

平成26年 5月 9日

平成25年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：北海道大学遺伝子病制御研究所

職名：助教

氏名：飯笹 久

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：RNA 編集酵素 ADAR1 による造血幹細胞増殖・分化制御機構の解明
2. 再生医科学研究所共同研究者：長澤 丘司 教授
3. 研究期間： 短期研究課題 ・ 長期研究課題  
(平成25年4月1日～平成26年3月31日)

4. 研究経過及び研究成果：

A-to-I RNA 編集酵素 ADAR1 は、二本鎖 RNA のアデノシンをイノシンへと変換する酵素である。ADAR1 欠損マウスでは、IFN シグナルの活性化と造血幹細胞の低下が報告されている。しかしながら ADAR1 の欠損は、ファミリー遺伝子である ADAR2 の RNA 編集活性を上昇させることから、ADAR1 の造血幹細胞における作用には不明な点が多い。

本研究では、造血幹細胞における A-to-I RNA 編集酵素 ADAR1 の役割を明らかにするために、Long-term hematopoietic stem cell (LT-HSC) 及び、Short-term hematopoietic stem cell (ST-HSC)における ADAR1 の基質である microRNA (miRNA) 前駆体の RNA 編集及び、ADAR1 isoform の発現を解析した。8週令の C57BL6 マウスより LT-HSC 画分 (CD34<sup>-</sup>, Flk2<sup>-</sup>, c-kit<sup>+</sup>, Sca1<sup>+</sup>, Linage<sup>-</sup>) 及び、ST-HSC 画分 (CD34<sup>+</sup>, Flk2<sup>-</sup>, c-kit<sup>+</sup>, Sca1<sup>+</sup>, Linage<sup>-</sup>) をセルソーターで分離し、また ADAR1 の基質であり血液系で発現が報告されている miRNA 前駆体 (Let-7g, miR-27a, miR-99a, miR-99b, miR-151, miR-203, miR-376a, miR-376b, miR-379, miR-411, miR-423) 及び、mRNA (CYFIP2, BLCAP, FLNA) を RT-PCR で増幅し、PCR 産物を直接シーケンスする

ことで、RNA 編集を確認した。陽性コントロールは、マウス大脳皮質を用いた。また、ADAR1 isoform (p110, p150)、ADAR2 の発現量は定量的 RT-PCR を用いて測定した。内部標準は $\beta$ -actin を用いた。

その結果、miRNA 前駆体は miR-99a, miR-151 が ST-HSC にのみ発現し、RNA 編集活性は認められなかった。また、mRNA は FLNA が、LT-HSC, ST-HSC に発現していたが両サンプルともに RNA 編集活性は認められなかった。RNA 編集活性は、陽性コントロールである脳サンプルでは認められた。また、脳と比較したところ先の ADAR1 欠損マウスにおける造血幹細胞の論文と異なり、LT-HSC に高い ADAR1p110 の発現（脳の 50 倍）が認められ、ST-HSC において IFN 誘導性の ADAR1p150 の高発現（脳の 15 倍）が認められた。ADAR1 が miRNA 産生酵素 Dicer と複合体を形成すると RNA 編集活性が低下することから（研究成果論文 1）、これらの結果は脳などの組織と異なり、造血幹細胞において ADAR1 が Dicer と複合体を形成している可能性を示唆している。現在詳細な解析を行なっている。

また、ADAR 1 はマウス体組織幹細胞に重要なことが示唆されていることから、癌幹細胞においても重要である可能性を考え、同様な解析をヒト癌細胞株についても行なった。その結果、ヒト悪性中皮腫細胞株 TCC-Meso-1 では、siRNA による ADAR1 発現抑制 (siADAR1) は細胞増殖を抑制しなかったが、siADAR2 は細胞増殖、接着、浸潤を強く抑制した。同様な活性は、RNA 結合能を有さないドミナントネガティブ体の発現でも認められたが、RNA 編集活性欠損型の発現では認められなかった。同様な結果は、ヒト子宮頸癌 HeLa においても認められた。また悪性中皮腫細胞株では、ADAR2 の基質ではタンパク質輸送に関わる COPA 遺伝子しか発現していなかったが、COPA の過剰発現及び RNA 編集型 COPA の過剰発現は、がん細胞の増殖に影響を与えなかった。これらの結果は、ADAR2 は RNA 編集非依存的に細胞増殖を制御していることを示唆している。ADAR2 欠損マウスでは、細胞増殖の異常は認められないことから、この現象は癌細胞に特有またはヒト細胞に特異的な現象と思われた。現在、miRNA に対する影響を解析中である（投稿準備中）。

ADAR1 の変異はヒトの皮膚病の原因となるが、マウスではこのような表現型は認められない（未発表データ）。これらの結果は、二本鎖 RNA 編集酵素 ADAR は編集活性非依存的な作用を有し、またその作用には種差が存在することを示している。ADAR は二本鎖 RNA に結合することから、miRNA 前駆体のみならずヒト特異的繰り返し配列 (Alu) の影響についても解析中である。

## 5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表等

1. Ota H, Sakurai M, Gupta, R, Valente L, Wulff B-E, Ariyoshi K, Iizasa H, Davuluri RV, Nishikura K. ADAR1 Forms a Complex with Dicer to Promote MicroRNA Processing and RNA-Induced Gene Silencing. *Cell* **153** (3): 578-589 (2013).  
☆ RNA 編集酵素 ADAR1 が miRNA 産生酵素 Dicer とヘテロダイマーを形成し、RNA 編集活性非依存的に Dicer を活性化することで、miRNA の産生を制御していることを明らかとした。
2. Liang S, Furuhashi M, Nakane R, Nakazawa S, Goudarzi H, Hamada J, Iizasa H. Isolation and characterization of human breast cancer cells with *SOX2* promoter activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **437** (2): 205-211 (2013).
3. Goudarzi H, Iizasa H, Furuhashi M, Nakazawa S, Nakane R, Liang S, Hida Y, Yanagihara K, Kubo T, Nakagawa K, Kobayashi, M, Irimura T, Hamada J. Enhancement of *in vitro* cell motility and invasiveness of human malignant pleural mesothelioma cells through the HIF-1 $\alpha$ -MUC1 pathway. *Cancer Lett.* **339** (1): 82-92 (2013).
4. A-to-I RNA editing in mouse long-term and short-term hematopoietic stem cells. Liang S, Kawano M, Nishikura K, Sugiyama T, Nagasawa T, Iizasa H (投稿予定)
5. p54<sup>nrb</sup>/NonO directly represses *SOX2* expression by the regulation of *SOX2* promoter activity in breast carcinoma cell lines. Liang S, Takahashi H, Hirose T, Kuramitsu Y, Nakamura K, Hatakeyama S, Hamada J, Iizasa H (投稿予定)
6. RNA editing enzyme ADAR2 regulates cell motility and proliferation in malignant pleural mesothelioma cell. Sakata K, Maeda K, Sakurai N, Nakazawa S, Liang S, Yanagihara K, Kubo T, Nishikura K, Hamada J, Iizasa H. (投稿予定)