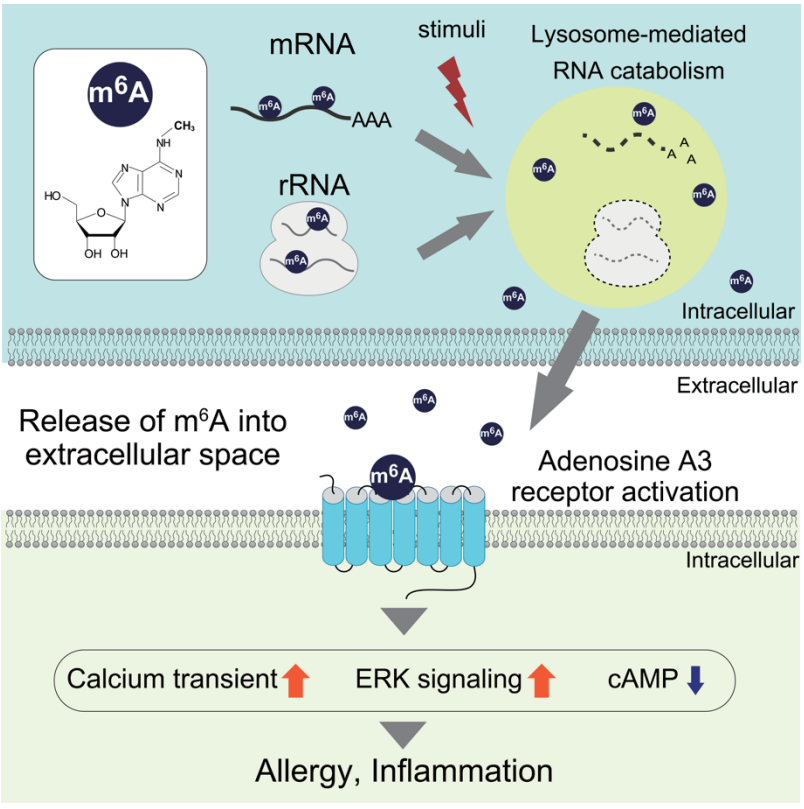
116　RNA修飾の代謝に着目した生体シグナル制御機構の解明	小川　亜希子

【目的】生体内の液性因子のうち、核酸型液性因子はアデノシンや ATP に集約されており、他の液性因子と比べて多様性が極端に乏しい。近年、RNA には 150 種にも及ぶ多彩な化学修飾が存在することが発見された。RNA 修飾は転写後の遺伝子発現制御を担い、修飾異常が疾患発症原因となることが明らかになりつつあるが、分解後にどのように振る舞い、細胞機能に影響を与えるか不明であった。そこで本研究では RNA 修飾由来の液性因子（修飾ヌクレオシド）の生体内の分布と生理的意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】質量分析により生体中に含まれる RNA 修飾由来の液性因子である修飾ヌクレオシドの分布を網羅的に解析した。次に生体内に存在する修飾ヌクレオシドの受容体スクリーニングを行い、受容体活性化能を検出した。受容体活性化能が検出された修飾ヌクレオシドについて、*in silico* ドッキングモデルで構造解析を行った。受容体下流のシグナル伝達をウエスタンブロットや細胞内カルシウムイメージング法で調べ、細胞モデルと動物モデルでその生理的意義・病的意義を検証した。

【結果】測定したヌクレオシドの中で、ヒト血清中の 49%、眼房水中の 20%、尿中の 97%が修飾ヌクレオシドであった。ヒト生体内に存在する修飾ヌクレオシドを shedding 法で受容体スクリーニングを行った結果、m6A（N6-methyladenosine）がアデノシン A3 受容体に特異的に結合していた。結合能の強さは未修飾アデノシンの約 10 倍も強力であった（m6A：EC_{50}＝9.8 nM、アデノシン：ED_{50}＝91 nM）。構造解析により、m6A の特異性に関わるアミノ酸残基を同定した。m6A は ERK のリン酸化と細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こし、これらのシグナル伝達経路がアデノシン A3 受容体依存的であることを阻害剤投与により確認した。肥満細胞を用いた脱顆粒反応試験と、マウスの PCA（passive cutaneous anaphylaxis）モデルの双方で m6A はアレルギー反応を惹起し、さらにマウスへの m6A 投与により、IL6 や MCP-1 といった炎症性サイトカイン・ケモカインが上昇していた。

RNA 修飾代謝物は新たな液性因子である



116. RNA 修飾の代謝に着目した生体シグナル制御機構の解明

小川　亜希子

東北大学 加齢医学研究所 モドミクス医学分野

Key words : RNA 修飾，エピトランスクリプトーム，モドミクス，代謝，GPCR

緒　言

生体内の液性因子のうち、核酸型液性因子はアデノシンや ATP に集約されており、他の液性因子と比べて多様性が極端に乏しい。近年、RNA には 150 種にも及ぶ多彩な化学修飾が存在することが発見された。RNA 修飾は転写後の遺伝子発現制御を担い、修飾異常が疾患発症原因となることが明らかになりつつあるが［1，2］、分解後にどのように振る舞い、細胞機能に影響を与えるか不明であった。研究代表者は RNA 修飾由来代謝物が眼房水や血清中といった生体中の細胞外液に豊富に含まれることを示し、さらにその中には液性因子として受容体を強力に活性化して下流のシグナルを誘導し、生体機能を調節しうるものが存在することを証明した。すなわち RNA 修飾研究が細胞の中から外へ大きな転換点を迎えている。そこで本研究では多彩な RNA 修飾代謝の観点より、測定の最適化と関連酵素の同定と機能解析を目的とする。

方　法

1. RNA 修飾代謝の網羅的検出法の確立

質量分析を用いて細胞外液に含まれる RNA 修飾の代謝物を安定して測定する手法の確立を目指して比較検討を行った。また、この系を用いてヒト眼房水や血漿、尿中の代謝物の定量評価を行った。

2. RNA 修飾代謝物の生理活性の検討

ヒト細胞外液中に存在する RNA 修飾の代謝物の液性因子としての活性評価を TGF-α shedding assay 法［3］を用いて行った。各種 G タンパク質共役受容体（GPCR）の発現ベクターとアルカリフォスファターゼ融合 TGFα（AP-TGFα）を一過性に HEK293A 細胞に強制発現させ、代謝物を添加した際に GPCR を介した活性化が起こると細胞膜から培養上清中に遊離する AP-TGFα量を測定した。

3. RNA 修飾代謝物の活性機構の解明と生理作用の同定

GPCR 活性が明らかになった RNA 修飾代物の活性機構の解明を *in silico* モデルと変異体作製により行った。更に外的環境に応じた RNA 修飾代謝物の生体内での変動の有無を測定し、その変動の機序について核酸分解と核酸代謝の観点から検討を行った。更に受容体を介した代謝物の生理作用・病的作用について、生体モデルを用いて検討した。

結　果

1.　RNA 修飾代謝の網羅的検出法の確立

生体サンプルは採取後－80℃で保存し、測定日に解凍し、有機溶媒を加えて除タンパクした後に水を添加して液層を 2 層に分け、そのうちの水層を、限外濾過を行った後に回収した。回収した水層を遠心濃縮して超純水に

再溶解し、質量分析装置により RNA 修飾代謝物を検出した（図 1）。

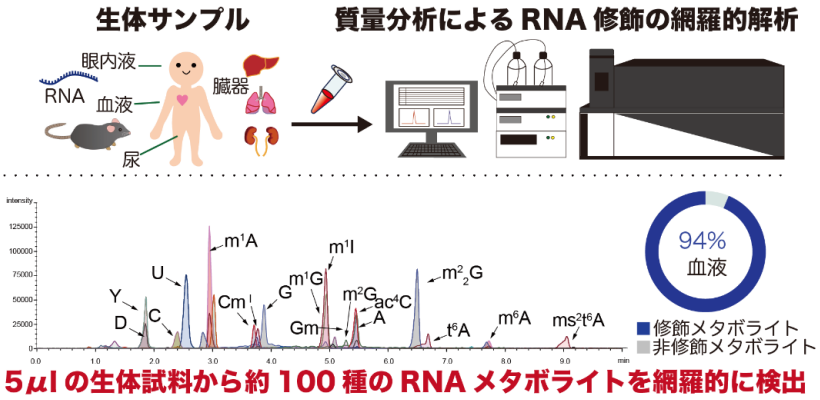


図 1. 細胞外液中の RNA 修飾代謝物の検出

眼房水、血漿、尿といった生体細胞外液を有機溶媒で抽出し、限外濾過により精製後、質量分析を用いた網羅的 RNA 修飾解析を行った。

2. RNA 修飾代謝物の生理活性の検討

上記検出法を用いてヒトを含む様々な生物種の細胞外液中の RNA 代謝物の分布を測定したところ、多種の代謝物が検出された。これらの代謝物はヌクレオシドの修飾体であるため活性スクリーニングを行った。その結果、N6-methyladenosine（m6A）がアデノシン A3 受容体に対して特異的な活性を有することを同定した（図 2）。その活性は未修飾アデノシンの 10 倍以上強力であり、m6A はわずか 1 nM でもアデノシン A3 受容体に対する活性を有していた。

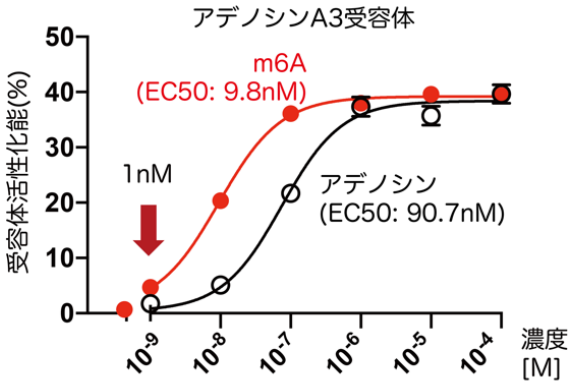


図 2. m6A と A の受容体活性能の比較

TGF-α shedding 法を用いて、m6A と A のアデノシン A3 受容体に対する活性能の比較をした結果、m6A の EC_{50} が A よりも 10 倍程度低かった。

3. RNA 修飾代謝物の活性機構の解明と生理作用の同定

m6A の強力な受容体活性機構を解明するためにホモロジーモデリングによる予測構造を調べ、さらに変異体アッセイを行うことで裏付けを取り、m6A 結合に特異的な疎水性アミノ酸残基を同定した。次に m6A の制御機構を調べるため様々な外的刺激を加えて変動を調べたところ、細胞傷害時特異的な RNA 分解がリソソームで起こることで m6A が細胞外で増えることが修飾酵素のノックアウト細胞株作製により分かった。さらにこの m6A–アデノシン A3 受容体の下流シグナル伝達により生体内で I 型アレルギーあるいは局所的な炎症性サイトカインの産生が増えることが分かった（図 3）。

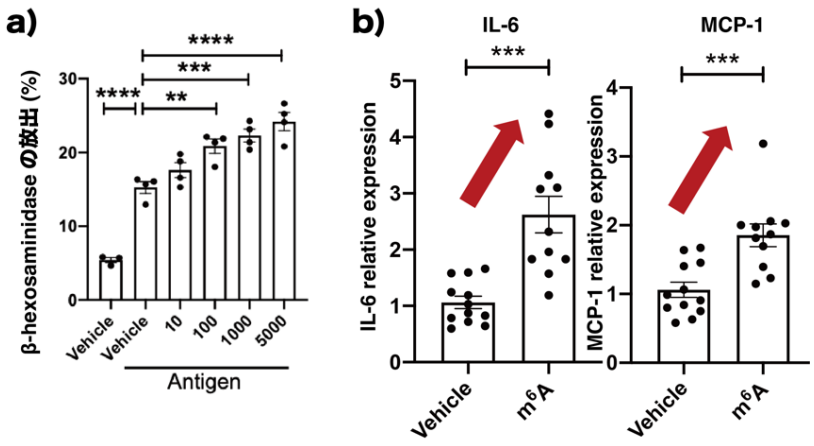


図 3. m6A は免疫応答を惹起する新規核酸因子である

a) m6A を加えた際の脱顆粒反応。**P＜0.01、***P＜0.001、****P＜0.0001 vs. vehicle＋antigen（one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test）。

b) m6A を加えた際の IL-6 と MCP-1 の発現量を q-PCR で調べた。*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001 vs. vehicle（unpaired two-tailed Student's t-test）。

考　察

近年、DNAやタンパク質だけでなく、RNAもメチル化やアセチル化といった化学修飾を受けることが明らかになり、RNA修飾がエピジェネティクスに次ぐ新たな研究分野として定着しつつある。本研究ではRNA修飾代謝に着目し、その網羅的検出の最適化を行い、更にこの手法を用いて様々な検体を解析することにより成果を得た［4，5］。更にm6Aの新たな代謝経路についても現在解析を進め、投稿準備中である（未発表データは本報告書には未記載）。また、世界的パンデミックCOVID-19ワクチンのRNA修飾動態［6］あるいは核酸治療薬の副作用の受容体活性についても明らかにすることができた［7］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学加齢医学研究所の魏范研教授、東北大学薬学研究科の井上飛鳥教授である。末筆ながら、本研究の遂行に際して支援していただいた上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げる。

文　献

1） Boccaletto P, Stefaniak F, Ray A, Cappannini A, Mukherjee S, Purta E, Kurkowska M, Shirvanizadeh N, Destefanis E, Groza P, Avşar G, Romitelli A, Pir P, Dassi E, Conticello SG, Aguilo F, Bujnicki JM. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2021 update. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D231-D235. doi: 10.1093/nar/gkab1083. PMID: 34893873

2） Suzuki T. The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 Jun;22(6):375-392. doi: 10.1038/s41580-021-00342-0. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33658722

3） Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, Higashiyama S, Ohwada T, Arai H, Makide K, Aoki J. TGFα shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat Methods.* 2012 Oct;9(10):1021-9. doi: 10.1038/nmeth.2172. Epub 2012 Sep 16. PMID: 22983457

4) Ogawa A* and Wei FY. Protocol for preparation and measurement of intracellular and extracellular modified RNA using liquid chromatography-mass spectrometry. *STAR Protoc.* 2021 Sep 27;2(4):100848. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100848. eCollection 2021 Dec 17. PMID: 34622220

5) 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*. N^6-methyladenosine (m^6A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand. *Molecular Cell*, 81: 1-16, 2021. Feb 18;81(4):659-674.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2020.12.038. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33472058
*Research Highlight として選出（*Nature Chemical Biology,* 2021 Mar;17(3):231. doi: 10.1038/s41589-021-00762-1. PMID: 33623161）

6) 小川亜希子, 松尾紀孝, 齋藤一創, 魏范研: 「COVID-19 ワクチン接種後の RNA 修飾代謝物排泄の変動」痛風と尿酸・核酸（日本痛風・尿酸核酸学会学会誌）46 巻 2 号 (2022). doi: https://doi.org/10.14867/gnamtsunyo.46.2_105

7) Ogawa A, Ohira S, Kato Y, Ikuta T, Yanagida S, Mi X, Ishii Y, Kanda Y, Nishida M*, Inoue A*, Wei FY*. Activation of the urotensin-II receptor by remdesivir induces cardiomyocyte dysfunction. *Communications Biology*, 2023, in press.