

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02599

研究課題名（和文）修飾ヌクレオシドを基軸とする新規ヌクレオシドシグナルの解明

研究課題名（英文）Characterization of novel nucleoside signaling

研究代表者

魏 范研（Wei, Fanyan）

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90555773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：RNAには様々な化学修飾が施されており、転写後遺伝子発現に重要であることが知られているが、RNAの代謝によって生じる修飾を含む塩基（以後、修飾ヌクレオシド）の生理意義については未解明であった。本研究はヒトを含む様々な生物種の細胞外液で存在する修飾ヌクレオシドの受容体活性を調べたところ、修飾ヌクレオシドのうち、N6-methyladenosine (m6A)がアデノシンA3受容体に対する高い活性を有していることを発見した。その活性は未修飾のアデノシンの約10倍以上も強力であった。また、m6Aは生体内で肥満細胞に作用し、I型アレルギー反応や炎症性サイトカインの産生を誘導す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

今回、RNA修飾の代謝産物の一つであるm6Aが、生体内で受容体を強力に活性化して生理作用・病的作用を起こすことを明らかにした。アデノシンの生理作用が発見されて以来約90年振りに、内在性に存在しアデノシンよりも強力なヌクレオシドを見出し、生命科学研究において非常に意義が高い。本研究結果により、従来の概念に存在しない新しい液性因子として、RNA由来の修飾ヌクレオシドが生体機能に関わる可能性が示され、修飾ヌクレオシドのさらなる研究によって、全く新しい核酸医薬開発への基盤研究となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：About 150 post-transcriptional RNA modifications have been identified in all kingdoms of life. During RNA catabolism, most modified nucleosides are resistant to degradation and are released into the extracellular space. In this study, we explored the physiological role of these extracellular modified nucleosides and found that N6-methyladenosine (m6A), widely recognized as an epigenetic mark in RNA, acts as a ligand for the human adenosine A3 receptor, for which it has greater affinity than unmodified adenosine. We used structural modeling to define the amino acids required for specific binding of m6A to the human A3 receptor. We also demonstrated that m6A was dynamically released in response to cytotoxic stimuli and facilitated type I allergy in vivo. Our findings implicate m6A as a signaling molecule capable of activating GPCRs and triggering pathophysiological responses, a previously unreported property of RNA modifications.

研究分野：生理学

キーワード：RNA修飾 液性因子 GPCR

## 1. 研究開始当初の背景

近年、分析技術の発展により RNA を構成するヌクレオシドは、複雑に化学修飾されていることが明らかになった。実際、全ての生物において全ての RNA が化学修飾をうけており、また、その種類が 100 種類以上にも上る (次頁図 2A 参照)。これまで我々は、RNA 修飾が細胞内においてタンパク質翻訳の調節を介して生体恒常性を制御し、修飾の破綻が 2 型糖尿病 [J Clin Invest (2011); Hum Mol Genet (2014); Diabetologia (2015)]、ミオパチー [Cell Metab (2015)]、小児急性肝不全 [PLoS Genet (2016)] 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。

一方、RNA を構成するヌクレオシドは、RNA 分解を受けた後に細胞から放出され、液性因子として機能することが知られている。例えば、アデノシンに対する受容体はアデノシン A1、A2a、A2b、A3 という 4 種類 GPCR があり、cAMP やカルシウムをセカンドメッセンジャーとして細胞応答を引き起こす。これらの受容体はほぼ全身に発現するため、アデノシンや ATP は血液循環、疼痛制御、ホルモン分泌や免疫応答など多彩な生理作用を有する。ところが、実際生体内で測定されるヌクレオシドの濃度 (10~100nM) は一般的に実験で用いられる濃度 (~1mM) よりはるかに低いことや、ヌクレオシド受容体ファミリーに属しながらリガンドが不明なオーファン GPCR も未だに多く存在することから、アデノシンを中心とする従来の概念だけでヌクレオシドシグナルを完全に説明することが困難であり、新たな視点からの研究が求められている。

## 2. 研究の目的

RNA 修飾は、タンパク質や DNA の修飾・脱修飾と異なり、RNA 修飾の脱修飾酵素は基本的に存在しない。即ち、RNA が一塩基レベルまで代謝されると、修飾ヌクレオシドは修飾を含んだまま生体に存在する。我々は、独自に確立した RNA 修飾を標的とするオミクス手法 (RNA モドミクス) を用いてヒト血液を解析した結果、修飾ヌクレオシドの種類と量が未修飾ヌクレオシドをはるかに超えるほどに血中に存在することを見出した。たとえば、アデノシンを骨格にもつヌクレオシドのうち、未修飾アデノシンはわずか 1% であり、残り 99% はすべて化学修飾を含むアデノシンであった (図 2B)。さらに、我々は、特異的なヌクレオシド受容体を活性化できる修飾ヌクレオシド ( $i^6A$ ) も見出した。これらの結果は、修飾ヌクレオシドが新しいシグナル因子であることを強く示唆するものである。そこで、本研究は、「生体に存在する多様な修飾ヌクレオシドの生理意義は何か」という問いを研究の中心にすえ、ヌクレオシド研究分野の新たな領域の開拓を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 修飾ヌクレオシドの受容体の同定

哺乳動物では 50 種以上の修飾ヌクレオシドが同定されている。これらのヌクレオシドに対する受容体を網羅的に同定するために、本研究では Shedding Assay 法を用いる。具体的には、GPCR の活性化に依存して細胞膜から培養上清に遊離するアルカリホスファターゼ (AP-TGF $\alpha$ ) を発現する HEK 細胞に、各種アデノシン受容体、P2X、P2Y 受容体およびヌクレオシド受容体ファミリーに属する GPCR を発現させる。次に、修飾ヌクレオシドで細胞を刺激し、培養上清中のアルカリホスファターゼ活性を発色法で検出することで、受容体の同定を行う。

### (2) 修飾ヌクレオシドの分子機能の解明

網羅的解析で陽性となった修飾ヌクレオシドと GPCR についてはさらに、同 GPCR を強制発現させた HEK 細胞および初代培養細胞を用いて、cAMP アッセイ、カルシウムイメージングやウェスタンブロットによるリン酸化カスケードの検討を実施することにより、細胞内のセカンドメッセンジャー活性化とその下流シグナルを調査し、真の内在性リガンドであることを実証する。

### (3) 修飾ヌクレオシドの生理機能の解明

受容体活性化能を有する修飾ヌクレオシドを同定した後、マウス個体を用いてアレルギー反応や免疫応答などにおける生理機能の解明を目指す。アレルギーモデルマウスについては、マウスの耳にヒト血清アルブミン (HSA) を注射し、その後さらに抗 HSA 抗体を注射することでアレルギー反応を誘導する。アレルギー反応の強さを定量するため、尾静脈経路でエバンスブルー色素を注射し、血管からのエバンスブルー色素の漏れを測定する。修飾ヌクレオシドや修飾ヌクレオシドが作用する受容体に対する阻害剤を抗 HSA 抗体と同時に投与することで、当該受容体を介する修飾ヌクレオシドの生理作用を検証する。

#### 4. 研究成果

(1) N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) による Adenosine A3 受容体の活性化。

まず体液中の修飾ヌクレオシドの分布を調べるため、ヒトを含む様々な生物種の細胞外液でモドミクス解析を行い、存在の多い 20 種類の修飾ヌクレオシドのアデノシン受容体に対する活性を調べたところ、修飾ヌクレオシドの中で m<sup>6</sup>A (N<sup>6</sup>-メチルアデノシン) がアデノシン A3 受容体に対する高い活性を有していることがわかり、その活性は未修飾のアデノシンの約 10 倍以上も強力であった(図 1)。

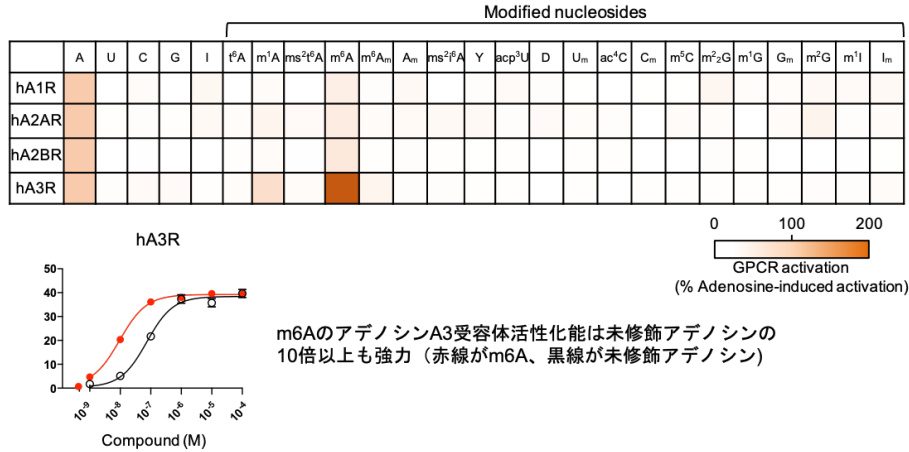


図 1 修飾ヌクレオシドのアデノシン受容体活性化能スクリーニング

(2) 細胞傷害刺激に応じて分泌される m<sup>6</sup>A がアレルギーを惹起

既知のシグナル因子の多くは刺激に応じて量が変動するため、m<sup>6</sup>A が変動するか調べたところ、細胞傷害等の外的刺激が加わった際に、生体や培養細胞で m<sup>6</sup>A が特異的に増えることが明らかになった。この変動は未修飾のアデノシンとは異なるパターンを示し(図 2)、細胞内小器官のリソソーム依存的で、生体内でアデノシンと独立したシグナル応答を惹起している可能性が示唆された。アデノシン A3 受容体はアレルギーを含む炎症に関わるため、細胞・動物モデルを用いて作用を調べたところ、m<sup>6</sup>A は I 型アレルギー反応や炎症性サイトカインの産生を誘導することが明らかになった(図 3)。

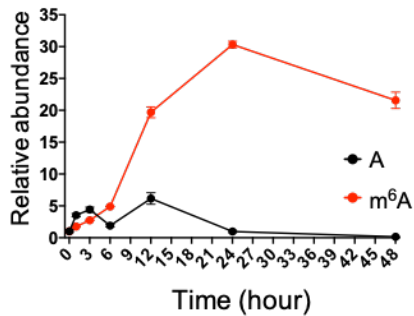


図 2 細胞傷害時における m<sup>6</sup>A の分泌

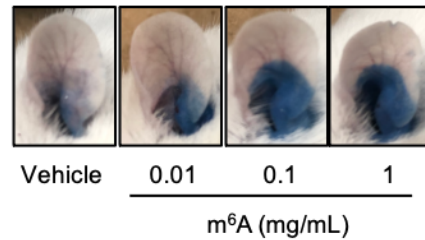


図 3 m<sup>6</sup>A によるアレルギー反応

(3) m<sup>6</sup>A によるアデノシン A3 受容体活性化の構造的解析

最後に、なぜ m<sup>6</sup>A がアデノシン A3 受容体に特異的な活性を有するのかを、ホモロジーモデリングによる予測構造から検討した。その結果、m<sup>6</sup>A のメチル基とより強い分子間力で結合するアデノシン A3 受容体に特異的な疎水性アミノ酸残基を見いだした(図 4)。このアデノシン A3 受容体のアミノ酸残基は生物の進化の過程で変動し、配列の相違と m<sup>6</sup>A の活性が強く相関しており、大型の哺乳動物で特に強い活性を持つことがわかった。すなわち m<sup>6</sup>A の A3 受容体活性化能は進化的なアミノ酸配列の変化により獲得されたものである可能性があると言える。

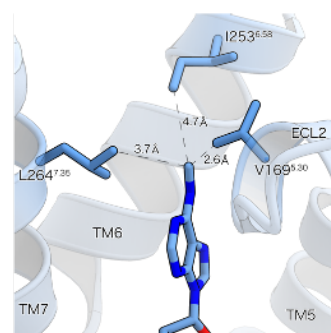


図 4 m<sup>6</sup>A と A3 受容体の結合様式

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Miyazaki T, Sasaki SI, Toyoda A, Wei FY, Shirai M, Morishita Y, Ikegami T, Tomizawa K, Honda A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Impaired bile acid metabolism with defectives of mitochondrial-tRNA taurine modification and bile acid taurine conjugation in the taurine depleted cats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61821-6	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 Naito T, Ercan B, Krshnan L, Triebel A, Koh DHZ, Wei FY, Tomizawa K, Torta FT, Wenk MR, Saheki Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Movement of accessible plasma membrane cholesterol by the GRAMD1 lipid transfer protein complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e51401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.51401.	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 該当する
1. 著者名 Yamamoto T, Fujimura A, Wei FY, Shinojima N, Kuroda JI, Mukasa A, Tomizawa K.	4. 巻 21
2. 論文標題 2-Methylthio Conversion of N6-Isopentenyladenosine in Mitochondrial tRNAs by CDK5RAP1 Promotes the Maintenance of Glioma-Initiating Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 42-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.10.012.	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 Shinoda S, Kitagawa S, Nakagawa S, Wei FY, Tomizawa K, Araki K, Araki M, Suzuki T, Suzuki T.	4. 巻 47
2. 論文標題 Mammalian NSUN2 introduces 5-methylcytidines into mitochondrial tRNAs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 8734-8745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz575.	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 Takesue Y, Wei FY, Fukuda H, Tanoue Y, Yamamoto T, Chujo T, Shinojima N, Yano S, Morioka M, Mukasa A, Kuratsu J, Tomizawa K.	4. 巻 66
2. 論文標題 Regulation of growth hormone biosynthesis by Cdk5 regulatory subunit associated protein 1-like 1 (CDKAL1) in pituitary adenomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocr J.	6. 最初と最後の頁 807-816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ18-0536.	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 Takenouchi T, Wei FY, Suzuki H, Uehara T, Takahashi T, Okazaki Y, Kosaki K, Tomizawa K.	4. 巻 179
2. 論文標題 Noninvasive diagnosis of TRIT1-related mitochondrial disorder by measuring i6 A37 and ms2 i6 A37 modifications in tRNAs from blood and urine samples.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Med Genet A.	6. 最初と最後の頁 1609-1614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.61211.	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 Doki T, Yamashita S, Wei FY, Hara K, Yamamoto T, Zhang Z, Zhang X, Tawara N, Hino H, Uyama E, Kurashige T, Maruyama H, Tomizawa K, Ando Y.	4. 巻 99
2. 論文標題 Mitochondrial localization of PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lab Invest.	6. 最初と最後の頁 1728-1740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0243-8.	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 Mon, E.E., Wei, F.-Y., Ahmad, R.N.R., Yamamoto, T., Moroishi, T., Tomizawa, K.	4. 巻 69
2. 論文標題 Regulation of mitochondrial iron homeostasis by sideroflexin 2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Physiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 359-373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-0652-2	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 Fakruddin, M., Wei, F.-Y., Suzuki, T., Asano, K., Kaieda, T., Omori, A., Izumi, R., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Miyata, K., Araki, K., Oike, Y., Scorrano, L., Suzuki, T., and Tomizawa, K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Defective Mitochondrial tRNA Taurine Modification Activates Global Proteostress and Leads to Mitochondrial Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 482-496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.12.051	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 該当する

1. 著者名 Asano, K., Suzuki, T., Saito, A., Wei, F.-Y., Ikeuchi, Y., Numata, T., Tanaka, R., Yamane, Y., Yamamoto, T., Goto, T., Kishita, Y., Murayama, K., Ohtake, A., Okazaki, Y., Tomizawa, K., Sakaguchi, Y., and Suzuki, T.	4. 巻 46
2. 論文標題 Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 1565-1583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky068	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 魏范研
2. 発表標題 Taurine-modification of mitochondrial tRNA regulates proteostatic network and contribute to the quality of embryonic stem cells.
3. 学会等名 1st International Mitochondria Meeting for Young Scientists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------