

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20H03341
研究課題名（和文）RNA編集酵素ADAR1の脳特異的機能の解明

研究課題名（英文）Investigation of brain-specific roles of ADAR1

研究代表者

河原 行郎（Kawahara, Yukio）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80542563

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：RNA編集酵素ADAR1にはp150とp110の2つのアイソフォームがある。このうちp110は、特に脳に高発現しており、本研究は、その役割を解明することを目的に実施した。ADAR1 p110選択的欠損マウスや神経細胞特異的ADAR1欠損マウスなどを作成して表現型等を解析した。その結果、p110が生後直後の脳神経系の恒常性維持に重要な役割を果たしていること、それにはRNA編集非依存的な機能が不可欠であることを解明した。一方、ADAR1 p150によるRNA編集機能の障害も特に脳に強い障害を引き起こすことを解明したことから、両アイソフォームの異なる機能が脳の恒常性維持に必須であると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADAR1遺伝子変異は、脳症を主症状としたエカルディ・グティエール症候群と呼ばれる先天性炎症性疾患の原因となることが知られている。今回の一連の研究を通して、この発症原因はADAR1 p150の機能低下であり、p110は関与しないことを明らかにした。また、脳症を再現するモデル動物の作出にも成功したことから、今後の病態解明と治療法確立に役立つことが期待できる。また、ADAR1の機能阻害はがん治療標的としても注目されているが、本研究を通してADAR1の2つのアイソフォームの機能の相違を明らかにできたことから、今後の阻害薬開発に役立つことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The adenosine-to-inosine RNA editing enzyme ADAR1 is composed of two isoforms, p150 and p110. Although ADAR1 p110 is ubiquitously expressed, it is remarkably abundant in the brain. However, the role of ADAR1, especially ADAR1 p110, in the brain remains unknown. In this study, to analyze the functions of ADAR1 p110, we established ADAR1 p110-specific knockout and neuron-specific ADAR1 knockout mice and analyzed their phenotypes. Consequently, we found that ADAR1 p110 plays an important role in the maintenance of homeostasis in the brain during post-natal stages via its RNA-edit-independent function. On the other hand, we also elucidated that the impaired RNA editing function of ADAR1 p150 also causes severe brain damage. Thus, we concluded that the different functions of both ADAR1 p110 and p150 isoforms are essential for the maintenance of brain homeostasis.

研究分野：RNA生物学、神経科学

キーワード：RNA修飾 発生・分化 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

近年の技術革新により、RNA に多様な化学修飾が施されている実態が明らかとなった。中でも、2 本鎖 RNA 中のアデノシンをイノシンへと置換する RNA 編集 (図 1) は、哺乳類において最も豊富に生じている化学修飾であり、特に脳において高頻度に生じているが、RNA 編集が脳の形成や機能の維持に果たす役割については、まだ部分的にしか解明されていない。

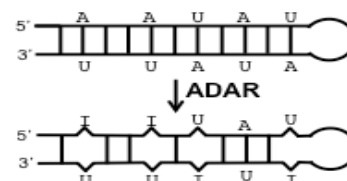


図1: 2本鎖RNAに生じるRNA編集

ヒトやマウスにおける RNA 編集は、ADAR1 と ADAR2 という 2 種類の酵素によって触媒される (図 1, 2)。どちらの酵素も 2 本鎖構造を認識するため、その標的の多くは SINE や LINE などの反復配列どうしによって形成される 2 本鎖構造内に認められる。ADAR1 には、細胞質に局在する p150 と核に局在する p110 の 2 種類のアイ

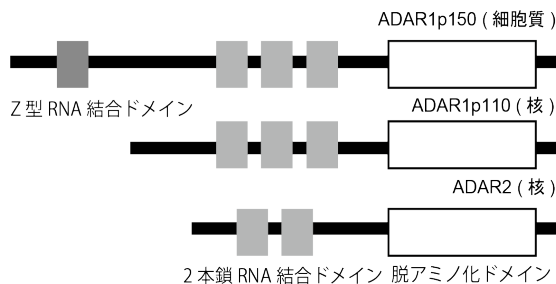


図 2: 哺乳類 ADAR ファミリーの構造と局在

ソフォームがあり、同じ遺伝子座から異なるプロモーターによって転写される (図 2, 3)。ADAR1 欠損マウスや ADAR1 p150 選択的欠損マウスは胎生致死を呈するが、細胞質に局在する



図 3: ADAR1 遺伝子の転写開始部位

ウイルス RNA センサー分子 MDA5 を同時に欠損させると、胎生致死を回避できる (Pestal et al, Immunity, 2015)。これらの知見は、内在 2 本鎖 RNA が MDA5 によって異物と誤認され免疫応答が惹起しないように、p150 を介した RNA 編集は、非コード領域中にある反復配列間で生じる 2 本鎖 RNA 構造を緩める役割を果たしていることを示唆している。ADAR2 欠損マウスにはこうした症状を認めない。また、ADAR1 遺伝子変異は、エカルディ・グティエール症

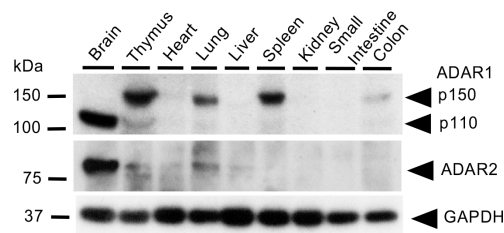


図4: 臓器別ADAR発現量

候群 (AGS) と呼ばれる脳症とインターフェロン過剰産生を伴った先天的炎症性疾患の原因となる (Rice et al, Nat Genet, 2012)。しかし、脳には ADAR1 p150 はほとんど発現しておらず (図 4)、脳症に至る機構は不明である。その一方で、脳には ADAR1 p110 が高発現しているが、その機能は特定されていない。特に、ADAR1/MDA5 2 重欠損マウスは、胎生致死を回避できるものの生後まもなく (P1) 死亡してしまうが、ADAR1 p150/MDA5 2 重欠損マウスは、生後数週間は生存できる (Pestal et al, Immunity, 2015)。これらの知見から、p110 が p150 とは異なる機能を有し、特に脳特異的な役割を果たしているのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

脳に特に高発現する ADAR1 p110 の生理的重要性を解明することを本研究の目的とした。特に、AGS の主症状である脳症は、p110 と p150 のどちらの機能不全に起因するのかを含め、脳における両アイソフォームの機能的差異を明確にすることを最終目標とした。

3. 研究の方法

ゲノム編集により、ADAR1 p110 と ADAR1 p150 に特異的なプロモーター領域と第 1 エクソン

(図3)を欠損させることで、ADAR1 p110 選択的欠損マウスと ADAR1 p150 選択的欠損マウスを作成した。また、AGS 型点変異を脱アミノ化ドメインに挿入した ADAR1 (K948N) 変異マウス、ADAR1 p150 にしかない Z 型 RNA 結合ドメイン(図2)に機能喪失型点変異を挿入した ADAR1 (W197A) 変異マウスも作成した。また、Tau-Cre ノックイン (KI) マウスと ADAR1 flox マウスを交配し、神経細胞特異的 ADAR1 欠損マウスを作成した。これら遺伝子改変マウスの生存率や体重などの表現型を解析するとともに、HE 染色などの病理学的解析を行った。また、MDA5 欠損マウスやすでに保有している活性喪失型点変異を持つ ADAR1 (E861A) 変異マウスと交配し、症状の変化を観察した。更に、脳など各臓器から RNA を抽出し、インターフェロン誘導遺伝子群 (ISGs) の発現を定量 RT-PCR 法で計測した。また、研究分担者(加藤有己)が網羅的シーケンス解析によって RNA 編集率の変化を定量解析した。

4. 研究成果

(1) ADAR1 p110 の欠損は、生後直後の高死亡率を引き起こす

はじめに、Tau-Cre ノックイン (KI) マウスと ADAR1 flox マウスを交配し、神経細胞特異的 ADAR1 欠損マウスを作成した。その結果、本マウスはすべて生後直後 (P0) に死亡することが判明した。このマウスでは、脳の ISGs の発現が上昇していた。しかし、このマウスと MDA5 欠損マウスを交配しても、高死亡率を完全回避することはできなかった。これらの結果から、脳では、ADAR1 p110 と ADAR1 p150 が異なる役割を果たしていることが示唆された。

そこで次に、ADAR1 p110 選択的欠損マウスを作成した (Kim et al, PLoS Genet, 2021)。本マウスは、生後直後の体重は正常であったが、その後成長障害と高い死亡率を呈することが判明した (図5)。約2

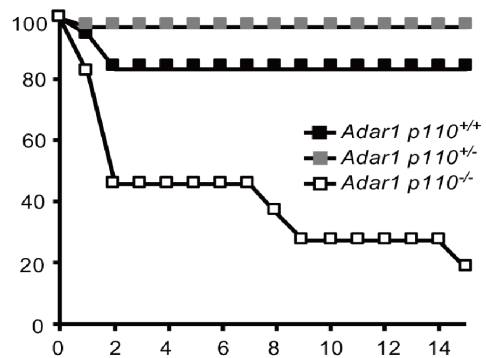


図5: ADAR1 p110 欠損マウスの生存率

週間で80%が死亡に至った。しかし、約20%は1年以上の長期に渡って生存し、生殖機能も正常であった。このため、ADAR1 p110 は、生後直後から2週程度の間で重要な役割を果たしているものと考えられた。詳細な脳や様々な臓器の病理学的解析を行ったが、明確な異常を捉えることはできなかった。また、ADAR1 p110 選択的欠損マウスでは ISGs の発現上昇は認めなかった。更に、ADAR1 p110/ADAR2 2 重欠損マウスにおいても ISGs の発現は正常であった (図6)。ADAR1 p110 選択的欠損マウスを MDA5 欠損マウスと交配しても、生後直後の高死亡率は改善できなかった。その一方で、ADAR1 (E861A) 変異マウスと交配すると、生後

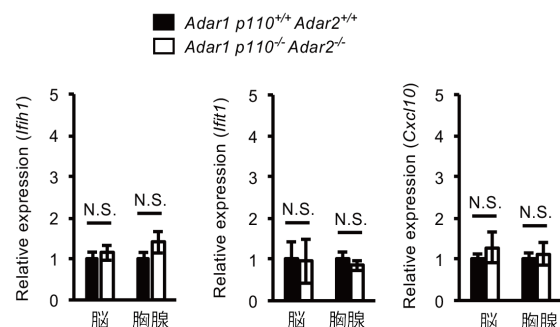


図6: ADAR1 p110/ADAR2 欠損マウスの ISGs

(2) 脳に低発現する ADAR1 p150 は、恒常性維持に必須の役割を果たす

ADAR1 p110/ADAR2 2 重欠損マウスの各臓器における RNA 編集率を解析したところ、野生型マウ

スで認めた RNA 編集部位の約 99%が消失するものの約 1%は残存した (Kim et al, PLoS Genet, 2021)。特に、RNA 編集率が全く低下しない部位を認め、これらの部位は ADAR1 p150/MDA5 2 重欠損マウスでは完全消失していた。これらの結果から、ADAR1 p150 は脳での発現量は極めて少ない (図 4) が、RNA 編集に貢献していることが明らかとなった。

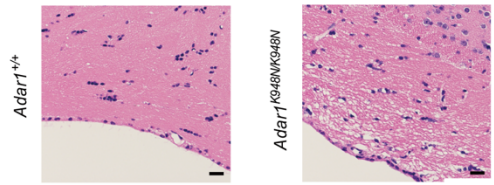


図 7: ADAR1(K948N) マウスの脳 HE 染色像

そこで、次に AGS 型点変異を脱アミノ化ドメインに挿入した ADAR1 (K948N) 変異マウスを作成した。本マウスでは、予想通り RNA 編集率が低下していた (Inoue et al, J Immunol, 2021)。軽度の成長障害を認めたが、生存率には影響しなかった。しかし、肝臓などに炎症を認め、加齢とともに増悪した。また、1 年齢に達すると、脳白質の密度が低下し (図 7)、アストロサイトやミクログリアが異常活性化していた。更に脳をはじめとした各臓器で ISGs の発現が上昇していた。こうした ISGs の発現上昇は、MDA5 欠損マウスや ADAR1 p110 選択的欠損マウスとの交配で正常化した。以上の結果から、ADAR1 (K948N) 変異マウスでは遅発性に AGS 様脳症を呈すること、その原因として ADAR1 p150 の機能低下が強く示唆されたことから、脳の恒常性維持には、ADAR1 p110 と ADAR1 p150 の異なる機能が必要不可欠であることが明らかとなった。

(3) ADAR1 p150 の機能低下は、マウスに AGS 様脳症を誘発する

ADAR1 (K948N) 変異マウスでは、p110 と p150 の両アイソフォームの RNA 編集機能が低下する。様々な解析結果から ISGs 発現上昇と遅発性脳症発症は、ADAR1 p150 の機能低下が主因と考えられたが、これを更に明確にするため、ADAR1 p150 にしかない Z 型 RNA 結合ドメイン (図 2) に機能喪失型点変異を挿入した ADAR1 (W197A) 変異マウスを作成した (Nakahama et al, Immunity, 2021)。本マウスは、生後直後の体重は正常であったが、その後著明な成長障害を呈し、約 6 週間で半数が死亡した (図 8)。ISGs は各臓器で発現上昇していたが、特に脳で高値を示した。6 週齢で、白質密度の低下、脳室拡大などの AGS 様脳症を認め、アストロサイトやミクログリアが異常活性化していた。これらの異常は MDA5 欠損マウスとの交配で消失した。以上の結果から、ADAR1 (W197A) 変異マウスでは早期に AGS 様脳症を呈することが判明した。脳の恒常性維持において、ADAR1 p150 は RNA 編集を介して MDA5 の異常活性化を回避する役割を果たし、ADAR p110 は RNA 編集非依存的な役割を果たしていると結論付けた。

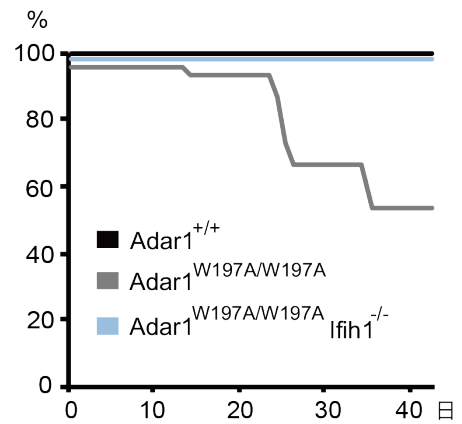


図 8: ADAR1(W197A) マウスの生存率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakahama Taisuke, Kato Yuki, Shibuya Toshiharu, Inoue Maal, Kim Jung In, Vongpipatana Tuangtong, Todo Hiroyuki, Xing Yanfang, Kawahara Yukio	4. 巻 54
2. 論文標題 Mutations in the adenosine deaminase ADAR1 that prevent endogenous Z-RNA binding induce Aicardi-Goutieres-syndrome-like encephalopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 1976 ~ 1988.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2021.08.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakahama Taisuke, Kawahara Yukio	4. 巻 22
2. 論文標題 Deciphering the Biological Significance of ADAR1-Z-RNA Interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11435 ~ 11435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222111435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Maal, Nakahama Taisuke, Yamasaki Ryuichiro, Shibuya Toshiharu, Kim Jung In, Todo Hiroyuki, Xing Yanfang, Kato Yuki, Morii Eiichi, Kawahara Yukio	4. 巻 207
2. 論文標題 An Aicardi-Goutieres Syndrome-Causative Point Mutation in Adar1 Gene Invokes Multiorgan Inflammation and Late-Onset Encephalopathy in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3016 ~ 3027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100526	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 中濱 泰祐、河原 行郎	4. 巻 40
2. 論文標題 RNAの巻き方を感知する自然免疫システム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 544 ~ 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/6991-00001-0000065-00	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 河原 行郎	4. 巻 39
2. 論文標題 RNA編集を応用した核酸医薬開発への展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学(増刊)	6. 最初と最後の頁 2772~2778
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jung In Kim, Taisuke Nakahama, Ryuichiro Yamasaki, Pedro Henrique Costa Cruz, Tuangtong Vongpipatana, Maal Inoue, Nao Kanou, Yanfang Xing, Hiroyuki Todo, Toshiharu Shibuya, Yuki Kato, Yukio Kawahara	4. 巻 17(5)
2. 論文標題 RNA editing at a limited number of sites is sufficient to prevent MDA5 activation in the mouse brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009516
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 河原 行郎	4. 巻 28(6)
2. 論文標題 エピトランスクリプトーム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 546-550
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakahama Taisuke, Kawahara Yukio	4. 巻 35
2. 論文標題 The RNA-editing enzyme ADAR1: a regulatory hub that tunes multiple dsRNA-sensing pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 123~133
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中濱 泰祐、河原 行郎	4. 巻 77(6)
2. 論文標題 RNAのイノシン化修飾の破綻はエカルディ・グティエール症候群様症状を引き起こす	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 737-743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 河原 行郎	4. 巻 78(1)
2. 論文標題 左巻きRNAを認識する自然免疫機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 111-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中濱 泰祐、河原 行郎	4. 巻 40(15)
2. 論文標題 RNA制御とI型インターフェロノパシー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学 (増刊)	6. 最初と最後の頁 2505-2512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yukio Kawahara
2. 発表標題 Deciphering the biological significance of ADAR1-Z-RNA interactions
3. 学会等名 A, B and Z: The Structure, Function and Genetics of Z-DNA and Z-RNA 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Kawahara
2. 発表標題 The physiological significance of RNA editing in maintaining brain homeostasis
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原 行郎
2. 発表標題 RNA編集研究の最前線：基礎、病態、そして治療法への応用について
3. 学会等名 核酸医薬シンポジウム2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原 行郎
2. 発表標題 RNA編集酵素ADAR1による自然免疫制御の新たな展開
3. 学会等名 第7回日本骨免疫学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taisuke Nakahama, Yukio Kawahara
2. 発表標題 Regulatory Mechanisms underlying ADAR1 p150-mediated RNA editing
3. 学会等名 A, B and Z: The Structure, Function and Genetics of Z-DNA and Z-RNA 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学医学系研究科神経遺伝子学教室
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/rna/publications.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 有己 (Kato Yuki) (10511280)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	The University of Melbourne			
中国	Chinese Institute for Brain Research			