論文の内容の要旨

論文題目　Investigation into the *ADARB1* Regulatory Mechanism
in the Human Spinal Motor Neurons
—An Implication for the Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathogenesis
（RNA 編集酵素 ADAR2 の発現を
ヒト脊髄運動神経特異的に制御する転写因子の探索
——筋萎縮性側索硬化症との病因的関連——）

氏名　廣 瀬　直 毅

背景

孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）は，主に壮年期以降，上位・下位運動神経が選択的・進行性に脱落し，上肢・下肢の麻痺や呼吸障害を呈して数年で死に至る，神経変性疾患である．この疾患の原因は完全には解明されていないが，患者の脊髄運動神経における分子病態への説明として，東京大学大学院医学系研究科郭グループは ADAR2-GluA2 仮説を提唱している．この仮説では，孤発性 ALS 患者の脊髄運動神経における RNA 編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA 2（ADAR2）の疾患特異的減少を発端に，その基質である AMPA 受容体サブユニット GluA2 のグルタミン・アルギニン部位における RNA 編集率が低下し，未編集型の GluA2 をサブユニットに持つ高 Ca^{2+}透過性 AMPA 受容体が発現する．その結果，脊髄運動神経内の Ca^{2+}濃度が上昇，活性化した蛋白質分解酵素カルパインが核膜孔複合体を分解し，TDP-43 の分解・細胞質内異常凝集も引き起こす（TDP-43 病理）．ADAR2 を脊髄運動神経選択的にコンディショナル・ノックアウトしたマウスは，脊髄運動神経の病理組織学的異常と進行性・選択的運動機能低下の両点において ALS 様の表現型を呈するので，この仮説には蓋然性がある．

ヒト神経組織や野生型マウスの脊髄運動神経における ADAR2 発現や RNA 編集率の加齢依存性の低下は既に報告されているが，ADAR2 の加齢依存性発現低下の仕組みは不明である．同様に，患者の脊髄運動神経で認める ADAR2 の発現低下の原因も不明である．

目的

「ヒト脊髄運動神経特異的に ADAR2 の発現を制御する転写因子群の発現は加齢依存性に低下しており，孤発性 ALS 患者の脊髄運動神経では，それら転写因子の発現低下が異常に加速している」という作業仮説の下，遺伝子発現制御の生物種・組織特異性を想定し，ヒト脊髄運動神経特異的に ADAR2 の発現を制御する転写因子を同定する．

材料・方法

１）ヒト脊髄運動神経における転写活性の網羅的検索

２例の非 ALS ヒト脊髄から脊髄運動神経をレーザー・キャプチャ・マイクロダイセクション法で採取した．比較対照の後角・白質（各２つの技術的反復材料）と併せ，それぞれから RNA を抽出・精製し，cap analysis of gene expression（CAGE）法で解析した．

２）脊髄運動神経で活性がある ADAR2 遺伝子プロモーターの同定

ヒト脊髄運動神経の CAGE データとプロモーター部位の既報データを基に，ヒト ADAR2 遺伝子 *ADARB1* のプロモーターを４箇所定義し，脊髄運動神経で活性を認める部位を２箇所同定した．更に，マウス ADAR2 遺伝子のプロモーター部位の既報データから，ヒトとマウスの ADAR2 遺伝子のプロモーター構造に関する生物種差を検証した．また，既報データに基づき，*ADARB1* プロモーター活性の組織特異性を検索した．

３）脊髄運動神経で発現する転写因子の同定

脊髄運動神経に関する今回の CAGE データと既報の RNA-seq データから，脊髄運動神経で発現する転写因子を網羅的に同定した．また，マウス脊髄運動神経を同様に採取して得た RNA-seq データから，マウス脊髄運動神経で発現する転写因子を同定し，転写因子の発現の生物種差を検証した．

４）ヒト脊髄運動神経で *ADARB1* の発現を制御しうる転写因子の予測

複数の既報データを *in silico* 解析し，脊髄運動神経で *ADARB1* の発現を制御しうる転写因子を予測した．HeLa 細胞でルシフェラーゼ・アッセイを行う転写因子を，候補の一部から選定した．

５）*ADARB1* プロモーターに対する転写因子のルシフェラーゼ・アッセイ

HeLa 細胞を用いて，４箇所の *ADARB1* プロモーター各々に対する各転写因子のルシフェラーゼ・アッセイを実施した．モック・ベクター使用時に対するシグナル変動が３／２以上・２／３以下の場合をそれぞれ活性化・抑制性作用とした．

６）ヒト脊髄運動神経特異的に *ADARB1* の発現を制御する転写因子複合体の推定【考察】

ルシフェラーゼ・アッセイの結果と，転写因子の蛋白間相互作用の公開データ，転写因子の組織特異的発現に関する既報の評価に基づき，*ADARB1* の発現を活性化しうる脊髄運動神経特異的な転写因子複合体を推定した．

７）脊髄運動神経で発現する転写因子と孤発性 ALS の病因的関連の推測【考察】

遺伝子の加齢依存性発現低下についての既報から，ルシフェラーゼ・アッセイを行なった転写因子を抽出した．また，孤発性 ALS 患者のエクソーム解析・ゲノムワイド関連研究と，遺伝子発現の量的形質遺伝子座の既報から，一塩基多型により患者組織で先天的に低発現となりうる転写因子も抽出した．

結果

１）ヒト脊髄運動神経における転写活性の網羅的検索

脊髄運動神経由来の RNA は量・質ともに CAGE 法が要求する基準値未満であったが，得られた CAGE シグナルは脊髄運動神経間で強く相関し，比較対照の後角・白質の CAGE シグナルとは独立していた．

２）脊髄運動神経で活性がある ADAR2 遺伝子プロモーターの同定

ADARB1 周辺の脊髄運動神経の CAGE シグナルは，後角・白質の CAGE シグナルとは大きく異なっていた．今回定義した４箇所の *ADARB1* プロモーター（Pr-p1，Pr-p2，Pr-p3/p4，Pr-p13）のうち，脊髄運動神経では Pr-p1 と Pr-p2 がそれぞれ強い活性，弱い活性を示し，他は不活性であった．また，マウス ADAR2 遺伝子のプロモーター構造はヒトとは大きく異なっており，ヒト組織における各プロモーターの転写活性は組織特異的であった．

３）脊髄運動神経で発現する転写因子の同定

脊髄運動神経で発現する転写因子はヒトが１，３３４種，マウスが１，２２５種あり，中央値以上の発現量があるヒトの転写因子に関しては，約３３％のみがマウスと共通していた．

４）ヒト脊髄運動神経で *ADARB1* の発現を制御しうる転写因子の予測

数百種の転写因子が脊髄運動神経で *ADARB1* の発現を制御しうると予測されたため，候補の中からルシフェラーゼ・アッセイを行う転写因子を４８種選定した（脊髄運動神経で発現あり，３４種；発現なし（比較対照），１４種）．

５）*ADARB1* プロモーターに対する転写因子のルシフェラーゼ・アッセイ

脊髄運動神経で発現する３４種の転写因子のうち，７種が４つのプロモーター全てを活性化，１種が全てを抑制，１種が全てのプロモーターに対して不活性であり，残りの転写因子は選択的にプロモーターを活性化・抑制した．一方，比較対照の１４種の転写因子のうち，２種が全てのプロモーターを活性化，１種は全てのプロモーターに対して不活性，残りはプロモーター選択的に活性化・抑制性作用を示した．

考察

１）今回の CAGE データ

今回の CAGE 解析に供した RNA 量は限定的であったが，脊髄運動神経の CAGE シグナルが後角・白質の CAGE シグナルとは独立して相関していたため，脊髄運動神経で特異的に強く転写されている部位を，信頼性をもって検知できたと考えられる．

２）脊髄運動神経での *ADARB1* の発現制御

ADARB1 周辺の CAGE シグナルが脊髄運動神経・後角・白質で大きく異なっていたこと，ヒト脊髄運

動神経で発現しない転写因子も *ADARB1* プロモーターを活性化したこと，転写因子の発現や *ADARB1* プロモーター活性に組織特異性を認めたことから，*ADARB1* の発現制御機構は組織特異性が高く，その制御を担う転写因子群の組み合わせも組織特異性が高いと考えられる．また，ヒトとマウスでは，ADAR2 遺伝子のプロモーター構造と脊髄運動神経で発現する転写因子の種・量が異なるので，脊髄運動神経での ADAR2 遺伝子の発現制御機構は，ヒトとマウスで生物種差が大きいと考えられる．

公開データから，今回のルシフェラーゼ・アッセイで複数のプロモーターを活性化した６種の転写因子と，１つのプロモーターを選択的に活性化した２種は，共在する脊髄運動神経において転写因子間だけでなく基本転写複合体間とも相互作用しうると分かった．また，既報からは，これら８種の転写因子のうち１種の発現は組織特異的であると分かった．ゆえに，この転写因子複合体は脊髄運動神経特異的に存在して，*ADARB1* の発現制御に関わる可能性がある．

３）転写因子と孤発性 ALS の病因的関連

既報によると，ルシフェラーゼ・アッセイで複数のプロモーターを活性化した転写因子の１つは，発現の組織特異性が高く，ヒト組織で加齢依存性に発現が低下し，更に，ALS 患者組織における発現低下および量的形質遺伝子座の一塩基多型も認められる．この転写因子は ALS 患者の組織において先天的に低発現となる可能性があり，孤発性 ALS 患者の脊髄運動神経における *ADARB1* の発現低下に関与している可能性が示唆された．

今回，ヒト脊髄運動神経で活性がある *ADARB1* プロモーターと，脊髄運動神経で *ADARB1* の発現を制御しうる複数の転写因子を，それぞれ同定した．しかし，ルシフェラーゼ・アッセイを未実施の転写因子も *ADARB1* の発現制御に関わっている可能性があり，また，今回はエンハンサーによる *ADARB1* の発現制御も検索していないので，*ADARB1* の発現制御機構については更なる研究が必要である．孤発性 ALS の病態発生には複数の転写因子が関与する可能性があるので，本研究を発端に，孤発性 ALS 患者の脊髄運動神経における *ADARB1* の発現低下に関与する転写因子群を特定し，その病因解明に役立てたい．