



Title	A comparative analysis of ADAR mutant mice reveals site-specific regulation of RNA editing
Author(s)	Costa Cruz, Pedro Henrique
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76418
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	Costa Cruz Pedro Henrique
論文題名 Title	A comparative analysis of ADAR mutant mice reveals site-specific regulation of RNA editing (マウス個体内における各RNA編集部位の触媒を担う責任ADAR酵素の決定)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>Adenosine-to-inosine (A-to-I) RNA editing is an essential posttranscriptional modification catalyzed by adenosine deaminase acting on RNA (ADAR)1 and ADAR2 in mammals. Given that inosine is recognized as guanosine by the cellular machinery, editing within coding sequences (CDS) and microRNAs (miRNA), which is highly conserved, has significant biological consequences, for example, by altering amino acid residues and target recognition. Previous studies showed, for instance, that mutant mice with fully edited or unedited form of proteins alone exhibit abnormal phenotypes such as seizures, hyperactivity and depression. Moreover, dysregulated RNA editing in CDS and miRNAs is linked to diseases such as cancer and neurodegenerative diseases, and it is crucial to know the enzyme(s) responsible for each conserved site in order to understand the mechanisms underlying the tight regulation of RNA editing. In this study, we aimed to comprehensively and quantitatively determine how specific ADARs contribute to each conserved sites <i>in vivo</i>, an important step to unravel the physiological importance of each site and their regulation.</p> <p>〔方法(Methods)〕</p> <p>Several challenges, such as low read depth in RNA-seq or no guarantee of amplification in other methods, have prevented a comprehensive and quantitative analysis of extent of editing at each editing site. To overcome these problems, we developed a method in which we performed reverse-transcription-PCR for each RNA editing site followed by adjusting the amplicon length with a second round of PCR. After gel purification of each PCR product, similar amounts were combined for deep sequencing, which yielded editing ratios with a high degree of accuracy for all sites examined. We applied this method to all RNA editing sites in CDS and miRNAs that are definitely or possibly conserved between humans and mice, and compared editing ratios in the cerebral cortex and spleen between wild-type mice, Adar1^{E861A/E861A}Ifih^{-/-} mice expressing inactive ADAR1 (Adar1 K1) and Adar2^{-/-}Gria2^{R/R} (Adar2 KO) mice.</p> <p>〔成績(Results)〕</p> <p>We found that most of the sites showed a preference for one ADAR. In contrast, some sites, such as one in miRNA miR-3099-3p, showed no ADAR preference. In addition, we found that the editing ratio for several sites, such as one in the DACT3 mRNA, was upregulated in either Adar mutant mouse strain, whereas a coordinated interplay between ADAR1 and ADAR2 was required for the efficient editing of specific sites, such as the 5-HT_{2C}R B site. We further created double mutant Adar1 K1 Adar2 KO mice and observed viable and fertile animals with the complete absence of editing, demonstrating that ADAR1 and ADAR2 are the sole enzymes responsible for all editing sites <i>in vivo</i>.</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>In this study we established the first complete list of the responsible ADAR for every A-to-I editing site conserved between human and mouse, which will be an important resource to understand the physiological importance of each site and the mechanism behind their editing. Moreover, while many possible factors affect editing at each site, such as ADAR expression, RNA level expression, regulatory factors and others, our study showed RNA editing is regulated by a site-specific mechanism related to the interplay between ADAR1 and ADAR2.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) Costa Cruz Pedro Henrique			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	大阪大学教授	河原 行郎
	副 査	大阪大学教授	山口 徹
	副 査	大阪大学教授	南 沁章

論文審査の結果の要旨

RNA中のアデノシンがイノシンへと置換されるA-to-I RNA編集は、広範な生物で保存されており、生存に必須の転写後修飾である。ヒトやマウスでは、ADAR1とADAR2という2つの酵素によって触媒されている。しかし、いずれのノックアウト (KO) マウスも致死性であるため、各臓器における各RNA編集部位の責任酵素や制御機構を解析することが困難であった。

しかし、ADAR2 KOマウスについては、致死に至る鍵がグルタミン酸受容体サブユニット GluA2のQ/R siteのRNA編集欠損にあることが判明し、これをゲノムレベルで修正すると成獣まで生存可能である。また、ADAR1の編集活性欠損マウス (KIマウス) では、自己二本鎖RNA (dsRNA) をMDA5が非自己と誤認することによって自己免疫反応が惹起される。このため、MDA5を同時KOすると、成獣まで生存できることが最近判明した。このため、これらの遺伝子組換えマウスから抽出した組織を用いることで、各臓器における各RNA編集部位の責任酵素や制御機構を解析することが可能となった。

そこで、Costaさんは、8週齢のADAR1 KI (MDA5 KO) マウスとADAR2 KO (GluA2 KI) マウスの大脳皮質 (ADAR1 p110とADAR2が高発現) と脾臓 (ADAR2 p150が高発現) を抽出し、ヒトとマウスで保存されている合計60遺伝子95箇所のRNA編集効率を比較した。その結果、ほとんどのCDS内のRNA編集は脳の方が脾臓より高いこと、多くはADAR2が触媒していることを見出した。一方で、新規のADAR1 siteも見出した。また、両者が協調して触媒する部位や、互いに阻害しあう部位があることなどを発見した。これらの成果は、同分野の研究者にとって必要不可欠な情報をもたらし、リソースとしての価値は計り知れないものと考えられた。

以上から、博士 (医学) の学位授与に価するものと認める。