

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02624

研究課題名(和文) RNA修飾を介した薬物動態制御機構の解明と創薬への応用研究

研究課題名(英文) RNA modification controlling pharmacokinetics: elucidation of the mechanisms for application to drug discovery

研究代表者

中島 美紀 (Nakajima, Miki)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・教授

研究者番号：70266162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：RNA上のアデノシンが6位メチル化(m6A修飾)されると、それを認識するreaderタンパク質の作用によってタンパク質発現量が増減する。本研究では、ヒト薬物代謝酵素のmRNAがm6A修飾されることで医薬品や生体内物質の体内動態が受ける影響を明らかにすることを目的とした。主な薬物代謝酵素であるCYP3A4, CYP2B6およびCES2について、それらのmRNAがm6A修飾されることで発現量が増減し、薬物代謝酵素活性が変動することを見出した。発現変動に寄与しているm6A修飾部位を同定し、それらを認識して作用するreaderタンパク質を同定すると共に、詳細な分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床で使用されている医薬品化合物の多くは、代謝されることで薬理作用を失い、生体外へと排泄されるため、代謝反応を担う薬物代謝酵素の発現調節機構の理解は、医薬品適正使用ならびに創薬に有益となる。本研究では、薬物代謝酵素をコードするmRNA上で、アデノシンがメチル化される修飾(m6A修飾)が、当該薬物代謝酵素の発現量を増減させ、薬物代謝能や脂質などの生体内物質の代謝能を変動する要因となっていることを明らかにした。薬物動態の変動要因として、新たな転写後調節機構を提唱した。

研究成果の概要(英文)：Methylation of adenosine at the N6 position (m6A modification) is one of the major RNA modifications in mammals and is catalyzed by METTL3-METTL14 methyltransferase complex, called “writer” proteins. The m6A is demethylated by fat mass and obesity-associated protein (FTO) or AlkB homolog 5 (ALKBH5), called “eraser” proteins. “Reader” proteins recognize the m6A to enhance degradation of mRNA or to modulate translation or splicing, affecting the expression. We found that the expression levels of CYP3A4, CYP2B6, and CES2, major drug-metabolizing enzymes, in human hepatoma-derived cell lines, were affected by the knockdown of m6A modification enzymes, resulting in the changes in drug metabolism potencies. We identified the m6A modification sites on CYP3A4, CYP2B6, and CES2 mRNAs that contribute to the expression changes, identified the reader proteins that recognize and act on them, and clarified the detailed molecular mechanisms.

研究分野：薬物動態学

キーワード：RNA修飾 RNAメチル化 転写後調節 薬物代謝酵素 シトクロム P450 カルボキシエステラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA は転写後に様々な修飾を受けており (RNA 修飾)、ヒトで高頻度に認められるのは A-to-I RNA 編集とアデノシン 6 位メチル化 (m^6A 修飾) である。前者では adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) によってアデノシンがイノシンに変換される。イノシンはグアノシンとして認識されるため、A-to-I RNA 編集によりアミノ酸置換や、スプライシング異常または mRNA 安定性の変化が起こり得る。後者では methyltransferase like 3 (METTL3) と METTL14 複合体によってアデノシンの 6 位がメチル化され、生じた m^6A に reader タンパク質が作用し、mRNA の安定性や翻訳効率が変化し得る。また、 m^6A は、fat mass and obesity-associated protein (FTO) や AlkB homolog 5, RNA demethylase (ALKBH5) によって脱メチル化されることで、メチル化程度がコントロールされている。次世代シーケンス解析により、ヒト RNA で 450 万箇所が A-to-I RNA 編集を、140 万箇所が m^6A 修飾を受けていることが最近明らかになったが、個々の RNA が修飾を受けることの生物学的・生理学的意義の解明が課題となっている。

2. 研究の目的

薬物代謝は、医薬品有効成分の血中濃度を規定し、薬効や副作用発症を左右する重要な要因であることから、それを担う薬物代謝酵素の発現量に個人差が生じる原因が研究され、遺伝子多型、転写因子による調節機構、DNA メチル化などのエピジェネティクスなどで説明されてきた。しかし、mRNA とタンパク質発現量に相関が認められない例が多く、転写後調節機構の寄与が示唆されている。本研究では、薬物代謝酵素の発現が RNA 修飾によって制御されていること、およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト肝がん由来 HepG2、Huh-7 または HepaRG 細胞を用い、RNA 修飾酵素に対する siRNA を導入し、薬物代謝酵素の発現量や酵素活性をリアルタイム RT-PCR、ウェスタンブロットおよび LC-MS/MS により評価した。RNA 修飾は、ダイレクトシーケンス解析または methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP) 法により評価した。転写阻害剤である α -アマンチンまたはアクチノマイシン D を処置した条件下で経時的に mRNA を定量することで mRNA 安定性を評価した。RNA 修飾部位を含む配列をルシフェラーゼ遺伝子の下流または上流に組み込んだプラスミドを細胞に導入し、RNA 修飾酵素ノックダウンによるルシフェラーゼ活性の変化を評価した。

4. 研究成果

(1) m^6A 修飾によるカルボキシルエステラーゼ 2 (CES2) の発現制御が薬物代謝および脂質代謝に及ぼす影響

医薬品の加水分解反応を担う代謝酵素である CES2 の HepG2 または HepaRG 細胞における発現量が、METTL3/METTL14 のダブルノックダウンにより有意に増加し、FTO または ALKBH5 のノックダウンにより有意に低下することを明らかにした。METTL3/METTL14 のダブルノックダウンによる CES2 の発現量増加は、抗がん薬塩酸イリノテカンの薬効体 SN-38 への加水分解酵素活性の増加をもたらした。CES は脂質を代謝する役割をも有しており、METTL3/14 のダブルノックダウンによる CES2 の発現量増加は、細胞内の脂質量を低下させることを明らかにした。

m^6A 修飾は、DRACH (D = A, G or U, R = A or G, H = A, C or U) モチーフのアデノシンで起こる。CES2 mRNA 上には 5'-非翻訳領域 (UTR) から、エクソンおよび 3'-UTR までにおいて 65 箇所 DRACH 配列が認められ、中でも 5'-UTR が高度に m^6A 修飾されていることが m^6A 抗体を

用いた MeRIP アッセイにより示された。転写阻害剤である α -アマンチン存在下で mRNA 発現量を経時的に評価した結果、METTL3/14 のダブルノックダウンは CES2 mRNA の安定性を向上させることが示された。5'-UTR を組み込んだレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、reader タンパク質の 1 つである YTHDC2 のノックダウンによってルシフェラーゼ活性が有意に増加したことから、YTHDC2 が CES2 mRNA 5'-UTR の m⁶A 修飾を認識して、CES mRNA の安定性を低下させることを明らかにした。

(2) m⁶A 修飾によるシクロロム P450 (CYP) 2B6 の発現変動とそのメカニズム解明

CYP2B6 はシクロホスファミドやエファピレンツなどの医薬品を代謝する薬物代謝酵素である。CYP2B6 mRNA には 18 箇所の DRACH モチーフが認められ、5'-UTR および終始コドン周辺を含む最終エクソンが高度に m⁶A 修飾されていることを、m⁶A 抗体を用いた MeRIP アッセイにより明らかにした。Huh7 細胞または HepaRG 細胞における CYP2B6 発現量が METTL3 のノックダウンにより有意に低下し、CYP2B6 により触媒されるプロピオン 6 位水酸化酵素活性も有意に低下した。CYP2B6 mRNA の安定性は METTL3 をノックダウンしても変化しなかったことから、CYP2B6 の発現低下は mRNA 安定性の低下に依らないことが示された。最終エクソンを下流に組み込んだレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、METTL3 ノックダウンしてもレポーター活性は変動せず、最終エクソンの m⁶A 修飾は CYP2B6 の発現変動に寄与していないと示唆された。また、5'-UTR を上流に組み込んだレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイでも、レポーター活性は METTL3 ノックダウンにより変動しなかった。Reader タンパク質である YTHDC1 は m⁶A を認識して、ヒストン H3 の 9 番目リジン残基のジメチル体 (H3K9me2) を脱メチル化する KDM3B (lysine demethylase 3B) をリクルートすることで転写を活性化することが知られている。そこで、METTL3 ノックダウンにより、ヒストン修飾が変化して CYP2B6 の転写が影響を受けている可能性を考慮し、H3K9me2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行ったところ、CYP2B6 遺伝子の遠位ならびに近位のエンハンサー領域の H3K9me2 レベルが METTL3/14 ダブルノックダウンにより増加していることが示された。また、当該領域のクロマチンは METTL3/14 ダブルノックダウンにより圧縮されることが FAIRE (formaldehyde-assisted enrichment regulatory element) アッセイにより示され、それが CYP2B6 発現低下をもたらしていることを明らかにした。

(3) m⁶A 修飾による CYP3A4 の発現変動とそのメカニズム解明

CYP3A4 は臨床で使用されている医薬品の約半数を代謝する主要な薬物代謝酵素である。HepaRG 細胞における CYP3A4 発現量は、METTL3/METTL14 ダブルノックダウンにより有意に増加し、ALKBH5 ノックダウンでは変化しなかったものの、FTO ノックダウンにより有意に低下した。DRACH モチーフは、CYP3A4 mRNA の 5'-UTR およびエクソンにも認められたが、3'-UTR に豊富に認められ、3'-UTR が高度に m⁶A 修飾されていることが、m⁶A 抗体を用いた MeRIP アッセイにより示された。転写阻害剤であるアクチノマイシン D 存在下で CYP3A4 mRNA 発現量を経時的に評価したところ、CYP3A4 mRNA の安定性が METTL3/METTL14 のノックダウンにより増加したことから、CYP3A4 発現量の増加は CYP3A4 mRNA 安定性の向上によるものであることが示された。3'-UTR を下流に組み込んだレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、METTL3/METTL14 ノックダウンによるレポーター活性の有意な増加が認められたことから、3'-UTR における m⁶A 修飾が発現調節に寄与していることが示された。Reader タンパク質に対するノックダウン実験の結果、YTHDC2 が CYP3A4 mRNA の 3'-UTR における m⁶A を認識して、CYP3A4 mRNA の分解を促進していることを明らかにした。

以上、本研究では、RNA 修飾が薬物代謝酵素の発現および酵素活性を調節する重要な転写後調節機構であることを示し、それぞれの調節における分子メカニズムを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masataka Nakano and Miki Nakajima	4. 巻 50
2. 論文標題 A-to-I RNA editing and m6A modification modulating expression of drug-metabolizing enzymes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 624-633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/dmd.121.000390	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Motoki Isono, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima	4. 巻 205
2. 論文標題 Adenosine N6-methylation upregulates the expression of human CYP2B6 by altering the chromatin status	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2022.115247	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Takemoto S, Nakano M, Nozaki K, Fukami T, Nakajima M.	4. 巻 37
2. 論文標題 Adenosine deaminases acting on RNA modulate the expression of the human pregnane X receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2020.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ondo K, Isono M, Nakano M, Hashiba S, Fukami T, Nakajima M.	4. 巻 189
2. 論文標題 The N6-methyladenosine modification posttranscriptionally regulates hepatic UGT2B7 expression.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2020.114402	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Takemoto S, Nakano M, Fukami T, Nakajima M.	4. 巻 193
2. 論文標題 m6A modification impacts hepatic drug and lipid metabolism properties by regulating carboxylesterase 2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2021.114766	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shuji Takeuchi, Masataka Nakano, Seiya Takemoto, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima
2. 発表標題 Hepatic CYP3A4 expression is modulated by m6A modification
3. 学会等名 The 37th Annual Meeting of JSSX
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯野元輝、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 RNA編集酵素ADAR1によるシトクロムc発現制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲本拓斗、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 RNA編集酵素ADAR1によるE-カドヘリン発現制御が肺がんのパクリタキセル感受性に及ぼす影響
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯野元輝、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 m6A修飾によるCYP2B6の発現制御機構の解明
3. 学会等名 令和4年内外環境応答・代謝酵素研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miki Nakajima and Masataka Nakano.
2. 発表標題 Epitranscriptional regulation of drug-metabolizing enzymes.
3. 学会等名 36th Japanese Society for the Study of Xenobiotics (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seiya Takemoto, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima.
2. 発表標題 Effects of m6A modification on hepatic drug and lipid metabolism properties by regulation of carboxylesterase 2.
3. 学会等名 36th Japanese Society for the Study of Xenobiotics
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takumi Nakano, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima.
2. 発表標題 m6A modification-related enzymes METTL3 and ALKBH5 modulate CYP1A1 induction by upregulating ARNT expression in human lung cells.
3. 学会等名 36th Japanese Society for the Study of Xenobiotics
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯野元輝、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 RNAメチル化転移酵素によるヒトCYP2B6の発現制御
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学薬学系薬物代謝安全性学研究室 https://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/index.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

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
---------	---------