

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22497

研究課題名（和文）発生から老化を操るエピトランスクリプトミクス制御の提唱

研究課題名（英文）Proposing epitranscriptomics control to manipulate from development to aging

研究代表者

辻川 和丈（TSUJIKAWA, KAZUTAKE）

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：10207376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：受精後の個体の発生、細胞分化、成長というダイナミックな変化における分子メカニズムの解明は、疾患の発症機構の解明や治療薬の創製において重要となる、その分子メカニズムにおいて、RNAの後天的修飾による遺伝子の発現制御が重要な役割を演じていると推測した。そこでRNAの修飾塩基の解析基盤技術によりその解明に挑んだ。その結果、加齢に伴い種々の臓器におけるRNAの5-hydroxymethylcytosineの発現レベルが低下することが示された。その制御に、Ten-Eleven Translocationが関わることを示された。本研究により細胞や個体の老化においてRNA修飾の重要性の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAの変異とともに、DNAの後天的修飾による遺伝子発現制御は、個体の発生や成長、疾患の発症において重要な役割を演じている。一方、個体の発生や成長、疾患の発症におけるRNAの後天的修飾の変化やその制御機構は不明なままであった。本研究では、RNAの修飾体解析基盤技術を用いて、世界で最初にそれらの変化をとらえることに成功した。さらにその中でも5-hydroxymethylcytosineの特徴的变化を明らかとし、その変化を制御する分子を同定したことに学術的意義がある。本研究成果は、RNA修飾異常と疾患発症との関連性を示し、さらにその成果に伴う創薬への応用性が期待される社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：The elucidation of molecular mechanisms in the development after fertilization, cell differentiation, and growth of individuals has been speculated to play an important role in the disease development and the creation of therapeutic agents. The control of gene expression by the post-modification of RNA is involved in the regulation mechanisms. We have challenged the elucidation of mechanisms by using basic analysis technology of the modified base in RNA. We showed that the expression level of 5-hydroxymethylcytosine of RNA in various organs decreased with aging. Moreover, Ten Eleven Translation was involved in the control of the RNA modification. This study revealed a part of the importance of RNA modification in the aging of cells and individuals.

研究分野：細胞生理学

キーワード：発生 成長 老化 RNA修飾 5-hydroxymethylcytosine ten-eleven translocation エピトランスクリプトミクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

申請者は癌で高発現し、2-oxoglutarate, Fe(II)-dependent oxygenase domain を有する AlkB family 遺伝子として ALKBH3 や ALKBH8 をクローニングした。また ALKBH3 がメチル化 tRNA を脱メチル化する酵素活性を有し、tRNA の脱メチル化によりタンパク質の翻訳効率を上昇させることを見出した。一方、ALKBH8 は 2-oxoglutarate, Fe(II)-dependent oxygenase domain とともに methyltransferase domain も有し、RNA を多様に修飾する酵素活性を発現することも明らかとした。作製した ALKBH8 ノックアウトマウスは、その誕生がメンデルの法則に従わず、また出生したマウスも体格が非常に小さく、運動機能も劣っていることを発見した。これらの研究成果により、生命の誕生や運命決定、機能発現と老化に伴う機能低下において RNA の後天的修飾による遺伝子発現・機能制御であるエピトランスクリプトミクスもエピジェネティクスと同様に重要な機能を演じているとの仮説を立て、その全容解明への生命科学研究を開始した。

2. 研究の目的

DNA のシトシンの 5 位のメチル化による遺伝子発現の制御はエピジェネティクスと呼ばれている。このエピジェネティクスのメチル化マークは発生の過程において、自己複製や分化方向の決定に関わっていることが知られている。一方、RNA も多様な修飾を受けていることは古くから知られていたが、その定量的検出法が構築されていなかったこともあり、時空間的变化や生物学的意義については不明なままである。そこで「個体の発生から老化に至る過程では、エピジェネティクスによる制御だけではなく、RNA の後天的修飾のダイナミックな変化と、それに伴うタンパク質の翻訳制御機構が機能している」との仮説を立てた。本研究では、この生命科学を変革する仮説を (1) RNA 修飾体検出基盤技術を用いた RNA 修飾変動の時空間・網羅的解析、(2) 修飾 RNA の同定、(3) RNA 修飾とタンパク質発現制御との関連性、から解析することを目的とするものである。これにより生命の発生から老化に至る過程が、「エピトランスクリプトミクス」という RNA の後天的修飾によるタンパク質の発現調節機構により制御されていることを提唱する。

3. 研究の方法

本申請研究では図 1 に示すように、(1) 受精卵から胎児、成体から老化マウスを用いて RNA の修飾変動の時空間・網羅的解析を行う。(2) RNA 修飾とタンパク質発現制御との関連性の解析 (3) 細胞老化に伴う RNA 修飾の分析、を行い、エピトランスクリプトミクスが生命の発生から老化に至る過程の制御に関わることを提唱する。

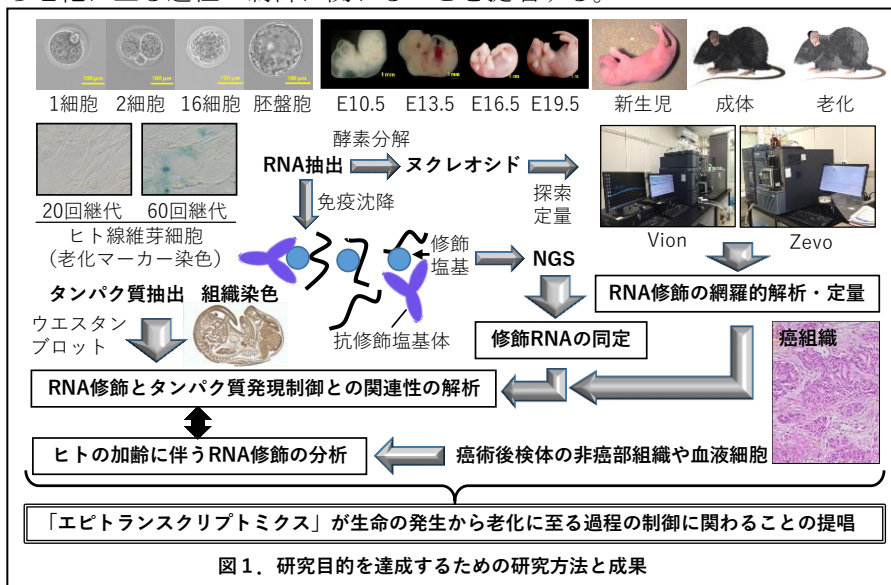


図 1. 研究目的を達成するための研究方法と成果

4. 研究成果

(1) 受精卵から胎児、成体から老化マウスを用いて RNA の修飾変動の時空間・網羅的解析
 質量分析装置を用いて受精卵から胚発生段階での RNA 修飾体の解析を行った。その結果、多様な変動が見られたが、特に 5-hydroxymethylcytosine (hm5C) レベルの顕著な上昇が認められた。一方、新生児期から老齢期におけるエピトランスクリプトーム解析を行ったところ、図 1 に示すように大脳皮質において tRNA が主な構成 RNA である small RNA 画分において、hm5C の週齢に伴う顕著な低下が認められた (図 1)。またその hm5C のレベル低下は、大脳以外に、小脳、肺、肝

臓、骨格筋においても顕著に認められた。この結果は、個体や臓器の機能老化と RNA 修飾レベルの低下、特に hm5C との関係を示唆するものとなった。

(2) RNA 修飾とタンパク質発現制御との関連性の解析

tRNA の hm5C 量とタンパク質の翻訳効率との関係を解析した。また hm5C を生成する酵素として DNA において 5-methylcytosine (m5C) から hm5C を生成する酵素活性が明らかにされている

ten-eleven translocation (TET)に着目した。In vitro において TET1 が RNA に対して m5C から hm5C を生成することを認めた。そこで TET1 により制御される tRNA の hm5C の機能をタンパク質翻訳効率の解析から評価した。その結果、リコンビナント TET1 と反応させた tRNA では hm5C レベルの増加 (data not shown) に伴う in vitro タンパク質翻訳効率の上昇が見られた (図 2A)。

次に HEK293 細胞を用い、TET1 を siRNA によりノック

ダウンした細胞から精製した small RNA 画分 (tRNA) においては、in vitro タンパク質翻訳効率の低下が見られた (図 2B)。さらに 7, 26, 52 週齢マウス肺由来 small RNA 画分 (tRNA) を用いた解析により、週齢に伴うタンパク質翻訳効率の低下が見られた。以上の結果より、TET1 により制御される tRNA の hm5C はタンパク質翻訳効率の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(3) 細胞老化に伴う RNA 修飾の分析

次に細胞老化と hm5C との関連性を解析した。この実験では各 population doubling level (PDL) のヒト線維芽細胞 TIG-1 を用いた。PDL の増加に伴い、細胞形態の扁平化と細胞老化のマーカーである SA-β-gal 染色陽性細胞の増加が見られた (図 3A)。また細胞増殖の低下も認められたことより (図 3B)、細胞老化が起こっていることが示された。この細胞における hm5C レベルの測定を行ったところ、PDL の増加に伴い hm5C レベルの低下が見られた (図 3C)。

以上の検討より、細胞や個体の老化と RNA 修飾の中で特に hm5C レベルの低下が相関すること、また tRNA の hm5C は TET1 により制御され、タンパク質の翻訳を制御することを明らかにした。

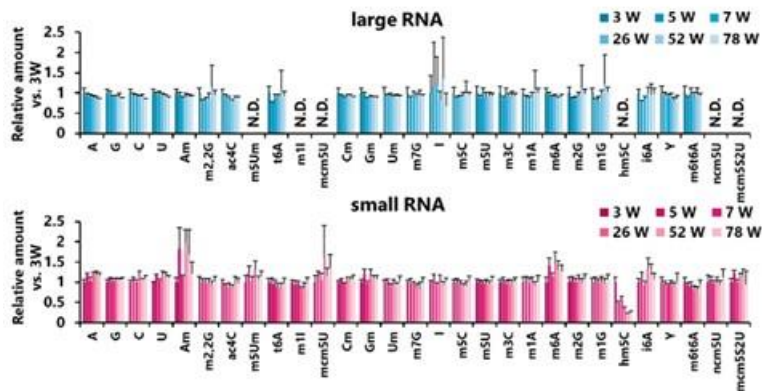


図 1 マウス大脳におけるエピトランスクリプトーム解析
大脳の large RNA (mRNA, rRNA 画分) と small RNA (tRNA 画分) における RNA 修飾体の質量分析計による解析

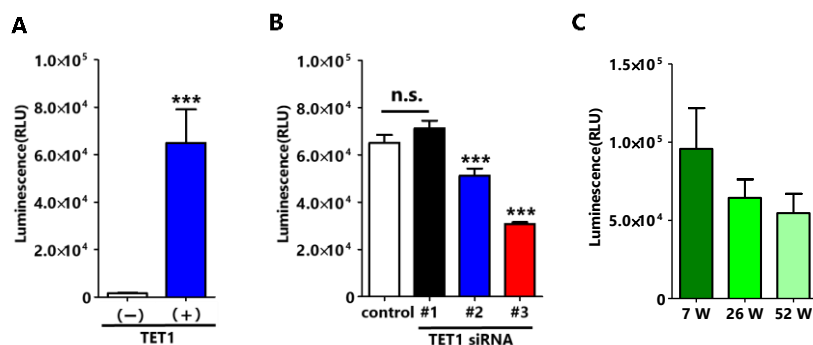
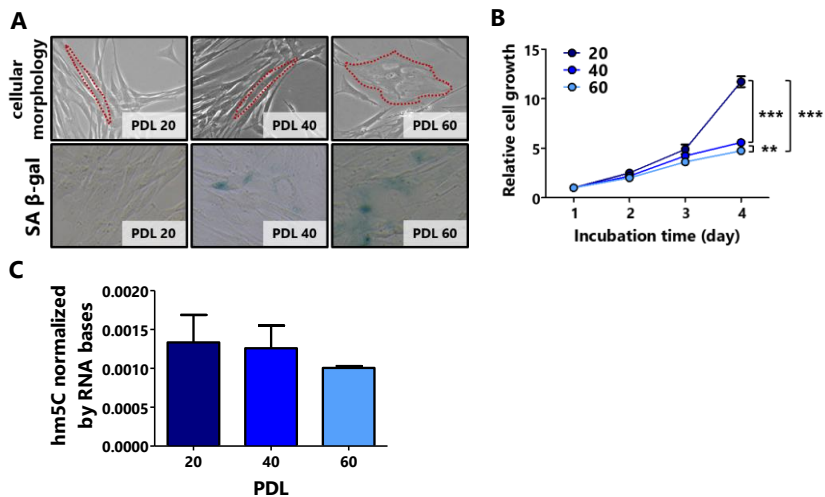


図 2 TET1 に制御される small RNA 画分 (tRNA) の in vitro タンパク質翻訳に対する効果

In vitro タンパク質翻訳反応を、A) リコンビナント TET1 と反応、B) TET1 siRNA トランスフェクション HEK293 細胞、C) 各週齢マウス肺、由来の small RNA (tRNA) を用いて行った。

次に HEK293 細胞を用い、TET1 を siRNA によりノック



以上、細胞や個体の老化と RNA 修飾の中で特に hm5C レベルの低下が相関すること、また tRNA の hm5C は TET1 により制御され、タンパク質の翻訳を制御することを明らかにした。

これにより tRNA の hm5C レベルの変動によるタンパク質翻訳低下が細胞や個体の老化と関係していることが示唆された。今後、この TET1 の酵素活性の制御により、老化に伴う臓器機能の低下が調整できないかに期待がかかる研究成果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 朴美燕、西本 愛、小垣考弘、北恵郁緒里、神宮司健太郎、上田裕子、長谷拓 明、辻川和丈
2. 発表標題 マウスの発生・成長・老化、細胞老化、癌細胞における RNA 修飾定量解析
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

RNAエピジェネティクス https://sites.google.com/site/xibaoshengli/home/yan-jiu/rnaepijenetikusu

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