

平成 21 年 4 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790601

研究課題名（和文） ADAR2 活性を修飾しうる microRNA の検索

研究課題名（英文） Search for microRNA capable of modifying with ADAR2 activity

研究代表者

山下 雄也（YAMASHITA TAKENARI）

東京大学・医学部附属病院・リサーチ・フェロー

研究者番号 20431843

研究成果の概要：孤発性 ALS の運動ニューロン死に深く関わる RNA 編集酵素 ADAR2 活性を *in vitro* で評価するシステムを開発した。その系を用い ADAR2 活性に影響を与えた 3 種の microRNAs を同定した。1 種は ADAR2 活性を賦活したが、2 種の microRNAs は ADAR2 活性を抑える作用があった。後者 2 種の microRNAs は ADAR2 mRNA 対 GluR2 ミニ遺伝子転写物比（酵素対基質量比）依存的に ADAR2 活性を抑制したが、ADAR2 活性賦活の分子メカニズムは明らかにできなかった。microRNAs は ADAR2 活性に効果を与えることが明らかとなり、ADAR2 活性の賦活による孤発性 ALS の治療戦略のツールとして、有用であることが期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	270,000	2,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：ADAR2、RNA 編集、筋萎縮性側索硬化症、microRNA、AMPA 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対して、現在有効な治療方法はなく、根本的な治療方法の開発が急務である。

孤発性 ALS の患者では、脊髄運動ニューロンで選択的にグルタミン酸受容体サブユニットである GluR2 の RNA 編集効率が低下しており、これが神経細胞死の一次原因であると考えられるので、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集を正常化することにより根本治療が可能になると考えられる。

GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は編集酵素であ

る adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) により特異的に触媒され、ADAR2 の酵素活性が低下すると GluR2 の RNA 編集が障害され、神経細胞死に陥る。したがって、ALS 運動ニューロンでは、ADAR2 活性が低下していると考えられる。ADAR2 活性の調節機構は未解明の部分が多いが、ADAR2 には複数の選択的スプライシングヴァリエントが存在し、その発現を通じて酵素活性を調節している可能性が論じられているなど、ADAR2 遺伝子発現レベルとスプライシングヴァリエントなどの発現を通じた酵素活性レベルの

調節機構によりADAR2の酵素活性は調節されている可能性が高い。

他方、microRNAs (miRNAs) の研究は近年目覚ましい速度で進んでおり、日々新しいmiRNAsが報告されている。しかし今回の研究でターゲットとするADAR2の基質であるGluR2 Q/R 部位に関連したmiRNAsに関しては、GluR2 Q/R、R/G部位に結合する人工的に作成したmiRNAsを用いて、それらの部位の編集効率を低下させることが培養細胞系において示されているが、in vivo で同様の機構が作用しているかに関する更なる研究が必要である。

同様に、small nucleolar RNA(snoRNA)が、セロトニン2CレセプターmRNAの選択的スプライシングを制御すること、トゥレット症候群において、hsa miR -189と呼ばれるmiRNAが疾患関連遺伝子の3' UTR領域に結合して遺伝子発現調節を行っていることが示唆されている。ADAR2 mRNAには多数の選択的スプライシングヴァリエントが存在し、その一部のみが活性型の蛋白に翻訳されるメカニズムが知られているが、ADAR2の活性型ヴァリエントの発現を制御するメカニズムにこれらsnoRNAs, miRNAs による選択的スプライシングの制御や遺伝子発現調節機構が関わっている可能性が高いと考えられる。

以上のことから機能性RNAとして働くmiRNAsがADAR2の酵素活性を制御する因子として機能するのではないかと考え、RNA編集機構までを視野に入れてADAR2活性を修飾するmiRNAの同定とその機能解析を行いたい。

## 2. 研究の目的

ADAR2の酵素活性を修飾しうる因子として最も可能性の高い、GluR2Q/R 部位のRNA編集を特異的に修飾するmicroRNAsを検索することである。したがって、ADAR2活性測定のための培養細胞系を開発した上で、ADAR2 の untranslated region (UTR) やGluR2のQ/R部位、GluR2 の exon complementary sequence(ECS) に結合しうるmicroRNAsを予測し、そこから見つかったmicroRNAsを培養細胞に遺伝子導入してADAR2のGluR2 Q/R 部位に対する活性に影響を与えるか検討を行なう。

## 3. 研究の方法

### (1) TetHeLaG2m 細胞の開発

ヒトGluR2の遺伝子の一部、エクソン11、イントロン11の一部、エクソン12、をPCRで増幅後、Tet-on システムの遺伝子発現ベクターであるpTRE-Tightに組み込む。その遺伝子コンストラクトとピューロマイシンセレクションマーカーをテトラサイクリンの発現を抑えた培養細胞株 (HeLa Tet-On Cell Line) に遺伝子導入し、ピューロマイシンを用いセレクションを行い、クローン細胞を作成する。

クローンから目的とする編集率をもつ細胞を選択する。細胞からtotal RNAを抽出しRT-PCR法を用いcDNAを作成する。特異的プライマーを作成し、各サンプル中のGluR2 をPCRで増幅し、GluR2のQ/R 部位のRNA編集率を、制限酵素を利用した系 (バイオアナライザー: アジレント社) で算出しGluR2のQ/R 部位の編集率を測定する。編集率が約50%となる細胞株を選択する。

培養24時間後に、0.1 μMから100 μMの濃度のドキシサイクリンを付加し、48時間後に回収する。Total RNAを回収し、上記と同様に編集率を測定する。ドキシサイクリンによりGluR2 ミニ遺伝子の発現量が増加することを定量PCRにより確認し、あわせてADAR2 mRNAの発現量を測定する。

ADAR1 および ADAR2 の siRNA を遺伝子導入し、GluR2 の Q/R 部位の編集率を測定する。

(2) ADAR2 活性を修飾しうる microRNA の検討データベース (miranda) を用い、ADAR2 の発現に影響しうる microRNAs を検索する。検索した microRNAs を合成し、TetHeLaG2m 細胞に遺伝子導入し、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率を測定することで ADAR2 活性に影響を与える microRNAs を同定する。ADAR2 活性に影響を与えた microRNAs を上記と同様の方法で、GluR2 ミニ遺伝子の発現量が増加することを定量 PCR により確認し、あわせて ADAR2 mRNA の発現量を測定する。

## 4. 研究成果

### (1) in vitro における ADAR2 活性測定システムの開発

培養細胞を用いた in vitro における ADAR2 活性の測定システムを開発した (TetHeLaG2m 細胞)。この細胞が発現するミニ GluR2 遺伝子産物の Q/R 部位における RNA 編集率が ADAR2 活性を反映することを、ADAR2 ノックダウン、ADAR2 遺伝子導入、活性のない変異 ADAR2 遺伝子導入により確かめた。TetHeLaG2m 細胞はヒト由来の細胞であり、ADAR2 活性賦活を目的とした孤発性 ALS の治療薬のスクリーニング系としても適している。

### (2) ADAR2 活性を修飾しうる microRNA の検索と同定

データベース (miranda) を用い ADAR2 の untranslated region (UTR) や GluR2 の Q/R 部位、GluR2 の exon complementary sequence(ECS) に結合しうる microRNAs を検索し、24 種の候補 microRNAs を得た。その検索した microRNAs を合成し、RNA 編集率測定培養細胞株 TetHeLaG2m に遺伝子導入し、編集率の変化を測定した。3 種の miRNAs で GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が変化した。

ADAR2 の酵素活性を変化させた分子メカニズムの検討のために、ADAR2 mRNA、GluR2 ミニ遺伝子転写物の発現レベルの定量を行なった。2 種の miRNAs は ADAR2 活性を抑える作用があり、その分子メカニズムが、ADAR2 mRNA 対 GluR2 ミニ遺伝子転写物比(酵素対基質量比) 依存的であることを明らかにした。1 種の miRNAs には ADAR2 活性賦活作用があったが ADAR2 mRNA、GluR2 ミニ遺伝子転写物の発現レベルに変化は無かった。このことから ADAR2 活性には報告されている ADAR2 mRNA の発現量以外にも ADAR2 活性を制御する因子があることが示唆された。

miRNAs に ADAR2 活性賦活作用があることが明らかとなり、孤発性 ALS の治療に繋がると考えられた。今後はこの系を用い ADAR2 の酵素活性を上昇させた miRNAs の効果について in vivo での検討を行う必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Sawada J, Yamashita T, Aizawa H, Aburakawa Y, Hasebe N, Kwak S: Effects of antidepressants on GluR2 Q/R site RNA editing in modified HeLa cell line. *Neurosci. Res.* in press, 2009. 査読有

Kwak S, Nishimoto Y, Yamashita T: Newly identified ADAR2 mediated editing positions as a useful tool for ALS research. *RNA Biology* 5:193-197, 2008. 査読有

Nishimoto Y, Yamashita T, Hideyama T, Tsuji S, Suzuki N, Kwak S: Determination of editors at the novel A-to-I editing positions, *Neurosci. Res.* 61(2), 201-206, 2008. 査読有

[学会発表](計 16 件)

Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Hideyama T, Kimura D, Suzuki T, Kwak S, Regulation mechanism of GluR2 Q/R site editing in cultured cell lines, Society for neuroscience 38th Annual Meeting, Washington, DC, November 17, 2008, 445-13

Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi R, Misawa H, Suzuki T, Kwak S: Slow neuronal death of motor neurons in sporadic ALS mouse model by RNA editing enzyme ADAR2 knockout. 38th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, 15-19 November 2008

Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi R, Misawa H, Suzuki T, Kwak S: Slow death of motor neurons in sporadic ALS mouse model by conditional targeting of RNA editing enzyme ADAR2. The 19<sup>th</sup> International Symposium on MND/ALS. 2008, Birmingham, 3-5 Nov, 2008.

Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi R, Misawa H, Suzuki T, Kwak S: Sporadic ALS model mice by RNA editing enzyme abnormality. 6<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience Forum 2008 Geneve, July 12-16, 2008

山下雄也, 只見智恵子, 西本祥仁, 日出山拓人, 木村大輔, 鈴木岳之, 郭伸: 培養細胞による GluR2 Q/R 部位の編集制御機構. 第 31 回神経科学大会, Neuro2008, 東京 July 9-11, 2008.

郭伸, 日出山拓人, 山下雄也, 辻省次, 高橋良輔, 三澤日出巳, 木村大輔, 鈴木岳之: RNA 編集異常による孤発性筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの作製. 第 31 回神経科学大会, Neuro2008, 東京 July 9-11, 2008.

澤田潤, 相澤仁志, 山下雄也, 油川陽子, 長谷部直幸, 郭伸: AMPA 受容体サブユニット GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集率に及ぼす各種薬剤の効果. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 15-17 May 2008

日出山拓人, 西本祥仁, 山下雄也, 辻省次, 高橋良輔, 三澤日出巳, 鈴木岳之, 郭伸: RNA 編集異常による孤発性 ALS モデルマウスの開発. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 15-17 May 2008

Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Kimura D, Suzuki T, Kwak S, Establishment of a novel HeLa cell line stably expressing the half-edited GluR2 transcript., Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, No. 591.16., San Diego, California, 3-7 November 2007

Hideyama T, Yamashita T, Tsuji S, Takahashi R, Misawa H, Suzuki T, Kwak S, Death of motor neurons in mice deficient in an RNA editing enzyme, *Amiotroph Later Sci*, P153, Tronto, Canada, 3-7 November 2007

山下雄也, 只見知恵子, 西本祥仁, 木村大輔, 鈴木岳之, 郭伸, Tet on システムを利用した RNA 編集活性測定株の樹立, 第 50 回日本神経化学会(横浜)大会合同大会 Neuro2007, P1-j01, 横浜, 10-12 September 2007

郭伸, 日出山拓人, 西本祥仁, 山下雄也, 辻省次, 高橋良輔, 三澤日出巳, 鈴木岳

之、RNA 編集異常による孤発性 ALS モデルマウスの開発、第 30 回日本神経科学会合同大会 Neuro2007、P1 h47、横浜、10 -12 September 2007

Hideyama, T, Nishimoto, Y, Yamashita, T, Tsuji, S, Takahashi, H, Kakita, A, Suzuki, T, Kwak, S, Alteration of RNA editing and neuronal death in motor neuron diseases., ENS 2007, No. 700., Rhodes, 16 -20 June 2007

日出山拓人、西本祥仁、山下雄也、伊藤杏子、辻省次、高橋良輔、三澤日出巳、鈴木岳之、郭伸、孤発性筋萎縮性側索硬化症のRNA編集異常、第48回日本神経学会総会、No. 10022、名古屋、16 -18 May 2007

西本祥仁、日出山拓人、山下雄也、鈴木則宏、郭伸、孤発性ALSのバイオマーカーの開発、第48回日本神経学会総会、P -10122、名古屋、16 -18 May 2007

只見智恵子、木村大輔、伊藤杏子、山下雄也、鈴木岳之、郭伸、グリオーマ細胞におけるAMPA受容体サブユニットGluR2の RNA編集率の検討、第80回日本薬理学会年会、No. 10300、名古屋、14 -16 March 2007

〔図書〕(計 2 件)

山下雄也、郭伸：グルタミン酸受容体と神経細胞死、神経変性疾患のサイエンス、南山堂、pp 91 -102, 2007

Kwak S, Hideyama T, Yamashita T: AMPA receptor mediated neuronal death in motor neuron diseases. In: *Amino Acid Receptor Research*, Eds. Paley BF, Warfield TE, Nova Science Publishers Inc. NY. pp 293 -310, 2008.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山下 雄也 (YAMASHITA TAKENARI)

東京大学・医学部附属病院・リサーチ・フェロー

研究者番号：20431843

(2)研究分担者

(3)連携研究者