

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02865

研究課題名(和文)新規内分泌因子の探索研究：tRNA修飾ヌクレオシドによる生体機能制御

研究課題名(英文)A research for novel hormone: physiological functions of nucleosides derived from modified tRNAs

研究代表者

富澤 一仁 (Kazuhito, Tomizawa)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：40274287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ペプチド型、ステロイド型、アミノ酸誘導体型に次ぐ第4の内分泌因子の存在とその生理機能について明らかにすることを目的として実施した。修飾RNAの代謝産物である修飾ヌクレオシドについてG蛋白共役型受容体リガンド同定技術を用いて、オーファン受容体やアデノシン受容体への結合能と活性化能を調査した結果、修飾ヌクレオシドの1種であるm6Aがアデノシン受容体のリガンドであることを明らかにした。また、m6Aはアデノシン受容体を介して、肥満細胞の脱顆粒を促進するなどの生理機能を有していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトゲノム中に内在性リガントが不明の「オーファン」な非嗅覚Gタンパク質共役受容体(GPCR)が少なくとも120種類ある。この内の49種類がヌクレオシド等の低分子リガントが結合するクラスAである。オーファンGPCRの生理的リガンド探索研究については、ヒトゲノムが解明された2003年頃に世界中で精力的に研究が行われて、多くの新規リガントが発見された。しかし、近年新規リガントの報告が激減している。GPCRのリガントとして修飾ヌクレオシドを同定したという本研究成果は、GPCR研究の促進に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：About 150 post-transcriptional RNA modifications are present throughout all kingdoms of life. During RNA catabolism, unlike unmodified nucleosides that are subject to further degradation or salvage pathway in cells, most modified nucleosides are resistant to degradation and are released into extracellular space<sup>4-6</sup>. However, the physiological role of these extracellular modified nucleosides remains unexplored. In this study, we found that N6-methyladenosine (m6A), widely known as an epigenetic mark in RNA, is released into extracellular space as the result of RNA breakdown and acts as a novel ligand for the adenosine A3 receptor with an 10-fold greater affinity than unmodified adenosine. Furthermore, m6A was dynamically released in response to cytotoxic stimuli both in vitro and in vivo, and facilitated type I allergy through the A3 receptor. Our findings shed new light on m6A as a signaling molecule with the ability to activate GPCRs.

研究分野：生理学

キーワード：ヌクレオシド 修飾ヌクレオシド オーファン受容体 免疫

## 1. 研究開始当初の背景

RNA 修飾研究 (エピトランスクリプトミクス) は、エピゲノムの次の研究分野として注目されている。従来の RNA 研究は、その配列情報と発現量を解析するトランスクリプトーム研究が中心であった。しかし、すべての生物において転移 RNA (tRNA)、リボソーム RNA (rRNA)、メッセンジャーRNA (mRNA) など全 RNA 種は、100 種類以上の複雑多彩な化学修飾を受け、同修飾という形で RNA の質的な情報としてメモリーされていることが我々などの研究により明らかになった。RNA 修飾の特徴は、真核生物や真正細菌のみに存在する修飾もあれば、全ての生物に共通の修飾もあるなど非常に複雑かつ多彩であり、DNA やタンパク質の化学修飾とは一線を画する。従来、RNA の代謝に関する報告は無かった。その理由は、tRNA 代謝産物 (修飾ヌクレオシド) を網羅的に解析できる技術が無かったからである。我々は、100 $\mu$ l の血液や尿標本からヒトの修飾ヌクレオシドを網羅的に解析する技術開発に成功した。我々は、本技術を用いて RNA の代謝について検討し、以下の結果を得た。RNA は細胞内でヌクレオシドまで分解される。未修飾のヌクレオシドは、そのまま細胞内に留まったり、また Equilibrative nucleoside transporter (ENT) を介して、細胞内に取り込まれたりすることにより、細胞内に高濃度存在することが明らかになった。これら未修飾ヌクレオシドは、RNA や ATP などの合成に再利用されていた。一方、修飾ヌクレオシドは、ENT を介して積極的に細胞外に分泌されていることが明らかになった。その結果、未修飾のヌクレオシドは、細胞内より血清中の濃度が 1/10 程度低く、一方修飾ヌクレオシドは血清中の濃度が、約 5 倍~10 万倍も高濃度であることが明らかになった。また、修飾ヌクレオシドは、生体内外の様々な環境因子 (酸化ストレス、pH、血中ポリ硫黄濃度など) やミトコンドリア障害などの刺激により、血中へ分泌が促進されることが明らかになった。

ミトコンドリア tRNA 修飾の一つに i<sup>6</sup>A があるが、i<sup>6</sup>A は植物では植物ホルモンとして知られている。また、哺乳細胞では、がん細胞の増殖抑制効果があることは古く知られていたが、その由来や作用機序は不明であった。これらの結果から、修飾 RNA 代謝産物である修飾ヌクレオシドは、細胞内外の環境刺激に応答により血中へ分泌し、他の臓器・組織にその情報を伝え、そして恒常性維持を担う“新規内分泌因子”なのでは? という着想に至った。

## 2. 研究の目的

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) はヒトゲノム中に約 800 種類の遺伝子が存在し、この内カテコールアミンやヌクレオシド等の低分子リガンドが結合し、創薬の標的となっているクラス A は約 270 種類存在する。現在、その内の 49 種類が未だオーファン受容体である。ヒトゲノム解読後、GPCR の内因性リガンド同定の報告が相次いだが、近年そのペースが激減している。このことは、これまでの概念に無い内因性リガンドの存在を示唆するものである。本研究の目的は、新規概念のクラス A に分類される GPCR の内因性リガンドを同定することである。

tRNA はタンパク質翻訳に不可欠のノンコーディング RNA の一種であるが、構成するヌクレオチドの約 80% が何らかの化学修飾を受けている。この修飾は、細菌~ヒトまですべての生物に認められており、すべての生物に共通の修飾もあれば、真核生物にのみ認められる修飾もあるなど多彩である。現在ヒトでは、約 50 種類が同定されている。従来の細菌や酵母の研究から、tRNA 修飾が、翻訳の正確性 (フレームシフトや誤翻訳の防止)、翻訳速度、tRNA の構造や安定性を制御していることは知られていた。一方、哺乳動物、特にヒトでは疾患との関連性が不明なため、これまで研究が全く進んでいない研究分野であった。最近になり我々が、tRNA 修飾異常が 2 型糖尿病、ミオパチー、小児急性肝不全など様々な疾患発症に関与していることを明らかにしたことから、生命科学研究の中で注目されている研究分野となっている。さらに tRNA の化学修飾は、細胞や生体内外の様々な環境因子 (酸化ストレス、pH、血中ポリ硫黄濃度など) により変動し、それが各組織・臓器の生理機能に影響を及ぼすことを明らかにした。

tRNA 修飾が DNA やタンパク質修飾と異なるのは、脱修飾酵素が存在しないということである。すなわち一度修飾されると、ヌクレオシドに代謝された後も長時間修飾ヌクレオシドとして細胞内に存在する。我々は、tRNA が代謝された後のヌクレオシドの局在について検討した。すると、未修飾ヌクレオシドは細胞内に再吸収され RNA 合成に再利用されるが、一方、修飾ヌクレオシドは、再利用できないため細胞外から血中に排出されることを明らかにした。そこで、血中に排出された修飾ヌクレオシドの一部が、GPCR に結合し、活性化するのではないかとの着想に至った。そこで本研究では修飾 RNA が代謝されて産生される修飾ヌクレオシドが、新規概念の内分泌因子として生理機能を発揮するかどうかを明らかにすることを目的として実施した。

### 3. 研究の方法

#### ①. GPCR 結合・活性化修飾ヌクレオシドの網羅的解析と同定

ヒトでは約 50 種類の RNA 由来の修飾ヌクレオシドが存在する。そこで各修飾ヌクレオシドについて、G 蛋白共役型受容体リガンド同定技術を用いてアデノシン受容体に結合し、同受容体を活性化修飾ヌクレオシドが存在するか網羅的に解析する。

網羅的解析で陽性となった修飾ヌクレオシドとアデノシン受容体を強制発現させた培養細胞を用いた cAMP-Glo™ Assay 法により、生理的結合能、細胞内のセカンドメッセンジャー活性化能、EC50 を調査し、真の内因性リガンドであることを証明する。

#### ②. ①で同定した修飾 tRNA ヌクレオシドの生理機能解析

①で同定した修飾ヌクレオシドの生理機能を明らかにするために、①で同定した修飾ヌクレオシドがどのような刺激により細胞外に分泌されるか、培養細胞に様々な刺激を与え、細胞外への分泌量を測定する。①で同定した修飾ヌクレオシドをマウスなど動物に接種し、その生体への影響について調査する。

### 4. 研究成果

#### ①. GPCR 結合・活性化修飾ヌクレオシドの網羅的解析と同定

血清や尿中に分泌される修飾ヌクレオシドを同定するために、ヒト血清ならびに尿を除タンパク後 LC/MS 質量分析機器にて各修飾ヌクレオシド量について網羅的に調査した。その結果、20 種類の修飾ヌクレオシドが血清ならびに尿中に豊富に存在することが明らかになった。

例えば、血清中に t<sup>6</sup>A は 78 nM、m<sup>1</sup>A は 48 nM、m<sup>6</sup>A は 12 nM 存在することが明らかになった。そこで、この 20 種類の修飾ヌクレオシドについて、A1、A2A、A2B ならびに A3 アデノシン受容体に対する結合能および活性能について G 蛋白共役型受容体リガンド同定技術を用いて調査した。すると m<sup>6</sup>A が、アデノシン A3 受容体に対して高い結合能と活性化能を

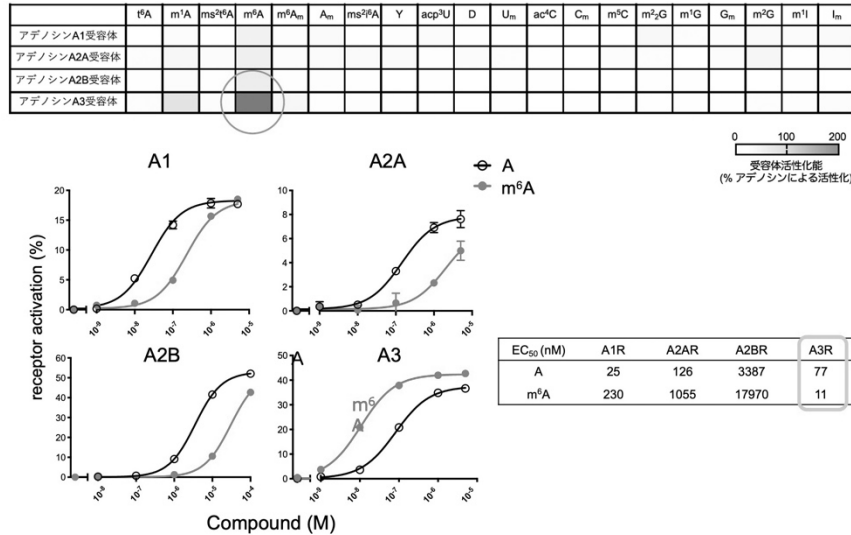
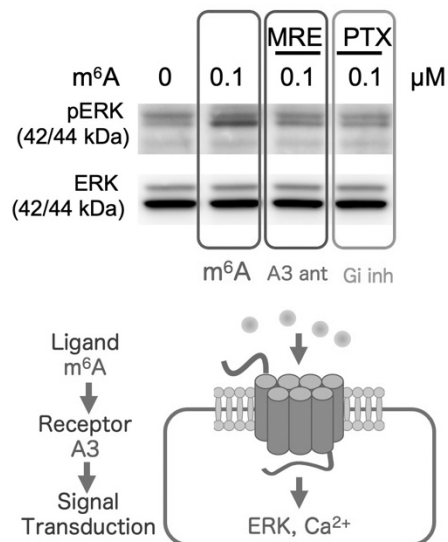


図1 修飾ヌクレオシドの1種であるm<sup>6</sup>AはA3アデノシン受容体のリガンドである

有していることが明らかになった (図 1)。そこで、アデノシンと m<sup>6</sup>A の各アデノシン受容体に対する EC<sub>50</sub> について比較検討した。その結果、A1、A2A、A2B アデノシン受容体に対しては、アデノシンの EC<sub>50</sub> が m<sup>6</sup>A より低値だった。一方、A3 アデノシン受容体に対しては、m<sup>6</sup>A の EC<sub>50</sub> がアデノシンより低値であった。また、その EC<sub>50</sub> が 11nM であることから、生理的なりガンドであることが示唆された (図 1)。

次に、m<sup>6</sup>A が A3 アデノシン受容体を活性化し、その下流の情報伝達系を活性化するか検討した。A3 アデノシン受容体にアデノシンが結合すると、細胞内の ERK が活性化されることが知られている。そこで培養細胞を m<sup>6</sup>A で 1 時間処理し、ERK のリン酸化についてウエスタンブロット法にて調査した。その結果、m<sup>6</sup>A は濃度依存的に ERK のリン酸化を促進した (図 2)。この m<sup>6</sup>A による ERK のリン酸化は、A3 アデノシン受容体の拮抗薬ならびに Gi 阻害剤で抑制された。A3 アデノシン受容体は、Gi 受容体であることから、m<sup>6</sup>A の ERK 経路の活性化は、A3 アデノシン受容体を介していることが示唆された。A3 アデノシン受容体の活性化は、細胞内の Ca<sup>2+</sup>の上昇とそれによる細胞内カルシウムシグナルを活性化することが知られていることから、次に m<sup>6</sup>A が細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させるか、Ca<sup>2+</sup>イメージング技術で解析した。その結果、m<sup>6</sup>A を培養細胞液中に添加すると、添加後 10 秒以内に、細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇した (図 2)。この m<sup>6</sup>A による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇は、A3 アデノシン受容体の拮抗的阻害薬を添加すると抑制されることから、m<sup>6</sup>A による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇は A3 アデノシン受容体を介していると結論づけた。

◆ Phosphorylation of transcription factors



◆ Intracellular calcium level

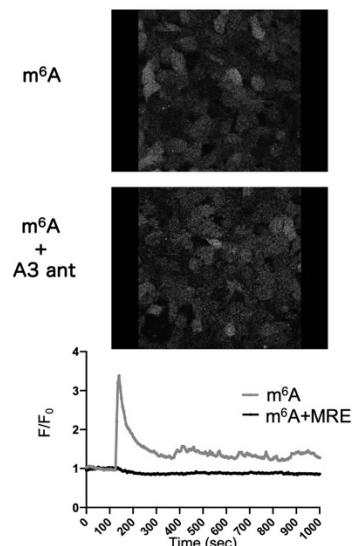


図2 m<sup>6</sup>Aは細胞内情報伝達経路としてERKの活性化と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させる

②. m<sup>6</sup>A の生理機能解析

A3 アデノシン受容体が、I型アレルギーに関与していることが知られていることから肥満

細胞の脱顆粒を促進する

か検討した。肥満細胞を

m<sup>6</sup>A で処理した後、

その後フォルスコリン

で刺激し、細胞内の

cAMP 濃度について調査

した。その結果、m<sup>6</sup>A は

濃度依存的にフォルスコ

リンによる細胞内

cAMP 低下作用を促進す

ることが明らかになっ

た (図3)。次に、肥満細胞

を様々な濃度の m<sup>6</sup>A

で処理し、その後抗原

である BSA で刺激し、脱

顆粒について検討した。

その結果、m<sup>6</sup>A は濃

度依存的に BSA による

肥満細胞の脱顆粒を促

進することが明らかにな

った (図3)。さらに、

m<sup>6</sup>A は肥満細胞内の Ca<sup>2+</sup>

を上昇させることが判明

した (図3)。

最後に、m<sup>6</sup>A が In vivo

で I型アレルギーを促進

させるか検討した。ウサ

ギの耳に IgE を注射し、

翌日に m<sup>6</sup>A もしくはコン

ロールとして溶解液のみ

を耳に注射した、その後、

抗原とエバンスブルーを

投与し、I型アレルギー反

応として生ずるエバンス

ブルー液の血管外への浸

潤面積について比較検討

した。すると、m<sup>6</sup>A を

投与すると、エバンスブ

ルー液の浸潤が濃度依

存的に拡大することが明

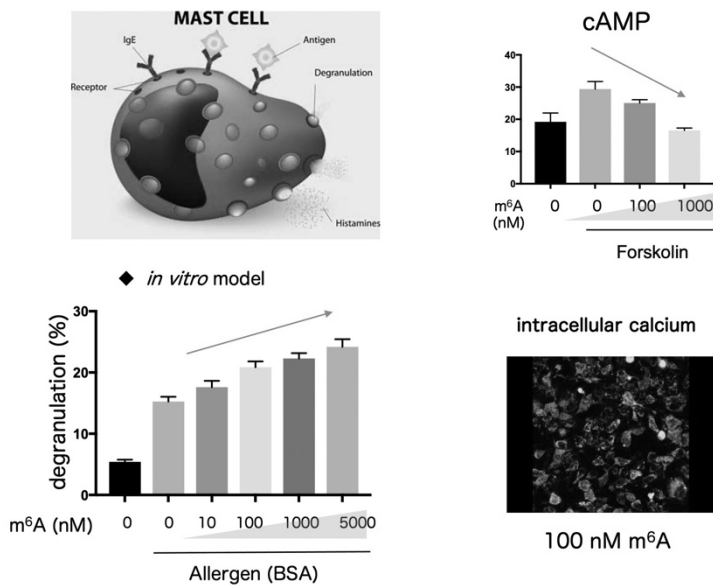


図3 m<sup>6</sup>Aはマスト細胞の脱顆粒などアレルギー反応を惹起させる

m<sup>6</sup>A は肥満細胞内の Ca<sup>2+</sup>を上昇させることが判明した (図3)。

最後に、m<sup>6</sup>A が In vivo で I型アレルギーを促進させるか検討した。ウサギの耳に IgE を注射し、翌日に m<sup>6</sup>A もしくはコンロールとして溶解液のみを耳に注射した、その後、抗原とエバンスブルーを投与し、I型アレルギー反応として生ずるエバンスブルー液の血管外への浸潤面積について比較検討した。すると、m<sup>6</sup>A を投与すると、エバンスブルー液の浸潤が濃度依存的に拡大することが明らかになった。このことから、m<sup>6</sup>A は I型アレルギー反応を促進することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Kaitsuka Taku, Kojima Rie, Kawabe Masaaki, Noguchi Hirofumi, Shiraki Nobuaki, Kume Shoen, Tomizawa Kazuhito  | 4. 巻<br>14                    |
| 2. 論文標題<br>A culture substratum with net-like polyamide fibers promotes the differentiation of mouse and human pluripotent stem cells to insulin-producing cells | 5. 発行年<br>2019年               |
| 3. 雑誌名<br>Biomedical Materials   | 6. 最初と最後の頁<br>045019 ~ 045019 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1088/1748-605X/ab261c   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yamamoto Takahiro, Fujimura Atsushi, Wei Fan-Yan, Shinojima Naoki, Kuroda Jun-ichiro, Mukasa Akitake, Tomizawa Kazuhito                    | 4. 巻<br>21            |
| 2. 論文標題<br>2-Methylthio Conversion of N6-Isopentenyladenosine in Mitochondrial tRNAs by CDK5RAP1 Promotes the Maintenance of Glioma-Initiating Cells | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>iScience   | 6. 最初と最後の頁<br>42 ~ 56 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.isci.2019.10.012   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Wei FY, Tomizawa K.                     | 4. 巻<br>Suppl 2     |
| 2. 論文標題<br>tRNA modifications and islet function. | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>Diabetes Obes Metab.                    | 6. 最初と最後の頁<br>20-27 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/dom.13405.    | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Mon EE, Wei FY, Ahmad RNR, Yamamoto T, Moroishi T, Tomizawa K.   | 4. 巻<br>69            |
| 2. 論文標題<br>Regulation of mitochondrial iron homeostasis by sideroflexin 2. | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>J Physiol Sci.   | 6. 最初と最後の頁<br>359-373 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s12576-018-0652-2.                     | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Ogawa A, Nagiri C, Shihoya W, Inoue A, Kawakami K, Hiratsuka S, Aoki J, Ito Y, Suzuki T, Suzuki T, Inoue T, Nureki O, Tanihara H, Tomizawa K, Wei FY. | 4. 巻<br>81            |
| 2. 論文標題<br>N6-methyladenosine (m6A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand   | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Cell  | 6. 最初と最後の頁<br>659-667 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.molcel.2020.12.038.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Chujo T, Tomizawa K.   | 4. 巻<br>288        |
| 2. 論文標題<br>Human transfer RNA modopathies: diseases caused by aberrations in transfer RNA modifications. | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>FEBS J.  | 6. 最初と最後の頁<br>1-27 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/febs.15736.  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tomizawa, Kazuhito                                       |
| 2. 発表標題<br>tRNA modifications & disease onset                       |
| 3. 学会等名<br>SBP Medical Discovery Institute Conference (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|                         |
|-------------------------|
| 1. 発表者名<br>富澤一仁         |
| 2. 発表標題<br>tRNAメチル化の恒常性 |
| 3. 学会等名<br>第91回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年<br>2018年         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>魏 范研、富澤一仁                          |
| 2. 発表標題<br>tRNA修飾異常によるミトコンドリア病の発症機序及び新規診断法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第18回日本ミトコンドリア学会年会                  |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 中條 岳志<br><br>(Chujo Takeshi) |                       |    |

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 |
|---------|---------|