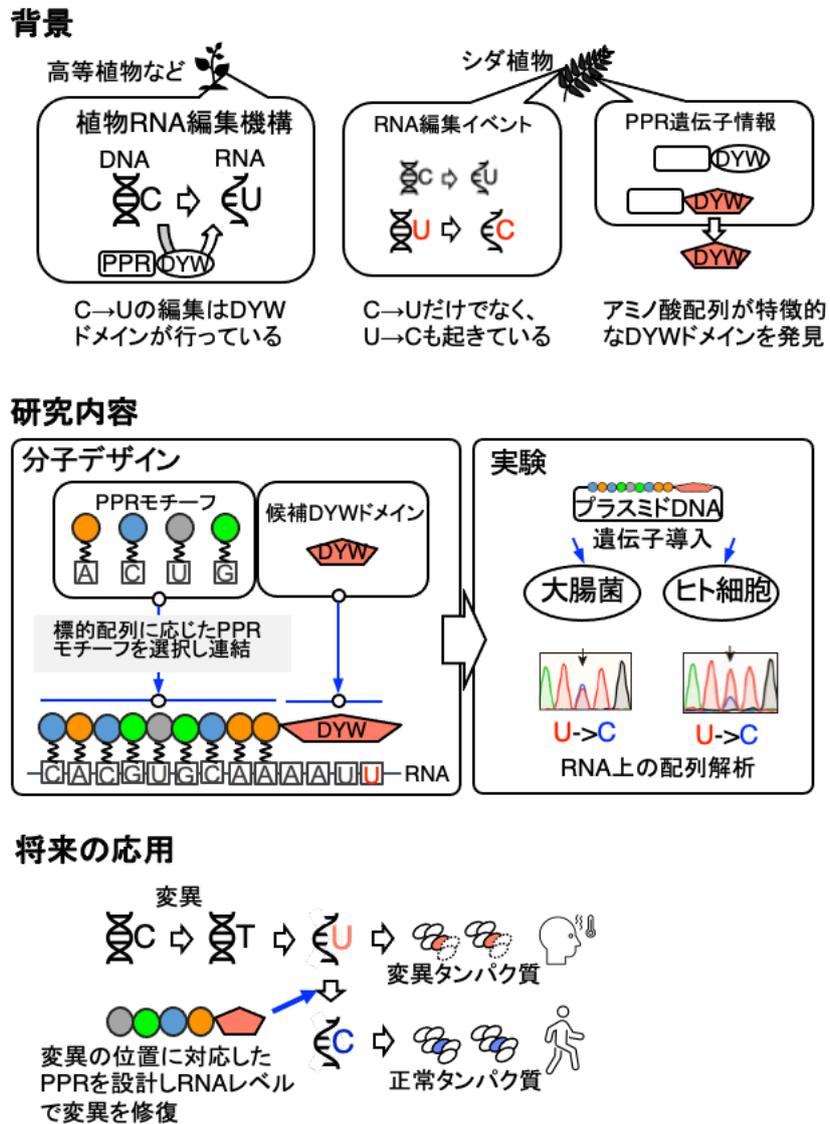
## 【今後の展開】

本研究では、1つの標的配列に対してデザインした PPR タンパク質を用いて編集活性が証明されました。今後、数年内に、様々な標的に対してもデザイン通りに機能するかどうかの検証を進め、細胞だけでなくマウスなどの個体においても応用可能な技術であることを証明していきます。さらに意図しない塩基の編集をできる限り減らすような技術開発を行っています。

将来的に本技術は、C が T に1塩基変異することが原因の病気の治療薬に応用されることが期待されます。遺伝子上で C が T に変異すると、ストップコドンと呼ばれるタンパク質が途中で合成をストップする変異が入ります。このような合成が止まったところを RNA レベルで修復し正常にタンパク質合成を進めることが可能になります。今後、そのような変異に対応した人工 PPR タンパク質を設計し

効果と安全性を実証していくことで、新しい遺伝子治療方法が確立されることが期待されます。

【参考図】



【用語解説】

(※1) ゲノム編集技術

生物のゲノム配列を直接改変する技術。ゲノム編集技術のひとつである CRISPR-Cas9 技術の開発者が2020年ノーベル化学賞を受賞している。

【謝辞】

本研究は山梨県大村智人材育成基金 山梨県若手研究者奨励事業の助成を受けたものです。

【論文情報】

掲載誌： *Communications Biology*

タイトル： U-to-C RNA editing by synthetic PPR-DYW proteins in bacteria and human culture cells

著者名： Mizuho Ichinose, Masuyo Kawabata, Yumi Akaiwa, Yasuka Shimajiri, Izumi Nakamura, Takayuki Tamai, Takahiro Nakamura, Yusuke Yagi & Bernard Gutmann

D O I : <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03927-3>

【お問合せ先】

<研究に関すること>

九州大学大学院農学研究院 教授 中村 崇裕 (ナカムラ タカヒロ)

TEL/FAX : 082-802-4721

Mail : [tnaka@agr.kyushu-u.ac.jp](mailto:tnaka@agr.kyushu-u.ac.jp)

<報道に関すること>

九州大学広報室

TEL : 092-802-2130 FAX : 092-802-2139

Mail : [koho@jimu.kyushu-u.ac.jp](mailto:koho@jimu.kyushu-u.ac.jp)