

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02731

研究課題名（和文）細菌における新規概念のRNA修飾の同定とその病態生理的意義の解明

研究課題名（英文）Nobel RNA modification in bacteria and its pathophysiological significance

研究代表者

富澤 一仁（Tomizawa, Kazuhito）

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）：本研究では、細菌感染時に尿もしくは血清中に特異的に増加する修飾ヌクレオシドについて網羅的解析を行った。すべての菌種から、細菌特異的修飾ヌクレオシドの1種であるm2Aが検出された。m2A量についてグラム陰性菌とグラム陽性菌と比較すると、グラム陰性菌の培地中のm2A量が多かった。細菌感染者、ウイルス感染者ならびに健常人の尿中のm2A量について、比較検討した。細菌感染者の尿中のm2A量は、健常人ならびにウイルス感染者と比較して有意に多かった。以上の結果から、m2Aは感染の有無を診断するマーカーとして有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細菌感染時に血中や尿中で特異的に増える修飾ヌクレオシド（RNAの分解産物）を同定した。同定された修飾ヌクレオシドは生理活性を有していなかったが、起炎菌の数と相関が認められた。従来、細菌感染時の細菌を同定するためには、細菌培養やPCRにより同定していたが、同定までに24時間以上かかっていた。本研究結果から、血清中もしくは尿中の修飾ヌクレオシドが、従来の細菌感染マーカーとは異なり、感染している細菌数を反映した新しい細菌感染マーカーになることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted a comprehensive analysis of modified nucleosides that specifically increase in urine or serum during bacterial infection. One type of bacteria-specific modified nucleoside, m2A, was detected in all species of 15 gram-negative pathogens and 8 gram-positive pathogens. When comparing the amounts of m2A between gram-negative and gram-positive bacteria, the levels of m2A in the medium were higher in gram-negative bacteria. We also compared and examined the levels of m2A in the urine of bacterial infection patients, viral infection patients, and healthy individuals. The m2A levels in the urine of bacterial infection patients were significantly higher compared to healthy individuals and viral infection patients. These results suggest that m2A is useful as a marker for diagnosing the presence of infection.

研究分野：病態生理学

キーワード：RNA修飾 細菌感染 修飾ヌクレオシド

1. 研究開始当初の背景

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等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。

我々は、tRNA や rRNA は細胞内でヌクレオシドまで代謝された後、未修飾ヌクレオシドは RNA 合成に再利用されるが、修飾ヌクレオシドは細胞外に積極的に排出されることを明らかにした。G 蛋白共役型受容体リガンド同定技術を用いて、修飾 RNA 代謝ヌクレオシドである N6-メチルアデノシン (m^6A) が グラス アデノシン ($A3$) 受容体に結合し、細胞内情報伝達系を活性化させることを明らかにした。また、 m^6A の $A3$ 受容体に対する EC_{50} はアデノシンのそれより約 8 倍低いことから、 $A3$ 受容体の真のリガンドは修飾 RNA 代謝産物である N6-メチルアデノシン (m^6A) であり、様々な環境要因に対する恒常性維持に関与していることを明らかにした。

また、我々は細菌感染状態における細菌と宿主の RNA 修飾に変化があるのか探求してきた。すると興味深いことに細菌が細胞に貪食されると細菌特異的修飾であるメチル化アデノシン (m^2A) が培地中に排泄されることを明らかにした。しかし、この細菌内から培地に放出される m^2A が、感染したヒト由来の培養や感染患者でも放出されるのか、さらにはヒトの体内でどのような機能を有するのかが不明である。さらに、 m^2A 以外の細菌特異的修飾ヌクレオシドが、細菌感染患者の尿や血液中に存在するのかが全く不明である。

2. 研究の目的

本研究は、以下のことを目的として実施した。

- (1) 各種病原菌・起炎菌と相関のある修飾ヌクレオシドの同定・・・ヒトは細菌に感染することにより、様々な疾患を発症したり、様々な病態を呈したりする。ヒトに対して病原菌・起炎菌となる細菌は多数存在する。もし菌種によって差異が認められるなら、新規病原菌同定検査法の開発に応用できる可能性があるため、病原菌や起炎菌により、産生される修飾ヌクレオシドに違いがあるのか明らかにすることを目的とし、研究を実施した。
- (2) 細菌感染患者尿中の細菌特異的修飾ヌクレオシド、 m^2A 量の測定・・・従来の研究により細菌がマクロファージに貪食されると培地中で検出される細菌特異的修飾ヌクレオシドである m^2A が、実際に感染したヒトでも検出されるのか明らかにすることを目的として、細菌感染患者の尿中における m^2A について解析した。
- (3) m^2A の病態生理的意義の検討・・・細菌特異的修飾ヌクレオシドである m^2A がヒトの細胞や組織にどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

- (1) 各種病原菌・起炎菌と相関のある修飾ヌクレオシドの同定・・・15 種類のグラム陰性病原菌ならびに 8 種類のグラム陽性病原菌を 24 時間培養し、その培地を回収し、除タンパク処理を行った。その後、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) にて質量分析を行い、修飾ヌクレオシド量について網羅的に解析を行った。各修飾ヌクレオシド量についてヒートマップ解析を行った。コントロールとして、ヒト由来培養細胞である HeLa 細胞、HEK293 細胞、THP-1 細胞の培養培地から除タンパク処理をした後、LC-MS で修飾ヌクレオシドについて網羅的に解析を行った。
- (2) 細菌感染患者尿中の細菌特異的修飾ヌクレオシド、 m^2A 量の測定・・・細菌性肺炎や細菌性腎盂腎炎など 56 名の細菌感染者から尿を採取した。同様にインフルエンザ感染症など 24 名のウイルス感染症患者から尿を採取した。コントロールとして 10 名健常人から尿を採取した。採取した尿をメタノールで除タンパク後、LC-MS で m^2A 量を測定した。 m^2A 量は、クレアチニンで補正した。
- (3) 細菌特異的修飾ヌクレオシド、 m^2A の病態生理的意義の検討・・・Hela 細胞ならびにホルボール 12-ミリストート 13-アセタート (PMA) によりマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞を培養した。その後、これら細胞を 100nM~10 μ M の濃度の m^2A を培地に添加することにより、刺激した。コントロールとして、リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) で刺激した。添加後、24 時間ならびに 48 時間後に細胞を回収した。回収した細胞からトータル RNA をフェノール-クロロホルム抽出法で精製した。精製したトータル RNA 内のインターロイキン (IL)-1、

-6、-8 および TNF- の遺伝子発現量について定量 PCR 法にて測定した。

4. 研究成果

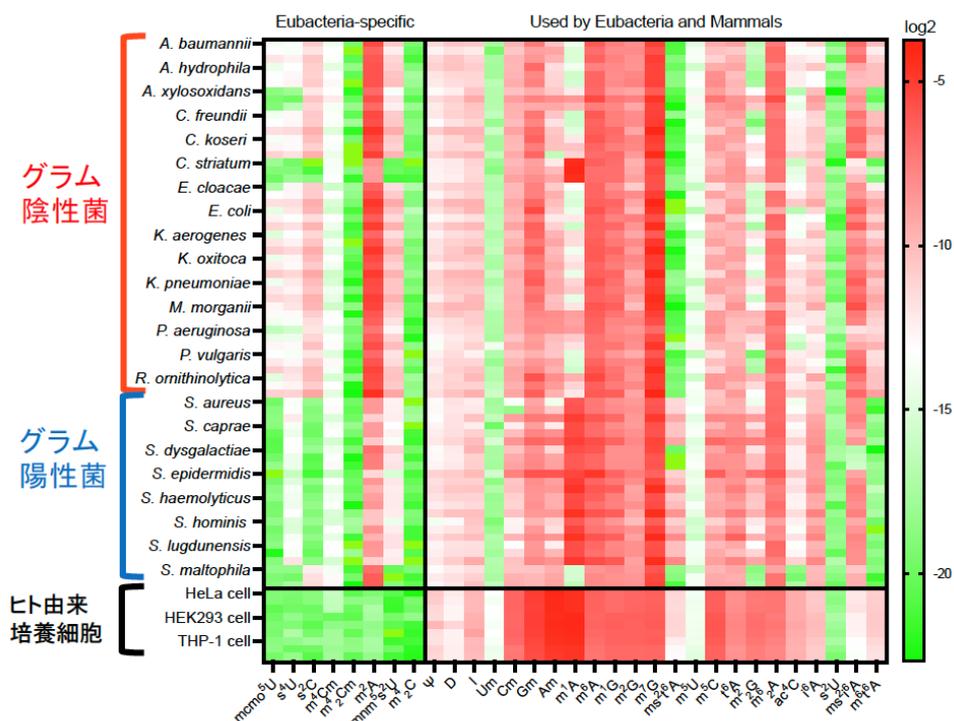
(1) 各種病原菌・起炎菌と相関のある修飾ヌクレオシドの同定・・・

15 種類のグラム陰性病原菌ならびに 8 種類のグラム陽性病原菌すべての菌種から、 m^2A は検出された (図 1)。 m^2A 量についてグラム陰性菌とグラム陽性菌で比較すると、グラム陰性菌の培地中の m^2A 量が多かった。細菌特異的修飾ヌクレオシドである mnm^5s^2U は、*S.maltophilia* ならびに *C.striatum* 以外の菌種において検出された (図 1)。 $mcmo^5U$ 、 s^4U ならびに s^2C は、グラム陰性菌では多く検出されたが、グラム陰性菌では微量の量が検出された。細菌特異的修飾ヌクレオシドの一種である $2C$ は、いずれの菌種からも微量以下の量しか検出されなかった。細菌ならびに真核細胞の両種で認められる修飾ヌクレオシド群については、各菌種において培地中で検出される量が多い菌種もあれば、少ない菌種もあり、各菌種で特有のヒートマップパターンを示していた。

ヒト由来の培養細胞からは、細菌特異的修飾ヌクレオシドは検出されなかった。

以上の結果より、細菌は菌種によって菌外に放出する修飾ヌクレオシドの種類、量が異なることが示唆された。すなわち、修飾ヌクレオシドを網羅的に解析することにより、病原菌・起炎菌を同定する新しい技術開発の可能性が示された。

図1 各種病原菌の培養液中に存在する修飾ヌクレオシドの網羅的解析

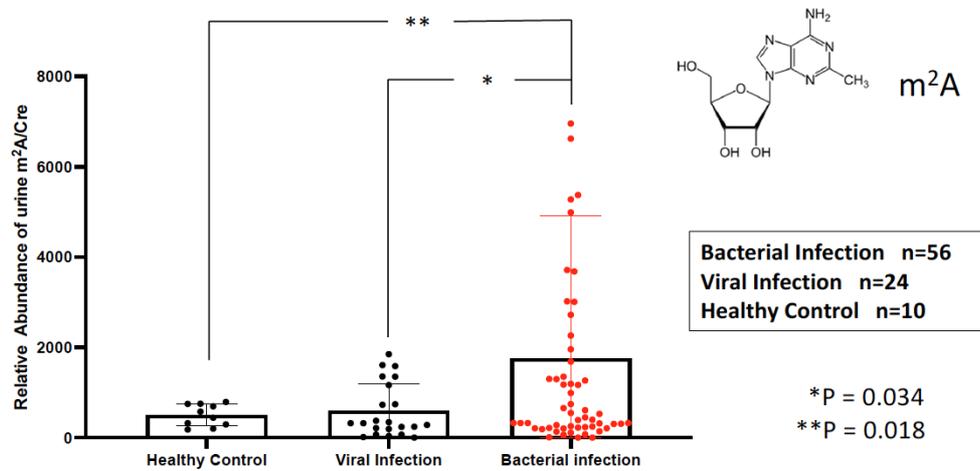


(2) 細菌感染患者尿中の細菌特異的修飾ヌクレオシド、 m^2A 量の測定・・・

m^2A は、細菌特異的修飾ヌクレオシドの 1 種である。細菌感染者、ウイルス感染者ならびに健常人の尿中の m^2A 量について、比較検討した。細菌感染者の尿中の m^2A 量は、健常人ならびにウイルス感染者と比較して有意に多かった (図 2) 細菌感染症マーカーである血清 C-reactive protein (CRP) ならびに白血球数と m^2A 量について相関があるか検討したが、相関性は認めなかった。細菌感染者の病巣から採取した体液や膿汁を用いた細菌培養にて同定された原因菌・起炎菌の種類により m^2A 量に違いがあるのか検討したが、差は認めなかった。この結果は (1) の実験結果とも一致する結果であった。一方、 m^2A 量と細菌感染者の病態、カルテ情報について相関性がある項目があるか検討すると、体温と相関性が認められた。

以上の結果より、尿中の m^2A 量を測定することにより、細菌感染の有無が診断できることが示唆された。一方で、CRP 値や白血球数とは相関が認められなかったことから、 m^2A は、細菌感染による急性炎症を反映するのではなく、原因菌、起炎菌の細菌数と相関があることが示唆された。

図2 細菌感染者、ウイルス感染者ならびに健常人の尿中のm²A量の比較



(3) 細菌特異的修飾ヌクレオシド、m²A の病態生理的意義の検討・・・

Hela 細胞ならびに PMA でマクロファージ様に分化誘導した THP-1 細胞を 100nM~10 μ M 濃度の m²A で刺激し、各種サイトカイン (IL-1、-6、-8 および TNF-) の発現量について PBS で刺激した細胞と比較検討した。100nM~10 μ M 濃度の m²A は、両細胞において IL-1、-6、-8 および TNF- 遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。そこで、培地中に添加した m²A が細胞内に導入されるのか、安定同位体標識した m²A を THP-1 細胞の培養培地に添加し、24 時間後に細胞を回収し、細胞内の m²A 量について LC-MS で測定した。すると細胞内の安定同位体標識した m²A 量は、未標識の内因性 m²A 量と差は認められなかった。

以上の結果より、m²A は宿主の炎症の惹起や炎症の増悪を引き起こすような病態生理学的作用を有さないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 3件）

1. 著者名 Nagayoshi Y, Nishiguchi K, Yamamura R, Chujo T, Oshiumi H, Nagata H, Kaneko H, Yamamoto K, Nakata H, Sakakida K, Kunisawa A, Adachi M, Kakizoe Y, Mizobe T, Kuratsu JI, Shimada S, Nakamori Y, Matsuoka M, Mukoyama M, Wei FY, Tomizawa K.	4. 巻 12
2. 論文標題 t6A and ms2t6A Modified Nucleosides in Serum and Urine as Strong Candidate Biomarkers of COVID-19 Infection and Severity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12091233	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Murakami Y, Wei FY, Kawamura Y, Horiguchi H, Kadomatsu T, Miyata K, Miura K, Oike Y, Ando Y, Ueda M, Tomizawa K, Chujo T.	4. 巻 6
2. 論文標題 NSUN3-mediated mitochondrial tRNA 5-formylcytidine modification is essential for embryonic development and respiratory complexes in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04680-x	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ahmad RNR, Zhang LT, Morita R, Tani H, Wu Y, Chujo T, Ogawa A, Harada R, Shigeta Y, Tomizawa K, Wei FY.	4. 巻 3
2. 論文標題 Pathological mutations promote proteolysis of mitochondrial tRNA-specific 2-thiouridylase 1 (MTU1) via mitochondrial caseinolytic peptidase (CLPP).	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res	6. 最初と最後の頁 1341-1358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad1197	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Yakita M, Chujo T, Wei FY, Hirayama M, Kato K, Takahashi N, Naganuma K, Nagata M, Kawahara K, Nakayama H, Tomizawa K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Extracellular N6-isopentenyladenosine (i6A) addition induces co-transcriptional i6A incorporation into ribosomal RNAs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 1013-1017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.079176.122.	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島村美帆
2. 発表標題 細菌特異的修飾ヌクレオシドによる自然免疫応答メカニズムの解明
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富澤一仁
2. 発表標題 RNA由来修飾ヌクレオシドによる COVID-19診断技術
3. 学会等名 第24回外科分子細胞治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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