

令和元年6月10日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20895

研究課題名（和文）RNA編集酵素ADAR1が関与するゲノム安定化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of genome stabilization mechanism involving RNA editing enzyme ADAR1

研究代表者

有吉 健太郎 (Ariyoshi, Kentaro)

弘前大学・被ばく医療総合研究所・助教

研究者番号：50462750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、RNA編集機能を持ったADAR1タンパク質が、ゲノム安定化にどのような形で関与しているのかを調べることで、RNA編集とDNA修復機構のクロストークした機能の解明を目指す事であった。研究成果としては、ADAR1タンパク質がDNA二重鎖切断部位に集積することが判明し、さらにADAR1発現抑制下では高い放射線感受性を示し、また、DNA損傷修復の遅延が生じることが判明した。これらのことから、ADAR1タンパク質はDNA損傷修復に関与する重要な因子であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA修復機構の破綻は細胞のがん化と密接な関連を持つことから、細胞がん化にADAR1の機能不全が影響している事が考えられ、得られた結果から、細胞のがん化とRNA編集機構の接点、およびRNA編集機構によるがん抑制機構の発見への可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to investigate the cross-talk function of RNA editing and DNA repair mechanism by examining how ADAR1 protein with RNA editing function is involved in genome stabilization. As a result, we found that ADAR1 protein accumulates at the DNA double-strand break site, and furthermore, we observed higher radiosensitivity of cells after knock down of ADAR1 expression. ADAR1 suppression also showed a delay of DNA damage repair. These results suggest that ADAR1 protein plays an important role in DNA damage repair.

研究分野：放射線生物学

キーワード：RNA編集 ゲノム不安定化 DNA損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ADAR1 (adenosine deaminases acting on RNA 1) は二本鎖 RNA に含まれるアデノシンをイノシンへと塩基修飾する RNA 編集酵素である。mRNA に存在するイノシンは翻訳の際にグアノシンとして認識されるため、いくつかの遺伝子においては RNA 編集により翻訳産物のアミノ酸配列に変化が生じるが、このような遺伝子は少数であり、RNA 編集の多くは非コード RNA 領域に起こる (Ramaswami et al, 2012)。ADAR1 の生理学的な機能を調べるため、幾つかのグループが ADAR1^{-/-}マウス作成を試みたが、いずれも胎生致死を示し、その原因は解明されていない (Wang et al, 2004)。近年、申請者を含む研究グループは、ADAR1 が RNAi 制御因子 Dicer と複合体を形成し、miRNA の産生および RNAi 促進能をもつことを発見した (Ota et al, 2013)。胚発生の過程では ADAR1 は ADAR1-Dicer ヘテロ二量体を形成し、miRNA 産生機構の補因子として、主に RNAi 生成に関与していると考えられる。ADAR1^{-/-}マウスの胎生致死という表現型は、胚発生における miRNA 産生機構において、ADAR1 の寄与がもっとも重要であることを示唆しているものと考えられる。申請者は以前、ヒト正常線維芽細胞 WI38 を用いて ADAR1 遺伝子の発現抑制を行った際、DNA 二重鎖切断損傷マーカーである H2AX フォーカスが蓄積し、DNA 損傷が頻発していることを発見した。また、対照細胞において放射線照射後、時間経過とともに H2AX フォーカスは消失してゆくが、ADAR1 を発現抑制された細胞においては、H2AX フォーカスが消失せずに残存し続ける事を見いだした。これまでの研究により、DNA 損傷修復に関わる多くの酵素の機能異常は、ゲノムの不安定化をもたらす、細胞のがん化が生じることが報告されている。現在までに、RNA 編集の ADAR1 が DNA 修復に関与することを示した報告は皆無であるため、DNA 修復機構における ADAR1 の機能的な役割とがん化への関与は全く不明である。しかし近年、DNA 損傷部位から短鎖 RNA が作られ、RNAi 生成に関わる Dicer と Ago2 が、DNA 修復に関与していることが報告されており、同じく RNAi 生成に関わっている ADAR1 が DNA 修復に関与していることは十分に考えられる。

2. 研究の目的

これまで RNA 編集は、RNAi 機構や miRNA 産生機構に対し拮抗作用をもつことが報告されてきたが、申請者の研究グループは近年、miRNA 生成に関わる Dicer と ADAR1 が相互作用し、RNAi 生成を促進させていることを明らかにした。他方、申請者は ADAR1 遺伝子を発現抑制した細胞において、DNA 損傷修復機構に破綻が生じている事を見いだしている。DNA 損傷修復機構の破綻は、ゲノムの不安定化をもたらす、細胞がん化と深い関わりをもつが、ADAR1 のゲノム安定化への関与は全く未知の事象である。そこで本研究は、ADAR1 の RNA 編集機能とゲノム安定化とのクロストークした機能の解明を目指す事で、ADAR1 の発がんメカニズムへの関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ADAR1 の DNA 二重鎖切断部位における集積性を可視化

ADAR1 の DNA 二重鎖切断部位における集積性の検証のため、DNA 損傷後に蛍光標識抗 ADAR1 の DNA 損傷部位への集積の解析、および DNA 二重鎖損傷のマーカーである H2AX および 53BP1 との共有性の検討を行った。使用した細胞はヒト正常線維芽細胞 (HDFn) およびタモキシフェン誘導体 4-OHT を処理することによって DNA 二重鎖切断を誘導することが可能な HT1080-Ippo1 細胞を用いた。

(2) ADAR1 の発現を抑制した際の DNA 二重鎖切断修復への影響解析

HDFn 細胞に siRNA を処理することで ADAR1 をノックダウンし、放射線照射 (2 Gy) により DNA 二重鎖切断を誘導した際、対照細胞と比較して DNA 損傷修復速度に変化が生じるかを調べるとともに、コロニー形成法を用いて ADAR1 をノックダウンした際の放射線感受性の変化を調べた。また、ADAR1 をノックダウンした HDFn に放射線照射 (2 Gy, 4 Gy) したのち、1 週間培養した際の DNA 二重鎖損傷陽性細胞、微小核陽性細胞の頻度をそれぞれ調べた。

(3) ADAR1 の DNA 損傷修復部位への結合調査

ADAR1 が DNA 二重鎖切断部位に結合している可能性を調べるため、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) を用いて、4-OHT 処理した HT1080-Ippo1 と未処理の細胞を ADAR1 抗体を用いて免疫沈降し、Ippo1 カuttingサイトのプライマーを用いて PCR を行なった。

4. 研究成果

ADAR1 タンパク質が DNA 二重鎖切断部位の修復に関与しているかを検証するため、HDFn に X 線を照射したのち、免疫染色を行い DNA 二重鎖切断損傷のマーカーと ADAR1 の局在性を調べた。通常の免疫染色では ADAR1 は核小体に局在することが判明したが、CSK バッファーを用いることで核小体以外の場所に集積する ADAR1 を検出することができた。また、DNA 二重鎖切断損傷マーカーである H2AX 及び 53BP1 フォーカスと ADAR1 のフォーカスの局在性を確認した。同様の実験を 4-OHT 処理した HT1080-Ippo1 と未処理の細胞で行ったところ、4-OHT 処理した HT1080-Ippo1 において DNA 二重鎖切断損傷の出現と、H2AX 及び 53BP1 フォーカスと ADAR1

のフォーカスの局在性を確認した (図 1)。

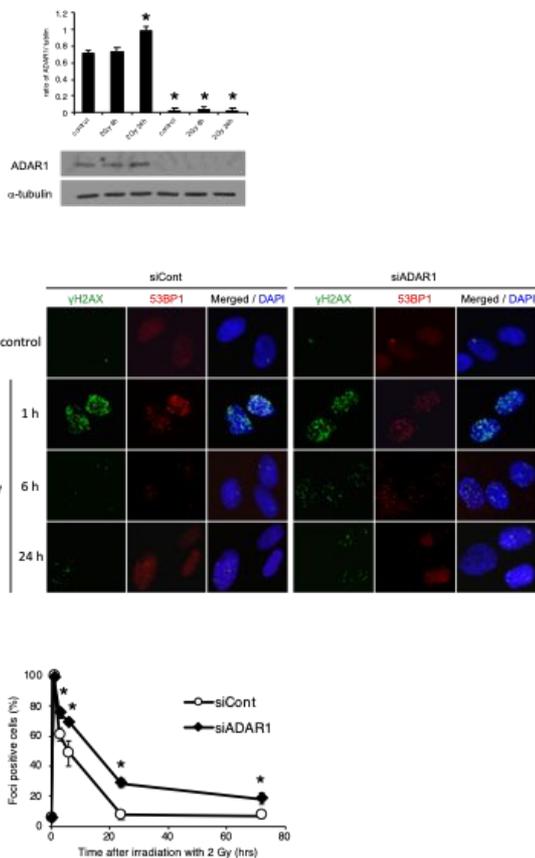
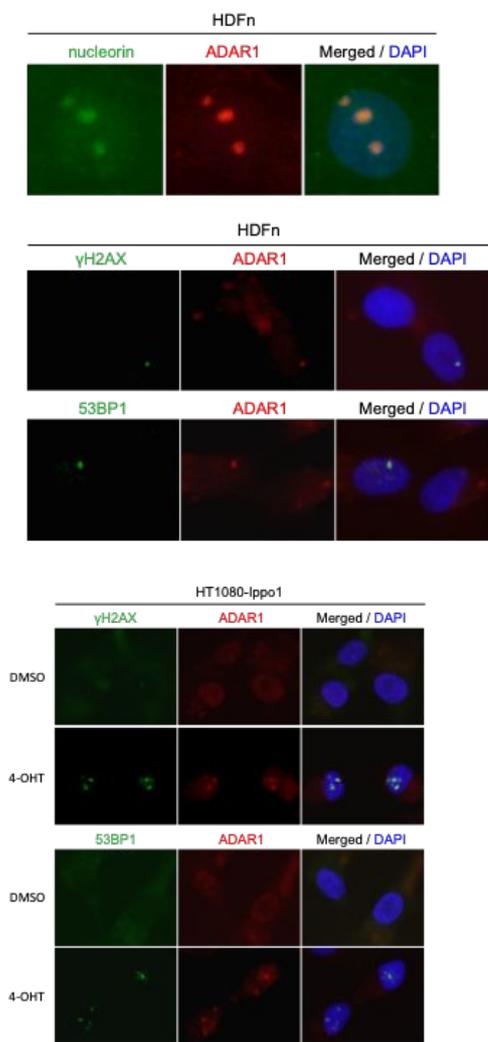


図 2. ADAR1ノックダウン細胞における DNA二重鎖損傷修復の遅延

図 1. ADAR1のDNA二重鎖損傷部位への集積

さらに、HDFn に siControl 処理した対照細胞、および siADAR1 によって ADAR1 をノックダウンした siADAR1 処理細胞に 2Gy の X 線を照射したのち、DNA 二重鎖切断損傷の継時的な定量化を行なった。H2AX 及び 53BP1 フォーカスを検出し、各フォーカスの数的変化を比較したところ、siControl 処理した対照細胞と比較して、siADAR1 処理細胞においては、時間とともにフォーカス数が減少せず、対照細胞よりも有意に高い頻度でみられた (図 2)。

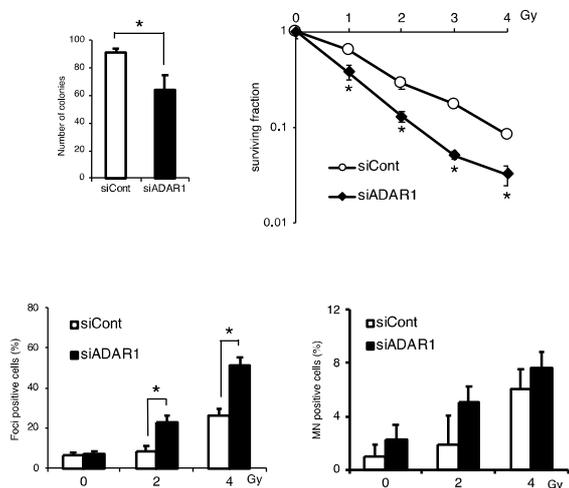


図 3. ADAR1ノックダウン細胞における放射線感受性と DNA二重鎖損傷修復の残存

siControl 処理 HDFn 細胞、及び siADAR1 処理 HDFn 細胞の両細胞に 1Gy - 4Gy の X 線を照射し、コロニー形成法により放射線感受性試験を行ったところ、siADAR1 処理 HDFn 細胞では低いコロニー形成率を示すとともに、siControl 処理 HDFn 細胞と比較して高い放射線感受性を示した (図 3)。また、siControl 処理、および siADAR1 処理 HDFn 細胞に放射線照射 (2 Gy, 4Gy) したのち、1 週間培養した際の DNA 二重鎖損傷陽性細胞、微小核陽性細胞の頻度をそれぞれ調べたところ、siADAR1 処理 HDFn 細胞において高い DNA 二重鎖損傷陽性率、および高い微小核陽性率が見られた (図 3)。

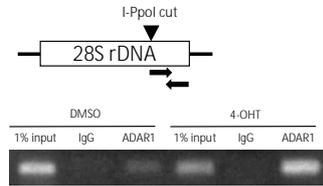


図4. 4-OHT処理した HT1080-Ippo1 細胞におけるChIPアッセイ

最後に、ChIP assay を用いて、4-OHT 処理した HT1080-Ippo1 と未処理の細胞を ADAR1 抗体を用いて免疫沈降し、IPPo1 カuttingサイトのプライマーを用いて PCR を行なったところ、4-OHT 処理した際の ADAR1 と Cuttingサイトの結合が確認された。

これらの結果から、ADAR1 タンパク質は DNA 二重鎖切断損傷に集積するとともに、その修復速度に影響を与えていることが明らかとなった。近年、DNA 損傷部位から短鎖 RNA が作られ、RNAi 生成に関わる Dicer と Ago2 が、DNA 修復に関与していることが報告されており (Wei et al, 2012; Gao et al, 2014)、ADAR1 が DNA 損傷部位から作られる短鎖 RNA を介して DNA 修復に関与している可能性を調べている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) Tan MH, Li Q, Shanmugam R, Piskol R, Kohler J, Young AN, Liu KI, Zhang R, Ramaswami G, Ariyoshi K, Gupte A, Keegan LP, George CX, Huang N, Pollina EA, Leeman D, Rustighi A, Goh YS, The GTEx Consortium, Chawla A, Sal GD, Peltz G, Brunet A, Conrad DF, Samuel CE, O'Connell MA, Walkley CR, Nishikura K, Li JB. Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals. *Nature*, 550, 249-254, 2017 査読有

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西倉和子

ローマ字氏名：(Nishikura Kazuko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。