

令和元年 6 月 20 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2017

受付番号 798

氏 名 城本 悠助

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： Philadelphia （国名： アメリカ合衆国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

反復配列を有する mRNA の分解機構と加齢黄斑変性の病態解明

3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

The Wistar Institute, Gene Expression and Regulation Program

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

< 研究・調査実施状況 >

ヒトゲノムには反復配列が多数存在し、特にレトロトランスポゾン遺伝子は逆転写酵素により、進化的にそのコピー数を増加させてきた。Alu は約 300 塩基長の短鎖のレトロトランスポゾン遺伝子であり、自身のプロモーターから 300 塩基長の RNA「Single Alu RNA」が転写される。また、コード領域、イントロン、UTR (Untranslated region) 領域にも存在しており、mRNA のプロモーターから Alu 配列を有する RNA が転写される「Alu 配列挿入型 mRNA」。さらに、2つの Alu 配列が近傍に存在すると、二本鎖を形成し、非常に安定な stem loop 構造を形成し、mRNA の翻訳や分解に機能すると考えられてきた。しかし、Alu RNA の存在意義、機能については未だに不明な点が多く残されている。近年、Single Alu RNA が RNaseIII 活性を有する DICER により分解されること、また、この分解機構の破綻により、眼病である加齢黄斑変性 (AMD) が引き起こされることが報告されたが、その病態の分子機構については詳細な解析がなされていなかった (Kaneko et al. 2011. Nature 471: 325)。最終報告では派遣先で取り組んだ、主に Alu が関与する RNA 制御機構について遂行状況を報告する。

① DICER による Alu RNA の分解機構

派遣先研究室では ADAR1 (Adenosine deaminases acting on RNA 1) が DICER と複合体を形成し、DICER による miRNA 前駆体の切断を亢進して、成熟型 miRNA による遺伝子発現抑制を促進することを明らかにしてきた。そこで、ADAR1 の DICER による Alu RNA 分解に対する影響を調べるため、DICER 単体及び DICER/ADAR1 複合体のリコンビナントタンパクを精製し、In vitro での RNA 分解実験をおこなったところ、DICER 単体においては Single Alu RNA は切断されず、二本鎖を形成した Alu RNA をわずかに切断した。一方、DICER/ADAR1 複合体においても Single Alu RNA の分解は認められなかったが、二本鎖 Alu RNA を効率よく切断した。DICER による切断産物が 21~23 塩基長であり、成熟型 miRNA や siRNA と同じ長さであったことから、次に細胞内において DICER と ADAR1 が二本鎖 Alu RNA の分解に寄与しているかどうかを調べるため、DICER 欠損細胞及び ADAR1 ノックダウン細胞の網羅的小分子 RNA シークエンスデータの解析をおこなった。すると、コントロール細胞では Alu 配列を有する小分子 RNA はセンス、アンチセンス共に、21~23 塩基長にピークが認められたが、DICER 欠損細胞及び ADAR1 ノックダウン細胞においては配列数の減少が認められた。

さらに、ルシフェラーゼの下流 (3'UTR 領域) に Alu 配列を 2つ挿入したプラスミドを作製し、細胞内における二本鎖 Alu RNA と ADAR1、DICER の関係を調べたところ、ADAR1 もしくは DICER を過剰に発現している細胞では二本鎖 Alu RNA を有するルシフェラーゼの発現が抑制されることがわかった。

以上の結果から、DICER 単体は Single Alu RNA を切断せず、DICER/ADAR1 複合体が二本鎖を形成した Alu RNA の分解に寄与していることが明らかとなった (図 1)。

② Alu RNA 由来の小分子 RNA の機能

次に、DICER/ADAR1 複合体により産生される Alu 由来の小分子 RNA が、細胞内において RNA サイレncing に機能する AGO2 に取り込まれているかどうかを調べた。培養細胞に FLAG タグ融合 AGO2 を強制発現した細胞から AGO2 を精製し、含まれる RNA を網羅的にシークエンスしたデータを解析したところ、microRNA と比べると少ない量ではあるが、いくつかの Alu 由来の小分子 RNA が AGO2 に取り込まれていた。そこで、特に AGO2 に取り込まれた配列数の多い、Alu 由来の小分子 RNA を人工合成し、培養細胞に導入して、そのターゲット遺伝子と生物学的機能について解析した。成熟型 microRNA や siRNA は AGO2 に取り込まれ、相補的な配列の mRNA の分解や、翻訳抑制に機能することから、センス鎖の Alu 小分子 RNA であればアンチセンス鎖の Alu 配列を、アンチセンス鎖の Alu 小分子 RNA であればセンス鎖の Alu 配列を有する mRNA に作用することが予想された。そこで、センス及びアンチセンス鎖の Alu 小分子 RNA を導入した細胞における、3'UTR に Alu 配列を有する遺伝子のタンパク発現を、ウエスタンブロット法を用いて解析した。アンチセンス Alu 小分子 RNA は 3'UTR にセンス鎖の Alu 配列を有する遺伝子のタンパク量には影響しなかったが、センス Alu 小分子 RNA の導入はアンチセンス鎖の Alu 配列を有する遺伝子 (CDCP1 など) の発現抑制を引き起こした。

CDCP1 は細胞膜貫通タンパクであり、近年、ERK1/2 経路、FAK 経路及び AKT 経路を介して、ガン細胞の増殖、細胞死、上皮間葉転換に寄与するタンパクとして報告されていることから、子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞を使用して Alu 小分子 RNA 導入の表現型解析をおこなった。センス Alu 小分子 RNA を導入すると、アポトーシスマーカーである Cleaved PARP の増加、及び Caspase3/7 の活性上昇が認められた。また、HeLa 細胞においては CDCP1 を単独でノックダウンすると、アポトーシスが生じたことから、センス Alu 小分子 RNA の導入によるアポトーシスは

CDCP1 の発現低下に起因することが示唆された。

以上の結果から、センス鎖の Alu 小分子 RNA が多量に存在すると、CDCP1 などの mRNA の 3'UTR にアンチセンス鎖の Alu を有する遺伝子の発現が抑制され、HeLa 細胞においてはアポトーシスが誘導されることが明らかとなった (図 1)。

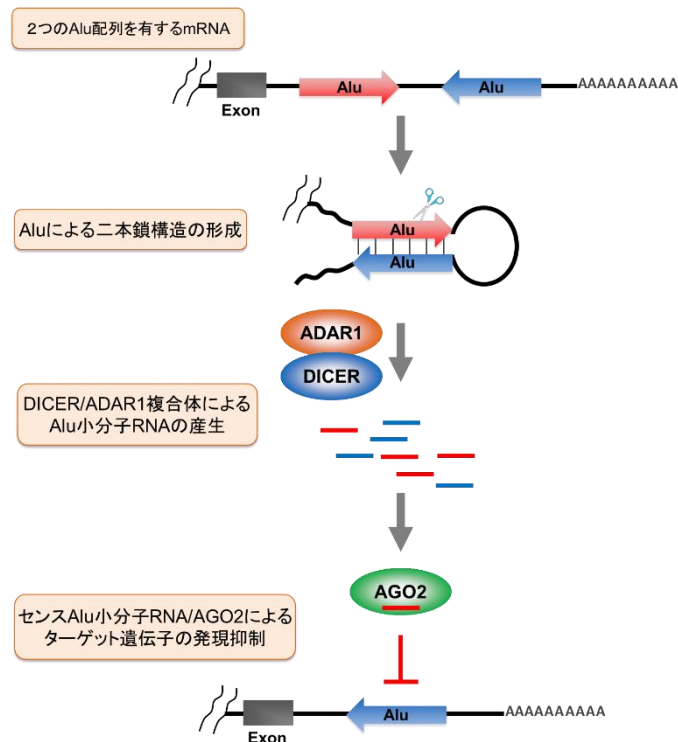


図 1 DICER/ADAR1 複合体による Alu 小分子 RNA の産生と遺伝子発現抑制

③ 紫外線照射ストレスに対する ADAR1 の機能解析

これまでに AMD 発症の危険因子として、紫外線が報告されていることから、紫外線ストレス時における ADAR1 の機能を調べた。ADAR1 は DICER との複合体形成による microRNA 産生の亢進だけでなく、二本鎖 RNA に結合し、RNA のアデノシンをイノシンに編集する酵素でもある。ADAR1 遺伝子座からは転写開始部位及び翻訳開始部位の異なる ADAR1p110 と ADAR1p150 の 2 つのタンパクが産生され、ADAR1p110 は恒常的に発現しているのに対し、ADAR1p150 はインターフェロン刺激時にその発現が誘導される。多くの細胞で ADAR1p110 は核内に存在しているが、紫外線刺激により細胞質に局在移動することがわかった。そこで、ADAR1p110 の局在制御機構について調べるため、紫外線刺激により活性化される MAP キナーゼ経路についての検証をおこなった。まず、MAP キナーゼキナーゼである MKK1、MKK6、JNK の活性型変異体を細胞に強制発現させたところ、MKK6 の強制発現により ADAR1p110 の細胞質への移行が観察された。また、ADAR1p110 の細胞質移行は p38 の阻害剤の添加、もしくはその下流のキナーゼである MSK1 と MSK2 を同時にノックダウンすると阻害されたことから、MKK6-p38-MSK1&2 経路により制御されていることが明らかとなった。

次に、ADAR1p110 がリン酸化されているかどうかを調べるため、電気泳動時にリン酸化によりタンパクの移動度が変化する Phos-tag ゲル、及び質量分析法による解析をおこなったところ、ADAR1p110 は MSK1&2 によりリン酸化されており、そのリン酸化部位は ADAR1p110 の C 末端側に位置する二本鎖 RNA 結合ドメイン 3 の近傍に存在するセリン、スレオニンのあわせて 5 残基であることがわかった。そこで、ADAR1p110 リン酸化模倣変異体を作製し、核外輸送タンパクとの結合能の変化を調べたところ、非リン酸化変異体と比べ、XPO5 との結合量が著しく増加していた。また、ADAR1p110 リン酸化模倣変異体を細胞に強制発現させると、非刺激状態においても細胞質に局在した。以上の結果から、ADAR1p110 は紫外線刺激により、活性化された MKK6-p38-MSK1&2 経路によってリン酸化を受けることにより、XPO5 との結合能が上昇し、細胞質に輸送されることが明らかとなった。

MAP キナーゼ経路は細胞の生死を制御する機構であり、紫外線などのストレスに応答することから、ADAR1p110 のアポトーシスへの関与を調べた。ADAR1 をノックダウンした細胞に紫外線照射をおこなうと、コントロールと比べ約 5 倍のアポトーシスが引き起こされた。また、内在性の

ADAR1のみをノックダウンした細胞にプラスミドトランスフェクションにより ADAR1p110 を強制発現させ、レスキュー実験をおこなったところ、野生型だけでなく、RNA 編集活性を有さない ADAR1p110 によってもアポトーシスの抑制が認められたことから、ADAR1p110 は RNA 編集非依存的に抗アポトーシス作用を示すことが明らかとなった。

次に、ADAR1 が細胞質においてどのような機構でアポトーシスを抑制するのか調べるため、紫外線照射した ADAR1 ノックダウン細胞の mRNA を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。その結果、3'UTR に Alu 配列などによる二本鎖構造を有する抗アポトーシス遺伝子の発現が有意に低下していた。一方、近年、細胞質に存在する二本鎖結合タンパクである STAU1 (Staufen 1) の結合 RNA の網羅的解析結果が報告されており、ADAR1 の RNA 結合部位と重複していることがわかった。STAU1 は細胞質において、UPF1 と複合体を形成し、結合した mRNA の分解を誘導することから、ADAR1p110 が細胞質において STAU1 依存的 mRNA 分解機構と拮抗するのではないかと考えられた。そこで、ADAR1 に加え STAU1 を同時にノックダウンすると、ADAR1 単独ノックダウンによって引き起こされた 3'UTR に二本鎖構造を有する mRNA の分解とアポトーシスの誘導が抑制された。さらに、STAU1 と 3'UTR に二本鎖構造を有する mRNA との結合に対する ADAR1 の影響を調べるため、HA タグ融合 STAU1 を強制発現した細胞から免疫沈降法を用いて STAU1 結合 RNA を精製し、qRT-PCR 法により定量解析をおこなった。その結果 ADAR1 をノックダウンした細胞においては、STAU1 に結合する二本鎖構造を有する mRNA の量が増加しており、ADAR1 が mRNA の二本鎖領域に排他的に結合して、STAU1 による二本鎖 RNA の認識を阻害することが明らかとなった。

本研究を進めるにあたり ADAR1 のリン酸化による DICER との結合への影響、RNA 切断活性の変化について解析をおこなったが、有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、紫外線の照射によって MKK6 がリン酸化され、下流の p38 がリン酸化される。そして、核へと移行したリン酸化 p38 は MSK1 および MSK2 をリン酸化し、続いて ADAR1p110 のリン酸化が引き起こされる。次に、リン酸化により ADAR1p110 の XPO5 複合体との結合能が上昇し細胞質へと輸送される。細胞質において ADAR1p110 は mRNA の 3'UTR の二本鎖領域と結合し、STAU1 に依存的な mRNA の分解機構を阻害する。ADAR1 は紫外線照射時に抗アポトーシスに寄与する遺伝子の mRNA を保護することによって抗アポトーシス作用を示すことが明らかとなった (図 2)。

今後、「DICER/ADAR1 複合体による二本鎖 Alu RNA の分解機構」および「ADAR1 と STAU1 による RNA 制御機構」と AMD の原因となる網膜色素上皮細胞の変性・脱落との関係について研究を展開していく予定である。

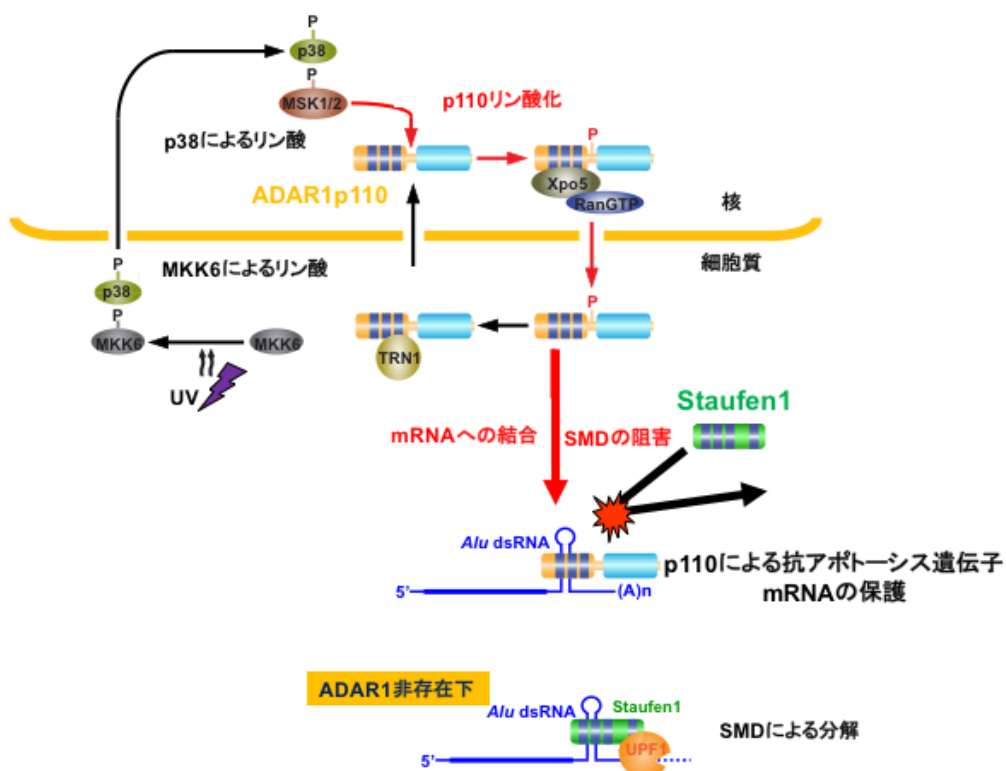


図 2 紫外線の照射による ADAR1p110 の局在の変化と mRNA の保護機構

<成果の発表・関係学会への参加状況>

本研究内容については Wistar 研究所でおこなわれた Research in Progress meeting にて口頭発表をおこなった。また、「③ 紫外線照射ストレスに対する ADAR1 の機能解析」については co-first author として学術雑誌「Nat. Struct. Mol. Biol」に成果を発表した。さらに「ライフサイエンス新着論文レビュー」にて日本語での総説を掲載した。

本研究内容については受入先研究室の西倉和子教授により米国、日本などで招待講演等、成果の発表がおこなわれた。