

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19599003
 研究課題名（和文） 孤発性筋萎縮性側索硬化症における RNA 編集新規基質の探索とバイオマーカーの開発
 研究課題名（英文） Screening for new substrate and development of bio-marker for RNA editing enzyme in sporadic amyotrophic lateral sclerosis
 研究代表者
 詫間 浩（TAKUMA HIROSHI）
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
 研究者番号：00326258

研究成果の概要：

孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）では、グルタミン酸受容体サブユニットのRNA編集異常が発症に関与し、編集酵素ADAR2の活性低下によると推定されている。未知のADAR2の基質が重要な役割をしているものと考えられ、本研究ではADAR2の基質となる新規RNA分子の同定を試みた。ヒト小脳からADAR2結合RNAを抽出し、マイクロアレイにより解析した。分析を行った候補遺伝子配列からは編集部位と思われる塩基置換は認められなかった。本研究でADAR2の基質候補となるデータベースを構築しており、今後のRNA編集機構ならびにALS発症メカニズムの研究の加速を保証した点は重要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経分子病態学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症、RNA 編集、新規基質、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の多くはその発症機構が未だ解明されておらず、根治的治療を難しくさせている。代表的な疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）は脊髄運動ニューロン・上位運動ニューロンが選択的に侵され脱落していき、意識ははっきりとした中、死に至るという極めて熾烈な緩徐進行性の疾患である。ごく一部の家族性ALSでは原因遺伝子が同

定されているが、大部分を占める孤発性ALSではその原因は確立したものがなかった。

遺伝子からmRNAが形成される過程で、遺伝情報が書き換えられることをRNA editing（編集）と呼ぶが、本研究代表者は孤発性ALSの運動ニューロンでグルタミン酸受容体（GluR-Bサブユニット）の編集異常（GluR-B editing deficiency）を初めて報告した（Takuma et al., *Ann Neurol*1999）。このことは共同

研究者達により単一細胞レベルでも確認されている (Kawahara et al., *Nature* 2005)。このGluR-B遺伝子のRNA編集はADAR (adenosine deaminase acting on RNA)という酵素で触媒される。哺乳類ではADAR1-3の3種類が知られているが、GluR-Bの編集はADAR2により触媒されることが動物脳で示されており、ヒト脳でも同様であると考えられる。このADAR2の発現が孤発性ALS患者運動ニューロンで低下していることも示唆されており (Kawahara & Kwak, 2005)、ALSにおけるGluR-BのRNA編集異常は、編集酵素ADAR2の活性低下によると推定される。しかしながら、ADAR2活性低下あるいはGluR-B編集異常が運動ニューロンの細胞死を引き起こすメカニズムは不明のままである。

グルタミン酸受容体サブユニットのうちチャンネルのCa²⁺透過性を決定するのはGluR-Bである。GluR-Bを含むAMPA受容体のCa²⁺透過性は低く、1つも含まないと透過性が高い。また未編集のGluR-Bを含むAMPA受容体はCa²⁺透過性が高いので、RNA編集率の低下は、編集型GluR-Bの減少と同様、AMPA受容体のCa²⁺透過性を高める。GluR-B編集異常により起こる神経細胞内へのカルシウム流入の増加が細胞死に関係している可能性がある。

この仮説を検証するために研究代表者はP.H. Seeburg教授 (ドイツ・Max-Planck医学研究所) の下でGluR-B遺伝子の改変により、脊髄運動ニューロン特異的にGluR-Bの編集が極端に低下したマウス、脊髄運動ニューロン特異的にGluR-B遺伝子欠失マウスを作成し、運動ニューロン特異的にカルシウム流入が増加したモデルマウスについて解析した。しかし生後1年半経過しても運動機能異常は起こらず、細胞死も認められなかった (2007年日本神経学会ポスター)。

この結果から、本研究代表者はADAR2、はグルタミン酸受容体編集以外の作用を通じて脊髄運動ニューロンに致死的な作用を及ぼしているものと考えに至った。ADAR2の基質となるRNAはGluR-B遺伝子以外にも他のAMPA型・カイニン酸型グルタミン酸受容体遺伝子、セロトニン受容体遺伝子 (5-HT_{2c}) などが同定されているが、これらの基質の編集が低下しても細胞死に至るとは考えにくく、このため未知のADAR2の基質が重要な役割をしているものと考えられる。

2. 研究の目的

- (1) ADAR2に結合する新規RNA分子の同定
ADAR2はRNAがループ状になった2本鎖

部分に結合し塩基置換を行う。本課題ではADAR2の新規基質RNAの候補遺伝子を同定するため、組織よりADAR2が特異的に結合するRNAを回収し、その同定を行う。RNAの回収・同定は脊髄運動ニューロンでは量的に難しいと思われるので、ADAR2の発現が多いヒト小脳組織を用い、免疫沈降法によりADAR2に結合したRNAを回収する。これをマイクロアレイを用いて解析し遺伝子を同定する。この方法は既に確立されており

(Ohlson J et al, *Nucleic Acids Research*, 2005)、複数の新規ADAR2結合RNA分子が同定できると期待される。さらに、得られたRNAならびに産物であるタンパク質のALS患者脊髄およびコントロール脊髄での組織分布、細胞内分布を*in situ*ハイブリダイゼーション、免疫組織学的手法により検討することにより、ヒト運動ニューロンで機能していることが示唆される遺伝子を選出する。

- (2) 候補遺伝子のRNA編集異常と神経細胞死との関与の検討

siRNAベクターを用いて培養細胞 (*in vitro*) においてADAR2の機能低下を誘導できる培養細胞株およびマウス運動ニューロン初代培養細胞系を確立する。これらの細胞に候補遺伝子のRNA編集型 (Edited form) を発現させ、細胞死が阻害されるものを選択する。

- (3) ALSバイオマーカーの確立

上記の基礎的な解析を十分に行うことによりADAR2機能を介した脊髄運動ニューロン死のメカニズムに迫ることができる。しかしながら、本研究では臨床的な検討を優先するため、同定遺伝子がヒトで実際に機能し、その異常が運動ニューロン死をもたらすことを確認することに重点を置く。これらの検討により絞り込まれた候補遺伝子について、患者・コントロール群末梢血リンパ球における発現量、編集・未編集率を比較しバイオマーカーを確立する。

3. 研究の方法

- (1) ADAR2結合体の単離・同定
①ADAR2結合RNAの分離

ADAR2は二重鎖を形成しているRNA部位に結合するが、ランダムに結合するのではなく、編集が行われるサイトに親和性が高い (Klaue Y et al., 2003)。この性質を利用し、ADAR2抗体を用いた免疫沈降法により結合するRNA複合体を回収する。

材料としては、ヒト小脳組織を用いる。ホモジェナイザーを用いて破碎し、DNA分解酵素 (DNase I) で処理した細胞抽出液からADAR2を特異的抗体 (N端もしくはC端に対

する抗体；Santa Cruz社）を用いて免疫沈降法により回収する。ADAR2の回収率をウエスタンプロットにより確認した上で、タンパク分解酵素（Proteinase K）処理およびフェノール/クロロフォルム法を用いて蛋白質を除去し、RNAを回収する。このRNAを用いてSuperScriptII（GibcoBRL, Grand Island, NY）によりcDNAを合成する。RNAの分離およびcDNA合成の成否を検証するために、既知のADAR2の基質であるGluR-B遺伝子、Kv1.1遺伝子に対するプライマーを用いてPCRを行い、回収されたRNAの中にこれらの遺伝子が含まれていることを確認する。その上で、得られたcDNAをマイクロアレイにより解析し、単離された遺伝子群を同定する。

②同定したADAR2結合RNAの解析

1) 新規ADAR2結合RNAのヒト神経組織での発現とRNA編集の解析

RNA編集はループ状になった二本鎖RNAがalu配列内にある部位で行われる事が知られており（Kim DDY, Genome Res, 2004; Levanon EY, Nuc Acid Res, 2005）、解析ソフトにより塩基配列を解析することにより、予想される適合部位を検索することが可能である。（1）で得られた新規ADAR2結合RNAについて編集候補部位を検索し、ヒト組織での発現・RNA編集の有無を検討する。材料としては正常小脳、正常脊髄前角組織を用い、Trizol（Invitrogen）を用いてRNAを抽出し、RT-PCR法により新規基質が発現していることを確認する。さらにRT-PCRで得られる産物のシーケンス（ABI310）を行い、ゲノムDNAと配列を比較することにより、編集が行われているかを検証する。

RNA編集が確認された遺伝子について以下の解析を進める。

2) 新規に同定されたRNA編集が行われる遺伝子のヒト組織内での発現分布の解析（*in situ*ハイブリダイゼーション法および免疫組織染色法）

正常小脳、孤発性ALS患者小脳組織において新規候補遺伝子の分布、発現を*in situ*ハイブリダイゼーション法により比較する。次に脊髄組織を用い、同様に分布、発現を比較する。さらに、抗体が入手可能であるものについては直ちに正常・患者の小脳・脊髄組織において免疫染色を行い、タンパク質レベルでの分布、発現についても解析する。また入手できないものについては大腸菌で抗原蛋白質を発現・精製するか抗原ペプチドを合成し、ウサギを用いてポリクローナル抗体を作成する。

1) 2) により候補遺伝子が実際にヒト組織内発現しどのように分布しているかを孤発性ALSと正常脳を比較して知ることができる。

3) 機能解析：細胞内でのADAR2作用の検討
i) ADAR2機能低下を誘導可能な培養細胞系、マウス運動ニューロン初代培養細胞系の確立（*in vitro*）

ADAR2のsiRNA ウイルスベクターを作成し（BLOCK-iT Adenoviral RNAi Expression System; Invitrogen）、ADAR2のノックダウン（RNAi）を誘導できる培養細胞系もしくはマウス運動ニューロン初代培養細胞系を確立する。培養細胞はSK-N細胞、HEK細胞、PC12細胞、HeLa細胞などから新規基質の発現をRT-PCRにより確認し選択する。RNAiを誘導する前の細胞と誘導後の細胞からtotal RNAを回収し、mRNAもしくはpre-mRNAよりcDNAを合成する。新規候補遺伝子の編集部位特異的プライマーを用いてRT-PCRを行ない、シーケンスを行うことによりADAR2のRNAiがRNA編集効率に影響を与えるかを検討する。

ii) ADAR2ノックダウンによる細胞死誘導における新規基質のRNA編集の関与の検討（レスキュー；*in vitro/in vivo*）

候補遺伝子がADAR2によりRNA編集され、その編集低下がADAR2ノックダウンによる細胞死の原因であるならば、編集後型（Edited form）の候補遺伝子が発現させることによりその細胞死を抑制できるはずである。
i) で確立したADAR2ノックダウン・神経細胞死誘導系を用い、候補遺伝子の中からその編集後型遺伝子の導入が細胞死を抑制できる遺伝子をスクリーニングする。さらに細胞死抑制活性を持つものについては、連携研究者（郭）が作成中のADAR2ノックアウトマウスの脊髄にウイルスを注入し、脊髄運動ニューロン死の抑制効果の検証を行う。この生体内（*in vivo*）での解析は候補遺伝子がALSにおける運動ニューロン死をもたらす原因遺伝子である可能性についてより直接的な示唆を与えるものである。研究代表者は抗ChAT抗体（Chemicon）により免疫染色をすることにより、培養系ならびに脊髄組織において脊髄運動ニューロン死を定量する事には習熟している。

細胞への遺伝子導入効率やsiRNA設計の問題でこの機能解析が計画通りに進まない可能性がある。その場合にはバイオマーカーの確立を優先するため、拘泥することなく臨床検体での確認を進めることとする。

(2) 臨床的検討

①候補基質の末梢血での確認

臨床的には末梢血を用いたスクリーニングが可能なバイオマーカーが有用である。そこで、候補遺伝子のリンパ球中での検出感度を検討する。孤発性ALS患者群（10例）、疾患コントロール群（他の神経変性疾患患者10例）、正常群（10例）において末梢血を採取しリンパ球からmRNA（もしくはpre-mRNA）を回収し、既に同定した候補遺伝子特異的なRT-PCRを行なう。これによりまず候補遺伝子のリンパ球中での存在量を確認する。

②患者・コントロール群間での比較

候補基質がADAR2による編集により、ある制限酵素認識部位が新しく生まれたり、破壊されたりする場合は、RT-PCR産物を制限酵素で処理することで異常編集の迅速簡便な検出が可能となる。これにより基質の編集率を群間で比較する。また、編集・未編集mRNAの定量のために、タックマン・プローブを使った定量的PCRを確立する。基質の発現自体が変化している可能性もあるが、その場合も本法により検証可能である。

本過程において1で得られたいくつかの候補基質がバイオマーカーとして臨床的に使用可能かどうか明らかになる。ここで得られるバイオマーカーは、孤発性ALSの早期診断に結びつくだけでなく、これにより様々な病態が混在しているALSの疾患概念を整理することが可能になり、系統的な治療法開発への道が拓ける。

4. 研究成果

(1) 脳組織より ADAR2 結合 RNA 複合体抽出法の確立

まずラット脳、マウス脳を用い、免疫沈降法によるRNA複合体の回収効率、抗体添加条件などを検討した。ショ糖濃度勾配を用い、130,000 x gにて超遠心を行い、分画した。これにより核分画を得ることができ、79µg/g・brainのRNAを抽出しえた。また抗ADAR2抗体（E-20; SantaCruz）により免疫沈降法を行った結果1.8µg/g・brainのADAR2結合RNAを得ることができた。

ヒト小脳（正常）を用い、同様の方法で核分画よりRNAを抽出し、抗ADAR2抗体にて免疫沈降を行った。その結果、BioanalyzerにてRNA濃度が25 ng/µlと13 ng/µlの2サンプルを得ることができた。またこれらサンプルには既知のADAR2基質であるGluR-Bならびにkv1.1が含まれていることがRT-PCRにて確認された。

(2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析 マイクロアレイ・チップ（東レ3

D-GeneHuman Oligo chip 25K（ヒト全遺伝子型DNAチップ）を用い、得られたRNAの発現強度を解析した。免疫沈降を行わなかったサンプルをコントロールとし、免疫沈降を行ったサンプルにおいて、発現強度が上昇しているものを抽出し、2サンプルで再現性のある56遺伝子を得た。

(3) 発現遺伝子のシーケンス解析

上記の56遺伝子の中より、その既知の分布が核内であるもの18遺伝子を選出した。RT-PCRを行い、cDNAをシーケンスした。またそれらの遺伝子のゲノムデータベースを得、先に得られたcDNA（mRNA）の配列と比較検討した。

検討した遺伝子のなかでは、期待された塩基置換を起こし、RNA編集が行われていると考えられる部位は同定できなかった。しかし、今回得られたマイクロアレイによる遺伝子発現情報は、ADAR2の基質候補となるデータベースを構築しており、今後のRNA編集機構ならびにALS発症メカニズムの研究の加速を保證した点は重要である。

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12件）

1. Takuma H, Teraoka R, Mori H, Tomiyama T. Amyloid β E22D variant induces synaptic alteration in mouse hippocampal slices. *Neuroreport*. 2008;19(6):615-619 査読有
2. Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H, Takuma H, Kuwano R, Imagawa M, Ataka S, Wada Y, Yoshioka E, Nishizaki T, Watanabe Y, Mori H. A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol*. 2008;63:377-387 査読有
3. Kinoshita K, Noguchi A, Ishii K, Tamaoka A, Ochi T, Kaise T. Urine analysis of patients exposed to phenylarsenic compounds via accidental pollution. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;867(2):179-88. 査読有
4. Ohkoshi N, Matsuno-Yoshida S, Watanabe M, Tamaoka A. Neuromuscular features in the camera-marugo-cohen syndrome. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2008;9(3):345-7. 査読有
5. Buckingham SD, Kwak S, Jones AK,

- Blackshaw SE, Sattelle DB: Edited GluR2, a gatekeeper for motor neuron survival? *BioEssays* 2008, 30(11-12):1185-92 査読有
6. Kwak S, Nishimoto Y, Yamashita T: Newly identified ADAR2-mediated editing positions as a useful tool for ALS research. *RNA Biology* 2008; 5(4):193-7. 査読有
 7. 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. 査読有
 8. Nishimoto Y, Yamashita T, Hideyama T, Tsuji S, Suzuki N, Kwak S: Determination of editors of mRNAs with site-selective A-to-I editing positions, *Neurosci Res* 2008; 61:201-206 査読有
 9. Kobayashi S, Takuma H, Murayama S, Sakurai M, Kanazawa I. A Japanese family with early-onset ataxia with motor and sensory neuropathy. *J Neurol Sci*. 2007;254(1-2):44-8 査読有
 10. Miyazaki H, Oyama F, Wong HK, Kaneko K, Sakurai T, Tamaoka A, Nukina N. BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit. *BBRC*. 2007;361(1):43-8 査読有
 11. Mizuno Y, Guyon JR, Ishii A, Hoshino S, Ohkoshi N, Tamaoka A, Okamoto K, Kunkel LM. Beta-synemin expression in cardiotoxin-injected rat skeletal muscle. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007;8:40. 査読有
 12. Aoyagi H, Hasegawa M, Tamaoka A: Fibrillogenic nuclei composed of P301L mutant tau induce elongation of P301L tau, but not wild-type tau. *J Biol Chem* 2007; 282(28):20309-18 査読有

[学会発表] (計9件)

1. 富所康志、玉岡 晃、Blas Frangione、Jorge Ghiso : 典型的老人斑を欠く変異型アルツハイマー病アイオワ家系脳の生化学的解析. 第27回日本認知症学会、2008年10月10日、前橋
2. 上野友之、矢口雅江、河野 豊、富所康志、永田博司、玉岡 晃 : 慢性脳低灌流暴露下におけるアミロイドβタンパク

- とBACE1の発現. 第27回日本認知症学会、2008年10月10日、前橋
3. 玉岡 晃 : アルツハイマー病の分子病態と治療—アミロイドβ蛋白を中心として—. 第39回日本脳科学学会、2008年6月13日、東京
 4. 詫間 浩、山下 雄也、郭 伸、玉岡 晃。孤発性筋萎縮性側索硬化症におけるRNA編集酵素 (ADAR2) の新規基質の検討. 第49回日本神経学会総会、2008年5月16日、横浜
 5. 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、2008年5月16日、横浜
 6. 織田彰子、荒木 亘、玉岡 晃 : 脂質ラフトのBACEに対する酸化ストレスの影響. 第49回日本神経学会総会、2008年5月15日、横浜
 7. 宮崎晴子、小山文隆、Hon-Kit Wong、金子貢巳、櫻井隆、玉岡晃、貫名信行 BACE1 cleavage mediates neurite morphology induced by sodium channel b4 subunit、第30回日本神経科学大会、2007年9月10-12日、横浜市
 8. 詫間 浩、郭 伸、玉岡 晃、Peter H Seeburg。グルタミン酸受容体RNA編集欠損による筋萎縮性側索硬化症モデルマウス作成の試み. 第48回日本神経学会総会、2007年5月17日、名古屋
 9. 富所康志、玉岡 晃、Frangione B、Ghiso J : 家族性デンマーク型認知症 : 典型的老人斑を欠いたADanおよびAβの共沈着. 第48回日本神経学会総会 2007年5月16日、名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

詫間 浩 (TAKUMA HIROSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号 : 00326258

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

玉岡 晃 (TAMAOKA AKIRA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
教授

研究者番号：50192183

郭 伸 (KWAK SHIN)

東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：40160981