

RNA編集酵素ADAR1によるスプライシング制御を介したヒト腎細胞での薬物排泄トランスポーター発現制御機構の解析

小俣, 裕司

<https://hdl.handle.net/2324/7363727>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



博士論文

RNA 編集酵素 ADAR1 によるスプライシング制御を介した ヒト腎細胞での薬物排泄トランスポーター発現制御機構の解析

令和 7 年 3 月

九州大学大学院 薬学府 創薬科学専攻

薬剤学分野

小俣 裕司

【目 次】

発表論文	3
略語	4
緒言	6

第 1 章

RNA 編集酵素 ADAR1 による *ABCB1* 遺伝子転写産物の選択的スプライシング制御を介した ヒト腎細胞での P 糖タンパク質発現の概日リズム制御機構の解析

概要	12
序論	13
方法	15
結果	27
考察	50

第 2 章

RNA 編集酵素 ADAR1 による環状 RNA バックスプライシング制御を介した ヒト腎細胞での MRP4 発現制御機構の解析

概要	56
序論	57
方法	60
結果	76
考察	106
総括	112
参考文献	116
付記	126
謝辞	128

【発表論文】

本学位論文は、以下に示す各原著論文を基に構成している。

第 1 章に関する原著論文

Omata Y, Yamauchi T, Tsuruta A, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. RNA editing enzyme ADAR1 governs the circadian expression of P-glycoprotein in human renal cells by regulating alternative splicing of the *ABCB1* gene. *J. Biol. Chem.* 296: 100601, 2021.

第 2 章に関する原著論文

Omata Y, Okawa M, Haraguchi M, Tsuruta A, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. RNA editing enzyme ADAR1 controls miR-381-3p-mediated expression of multidrug resistance protein MRP4 *via* regulation of circRNA in human renal cells. *J. Biol. Chem.* 298: 102184, 2022.

参考論文

Omata Y, Haraguchi M, Yoshinaga S, Ogino T, Okawa M, Tsuruta A, Koyanagi S, Ohdo S. RNA editing enzyme ADAR2 regulates P-glycoprotein expression in murine breast cancer cells through the circRNA-miRNA pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 726: 150289, 2024.

Kanado Y, Tsurudome Y, **Omata Y**, Yasukochi S, Kusunose N, Akamine T, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Estradiol regulation of P-glycoprotein expression in mouse kidney and human tubular epithelial cells, implication for renal clearance of drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 519: 613–619, 2019.

【略 語】

3'UTR, 3' untranslated region
A-to-I, adenosine to inosine
ABC, ATP-binding cassette
ACT-D, actinomycin D
ADAR, adenosine deaminases acting on RNA
AHR, aryl hydrocarbon receptor
ANOVA, analysis of variance
ATF4, activating transcription factor 4
BCRP, breast cancer resistance protein
BMAL1, brain and muscle arnt-like 1
bp, base pairs
BSJ, back-splice junction
cDNA, complementary DNA
CDS, coding sequence
ceRNA, competing endogenous RNA
CHX, cycloheximide
circRNA, circular RNA
CMV, cytomegalovirus
CRE, cAMP-response element
DEX, dexamethasone
DMSO, dimethyl sulfoxide
dsRBD, double-stranded RNA binding domain
dsRNA, double-stranded RNA
GFP, green fluorescent protein
HIPK3, homeodomain interacting protein kinase 3
HLF, hepatic leukemia factor
IRA/*u*, inverted repeat *A/u*
KD, knockdown
Luc, Luciferase
MATE, multidrug and toxic compound extrusion
MEM α , minimum essential medium α

miRNA, microRNA
mRNA, messenger RNA
MRP, multidrug resistance-associated protein
mut, mutation
NMD, nonsense-mediated mRNA decay
NRF2, NFE2 like bZIP transcription factor 2
nt, nucleotides
OAT, organic anion transporter
OCT, organic cation transporter
OCTN, novel organic cation transporter
OX, overexpression
P-gp, P-glycoprotein
PARRE, PAR bZip response element
PBS, phosphate buffered saline
PCR, polymerase chain reaction
PEPT, peptide transporter
PPAR α , peroxisome proliferator activated receptor α
pre-mRNA, precursor messenger RNA
PVR, poliovirus receptor cell adhesion molecule
RIP, RNA immunoprecipitation
RPTECs, renal proximal tubular epithelial cells
rRNA, ribosomal RNA
RT, reverse transcription
SCN, suprachiasmatic nucleus
shRNA, small hairpin RNA
SLC, solute carrier
snRNP, small nuclear ribonucleoprotein
ss, splice site
TBP, TATA-box binding protein
TSS, transcription start site
ZT, zeitgeber time

【緒 言】

生体に投与された薬物は直ちに薬効を示すのではなく、体内に吸収されて血液循環系に入り、全身をめぐり体内の各組織に分布する。そのなかで、作用部位に到達した一部の薬物が効果を発揮するが、同時に代謝を受けて尿や糞便中へ排泄される。このように、薬物が生体に投与されてから排泄されるまでの一連の挙動を体系化した学問領域は「薬物動態」と呼ばれ、特に重要性の高い「吸収 (Absorption) ・ 分布 (Distribution) ・ 代謝 (Metabolism) ・ 排泄 (Excretion)」の 4 つの過程は、その頭文字をとって「ADME」と称されている。各薬物の ADME を理解し、体内での挙動を把握・制御することは、新薬の開発だけでなく、薬物治療の最適化の観点からも重要である。

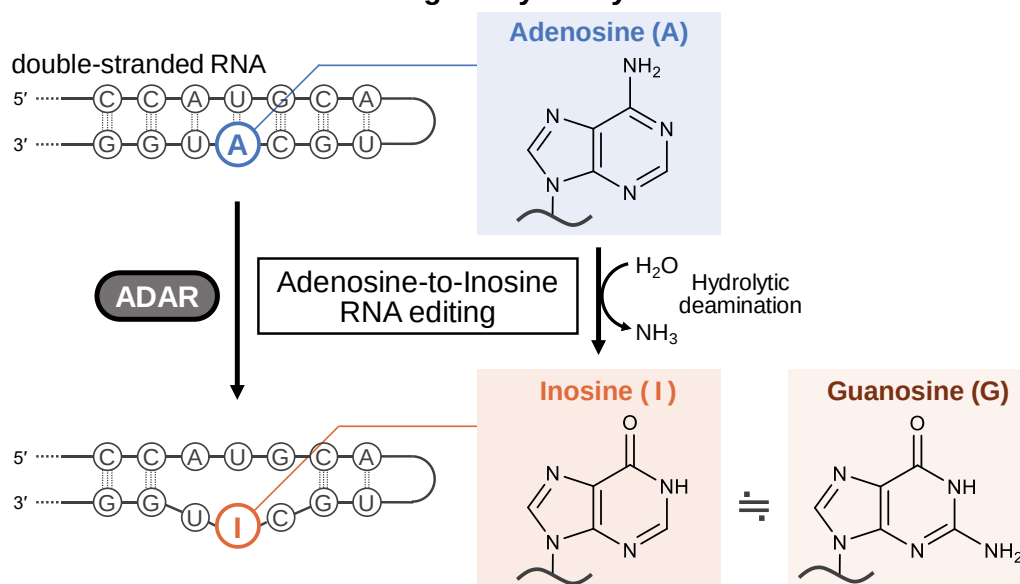
薬物は未変化体のまま、あるいは代謝物となって体外へ排泄されるが、代表的な経路は腎臓を介した尿中排泄である。腎臓の構造的基本単位はネフロンであり、ネフロンは糸球体・ボーマン嚢からなる腎小体と、近位尿細管・ヘンレ係蹄・遠位尿細管からなる尿細管で構成されている。糸球体での濾過、近位尿細管での分泌、遠位尿細管での再吸収が薬物腎排泄の構成要素である。その中で、近位尿細管での分泌には多くの薬物排泄トランスポーターが関与している。近位尿細管には極性が存在しており、血液側である側底膜と尿細管管腔側である刷子縁膜では、発現しているトランスポーターが大きく異なる。刷子縁膜側に発現している P 糖タンパク質 (P-gp, P-glycoprotein)、MRPs (multidrug resistance-associated protein)、BCRP (breast cancer resistance protein) は ATP のエネルギーを直接利用する一次性能動輸送担体であり、基質認識能が広く、多くの薬物の腎排泄に関与する。これらトランスポーターの発現制御機構を解明することは、薬物の体内動態の正確な把握に繋がり、新薬開発・効果的な薬物治療に貢献することが期待される。

DNA がもつ遺伝情報を基にして機能性分子であるタンパク質が生成されるまでには、多くの複雑な制御機構が存在する。DNA から遺伝子の配列情報を RNA に写し取る「転写」によって合成された mRNA 前駆体は、スプライシングによって不要な intron が除去

されて exon が連結することで成熟型 mRNA となる。mRNA は核内から細胞質のリボソームへ移動し、「翻訳」を受けることでタンパク質が作られる。このような「DNA」「mRNA」「タンパク質」という一連の流れをセントラルドグマと呼ぶ。その重要性の高さから、多くの遺伝子発現制御に関する研究はこのセントラルドグマに重点が置かれてきた。しかし、科学技術の発展に伴い、転写・翻訳だけでなく、その他の多くの制御機構の存在が明らかになりつつある。転写後の RNA の配列や安定性を制御する「転写後制御」、翻訳後のタンパク質に修飾を加える「翻訳後制御」がその代表的な事例である。

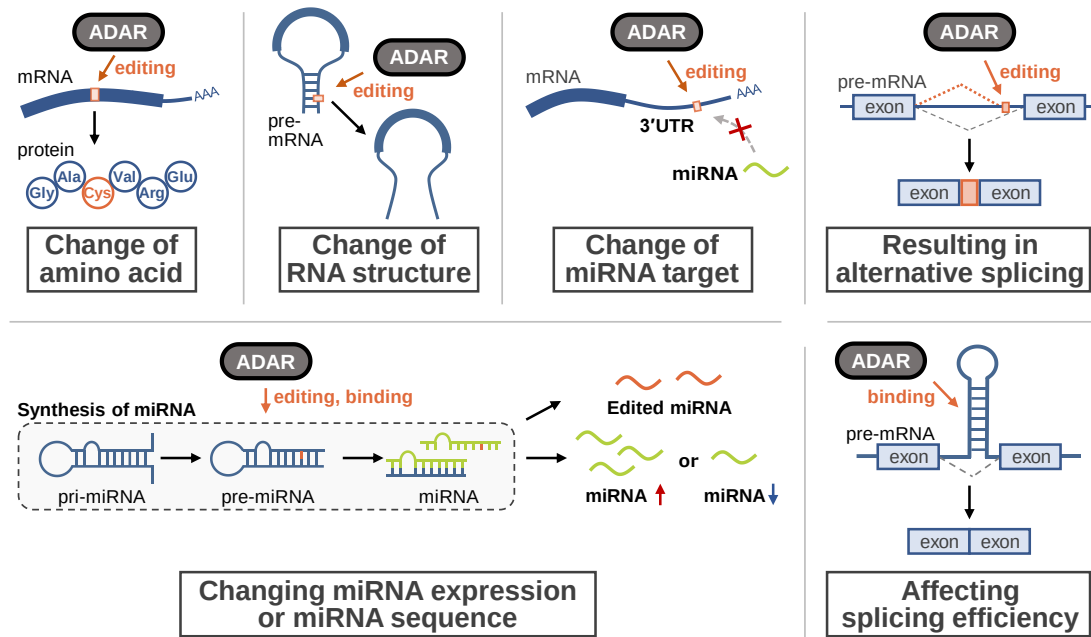
転写後制御のうち、RNA の配列を変える「RNA 編集」と、mRNA 前駆体から intron を除去する「スプライシング」の制御は生じる頻度の高さから重要性が高く、また、相互に制御し合うことが提唱されている [Hsiao et al., 2018]。Adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) ファミリーは代表的な RNA 編集酵素であり、2 本鎖 RNA (dsRNA, double-stranded RNA) 上に存在するアデノシンを脱アミノ化によってイノシンに変換する [Nishikura, 2010]。イノシンはグアノシンの構造類似体でありシチジンと塩基対を形成するため、ADAR による RNA 編集は、アデノシンをグアノシンに変換することと同義である (下図)。ADAR による

Adenosine-to-Inosine RNA editing catalyzed by ADAR



Schematic diagram of Adenosine-to-Inosine RNA editing by ADAR. ADAR converts adenosines to inosines in double-stranded RNA structure.

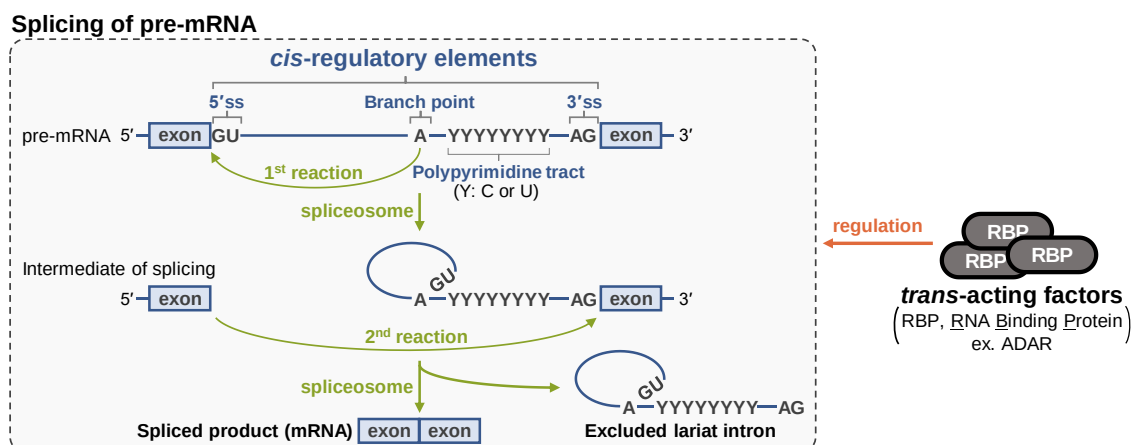
Various effects of RNA editing by ADAR



Schematic diagram showing the various effects of RNA editing. ADAR affects a variety of phenomena in cells, depending on the target sites of RNA editing.

RNA 編集が生じると、その標的部位に応じて様々な影響が生じる (上図)。例えば、アミノ酸をコードしている mRNA の exon に RNA 編集が生じると、アミノ酸配列の変化が引き起こされる。mRNA 前駆体 (pre-mRNA) での RNA 編集では RNA の塩基対形成が破壊されて 2 次構造が変化する場合がある。mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR, 3' untranslated region) での RNA 編集は microRNA(miRNA) の標的が変化するほか、ADAR は miRNA の成熟過程に作用してその発現量を制御する。さらに、intron での RNA 編集が選択的スプライシングを誘導するなど、ADAR はスプライシング制御因子の 1 つであると考えられている。

スプライシングは核内リボヌクレオタンパク質 (snRNP) と補助タンパク質を含む RNA-タンパク質複合体であるスプライソソームによって触媒される、mRNA 前駆体から intron を除去する反応である。Intron 上に存在する 5'splice site (5'ss) や 3'ss、ブランチ部位やポリピリミジン配列などの *cis*-regulatory element によって exon-intron 構造が決定される。また、多くの RNA 結合タンパク質がスプライシングの *trans*-acting factor として機能し、スプライシング制御に関与する (次頁図)。ADAR ファミリーは RNA 編集活性依存的、あるいは非依存的にスプライシングを制御することが知られている [Tang et al., 2020]。



Schematic diagram of the splicing reaction of pre-mRNA.

本研究では、ADAR ファミリーの 1 つである ADAR1 による選択的スプライシング制御に着目して、ヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs, renal proximal tubular epithelial cells) における薬物排泄トランスポーター発現制御機構の解明を試みた。shRNA を用いて ADAR1 の発現を抑制した培養ヒト RPTECs において、P-gp タンパク質の発現量は低下し、MRP4 タンパク質の発現量は上昇した。そこで、第 1 章では ADAR1 による P-gp 発現制御について、第 2 章では MRP4 発現制御について検討を行った。P-gp の基質薬物の腎クリアランスは投薬時刻の違いにより変動することが指摘されているが、カニクイザルの腎臓における P-gp および ADAR1 の発現に概日リズムが認められたことから、第 1 章では ADAR1 による P-gp 発現の概日リズム制御機構を検討した。Dexamethasone (DEX) を短時間曝露することで概日時計機構を再構築した RPTECs において、ADAR1 と P-gp の発現に約 24 時間周期の変動が認められた。P-gp タンパク質をコードする *ABCB1* mRNA には ADAR1 による RNA 編集箇所は認められなかったが、ADAR1 が *ABCB1* mRNA 前駆体の intron に結合して時刻依存的に選択的スプライシングを抑制することで、P-gp タンパク質発現の概日リズムを制御することが明らかになった。第 2 章では、ADAR1 による環状 RNA 発現制御に着目した。ADAR1 が環状 RNA circHIPK3 の生成過程である back-splicing を RNA 編集依存的に抑制することで、microRNA である miR-381-3p の発現が上昇し、MRP4 の発現抑制が認められた。このように、ADAR1 が RNA 編集活性依存的あるいは非依存的にスプライシングを制御することで、ヒト RPTECs で薬物排泄トランスポーターの発現制御を担うことが明らかになった。

第 1 章

RNA 編集酵素 ADAR1 による *ABCB1* 遺伝子転写産物の
選択的スプライシング制御を介した
ヒト腎細胞での P 糖タンパク質発現の概日リズム制御機構の解析

【概 要】

ヒトを含め哺乳類の様々な生体機能は、約 24 時間を 1 周期とする概日リズムを示す。薬物排泄に関わるトランスポーターの発現や機能にも概日リズムが認められ、薬物の効果や毒性、体内動態に投薬時刻による違いが引き起こされる。ATP-binding cassette sub-family B member 1 (*ABCB1*) 遺伝子にコードされている P 糖タンパク質 (P-gp, P-glycoprotein) は様々な臓器に発現し、薬物の組織移行性や排泄に関わるトランスポーターであるが、P-gp の基質薬物の腎クリアランスは投薬時刻の違いにより変動することが指摘されている。しかしながら、そのメカニズムは明らかにされていない。本研究では、RNA 編集酵素の 1 つである adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) が、ヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs, renal proximal tubular epithelial cells) において P-gp 発現の概日リズム制御に関与していることを明らかにした。Dexamethasone (DEX) を短時間曝露することで概日時計分子の発現リズムを同調した RPTECs において、P-gp の発現は約 24 時間周期の発現変動を示したが、shRNA を用いて ADAR1 の発現を抑制するとそのリズムは消失した。ADAR1 は 2 本鎖 RNA 上のアデノシンをイノシンに変換する酵素であるが、RPTECs における *ABCB1* 遺伝子転写産物に RNA 編集部位は検出されなかった。一方、ADAR1 発現の抑制によって *ABCB1* の選択的スプライシングが誘導され、intron 27 が保持された転写産物の産生が認められた。この intron 27 保持型の選択的スプライシング産物は、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD, nonsense-mediated mRNA decay) により分解される不安定な転写産物であったことから、ADAR1 は *ABCB1* 遺伝子の転写産物の選択的スプライシングを時刻依存的に抑制して、P-gp タンパク質の発現に概日リズムを生じさせることが明らかになった。

【序 論】

生理機能の概日リズムは薬物の効果や毒性に影響を与える重要な因子であり、多くの薬物の治療効果は投薬する時刻によって変化する [Ohdo et al., 2011; Dallmann et al., 2016]。一般に薬物の効果や毒性は、作用部位における薬物への感受性とその濃度によって規定されるが、吸収・分布・代謝・排泄などの薬物の体内動態を制御する分子の発現や機能には概日リズムが認められる [Ohdo et al., 2019]。ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターはエネルギー依存的に毒物を細胞から排泄する膜タンパク質である。ABC トランスポーターは主に脳、肝臓、小腸や腎臓などの上皮細胞に発現しており、薬物の胆汁、小腸、腎排泄の機能も担っている [Shitara et al., 2006; Sissung et al., 2014]。複数の ABC トランスポーターの発現や機能には概日リズムが認められており、その基質となる薬物の体内動態に投薬時刻による違いを生じさせる [Hamdan et al., 2012; Yu et al., 2019; Kato et al., 2020]。過去に当研究室では、*ABCB1* 遺伝子にコードされている P 糖タンパク質 (P-gp, P-glycoprotein) の発現と機能が、マウスとカニクイザルの小腸で概日リズムを示すことを見出しており [Murakami et al., 2008; Iwasaki et al., 2015]、両動物で P-gp 発現の概日リズムは小腸からの基質薬物の吸収に投薬時刻による差異を引き起こすことを明らかにしている。ヒトにおいて、P-gp の基質薬物の腎クリアランスに投薬時刻による差異が報告されていることから [Ferrazzini et al., 1991; Choi and Park, 1999]、P-gp の薬物排泄活性に概日リズムがあることが示唆されているが、ヒト腎細胞における P-gp の発現と機能における概日リズムの有無は明らかにされていない。

一般的に、タンパク質の発現量は遺伝子発現の様々な過程で制御されており、合成過程だけでなく mRNA とタンパク質の分解過程も膜タンパク質の発現量に影響を及ぼしている。時計遺伝子やその標的となる遺伝子の概日リズムも、転写・転写後・翻訳・翻訳後など様々な過程で引き起こされている [Fustin et al., 2013; Okazaki et al., 2014; Tsurudome et al., 2018]。転写後制御の中でも、adenosine-to-inosine (A-to-I) RNA 編集は哺乳類において最も頻発する塩基変換である [Nishikura, 2010]。イノシンはグアノシンの構造類似体であり、シチジンと

塩基対を形成する。従ってアデノシンからイノシンへの A-to-I RNA 編集は、アミノ酸配列の置換、microRNA (miRNA) の標的の変化、スプライシングの変容など様々な波及効果をもたらす。A-to-I RNA 編集は adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) によって引き起こされるが、本酵素は 2 本鎖 RNA に存在するアデノシンを脱アミノ化してイノシンに変換する。ヒトの ADAR family には、ADAR1 と ADAR2 の 2 つの機能的な遺伝子が同定されている。ADAR1 はさらに、ADAR1-p110 と ADAR1-p150 の 2 つのアイソフォームが存在し、ADAR1-p110 が恒常的に核に発現する一方で、ADAR1-p150 はインターフェロン誘導性のプロモーターを有し、その発現は細胞質に局在している [Patterson and Samuel, 1995; Nishikura, 2010]。近年、マウスの肝臓において A-to-I RNA 編集が概日リズムを示すことが明らかにされ [Terajima et al., 2017]、A-to-I RNA 編集が幅広い mRNA の概日リズム形成に寄与していることが示唆されている。

一方で、ADAR1 による RNA 編集は薬物代謝酵素の発現を制御することも指摘されている [Nakano and Nakajima, 2018]。例えば、ADAR1 が芳香族炭化水素受容体 (AhR) mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR, 3' untranslated region) に miRNA 標的配列を形成させ、AhR の発現量を低下させることが報告されている [Nakano et al., 2016]。AhR の低下はその下流の *Cytochrome 1A1* の発現を低下させて、薬物代謝を抑制する。本研究では、腎臓の薬物排泄を担うトランスポーターの制御における RNA 編集の役割を解析するなかで、ヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs, renal proximal tubular epithelial cells) での ADAR1 の発現抑制が P-gp の発現量の低下を引き起こすことを発見した。概日時計分子の発現リズムを同調した RPTECs において P-gp の発現は約 24 時間周期の発現変動を示したが、その発現変動は ADAR1 ノックダウンによって消失した。そこで、本章では概日時計機構を再構築したヒト RPTECs を対象に、ADAR1 による P-gp 発現の概日リズム制御機構について解析を行った。

【方 法】

細胞培養

ヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs: SA7K clone) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。RPTECs は 5.5% RPTECs Complete Supplement、2.33 mM L-glutamine、28 μ M gentamicin、14 nM amphotericin B を含む MEM α 培地 (すべて Sigma-Aldrich) で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養して、各実験に用いた。

ADAR1-knockdown (ADAR1-KD) RPTECs の作製

ADAR1 に対する small hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターを 3 種類パッケージしたレンチウイルス粒子 (sc-37657-V; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を RPTECs に感染させた。感染 24 時間目から 5 μ g/mL puromycin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan) でセレクションを行い、shRNA 安定発現株 (ADAR1-KD RPTECs) を作製した。ADAR1 の発現量の低下は western blotting で確認した。

Western blotting

RPTECs およびカニクイザルの腎臓組織の総タンパク質の抽出は、CellLytic MT Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。等量のサンプルバッファ (0.05 M Tris-HCl, 2% SDS, 0.06% 2-mercaptoethanol, 1% glycerol) を加え、95°C で 5 分間加熱することで、変性処理を行った。変性させたタンパク質はポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、polyvinylidene difluoride メンブレンに転写した。その後、メンブレンを 1% スキムミルクに浸して室温で 1 時間ブロッキング処理を行い、抗 ADAR1 抗体 (1:1000, sc-73408; Santa Cruz Biotechnology)、抗 P-gp 抗体 (1:1000, C219; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、抗 MRP2 抗体 (1:1500, sc-5770; abcam, Cambridge, UK)、MRP4 抗体 (1:3000, ab15602; abcam)、抗 β -ACTIN 抗体 (1:10000, sc-1616; Santa Cruz Biotechnology)、抗 TBP

抗体 (1:1000, ab51841; Santa Cruz Biotechnology) 溶液中にて 4°C で一晩インキュベートした。ADAR1、P-gp、TBP の 2 次抗体として抗 mouse IgG 抗体 (1:10000, sc-2005; Santa Cruz Biotechnology)、MRP2 の 2 次抗体として抗 goat IgG 抗体 (1:10000, sc-2020; Santa Cruz Biotechnology)、MRP4 の 2 次抗体として抗 rat IgG 抗体 (1:10000, ab97057; abcam) を用いた。各タンパク質の検出には ImmunoStar LD (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.) を使用し、化学発光は ImageQuant LAS3000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan) で撮影した。

ダイレクトシーケンス解析

RPTECs の RNA 抽出は ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega, Madison, WI) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。ゲノム DNA を除くため、カラム上で DNase I 処理を行った。500 ng の RNA を ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて逆転写して cDNA を合成した。ゲノム DNA の抽出は Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。

Poliovirus receptor (PVR) 3'UTR の配列は、RPTECs のゲノム DNA もしくは cDNA を鋳型にして、GoTaq Green Master Mix (Promega) と遺伝子特異的な outside primer (Human *PVR* 3'UTR outside, **Table 1-1**) を用いて PCR で増幅した (1st PCR)。1st PCR 産物を鋳型にして、inside primer (Human *PVR* 3'UTR inside, **Table 1-1**) を用いて 2nd PCR を実施した。2nd PCR 産物を精製して、2nd PCR の primer を用いてサンガー法でシーケンスおよび RNA 編集の有無を確認した。*PVR* 3'UTR (chr19:45,168,642) の RNA 編集レベルは、以下の式を用いて算出した。

$$\text{RNA editing level (\%)} = \frac{\text{peak height of "G"}}{\text{peak height of "G" + peak height of "A"}} \times 100$$

ABCB1 intron 27 の配列は、RPTECs のゲノム DNA もしくは cDNA を鋳型にして、GoTaq Green Master Mix (Promega) と遺伝子特異的な outside primer (Human *ABCB1* intron 27 outside, **Table 1-1**) を用いて PCR で増幅した。PCR 産物は、アガロースゲルから QIAquick Gel

Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて目的の 1590 bp のバンドを切り出して精製した後、inside primer (Human *ABCB1* intron 27 inside, **Table 1-1**) を用いてサンガー法によって RNA 編集の有無を確認した。サンガー法でのシーケンス解析は Fasmac Co., Ltd. (Kanagawa, Japan) に依頼して、波形の図示および peak height の測定には SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>) を用いた。

Table 1-1 Primer sets for direct sequencing

Gene / primer	sequence
Human <i>PVR</i> 3'UTR outside	
Forward	5'-CACAGAGCCAGGAATGGAGAGTG-3'
Reverse	5'-ATGTTCCAACCACCCAGACAGAGG-3'
Human <i>PVR</i> 3'UTR inside	
Forward	5'-GGCTAAAACACTCCACACCCTC-3'
Reverse	5'-ACAAACAGCAGAGCAGCAGA-3'
Human <i>ABCB1</i> intron 27 outside	
Forward	5'-AGCTCGTGCCCTTGTTAGAC-3'
Reverse	5'-GGCGGTGAGCAATCACAATG-3'
Human <i>ABCB1</i> intron 27 inside	
Forward	5'-ATGGAGTCTCGCTCTGTCTG-3'

定量的/半定量的 RT-PCR

RPTECs およびカニクイザルの腎臓組織の RNA 抽出は、RNAiso Plus (Takara Bio Inc.) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。500 ng の RNA を ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo Co., Ltd.) を用いて逆転写して cDNA を合成した。定量的 RT-PCR では、cDNA は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo Co., Ltd.) および LightCycler 96 system (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて PCR を行い、検量線法によって各遺伝子の発現量を測定した。半定量的 RT-PCR では、cDNA を GoTaq Green Master Mix (Promega) を用いて PCR を行い、エチジウムブロマイドを含む 1%アガロースゲルで電気泳動して PCR 産物を分離した。PCR 産物は ImageQuant LAS3000 (FUJIFILM) を用いて定量した。アガロースゲルから目的のバンドを切り出して精製した後、サンガー法によって配列を確認することで、目的の配列が増幅されていることを確認した。本実験で使用した各遺伝子のプライマーの配列を **Table 1-2** に示す。

Table 1-2 Primer sets for RT-PCR analysis of gene expression

Gene / primer	sequence
Human <i>SLC15A1</i>	
Forward	5'-TCACCTGTGGCGAAGTGGTC-3'
Reverse	5'-AGCACCGACTTCATGTTGGAAG-3'
Human <i>SLC15A2</i>	
Forward	5'-TCGTCTGGTCTCCAAGTGTGG-3'
Reverse	5'-TGGGCTGGGGCCATTTCAATTT-3'
Human <i>SLC22A4</i>	
Forward	5'-TGCCCAGGCGTTATATCATAGC-3'
Reverse	5'-AGCATGACCAGACCAATGGATAAG-3'
Human <i>SLC22A5</i>	
Forward	5'-ATGGGTGTGGGAGTCAGCTC-3'
Reverse	5'-GAATGTAGGGCAGGAAGCGG-3'
Human <i>SLC47A1</i>	
Forward	5'-ATGTGTCCAGGCTTACCCAGAC-3'
Reverse	5'-GACAAGGTTGGCTGCAACTCC-3'
Human <i>SLC47A2</i>	
Forward	5'-CTCCGCCTATGCCAACATCATC-3'
Reverse	5'-GGGACAGCCAGGGAGAAGAAG-3'
Human <i>SLC22A2</i>	
Forward	5'-CATCGTCACCGAGTTTAACTG-3'
Reverse	5'-AGCCGATACTCATAGAGCCAAT-3'
Human <i>SLC22A6</i>	
Forward	5'-AGGAGCCAAATTGAGTATGGAGG-3'
Reverse	5'-GTATGCAAAGCTAGTGGCAAACC-3'
Human <i>SLC22A8</i>	
Forward	5'-AGCACCGTCATCTTGAATGTGG-3'
Reverse	5'-AGGTGTAGCAGTACCCGAGTG-3'
Human <i>ABCB1</i>	
Forward	5'-CCATGCTCAGACAGGATGTGA-3'
Reverse	5'-ATCATTGGCGAGCCTGGTAG-3'
Human <i>ABCC2</i>	
Forward	5'-TGCAACTCTACTTTTTTGGAA-3'
Reverse	5'-TCTCTTGGTCCTGGATTTAT-3'
Human <i>ABCC4</i>	
Forward	5'-AGTCAATTCTGAAAGCTCCGGTA-3'
Reverse	5'-CGGCAGCAAATCATCCAAGTG-3'
Human <i>ABCG2</i>	
Forward	5'-ATGTAATTCAGGTTACGTGG-3'
Reverse	5'-CTAACTCTTGAATGACCCTG-3'
Human <i>PERIOD2</i>	
Forward	5'-GACATGAGACCAACGAAAACCTGC-3'
Reverse	5'-AGGCTAAAGGTATCTGGACTCTG-3'
Human <i>BMAL1</i>	
Forward	5'-AAGGGAAGCTCACAGTCAGAT-3'
Reverse	5'-GGACATTGCGTTGCATGTTGG-3'
Human <i>ABCB1</i> [RIP-assay]	
Forward	5'-ATGGAGTCTCGCTCTGTCTG-3'
Reverse	5'-GTGCCTGTAGTCCCAGCTAG-3'

Human <i>ABCB1</i> [semi-quantitative PCR]		
Forward		5'-TTCGCAACCCCAAGATCCTC-3'
Reverse		5'-ATGTGCCACCAAGTAGGCTC-3'
Human 18S rRNA		
Forward		5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
Reverse		5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'
Monkey <i>PERIOD2</i>		
Forward		5'-GGGCCCTTTGAATGAGGACG-3'
Reverse		5'-CTGGAGGAGGTCTGGCTCAT-3'
Monkey <i>BMAL1</i>		
Forward		5'-CGGCGCCGGGATAAAATGAA-3'
Reverse		5'-GCTGCCCTGAGAATGAGGTG-3'
Monkey <i>β-ACTIN</i>		
Forward		5'-CCTTCAACACCCCAGCCATG-3'
Reverse		5'-TAGGGCGACATAGCACAGCT-3'

実験動物

4–7 歳の雄性のカニクイザル (cynomolgus monkeys) は Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd. (Wakayama and Kagoshima, Japan) から購入し、NAS Laboratory, Ltd. (Chiba, Japan)、または TransGenic Inc. (Hyogo, Japan) の各動物実験施設で飼育した。飼育は自由飲水、一定の温度 ($24 \pm 2^\circ\text{C}$)、一定の湿度 ($50 \pm 20\%$)、12 時間の明暗周期の条件で行った。Zeitgeber time (ZT) 0 から ZT12 を明期、ZT12 から ZT24 を暗期とした。各ケージに一匹ずつ飼育し、90–100 g の固形食料 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) と 30 g の果物を 1 日 1 回、ZT1.5 から ZT3 に与えた。カニクイザルは ZT2、ZT8、ZT14、ZT20 に麻酔下で安楽死させ、摘出した腎臓は液体窒素の中で急速冷凍し、 -80°C で保存した。なお、全ての動物実験は、各施設における実験動物委員会による承認を受けた後、その方針に従って実施し、本学では譲渡されたサンプルを用いた解析のみを行った。

RPTECs における時計遺伝子の発現リズムの同調

通常、個々の細胞はそれぞれ独立した時計遺伝子の発現リズムを有しており、細胞集団としてのリズムを検出することはできない (Fig. 1-1①)。一方、哺乳類の培養細胞にグルココルチコイドアナログである Dexamethasone (DEX) を添加して短時間刺激した場合 (Fig. 1-1②)、個々の細胞の *PERIOD1* 遺伝子の発現が一過性に誘起され分子時計がリセットされ、細胞集団全体で同調した概日リズムを検出できるようになり (Fig. 1-1③)、培養細胞で概日時計機構を再構築することができる [Balsalobre et al., 2000a]。そこで、各種細胞に DEX (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.) を終濃度 100 nM で 2 時間曝露して、時計遺伝子発現の同調を実施した。DEX を含まない培地に交換後、52 時間後までの所定の時間に細胞を回収し、各実験に用いた。

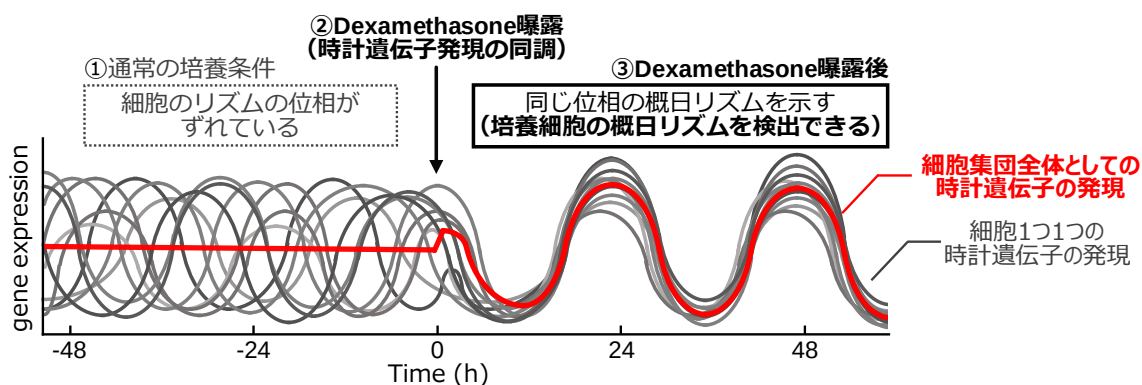


Figure 1-1. Schematic image of the concept of circadian clock synchronization in cultured cells by the treatment of dexamethasone.

細胞内ジゴキシン存在量の測定

P-gp の薬物輸送活性を評価するために、P-gp の代表的な基質であるジゴキシンの細胞内存在量を LC-MS/MS で測定した。上記の方法で時計遺伝子の発現リズム同調後 32 時間および 44 時間、もしくは終濃度 1 μ M の NMDI-14 (Merck Millipore, Burlington, MA) 添加後 24 時間の Mock および *ADAR1*-KD RPTECs の培地を、1 μ M のジゴキシン (ジゴシン®注; Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を含む Krebs–Ringer buffer (117 mM NaCl, 4.7 mM

KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 10 mM HEPES, 2.5 mM CaCl₂, 11 mM D-glucose) に交換して 1 時間インキュベートした。細胞を生理食塩水で 2 回洗浄した後、内部標準 (3.3 μM ジギトニン, Sigma-Aldrich) を含むメタノール中でホモジネートした。12,000 × g、4°C で 5 分間遠心して、上清を 0.22-μm polyvinylidene difluoride メンブレン (Merck Millipore) で濾過した。エバポレートした後、50 μL の移動相に再溶解した。LC-MS/MS は ACQUITY (Waters, Milford, MA)、液体クロマトグラフィーのカラムは CORTECSC18+ (2.7 μm, 2.1 mm × 100 mm; Waters) を用いた。移動相には 10 mM ギ酸アンモニウム-メタノール (1:4, v/v) を用いて、流速は 0.2 mL/min とした。質量分析計は多重反応モニタリング (MRM) で、ポジティブエレクトロスプレーイオン化法を用いた。MRM の質量電荷比 (*m/z*) は、ジゴキシンは 798.8-651.5、ジギトニンは 1247-781.6 とした。ジゴキシン存在量は Pierce BCA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で測定した総タンパク量で補正した。

プラスミドベクターの作製

ヒト *ABCB1* 遺伝子の塩基配列情報をもとに、プロモーター領域として転写開始点の上流 2091 nt から下流 701 nt、および 3'UTR として終止コドンから下流 391 nt の領域を増幅するように、制限酵素認識配列 (KpnI/NheI および XbaI/FseI) を 5'末端に付加したプライマーを設計して、RPTECs のゲノム DNA を鋳型にして PrimeSTAR MAX DNA polymerase (Takara Bio Inc.) を用いて PCR を行った。プロモーター領域の PCR 産物は pGL4.12 (Promega)、3'UTR の PCR 産物は pGL4.13 (Promega) へそれぞれ挿入した。*ABCB1* exon 27-exon 28 minigene の配列は、*ABCB1* 遺伝子の exon 27 から exon 28 までの配列 (intron 27 を含む) を、制限酵素認識配列 (NheI/KpnI) を 5'末端に付加したプライマーを用いて RPTECs のゲノム DNA を鋳型にして PCR を行った。PCR 産物を pcDNA3.1 (Invitrogen; Life Technologies) へ挿入した。本実験で使用するプライマーの配列を **Table 1-3** に示す。

Table 1-3 Primer sets for plasmid construction and minigene assay

The numbers indicate the distance from the transcription start site (+1) for the upstream vector or from the nucleotide immediately after the stop codon (+1) for the 3'UTR vector.

Gene / primer	sequence
Human <i>ABCB1</i> upstream	
Forward for -2091 nt	5'-GCTGGTACCTCAACTTGCAAGGGGACCAAG-3'
Reverse for +703 nt	5'-ATAGCTAGCCGACCTGAAGAGAAACCGCA-3'
Human <i>ABCB1</i> 3'UTR	
Forward for +1 nt	5'-GCGCTCTAGAACTCTGACTGTATGAGATG-3'
Reverse for +391 nt	5'-TAAGGCCGCGCCAGTCACATGAAAGTTTAG-3'
Human <i>ABCB1</i> minigene	
Forward for exon 27	5'-CGTGCTAGCGCAAGCTGTTAGAACTTTACTTTCA-3'
Reverse for exon 28	5'-CGCGGTACCACAGGCAGTTTGGACAAGATGA-3'

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

各種細胞を 1.5×10^5 cells/well の細胞数で 24 ウェルプレートに播種した。Lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen; Life Technologies) を用いて、500 ng のプロモーターレポーターベクターもしくは 200 ng の 3'UTR レポーターベクターをリバース法でトランスフェクトした。その際、10 ng の pRL-TK ベクター (Promega) を内部標準として共トランスフェクトした。Mock および *ADAR1*-KD RPTECs は 24 時間後に細胞を回収して、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。Naive RPTECs はトランスフェクション後 24 時間に、前述した方法で概日時計機構の再構築を行い、32 時間および 44 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性の比を補正後のルシフェラーゼ活性とした。

mRNA の安定性の測定

上記の方法で概日時計機構の再構築後 32 時間および 44 時間の RPTECs、もしくは未処置の Mock および *ADAR1*-KD RPTECs の培地を、転写阻害剤である Actinomycin D (ACT-D; FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.) を終濃度 $5 \mu\text{M}$ で含む培地に交換した。培地交換後 3 時間ごとに、6 時間後もしくは 12 時間後まで細胞を回収し、上記の方法で RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR で mRNA の安定性を測定した。

RNA の 2 次構造解析

ヒト *ABCB1* 遺伝子の転写産物の 2 次構造解析には RNAfold を用いた。RNAfold は、RNA の 2 次構造形成による自由エネルギーの低下を算出して、最も安定な構造（細胞内で実際に存在している可能性の高い構造）を予測できるソフトウェアである [Lorenz et al., 2011]。 *ABCB1* intron 27 の解析では intron 27 のうち 634–1370 番目の塩基を入力し、その他の intron の解析ではそれぞれ intron の全長を入力して、パラメータ設定は初期値で解析を行った。また、その他の intron の解析では、RNA 編集のデータベースである REDportal [Picardi et al., 2017] に登録されている RNA 編集サイト周辺の 2 次構造を示し、ADAR1 が結合し得る安定な 2 本鎖構造をとるか検証した。解析結果は最小自由エネルギー (minimum free energy) で示し、塩基対を形成する可能性 (base-pair probabilities) で色分けした。暖色系が塩基対形成の可能性が高い安定的な構造を、寒色系が塩基対形成の可能性が低い不安定な構造を示している。

RNA 免疫沈降法

1.0×10^6 個の RPTECs を 10 μ g の minigene プラスミドもしくは pcDNA3.1 と、Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific) で懸濁した。この懸濁液をキュベットへ移し、Super Electroporator NEPA21 (NEPA GENE, Co., Ltd., Chiba, Japan) を用いてエレクトロポレーションを実施した。Poring pulse は 175 V (pulse length, 5 ms; pulse interval, 50 ms; number of pulses, 2; decay rate, 10%)、transfer pulse は 20 V (pulse length, 50 ms; pulse interval, 50 ms; number of pulses, 5; decay rate, 40%) で実施した。エレクトロポレーションの 24 時間後、細胞を回収して 1 mL の nuclear isolation buffer (1.28 M sucrose, 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 4% Triton X-100) で懸濁した。1 mL の PBS と 3 mL の DEPC 処理水を加えて、2,500 $\times$ g、4°C で 15 分間遠心してペレットを RIP buffer (150 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5% Nonidet P-40, 2 μ g/mL leupeptin,

2 µg/mL aprotinin, 100 U/mL recombinant RNase inhibitor [TOYOBO Co., Ltd.]) で再懸濁した。ポッター型ホモジナイザーでホモジネート後、13,000 rpm で 10 分間遠心して、上清を核画分として回収した。抗 ADAR1 抗体 (sc-73408, Santa Cruz Biotechnology) もしくはマウス IgG 抗体 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.) を 5 µg 加えて、4°C で 2 時間反応させた。その後、protein G beads (Thermo Fisher Scientific) を加えて 4°C で 1 時間反応させた。Beads を RIP buffer で 3 回洗浄して、10%の beads をタンパク抽出に、残りを RNA 抽出に用いた。RNA 抽出は RNAiso Plus (Takara Bio Inc.) を用いて前述のように実施して、定量的 RT-PCR で ADAR1 に結合している minigene 由来の *ABCB1* intron 27 を定量した。 $\%Input = 2^{-\Delta Ct} \times 100$: $\Delta Ct = Ct_{RIP} - (Ct_{input} - \text{Log}_2[\text{input dilution factor}])$ 。

変異体 ADAR1 過剰発現系の構築

Origene Technologies (Rockville, MD) から購入した ADAR1 Human Tagged ORF Clone (RG219761) を鋳型にして、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara Bio Inc.) の推奨のプロトコルに従って各種変異導入を実施した。RNA 編集活性欠損変異体 ADAR1 (E617A mutated ADAR1) の作製では、617 番目の Glu (GAA) を Ala (GCA) に変換することで編集活性を欠損させた [Lai et al., 1995]。2 本鎖 RNA 結合活性欠損変異体 ADAR1 (EAA-mutated ADAR1) の作製では、3 か所の 2 本鎖 RNA 結合ドメイン (dsRBD) に存在する KKxxK モチーフをそれぞれ EAxxA モチーフに変換することで結合活性を欠損させた [Valente and Nishikura, 2007]。本実験で使用したプライマーの配列を **Table 1-4** に示す。

変異体 ADAR1 の RPTECs への導入にはエレクトロポレーション法を用いた。1.0 × 10⁶ 個の RPTECs を 10 µg の各種 ADAR1 発現プラスミド (wild-type, E617A, EAA) もしくは pcDNA3.1 と、Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific) で懸濁した。この懸濁液をキュベットへ移し、Super Electroporator NEPA21 (NEPA GENE, Co., Ltd.) を用いてエレクトロポレーションを実施した。Poring pulse は 175 V (pulse length, 5 ms; pulse

interval, 50 ms; number of pulses, 2; decay rate, 10%)、transfer pulse は 20 V (pulse length, 50 ms; pulse interval, 50 ms; number of pulses, 5; decay rate, 40%) で実施した。エレクトロポレーションの 24 時間後細胞を回収し、各種実験に用いた。

Table 1-4 Primer sets for mutated *ADAR1*-expressing plasmid construction

Gene / primer	sequence
<i>ADAR1</i> E617A-mut	
Forward	5'-CATGCAGCAATAATCTCCCGGAGAG-3'
Reverse	5'-GATTATTGCTGCATGGCAGTCATTGAC-3'
<i>ADAR1</i> EAA-mut #1	
Forward	5'-GAGGCCGTGGCGGCGCAGGATGCAGCTATGA-3'
Reverse	5'-CGCCGCCACGGCCTCGCTTCCAGCTTCAG-3'
<i>ADAR1</i> EAA-mut #2	
Forward	5'-GAGGCAGTGGCAGCGCAGATGGCCGCAGA-3'
Reverse	5'-CGCTGCCACTGCCTCGCTGGGAGCACTCAC-3'
<i>ADAR1</i> EAA-mut #3	
Forward	5'-GAGGCCCAAGGGGCGCAGGAAGCAGCAGATG-3'
Reverse	5'-CGCCCCTTGGGCCTCGCTGTGTGCGCAG-3'

Minigene を用いた選択的スプライシングの評価

RPTECs を 1.5×10^5 cells/well の濃度で 24 ウェルプレートに播種した。Lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen; Life Technologies) を用いて、1 μ g の minigene プラスミドをトランスフェクトした。24 時間後に ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) を用いて推奨のプロトコルに従って RNA を抽出した。ゲノム DNA およびプラスミド DNA を除くため、カラム上で DNase I 処理を行った。500 ng の RNA を ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo Co., Ltd.) を用いて逆転写し、cDNA を合成した。Minigene 由来の cDNA は、minigene 特異的なプライマー (Table 1-3) で GoTaq Green Master Mix (Promega) を用いて増幅した。PCR 産物はエチジウムブロマイドを含む 1%アガロースゲルで電気泳動して分離した。Intron 27 保持型選択的スプライシング産物 (2287 bp) と、intron 27 が正常に取り除かれたスプライシング産物 (827 bp) を、ImageQuant LAS3000 (FUJIFILM) を用いて定量した。その後、PCR 産物をそれぞれアガロースゲルから切り出して精製した後、サンガー法によってシーケンス解析を行い、目的の配列が増幅されていることを確認した。

阻害剤曝露によるナンセンス変異依存 mRNA 分解機構阻害実験

ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD, nonsense-mediated mRNA decay) 阻害には、NMD 特異的な阻害剤である NMDI-14 (Merck Millipore)、もしくは翻訳阻害剤である Cycloheximide (CHX, FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) を、それぞれ終濃度 1 μ M、100 μ g/mL で用いた。Minigene を用いた選択的スプライシングの評価では、minigene トランスフェクト 24 時間後に NMDI-14 もしくは CHX を曝露し、6 時間後に RNA を抽出した。内在性の *ABCB1* mRNA、P-gp 発現に NMD が与える影響の評価では、mock あるいは *ADAR1*-KD RPTECs に NMDI-14 もしくは CHX を曝露し、RNA 抽出は 6 時間後、タンパク抽出は 24 時間後に実施した。

統計解析

統計解析ソフトとして JMP Pro14 (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) を用いた。独立多群間の比較には一元配置分散分析法 (One-way ANOVA)、Tukey-Kramer post hoc test および Dunnett's post hoc test を用いた。また、独立二群間の比較には Student's *t*-test を用いた。有意水準は 0.05 とした。

【結 果】

ADAR1-KD RPTECs の作製

ヒト腎細胞における薬物排泄に関わるトランスポーターの発現への ADAR1 の影響を検討するため、small hairpin RNA (shRNA) を安定発現させることで ADAR1 をノックダウン (KD, knockdown) させたヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs, renal proximal tubular epithelial cells) を作製した (ADAR1-KD RPTECs)。RPTECs において ADAR1-p150 の明瞭なバンドは確認できなかったが、ADAR1-KD RPTECs において ADAR1-p110 の発現量は有意に低下した ($p < 0.01$, **Fig. 1-2A**)。そこで、ADAR1 タンパク質の発現低下に伴って RNA 編集活性が変化するか検討した。細胞全体での RNA 編集活性を測定することは困難であることから、RNA 編集活性の評価は、3'UTR で A-to-I RNA 編集が高頻度で生じることが報告されている *Poliovirus receptor (PVR)* 遺伝子の chr19:45,168,642 のアデノシンの編集レベルを指標にした [Hong et al., 2018]。Mock RPTECs では編集型のグアノシンの割合は約 29%であったのに対して、ADAR1-KD RPTECs では約 13%に低下しており ($p < 0.01$, **Fig. 1-2B**)、ADAR1-KD で RNA 編集活性が低下していることが示唆された。

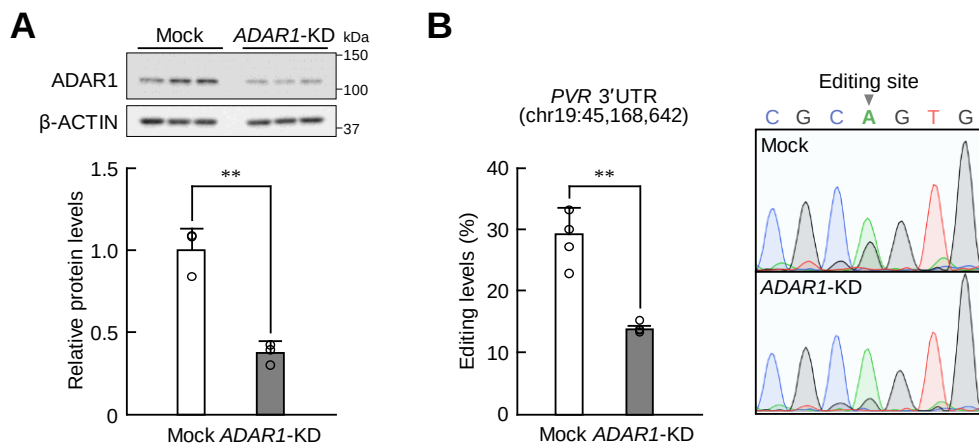


Figure 1-2. Construction of ADAR1-knockdown (ADAR1-KD) RPTECs. (A) Confirmation of downregulation of ADAR1 protein in RPTECs with western blotting. The expression level of ADAR1 protein was normalized to that of β-ACTIN. Values are the mean with S.D. ($n = 3$). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_4 = 6.988$, $p = 0.002$; Student's t -test). **(B)** RNA editing levels in *PVR* 3'UTR (chr19:45,168,642) in mock-transduced and ADAR1-KD RPTECs. In the left panel, values are the mean with S.D. ($n = 4$). Representative electropherogram of direct sequencing was shown in the right panel. **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_6 = 6.466$, $p < 0.001$; Student's t -test).

ヒト腎近位尿細管上皮細胞のトランスポーター発現への ADAR1 発現抑制の影響

作製した ADAR1-KD RPTECs を用いて、**Fig. 1-3A** に示す薬物の腎排泄に関与する代表的なトランスポーターの mRNA 発現量を評価した [Giacomini et al., 2010]。Solute carrier (SLC) トランスポーターファミリーに属する SLC15A1, SLC15A2, SLC22A4, SLC22A5, SLC47A1, SLC47A2 の mRNA 発現量は Mock RPTECs と ADAR1-KD RPTECs で有意な差異は認められなかった (**Fig. 1-3B**)。SLC22A2, SLC22A6, SLC22A8 遺伝子にコードされているトランスポーターも様々な薬物の尿細管分泌に寄与していることが知られているが [Giacomini et al., 2010]、本研究で使用した RPTECs ではこれらの発現は認められなかった。ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターファミリーに属する ABCG2 の mRNA 発現量は Mock RPTECs と ADAR1-KD RPTECs において有意な差異は認められなかったが、ADAR1-KD RPTECs において ABCB1 mRNA の発現量は有意に低下し、ABCC2, ABCC4 mRNA の発現量は有意に増加していた ($p < 0.01$, $p < 0.05$; **Fig. 1-3B**)。さらに、ABCC2 遺伝子にコードされている MRP2 タンパク質の発現量が Mock RPTECs と ADAR1-KD RPTECs において有意な差異が認められなかったのに対して、ABCB1 遺伝子にコードされている P 糖タンパク質 (P-gp, P-glycoprotein) の発現量は ADAR1-KD RPTECs において有意に低下し、ABCC4 遺伝子にコードされている MRP4 タンパク質の発現量は上昇した ($p < 0.05$, $p < 0.01$; **Fig. 1-3C**)。これらの結果より、RPTECs において ADAR1 が P-gp および MRP4 の発現を制御していることが示唆されたことから、これら 2 つの ABC トランスポーターに着目して以降の検討を実施した。

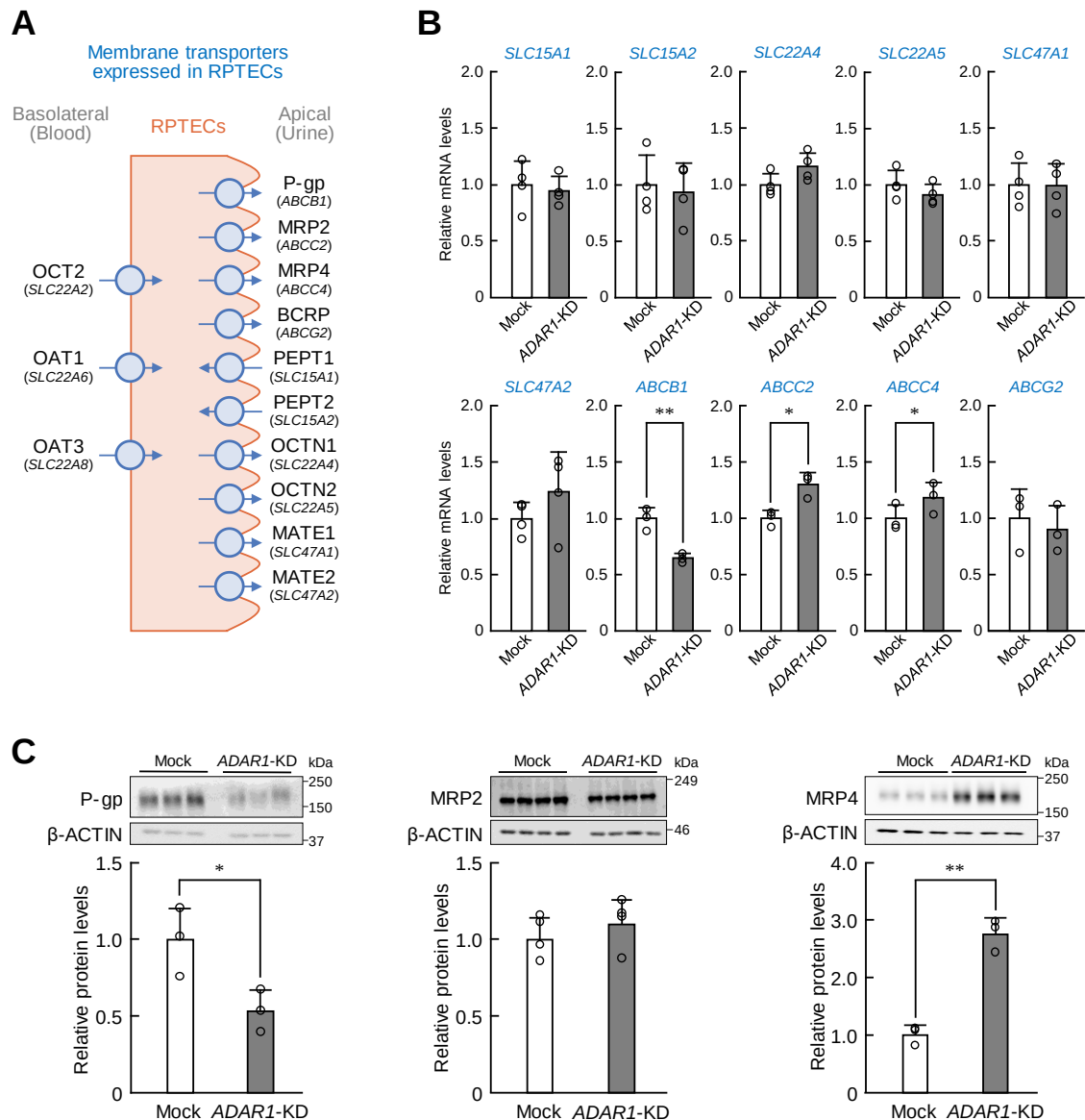


Figure 1-3. Downregulation of ADAR1 affects the expression of xenobiotic transporters in RPTECs. (A) Schematic image of the xenobiotic transporters normally expressed in the human kidneys. (B) The mRNA levels of SLC and ABC transporters in mock-transduced and ADAR1-KD RPTECs. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. (n = 3, 4). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups ($t_4 = 5.656$, $p = 0.005$ for ABCB1; $t_4 = 4.175$, $p = 0.014$ for ABCC2; $t_4 = 4.178$, $p = 0.014$ for ABCC4; Student's t -test). (C) The protein levels of P-gp, MRP2 and MRP4 in mock-transduced and ADAR1-KD RPTECs. The protein levels were normalized to those of β -ACTIN. Values are the mean with S.D. (n = 3, 4). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups ($t_4 = 2.938$, $p = 0.043$ for P-gp; $t_4 = 9.165$, $p < 0.001$ for MRP4; Student's t -test).

カニクイザル腎臓での P-gp 発現の概日リズム

複数の P-gp の基質薬物について、その腎クリアランスは投薬時刻によって変化することが報告されており [Ferrazzini et al., 1991; Choi and Park, 1999]、P-gp の薬物排泄機能が概日リズムを示すことが示唆されている。そこで、ヒトと同じ昼行性の哺乳類であり、主要な時計遺伝子である *PERIOD2* と *BMAL1* の mRNA 発現量に概日変動が認められたカニクイザルの腎臓での P-gp と ADAR1 の発現を調べたところ、これらタンパク質の発現には明瞭な概日リズムが認められた (**Fig. 1-4A, B**)。また、P-gp の発現は ADAR1 の発現が上昇する時間帯においてピークを示していた。この所見および *ADAR1*-KD RPTECs で得られた結果 (**Fig. 1-3C left**) から、ヒト腎臓細胞でも P-gp の発現は概日リズムを示し、その制御に ADAR1 が関与していることが示唆された。一方で、カニクイザルの腎臓では MRP4 タンパク質の発現に明瞭な概日リズムは認められなかった (**Fig. 1-4B**)。これらのことから、P-gp 発現の概日リズム制御での ADAR1 の役割については第 1 章で検討し、MRP4 発現制御での ADAR1 の役割については第 2 章で検討することにした。

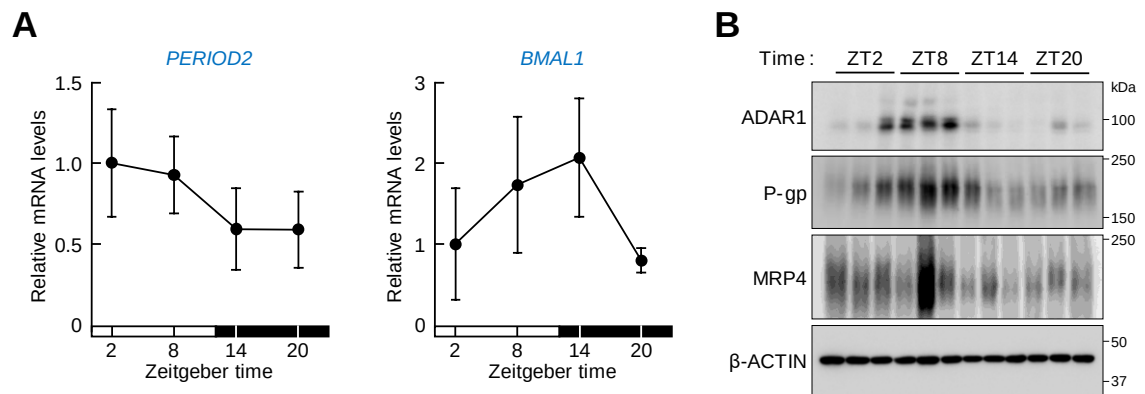


Figure 1-4. Circadian oscillation of clock genes, ADAR1 and xenobiotic transporters in the kidney of cynomolgus monkeys. (A) Circadian oscillation of *PERIOD2* and *BMAL1* mRNA in the kidney of cynomolgus monkeys. The mRNA levels were normalized to those of β -ACTIN. Values are the mean with S.D. (n = 3). **(B)** Circadian oscillation of ADAR1, P-gp and MRP4 protein in the kidney of cynomolgus monkeys. The protein levels of β -ACTIN are shown as loading controls.

RPTECs での ADAR1 発現と RNA 編集の概日リズム

カニクイザルの腎臓において ADAR1 タンパク質および P-gp の発現に概日リズムが認められたことから (**Fig. 1-4B**)、培養細胞である RPTECs の時計遺伝子の発現リズムを同調させることによってヒト ADAR1 および P-gp の発現も概日リズムを示す可能性が考えられた。そこで、Dexamethasone (DEX) を用いて RPTECs の時計遺伝子の発現リズムを同調させ、概日時計機構の再構築系を確立することを試みた。DEX は合成グルココルチコイドの一種であり、培養細胞に曝露することで、細胞ごとに別々のリズムを刻んでいる時計遺伝子の発現リズムを同調させることが知られている [Balsalobre et al., 2000a]。RPTECs に 100 nM DEX を 2 時間曝露すると (**Fig. 1-5A**)、主要な時計遺伝子である *PERIOD2* および *BMAL1* mRNA の発現に約 24 時間周期の有意な変動が認められ ($p < 0.01$, **Fig. 1-5B**)、培養 RPTECs においても概日時計機構が再構築できることが明らかになった。この概日時計機構を再構築した *in vitro* 実験系では、DEX 曝露直後は DEX に対する一過性の応答反応の影響が生じる。そのため、時計遺伝子の発現リズムを同調して 2 周期目のリズムが発生する DEX 曝露後 24 時間以降が、細胞内在性の概日時計機構によって引き起こされる遺伝子の発現リズムと認識されている [Balsalobre et al., 1998, 2000a]。そこで、DEX 曝露後 28 時間から 48 時間目の細胞を回収し、ADAR1 タンパク質の発現量を測定した結果、有意な発現変動が認められた ($p < 0.01$, **Fig. 1-5C**)。さらに、ADAR1 タンパク質発現量が低値および高値を示した DEX 曝露 32 時間後、44 時間後に RNA 編集活性の指標として *PVR* 3'UTR の RNA 編集を測定したところ、ADAR1 発現の高い DEX 曝露 44 時間後に編集レベルが有意に高値を示した ($p < 0.01$, **Fig. 1-5D**)。これらの結果から、DEX の短時間曝露で概日時計機構を再構築した RPTECs において、ADAR1 の発現と RNA 編集活性は概日リズムを示すことが明らかになった。

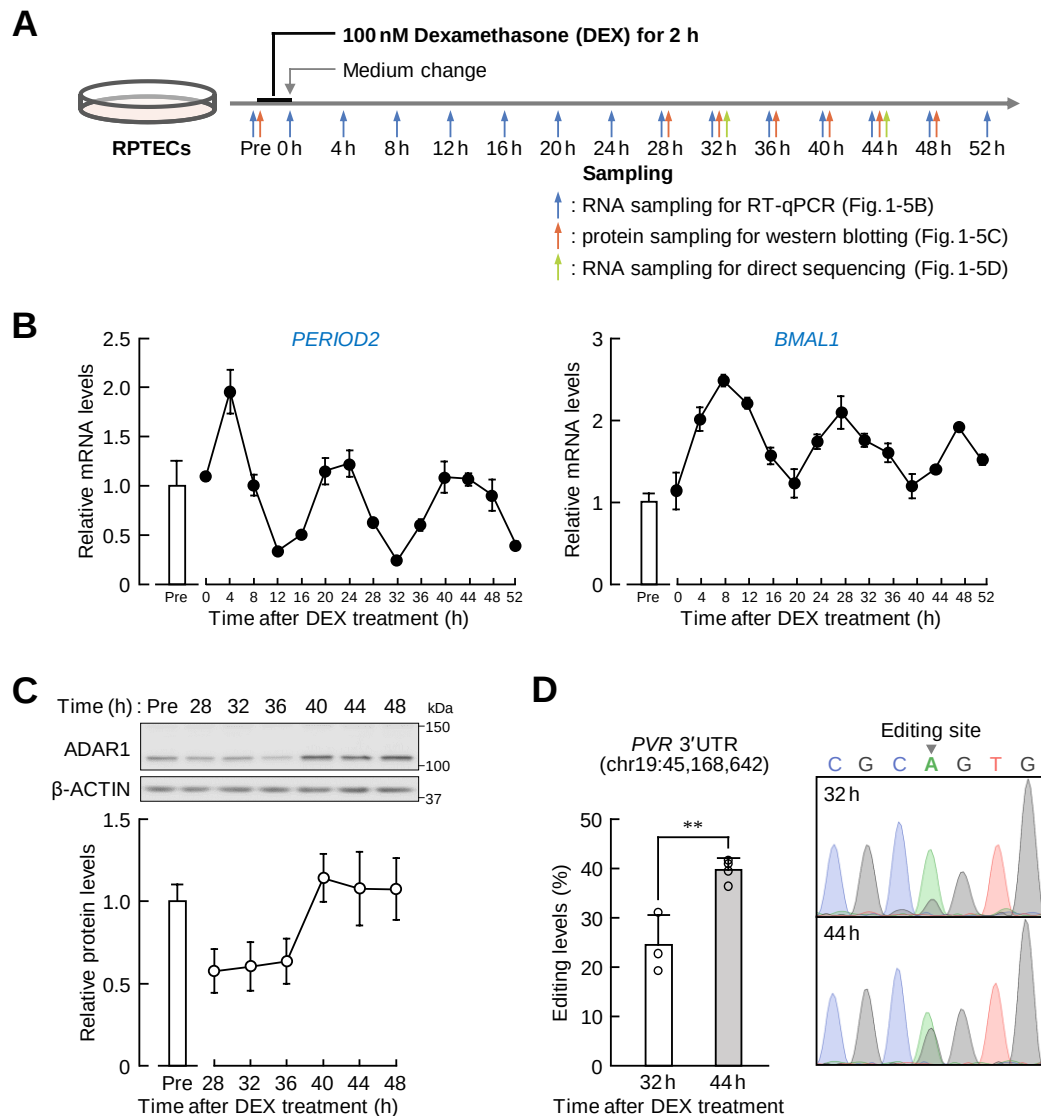


Figure 1-5. ADAR1 expression shows the circadian oscillation in circadian clock-synchronized RPTECs. (A) Schematic diagram indicating how to synchronize the circadian clock machinery of cultured RPTECs with dexamethasone (DEX). RPTECs were treated with 100 nM DEX for 2 h and replaced with new medium without DEX. After the medium change, RPTECs were incubated at 37°C and harvested at the indicated time points. **(B)** Temporal expression profiles of *PERIOD2* and *BMAL1* mRNA in RPTECs after treatment with 100 nM DEX for 2 h. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. ($n = 3$). There were significant time-dependent variations in *PERIOD2* and *BMAL1* mRNA expression ($F_{14,30} = 39.291$, $p < 0.001$ for *PERIOD2*; $F_{14,30} = 36.744$, $p < 0.001$ for *BMAL1*; ANOVA). **(C)** Temporal protein expression profiles of ADAR1 in RPTECs after treatment with 100 nM DEX. The protein levels were normalized to those of β -ACTIN. Values are the mean with S.D. ($n = 3$). There was a significant time-dependent variation ($F_{6,14} = 8.218$, $p < 0.001$; ANOVA). **(D)** RNA editing levels in *PVR* 3'UTR (chr19:45,168,642) in RPTECs 32 and 44 h after DEX treatment. In the left panel, values are the mean with S.D. ($n = 3, 4$). Representative electropherogram of direct sequencing was shown in the right panel. **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_5 = 4.677$, $p = 0.005$; Student's t -test).

RPTECs での P-gp 発現の概日リズム制御における ADAR1 の関与

ADAR1 による発現制御が P-gp の発現リズムに及ぼす影響を評価するために、Mock および *ADAR1*-KD RPTECs においても DEX 短時間曝露による概日時計機構の再構築を試みた。Mock RPTECs でも Naive RPTECs と同様に、DEX の短時間曝露で概日時計機構の再構築が認められた ($p < 0.01$, **Fig. 1-6A**)。 *ADAR1*-KD RPTECs では Mock RPTECs と比較して *BMAL1* mRNA の発現上昇が認められたが、DEX 曝露後の *PERIOD2* および *BMAL1* mRNA の発現変動が認められ、概日時計機構が再構築されていると判断された ($p < 0.01$, **Fig. 1-6A**)。同条件の Mock RPTECs では ADAR1 タンパク質発現に有意な発現変動が認められ、 *ADAR1*-KD RPTECs においてはその発現が低下していた ($p < 0.01$, **Fig. 1-6B**)。さらに、Mock RPTECs における P-gp の発現も有意な発現変動を示し ($p < 0.05$, **Fig. 1-6C**)、P-gp の代表的な基質であるジゴキシンの細胞内存在量にも有意な時刻差が認められた ($p < 0.05$, **Fig. 1-6D**)。ジゴキシンの細胞内存在量は P-gp の発現が高い時刻において低下しており、ADAR1 発現量の増加により P-gp の発現と薬物排泄活性が上昇することが示唆された。一方で、 *ADAR1*-KD RPTECs における P-gp の発現量は測定した全ての時間において低下しており、その概日変動は減弱した (**Fig. 1-6C**)。また、 *ADAR1*-KD RPTECs でのジゴキシンの存在量は両時刻で上昇し、有意な時刻差は認められなかった (**Fig. 1-6D**)。これらの結果から、RPTECs において ADAR1 が P-gp 発現の概日リズム制御に関与していることが示唆された。

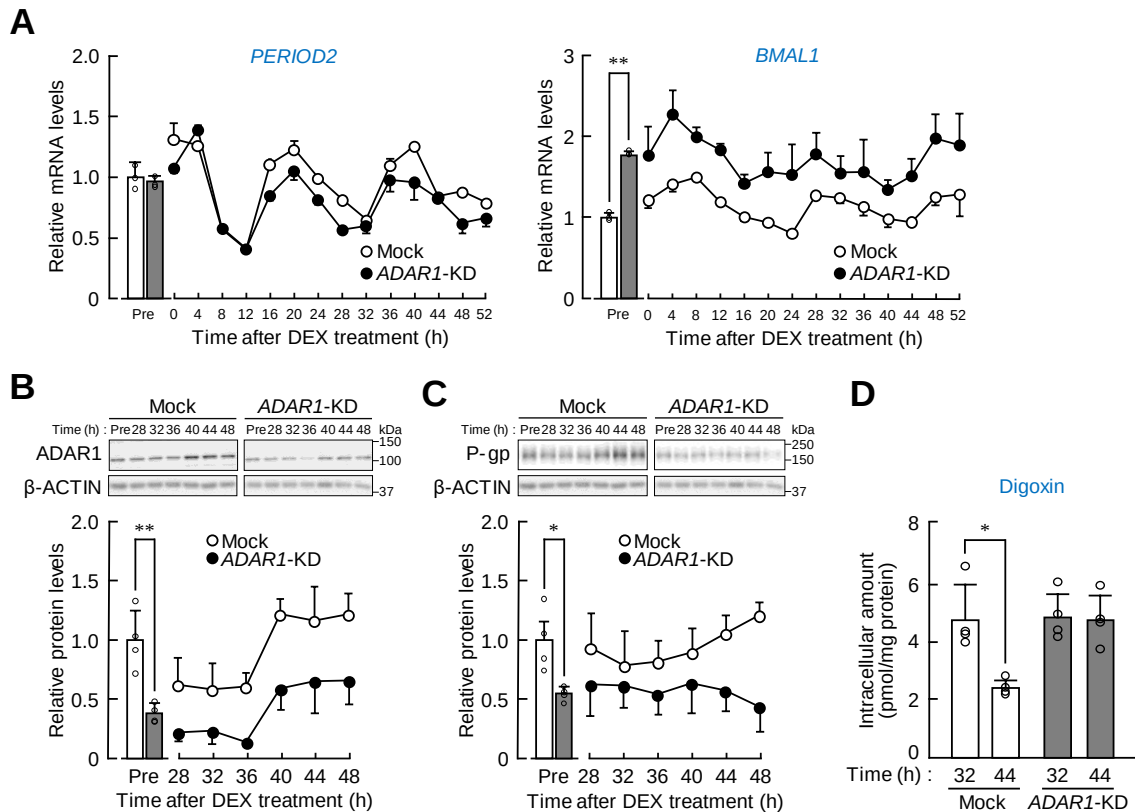


Figure 1-6. ADAR1 is involved in circadian regulation of P-gp expression in human RPTECs. (A) Temporal expression profiles of *PERIOD2* and *BMAL1* mRNA in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs after treatment with 100 nM DEX for 2 h. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. (n = 3). There were significant time-dependent variations in *PERIOD2* and *BMAL1* mRNA expression ($F_{13,28} = 56.917$, $p < 0.001$ and $F_{13,28} = 46.243$, $p < 0.001$ for *PERIOD2* in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs, respectively; $F_{13,28} = 14.565$, $p < 0.001$ and $F_{13,28} = 5.157$, $p < 0.001$ for *BMAL1* in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs, respectively; ANOVA). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_4 = 38.454$, $p < 0.001$; Student's *t*-test). (B and C) Temporal protein expression profiles of ADAR1 (B) and P-gp (C) in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs after treatment with 100 nM DEX. The protein levels were normalized to those of β-ACTIN. Values are the mean with S.D. (n = 4). There were significant time-dependent variations ($F_{5,18} = 10.414$, $p < 0.001$ and $F_{5,18} = 8.214$, $p < 0.001$ for ADAR1 in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs, respectively; $F_{5,18} = 2.899$, $p = 0.043$ for P-gp in mock-transduced RPTECs; ANOVA). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups ($t_6 = 4.641$, $p = 0.004$ for ADAR1; $t_6 = 2.617$, $p = 0.040$ for P-gp; Student's *t*-test). (D) Intracellular accumulation of digoxin in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs 32 and 44 h after DEX treatment. Concentrations of digoxin were measured by LC-MS/MS analysis 1 h after incubation with the drug. Values are the mean with S.D. (n = 4). *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups ($F_{3,12} = 7.487$, $p = 0.004$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test).

ABCB1 mRNA の安定性の時刻変動

ADAR1-KD RPTECsにおいてP-gp発現の概日リズムが変容した機序を解明するために、概日時計機構を再構築したRPTECsでのABCB1 mRNA発現量の経時的变化を測定したところ、Mock RPTECsにおいてABCB1 mRNA発現の有意な概日変動が認められた ($p < 0.01$, **Fig. 1-7A**)。また、ADAR1-KD RPTECsにおいてはABCB1 mRNA発現量が低下しているものの、Mock RPTECsと同様に有意な発現変動が認められた ($p < 0.01$, **Fig. 1-7A**)。この結果から、ADAR1-KDによるP-gp発現の概日リズムの変容は、ABCB1 mRNAの発現リズムの変化のみで生じているのではないことが示唆された。

次に、転写活性に着目してABCB1 mRNA発現の概日リズム制御機構の解析を行った。ABCB1遺伝子の転写開始点上流 2091 nt から下流 701 nt の領域を挿入したルシフェラーゼレポーターベクター (ABCB1 upstream::Luc) を作製し、RPTECs にトランスフェクト後、DEXの曝露により概日時計機構を再構築した。DEX曝露後、ABCB1 mRNAの発現が低値を示した32時間後と、高値を示した44時間後にルシフェラーゼ活性を評価した。その結果、上記2時点におけるルシフェラーゼ活性に有意な差は認められず (**Fig. 1-7B**)、ABCB1 mRNA発現の概日リズムは転写過程によるものではないことが示唆された。

遺伝子発現の概日リズムは転写過程によって生じるだけでなく、転写後制御によっても引き起こされることが指摘されている [Fustin et al., 2013; Terajima et al., 2017]。そこで、ABCB1 mRNAの安定性の時刻差を解析した。上記と同様の方法でDEXを用いてRPTECsの概日時計機構を再構築させ、32時間後と44時間後に転写阻害剤であるActinomycin D (ACT-D) を終濃度 5 μ M で細胞に曝露し、6時間後までのABCB1 mRNA発現量を経時的に測定した (**Fig. 1-7C**)。その結果、DEX曝露32時間後でのABCB1 mRNAの安定性は、44時間後と比較して有意に減少することが認められた ($p < 0.05$, **Fig. 1-7D**)。これらの結果から、DEX曝露後のRPTECsにおけるABCB1 mRNAの発現変動は、転写活性の時刻差ではなく、mRNAの安定性によって生じることが示唆された。

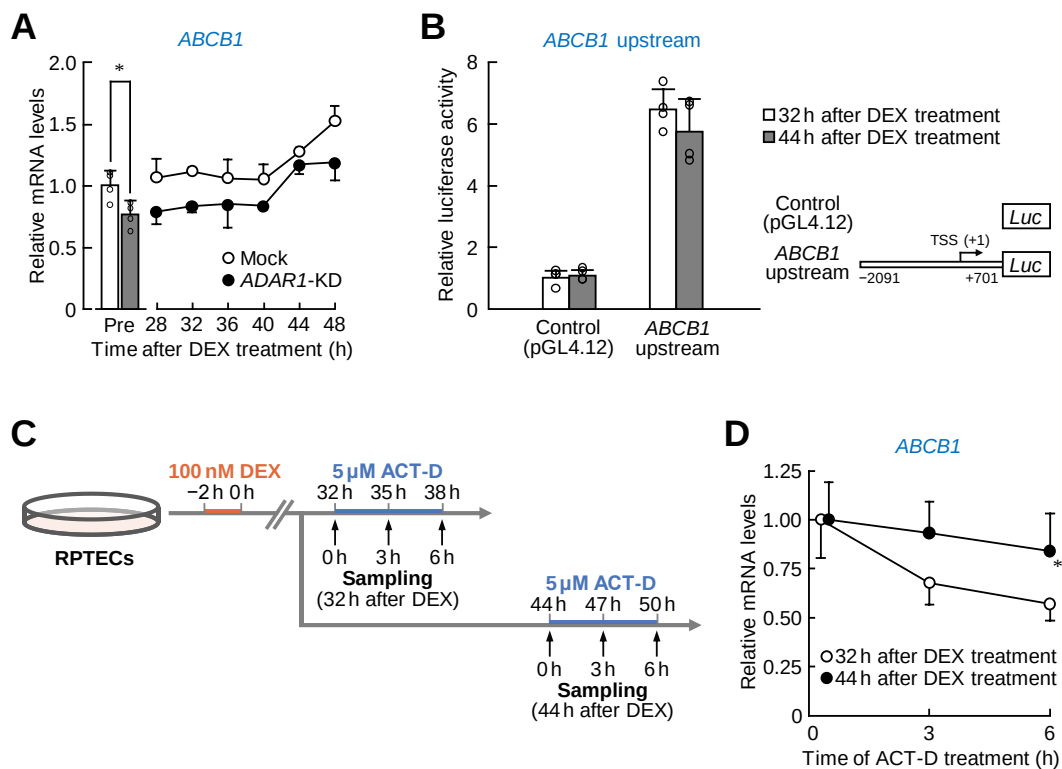


Figure 1-7. The time-dependency of *ABCB1* mRNA expression in human RPTECs. (A) Temporal expression profiles of *ABCB1* mRNA in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs after treatment with 100 nM DEX. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. ($n = 3, 4$). There were significant time-dependent variations in *ABCB1* mRNA levels in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs ($F_{5,12} = 9.426$, $p < 0.001$ for mock-transduced; $F_{5,12} = 5.271$, $p = 0.009$ for *ADAR1*-KD; ANOVA). *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups ($t_6 = 2.994$, $p = 0.024$; Student's t -test). (B) The luciferase activity of *ABCB1* upstream::Luc in RPTECs 32 and 44 h after DEX treatment. The numbers in the right panel indicate the distance in nt from the putative transcription start site (TSS, +1). Values are the mean with S.D. ($n = 4$). (C) Schematic diagram indicating how to treat RPTECs with DEX for synchronization of circadian clock machinery and with actinomycin D (ACT-D) for inhibiting the transcription. RPTECs were treated with 5 μ M ACT-D 32 or 44 h after DEX treatment, and then RNA was extracted at indicated time points after the addition of ACT-D. (D) The stability of *ABCB1* mRNA in RPTECs 32 or 44 h after DEX treatment. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. ($n = 6$). *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups at the corresponding time point ($F_{5,30} = 6.837$, $p < 0.001$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test).

ABCB1 mRNA の安定性における ADAR1 の関与

概日時計機構を再構築した RPTECs において、ADAR1 タンパク質の発現が高い時刻に *ABCB1* mRNA の安定性向上が認められた (**Fig. 1-6B, 7D**)。そこで、ADAR1 が *ABCB1* mRNA の安定性に影響を与えるか検討するために、Mock および *ADAR1*-KD RPTECs に転写阻害剤である ACT-D を曝露して経時的に mRNA 発現量を測定した。その結果、*ADAR1*-KD RPTECs における *ABCB1* mRNA 存在量の減少速度は、Mock RPTECs と比較して有意に速いことが示された ($p < 0.01$, $p < 0.05$; **Fig. 1-8A**)。また、*ABCB1* upstream::Luc のルシフェラーゼ活性は Mock と *ADAR1*-KD RPTECs において有意な差異は認められなかったことから (**Fig. 1-8B**)、ADAR1 は *ABCB1* の転写活性には影響を及ぼさず、その転写産物の安定性を制御していることが示唆された。

一般的に mRNA の安定性は、3'非翻訳領域 (3'UTR, 3' untranslated region) を介した制御を受けることが知られている [Fabian et al., 2010]。そこで、*Luciferase* 遺伝子の下流に *ABCB1* mRNA の 3'UTR を挿入したレポーターベクター (*ABCB1* 3'UTR::Luc) を作製し、Mock および *ADAR1*-KD RPTECs にトランスフェクトして解析を行った。その結果、レポーター由来のルシフェラーゼ活性は *ABCB1* 3'UTR の挿入により減少したが、その減少に Mock RPTECs と *ADAR1*-KD RPTECs で有意な差異は認められなかった (**Fig. 1-8C**)。この結果から、*ADAR1*-KD RPTECs における *ABCB1* mRNA の安定性の低下は、3'UTR を介した制御ではないことが示唆された。

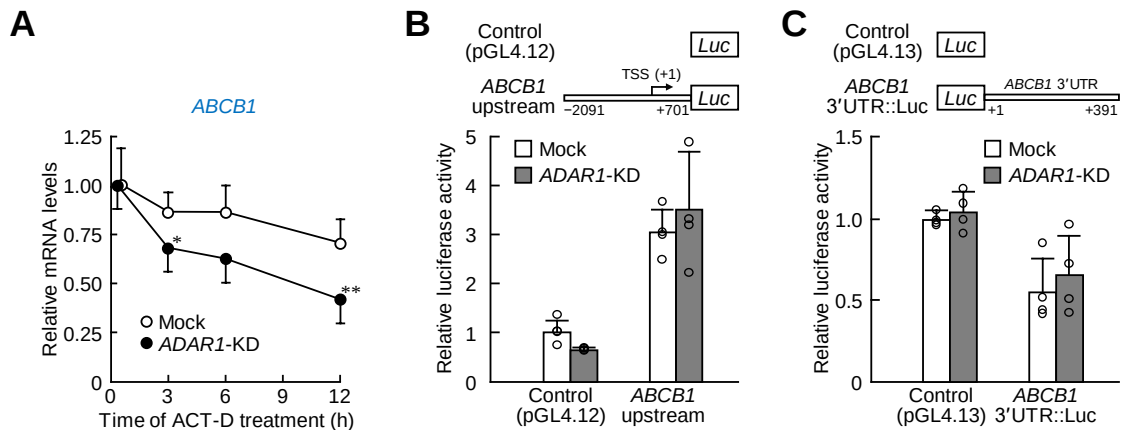


Figure 1-8. ADAR1 regulates the stability of *ABCB1* mRNA. **(A)** The stability of *ABCB1* mRNA in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. Cells were treated with 5 μ M ACT-D and then RNA was extracted at the indicated time points. *ABCB1* mRNA levels were measured by semiquantitative RT-PCR. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. ($n = 5, 6$). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups at the corresponding time point ($F_{7,38} = 15.522$, $p < 0.001$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test). **(B)** The luciferase activity of *ABCB1* upstream::*Luc* in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. Schematic diagrams of luciferase reporter constructs containing the 5'-flanking region of *ABCB1* gene are shown in the upper panel. The numbers in the upper panel indicate the distance in nt from the putative transcription start site (TSS, +1). Values are the mean with S.D. ($n = 4$). **(C)** The luciferase activity of *ABCB1* 3'UTR::*Luc* in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. Schematic diagrams of luciferase reporter constructs containing *ABCB1* 3'UTR are shown in the upper panel. The numbers in the upper panel indicate the distance in nt from the nucleotide immediately after the stop codon (+1). Values are the mean with S.D. ($n = 4$).

RNA 編集部位の探索と *ABCB1* mRNA 前駆体の 2 次構造解析

ADAR1 による *ABCB1* 発現制御機構を明らかにするため、ADAR1 による直接的な RNA 編集が *ABCB1* mRNA 前駆体に認められるか検討した。ADAR1 による RNA 編集の基質特異性は低く、50 bp 以上の 2 本鎖 RNA 構造で高頻度に生じることが知られている [Nishikura et al., 1991; Eggington et al., 2011]。そこで、*ABCB1* 遺伝子の転写産物における RNA 編集部位を、A-to-I RNA 編集のデータベースである REDIPortal を用いて検索した [Picardi et al., 2017]。REDIPortal ではヒト *ABCB1* 遺伝子の転写産物上には合計 47 か所の RNA 編集部位が登録されており、そのうち 33 か所が intron 27 に局在していた (**Fig. 1-9A**)。RNA 編集部位が集中している要因を探るため、RNA の 2 次構造解析を RNAfold というソフトウェアを用いて実施した [Lorenz et al., 2011]。その結果、intron 27 では約 280 bp の長さの強固な 2 本鎖 RNA 構造をとることが示されたが (**Fig. 1-9B**)、RNA 編集部位が点在している intron に関しては安定な 2 本鎖 RNA 構造は認められなかった (**Fig. 1-10**)。この結果から、*ABCB1* mRNA 前駆体のうち、intron 27 が ADAR1 の作用標的になる可能性が高いと考えられた。

ADAR1 が intron 27 に結合しているか検証するため、*ABCB1* 遺伝子の exon 27–intron 27–exon 28 の配列を pcDNA3.1 に挿入した minigene ベクターを作製して解析を行った。この minigene ベクターをトランスフェクトした RPTECs で、抗 ADAR1 抗体を用いた RNA 免疫沈降を実施したところ、ADAR1 と *ABCB1* intron 27 の直接的な結合が認められた ($p < 0.01$, **Fig. 1-9C**)。しかし、ダイレクトシーケンス法での解析では、*ABCB1* intron 27 には RNA 編集と認識できる箇所は確認できなかった (**Fig. 1-11**)。ADAR1 による遺伝子発現の制御は RNA 編集活性だけに依存するのではなく、2 本鎖 RNA への結合自体によっても引き起こされることが知られている [Sakurai et al., 2017]。そこで、ADAR1 が *ABCB1* intron 27 への結合を介して、RNA 編集非依存的に *ABCB1* 遺伝子転写産物の安定性の制御に関与していると考え、以降の検討を実施した。

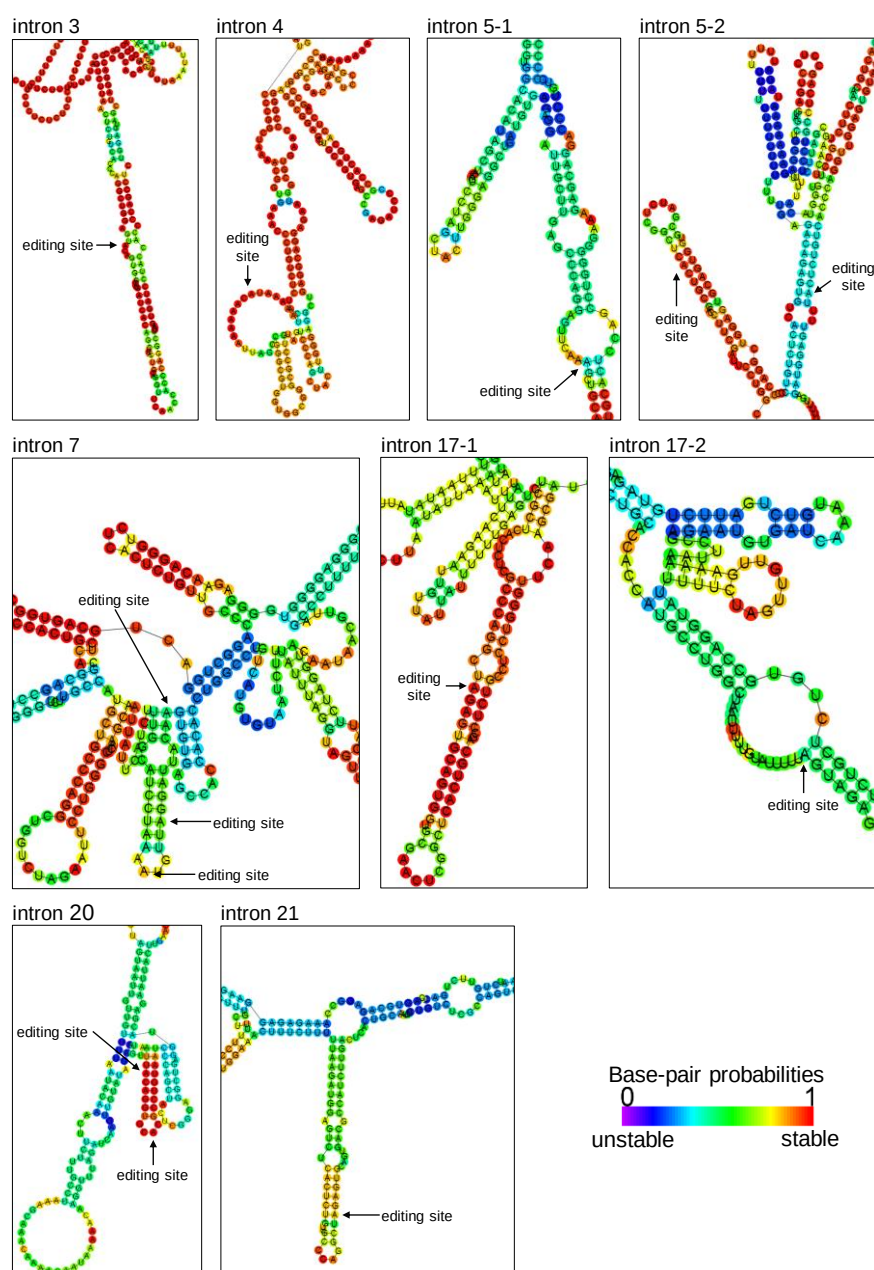


Figure 1-10. *In silico* prediction of RNA secondary structure of introns of the human *ABCB1* gene by RNAfold. The minimum free energy structure with base-pair probabilities was calculated to have the lowest value of free energy. Base-pair probabilities are shown by a color spectrum. The RNA editing sites registered in REDportal are indicated by arrows.

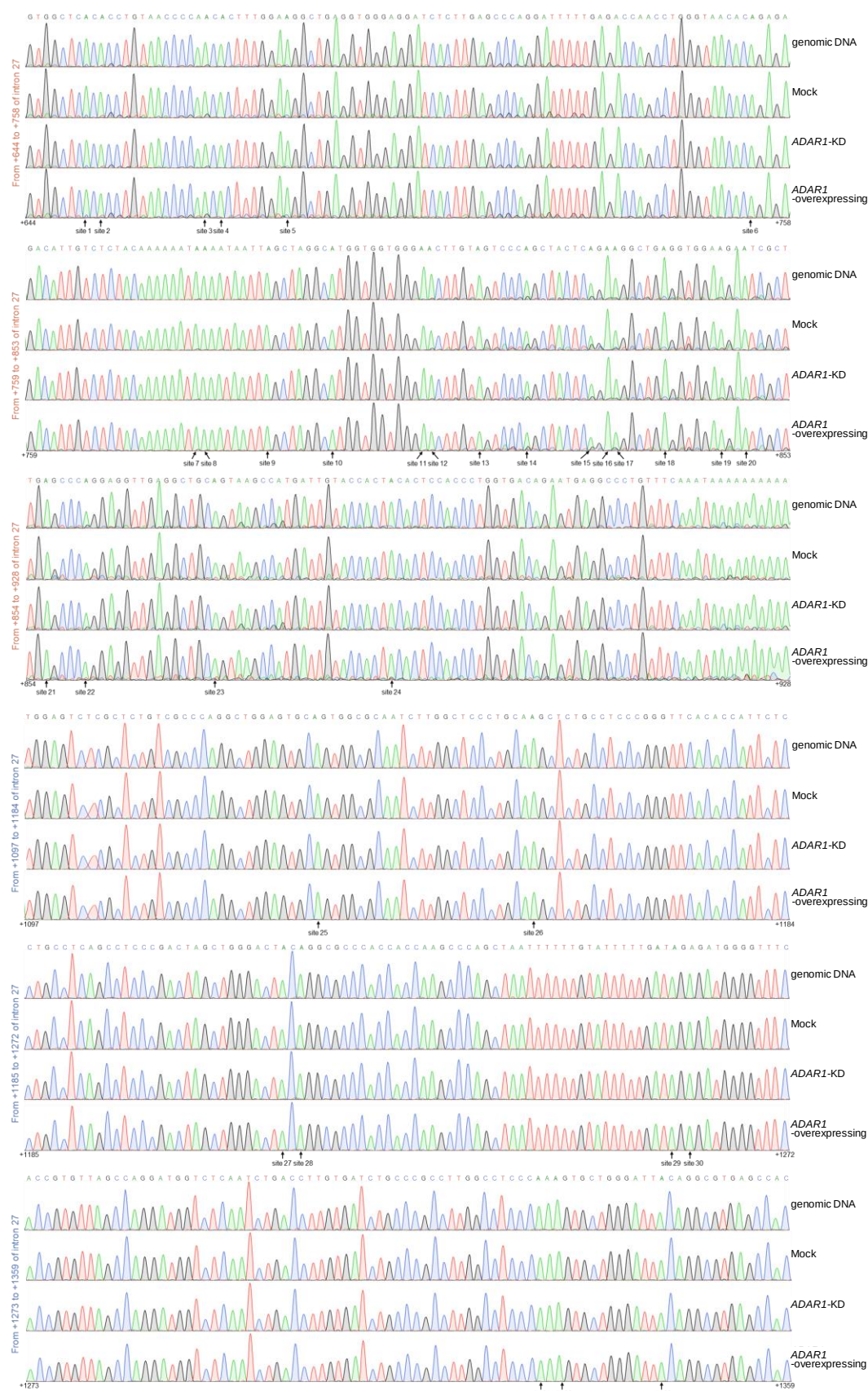


Figure 1-11. Electropherograms from direct sequencing of the PCR-amplified product of intron 27 of the human *ABCB1* pre-mRNA. The sequence data are obtained from pre-mRNA extracted from mock-transduced, *ADAR1*-KD and *ADAR1*-overexpressing RPTECs. The RNA editing sites registered in REDportal are indicated by arrows.

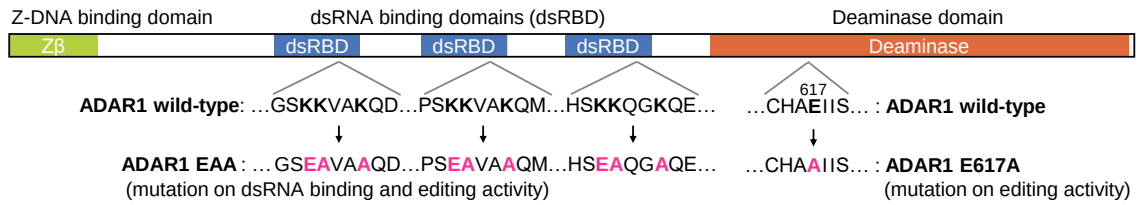
ADAR1 は dsRNA 結合活性を介して P-gp 制御に関与する

ADAR1 は A-to-I RNA 編集活性だけでなく、2 本鎖 RNA (dsRNA, double-stranded RNA) への結合によって RNA 編集非依存的に遺伝子の発現を制御することが知られている [Chen et al., 2015; Sakurai et al., 2017]。そこで、RNA 編集活性あるいは dsRNA 結合活性を欠失させた変異体 ADAR1 発現ベクターを作製した。ADAR1 アミノ酸配列において、活性部位である deaminase ドメインと、3 か所存在する dsRNA 結合ドメイン (dsRBD, dsRNA binding domain) の両方が RNA 編集には必要である (**Fig. 1-12A**)。RNA 編集活性欠損変異体 ADAR1 (E617A-mutated ADAR1) は、617 番目のグルタミン酸をアラニンに変換することで作製した [Lai et al., 1995]。2 本鎖 RNA への結合能が欠損した変異体 ADAR1 (EAA-mutated ADAR1) は、3 か所の dsRBD に存在する KKxxK モチーフをそれぞれ EAxxA モチーフに変換することで作製した [Valente and Nishikura, 2007]。EAA 変異は dsRNA へ結合できないため、編集活性も欠失する。

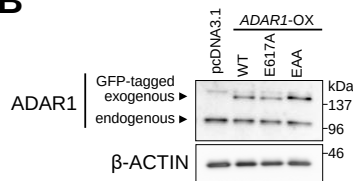
野生型および E617A 変異体 ADAR1 を過剰発現した RPTECs では、P-gp タンパク質の発現が有意に上昇した ($p < 0.01$, **Fig. 1-12B, C**)。一方で、EAA 変異体 ADAR1 を過剰発現した場合は P-gp の発現に有意な差は認められなかった (**Fig. 1-12B, C**)。さらに *ABCB1* mRNA の発現量は、野生型および E617A 変異体 ADAR1 を過剰発現した RPTECs では有意に上昇したのに対して、EAA 変異体 ADAR1 を過剰発現した場合は有意な変動を示さなかった (**Fig. 1-12D**)。これらの結果から、ADAR1 による P-gp 発現制御には、ADAR1 の編集活性ではなく、dsRNA 結合活性が必要であることが示唆された。

A

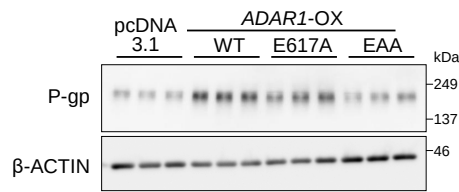
Domain structure of ADAR1 protein



B



C



D

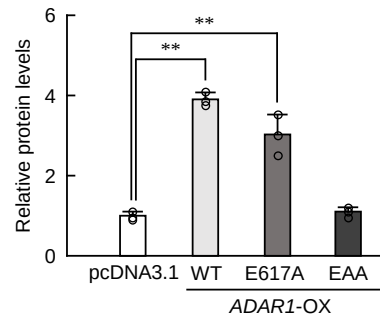
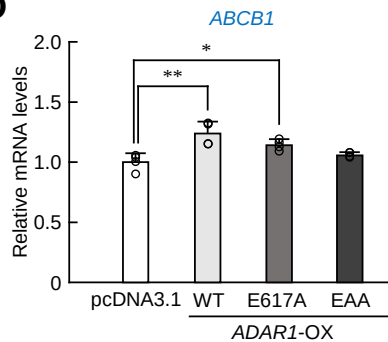


Figure 1-12. ADAR1 regulates the expression of P-gp with its dsRNA binding ability. (A)

Schematic diagram of the domain structure of human ADAR1. ADAR1 has a Z-DNA binding domain, three repeats of double-stranded RNA (dsRNA)-binding domain (dsRBD), and a catalytic deaminase domain. The E617A point mutation abolishes A-to-I RNA editing activity (E617A). Mutation of KKxxK motif in dsRBD to EAxxA abolishes dsRNA binding ability of ADAR1, thus deficient in A-to-I RNA editing activity. **(B)** Construction of ADAR1-overexpression (OX) RPTECs. pcDNA3.1, wild-type (WT), E617A mutant, or EAA mutant GFP-tagged ADAR1-expressing vectors were transfected into RPTECs with electroporation. Bands derived from endogenous ADAR1 and GFP-tagged exogenous ADAR1 (WT, E617A or EAA) were detected in the western blotting image. The protein levels of β-ACTIN are shown as loading control. **(C)** The protein levels of P-gp in pcDNA3.1-transfected and ADAR1 (WT, E617A, EAA)-OX RPTECs. The protein levels were normalized to those of β-ACTIN. Values are the mean with S.D. (n = 3). **, $p < 0.01$; significant difference between the indicated groups ($F_{3,8} = 78.208$, $p < 0.001$; ANOVA with Dunnett's post hoc test). **(D)** The expression levels of ABCB1 mRNA in pcDNA3.1-transfected and ADAR1 (WT, E617A, EAA)-OX RPTECs. The expression levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. (n = 4). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the indicated groups ($F_{3,12} = 10.166$, $p = 0.001$; ANOVA with Dunnett's post hoc test).

ADAR1 による ABCB1 遺伝子転写産物の選択的スプライシング制御

ABCB1 遺伝子に関する情報をデータベース (Ensembl [Yates et al., 2019]) で検索したところ、選択的スプライシングを受けて、intron 27 を保持した形の転写産物 (ID, ENST00000491360.1) が産生されることが判明した。この intron 27 保持型転写産物の配列を解析すると、intron 27 の保持によって未成熟ストップコドンが形成されて、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD, nonsense-mediated mRNA decay) による分解を受けることが示唆された (**Fig. 1-13A**)。この現象が実際に生じているかを検討するため、ABCB1 遺伝子の exon 27–intron 27–exon 28 の配列を pcDNA3.1 に挿入した minigene ベクターを Mock および ADAR1-KD RPTECs にトランスフェクトして、RT-PCR で選択的スプライシング産物の測定を行った。その結果、intron 27 が除かれた正常なスプライシング産物と、intron 27 が保持された選択的スプライシング産物の 2 つが確認され、intron 27 保持型の転写産物の割合は ADAR1-KD RPTECs で有意に高値を示した ($p < 0.01$, **Fig. 1-13B**)。さらに、この minigene ベクターを Mock および ADAR1-KD RPTECs にトランスフェクトした後に、DEX による概日時計機構の再構築を行い、DEX 曝露 32 時間後および 44 時間後に minigene 由来の転写産物を測定した。その結果、Mock RPTECs での intron 27 保持型の転写産物の割合は、DEX 曝露 32 時間後で有意に高値を示した ($p < 0.05$, **Fig. 1-13C**)。一方で ADAR1-KD RPTECs においては、両時刻において intron 27 保持型の転写産物の割合が高くなり、その発現量の割合に有意な時刻差は認められなかった (**Fig. 1-13C**)。これらの結果から、ADAR1-KD が intron 27 保持型の選択的スプライシングを誘導している可能性が考えられた。また、RPTECs に NMD 特異的な阻害剤である NMDI-14 [Martin et al., 2014]、および翻訳阻害を介して NMD を抑制する Cycloheximide (CHX) [Ishigaki et al., 2001] をそれぞれ曝露すると、minigene 由来の intron 27 保持型の割合が有意に上昇したことから ($p < 0.01$, **Fig. 1-13D, E**)、intron 27 保持型の転写産物は NMD による分解を受けることが示唆された。さらに、intron 27 保持型の転写産物の安定性は、正常なスプライシング産物と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$, **Fig. 1-13F**)。

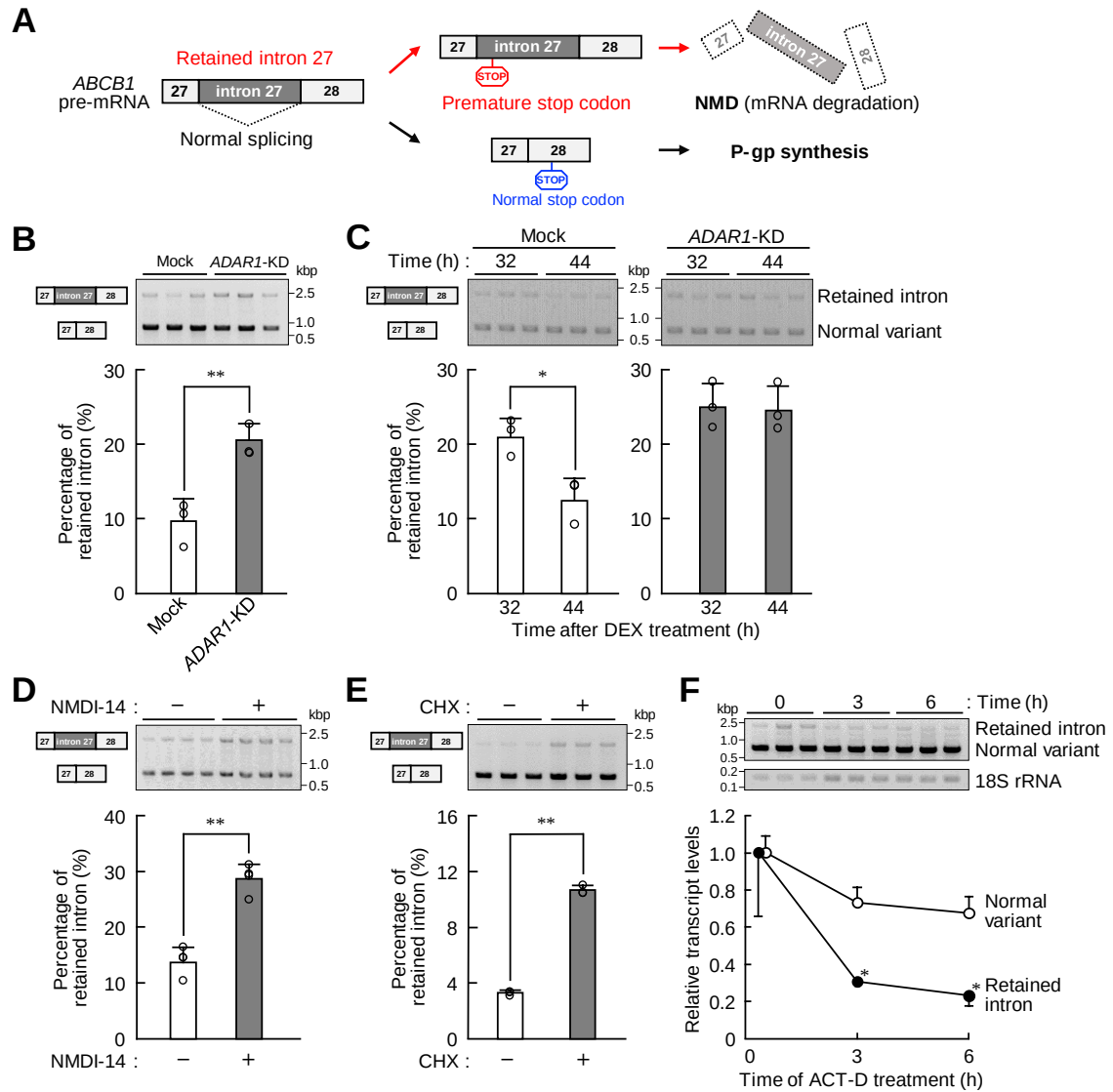


Figure 1-13. ADAR1 regulates the time-dependent differences in the alternative splicing of the human *ABCB1* gene. (A) Schematic diagram of the retention of intron 27 of the *ABCB1* gene. Intron-retaining *ABCB1* mRNA may be degraded through nonsense-mediated mRNA decay (NMD). (B) ADAR1 is involved in the production of retained-intron 27 of *ABCB1* transcripts. Minigene-derived normal splicing transcripts and retained-intron transcripts were assessed by semiquantitative RT-PCR. Values are the mean with S.D. ($n = 3$). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_4 = 5.167$, $p = 0.007$; Student's t -test). (C) ADAR1 is involved in the time-dependent differences in the production of retained-intron 27 of *ABCB1* transcripts. Values are the mean with S.D. ($n = 3$). *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups ($F_{3,8} = 11.373$, $p = 0.003$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test). (D and E) Retained-intron 27 transcripts of the *ABCB1* gene are degraded by NMD. Cells were transfected with the exon 27–exon 28 minigene and treated with 1 μ M NMDI-14 or 100 μ g/mL cycloheximide (CHX) for 6 h, respectively. Values are the mean with S.D. ($n = 3, 4$). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_6 = 8.022$, $p < 0.001$ for NMDI-14; $t_4 = 34.267$, $p < 0.001$ for CHX; Student's t -test). (F) The stability of retained-intron 27 transcript of the *ABCB1* gene. Cells were transfected with the exon27–exon28 minigene. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. ($n = 3$). *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups at the corresponding time point ($F_{5,12} = 13.641$, $p < 0.001$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test).

選択的スプライシング阻害による内在性 *ABCB1* および P-gp の発現変化

外来性の minigene を用いた検討で、*ABCB1* の intron 27 保持型選択的スプライシングが時刻依存的に引き起こされていることが示唆されたことから、内在性の *ABCB1* 発現への NMD の影響を評価した。Mock RPTECs に NMD 阻害剤として NMDI-14 を曝露したところ、内在性の *ABCB1* mRNA 発現量は有意に上昇した ($p < 0.05$, **Fig. 1-14A**)。さらに、*ADAR1*-KD RPTECs における *ABCB1* mRNA 発現量低下は、NMDI-14 および CHX 曝露で mock RPTECs と同レベルにまで上昇した ($p < 0.01$, **Fig. 1-14A, B**)。CHX は翻訳阻害剤であり NMD 阻害条件下でのタンパク質発現量の評価には適さないため、NMDI-14 を用いて NMD 阻害時の P-gp 発現量と薬物輸送活性を評価した。その結果、NMD 阻害により P-gp 発現量は有意に上昇した ($p < 0.01$, **Fig. 1-14C**)。P-gp の発現上昇に伴いジゴキシンの細胞内存在量は低下しており ($p < 0.01$, **Fig. 1-14D**)、P-gp の薬物輸送活性が上昇していることが示唆された。これらの結果から、*ADAR1* は *ABCB1* 遺伝子を intron 保持という異常なスプライシングから保護し、mRNA の安定性を向上させることで、P-gp の発現量を上昇させていることが示唆された。

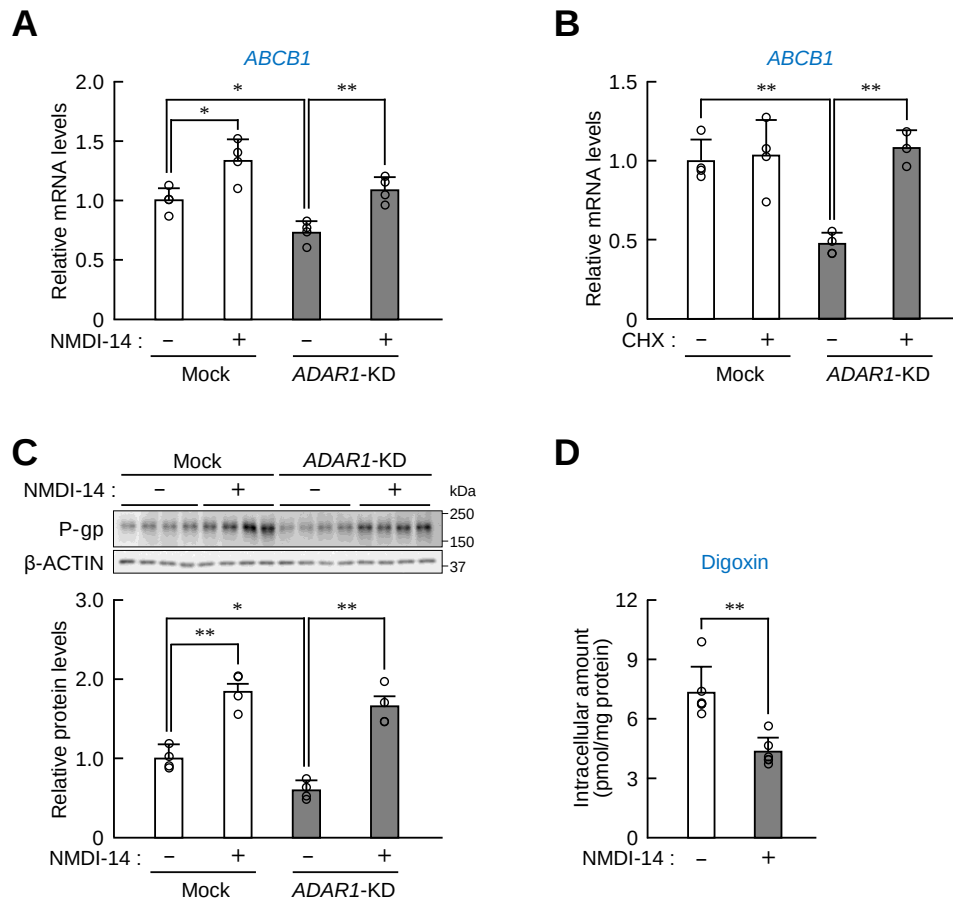


Figure 1-14. Inhibition of NMD restores the expression level and activity of P-gp through upregulating ABCB1 mRNA. (A and B) NMD inhibition restores levels of ABCB1 mRNA in ADAR1-KD RPTECs. Mock-transduced and ADAR1-KD cells were treated with 1 μ M NMDI-14 or 100 μ g/mL cycloheximide (CHX) for 6 h, respectively. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. (n = 4). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the indicated groups ($F_{3,12} = 13.981$, $p < 0.001$ for NMDI-14; $F_{3,12} = 13.155$, $p < 0.001$ for CHX; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test). (C) NMD inhibition restores levels of P-gp in ADAR1-KD RPTECs. Mock-transduced and ADAR1-KD cells were treated with 1 μ M NMDI-14 for 24 h. The levels of P-gp were normalized those of β -ACTIN. Values are the mean with S.D. (n = 4). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the indicated groups ($F_{3,12} = 37.583$, $p < 0.001$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test). (D) Intracellular accumulation of digoxin in NMDI-14-treated ADAR1-KD RPTECs. Concentrations of digoxin were measured by LC-MS/MS analysis 1 h after incubation with the drug. Values are the mean with S.D. (n = 6). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_{10} = 4.868$, Student's t -test).

【考 察】

概日時計機構は転写、翻訳、分解などの様々な過程を介して生体機能に概日リズムを引き起こす。本研究では、概日時計機構を再構築したヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs) において、P 糖タンパク質 (P-gp) の発現が 24 時間周期の概日リズムを刻むことを見出し、そのリズムは、ADAR1 を介した *ABCB1* 遺伝子の選択的スプライシングの制御により、転写後過程で引き起こされていることを明らかにした [Omata et al., 2021]。すなわち、ADAR1 は時刻依存的に *ABCB1* の異常スプライシング産物の生成を抑制して、P-gp の発現リズムを生み出していると考えられた (Fig. 1-15)。

遺伝子発現の概日リズムを解析するためには、組織サンプルを数時間ごとに採取する必要があるため、時間薬理学・時間薬物動態学の研究では主に実験動物を用いた研究が行われてきた。マウスやラットでの薬物代謝酵素や排泄トランスポーターの発現の概日リズムは複数報告されているが [Matsunaga et al., 2008; Hamdan et al., 2012]、ヒトでは頻繁に検体を採取することが困難であることから、薬物動態関連因子の概日リズムの分子機構の解析には限界があった。ヒトを含む哺乳類において、ほとんどの細胞には概日時計機構が備わってお

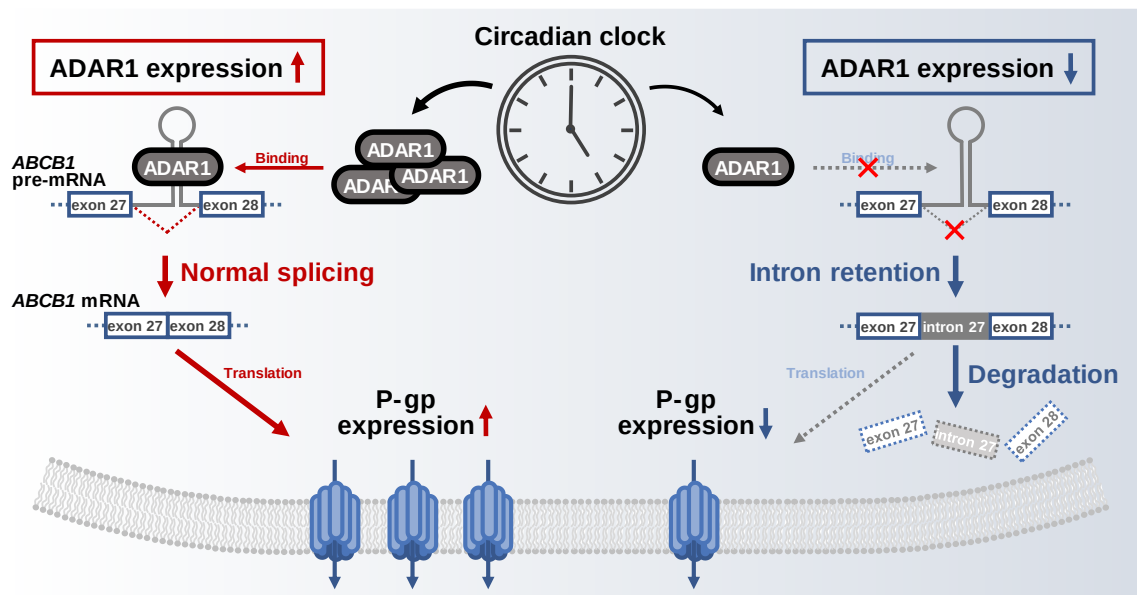


Figure 1-15. Schematic diagram of the ADAR1-mediated regulation of diurnal expression of P-gp in human renal cells. ADAR1 time-dependently prevents the production of intron 27-retaining *ABCB1* transcripts, resulting in the diurnal changes in the maturation and stability of *ABCB1* mRNA. The time-dependent differences in the *ABCB1* mRNA levels lead to the diurnal expression of P-gp in human renal cells.

り、視交叉上角 (SCN) を中枢時計とする階層的なリズム制御機構を形成している [Hastings et al., 2003]。時計遺伝子や時計制御遺伝子の発現は SCN だけでなく、末梢臓器でも概日リズムが認められる [Akhtar et al., 2002]。培養細胞においても、高濃度の血清、Forskolin、Phorbol-12-myristate-13-acetate、Calcimycin、Dexamethasone (DEX)などを短時間曝露することで、概日時計機構を再構築させて遺伝子発現の概日リズムを解析できることから [Balsalobre et al., 1998, 2000a, 2000b]、本研究では RPTECs に 100 nM DEX を 2 時間曝露することによって概日時計機構の再構築を行い、P-gp と ADAR1 の発現が概日リズムを示すことを見出した。さらに、ヒトと同様に昼行性動物であるカンクイザルの腎臓においても P-gp と ADAR1 の発現に概日リズムが認められたことから、ヒトの腎臓組織においてもこれらのタンパク質の発現は概日リズムを示すと考えられた。

ADAR1 の機能は哺乳類では高度に保存されており、A-to-I RNA 編集は最も高頻度に認められる RNA 修飾で、多くの遺伝子の発現を調節する普遍的な機構であることが明らかになっている [Nishikura, 2010]。概日時計機構を再構築した RPTECs およびサル腎臓での P-gp 発現リズムは、ADAR1 タンパク質の発現リズムとほぼ同位相であったことから、ADAR1 発現の上昇が *ABCB1* 遺伝子の異常スプライシング産物を抑制して、その mRNA を安定化させ、タンパク質への成熟を促進していることが示唆された。また、このような ADAR1 を介した *ABCB1* mRNA 成熟の時刻依存的な変化が、P-gp 発現の概日リズムを引き起こしていると考えられた (Fig. 1-15)。RNA 編集とスプライシングは、真核生物の転写産物を多様化させる 2 つの主要なプロセスであり、これらは互いに影響し合うことが知られている。ADAR1 による RNA 編集はスプライシングに先立ち、新生 RNA 上で転写とほぼ同時に行われると考えられている [Hsiao et al., 2018]。近年、ADAR1 が *CCDC15* (coiled-coil domain containing 15) の選択的スプライシングを RNA 編集依存的および非依存的の両面から制御していることが報告された [Tang et al., 2020]。さらに、活性部位変異型 ADAR2 は、編集活性を持たないにも関わらず *ADAR2* mRNA 前駆体の異常なスプライシングを引き起こすことも知られている

[Agranat et al., 2010]。これらのことから、ADAR は RNA の 2 本鎖領域に結合することで、編集活性非依存的にスプライシングを制御できると考えられている。本研究での解析において、*ABCB1* mRNA 前駆体の intron 27 領域は 2 本鎖構造を形成しているが、この領域には有意な A-to-I RNA 編集部位は検出されなかった。ADAR1 は約 50 bp 以上の長さの 2 本鎖 RNA に高頻度で結合することから [Nishikura et al., 1991; Eggington et al., 2011]、*ABCB1* intron 27 が形成する 2 本鎖構造の長さは ADAR1 の結合には十分な長さであると考えられた。これらのことから、ADAR1 は *ABCB1* mRNA 前駆体の intron 27 のスプライシングを RNA 編集非依存的に制御していることが示唆された。

スプライシングは、mRNA 前駆体から intron を除去し exon 領域を接合して成熟型 mRNA を形成するプロセスである。Exon と intron を定義するために、5' splice site (5'ss)、3'ss、ブランチ部位、ポリピリミジン配列などの部位が保存されている [Will and Luhrmann, 2011]。スプライシングは、核内リボヌクレオタンパク質 (snRNP) と補助タンパク質の集合体を含む RNA-タンパク質複合体であるスプライソソームによって触媒される。U1 と U2 の snRNP は、それぞれ 5'ss とブランチ部位を認識し、intron-exon 構造を特定する。Intron 保持とは、未成熟型 mRNA (mRNA 前駆体) から成熟型 mRNA が形成される際に、特定の intron が除去されない現象であり、選択的スプライシングの 1 つである [Wong et al., 2016]。Intron 保持が生じやすいスプライス部位はスプライソソームによる識別を受けにくいことが多い [Sakabe and de Souza, 2007]。さらに、intron 保持領域においては、スプライシングに必要なポリピリミジン配列の保存性も低い傾向がある。Intron が保持された mRNA の領域では、未成熟ストップコドンが形成されやすいことから、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) の標的となり、intron 保持型の mRNA の安定性は低下し、コードされるタンパク質の発現量も低下すると考えられている [Wong et al., 2016]。本研究では、ADAR1 のノックダウンにより *ABCB1* の intron 27 保持型 mRNA の発現割合が増加することを示し、ADAR1 が *ABCB1* 転写産物の intron 保持を妨げていることが示唆された。実際に、*ABCB1* 遺伝子の intron 27 領

域ではポリピリミジン配列の保存性が低いことが認められた。また、ADAR1 は RNA 結合タンパク質であり、スプライシング制御因子としても機能することを考慮すると、ADAR1 をノックダウンすることでスプライソソームの *ABCB1* intron 27 領域への作用に影響を与え、intron 27 の保持を引き起こすことが考えられた。

概日時計機構を再構築した *ADAR1*-KD RPTECs において P-gp 発現の概日リズムは変容したが、*ABCB1* mRNA 発現の概日リズムには時刻依存的な変動が認められた。この結果は ADAR1 が P-gp の翻訳過程に関与し、概日リズムの形成に寄与していることを示唆している。microRNA(miRNA) の発現やその配列は ADAR1 の RNA 編集によって影響を受けることが知られている [Kawahara et al., 2007a, 2007b]。P-gp の発現を制御する miRNA は複数報告されており [Feng et al., 2011; Shang et al., 2014; Omata et al., 2024]、ADAR1 を介した miRNA の制御が、概日時計機構を再構築した *ADAR1*-KD 細胞における P-gp 発現の概日リズムの変容に関与していることも考えられる。これらの点を考慮すると、*ABCB1* mRNA から P-gp への翻訳過程における ADAR1 の関与については更なる検討が必要だと思われる。

以前に当研究室ではマウスやカニクイザルの小腸で P-gp の発現と活性が概日リズムを示すことを明らかにしている [Murakami et al., 2008; Iwasaki et al., 2015]。この概日リズムは転写レベルによって制御されており、Hepatic leukemia factor (HLF) と E4 promoter-binding protein-4 は、同じ PAR bZip 応答エレメント (PARRE) を介して *Abcb1* 遺伝子の転写の促進と抑制を 24 時間周期で交互に繰り返し、転写レベルで P-gp の発現に概日リズムを引き起こす。本研究で用いた *ABCB1* upstream::Luc は PARRE を含むが、そのルシフェラーゼ活性は概日時計機構を再構築した RPTECs において時間依存性な変動を示さなかった。サル的小腸と腎臓では *HLF* mRNA の振幅が異なり、ピーク時の小腸の *HLF* mRNA 発現量はトラフ時の約 3.5 倍であったのに対し、腎臓ではピーク時の *HLF* mRNA 発現量はトラフ時の約 1.5 倍であった [Iwasaki et al., 2015]。これらの所見から、P-gp 発現の概日リズム制御に関わる分子の寄与度は臓器や組織によって異なっているのではないかと考えられた。

本研究では、DEX 処理によって概日時計機構を再構築した培養ヒト RPTECs およびサル
の腎臓において、ADAR1 タンパク質の発現が概日リズムを示すことを明らかにしたが、その
制御機構は未解明である。ヒトおよびサルの *ADAR1* 遺伝子の転写開始部位付近には、cAMP-
response element (CRE) と相同性のあるヌクレオチド配列が存在している。Activating
transcription factor 4 (ATF4) は、CRE を介した転写により概日時計機構の出力分子として機
能することが示されている [Hamdan et al., 2012; Ushijima et al., 2012]。当研究室では、マウ
スの腎臓や胚性線維芽細胞において ATF4 の発現が概日リズムを示すことを明らかにしてお
り [Koyanagi et al., 2011]、CRE を介した ATF4 による転写制御は RPTECs およびサル腎臓
における ADAR1 発現の概日リズムを引き起こしている可能性が考えられた。

P-gp のいくつかの基質薬物の腎クリアランスには投薬時刻による差異が認められており、
P-gp の薬物排泄活性の時刻差が示唆されている。本研究で明らかにしたヒト腎細胞での P-gp
発現の概日リズム制御機構は、それらの時刻差を説明するだけでなく、P-gp の基質となる多
くの薬物の腎排泄に、投薬時刻による違いが存在することを示唆している。一方で、薬物の
腎排泄に時刻差を生じさせる要因として、腎血流量、糸球体濾過量、尿 pH、遠位尿細管での
薬物再吸収なども知られている [Bicker et al., 2020]。将来的にはこれらを統合的に評価する
ことで、薬物腎排泄の時刻差を考慮した投薬時刻の最適化に繋がることが期待される。

従来の薬物療法における個別化は、主に薬物濃度のモニタリングとそれを基にした投与
量調整によって達成されてきた。しかし、多くの薬物の体内動態は、吸収・分布・代謝・排泄
の概日リズムによって時刻依存的に変化する。そのため、より合理的な薬物療法を行うた
めには、薬物動態の個体間変動と個体内変動の両者を考慮する必要がある。本研究で得られた
知見は、薬物排泄の投薬時刻による違いの根底にある新たなメカニズムを示唆するものであ
り、生体の薬物排泄機構と概日時計機構との間の分子的な関連性を示している。今後、ADAR1
の RNA 編集活性を基盤にした解析により、薬物動態関連分子の概日リズム制御機構の全容解
明に繋がることが期待したい。

第 2 章

RNA 編集酵素 ADAR1 による環状 RNA バックスプライシング制御を介した ヒト腎細胞での MRP4 発現制御機構の解析

【概 要】

Multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) は ATP-binding cassette transporter の C サブファミリーに属し、哺乳類では様々な組織で発現が認められるが、特に腎臓で高発現し、多くの薬物の腎排泄に関与している。Adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) は adenosine-to-inosine (A-to-I) RNA 編集を触媒することで遺伝子発現を制御することが報告されているが、本章における検討では、ヒト腎臓細胞において ADAR1 は MRP4 の発現を転写後レベルで制御することを明らかにした。ルシフェラーゼレポーターアッセイとマイクロアレイ解析の結果から、ADAR1 のノックダウンが miR-381-3p の発現レベル低下を介して MRP4 の発現を上昇させることが明らかになった。環状 RNA (circRNA) はループ状の内因性 non-coding RNA の一種であり、miRNA を吸着するスポンジとして機能することで遺伝子発現に影響を与える。ADAR1 は、A-to-I RNA 編集を触媒して circRNA の 1 つである circHIPK3 の前駆体の 2 次構造を変化させることにより、circHIPK3 の生合成を抑制していることが明らかになった。*In silico* 解析の結果、circHIPK3 は miR-381-3p のスポンジとして機能していることが示唆された。実際に、circHIPK3 の過剰発現は miR-381-3p による翻訳抑制機能を阻害することで MRP4 の発現を上昇させることが明らかになった。これらの結果から、RNA 編集酵素 ADAR1 による circRNA の産生制御を介した薬物動態関連トランスポーターの発現コントロールという、従来にない新たなメカニズムの概念が提唱された。

【序 論】

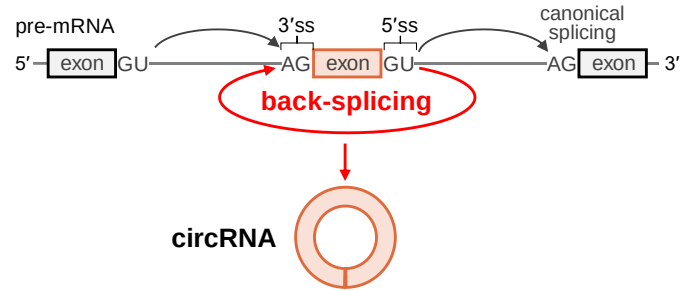
ABCC4 遺伝子にコードされる multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) は ABC トランスポーターの 1 つであり、哺乳類の腎臓、骨髄、脳などに高発現している [Aubel et al., 2002; Nies et al., 2004; Belinsky et al., 2007]。MRP4 は様々な化合物を基質として認識し、細胞内から細胞外液に輸送する [Leggas et al., 2004]。腎近位尿細管上皮細胞において、MRP4 は多くの薬物の尿中排泄に関与し、その腎クリアランスにも影響を及ぼす。MRP4 の発現は組織依存的に制御されていることが指摘されており、ヒト腎細胞における *ABCC4* mRNA の転写には、PPAR α 、NRF2、AHR などの腎臓で高発現している転写因子が関与していると考えられているが [Wen et al., 2015]、転写過程に加え、転写後制御の寄与も大きいことが示唆されている [Borel et al., 2012]。

microRNA(miRNA) は小分子の non-coding RNA で、標的 mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR, 3'untranslated region) に結合し、mRNA の分解や翻訳抑制を誘導する [Fabian et al., 2010]。最近の研究で、ABC トランスポーターファミリーの一部のメンバーが miRNA を介した遺伝子制御を受けていることが示されている [Haenisch et al., 2014]。例えば、ドキソルビシン耐性ヒト乳がん細胞における miR-298 の発現抑制は、P 糖タンパク質の発現を誘導してドキソルビシン耐性を付与することが報告されている [Bao et al., 2012]。また、miR-124a や miR-506 は HEK293T/17 細胞の MRP4 タンパク質レベルを低下させることから [Markova and Kroetz, 2014]、ヒト腎臓における薬物排泄トランスポーターの発現調節に miRNA が関与していることが示唆されている。このように、miRNA による ABC トランスポーターの転写後制御を示す報告は数多くあるが、miRNA 自体の発現や機能の制御については解明されていない点が多く残されている。

一方、環状 RNA(circRNA, circular RNA) は、5'・3'末端や poly(A)構造を持たない、ループ構造の 1 本鎖の non-coding RNA である [Chen and Yang, 2015]。circRNA は様々な miRNA を吸着する「スポンジ」のような働きを持ち、miRNA がタンパク質の翻訳を抑制する機能を

阻害する [Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013; Chen, 2020]。

circRNA の生成は、直鎖状 RNA の通常のスプライシングとは異なり、



下流の 5' splice site (5'ss) が上流の **Figure 2-1. Schematic diagram of the back-splicing.**

3'ss に結合する back-splicing によって形成される (Fig. 2-1) [Zhang et al., 2014]。Back-splicing には、通常の 5'ss・3'ss とスプライシング機構が必要である [Starke et al., 2015; Vo et al., 2019]。一般に、back-splicing の頻度は通常のスプライシングよりもはるかに低い [Zhang et al., 2016]、いくつかの circRNA はその高い安定性により、対応する線形 mRNA よりも高い発現量を示す。環状化される exon に隣接する intron 同士の *Alu* 配列などの逆反復エレメント (IRAlu, inverted repeat *Alu*) での 2 本鎖 RNA の形成が (Fig. 2-2①)、back-splicing 部位を近接させることで back-splicing を促進する (Fig. 2-2②) [Jeck et al., 2013]。これらの *cis*-regulatory element に加え、いくつかの RNA 結合タンパク質は back-splicing の *trans*-acting factor として働く。例えば、数多くの circRNA が上皮間葉転換の際に Quaking (QKI)

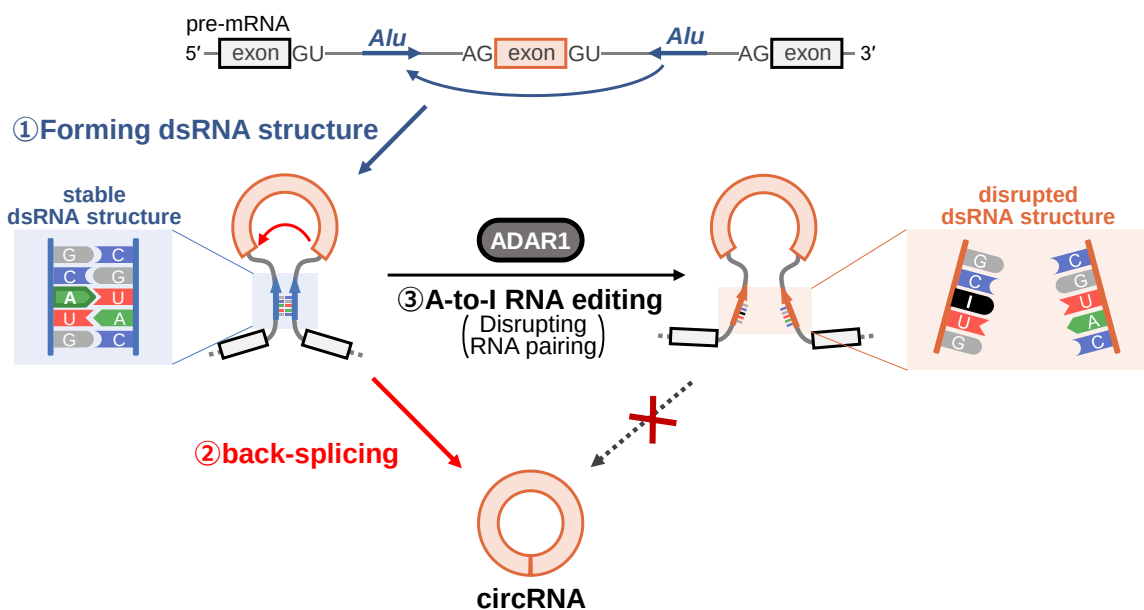


Figure 2-2. Schematic diagram showing the mechanism of back-splicing and the effects of the *cis*-regulatory element (dsRNA structure) and the *trans*-acting factor (RNA editing by ADAR1).

タンパク質の働きで発現上昇する [Conn et al., 2015]。QKI は circRNA を形成する exon の近傍の intron に結合し、二量体を形成することで back-splicing 部位を近づける。また、adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) は circRNA の生合成を抑制する [Ivanov et al., 2015; Rybak-Wolf et al., 2015]。ADAR1 は、哺乳類で最も一般的なヌクレオチド変換である A-to-I RNA 編集を触媒する酵素である [Nishikura, 2010]。イノシンはシチジンと塩基対を形成する、グアノシン類似体である。したがって A-to-I RNA 編集は、コドンの変更、選択的スプライシング、RNA の 2 次構造変化などを引き起こす [Eisenberg and Levanon, 2018]。circRNA 前駆体で形成される 2 本鎖 RNA に対する A-to-I RNA 編集は、相補性を低下させて RNA 塩基対形成を崩壊させるため、circRNA の生成が低下する (**Fig. 2-2③**)。ADAR1 は幅広い基質認識能力を持ち、多くの組織で恒常的に発現しているが [Eggington et al., 2011]、circRNA 生成への関与を報告した研究は極僅かである [Shi et al., 2017; Ma et al., 2020; Shen et al., 2021]。

本学位論文の第 1 章では、ADAR1 がヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs) での P 糖タンパク質の発現を制御していることを明らかにした。また、ADAR1 が腎臓の薬物排泄トランスポーター発現調節に果たす役割を解析する過程で、ADAR1 のノックダウンによって MRP4 タンパク質の発現が増加することを見出し (**Fig. 1-3C right**)、ADAR1 は MRP4 の発現を転写後レベルで制御すると考えられた。そこで本学位論文の第 2 章では、RPTECs における ADAR1 による MRP4 発現制御機構について、circRNA が miRNA を吸着する「スポンジ」として、その機能を抑制する点に着目して検討した。

【方 法】

細胞培養

ヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs: SA7K clone) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より、Lenti-X 293T 細胞は Takara Bio Inc. (Shiga, Japan) より購入した。RPTECs は 5.5% RPTECs Complete Supplement、2.33 mM L-glutamine、28 μ M gentamicin、14 nM amphotericin B を含む MEM α 培地 (すべて Sigma-Aldrich) で、Lenti-X 293 T 細胞は 5% fetal bovine serum (Moregate Biotech, Bulimba, Australia) および 0.5% penicillin-streptomycin (Invitrogen; Life Technologies, Carlsbad, CA) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium 培地 (Sigma-Aldrich) で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養して各実験に用いた。

ADAR1-knockdown (ADAR1-KD) RPTECs の作製

ADAR1 に対する small hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターを 3 種類パッケージしたレンチウイルス粒子 (sc-37657-V; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を RPTECs に感染させた。感染 24 時間目から 5 μ g/mL puromycin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan) でセレクションを行い、shRNA 安定発現株 (ADAR1-KD RPTECs) を作製した。ADAR1 の発現量の低下は western blotting で確認した。

Western blotting

RPTECs の総タンパク質の抽出は、CellLytic MT Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。等量のサンプルバッファー (0.05 M Tris-HCl, 2% SDS, 0.06% 2-mercaptoethanol, 1% glycerol) を加え、95°C で 5 分間加熱することで、変性処理を行った。変性させたタンパク質はポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、polyvinylidene difluoride メンブレンに転写した。その後、メンブレンを 1% スキムミルクに浸して室温で 1 時間ブロッキング処理を行い、抗 ADAR1 抗体 (1:1000, sc-73408; Santa Cruz

Biotechnology)、抗 MRP4 抗体 (1:3000, ab15602; Abcam, Cambridge, UK)、抗 β -ACTIN 抗体 (1:10000, sc-1616; Santa Cruz Biotechnology)、抗 TBP 抗体 (1:1000, ab51841; Abcam) 溶液中に 4°C で一晩インキュベートした。ADAR1 および TBP の 2 次抗体として抗 mouse IgG 抗体 (1:10000, sc-2005; Santa Cruz Biotechnology)、MRP4 の 2 次抗体として抗 rat IgG 抗体 (1:10000, ab97057; Abcam) を用いた。各タンパク質の検出には ImmunoStar LD (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.) を使用し、化学発光は ImageQuant LAS3000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan) で撮影した。

定量的 RT-PCR による mRNA, pri-miRNA の測定

RPTECs の RNA 抽出は、RNAiso Plus (Takara Bio Inc.) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。500 ng の RNA を ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて逆転写して cDNA を合成した。mRNA の定量では、cDNA は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo Co., Ltd.)、LightCycler 96 system (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)、および **Table 2-1** に示す遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR を行い、検量線法によって各遺伝子の発現量を測定した。pri-miRNA の定量では、cDNA は Taqman Fast Advanced Master Mix、7500 Real-time PCR system、および Taqman Pri-miRNA Assays (pri-mir-381, Hs03303552_pri) を用いて PCR を行い、検量線法によって pri-miRNA の発現量を測定した (全て Applied Biosystems, Tokyo, Japan)。本解析における全ての定量において 18S rRNA を内部標準に用いた。

Table 2-1 Primer sets for RT-PCR analysis of gene expression

Gene / primer	sequence
Human <i>ABCC4</i>	
Forward	5'-AGTCAATTCTGAAAGCTCCGGTA-3'
Reverse	5'-CGGCAGCAAATCATCCAAGTG-3'
Human <i>NRF2</i>	
Forward	5'-GAGCAAGTTTGGGAGGAGCTA-3'
Reverse	5'-CAGTTTGGCTTCTGGACTTGG-3'
Human <i>PPARα</i>	
Forward	5'-AGTGCCTTTCTGTCGGGATG-3'
Reverse	5'-TGCTTTCAGTTTTGCTTCTCAG-3'
Human <i>AHR</i>	
Forward	5'-TGCCGAGTCCCATATCCGAA-3'
Reverse	5'-GGCGTGCATTAGACTGGACC-3'
<i>Luciferase (Luc)</i>	
Forward	5'-CAGCGAGAATAGCTTGCACT-3'
Reverse	5'-AGGATCTTTTGCAGCCCTTT-3'
<i>Renilla luciferase (Rluc)</i>	
Forward	5'-ATAACTGGTCCGCAGTGGTG-3'
Reverse	5'-TAAGAAGAGGCCGCGTTACC-3'
Human <i>HIPK3</i>	
Forward	5'-GCACATGTTGTCTGGCCTCAG-3'
Reverse	5'-TCTCTTCCTGGCTCCCATTC-3'
Human β - <i>ACTIN</i>	
Forward	5'-AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3'
Reverse	5'-CGCATCTCATATTTGGAATGACT-3'
Human <i>GAPDH</i>	
Forward	5'-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3'
Reverse	5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'
Human pre-circHIPK3	
Forward	5'-TATTTGCACTGCCAACTAGTTAAG-3'
Reverse	5'-CTGAATCCTTATACAGGTTGAGCA-3'
Human 18S rRNA	
Forward	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
Reverse	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

ルシフェラーゼレポーターベクターの作製

ヒト *ABCC4* 遺伝子の塩基配列情報 (NM_005845.4) をもとに、プロモーター領域として転写開始点の上流 1650 nt から下流 70 nt、3'UTR として終止コドンの次の塩基から下流 1741 nt、1192 nt および 553 nt の領域を増幅するように、制限酵素認識配列 (KpnI/NheI および XbaI/FseI) を 5'末端に付加したプライマーを設計して、RPTECs のゲノム DNA を鋳型にして PrimeSTAR MAX DNA polymerase (Takara Bio Inc.) を用いて PCR を行った。プロモーター領域の PCR 産物は pGL4.25 (Promega, Madison, WI)、3'UTR の PCR 産物は pGL4.13

(Promega) へそれぞれ挿入した (*ABCC4* upstream::Luc および *ABCC4* 3'UTR::Luc)。miR-381-3p 結合部位に変異を入れた *ABCC4* 3'UTR MUT::Luc の作製では、miR-381-3p 結合配列 (5'-TTGTATA-3') を MluI 認識配列 (5'-ACGCGTA-3') へ変換した。変異導入には PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara Bio Inc.) を用いて、推奨のプロトコルに従って行った。

miR-381-3p target::Luc の作製では、制限酵素認識配列 (NheI/XbaI) を 5'末端に付加した miR-381-3p 相補鎖のオリゴヌクレオチドを 90°C で 3 分間処理した後、pmirGLO (Promega) の NheI/XbaI 制限酵素認識部位に挿入した (**Fig. 2-8A**)。本実験で使用したプライマー、オリゴヌクレオチドの配列を **Table 2-2** に示す。

Table 2-2 Primer sets and oligonucleotide for reporter plasmid construction

The numbers indicate the distance in nt from the transcription start site for the upstream vector or from the nucleotide immediately after the stop codon for the 3'UTR vector.

Gene / primer / oligo	sequence
Human <i>ABCC4</i> upstream	
Forward for -1651 nt	5'-CGTGGTACCCAGGGTGGATATGAAGAGCAGC-3'
Reverse for +70 nt	5'-ATAGCTAGCCCTGGACCTCAAGCAGGGATG-3'
Human <i>ABCC4</i> 3'UTR	
Forward for +1 nt	5'-GCGCTCTAGAATCCAACCAAAATGTCAAGTC-3'
Reverse for +1741 nt	5'-TAGGCCGGCCATGGAGATGAAACTATCATTTA-3'
Reverse for +1192 nt	5'-TAGGCCGGCCACTCAACATATTACAGCCAC-3'
Reverse for +553 nt	5'-TAGGCCGGCCGGTACACACTCCCTACTA-3'
Human <i>ABCC4</i> 3'UTR miR-381-3p mutation	
Forward	5'-TTGTACGCGTACATATATTTGTCCTTCG-3'
Reverse	5'-TGTACGCGTACAAATGCACACGTG-3'
hsa-miR-381-3p antisense	
Top	5'-CTAGCATGCGGCCGCTAGTACAGAGAGCTTGCCC TTGTATAT-3'
Bottom	5'-CTAGATATACAAGGGCAAGCTCTCTGTACTAGCGG CCGCATG-3'

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

各種細胞を 2.0×10^5 cells/well の細胞数で 24 ウェルプレートに播種した。Lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen; Life Technologies) を用いて、500 ng の pGL4.25 ベクター類、200 ng の pGL4.13 ベクター類もしくは 200 ng の pmirGLO ベクター類をリバーズ法でトランスフェクトした。pGL4.25 ベクター類もしくは pGL4.13 ベクター類の導入時には 10ng の pRL-

TK ベクター (Promega) を内部標準として共トランスフェクトした。24 時間後に細胞を回収して、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性の比を補正後のルシフェラーゼ活性とした。

mRNA の安定性の測定

RPTECs に転写阻害剤である Actinomycin D (ACT-D; FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.) を終濃度 5 μ M で曝露した。曝露開始後、所定の時間に細胞を回収し、上記の方法で RNA を抽出し、定量的 RT-PCR で mRNA および circRNA の発現量を測定した。circHIPK3 過剰発現条件での miR-381-3p 安定性の評価では、circHIPK3 過剰発現ベクターもしくは pcDNA3.1 導入 24 時間後に ACT-D を曝露して、0 および 24 時間後に RNA を抽出して、定量的 RT-PCR で miRNA の発現量を測定した。

RNA の 2 次構造解析

ヒト *ABCC4* 遺伝子の転写産物の 2 次構造解析には RNAfold を用いた。RNAfold は、RNA の 2 次構造形成による自由エネルギーの低下を算出して、最も安定な構造を予測できるソフトウェアである [Lorenz et al., 2011]。 *ABCC4* 3'UTR の解析では、3'UTR の+1192 nt から +1741 nt を入力して、パラメータ設定は初期値で解析を行った。Intron を含む circHIPK3 前駆体の解析では、*HIPK3* exon 2 の上流 630 nt から下流 2060 nt を入力して、パラメータ設定は初期値で解析を行った。RNA 編集による circHIPK3 前駆体の 2 本鎖 RNA 構造不安定化の検討では、A-to-I RNA 編集が生じていると予想されたアデノシンをグアノシンに変換して解析を行った。解析結果は最小自由エネルギー (minimum free energy) で示し、塩基対を形成する可能性 (base-pair probabilities) で色分けした。暖色系が塩基対形成の可能性が高い安定的な構造を、寒色系が塩基対形成の可能性が低い不安定な構造を示している。

ダイレクトシーケンス解析

RPTECs の RNA 抽出は ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。ゲノム DNA を除くため、カラム上で DNase I 処理を行った。500 ng の RNA を ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo Co., Ltd.) を用いて逆転写して cDNA を合成した。ゲノム DNA の抽出は Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。

ABCC4 3'UTR の配列は、RPTECs のゲノム DNA もしくは cDNA を鋳型にして、GoTaq Green Master Mix (Promega) と遺伝子特異的な primer (Human ABCC4 3'UTR, Forward for +1 nt and Reverse for +1741 nt; **Table 2-2**) を用いて PCR で増幅した。PCR 産物は Reverse primer を用いてサンガー法によって RNA 編集の有無を確認した。

circHIPK3 の back-splicing の結合部の配列は、GoTaq Green Master Mix (Promega) と circHIPK3 特異的な divergent primer (詳細は後述する「定量的/半定量的 RT-PCR による環状 RNA の測定」で記す) を用いて PCR で増幅した。PCR 産物は Forward primer を用いてサンガー法によって配列を確認した。

circHIPK3 前駆体のダイレクトシーケンスには、レンチウイルスベクターによって circHIPK3 前駆体を過剰発現した RPTECs を用いた。レンチウイルス感染 48 時間後の RPTECs のゲノム DNA もしくは cDNA を鋳型にして、GoTaq Green Master Mix (Promega) と遺伝子特異的な primer (Forward primer, 5'-TATTTGCACTGCCAACTAGTTAAG-3'; Reverse primer, 5'-CTAAAGCGCATGCTCCAGAC-3') を用いて PCR で増幅した。PCR 産物は Reverse primer を用いてサンガー法によって RNA 編集の有無を確認した。circHIPK3 前駆体の RNA 編集レベルは、以下の式を用いて算出した。

$$\text{RNA editing level (\%)} = \frac{\text{peak height of "G"}}{\text{peak height of "G"} + \text{peak height of "A"}} \times 100$$

サンガー法でのシーケンス解析は Fasmac Co., Ltd. (Kanagawa, Japan) に依頼して、波形の図示および peak height の測定には SnapGene Viewer を用いた。

miRNA マイクロアレイ解析

RPTECs からの miRNA を含む total RNA の抽出は、miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。RNA のクオリティチェックには Experion (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いた。SurePrint miRNA Microarray rel. 21 (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) を用いて、2549 種の miRNA の発現量を確認した。発現上昇あるいは発現低下した miRNA を同定するために、それぞれのプローブの正規化されたシグナル強度から発現量の比と Z-score を算出した。発現上昇した miRNA の基準は発現量の比が 2 以上あるいは Z-score が 2 以上、発現低下した miRNA の基準は発現量の比が 0.5 以下あるいは Z-score が -2 以下とした。マイクロアレイのデータは National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus に登録した (Accession number, GSE192692)。

定量的 RT-PCR による miRNA の測定

RPTECs からの miRNA を含む total RNA の抽出は、miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。10 ng の RNA を Taqman Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写および miRNA の増幅反応を実施した。7500 Real-time PCR system、Taqman Fast Advanced Master Mix および miRNA 特異的な Taqman Advanced MicroRNA Assay (miR-381-3p, 477816_mir; miR-191-5p, 477952_mir) を用いて PCR を行い、検量線法によって miRNA の発現量を定量した (用いた試薬は全て Applied Biosystems 社製)。miR-191-5p の値は RNA 量、RT および miRNA 増幅反応の補正のために用いた。

miRNA mimic の RPTECs への導入

各種細胞を 2.0×10^5 cells/well の細胞数で 24 ウェルプレートに播種した。Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen; Life Technologies) を用いて、miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control #1 もしくは miR-381-3p mimic (C-300690-03-0005; Horizon Discovery, Cambridge, UK) を設定した終濃度となるようにリバース法でトランスフェクトした。共トランスフェクトの実験では、他のプラスミドベクターも mimic と同時にトランスフェクトした。24 時間後に細胞を回収して、各種実験に用いた。

定量的/半定量的 RT-PCR による環状 RNA の測定

環状 RNA は下流の 5' splice site と上流の 3' splice site が結合する back-splicing によって生じる選択的スプライシング産物である。Back-splicing の結合部は back-splice junction (BSJ) と呼ばれ、通常のスプライシング産物には存在しない環状 RNA 特異的な配列となる。したがって、BSJ を増幅する primer pair を設計することで環状 RNA の発現量を測定することができる。通常の primer pair が内向き (convergent) であるのに対し、BSJ を増幅する primer pair は遺伝子上で表現すると外向きとなるので、divergent primer (外向き primer) と呼ばれる (Fig. 2-3)。

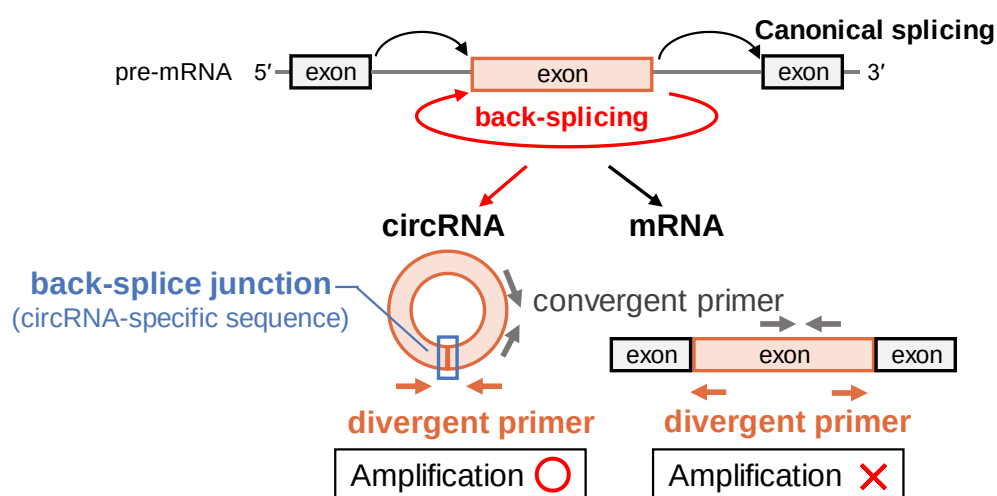


Figure 2-3. Schematic diagram showing the design of divergent primers for circRNA detection. PCR with divergent primers amplified the circRNA back-splice junction sequence in the circRNA but not the mRNA.

circHIPK3 およびその他の環状 RNA に関して、**Table 2-3** に示す divergent primer を設計した。各種細胞から RNAiso Plus (Takara Bio Inc.) を用いて total RNA を抽出して、上記のように cDNA を合成して、定量的 RT-PCR で divergent primer を用いた環状 RNA の定量を実施した。半定量的 RT-PCR では、cDNA を GoTaq Green Master Mix (Promega) を用いて PCR を行い、エチジウムブロマイドを含む 2% アガロースゲルで電気泳動して PCR 産物を分離した。PCR 産物は ImageQuant LAS3000 (FUJIFILM) を用いて撮影した。アガロースゲルから目的のバンドを切り出して精製した後、サンガー法によって配列を確認することで、目的の配列が増幅されていることを確認した。ゲノム DNA を鋳型にした PCR は、divergent primer による環状 RNA の増幅が cDNA でのみ生じていることを確認するために実施した。本実験で使用したプライマーの配列を **Table 2-3** に示す。

Table 2-3 Primer sets for RT-PCR analysis of circRNA expression

Gene / circAtlas ID / primer	sequence
Human circHIPK3 [divergent]	
Forward	5'-TATGTTGGTGGATCCTGTTCCGGCA-3'
Reverse	5'-TGGTGGGTAGACCAAGACTTGTGA-3'
Human circHIPK3 [convergent]	
Forward	5'-TTAGTCCCCTGCCACTAAAAGTGA-3'
Reverse	5'-TGCCGAACAGGATCCACCAACATA-3'
Human β -ACTIN [divergent]	
Forward	5'-CACCTTCACCGTTCCAGTTT-3'
Reverse	5'-AGTCATTCCAAATATGAGATGCG-3'
Human β -ACTIN [convergent]	
Forward	5'-AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3'
Reverse	5'-CGCATCTCATATTTGGAATGACT-3'
hsa_ZNF124_0005	
Forward	5'-TAAGCAATAAGAACTCGGTTGCC-3'
Reverse	5'-GGGAAGGATCCAACAAAGCCC-3'
hsa-RBM33_0009	
Forward	5'-CCCAGAAGAAGGACAGTATGAA-3'
Reverse	5'-TGTAACACCCTGAGAACTGAAAT-3'
hsa-CGNL1_0010	
Forward	5'-GGGAGCCCTGAAAGAAGAGGT-3'
Reverse	5'-TGGAATTACAAGCCTTGTTGCT-3'
hsa-ZKSCAN1_0001	
Forward	5'-GAAACCCCGCCTCTTACA-3'
Reverse	5'-TTCCTCTTCCACCTTCACTATTA-3'
hsa-CDYL_0005	
Forward	5'-CTTAGCTGTTAACGGGAAA-3'
Reverse	5'-CTGTTGAAGTCGTGGATGT-3'

hsa-MAN1A2_0003	Forward	5'-TCTGTGTTTGAAGTCAACATTG-3'
	Reverse	5'-GCTTCTTCCAAGGCCTTCTC-3'
hsa-C3_0002	Forward	5'-CGGACAAGAAAGGTAACCTGGA-3'
	Reverse	5'-AAGTCCTCAACGTTCCACAGC-3'
hsa-FBXW7_0005	Forward	5'-AGTATTGTGGACCTGCCCCGTTG-3'
	Reverse	5'-GCCAGCTTGCTACTTCTTGGA-3'
hsa-SLC8A1_0015	Forward	5'-ATCGAAGGGACTGCCAGAGG-3'
	Reverse	5'-GGTGAAAGACTTAATCGCCGC-3'
hsa-PCMTD1_0002	Forward	5'-CTGAAGTTATGGAAGCATTG-3'
	Reverse	5'-ATGGCTTCCAATATTGCACTTG-3'
hsa-PSD3_0018	Forward	5'-GTCCATTGCCTTACCTGTGCAA-3'
	Reverse	5'-TTGGCTGCTTCCACATTGCT-3'
hsa-SMARCA5_0005	Forward	5'-GAAAAGCTCTCCAAGATGGG-3'
	Reverse	5'-CTTCTTTGCACCTCTTTCCAA-3'
hsa-FGGY_0001	Forward	5'-TCTCCCGGACTTCTTATCGTGG-3'
	Reverse	5'-CGATGGTCCAGCCACATGAT-3'
hsa-RHOBTB3_0011	Forward	5'-AGGCAACCCACCATTACGAG-3'
	Reverse	5'-ATGGCTTACAGCGCAGAGAA-3'
hsa-FNDC3B_0004	Forward	5'-CAAGAAGCAGCCCAAAGTCG-3'
	Reverse	5'-CATGGCTGAGGGGTAGCTTG-3'
hsa-ATRNL1_0001	Forward	5'-CCAATTGCGGCAGTCCAGAT-3'
	Reverse	5'-TGGATAGCCTTCAATGAGCCA-3'
hsa-NOX4_0018	Forward	5'-TCCGGAGCAATAAGCCAGTC-3'
	Reverse	5'-TTAAGACTGATGCAGCCGGG-3'
hsa-SETD3_0001	Forward	5'-AAACACAGCTCGACAGTACGC-3'
	Reverse	5'-GCATTTCTGCAGCAGCTCAC-3'
hsa-RAB3IP_0013	Forward	5'-GTTCTGGAGGCTGTGGAAAA-3'
	Reverse	5'-GACACGTCCTGTCCATTGTG-3'
hsa-SLTM_0001	Forward	5'-AGAGGACATCGAAAGTCAGGAAA-3'
	Reverse	5'-TCCACAGAAGCATCTCCACTCA-3'
hsa-MAN1A2_0002	Forward	5'-GCAAGGAAAGGACACTCCCC-3'
	Reverse	5'-TCTTCCTCTTCCCACACTGAAA-3'
hsa-PTK2_0007	Forward	5'-TTGCCAAAAGGATTTCTAAACCAGT-3'
	Reverse	5'-GTTGGGGTCAAGGTAAGCAGC-3'

oligo(dT) primer を用いた RT による cDNA の合成

RPTECs の RNA 抽出は、RNAiso Plus (Takara Bio Inc.) を用いて推奨のプロトコルに従って行った。300 ng の RNA を ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) および 15 pmol の oligo(dT) primer もしくは 30 pmol の Random primer (nonadeoxy-ribonucleotide mixture, pd (N)9; Takara Bio Inc.) を用いて逆転写して cDNA を合成した。

RNase R 処理による環状 RNA の検出

RNase R はほぼ全ての直鎖状 RNA を分解する 3'→5'エキソヌクレアーゼである。環状 RNA は 3'末端および 5'末端を持たないことから、RNase R による分解に耐性を持つことが知られている [Suzuki et al., 2006]。RPTECs から RNAiso Plus (Takara Bio Inc.) を用いて抽出した 20 µg の total RNA を、2 U/µg の RNase R (Applied Biological Materials Inc., BC, Canada) で 37°C、20 min 反応させて直鎖状の RNA の分解を実施した。RNA はフェノールクロロホルム沈殿法で精製した後、上記の方法で定量的 PCR を用いて測定した。*HIPK3*, *β-ACTIN*, *GAPDH* mRNA は RNase R での直鎖状 RNA 分解反応のポジティブコントロールとして測定した。

circHIPK3 過剰発現プラスミドベクターおよびレンチウイルスベクターの作製

ヒト *HIPK3* 遺伝子の塩基配列情報をもとに、circHIPK3 前駆体の配列を制限酵素認識部位 (NheI/KpnI および XbaI/NotI) を 5'末端に付加したプライマーを設計して、RPTECs のゲノム DNA を鋳型にして PrimeSTAR MAX DNA polymerase (Takara Bio Inc.) を用いて PCR を行った。PCR 産物はそれぞれ pcDNA3.1 (Invitrogen; Life Technologies) および pLVSiN-CMV Pur (Takara Bio Inc.) へ挿入した。RNA 編集型の circHIPK3 前駆体発現ベクターの作製では、circHIPK3 前駆体の *Alu* 配列のうち 3 か所のアデノシン (5'-CTAAAAATA-3') を、A-to-I RNA 編集型であるグアノシンに変換した (5'-CTAGGGGATA-3')。変異導入には PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara Bio Inc.) を用いて、推奨のプロトコルに従って行った。

circHIPK3 過剰発現の実験では、各種細胞を 2.0×10^5 cells/well の細胞数で 24 ウェルプレートに播種した後、Lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen; Life Technologies) を用いて、500 ng の circHIPK3 発現ベクターをリバース法でトランスフェクトした。24 時間後に細胞を回収して、各種実験に用いた。circHIPK3 前駆体発現レンチウイルス粒子の作製は、Lenti-X293 T 細胞と Lentiviral High Titer Packaging Mix with pLVSIIN series (Takara Bio Inc.) を用いて、推奨のプロトコルに従い実施した。本実験で使用したプライマーの配列を **Table 2-4** に示す。

Table 2-4 Primer sets for circHIPK3-expressing plasmid construction

Gene / primer		sequence
circHIPK3 into pcDNA3.1		
	Forward	5'-CGTGCTAGCTGAGGCAATTCTTGGGCTTTAGG-3'
	Reverse	5'-CGCGGTACCACTCACGGGAGCCAAAGAAGTAT-3'
circHIPK3 into pLVSIIN-CMV		
	Forward	5'-CGGCTCTAGATGAGGCAATTCTTGGGCTTTAGG-3'
	Reverse	5'-ATTGCGGCCGCGAGTCACGGGAGCCAAAGAAGTAT-3'
circHIPK3 mutation		
	Forward	5'-CTCTACTAGGGATAACAAAAATTAGCTGG-3'
	Reverse	5'-TGTTATCCCTAGTAGAGATGGGGGTTT-3'

RPTECs における時計遺伝子の発現リズムの同調

通常、個々の細胞はそれぞれ独立した時計遺伝子の発現リズムを有しており、細胞集団としてのリズムを検出することはできない。一方、哺乳類の培養細胞にグルココルチコイドアナログである Dexamethasone (DEX) を添加して短時間刺激した場合、個々の細胞の *PERIOD1* 遺伝子の発現が一過性に誘起され分子時計がリセットされ、細胞集団全体で同調した概日リズムを検出できるようになる [Balsalobre et al., 2000a]。そこで、各種細胞に DEX (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.) を終濃度 100 nM で 2 時間曝露して、時計遺伝子の発現リズムの同調 (概日時計機構の再構築) を行った。第 1 章の結果 (**Fig. 1-5B**) から、細胞内の概日時計機構によって概日リズムが生じていると考えられる DEX 処理後 28 時間から 48 時間後まで、4 時間ごとに細胞を回収して各実験に用いた。

変異体 ADAR1 過剰発現系の構築

Origene Technologies (Rockville, MD) から購入した ADAR1 Human Tagged ORF Clone (RG219761) を鋳型にして、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara Bio Inc.) の推奨のプロトコルに従って各種変異導入を実施した。RNA 編集活性欠損変異体 ADAR1 (E617A mutated ADAR1) の作製では、617 番目の Glu (GAA) を Ala (GCA) に変換することで編集活性を欠損させた [Lai et al., 1995]。2 本鎖 RNA 結合活性欠損変異体 ADAR1 (EAA-mutated ADAR1) の作製では、3 か所の 2 本鎖 RNA 結合ドメイン (dsRBD) に存在する KKxxK モチーフをそれぞれ EAxxA モチーフに変換することで結合活性を欠損させた [Valente and Nishikura, 2007]。本実験で使用したプライマーの配列を **Table 2-5** に示す。

変異体 ADAR1 の RPTECs への導入にはエレクトロポレーション法を用いた。 1.0×10^6 個の RPTECs を 10 μ g の各種 ADAR1 発現プラスミド (wild-type, E617A, EAA) もしくは pcDNA3.1 と、Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で懸濁した。この懸濁液をキュベットへ移し、Super Electroporator NEPA21 (NEPA GENE, Co., Ltd., Chiba, Japan) を用いてエレクトロポレーションを実施した。Poring pulse は 175 V (pulse length, 5 ms; pulse interval, 50 ms; number of pulses, 2; decay rate, 10%)、transfer pulse は 20 V (pulse length, 50 ms; pulse interval, 50 ms; number of pulses, 5; decay rate, 40%) で実施した。エレクトロポレーションの 24 時間後細胞を回収し、各種実験に用いた。

Table 2-5 Primer sets for mutated ADAR1-expressing plasmid construction

Gene / primer		sequence
<i>ADAR1</i> E617A-mut		
Forward		5'-CATGCAGCAATAATCTCCCGGAGAG-3'
Reverse		5'-GATTATTGCTGCATGGCAGTCATTGAC-3'
<i>ADAR1</i> EAA-mut #1		
Forward		5'-GAGGCCGTGGCGGCGCAGGATGCAGCTATGA-3'
Reverse		5'-CGCCGCCACGGCCTCGCTTCCAGCTTCAG-3'
<i>ADAR1</i> EAA-mut #2		
Forward		5'-GAGGCAGTGGCAGCGCAGATGGCCGCAGA-3'
Reverse		5'-CGCTGCCACTGCCTCGCTGGGAGCACTCAC-3'
<i>ADAR1</i> EAA-mut #3		
Forward		5'-GAGGCCCAAGGGGCGCAGGAAGCAGCAGATG-3'
Reverse		5'-CGCCCCTTGGGCCTCGCTGTGTGCGCAG-3'

RNA 免疫沈降法

circHIPK3 前駆体を検出するために、RNA 免疫沈降法ではレンチウイルスベクターによって circHIPK3 前駆体を過剰発現した RPTECs を用いた。レンチウイルス感染 48 時間後、細胞を回収して 1 mL の nuclear isolation buffer (1.28 M sucrose, 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 4% Triton X-100) で懸濁した。1 mL の PBS と 3 mL の DEPC 処理水を加えて、 $2,500 \times g$ 、4°C で 15 分間遠心してペレットを RIP buffer (150 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5% Nonidet P-40, 2 µg/mL leupeptin, 2 µg/mL aprotinin, 100 U/mL recombinant RNase inhibitor [TOYOBO Co., Ltd.]) で再懸濁した。ポッター型ホモジナイザーでホモジネート後、13,000 rpm で 10 分間遠心して、上清を核画分として回収した。抗 ADAR1 抗体 (sc-73408; Santa Cruz Biotechnology) もしくはマウス IgG 抗体 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.) を 5 µg 加えて、4°C で 2 時間反応させた。その後、protein G beads (Thermo Fisher Scientific) を加えて 4°C で 1 時間反応させた。Beads を RIP buffer で 3 回洗浄して、10%の beads をタンパク抽出に、残りを RNA 抽出に用いた。RNA 抽出は miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて前述のように実施して、遺伝子特異的 primer (**Table 2-1**) を用いた定量的 RT-PCR で ADAR1 に結合している circHIPK3 前駆体を定量した。 $\%Input = 2^{-\Delta Ct} \times 100$; $\Delta Ct = Ct_{RIP} - (Ct_{input} - [\text{Log}_2 \text{input dilution factor}])$ 。

circHIPK3 back-splicing 効率の評価

各種細胞を 2.0×10^5 cells/well の細胞数で 24 ウェルプレートに播種した。Lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen; Life Technologies) を用いて、500 ng の野生型 circHIPK3 発現ベクターもしくは編集型 circHIPK3 発現ベクターをリバーズ法でトランスフェクトした。24 時間後に細胞を回収して、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) を用いて推奨のプロトコルに従って RNA 抽出を実施した。プラスミドベクターDNA を除くため、カラム上で DNase I 処理を行った。上記のように cDNA の合成、定量的 RT-PCR を実施して、back-splicing

産物である circHIPK3 と、back-splicing を受けていない転写産物を定量した。circHIPK3 発現量と back-splicing を受けていない転写産物の発現量の比を biogenesis efficiency とした。

統計解析

統計解析ソフトとして JMP Pro14 (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) を用いた。独立多群間の比較には一元配置分散分析法 (One-way ANOVA)、Tukey–Kramer post hoc test および Dunnett's post hoc test を用いた。また、独立二群間の比較には Student's *t*-test を用いた。有意水準は 0.05 とした。

【結 果】

ADAR1-KD による MRP4 発現上昇における転写制御の評価

第 1 章で作製した ADAR1 をノックダウンしたヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs, renal proximal tubular epithelial cells; **Fig. 1-2A**) において、ABC トランスポーターファミリーに属する *ABCC4* の mRNA 発現量は Mock RPTECs と比較して有意に上昇した ($p < 0.05$, **Fig. 1-3B**)。さらに、*ABCC4* 遺伝子にコードされている MRP4 タンパク質の発現量にも ADAR1-KD で有意な上昇が認められた ($p < 0.01$, **Fig. 1-3C**)。これらより、RPTECs において ADAR1 が *ABCC4* mRNA および MRP4 の発現を制御していることが示唆されたことから、その制御機構について解析を行った。

MRP4 タンパク質発現には、転写・転写後・翻訳・翻訳後など、遺伝子発現制御の多くの過程が関与していることが指摘されている [Wen et al., 2015]。そこで始めに、ADAR1 による MRP4 発現制御が転写過程によるものかを検討するために、*ABCC4* 遺伝子の転写開始点上流 1650 nt から下流 70 nt を pGL4.25 の *Luciferase* 配列の上流に組み込んだレポーターベクターを作製した (*ABCC4* upstream::Luc)。この領域は、ヒト腎細胞において *ABCC4* の転写に関わることが知られている転写因子である NRF2、PPAR α 、AHR の応答配列を含むように設計した (**Fig. 2-4A**)。応答配列の検索には、転写因子の結合配列検索ツールである JASPAR2022 [Fornes et al., 2019] を使用した。ADAR1-KD RPTECs ではこれらの転写因子の mRNA 発現量に有意な変化が認められなかった (**Fig. 2-4B**) ことと一致し、*ABCC4* upstream::Luc のルシフェラーゼ活性は Mock RPTECs と ADAR1-KD RPTECs で有意な変化を示さなかった (**Fig. 2-4C**)。これらの結果から、ADAR1 による MRP4 発現制御は転写過程によるものではないことが示唆された。

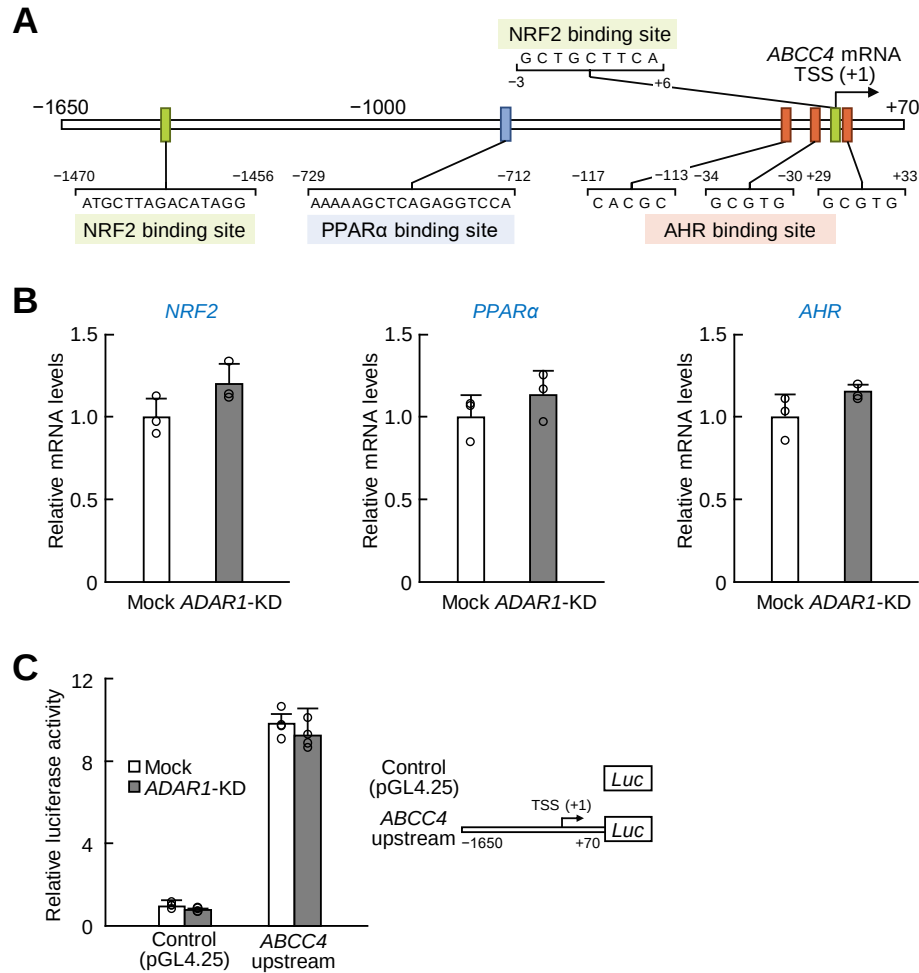


Figure 2-4. Effects of the knockdown of *ADAR1* on the transcription activity of the *ABCC4* gene. (A) Schematic diagrams of the 5'-flanking region of the *ABCC4* gene and response elements of *ABCC4*-related transcription factors. The numbers indicate the distance in nt from the putative transcription start site (TSS, +1). Binding sites of the transcription factors were searched in JASPAR2022 [Fornes et al., 2019] and referred from a previous study [Xu et al., 2010]. (B) The mRNA levels of *NRF2*, *PPARα* and *AHR* in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. (n = 3). (C) The luciferase activity of *ABCC4* upstream::Luc in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. Schematic diagrams of luciferase reporter constructs containing 5'-flanking region of the *ABCC4* gene are shown in the right panel. The numbers in the right panel indicate the distance in nt from TSS. Values are the mean with S.D. (n = 4).

ADAR1 による ABCC4 発現の転写後制御

ADAR1-KD による ABCC4 RNA 発現上昇がおよそ 1.2 倍であったのに対して、MRP4 タンパク質発現上昇はおよそ 2.7 倍と顕著に大きかったことから (Fig. 1-3B, C)、翻訳過程に着目した。翻訳効率を制御する因子として、3'非翻訳領域 (3'UTR, 3' untranslated region) への microRNA (miRNA) の結合が知られている。そこで、ADAR1 が miRNA を介して ABCC4 3'UTR に作用するか検討した。ABCC4 3'UTR の全長 1741 nt を pGL4.13 の *Luciferase* 配列の下流に組み込んだレポーターベクター (ABCC4 3'UTR +1741::Luc) と、+1192 nt および +553 nt までを組み込んだレポーターベクター (ABCC4 3'UTR +1192::Luc, ABCC4 3'UTR +553::Luc) を作製した (Fig. 2-5A left)。ABCC4 3'UTR +1741::Luc のルシフェラーゼ活性は、3'UTR を組み込んでいない pGL4.13 と比べて低下しており、3'UTR による MRP4 翻訳抑制が示唆された。さらに、ADAR1-KD RPTECs での ABCC4 3'UTR +1741::Luc のルシフェラーゼ活性は、Mock RPTECs と比べて有意に上昇していた ($p < 0.01$, Fig. 2-5A)。一方で、ABCC4 3'UTR +1192::Luc と ABCC4 3'UTR +553::Luc のルシフェラーゼ活性は Mock RPTECs と ADAR1-KD RPTECs で有意な差は認められなかったことから (Fig. 2-5A)、ABCC4 3'UTR の +1193 nt から +1741 nt の領域が ADAR1 による MRP4 発現制御に関与していることが示唆された。

一方で、ABCC4 3'UTR +1741::Luc をトランスフェクトして *Luciferase* mRNA 発現量を測定したところ、Mock RPTECs と ADAR1-KD RPTECs で有意な差は認められなかった (Fig. 2-5B)。さらに、転写阻害剤である Actinomycin D (ACT-D) を曝露して経時的に発現量を測定することで ABCC4 mRNA の安定性を評価したところ、Mock RPTECs と ADAR1-KD RPTECs で有意な差は認められなかった (Fig. 2-5C)。miRNA による遺伝子発現制御には mRNA 分解と翻訳抑制の 2 つが知られているが [Fabian et al., 2010]、これらの結果から ADAR1 による MRP4 発現制御には、主に miRNA による翻訳抑制が関与していると考えられた。

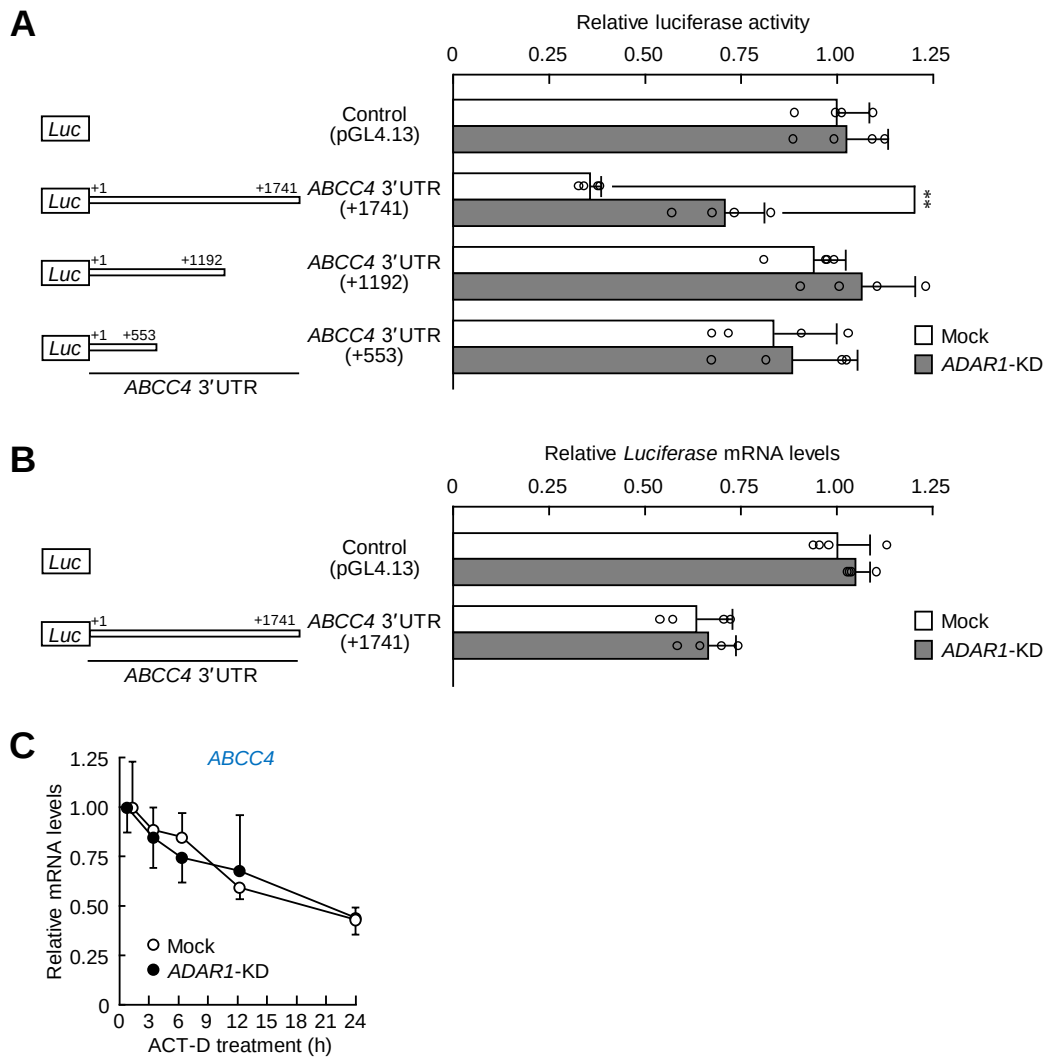


Figure 2-5. ADAR1 regulates the expression of MRP4 through the 3'UTR of *ABCC4* mRNA in RPTECs. (A) The luciferase activity of *ABCC4* 3'UTR::Luc in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. Schematic diagrams of luciferase reporter constructs containing varying length of the 3'UTR of the *ABCC4* gene are shown in the left panel. The numbers in the left panel indicate the distance in nt from the nucleotide immediately after the stop codon. Values are the mean with S.D. ($n = 4$). **, $p < 0.01$; significant difference between the indicated groups ($F_{7,24} = 14.807$, $p < 0.001$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test). **(B)** The mRNA levels of the *Luciferase* gene in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs transfected with luciferase reporter constructs containing the full-length *ABCC4* 3'UTR. The mRNA levels of the *Luciferase* gene were normalized to those of *Renilla luciferase*. Values are the mean with S.D. ($n = 4$). **(C)** The stability of *ABCC4* mRNA in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. Cells were treated with 5 μ M actinomycin D (ACT-D) and RNA was extracted at the indicated time points. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. ($n = 3, 4$).

ABCC4 3'UTR における ADAR1 作用点の探索

ADAR1 による RNA 編集の基質特異性は低く、50 bp 以上の 2 本鎖 RNA (dsRNA, double-stranded RNA) で高頻度に生じることが知られている [Nishikura et al., 1991; Eggington et al., 2011]。そこで、ABCC4 3'UTR の+1193 nt から+1741 nt の領域が ADAR1 による RNA 編集を受けるか検討した。まず、この領域が ADAR1 の標的となる安定な dsRNA 構造をとるか、RNA の 2 次構造解析を実施した。RNA の塩基対形成による安定化を算出するソフトウェアである RNAfold [Lorenz et al., 2011] での解析の結果、ABCC4 3'UTR の+1193 nt から+1741 nt の領域は安定な dsRNA 構造をとらないことが示された (**Fig. 2-6A**)。さらに、ダイレクトシーケンス解析の結果、この領域に A-to-I RNA 編集と認められる部位は存在しなかった (**Fig. 2-6B**)。これらの結果から、ADAR1 による MRP4 発現制御は、ABCC4 3'UTR への直接的な作用ではないことが示唆された。

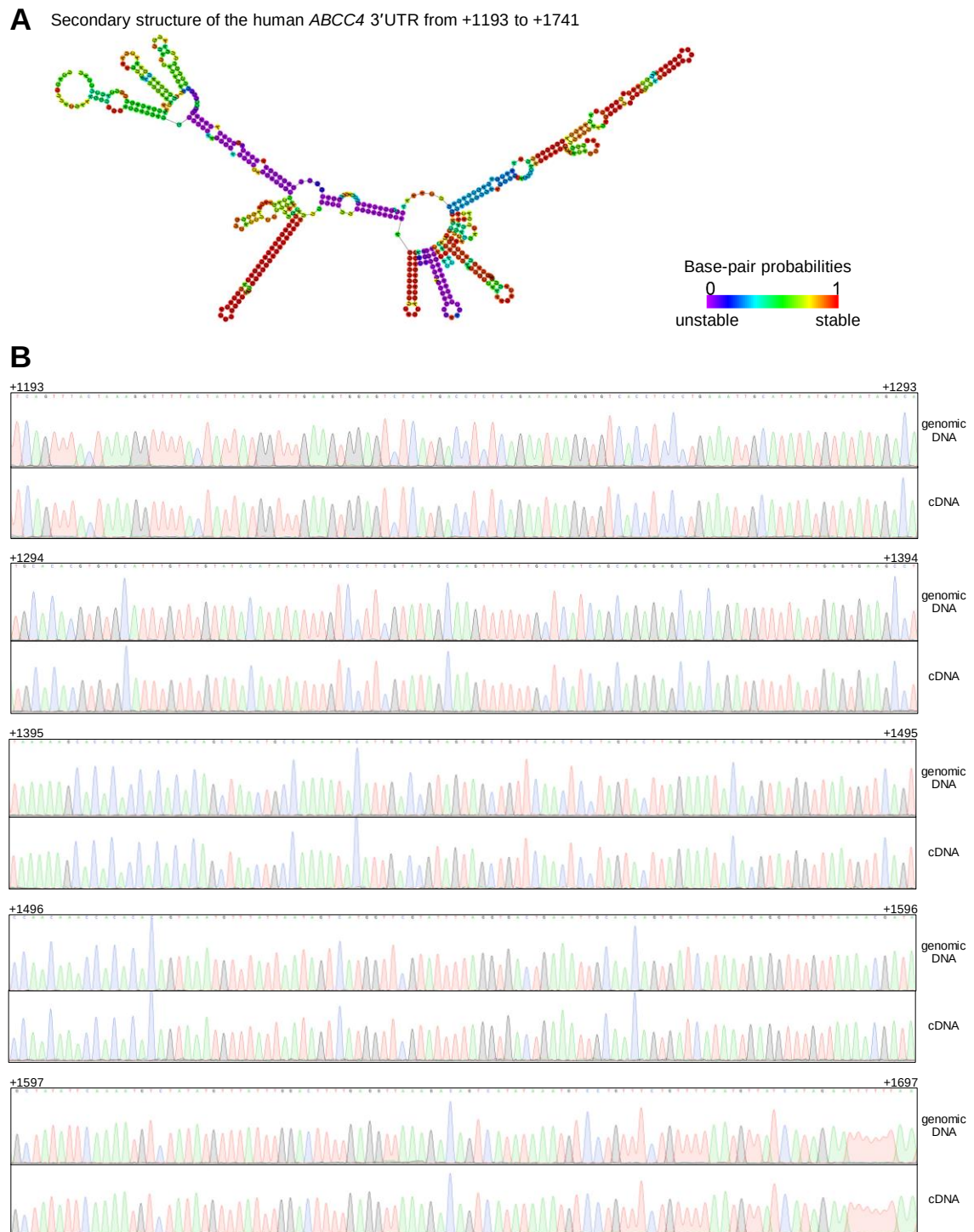


Figure 2-6. ADAR1 does not act directly on the *ABCC4* 3'UTR. (A) *In silico* analysis for prediction of RNA secondary structure of the *ABCC4* 3'UTR (the region from +1193 to +1741) by RNAfold. The minimum free energy structure with base-pair probabilities was calculated to have the lowest value of free energy. Base-pair probabilities are shown by a color spectrum. (B) Electropherograms from direct sequencing of the PCR-amplified product of *ABCC4* 3'UTR. The sequence data were obtained from genomic DNA and mRNA extracted from RPTECs. The numbers indicate the distance in nt from the nucleotide immediately after the stop codon. Electropherograms were visualized using SnapGene Viewer.

ADAR1 による MRP4 の翻訳制御への miR-381-3p の関与

ADAR1 が miRNA を介して間接的に MRP4 の発現を制御していると考えられたことから、*ABCC4* 3'UTR の+1193 nt から+1741 nt の領域に結合する miRNA の検索を行った。TargetScanHuman [Agarwal et al., 2015] での検索で、この領域には 25 個の miRNA が結合することが予想された (**Fig. 2-7A**)。さらに、Mock および *ADAR1*-KD RPTECs を用いた miRNA microarray では、16 個の miRNA の発現が変化した (**Fig. 2-7B**)。この解析において、発現上昇の基準を発現量の比が 2 以上もしくは Z-score が 2 以上、発現低下の基準は発現量の比が 0.5 以下あるいは Z-score が -2 以下に設定したところ、9 つの miRNA の発現上昇および 7 つの miRNA の発現低下が確認された (**Fig. 2-7C**)。これらの中で *ABCC4* 3'UTR の+1193 nt から+1741 nt の領域に結合することが予想され、かつ、*ADAR1*-KD で発現量が低下した miR-381-3p (Accession number, MIMAT0000736) に着目して以降の検討を行った。

miR-381-3p の発現量を定量的 RT-PCR 法で測定したところ、Mock RPTECs と比較して *ADAR1*-KD RPTECs で有意な低下が認められた ($p < 0.01$, **Fig. 2-7D**)。この定量的 RT-PCR 法において、miRNA の内在性コントロールとして推奨されている miR-191-5p を、RNA 量、RT および miRNA 増幅過程の補正に用いた [Peltier and Latham, 2008]。さらに、成熟型 miRNA の前駆体である pri-miRNA を測定すると、Mock および *ADAR1*-KD RPTECs では miR-381-3p の前駆体である pri-mir-381 の発現量に有意な変化は認められなかったことから (**Fig. 2-7E**)、ADAR1 による miR-381-3p の発現制御は転写後レベルでの制御であると考えられた。

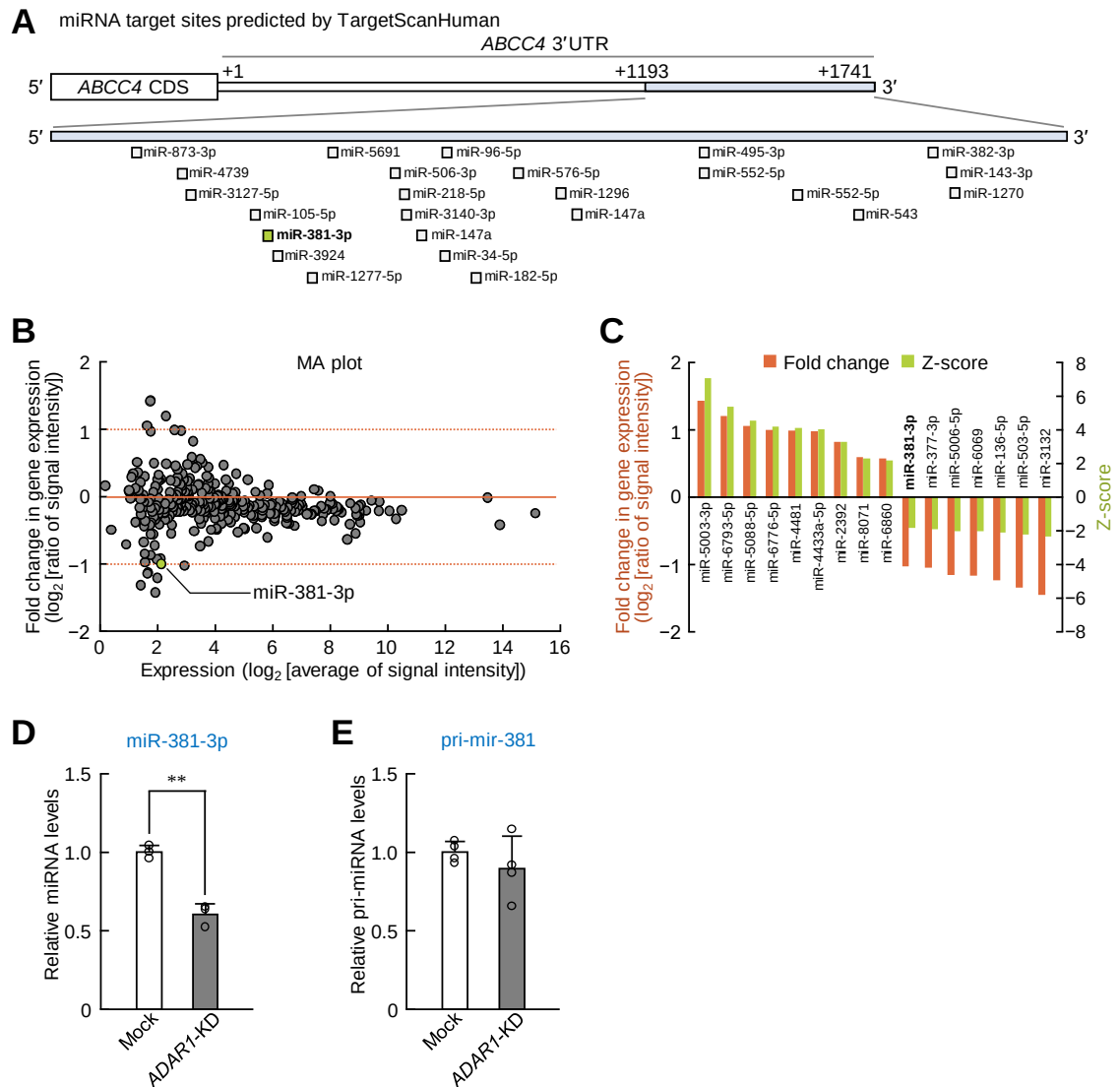


Figure 2-7. ADAR1 regulates the translation of *ABCC4* mRNA into MRP4 protein through mediating miR-381-3p expression. (A) A schematic diagram showing the putative target sites of miRNAs in *ABCC4* 3'UTR from +1193 to +1741. The numbers indicate the distance in nt from the nucleotide immediately after the stop codon. The miRNA target sites were predicted with TargetScanHuman. CDS, coding sequence. (B) MA plot of all miRNAs expressed in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. Data were obtained from microarray analysis (Accession number, GSE192692). The criteria for up-regulated miRNAs were set at a ratio of 2-fold or Z-score of 2.0; the criteria for down-regulated miRNAs were set at a ratio of 0.5-fold or Z-score of -2.0. (C) Differentially expressed miRNAs between mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs in the microarray analysis. (D) The expression levels of miR-381-3p in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. The expression levels were normalized to those of miR-191-5p. Values are the mean with S.D. (n = 3). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_4 = 8.567$, $p = 0.001$; Student's t -test). (E) The expression levels of pri-mir-381 in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. The expression levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. (n = 4).

RPTECs における内在性 miR-381-3p の機能評価

ADAR1 による MRP4 翻訳制御に関与する miRNA として miR-381-3p が同定されたことから、この miRNA が RPTECs において実際に機能しているか検討した。まず miR-381-3p の活性を測定するために、pmirGLO の *Luciferase* 配列と poly(A)シグナル配列の間に miR-381-3p 全長の完全相補鎖配列を挿入した miR-381-3p target::Luc を作製した (**Fig. 2-8A**)。Mock RPTECs において、コントロールの pmirGLO と比較して miR-381-3p target::Luc のルシフェラーゼ活性が有意に低下したことから ($p < 0.01$, **Fig. 2-8B**)、RPTECs において内在性の miR-381-3p が機能していることが示された。また、miR-381-3p target::Luc のルシフェラーゼ活性は Mock RPTECs と比較して *ADAR1*-KD RPTECs で有意に上昇したことから ($p < 0.05$, **Fig. 2-8B**)、*ADAR1*-KD RPTECs では miR-381-3p の活性が低下していることが示唆された。

続いて、RPTECs において miR-381-3p が *ABCC4* 3'UTR に作用しているか検討した。*ABCC4* 3'UTR +1741::Luc の miR-381-3p 結合部位の配列を変異させて miR-381-3p の結合を妨げることで、*ABCC4* 3'UTR の挿入で低下していたルシフェラーゼ活性が有意に上昇した ($p < 0.05$, **Fig. 2-8C**)。この結果から、RPTECs において miR-381-3p が *ABCC4* 3'UTR に作用していることが示され、*ADAR1*-KD RPTECs での MRP4 発現上昇に miR-381-3p が関与していることが示唆された。

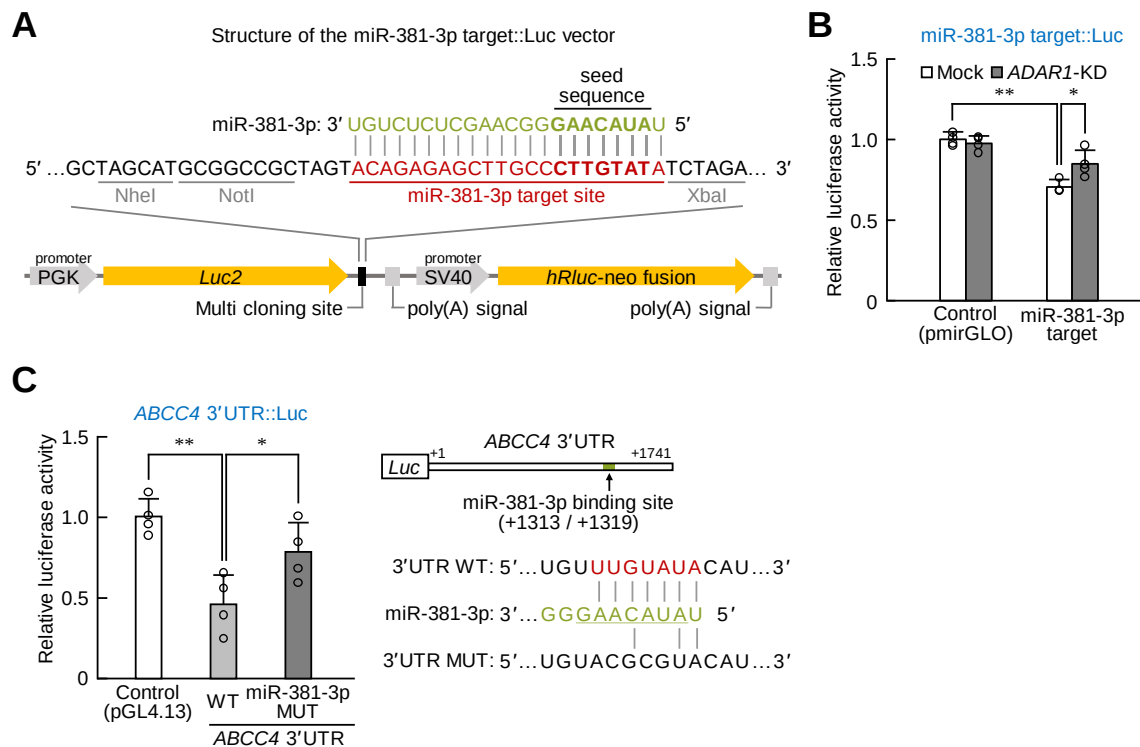


Figure 2-8. Evaluation of endogenous miR-381-3p function in RPTECs. (A) Schematic diagram showing the miR-381-3p target::Luc vector based on the pmirGLO vector. (B) The luciferase activity in mock-transduced and ADAR1-KD RPTECs transfected with miR-381-3p target::Luc vector. Values are the mean with S.D. (n = 4). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the indicated groups ($F_{3,12} = 24.888$, $p < 0.001$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test). (C) The luciferase activity in RPTECs transfected with wild-type (WT) or mutant (MUT) ABCC4 3'UTR::Luc. Schematic diagrams of luciferase reporter constructs containing WT or MUT (mutation at the miR-381-3p target site) 3'UTR of the ABCC4 gene are shown in the right panel. The numbers in the right panel indicate the distance in nt from the nucleotide immediately after the stop codon. Values are the mean with S.D. (n = 4). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the indicated groups ($F_{2,9} = 11.252$, $p = 0.004$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test).

miR-381-3p による MRP4 発現制御の機能評価

MRP4 の発現制御には複数の miRNA が関与することが報告されているが [Haenisch et al., 2014]、miR-381-3p による制御についての報告はない。そこで、miR-381-3p の mimic を導入することで、本 miRNA が MRP4 タンパク質の翻訳制御に関与しているか検討した。まず miR-381-3p と 0.1–100 nM の miR-381-3p mimic を共トランスフェクトすることで、mimic の機能を評価した。その結果、mimic の濃度依存的なルシフェラーゼ活性の低下が認められた ($p < 0.01$, **Fig. 2-9A**)。最大濃度の 100 nM では非特異的な抑制効果が認められたことを考慮して、以降の検討では 10 nM の mimic を用いた。10 nM の miR-381-3p mimic 導入では、コントロールの pmirGLO への有意な抑制効果は認められず、miR-381-3p target::Luc の有意な抑制が認められた ($p < 0.01$, **Fig. 2-9B**)。さらに、*ABCC4* 3'UTR::Luc のルシフェラーゼ活性、MRP4 タンパク質発現量も miR-381-3p 導入で有意に低下したことから ($p < 0.01$, **Fig. 2-9C, D**)、miR-381-3p が *ABCC4* 3'UTR を介して MRP4 の発現量を低下させることが示唆された。一方で、miR-381-3p 導入によって *ABCC4* mRNA 発現量も低下しており ($p < 0.01$, **Fig. 2-9E**)、miR-381-3p の *ABCC4* mRNA への作用として翻訳抑制効果だけでなく、mRNA 分解効果も働いていることが示唆された。

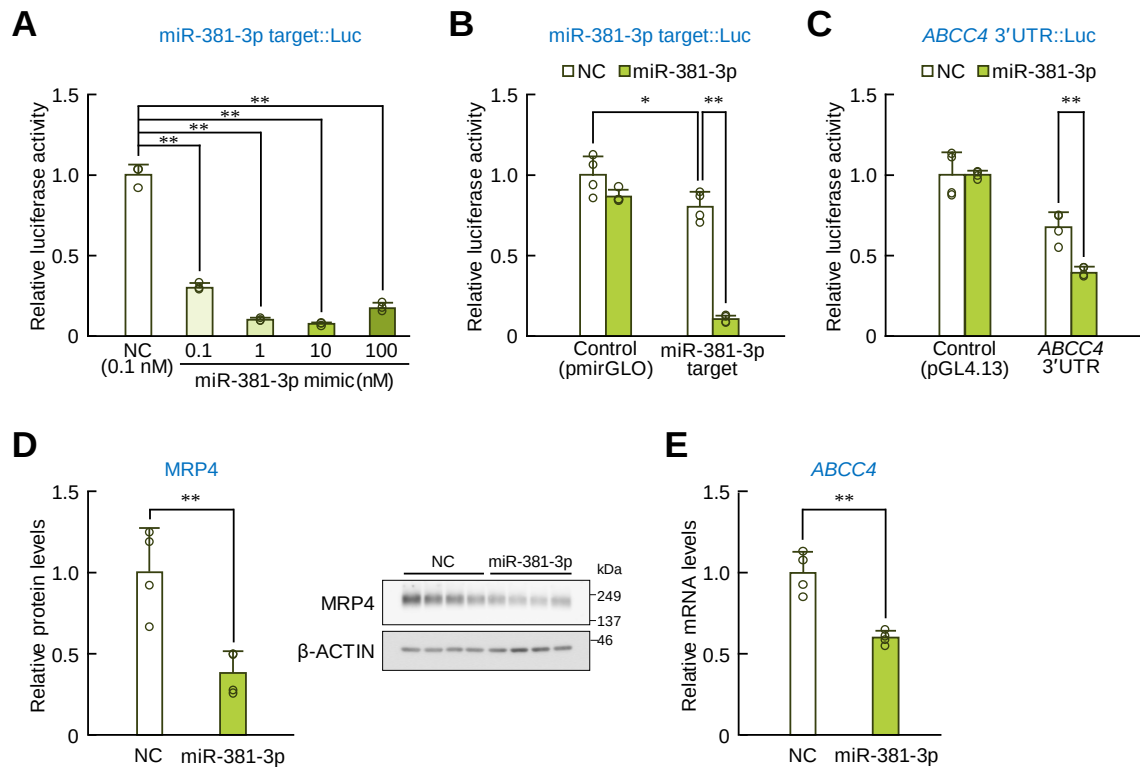


Figure 2-9. miR-381-3p suppresses MRP4 expression by acting on the *ABCC4* 3'UTR. (A) The luciferase activity in RPTECs transfected with miR-381-3p target::Luc vector and 0.1, 1, 10, and 100 nM miR-381-3p mimic. Values are the mean with S.D. ($n = 3$). **, $p < 0.01$; significant difference between the indicated groups ($F_{4,10} = 375.084$, $p < 0.001$; ANOVA with Dunnett's post hoc test). NC, negative control. (B and C) The luciferase activity in RPTECs transfected with miR-381-3p target::Luc (B) or *ABCC4* 3'UTR::Luc vector (C), and 10 nM miR-381-3p mimic. Values are the mean with S.D. ($n = 4$). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the indicated groups ($F_{3,12} = 101.420$, $p < 0.001$ for miR-381-3p target::Luc; $F_{3,12} = 45.210$, $p < 0.001$ for *ABCC4* 3'UTR::Luc; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test). (D and E) Expression levels of MRP4 protein (D) and *ABCC4* mRNA (E) in RPTECs transfected with 10 nM miR-381-3p mimic. Values are the mean with S.D. ($n = 4$). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_6 = 4.116$, $P = 0.006$ for MRP4; $t_6 = 5.783$, $P = 0.001$ for *ABCC4*; Student's t -test).

ヒト腎臓での環状 RNA の発現解析

ADAR1 による miR-381-3p の機能制御を結びつける因子を探索するにあたり、環状 RNA (circRNA, circular RNA) に着目した。circRNA は ADAR1 の RNA 編集によって生成が制御されることや [Ivanov et al., 2015; Rybak-Wolf et al., 2015]、miRNA をスポンジのように吸着してその機能を抑制する competing endogenous RNA (ceRNA) として働くことが報告されている [Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013]。さらに、miR-381-3p の ceRNA として機能する circRNA も複数報告されている [Zhang et al., 2019; Gu et al., 2020; Bi et al., 2021]。circRNA の発現は細胞・組織依存的であることから [Liang and Wilusz, 2014]、circRNA 発現のデータベースである circAtlas 2.0 [Wu et al., 2020] を用いてヒト腎臓組織での circRNA 発現分布を検索した。circAtlas 2.0 において、30 個の circRNA がヒト腎臓組織で高発現していることが示された (**Fig. 2-10A**)。その中で、circHIPK3 (circBase ID: hsa_circ_0000284) は miR-381-3p 結合部位を持つことが starBase v2.0 [Li et al., 2014] での解析で見出されたことから (**Fig. 2-10B**)、ADAR1 と miR-381-3p を仲介する因子として circHIPK3 に着目した。データベースの登録情報から、circHIPK3 は広く全身に発現する環状 RNA であり、腎臓での発現も認められると考えられた (**Fig. 2-10C**)。circHIPK3 について検討するにあたり、まずは RPTECs で circHIPK3 の発現が認められるか検討した。

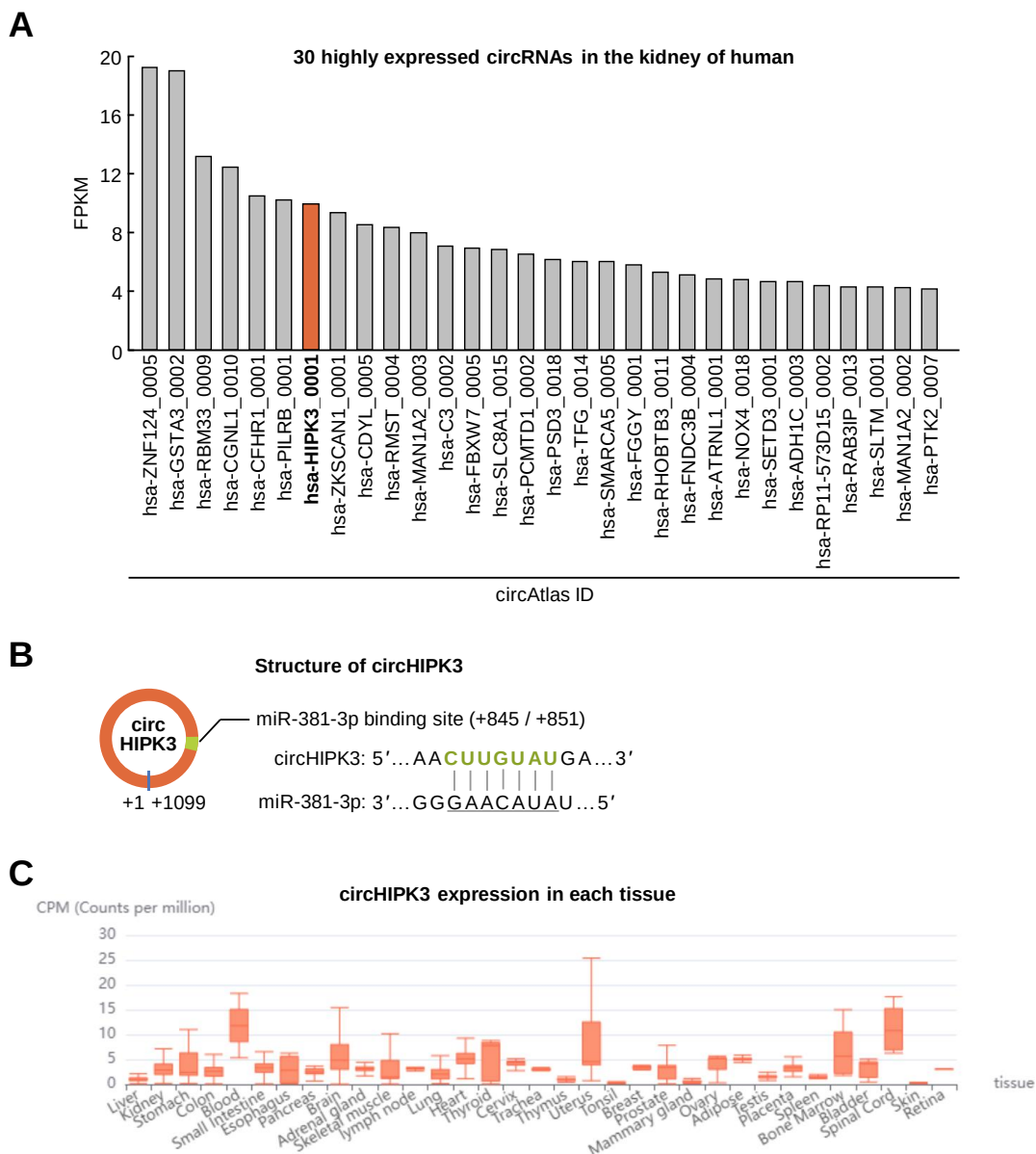


Figure 2-10. Expression profile of circRNA in the human kidney. (A) Thirty highly expressed circRNAs in the human kidney registered in circAtlas 2.0 database. FPKM, fragments per kilobase of exon per million mapped reads. (B) A schematic diagram showing the putative target site of miR-381-3p in circHIPK3. The interaction of miR-381-3p and the circRNAs was predicted using starBase v2.0. (C) Expression levels of circHIPK3 among human tissues. Data were obtained from circAtlas 3.0 database.

RPTECs における circHIPK3 発現の確認

RPTECs における circHIPK3 発現量を測定するために、circHIPK3 の back-splice junction (BSJ) を特異的に増幅する divergent primer (外向き primer) を設計し (Fig. 2-11A)、環状 RNA 検出のバリデーションを実施した。この divergent primer を使用した RT-PCR において、cDNA を鋳型にした場合に検出された PCR 産物が、ゲノム DNA を鋳型にすると検出されなかった (Fig. 2-11B left)。さらに、この PCR 産物のシーケンスを確認すると、BSJ 特異的な配列が確認されたことから (Fig. 2-11B right)、設計した divergent primer は circHIPK3 の BSJ を特異的に増幅することが示された。circRNA はその構造上の特性として、poly(A)配列を持たないことによる oligo(dT) primer での RT 効率の低下、直鎖状 RNA を分解するエキソヌクレアーゼである RNase R への抵抗性、およびエキソヌクレアーゼによる分解を受けないことによる高い安定性を示す。RPTECs において、random primer で RT した cDNA と比較して oligo(dT) primer で RT した cDNA では *HIPK3* mRNA の存在量が約 0.27 倍であったのに対して、circHIPK3 の存在量は約 0.01 倍と顕著に低下した (Fig. 2-11C)。このことから、divergent primer が poly(A)を持たない RNA 由来の cDNA を検出していることが示唆された。また、RPTECs から抽出した RNA を RNase R で処理すると、*HIPK3* および β -*ACTIN* mRNA の存在量が著しく低下したのに対し、circHIPK3 の存在量は約 0.84 倍しか変化せず、RNase R への抵抗性を示した (Fig. 2-11D)。さらに、circHIPK3 の高い安定性も確認されたことから (Fig. 2-11E)、divergent primer を用いて検出した circHIPK3 は、確かに環状構造を形成していることが確認された。この divergent primer を用いて circHIPK3 の発現量を測定したところ、Mock RPTECs と比べて *ADAR1*-KD RPTECs で有意に上昇した ($p < 0.05$, Fig. 2-11F left)。さらに、*HIPK3* mRNA の発現量が *ADAR1*-KD で変化しなかったことから (Fig. 2-11F right)、*ADAR1* が circHIPK3 の発現量を転写後レベルで制御していることが示唆された。

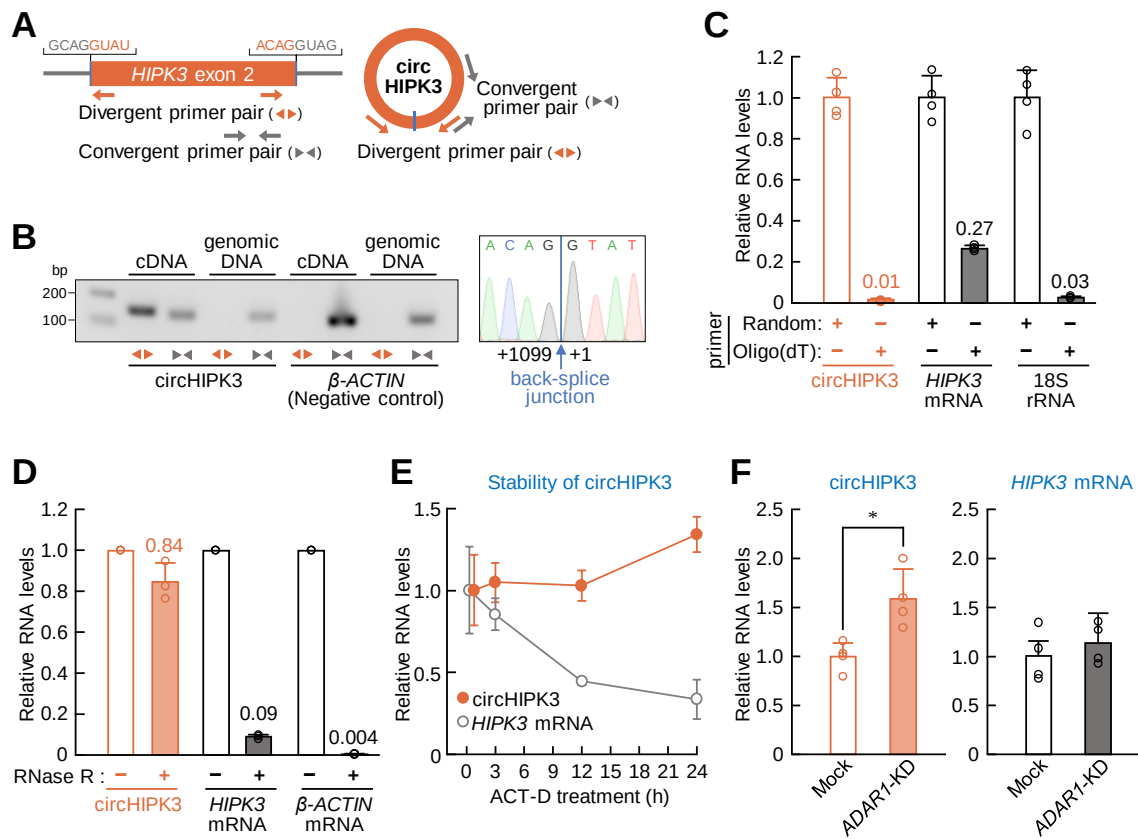


Figure 2-11. Validation of circHIPK3 expression in RPTECs. (A) A schematic diagram showing the design of the circHIPK3 divergent and convergent primers. (B) Validation of circHIPK3 detection by RT-PCR. Divergent primers amplified the circHIPK3 back-splice junction sequence in the cDNA but not the genomic DNA. Convergent primers amplified both mRNA in cDNA and genomic DNA. Sanger sequencing confirmed the back-splice junction sequence of the PCR products with the divergent primers (right panel). (C) The abundance of circHIPK3, *HIPK3* mRNA and 18S rRNA in cDNA reverse-transcribed with random primers or oligo(dT) primers. Values are the mean with S.D. (n = 4). The expression levels were normalized to those of β -ACTIN mRNA. (D) RT-qPCR analysis for the abundance of circHIPK3, *HIPK3* mRNA, and β -ACTIN mRNA in RNA treated with RNase R. The amounts of target RNAs were normalized to those in the mock treatment. Values are the mean with S.D. (n = 3). (E) The stability of circHIPK3 and *HIPK3* mRNA in RPTECs. Cells were treated with 5 μ M actinomycin D (ACT-D) and RNA was extracted at the indicated time points. The expression levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. (n = 4). (F) The expression levels of circHIPK3 and *HIPK3* mRNA in mock-transduced and ADAR1-KD RPTECs. The expression levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. (n = 4). *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups ($t_6 = 3.494$, $p = 0.013$ for circHIPK3; Student's t -test).

環状 RNA 発現に及ぼす *ADAR1* ノックダウンの影響

ADAR1 は RNA 編集依存的に circRNA の発現を制御することが報告されていることから [Ivanov et al., 2015; Rybak-Wolf et al., 2015], *ADAR1*-KD による発現上昇が circHIPK3 特異的であるか検討した。circAtlas 2.0 でヒト腎臓組織に高発現していることが示された 30 個の circRNA (**Fig. 2-10A**) に関して、circHIPK3 と同様に divergent primer を設計して mock および *ADAR1*-KD RPTECs で発現量を測定したところ、circHIPK3 を除いた 29 個の circRNA のうち、22 個の miRNA が RPTECs で測定可能だった。そのうち、circHIPK3 と同様に *ADAR1*-KD で発現上昇した circRNA は認められなかったが、hsa-CDYL_0005 と hsa-FBXW7_0005 の発現量が *ADAR1*-KD で有意に低下した ($p < 0.01$, **Fig. 2-12A**)。また、設計した divergent primer が circRNA を測定していることを確かめるために RNase R 処理した RNA における各 circRNA の存在量も測定したが、22 個の circRNA 全てで RNase R への抵抗性が認められ (**Fig. 2-12B**)、設計した divergent primer は確かに環状構造を検出していることが確認された。したがって、RPTECs に発現している circRNA のうち、circHIPK3 は *ADAR1*-KD RPTECs で特異的に発現上昇している circRNA であると考えられた。

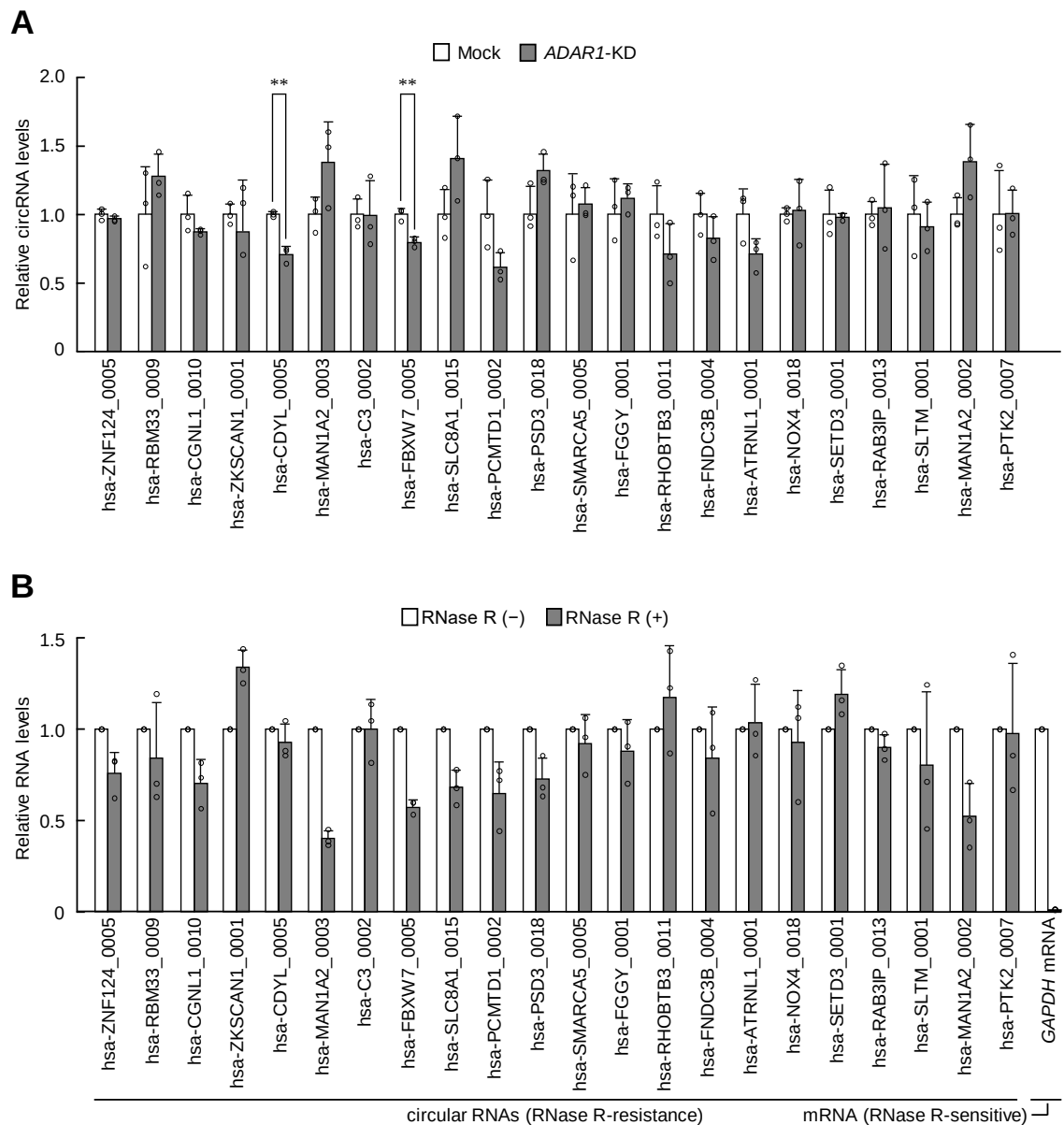


Figure 2-12. Effect of the *ADAR1*-knockdown on the levels of circRNAs expressed in RPTECs. (A) The expression levels of circRNAs listed in **Fig. 2-10A** in mock-transduced and *ADAR1*-KD RPTECs. The expression levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. ($n = 3$). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_4 = 8.067$, $p = 0.001$ for circCDYL; $t_4 = 6.503$, $p = 0.003$ for circFBXW7; Student's t -test). **(B)** RT-qPCR analysis for the abundance of circRNAs listed in **Fig. 2-10A** and *GAPDH* mRNA in RNA treated with RNase R. The amounts of target RNAs were normalized to those in the mock treatment.

MRP4 の発現に及ぼす circHIPK3 過剰発現の影響

MRP4 発現制御への circHIPK3 の関与を明らかにするために、circHIPK3 発現ベクターを作製した (**Fig. 2-13A**)。circHIPK3 に対応する遺伝子である *HIPK3* (homeodomain interacting protein kinase 3) の exon 2 と、隣接する intron 1 および intron 2 の配列を pcDNA3.1(+)に組み込んだ。この 2 つの intron にはレトロトランスポゾンの 1 つである *Alu* 配列が逆向きに含まれており (IRA*lu*, inverted repeat *Alu*)、この IRA*lu* による dsRNA 形成が circRNA 形成の back-splicing を促進すると想定された (**Fig. 2-13B**)。circHIPK3 発現ベクターをトランスフェクトした RPTECs では circHIPK3 の発現が有意に上昇したが ($p < 0.01$, **Fig. 2-13C left**)、*HIPK3* mRNA 発現量には影響を与えなかった (**Fig. 2-13C right**)。この circHIPK3 過剰発現 (circHIPK3-OX; OX, overexpression) RPTECs では、MRP4 発現量が有意に上昇したことから ($p < 0.05$, **Fig. 2-13D**)、circHIPK3 が MRP4 制御に関与することが明らかになった。一方、circHIPK3-OX で *ABCC4* mRNA 発現量には有意な差は認められなかった (**Fig. 2-13E**)。この結果は、miR-381-3p の *ABCC4* 3'UTR への作用は翻訳抑制が主であるというこれまでの結果と一致していると考えられた。

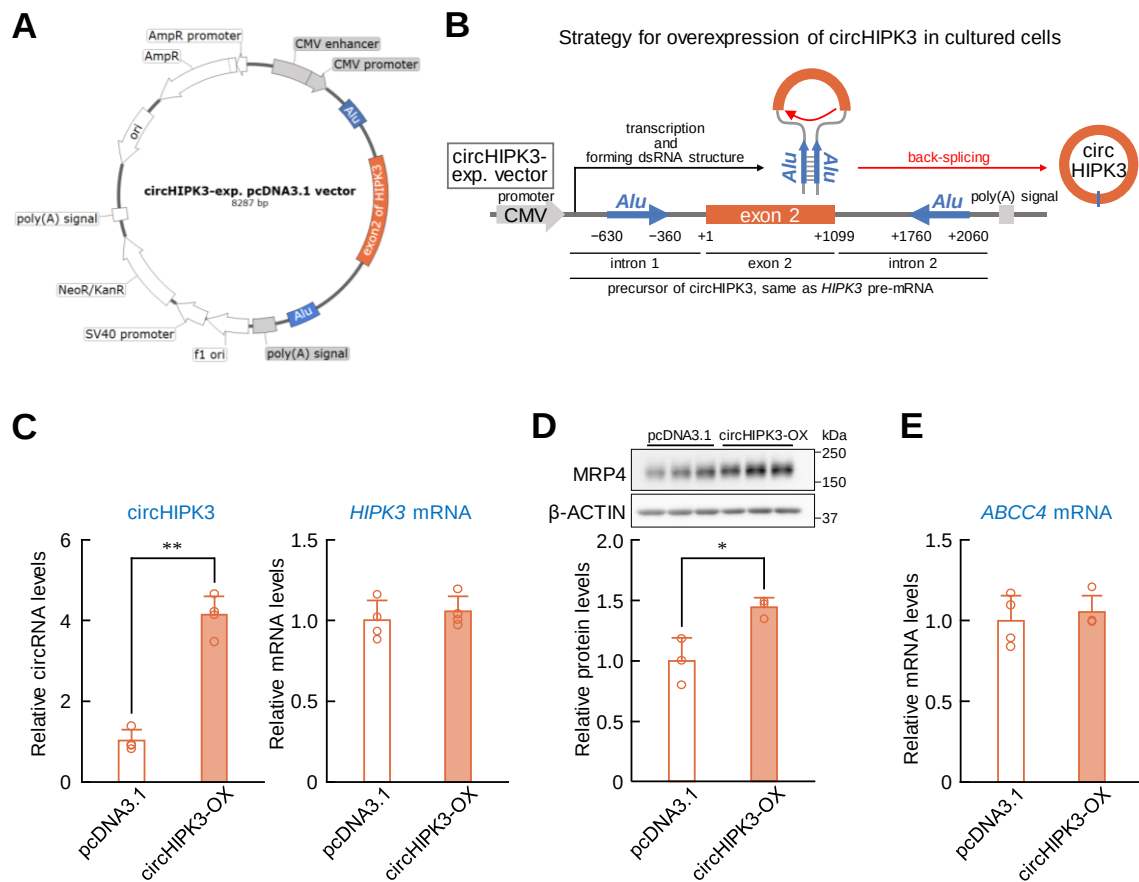


Figure 2-13. The overexpression of circHIPK3 induces MRP4 expression. (A) Structure of the circHIPK3 expression vector, which was constructed based on the pcDNA3.1(+) vector. (B) Schematic diagram of the overexpression of circHIPK3 derived from the circHIPK3 expression vector transfected into cultured cells. (C) The expression levels of circHIPK3 and *HIPK3* mRNA in RPTECs transfected with circHIPK3-expression vector or empty vector (pcDNA3.1). The expression levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. (n = 4). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_6 = 11.286$, $p < 0.001$ for circHIPK3; Student's t -test). (D) The protein levels of MRP4 in pcDNA3.1-transfected and circHIPK3-overexpressing (OX) RPTECs. The protein levels were normalized to those of β -ACTIN. Values are the mean with S.D. (n = 3). *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups ($t_4 = 3.697$, $p = 0.021$; Student's t -test). (E) The mRNA levels of *ABCC4* in pcDNA3.1-transfected and circHIPK3-OX RPTECs. The mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. (n = 4).

miR-381-3p の翻訳抑制機能に及ぼす circHIPK3 過剰発現の影響

次に、circHIPK3 過剰発現での MRP4 発現上昇が miR-381-3p を介しているか検討した。miR-381-3p target::Luc ベクターを circHIPK3 発現ベクターと共トランスフェクトすると、circHIPK3-OX RPTECs ではルシフェラーゼ活性の有意な上昇が認められた ($p < 0.01$, **Fig. 2-14A**)。この結果から、circHIPK3 が miR-381-3p の活性を低下させることが示唆された。また、circHIPK3-OX RPTECs では miR-381-3p の発現量が有意に低下した ($p < 0.05$, **Fig. 2-14B**)。一般に、circRNA の miRNA 機能抑制の機序について、circRNA に捕捉された miRNA がどのように処理されるかは未だ明らかにされていない。一方で circHIPK3-OX RPTECs では miR-381-3p の安定性が低下したことから ($p < 0.01$, **Fig. 2-14C**)、circHIPK3 が miR-381-3p を不安定化することでその発現量を低下させることが示唆された。

circHIPK3/miR-381-3p/*ABCC4* 3'UTR の経路を検証するために、*ABCC4* 3'UTR +1741::Luc を用いたルシフェラーゼアッセイを実施した。野生型 *ABCC4* 3'UTR +1741::Luc のルシフェラーゼ活性は circHIPK3-OX で有意に上昇した ($p < 0.01$, **Fig. 2-14D**)。さらに、pcDNA3.1 をトランスフェクトした RPTECs では 3'UTR の miR-381-3p 結合配列の変異導入でルシフェラーゼ活性が有意に上昇したが ($p < 0.01$, **Fig. 2-14D**)、circHIPK3-OX RPTECs ではその活性上昇は認められなかった (**Fig. 2-14D**)。これらの結果から、circHIPK3 が miR-381-3p に対するスポンジとして機能して、miR-381-3p の *ABCC4* 3'UTR への作用を抑制していることが示唆された。

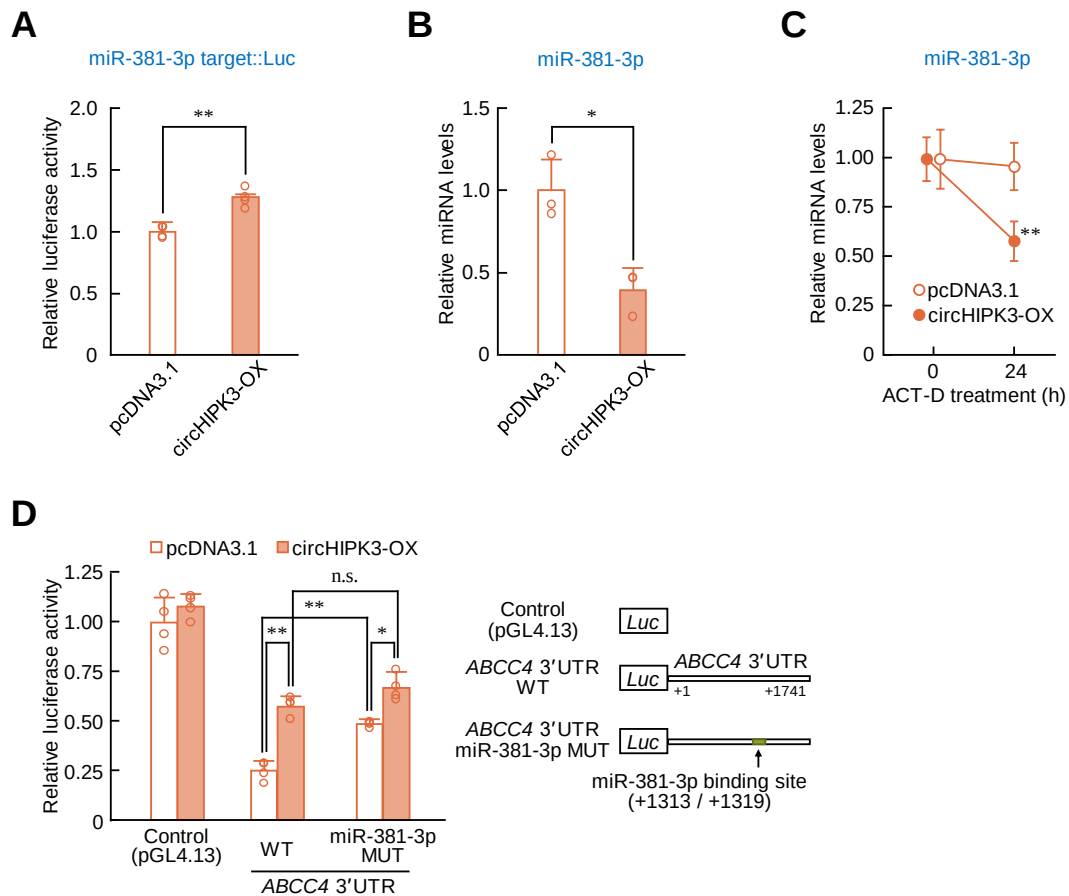


Figure 2-14. miR-381-3p mediates the circHIPK3-induced MRP4 expression. (A) The luciferase activity in pcDNA3.1-transfected and circHIPK3-OX RPTECs transfected with miR-381-3p target::Luc vector. Values are the mean with S.D. (n = 4). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_6 = 6.122$, $p < 0.001$; Student's t -test). **(B)** The expression levels of miR-381-3p in pcDNA3.1-transfected and circHIPK3-OX RPTECs. The expression levels were normalized to those of miR-191-5p. Values are the mean with S.D. (n = 3). *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups ($t_4 = 4.473$, $p = 0.011$; Student's t -test). **(C)** The stability of miR-381-3p in pcDNA3.1-transfected and circHIPK3-OX RPTECs. The expression levels were normalized to those of miR-191-5p. Values are the mean with S.D. (n = 4). **, $p < 0.01$; significant difference between the indicated groups ($F_{3,12} = 11.433$, $p < 0.001$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test). **(D)** The luciferase activity derived from *ABCC4* 3'UTR WT::Luc and miR-381-3p MUT::Luc in pcDNA3.1-transfected and circHIPK3-OX RPTECs. Schematic diagrams of luciferase reporter constructs containing the 3'UTR of *ABCC4* gene are shown in the right panel. The numbers in the right panel indicate the distance in nt from the nucleotide immediately after the stop codon. Values are the mean with S.D. (n = 4). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the indicated groups ($F_{5,18} = 83.630$, $p < 0.001$; ANOVA with Tukey–Kramer post hoc test). n.s., not significant.

MRP4 および circHIPK3 発現の概日変動に関する検討

第 1 章において、Dexamethasone (DEX) の短時間曝露によって概日時計機構を再構築した RPTECs では、ADAR1 の発現と機能に概日リズムが認められることを明らかにした (Fig. 1-5C, D)。ADAR1 発現の時刻依存性はカニクイザル腎臓組織にも認められたが、MRP4 タンパク質の発現に時刻依存性は認められなかった (Fig. 1-4B)。RPTECs において ADAR1 が MRP4 の発現制御に関与していることから、概日時計機構を再構築した RPTECs において MRP4 の発現に概日リズムが認められるか検討した。その結果、DEX を 2 時間曝露して概日時計機構を再構築した RPTECs において、MRP4 の発現に有意な変動は認められなかった (Fig. 2-15A)。さらに、circHIPK3 の発現にも有意な変動が認められなかった (Fig. 2-15B)。これらのことから、ADAR1 と MRP4 を介在する因子である circHIPK3 に発現リズムが存在しないことが、MRP4 に発現リズムが生じない原因の 1 つであると考えられた。

一方で、circHIPK3 に対応する mRNA である *HIPK3* mRNA の発現には有意な概日変動が認められ ($p < 0.05$, Fig. 2-15C)、circHIPK3 の生成過程には概日変動が存在することが示唆された。circHIPK3 は安定性が高いために (Fig. 2-11E)、生成過程での概日リズムが存在量には反映されなかったと考えられた。

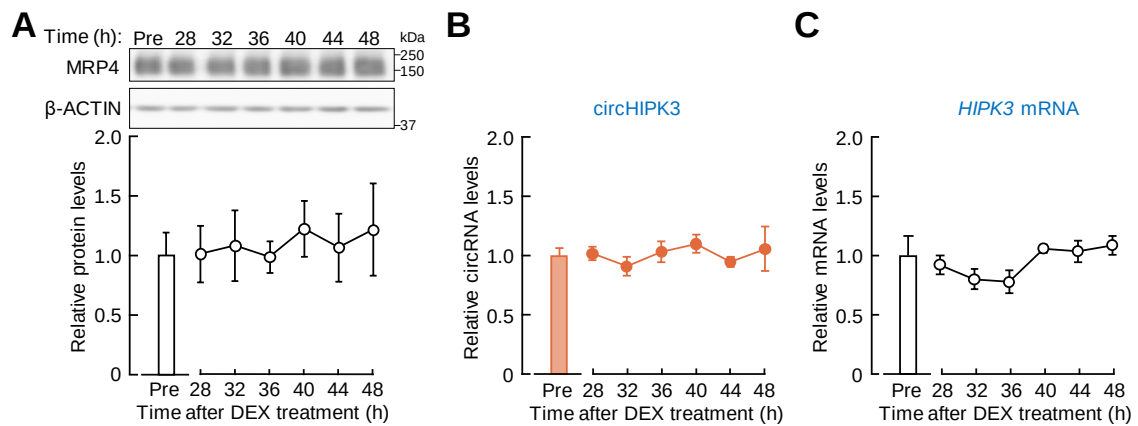


Figure 2-15. The expression of MRP4 and circHIPK3 does not show time-dependent oscillation in RPTECs. (A–C) Temporal expression profiles of MRP4 protein (A), circHIPK3 (B) and *HIPK3* mRNA (C) in RPTECs after treatment with 100 nM DEX for 2 h. The protein levels were normalized to those of β -ACTIN, and circRNA and mRNA levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. ($n = 3, 4$). There was a significant time-dependent variation in *HIPK3* mRNA expression ($F_{6,14} = 3.264$, $p = 0.032$; ANOVA).

RNA 編集活性および dsRNA 結合活性を介した ADAR1 による MRP4 の発現制御

ADAR1 は A-to-I RNA 編集活性だけでなく、dsRNA への結合によっても遺伝子発現を制御することが知られている [Chen et al., 2015; Sakurai et al., 2017]。そこで、第 1 章と同様に、RNA 編集活性あるいは dsRNA 結合活性を欠失させた変異体 ADAR1 発現ベクターを作製した。ADAR1 アミノ酸配列において、活性部位である deaminase ドメインと、3 か所存在する dsRNA 結合ドメイン (dsRBD) の両方が RNA 編集に必要である (**Fig. 1-12A**)。RNA 編集活性欠損変異体 ADAR1 (E617A-mutated ADAR1) は、617 番目のグルタミン酸をアラニンに変換することで作製した [Lai et al., 1995]。2 本鎖 RNA 結合活性欠損変異体 ADAR1 (EAA-mutated ADAR1) は、3 か所の dsRBD に存在する KKxxK モチーフをそれぞれ EAxxA モチーフに変換することで作製した [Valente and Nishikura, 2007]。EAA 変異は dsRNA へ結合できないため、編集活性も欠失する。

野生型の ADAR1 を過剰発現した RPTECs では、MRP4 タンパク質の発現に有意な低下が観察された ($p < 0.01$, **Fig. 2-16A**)。一方、E617A もしくは EAA 変異体 ADAR1 を過剰発現した場合は MRP4 の発現に有意な差は認められなかった (**Fig. 2-16A**)。さらに、E617A もしくは EAA 変異体 ADAR1 を過剰発現した場合は、circHIPK3 および miR-381-3p の発現量は、野生型 ADAR1 を過剰発現した場合とは同様の挙動を示さなかった (**Fig. 2-16B, C**)。これらの結果から、ADAR1 による circHIPK3/miR-381-3p 経路を介した MRP4 発現制御には、ADAR1 の編集活性と dsRNA 結合活性の両方が必要であることが示唆された。

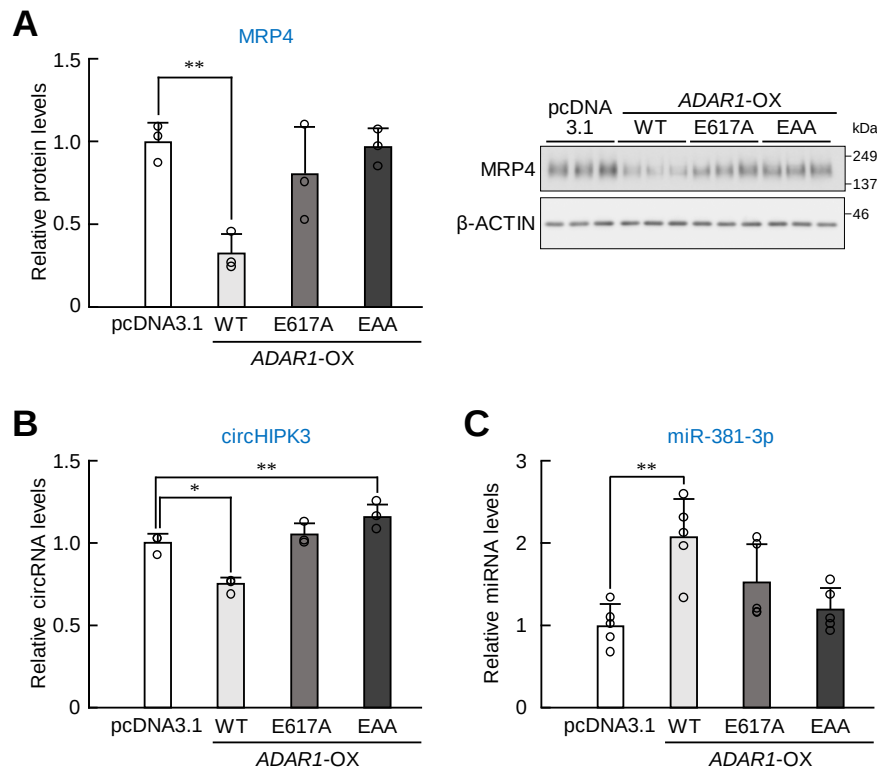


Figure 2-16. ADAR1 regulates the expression of MRP4 with its editing and dsRNA binding ability. **(A)** The protein levels of MRP4 in pcDNA3.1-transfected and ADAR1 (WT, E617A, EAA)-OX RPTECs. The protein levels were normalized to those of β -ACTIN. Values are the mean with S.D. ($n = 3$). **, $p < 0.01$; significant difference between the indicated groups ($F_{3,8} = 9.456$, $p = 0.005$; ANOVA with Dunnett's post hoc test). **(B)** The expression levels of circHIPK3 in pcDNA3.1-transfected and ADAR1 (WT, E617A, EAA)-OX RPTECs. The expression levels were normalized to those of 18S rRNA. Values are the mean with S.D. ($n = 3$). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; significant difference between the indicated groups ($F_{3,8} = 25.460$, $p < 0.001$; ANOVA with Dunnett's post hoc test). **(C)** The expression levels of miR-381-3p in pcDNA3.1-transfected and ADAR1 (WT, E617A, EAA)-OX RPTECs. The expression levels were normalized to those of miR-191-5p. Values are the mean with S.D. ($n = 5$). **, $p < 0.01$; significant difference between the indicated groups ($F_{3,16} = 7.647$, $p = 0.002$; ANOVA with Dunnett's post hoc test).

ADAR1 による circHIPK3 発現制御の *in silico* 解析

一般に、多くの circRNA は back-splicing と呼ばれる選択的スプライシングによって生成される。Back-splicing では、下流の 5' splice site (5'ss) と上流の 3'ss が結合するが [Zhang et al., 2014]、その *cis*-regulatory element として、環状化される exon に隣接する intron 同士で形成される dsRNA 構造が知られている。この dsRNA は 5'ss と 3'ss を近接させることで、back-splicing を誘導すると考えられている [Chen, 2016]。したがって、circHIPK3 の parental gene である *HIPK3* の exon 2 に隣接する intron に存在する *IRAlu* も *cis*-regulatory element として機能すると予想された (**Fig. 2-17A**)。実際に RNAfold を用いて 2 次構造解析を実施すると、intron 同士が強固な dsRNA 構造をとることが明らかになった (**Fig. 2-17B left**)。この約 270 bp の dsRNA 構造は ADAR1 が編集するには十分な長さであることから、この dsRNA 構造上の RNA 編集部位の探索を試みた。

まず、RNA 編集のデータベースである REDportal [Picardi et al., 2017] を用いて、この領域での RNA 編集サイトを検索したところ、89 か所の RNA 編集部位が登録されていた (**Fig. 2-17C**)。これら編集部位に関して、dsRNA 構造の安定性に与える影響を検討した。RNA 編集前後の配列で 2 次構造解析を実施したところ、dsRNA 構造の 2 か所の領域で RNA 編集による dsRNA 構造の不安定化が認められた (**Fig. 2-17B right**)。これらの *in silico* 解析の結果から、circHIPK3 前駆体の dsRNA は ADAR1 による RNA 編集の標的になり、生じた RNA 編集は dsRNA 構造を不安定化して circHIPK3 の生成を抑制することが示唆された。

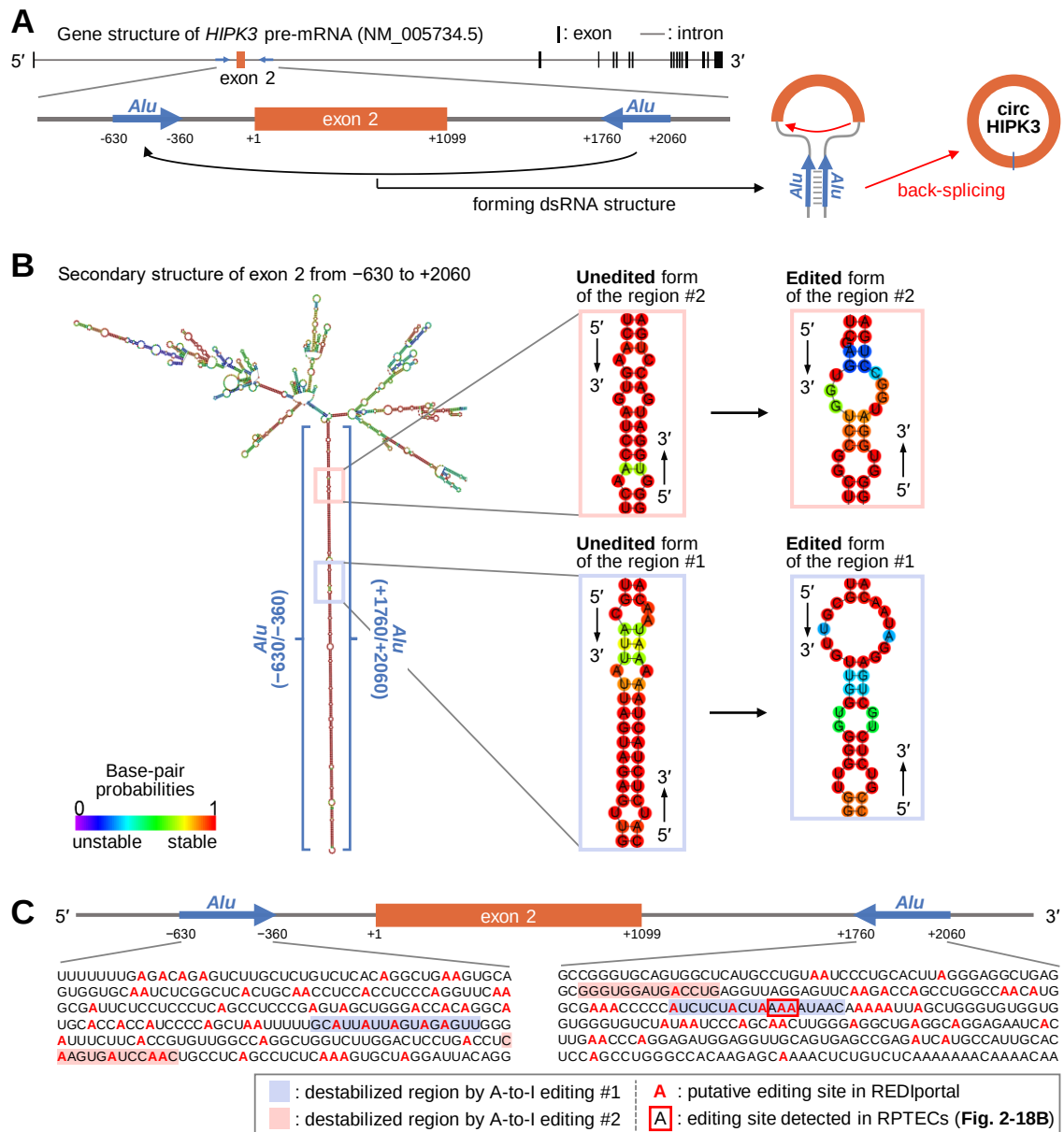


Figure 2-17. Precursor of circHIPK3 has the dsRNA structure targeted by ADAR1. (A) Schematic diagram of the genomic region of human *HIPK3* exon 2 and its flanking introns with inverted *Alu* elements. circHIPK3 is formed by back-splicing, in which a 5' splice site in the downstream region of exon 2 joins to the 3' splice site in the upstream region of exon 2. (B) *In silico* prediction of RNA secondary structure of the putative destabilized regions in precursor of circHIPK3. The middle panel shows the unedited form and the right panel shows the edited form of the putative destabilized regions. The minimum free energy structure with base-pair probabilities was calculated to have the lowest value of free energy. Base-pair probabilities are shown by a color spectrum. (C) Schematic diagram of the genomic region of human *HIPK3* exon 2 and its flanking introns with inverted *Alu* elements and detailed sequence of the inverted *Alu* elements. Sequences colored blue or red indicate the putative destabilized regions by A-to-I RNA editing. "A" colored red indicates A-to-I RNA editing sites registered in REDportal. "A" enclosed in a red square indicates the editing sites detected in RPT ECs with direct sequencing (Fig. 2-18B).

ADAR1 による circHIPK3 発現制御の *in vitro* 解析

最後に、ADAR1 が circHIPK3 発現に与える影響を *in vitro* で解析した。まず、circHIPK3 前駆体の dsRNA 構造に ADAR1 が結合するか、RNA 免疫沈降法で検証した。内在性の circHIPK3 前駆体は、その存在量の少なさから RT-PCR での検出が困難であったため、レンチウイルスベクターを用いて circHIPK3 前駆体を導入して、ADAR1 との結合を検討した。その結果、コントロール IgG 抗体で免疫沈降した場合と比べて、ADAR1 抗体で免疫沈降した場合の circHIPK3 前駆体存在量は有意に高値を示し ($p < 0.01$, **Fig. 2-18A**)、ADAR1 が circHIPK3 前駆体に結合していることが示唆された。同様にレンチウイルスベクターを用いて circHIPK3 前駆体を導入した RPTECs において、circHIPK3 前駆体の RNA 編集箇所をダイレクトシーケンスで確認したところ、3 か所のアデノシンがイノシン (サンガー法ではグアノシンとして検出) に変換されていた (**Fig. 2-18B**)。この A-to-I (G) 塩基の変換は、ADAR1-OX RPTECs ではその割合が増加し、ADAR1-KD では低下していたことから (**Fig. 2-18B**)、ADAR1 による RNA 編集であると考えられた。この検出された RNA 編集箇所について、編集後の配列で 2 次構造解析を実施したところ、編集前の配列と比較して dsRNA 構造が乖離することが示唆された (**Fig. 2-18C**)。そこで、これらの RNA 編集が circHIPK3 の生成に与える影響を評価した。circHIPK3-OX で使用した circHIPK3 発現プラスミドベクターの RNA 編集箇所に編集型の変異を導入した、編集型 circHIPK3 発現ベクターを作製して、circHIPK3 発現効率を検討した。その結果、編集型の変異を導入することで、circHIPK3 生成効率は有意に低下した ($p < 0.05$, **Fig. 2-18D**)。この結果と一致して、ADAR1-KD RPTECs では Mock RPTECs と比べて circHIPK3 生成効率は有意に高値を示した ($p < 0.05$, **Fig. 2-18E**)。これらの結果から、ADAR1 による RNA 編集が circHIPK3 生成を抑制することが明らかになった。

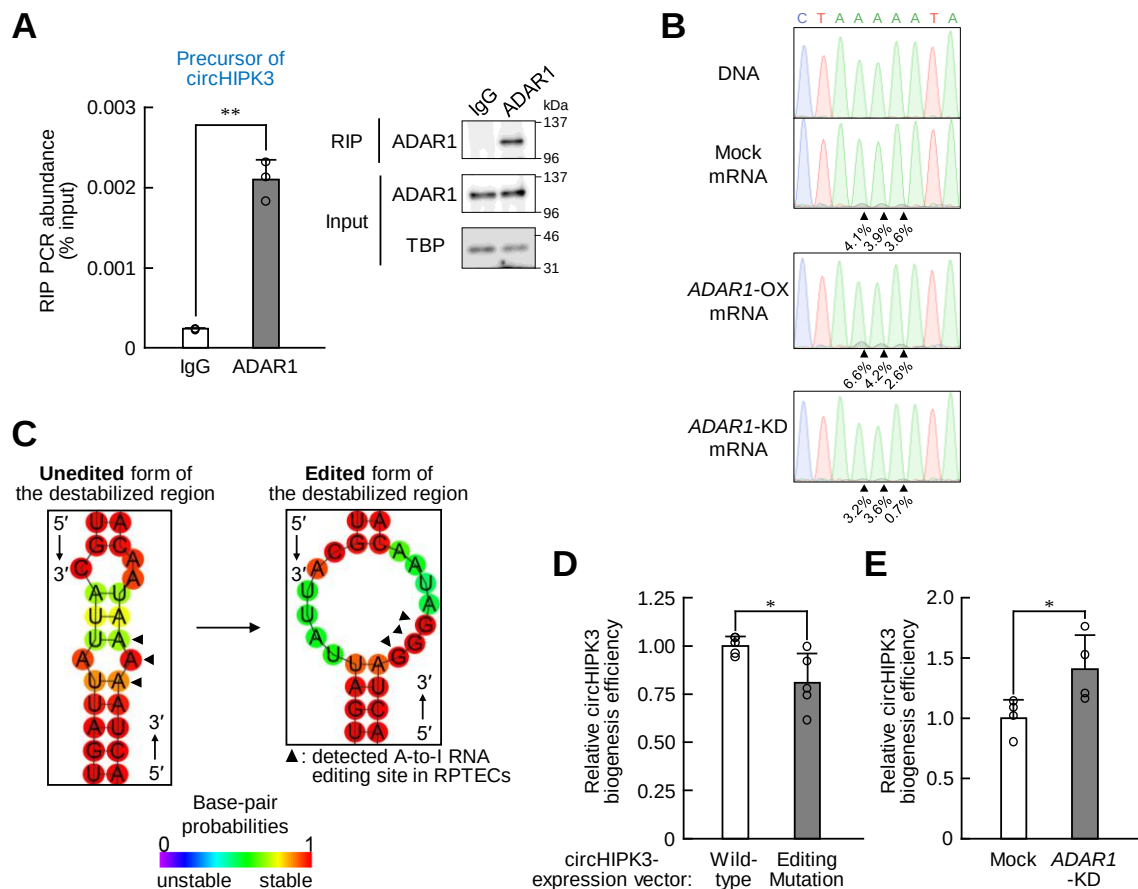


Figure 2-18. ADAR1 suppresses circHIPK3 formation by inhibiting base-pairing in its precursor RNA. (A) ADAR1 binds to the precursor of circHIPK3. RPTECs were infected with lentiviral particles expressing the precursor of circHIPK3 and RNA immunoprecipitation (RIP) was conducted. Right panel shows western blotting analysis of ADAR1-RIP immunoprecipitates. Left panel shows RT-qPCR analysis of ADAR1-RIP immunoprecipitates. Values are the mean with S.D. (n = 3). **, $p < 0.01$; significant difference between the two groups ($t_4 = 13.102$, $p < 0.001$; Student's t -test). (B) Electropherograms from direct sequencing of the PCR-amplified product of the precursor of circHIPK3 derived from lentivirus. The sequence data were obtained from mock-transduced, ADAR1-OX and ADAR1-KD RPTECs. Triangles indicate the ADAR1-mediated A-to-I RNA editing sites detected in RPTECs. Percentage represents the editing frequency calculated by the peak height of "G" peak over sum of "A" and "G" peak heights. Electropherograms were visualized using SnapGene Viewer. (C) *In silico* prediction of RNA secondary structure around the editing sites in precursor of circHIPK3. Left and right panels show unedited and edited form, respectively. The minimum free energy structure with base-pair probabilities was calculated to have the lowest value of free energy. Base-pair probabilities are shown by a color spectrum. (D and E) The biogenesis efficiency of circHIPK3 derived from circHIPK3-expression vector with and without the mutation in *Alu* elements (D), and wild-type circHIPK3-expression vector in mock-transduced and ADAR1-KD RPTECs (E). The efficiency was calculated as the ratio of the expression levels of circHIPK3 to that of precursor of circHIPK3, which were assessed by RT-qPCR analysis. Values are the mean with S.D. (n = 4, 5). *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups ($t_8 = 2.682$, $p = 0.028$ for (D); $t_6 = 2.510$, $p = 0.046$ for (E); Student's t -test).

【考 察】

MRP4 は ABC トランスポーターの 1 つであり、様々な組織やがん細胞で発現が認められている。MRP4 は、様々な化合物を基質として認識して細胞内から細胞外液へ排泄する。MRP4 の発現は、転写制御、転写後制御、翻訳制御などの多くの過程を経て、組織依存的に制御されている [Moffit et al., 2006; Xu et al., 2010; Wen et al., 2015]。本研究では、ヒト腎臓細胞における MRP4 の発現が、RNA 編集酵素 ADAR1 によって制御されていることを明らかにした [Omata et al., 2022]。ADAR1 が触媒する A-to-I RNA 編集は環状 RNA である circHIPK3 の生成を低下させて、結果として miRNA である miR-381-3p の発現を増加させて、ABCC4 mRNA から MRP4 タンパク質への翻訳を抑制した (Fig. 2-19)。

最近の研究では、いくつかの ABC トランスポーターで miRNA を介した翻訳制御を受けていることが指摘されている [Haenisch et al., 2014]。例えば、ABCC4 は肝がん細胞において miR-125a および miR-125b によって制御されることが報告されている [Borel et al., 2012]。本研究で RPTECs においても miR-125a および miR-125b の発現が検出されたが、これらの発現量は ADAR1 のノックダウンによる影響を受けなかった。また、HEK293T/17 細胞におい

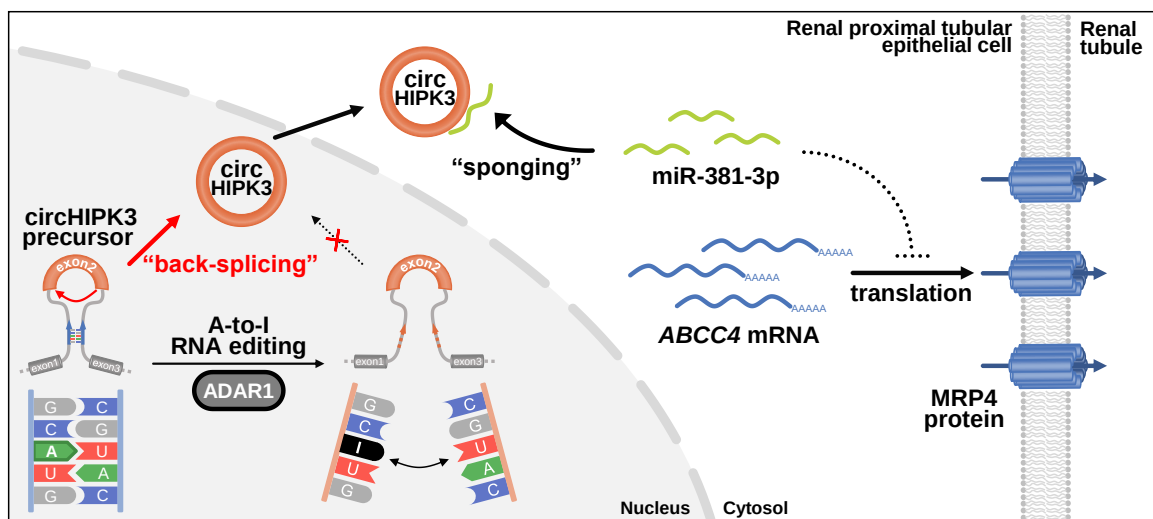


Figure 2-19. Schematic diagram of the ADAR1-mediated regulation of MRP4 expression in human renal cells. ADAR1 edits and destabilizes the dsRNA structure in the precursor of circHIPK3, thereby preventing circHIPK3 biogenesis. circHIPK3 binds to miR-381-3p and reduces its expression levels, promoting the translation from ABCC4 mRNA to MRP4 protein. Thus, ADAR1-induced prevention of circHIPK3 biogenesis leads to the reduction of MRP4 expression via miR-381-3p.

て miR-506 および miR-124a が MRP4 タンパク質レベルを低下させること、ヒト腎臓組織における miR-506 および miR-124a の発現量と MRP4 発現量には負の相関があることが報告されている [Markova and Kroetz, 2014]。miR-506 の標的部位は *ABCC4* mRNA の 3'UTR に位置していたが、RPTECs ではこの miRNA の発現は認められなかった。また、今回の検討では miR-124a の標的部位は *ABCC4* mRNA の 3'UTR 上には検出されなかった。本研究では、TargetScanHuman を用いた *in silico* 解析と分子生物学実験を組み合わせることで、MRP4 の新規発現制御因子として miR-381-3p を同定した。miR-381-3p は、がん細胞の増殖制御 [Yang et al., 2017]、炎症反応 [Jiang et al., 2020]、薬剤耐性 [Yi et al., 2019] に関わっていることが報告されている。*ABCC4* mRNA に対する作用と同様に、miR-381-3p は *ABCB1* mRNA の 3'UTR を標的とし、乳がん細胞におけるシスプラチン感受性を促進することも示されている [Yi et al., 2019]。このことは、miR-381-3p が他の薬物排泄トランスポーターの転写後制御に関与していることを示唆しているが、他の臓器や病態での MRP4 の制御に対する miR-381-3p の影響については、さらなる研究が必要である。

近年、免疫系 [Li et al., 2017]、細胞増殖 [Zhenget al., 2016]、神経機能 [You et al., 2015] の制御において、circRNA が重要な役割を果たしていることが実証されてきている。circRNA は、遺伝子発現の制御において幅広い機能を有している。これまで最も解明されている機能として、circRNA は competing endogenous RNA (ceRNA) として機能して、miRNA を吸着することで標的となる mRNA との結合を阻害する機能を有すると認識されている [Salmena et al., 2011]。circHIPK3 は ceRNA として機能する代表的な circRNA の 1 つである。例えば、circHIPK3 は miR-124 の機能を阻害することにより、細胞増殖を促進することが報告されている [Zhenget al., 2016]。また、circHIPK3 を介した miR-338-3p の機能制御は、インスリン分泌の変化を引き起こす [Stoll et al., 2018]。また、ヒト肝がん細胞では、circHIPK3 が miR-124-3p と miR-4524 の機能抑制を介して MRP4 の発現を調節していることが示唆されている [Hu et al., 2021]。本研究では、ヒト腎細胞において、circHIPK3 が miR-381-3p の機能抑制を

介して MRP4 の発現を制御することが明らかになったが、既報との機能的な違いは、組織や細胞ごとに miRNA の発現プロファイルに差があるためと考えられた [Landgraf et al., 2007]。実際、RPTECs では miR-124-3p と miR-4524 の発現は検出されず、miRNA の発現に関する包括的データベースである human miRNA tissue atlas によると、腎臓での miR-381-3p の発現レベルは肝臓の約 2.6 倍であった [Ludwig et al., 2016]。このように、circRNA の標的や機能は、各組織や細胞種における miRNA の発現量に依存すると考えられた。

circRNA は miRNA を捕捉し、標的 mRNA との結合を阻害するが、捕捉した miRNA の発現量をどのような機構で低下させるかは未解明である [Zheng et al., 2021; Li et al., 2022]。本研究では、RPTECs において circHIPK3 の発現が増加すると、miR-381-3p が不安定化し、その発現レベルが低下することを示した。細胞内、細胞外液中ともに、ほとんどの miRNA は安定であると考えられている。miRNA の分解、特に circRNA に吸着された miRNA の分解の機構については未解明な点が多く残されている [Kim and Pak, 2020]。circRNA を介した miRNA の安定性とその分解の制御を明らかにするため、さらなる研究が必要である。

A-to-I RNA 編集は、哺乳類において最も一般的なヌクレオチド変換である [Nishikura, 2010]。ADAR1 は、mRNA のタンパク質コード領域だけでなく、*Alu* 配列を含むことの多い非コード領域においても 2 本鎖 RNA の A-to-I RNA 編集を触媒している。そのため、ADAR1 は miRNA 産生の調節因子として機能していると考えられてきた [Kawahara et al., 2007a, 2007b]。近年、circRNA が miRNA に対する ceRNA として機能することが示され、遺伝子制御における新規因子であることが認識されてきている [Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013]。circRNA の生成は、*cis*-regulatory element と *trans*-acting factor よって制御されており、環状化される exon に隣接する intron 同士で形成される dsRNA 構造は、最も有効な *cis*-regulatory element である。ADAR1 は、この dsRNA 構造を変容させることで *trans*-acting factor として働き、結果的に circRNA の生成が抑制される。RNA 編集酵素は、約 50 bp より長い dsRNA 中のアデノシンをイノシンに変換するが [Nishikura et al., 1991; Eggington et al.,

2011]、このような dsRNA 構造は circRNA 生成の *cis*-regulatory element において頻繁に観察される [Dong et al., 2017]。したがって、ADAR1 は circRNA の発現に幅広い影響を及ぼすと考えられる。しかしながら、circRNA の形成における ADAR1 の役割についての理解は限定的であり、ADAR1 を介した circRNA の発現制御に関する報告も僅かである [Shi et al., 2017; Ma et al., 2020; Shen et al., 2021]。本研究では、ADAR1 が circHIPK3 産生の制御に関与していることを *in silico*、*in vitro* の 2 つのアプローチで明らかにし、今後の circRNA 生成制御機構の検討にも、今回用いた手法は有効だと考えられる。

イノシンはグアノシンの類似体であり、シチジンと塩基対を形成する。そのため、スプライシングや翻訳などの過程では、イノシンはグアノシンとして認識される [Nishikura, 2010]。これらの特徴を利用して、A-to-I RNA 編集は通常サンガー法で検出できる。サンガー法では、編集されたアデノシンはグアノシンとして読み取られる。本研究においても、サンガー法を用いて、circHIPK3 の前駆体における A-to-I RNA 編集の検出と定量を行った (**Fig. 2-18B**)。ADAR1-OX および ADAR1-KD RPTECs では、3 つのアデノシンの編集レベルがそれぞれ増加および減少したため、ADAR1 による編集が生じていると考えられた。3 つのアデノシンの編集レベルは 10%以下と比較的低値であったが、これは実験上の制限によるものであると考えられた。内因性の circHIPK3 前駆体は PCR でも検出が困難であったため、細胞に circHIPK3 前駆体発現レンチウイルスベクターを導入して、その RNA をサンガー法で解析した。外来性の circHIPK3 前駆体は、ADAR1 の基質として過剰に発現するため、RNA 編集量が過小評価されている可能性がある。さらに、ADAR1 は RNA 編集酵素としてだけでなく、2 本鎖 RNA 結合タンパク質としても機能することが報告されている [Chen et al., 2015; Sakurai et al., 2017]。RPTECs への野生型 ADAR1 の導入は、circHIPK3 発現量の低下および miR-381-3p のレベルを上昇させ、MRP4 タンパク質の発現を抑制した。しかし、ADAR1 の MRP4、circHIPK3、miR-381-3p の発現調節効果は、deaminase ドメインの変異だけでなく、dsRNA 結合ドメインの変異でも消失した (**Fig. 2-16A-C**)。ADAR1 の多面的な機能を考慮す

ると、2 本鎖 RNA への結合活性も circHIPK3 生成の阻害に関与している可能性がある。circHIPK3 形成の制御における ADAR1 の詳細な役割を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

MRP4 は cAMP や cGMP、ADP、尿酸、葉酸、ロイコトリエン類、プロスタグランジン類など、多くの内因性物質や生理活性物質を輸送することが知られている。さらに、MRP4 はメトトレキサートやシタラビン、メルカプトプリンなどの抗がん剤、セファゾリンやセフメタゾールなどの抗生物質、エナラプリルやオルメサルタンなどの降圧薬など、多くの薬物の輸送にも関与することが *in vitro* 試験やノックアウトマウスを用いた *in vivo* 試験などで明らかにされている [Wen et al., 2015]。このように、MRP4 は生理学・薬物治療学の両面で重要なトランスポーターであるが、その発現には個人差が存在することが知られている [Gradhand et al., 2007]。本研究では、RNA 編集酵素 ADAR1 がヒト腎細胞での MRP4 発現制御に関与していることを明らかにしたが、ADAR1 タンパク質の発現には約 220 倍の個人差が存在することが報告されている [Nakano et al., 2016]。本研究で明らかにした circHIPK3/miR-381-3p 経路を介して、ADAR1 が MRP4 発現の個人差、さらには MRP4 基質薬物の体内動態の個人差の要因となっている可能性が考えられた。また、環状 RNA は細胞から分泌されるエクソソームに内包され血中에서도安定して存在することが知られており [Chen et al., 2016]、将来的には血中の環状 RNA を MRP4 発現の指標となるバイオマーカーとして活用し、薬物治療の最適化に貢献することも期待される。

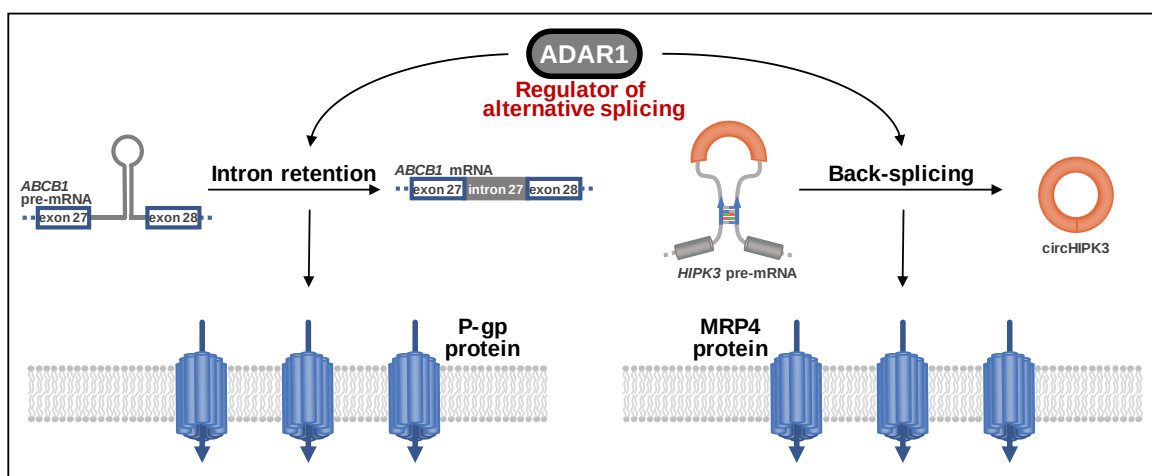
本章における検討で、ヒト腎臓細胞における ADAR1 が circHIPK3/miR-381-3p 経路を介して MRP4 の発現を制御していることが明らかになった (**Fig. 2-19**)。ADAR1 は circHIPK3 前駆体の 2 本鎖 RNA 構造を編集して不安定化し、circHIPK3 形成を阻害する。一方、circHIPK3 は miR-381-3p に対する ceRNA として機能して、miR-381-3p による *ABCC4* mRNA から MRP4 タンパク質への翻訳抑制を阻害している。すなわち、ADAR1 による circHIPK3 の生成の阻害は、miR-381-3p による MRP4 タンパク質の発現抑制を可能にしている可能性がある。

MRP4 の発現過程には、いくつかの制御因子が関与していることが知られているが、本研究では、miR-381-3p がヒト腎細胞において MRP4 発現の新規制御因子として働くことを明らかにした。MRP4 以外にも、薬物排泄に関与する ABC トランスポーターは複数存在する。今後、薬物排泄トランスポーターの機能と発現の制御機構を体系化し、薬物の排泄を予測する戦略を立てる必要があると考える。

【総 括】

薬物の体内動態において、腎臓は薬物の「排泄」を主に担う重要な臓器である。多くの薬物は未変化体のまま、あるいは肝臓などでの代謝を受けた代謝物として、尿中に排泄される。近位尿細管は薬物腎排泄のうち「尿細管分泌」を担い、能動的に薬物を尿中に輸送しているが、それには多くの薬物排泄トランスポーターが関与している。これらトランスポーターの発現制御を把握して薬物の体内動態を理解することは、新薬開発や薬物治療の最適化の観点からも重要である。そのため、従来から薬物輸送トランスポーターの発現制御に関する研究は盛んに行われてきたが、それらは転写・翻訳といった「セントラルドグマ」の観点での検討が主体であり、近年明らかになってきた「転写後制御」からの観点での検討は不十分な状況であった。本学位論文では、代表的な RNA 編集酵素である ADAR1 に着目することで、ヒト RPTECs での薬物トランスポーターP 糖タンパク質 (P-gp) および MRP4 の新規発現制御機構の解明を試みた。その結果、ADAR1 は RNA 編集依存的あるいは非依存的に選択的スプライシングを制御することで、これら 2 つのトランスポーターの発現制御に関与していることが明らかになった(下図)。

第 1 章では、Dexamethasone の短時間曝露によって概日時計機構を再構築させた培養ヒト RPTECs での P-gp 発現の概日リズム制御について検討した。P-gp の基質薬物の腎クリア



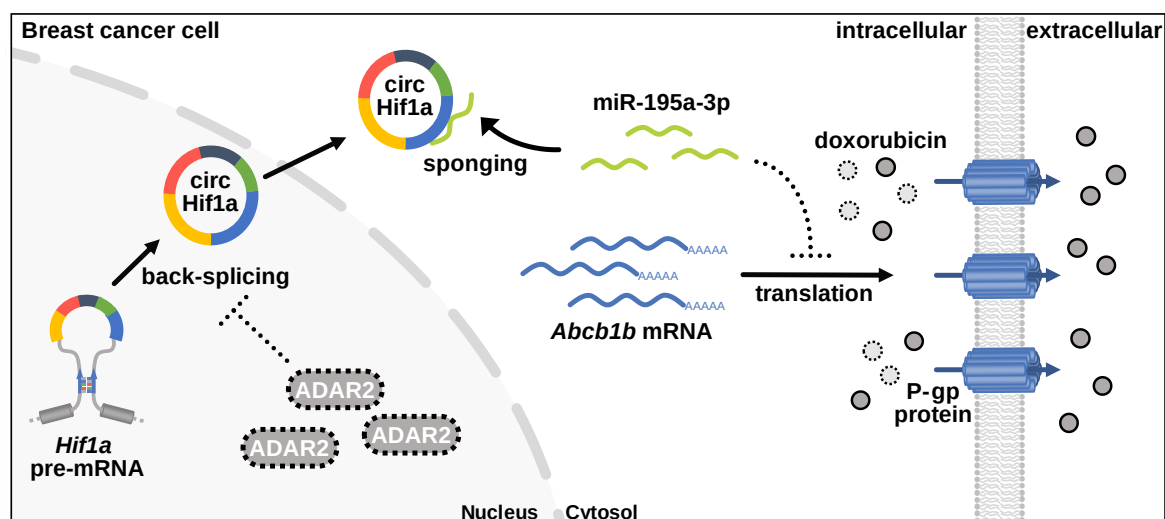
Schematic diagram of the doctoral dissertation. RNA editing enzyme ADAR1 regulates two types of alternative splicing, intron retention and back-splicing. In human RPTECs, the expression of two drug efflux transporters, P-gp and MRP4, is regulated by ADAR1 through its role in regulating the alternative splicing.

ランスに投薬時刻による差が認められたという報告 [Ferrazzini et al., 1991; Choi and Park, 1999] と一致して、ヒトと同じ昼行性哺乳類であるカンクイザルの腎臓で P-gp の発現に概日リズムが認められたことに加え、概日時計機構を再構築した RPTECs においても P-gp の発現および薬物輸送活性にも概日リズムが認められた。また、P-gp をコードする *ABCB1* 遺伝子で生じる intron 保持というタイプの選択的プライシングの発生頻度にも時刻差が認められ、P-gp 発現の概日リズムに繋がっていることが判明した。RNA 編集酵素である ADAR1 は *ABCB1* mRNA 前駆体に結合することによって、すなわち RNA 編集活性非依存的に、*ABCB1* の選択的スプライシングを時刻依存的に抑制していた。P-gp は基質認識能が極めて広く、多くの薬物の腎排泄に関与しているトランスポーターである。ヒト腎臓での P-gp 発現・薬物輸送活性の概日リズムを考慮することで、薬物治療の最適化に繋がることが期待される。

第 2 章では、培養ヒト RPTECs での薬物排泄トランスポーター MRP4 の ADAR1 による発現制御について、新規の non-coding RNA である「環状 RNA」に着目して検討を実施した。ADAR1 による RNA 編集は転写直後から生じると考えられており、同じく転写直後に生じるスプライシングに影響を与えることが指摘されている [Hsiao et al., 2018]。環状 RNA は通常のスプライシングとは逆向きの back-splicing で生じる 1 本鎖の non-coding RNA である。Back-splicing を促進する要因の 1 つに、環状化される exon に隣接する intron 同士による 2 本鎖 RNA 構造の形成が知られている [Jeck et al., 2013]。本研究では、この 2 本鎖 RNA が ADAR1 による RNA 編集の標的になり得ることに着目した。ADAR1 による MRP4 発現制御に関与することが明らかになった環状 RNA circHIPK3 について、その前駆体である *HIPK3* mRNA 前駆体が ADAR1 による RNA 編集を受けることで 2 本鎖 RNA 構造が乖離し、back-splicing が抑制されることが *in silico*、*in vitro* の両検討から明らかになった。環状 RNA は近年その機能が判明し、急速に注目を集めている機能性 RNA である。そのため、現時点では薬学領域において環状 RNA に着目している研究は現時点で殆ど無い状況である。本研究で得ら

れた成果や方法論は、薬学研究に環状 RNA という概念を登場させ、薬物動態関連因子の発現制御研究の更なる発展に貢献することが期待される。

RNA 編集酵素である ADAR ファミリーのうち、RNA 編集活性を有するサブタイプには ADAR1 と ADAR2 の 2 つが存在する [Nishikura, 2010]。ADAR1 は環状 RNA 生成の back-splicing 制御に関与することが報告されており [Ivanov et al., 2015; Rybak-Wolf et al., 2015]、本学位論文の第 2 章でも ADAR1 による環状 RNA circHIPK3 発現制御機構を明らかにした。しかし、ADAR1 と同様に RNA 編集活性を有する ADAR2 に関しては、環状 RNA との関連を示す報告は存在しなかったが、当研究室ではマウス乳がん細胞を用いた検討で、ADAR2 が circHif1a という環状 RNA の発現制御に関わることを明らかにした [Omata et al., 2024]。shRNA を用いて ADAR2 の発現を抑制したマウス乳がん 4T1 細胞において、circHif1a の発現が上昇することで miR-195a-3p の発現が低下し、その標的である P-gp の発現が上昇した。その結果、乳がん細胞において P-gp の基質である抗がん剤ドキソルビシンの感受性が低下することを見出した(下図)。データベースを用いた検討で、乳がん組織において ADAR2 発現量が低下しており、ADAR2 低発現の乳がん患者は予後不良であることが示唆されており、この研究において *in vitro* で得た結果は実臨床での知見と一致していた。このことから、「RNA 編



Schematic representation of the underlying mechanism by which downregulation of ADAR2 decreases the sensitivity of murine breast cancer 4T1 cells to doxorubicin. The decreased expression of ADAR2, one of the RNA editing enzymes, increases the biogenesis of circHif1a, which promotes the translation of P-glycoprotein (P-gp) by acting as a sponge of miR-195a-3p. The increased P-gp prevents intracellular accumulation of doxorubicin.

集酵素による環状 RNA 発現制御」という概念は本学位論文で実施した薬物動態だけでなく、病態における薬物治療の観点からも重要であると考えられる。今後は環状 RNA という新たな概念に着目することで、がんなどの病態の未知の分子機構が解明され、薬物治療戦略の構築・最適化に繋がることが期待される。

本研究では、RNA 編集酵素 ADAR1 による選択的スプライシング制御に着目することで、ヒト RPTECs での薬物排泄トランスポーターP-gp および MRP4 の新規発現制御機構を明らかにした。多くの薬物の腎排泄に関与するこれらトランスポーターの発現制御機構の理解は、新薬開発のみならず、薬物治療の更なる最適化にも繋がることが期待される。さらに、乳がん細胞での検討においても「RNA 編集・環状 RNA・薬物排泄トランスポーター」経路の重要性が明らかになったことから [Omata et al., 2024]、正常組織だけでなく、がんなどの病態においても同様な経路が機能している可能性が考えられる。本研究の成果を基に、薬物動態関連因子や治療標的分子の新たな発現制御分子機構が明らかになり、新薬開発や薬物治療戦略の開発に繋がることが期待したい。

【参考文献】

- Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4: 1–38, 2015.
- Agranat L, Sperling J, Sperling R. A novel tissue-specific alternatively spliced form of the A-to-I RNA editing enzyme ADAR2. *RNA Biol.* 7: 253–262, 2010.
- Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, Gant TW, Hastings MH, Kyriacou CP. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr. Biol.* 12: 540–550, 2002.
- Aubel RAMH van, Smeets PHE, Peters JGP, Bindels RJM, Russel FGM. The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 595–603, 2002.
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289: 2344–2347, 2000a.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93: 929–937, 1998.
- Balsalobre A, Marcacci L, Schibler U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr. Biol.* 10: 1291–1294, 2000b.
- Bao L, Hazari S, Mehra S, Kaushal D, Moroz K, Dash S. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am. J. Pathol.* 180: 2490–2503, 2012.
- Belinsky MG, Guo P, Lee K, Zhou F, Kotova E, Grinberg A, Westphal H, Shchavaleva I, Klein-Szanto A, Gallo JM, Kruh GD. Multidrug resistance protein 4 protects bone marrow, thymus, spleen, and intestine from nucleotide analogue-induced damage. *Cancer Res.* 67: 262–268, 2007.
- Bi L, Zhang C, Yao Y, He Z. circ-HIPK3 regulates YAP1 expression by sponging miR-381-3p to promote oral squamous cell carcinoma development. *J. Biosci.* 46: 20, 2021.
- Bicker J, Alves G, Falcão A, Fortuna A. Timing in drug absorption and disposition: the past, present, and future of chronopharmacokinetics *Br. J. Pharmacol.* 177: 2215–2239, 2020.
- Borel F, Han R, Visser A, Petry H, Deventer SJH van, Jansen PLM, Konstantinova P. Adenosine triphosphate-binding cassette transporter genes up-regulation in untreated hepatocellular carcinoma is mediated by cellular microRNAs. *Hepatology* 55: 821–832, 2012.

- Chen L-L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17: 205–211, 2016.
- Chen L-L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21: 475–490, 2020.
- Chen L-L, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis. *RNA Biol.* 12: 381–388, 2015.
- Chen T, Xiang J-F, Zhu S, Chen S, Yin Q-F, Zhang X-O, Zhang J, Feng H, Dong R, Li X-J, Yang L, Chen L-L. ADAR1 is required for differentiation and neural induction by regulating microRNA processing in a catalytically independent manner. *Cell Res.* 25: 459–476, 2015.
- Choi J, Park H. Circadian changes in pharmacokinetics of cyclosporin in healthy volunteers. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 130: 109–112, 1999.
- Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, Conn VM, Salmanidis M, Phillips CA, Roslan S, Schreiber AW, Gregory PA, Goodall GJ. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell* 160: 1125–1134, 2015.
- Dallmann R, Okyar A, Lévi F. Dosing-time makes the poison: circadian regulation and pharmacotherapy. *Trends Mol. Med.* 22: 430–445, 2016.
- Dong R, Ma X-K, Chen L-L, Yang L. Increased complexity of circRNA expression during species evolution. *RNA Biol.* 14: 1064–1074, 2017.
- Eggington JM, Greene T, Bass BL. Predicting sites of ADAR editing in double-stranded RNA. *Nat. Commun.* 2: 319, 2011.
- Eisenberg E, Levanon EY. A-to-I RNA editing — immune protector and transcriptome diversifier. *Nat. Rev. Genet.* 19: 473–490, 2018.
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79: 351–379, 2010.
- Feng D-D, Zhang H, Zhang P, Zheng Y-S, Zhang X-J, Han B-W, Luo X-Q, Xu L, Zhou H, Qu L-H, Chen YQ. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *J. Cell Mol. Med.* 15: 2164–2175, 2011.
- Ferrazzini G, Sohl H, Robieux I, Johnson D, Giesbrecht E, Koren G. Diurnal variation of methotrexate disposition in children with acute leukaemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 41: 425–427, 1991.
- Fornes O, Castro-Mondragon JA, Khan A, Lee R van der, Zhang X, Richmond PA, Modi BP, Correard S, Gheorghe M, Baranašić D, Santana-Garcia W, Tan G, Chèneby J, Ballester B, Parcy F, Sandelin A, Lenhard B, Wasserman WW, Mathelier A. JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 48: D87–D92, 2019.

- Fustin J-M, Doi M, Yamaguchi Y, Hida H, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, Morioka MS, Kakeya H, Manabe I, Okamura H. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. **Cell** 155: 793–806, 2013.
- Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Wah Yee S, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L. Membrane transporters in drug development. **Nat. Rev. Drug Discov.** 9: 215–236, 2010.
- Gradhand U, Lang T, Schaeffeler E, Glaeser H, Tegude H, Klein K, Fritz P, Jedlitschky G, Kroemer HK, Bachmakov I, Anwald B, Kerb R, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M, Fromm MF. Variability in human hepatic mrp4 expression: influence of cholestasis and genotype. **Pharmacogenomics J.** 8: 42–52, 2008.
- Gu F, Zhang J, Yan L, Li D. circHIPK3/miR-381-3p axis modulates proliferation, migration, and glycolysis of lung cancer cells by regulating the AKT/mTOR signaling pathway. **Open Life Sci.** 15: 683–695, 2020.
- Haenisch S, Werk AN, Cascorbi I. MicroRNAs and their relevance to ABC transporters. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 77: 587–596, 2014.
- Hamdan AM, Koyanagi S, Wada E, Kusunose N, Murakami Y, Matsunaga N, Ohdo S. Intestinal expression of mouse Abcg2/breast cancer resistance protein (BCRP) gene is under control of circadian clock-activating transcription factor-4 pathway. **J. Biol. Chem.** 287: 17224–17231, 2012.
- Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. **Nature** 495: 384–388, 2013.
- Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. **Nat. Rev. Neurosci.** 4: 649–661, 2003.
- Hong H, An O, Chan THM, Ng VHE, Kwok HS, Lin JS, Qi L, Han J, Tay DJT, Tang SJ, Yang H, Song Y, Bellido Molias F, Tenen DG, Chen L. Bidirectional regulation of adenosine-to-inosine (A-to-I) RNA editing by DEAH box helicase 9 (DHX9) in cancer. **Nucleic Acids Res.** 46: 7953–7969, 2018.
- Hsiao YHE, Bahn JH, Yang Y, Lin X, Tran S, Yang EW, Quinones-Valdez G, Xiao X. RNA editing in nascent RNA affects pre-mRNA splicing. **Genome Res.** 28: 812–823, 2018.
- Hu H, Wang Y, Qin Z, Sun W, Chen Y, Wang J, Wang Y, Nie J, Chen L, Cai S, Yu L, Zeng S. Regulation of MRP4 expression by circHIPK3 via sponging miR-124-3p/miR-4524-5p in hepatocellular carcinoma. **Biomedicines** 9: 497, 2021.
- Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE. Evidence for a pioneer round of mRNA translation. **Cell** 106: 607–617, 2001.

- Ivanov A, Memczak S, Wyler E, Torti F, Porath HT, Orejuela MR, Piechotta M, Levanon EY, Landthaler M, Dieterich C, Rajewsky N. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. **Cell Rep.** 10: 170–177, 2015.
- Iwasaki M, Koyanagi S, Suzuki N, Katamune C, Matsunaga N, Watanabe N, Takahashi M, Izumi T, Ohdo S. Circadian modulation in the intestinal absorption of P-glycoprotein substrates in monkeys. **Mol. Pharmacol.** 88: 29–37, 2015.
- Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. **RNA** 19: 141–157, 2013.
- Jiang X, Yu M, Zhu T, Lou L, Chen X, Li Q, Wei D, Sun R. Kcnq1ot1/miR-381-3p/ETS2 axis regulates inflammation in mouse models of acute respiratory distress syndrome. **Mol. Ther. Nucleic Acids** 19: 179–189, 2020.
- Kato M, Tsurudome Y, Kanemitsu T, Yasukochi S, Kanado Y, Ogino T, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Diurnal expression of MRP4 in bone marrow cells underlies the dosing-time dependent changes in the oxaliplatin-induced myelotoxicity. **Sci. Rep.** 10: 13484, 2020.
- Kawahara Y, Zinshteyn B, Chendrimada TP, Shiekhattar R, Nishikura K. RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer–TRBP complex. **EMBO Rep.** 8: 763–769, 2007a.
- Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, Iizasa H, Hatzigeorgiou AG, Nishikura K. Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. **Science** 315: 1137–1140, 2007b.
- Kim CK, Pak TR. miRNA degradation in the mammalian brain. **Am. J. Physiol.-Cell Physiol.** 319: C624–C629, 2020.
- Koyanagi S, Hamdan AM, Horiguchi M, Kusunose N, Okamoto A, Matsunaga N, Ohdo S. cAMP-response element (CRE)-mediated transcription by activating transcription factor-4 (ATF4) is essential for circadian expression of the Period2 gene. **J. Biol. Chem.** 286: 32416–32423, 2011.
- Lai F, Drakas R, Nishikura K. Mutagenic analysis of double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for RNA editing of glutamate-gated ion channel transcripts. **J. Biol. Chem.** 270: 17098–17105, 1995.
- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foà R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Müller R-U, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, Vita G De, Frezzetti D, Trompeter H-I, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Lauro R Di, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. **Cell** 129: 1401–1414, 2007.

- Leggas M, Adachi M, Scheffer GL, Sun D, Wielinga P, Du G, Mercer KE, Zhuang Y, Panetta JC, Johnston B, Scheper RJ, Stewart CF, Schuetz JD. Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. **Mol. Cell Biol.** 24: 7612–7621, 2004.
- Li J-H, Liu S, Zhou H, Qu L-H, Yang J-H. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein–RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. **Nucleic Acids Res.** 42: D92–D97, 2014.
- Li W, Shan B, Cheng X, He H, Qin J, Zhao H, Tian M, Zhang X, Jin G. circRNA Acbd6 promotes neural stem cell differentiation into cholinergic neurons via the miR-320-5p-Osbp12 axis. **J. Biol. Chem.** 298: 101828, 2022.
- Li X, Liu C-X, Xue W, Zhang Y, Jiang S, Yin Q-F, Wei J, Yao R-W, Yang L, Chen L-L. Coordinated circRNA biogenesis and function with NF90/NF110 in viral infection. **Mol. Cell** 67: 214-227.e7, 2017.
- Liang D, Wilusz JE. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. **Genes Dev.** 28: 2233–2247, 2014.
- Lorenz R, Bernhart SH, Höner Zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL. ViennaRNA Package 2.0. **Algorithms Mol. Biol.** 6: 26, 2011.
- Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stähler C, Meese E, Keller A. Distribution of miRNA expression across human tissues. **Nucleic Acids Res.** 44: 3865–3877, 2016.
- Ma C, Wang X, Yang F, Zang Y, Liu J, Wang X, Xu X, Li W, Jia J, Liu Z. Circular RNA hsa_circ_0004872 inhibits gastric cancer progression via the miR-224/Smad4/ADAR1 successive regulatory circuit. **Mol. Cancer** 19: 157, 2020.
- Markova SM, Kroetz DL. ABCC4 is regulated by microRNA-124a and microRNA-506. **Biochem. Pharmacol.** 87: 515–522, 2014.
- Martin L, Grigoryan A, Wang D, Wang J, Breda L, Rivella S, Cardozo T, Gardner LB. Identification and characterization of small molecules that inhibit nonsense-mediated RNA decay and suppress nonsense p53 mutations. **Cancer Res.** 74: 3104–3113, 2014.
- Matsunaga N, Ikeda M, Takiguchi T, Koyanagi S, Ohdo S. The molecular mechanism regulating 24-hour rhythm of *CYP2E1* expression in the mouse liver. **Hepatology** 48: 240–251, 2008.
- Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, Noble F Le, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. **Nature** 495: 333–338, 2013.

- Moffit JS, Aleksunes LM, Maher JM, Scheffer GL, Klaassen CD, Manautou JE. Induction of hepatic transporters multidrug resistance-associated proteins (Mrp) 3 and 4 by clofibrate is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 317: 537–545, 2006.
- Murakami Y, Higashi Y, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian clock-controlled intestinal expression of the multidrug-resistance gene mdr1a in mice. **Gastroenterology** 135: 1636–1644, 2008.
- Nakano M, Fukami T, Gotoh S, Takamiya M, Aoki Y, Nakajima M. RNA editing modulates human hepatic aryl hydrocarbon receptor expression by creating microRNA recognition sequence. **J. Biol. Chem.** 291: 894–903, 2016.
- Nakano M, Nakajima M. Significance of A-to-I RNA editing of transcripts modulating pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Pharmacol. Ther.** 181: 13–21, 2018.
- Nies AT, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt H-P, Keppler D. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1–MRP6 (ABCC1–ABCC6), in human brain. **Neuroscience** 129: 349–360, 2004.
- Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. **Annu. Rev. Biochem.** 79: 321–349, 2010.
- Nishikura K, Yoo C, Kim U, Murray JM, Estes PA, Cash FE, Liebhaber SA. Substrate specificity of the dsRNA unwinding/modifying activity. **EMBO J.** 10: 3523–3532, 1991.
- Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N. Chronopharmacological strategies focused on chronodrug discovery. **Pharmacol. Ther.** 202: 72–90, 2019.
- Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N, Hamdan AM. Molecular basis of chronopharmaceutics. **J. Pharm. Sci.** 100: 3560–3576, 2011.
- Okazaki H, Matsunaga N, Fujioka T, Okazaki F, Akagawa Y, Tsurudome Y, Ono M, Kuwano M, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian regulation of mTOR by the ubiquitin pathway in renal cell carcinoma. **Cancer Res.** 74: 543–551, 2014.
- Omata Y, Haraguchi M, Yoshinaga S, Ogino T, Okawa M, Tsuruta A, Koyanagi S, Ohdo S. RNA editing enzyme ADAR2 regulates P-glycoprotein expression in murine breast cancer cells through the circRNA-miRNA pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 726: 150289, 2024.
- Omata Y, Okawa M, Haraguchi M, Tsuruta A, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. RNA editing enzyme ADAR1 controls miR-381-3p-mediated expression of multidrug resistance protein MRP4 via regulation of circRNA in human renal cells. **J. Biol. Chem.** 298: 102184, 2022.

- Omata Y, Yamauchi T, Tsuruta A, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. RNA editing enzyme ADAR1 governs the circadian expression of P-glycoprotein in human renal cells by regulating alternative splicing of the *ABCB1* gene. **J. Biol. Chem.** 296: 100601, 2021.
- Patterson JB, Samuel CE. Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. **Mol. Cell Biol.** 15: 5376–5388, 1995.
- Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. **RNA** 14: 844–852, 2008.
- Picardi E, D'Erchia AM, Giudice C Lo, Pesole G. REDportal: a comprehensive database of A-to-I RNA editing events in humans. **Nucleic Acids Res.** 45: D750–D757, 2017.
- Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, Jens M, Pino N, Giusti S, Hanan M, Behm M, Bartok O, Ashwal-Fluss R, Herzog M, Schreyer L, Papavasileiou P, Ivanov A, Öhman M, Refojo D, Kadener S, Rajewsky N. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. **Mol. Cell** 58: 870–885, 2015.
- Sakabe N, Souza S de. Sequence features responsible for intron retention in human. **BMC Genomics** 8: 59, 2007.
- Sakurai M, Shiromoto Y, Ota H, Song C, Kossenkova A V., Wickramasinghe J, Showe LC, Skordalakes E, Tang H-Y, Speicher DW, Nishikura K. ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 24: 534–543, 2017.
- Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the rosetta stone of a hidden RNA language? **Cell** 146: 353–358, 2011.
- Shang Y, Zhang Z, Liu Z, Feng B, Ren G, Li K, Zhou L, Sun Y, Li M, Zhou J, An Y, Wu K, Nie Y, Fan D. miR-508-5p regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting ABCB1 and ZNRD1. **Oncogene** 33: 3267–3276, 2014.
- Shen P, Yang T, Chen Q, Yuan H, Wu P, Cai B, Meng L, Huang X, Liu J, Zhang Y, Hu W, Miao Y, Lu Z, Jiang K. circNEIL3 regulatory loop promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression via miRNA sponging and A-to-I RNA-editing. **Mol. Cancer** 20: 51, 2021.
- Shi L, Yan P, Liang Y, Sun Y, Shen J, Zhou S, Lin H, Liang X, Cai X. Circular RNA expression is suppressed by androgen receptor (AR)-regulated adenosine deaminase that acts on RNA (ADAR1) in human hepatocellular carcinoma. **Cell Death Dis.** 8: e3171–e3171, 2017.
- Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. **Eur. J. Pharm. Sci.** 27: 425–446, 2006.

- Sissung TM, Goey AKL, Ley AM, Strope JD, Figg WD. Pharmacogenetics of membrane transporters: a review of current approaches. **Methods Mol. Biol.** 1175:91–120, 2014.
- Starke S, Jost I, Rossbach O, Schneider T, Schreiner S, Hung LH, Bindereif A. Exon circularization requires canonical splice signals. **Cell Rep.** 10: 103–111, 2015.
- Stoll L, Sobel J, Rodriguez-Trejo A, Guay C, Lee K, Venø MT, Kjems J, Laybutt DR, Regazzi R. Circular RNAs as novel regulators of β -cell functions in normal and disease conditions. **Mol. Metab.** 9: 69–83, 2018.
- Suzuki H, Zuo Y, Wang J, Zhang MQ, Malhotra A, Mayeda A. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. **Nucleic Acids Res.** 34: e63, 2006.
- Tang SJ, Shen H, An O, Hong H, Li J, Song Y, Han J, Tay DJT, Ng VHE, Bellido Molias F, Leong KW, Pitcheshwar P, Yang H, Chen L. Cis- and trans-regulations of pre-mRNA splicing by RNA editing enzymes influence cancer development. **Nat. Commun.** 11: 799, 2020.
- Terajima H, Yoshitane H, Ozaki H, Suzuki Y, Shimba S, Kuroda S, Iwasaki W, Fukada Y. ADARB1 catalyzes circadian A-to-I editing and regulates RNA rhythm. **Nat. Genet.** 49: 146–151, 2017.
- Tsurudome Y, Koyanagi S, Kanemitsu T, Katamune C, Oda M, Kanado Y, Kato M, Morita A, Tahara Y, Matsunaga N, Shibata S, Ohdo S. Circadian clock component PERIOD2 regulates diurnal expression of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 and its scaffolding function. **Sci. Rep.** 8: 9072, 2018.
- Ushijima K, Koyanagi S, Sato Y, Ogata T, Matsunaga N, Fujimura A, Ohdo S. Role of activating transcription factor-4 in 24-hour rhythm of serotonin transporter expression in the mouse midbrain. **Mol. Pharmacol.** 82: 264–270, 2012.
- Valente L, Nishikura K. RNA binding-independent dimerization of adenosine deaminases acting on RNA and dominant negative effects of nonfunctional subunits on dimer functions. **J. Bio. Chem.** 282: 16054–16061, 2007.
- Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, Shukla S, Xiao L, Zhang Y, Wu Y-M, Dhanasekaran SM, Engelke CG, Cao X, Robinson DR, Nesvizhskii AI, Chinnaiyan AM. The landscape of circular RNA in cancer. **Cell** 176: 869-881.e13, 2019.
- Wen J, Luo J, Huang W, Tang J, Zhou H, Zhang W. The pharmacological and physiological role of multidrug-resistant protein 4. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 354: 358–375, 2015.
- Will CL, Luhrmann R. Spliceosome structure and function. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** 3: a003707, 2011.

- Wong JJJ, Au AYM, Ritchie W, Rasko JEJ. Intron retention in mRNA: no longer nonsense. **BioEssays** 38: 41–49, 2016.
- Wu W, Ji P, Zhao F. circAtlas: an integrated resource of one million highly accurate circular RNAs from 1070 vertebrate transcriptomes. **Genome Biol.** 21: 101, 2020.
- Xu S, Weerachayaphorn J, Cai S-Y, Soroka CJ, Boyer JL. Aryl hydrocarbon receptor and NF-E2-related factor 2 are key regulators of human MRP4 expression. **Am. J. Physiol.-Gastroint. Liver Physiol.** 299: G126–G135, 2010.
- Yang X, Ruan H, Hu X, Cao A, Song L. miR-381-3p suppresses the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by directly targeting FGFR2. **Am. J. Cancer Res.** 7: 913–922, 2017.
- Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, Bhai J, Billis K, Boddu S, Marugán JC, Cummins C, Davidson C, Dodiya K, Fatima R, Gall A, Giron CG, Gil L, Grego T, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Martinez JG, Maurel T, McDowall M, McMahon A, Mohanan S, Moore B, Nuhn M, Oheh DN, Parker A, Parton A, Patricio M, Sakthivel MP, Abdul Salam AI, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Sycheva M, Szuba M, Taylor K, Thormann A, Threadgold G, Vullo A, Walts B, Winterbottom A, Zadissa A, Chakiachvili M, Flint B, Frankish A, Hunt SE, Ilesley G, Kostadima M, Langridge N, Loveland JE, Martin FJ, Morales J, Mudge JM, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Trevanion SJ, Cunningham F, Howe KL, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2020. **Nucleic Acids Res.** 48: D682–D688, 2019.
- Yi D, Xu L, Wang R, Lu X, Sang J. miR-381 overcomes cisplatin resistance in breast cancer by targeting MDR1. **Cell Biol. Int.** 43: 12–21, 2019.
- You X, Vlatkovic I, Babic A, Will T, Epstein I, Tushev G, Akbalik G, Wang M, Glock C, Quedenau C, Wang X, Hou J, Liu H, Sun W, Sambandan S, Chen T, Schuman EM, Chen W. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. **Nat. Neurosci.** 18: 603–610, 2015.
- Yu F, Zhang T, Zhou C, Xu H, Guo L, Chen M, Wu B. The circadian clock gene Bmal1 controls intestinal exporter MRP2 and drug disposition. **Theranostics** 9: 2754–2767, 2019.
- Zhang P-F, Pei X, Li K-S, Jin L-N, Wang F, Wu J, Zhang X-M. Circular RNA circFGFR1 promotes progression and anti-PD-1 resistance by sponging miR-381-3p in non-small cell lung cancer cells. **Mol. Cancer** 18: 179, 2019.
- Zhang X-O, Wang H-B, Zhang Y, Lu X, Chen L-L, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. **Cell** 159: 134–147, 2014.
- Zhang Y, Xue W, Li X, Zhang J, Chen S, Zhang J-L, Yang L, Chen L-L. The biogenesis of nascent circular RNAs. **Cell Rep.** 15: 611–624, 2016.

- Zheng Q, Bao C, Guo W, Li S, Chen J, Chen B, Luo Y, Lyu D, Li Y, Shi G, Liang L, Gu J, He X, Huang S. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. **Nat. Commun.** 7: 1–13, 2016.
- Zheng W, Sun L, Yang L, Xu T. The circular RNA circBCL2L1 regulates innate immune responses via microRNA-mediated downregulation of TRAF6 in teleost fish. **J. Biol. Chem.** 297: 101199, 2021.

【付 記】

本学位論文の内容は、以下のように発表した。

第 1 章に関する学会発表

小俣裕司, 鶴田朗人, 松永直哉, 小柳悟, 大戸茂弘. ヒト腎近位尿細管上皮細胞における P 糖タンパク質発現の概日リズム制御機構の解析, 日本薬剤学会第 35 年会, 2020 年 5 月, 熊本 (誌上開催).

小俣裕司, 山内智暁, 鶴田朗人, 松永直哉, 小柳悟, 大戸茂弘. ヒト腎近位尿細管上皮細胞における P 糖タンパク質発現の概日リズム制御機構の解析, 第 41 回日本臨床薬理学会学術総会, 2020 年 12 月, 福岡.

小俣裕司, 山内智暁, 鶴田朗人, 松永直哉, 小柳悟, 大戸茂弘. RNA 編集酵素 ADAR1 によるヒト腎細胞での P 糖タンパク質発現の概日リズム制御機構, 日本薬学会第 141 年会, 2021 年 3 月, 広島 (Web 開催), **学生優秀発表賞 (口頭発表の部) 受賞**.

小俣裕司, 山内智暁, 鶴田朗人, 松永直哉, 小柳悟, 大戸茂弘. RNA splicing の時刻変動による P 糖タンパク質の発現リズム制御, 日本薬剤学会第 36 年会, 2021 年 5 月, 徳島 (Web 開催), **優秀発表者賞受賞**.

小俣裕司, 山内智暁, 鶴田朗人, 松永直哉, 小柳悟, 大戸茂弘. RNA 編集酵素 ADAR1 によるヒト腎近位尿細管上皮細胞での P 糖タンパク質発現の概日リズム制御, 日本薬物動態学会第 36 回年会, 2021 年 11 月, 群馬 (Web 開催).

第 2 章に関する学会発表

小俣裕司, 大川ませ梨, 鶴田朗人, 松永直哉, 小柳悟, 大戸茂弘. RNA 編集酵素 ADAR1 による「環状 RNA」発現制御を介したヒト腎細胞における MRP4 発現制御機構の解析, 日本薬物動態学会第 36 回年会, 2021 年 11 月, 群馬 (Web 開催).

小俣裕司, 大川ませ梨, 原口真依, 鶴田朗人, 松永直哉, 小柳悟, 大戸茂弘. RNA 編集酵素 ADAR1 による「環状 RNA-microRNA 経路」を介したヒト尿細管上皮細胞における薬物排泄トランスポーター-MRP4 発現制御機構, 日本薬物動態学会第 37 回年会, 2022 年 11 月, 神奈川.

小俣裕司, 大川ませ梨, 原口真依, 鶴田朗人, 松永直哉, 小柳悟, 大戸茂弘. RNA 編集酵素 ADAR1 による「環状 RNA」生成制御を介したヒト腎尿細管上皮細胞における薬物排泄トランスporter-MRP4 発現制御機構の解析, 日本薬学会第 143 年会, 2023 年 3 月, 北海道, **学生優秀発表賞 (口頭発表の部) 受賞**.

小俣裕司, 大川ませ梨, 原口真依, 鶴田朗人, 松永直哉, 小柳悟, 大戸茂弘. RNA 編集酵素による「環状 RNA-microRNA 経路」を介したヒト腎尿細管上皮細胞における薬物排泄トランスporter-MRP4 発現制御機構の解析, 第 44 回日本臨床薬理学会学術総会, 2023 年 12 月, 兵庫, **優秀発表賞受賞**.

その他の学会発表

小俣裕司, 原口真依, 吉永彩恵, 荻野敬史, 大川ませ梨, 鶴田朗人, 小柳悟, 大戸茂弘. RNA 編集酵素 ADAR2 による「環状 RNA-microRNA 経路」を介した乳がん細胞の抗がん剤耐性獲得メカニズムの解析, 第 22 回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム 2023, 2023 年 9 月, 福岡, **最優秀発表賞受賞**.

Omata Y, Haraguchi M, Yoshinaga S, Ogino T, Okawa M, Tsuruta A, Koyanagi S, Ohdo S. RNA editing enzyme ADAR2 is involved in the P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in murine breast cancer cells via circRNA-miRNA pathway. *2023 International Joint Meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 (ICCP450) and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics (JSSX)*, September 2023, Shizuoka.

小俣裕司, 原口真依, 吉永彩恵, 荻野敬史, 大川ませ梨, 鶴田朗人, 小柳悟, 大戸茂弘. RNA 編集酵素 ADAR2 による「環状 RNA-microRNA 経路」を介した乳がん細胞の抗がん剤耐性獲得機構, 第 18 回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム, 2024 年 10 月, 石川, **優秀発表賞受賞**.

【謝 辞】

本研究に際し、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました九州大学大学院薬学研究院
薬剤学分野 教授 小柳 悟 先生に謹んで深謝致します。

本研究に際し、有益な助言と御支援、御高閲を賜りました九州大学大学院薬学研究院
薬物動態学分野 特命教授 大戸 茂弘 先生に謹んで深謝致します。

本研究に際し、有益な助言と御支援、御高閲を賜りました九州大学大学院薬学研究院
薬物動態学分野 教授 松永 直哉 先生に謹んで深謝致します。

本研究に際し、有益な助言と御支援、御高閲を賜りました九州大学大学院薬学研究院
薬剤学分野 助教 鶴田 朗人 先生に謹んで深謝致します。

本研究に際し、有益な助言と御支援、御高閲を賜りました九州大学大学院薬学研究院
薬物動態学分野 助教 吉田 優哉 先生に謹んで深謝致します。

本研究の完成に際し、貴重な御意見と御高閲を賜りました九州大学大学院薬学研究院
臨床薬物治療学分野 教授 内田 まやこ 先生に謹んで深謝致します。

本研究の完成に際し、貴重な御意見と御高閲を賜りました九州大学大学院薬学研究院
臨床育薬学分野 講師 川尻 雄大 先生に謹んで深謝致します。

本研究の完成に際し、貴重な御意見と御高閲を賜りました九州大学大学院薬学研究院
薬物動態学分野 講師 濱村 賢吾 先生に謹んで深謝致します。

本研究の実施に際し、有益な助言と御協力を賜りました九州大学大学院薬学府薬剤学分野
山内 智暁 修士、大川 ませ梨 修士、原口 真依 学士に謹んで感謝致します。

本研究の実施に際し、御理解と御協力を賜り、また公私共に懇意にして頂いた
九州大学大学院薬学府薬剤学分野の皆様、卒業生の皆様方に心より感謝を申し上げます。

また、本研究のために犠牲になった数多くの尊い命に深く感謝し御冥福をお祈り致します。

最後に、長きに渡る学生生活におきましても、深い理解と愛情をもって精神的、
経済的に支援をして下さいました両親をはじめ家族全員に心より感謝申し上げます。