

研究報告書

「RNA モドミクスの確立及び神経・精神疾患への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 魏 范研

1. 研究のねらい

最近の研究で RNA に大量の転写後修飾が存在し、RNA の機能を巧妙に制御することが明らかになってきている。RNA 修飾は、メチル化や水酸化など化学的にバリエーションに富んだ様々な修飾体が現在知られている。さらに、これらの RNA 修飾は、修飾酵素の発現量や基質となるメタボライトの濃度でダイナミックに変化し、RNA エピジェネティクスという革新的な分野が展開されようとしている。

哺乳動物において RNA の種類が非常に豊富であり、RNA 修飾についてはほとんど解明されていない状況にある。ここ数年、私は世界に先駆けてマウスやヒトにおいて新規 RNA 修飾を見出した。さらに、その修飾の破綻が糖尿病やミトコンドリア病といった疾患の原因になることを報告し、RNA 修飾は疾患実態を反映する新しい代謝物であることを提示した。最近私は、RNA 修飾活性を有する酵素群が神経・精神疾患領域のうち、罹患者数が多いのにもかかわらず診断法・治療法が確立していない精神遅滞やミトコンドリア脳筋症の発症に関わることを新たに見出している。これらの新規修飾酵素による RNA 修飾は、今後神経疾患領域における創薬や診断に応用されることが期待されている。しかし、マイクロアレイや次世代シーケンサーに代表されるこれまでの RNA 解析技術は、RNA の配列情報のみを解析する技術であり、修飾情報を捉えることが困難であった。RNA 修飾が関わる疾患の原因解明及び診断法開発を進めるために、RNA 修飾情報を効率よく検出・解析する技術が今後必要とされている。

そこで、私は質量分析法を用いた微量 RNA 修飾解析法を応用・発展させることで、ハイスループット RNA 修飾解析法である RNA Modomics (Modification+Omic) を確立し、哺乳動物における新規 RNA 修飾を探索し、診断及び創薬に実装できる基盤技術の創出を目指す。さらに、同解析法を用いて精神遅滞やミトコンドリア脳筋症において新規診断法の確立を目指すとともに、RNA 修飾がどのようにこれらの疾患の進行に関わるかを解明することで、同技術が新たな治療法開発の基盤となることを示す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、(1)質量分析装置を用いたハイスループット RNA 修飾解析法の確立、(2)同解析法を用いて神経・精神疾患と関連する RNA 修飾の同定ならびに RNA 修飾破綻による疾患発症の分子メカニズムの解明、(3)RNA 修飾欠損に起因する神経・精神疾患に対して新規診断法の確立、以上3項目について研究開発を行なった。

具体的には、トリプル四重極質量分析計 (Shimazu LCMS8050) を導入し、ヒトに存在する 50 種類以上の RNA 修飾を標的に測定パラメーターの最適化や試料処理法の最適化を図り、高感度かつ汎用性の高い RNA 修飾解析法を確立した。次に同方法を用いた精神遅滞の発症に関わる Ftsj1、ミトコンドリア脳筋症の発症に関わる Mtu1 や Mto1 などの酵素について RNA 修飾の探索を行なった。その結果、Ftsj1 は7種類の細胞質 tRNA を基質 tRNA として認識し、32 位と 34 位の塩基のリボースをメチル化することを見出した。また、Mtu1 はミトコンドリア DNA に由来する 2 種類の tRNA を認識し、34 位ウリジンをチオール化する。Mto1 はミトコンドリア DNA に由来する 5 種類の tRNA を認識し、34 位ウリジンをタウリン化することを見出した。次に、それぞれの酵素を欠損したマウスを作製し、解析を行なった。その結果、Ftsj1 による tRNA 修飾を欠損したマウ

スでは、神経細胞におけるタンパク質翻訳が低下し、記憶学習障害が生じた。一方、Mtu1 や Mto1 によるミトコンドリア tRNA の修飾を欠損したマウスでは、ミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳が著しく低下し、ミトコンドリアの呼吸活性が障害され、肝障害や心不全が誘発された。上記の遺伝子欠損マウスは、ヒトの神経・精神疾患の症状と類似することから、ヒトにおいても同様な機序で疾患が発症すると推察された。次に、tRNA 修飾を標的とする新規診断法の開発に取り組んだ。具体的には、タウリン修飾を含有するミトコンドリア tRNA に変異を持つミトコンドリア病患者を対象に尿検体を収集し、尿に含まれるタウリン修飾ヌクレオシドを RNA Modomics システムを用いて測定した。その結果、健常人と比較して、ミトコンドリア病患者では尿中タウリン修飾が有意に低下した。

以上の結果から、RNA 修飾がタンパク質翻訳に必要不可欠であり、その破綻が神経・精神疾患の発症原因となることが示唆された。また、本研究で確立した RNA Modomics システムはミトコンドリア病の非侵襲的な診断に有用であることが示された。

(2) 詳細

研究テーマ A「RNA モドミクスの確立」

従来の RNA 修飾解析は、極細キャピラリーや超精密質量分析計によって行われてきた。しかし、試料の準備が煩雑であり、また一回の分析が非常に時間を要するため、臨床検査といった実社会での応用が困難であった。そこで、本研究は、実社会の使用に堪えられる RNA 修飾分析法の実現を目標とした。具体的には、普及しつつあるトリプル四重極質量分析計である LCMS(Shimadzu LCMS8050)を島津製作所より導入し、システムの最適化を行った。まず、超高速液体クロマトグラフィーの最適化により、一回の分析を 15 分で完了することに成功し、多検体の迅速な処理が可能となった。また、質量分析については修飾 RNA ヌクレオシドの標準品を用いて多重モニタリング法(MRM)のパラメーター最適化を行い、fmol レベルのヒト tRNA 修飾の検出に成功した。さらに、生体試料についても前処理の最適化を実施し、処理ステップの削減など、汎用性の高い分析法の確立に成功した。

研究テーマ B「神経・精神疾患と相関する RNA 修飾の同定ならびに RNA 修飾破綻による疾患発症の分子メカニズムの解明」

・X 染色体連鎖性精神遅滞

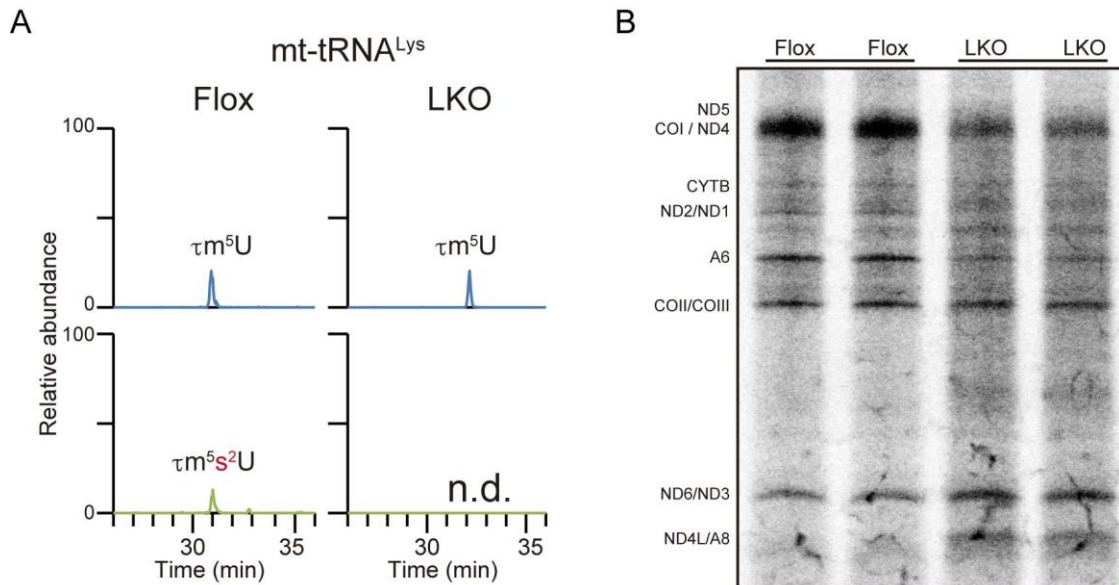
X 染色体連鎖性精神遅滞は、主に X 染色体上の遺伝子変異に起因する難病である。本研究は日本や中国での家系調査によって明らかになった危険遺伝子の一つである Ftsj1 について検討を行なった。Ftsj1 は tRNA 修飾を行う酵素領域を有するが、その詳細な分子機序が不明であった。本研究は、野生型マウスと Ftsj1 欠損マウスの臓器から各種 tRNA を精製し、RNA Modomics により tRNA 修飾の一斉分析を行なった。その結果、Ftsj1 は細胞質 tRNA のうち、少なくとも 7 種類の tRNA を認識し、32 位と 34 位の塩基をメチル化することが明らかになった。一方、Ftsj1 による tRNA のメチル化修飾の役割を検討するために、Yale 大学の研究チームと共同で Ribosomal Profiling を実施し、翻訳への影響を詳細に検討した。その結果、Ftsj1 による tRNA 修飾のメチル化を欠損すると、tRNA による mRNA の読み取りが障害されることがわかった。Ftsj1 欠損マウスでは、神経細胞の機能維持に重要なタンパク質が翻訳されなくなった結果、神経細胞間の情報伝達が低下し、最終的に記憶学習といった高次機能が障害された。以上の結果から、Ftsj1 欠損を伴う X 染色体連鎖性精神遅滞の発症は tRNA のメチル化修飾の欠損によるものであることが実証された。上記の研究成果に対して 2017 年日本生理学会奨励賞が与えられた。

・小児急性肝障害

ミトコンドリアに局在する Mtu1 遺伝子は小児急性肝障害の原因遺伝子であるが、その発症機序は明らかになっていなかった。本研究では、Mtu1 の肝臓特異的な欠損マウスを作製し、肝臓よりミトコンドリア tRNA を精製した。RNA Modomics を用いて基質 tRNA および RNA 修飾を検討

した結果、Mtu1 はミトコンドリア DNA 由来の tRNA^{Gln} および tRNA^{Lys} を認識し、34 位ウリジンをチオール化することを見出した。Mtu1 を欠損した肝細胞ではミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳が顕著に低下していた(図1参照)。また、Mtu1 の肝臓特異的欠損マウスでは、肝機能が著しく低下していた。以上のことから、Mtu1 異常を伴う小児肝障害はミトコンドリア tRNA のチオール化修飾の欠損によるものであることが示された。同研究結果は、2016 年に PLoS Genetics 誌に掲載された(PLoS Genet., vol. 12, no. 9, e1006355)。

図1 ミトコンドリア tRNA のチオール化修飾によるミトコンドリアタンパク質翻訳制御



(A) Mtu1 の肝臓特異的欠損マウス(LKO)および野生型マウス(Flox)の肝組織から RNA を抽出し、RNA 修飾を質量分析で検討した。LKO のミトコンドリア tRNA^{Lys}(mt-tRNA^{Lys})では、チオール化修飾(s²U)が消失した。(B) LKO マウスの肝細胞におけるミトコンドリアタンパク質翻訳が、Flox マウスと比べて顕著に低下した。

・ミトコンドリア脳筋症

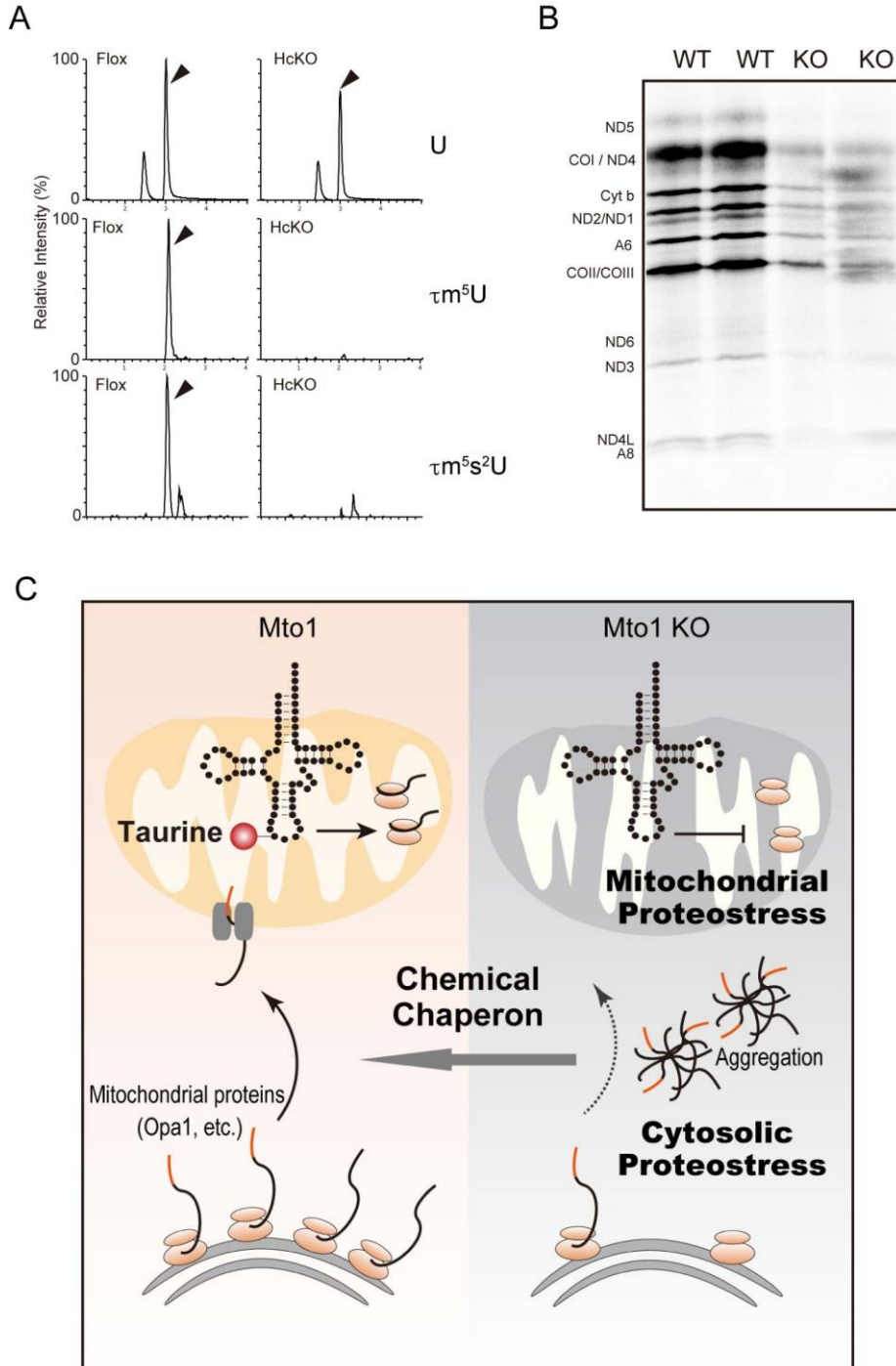
ミトコンドリア脳筋症は、脳卒中や心筋症など多彩な病態を示す重篤な神経疾患であり、ミトコンドリア病の中でも特に頻度の高い病態である。ミトコンドリアに局在する酵素である Mto1 はミトコンドリア脳筋症に関連するタンパク質の一つであるが、その分子機能および Mto1 異常によるミトコンドリア脳筋症の発症機序が不明であった。本研究では、Mto1 の全身欠損マウスや心臓特異的欠損マウスを作製し、RNA Modomics を用いて解析を行なった。その結果、Mto1 がミトコンドリア DNA に由来する5種類の tRNA を認識し、34 位ウリジンをタウリン修飾することがわかった(図2参照)。Mto1 欠損細胞では、ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾が完全に消失し、ミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳が著しく障害された(図2参照)。その結果、ミトコンドリアの電子伝達系を構成するタンパク質が不足し、ミトコンドリアのエネルギー代謝が大幅に低下した。これらの結果から、タウリン修飾がミトコンドリアのタンパク質翻訳を制御することで、ミトコンドリアを中心とするエネルギー代謝に重要であることが示された。

興味深いことに、ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾を欠損した細胞では、細胞質側で異常なタンパク質の蓄積が頻繁に見られた。これら異常タンパク質の蓄積が結果的に小胞体ストレスを誘発し、細胞増殖をはじめとする細胞機能を障害した。さらに、異常タンパク質の蓄積は、心臓特異的 Mto1 欠損マウスと肝臓特異的 Mto1 欠損マウスでも観察された。近年、異常タンパク質凝集体の蓄積を抑制する候補化合物が開発され、その中の1つが TUDCA(ウルソデオキシコール酸)である。Mto1 欠損細胞や Mto1 肝臓特異的欠損マウスに TUDCA を投与した結果、細胞内の凝集体が消失し、小胞体ストレスが低下し、細胞や肝臓の組織機能も改善された(図2参

照)。

以上の結果から、ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾はミトコンドリアでのタンパク質翻訳に不可欠であり、タウリン修飾の欠損がミトコンドリア脳筋症の原因であることが示された。また、本研究により、TUDCA がミトコンドリア病に対して効果的な治療薬となる可能性が示唆された。本研究成果は、2018 年に Cell Reports 誌 (vol. 22, no. 2, pp. 482-496) に掲載された。また、TUDCA の効果については、特許出願を行なった(ミトコンドリア病治療薬: 特願 2017-246492)。

図2 ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾によるミトコンドリアタンパク質翻訳制御

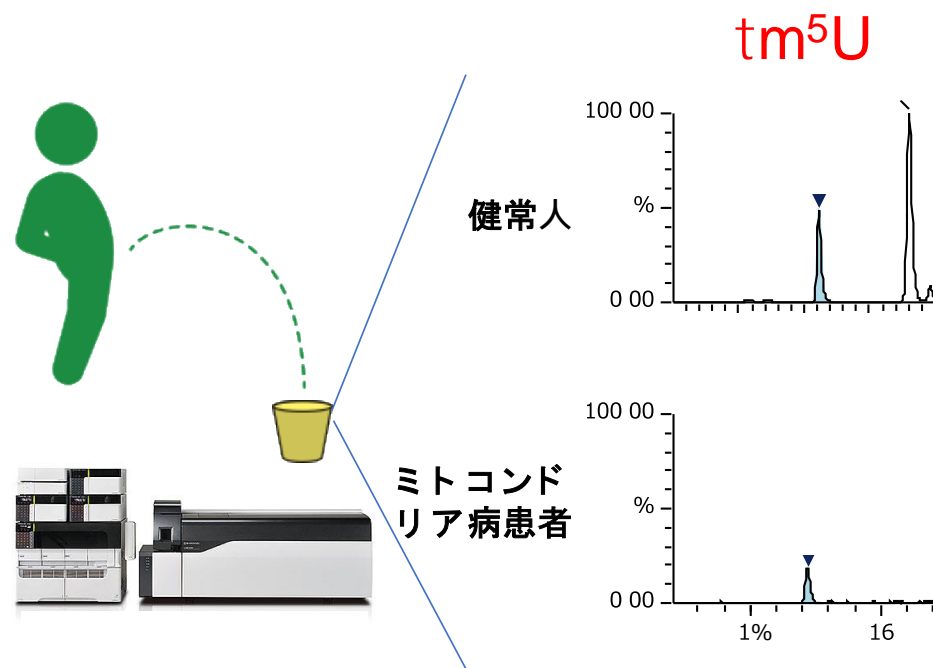


(A) Mto1 の心臓特異的欠損マウス(HcKO)および野生型マウス(Flox)の心筋から RNA を抽出し、RNA 修飾を質量分析で検討した。HcKO のミトコンドリア tRNA では、タウリン修飾(tm^5U と tm^5s^2U)が消失した。(B) HcKO マウス由来の ES 細胞におけるミトコンドリアタンパク質翻訳が、Flox マウス由来の ES 細胞と比べて顕著に低下した。(C) タウリン修飾欠損による細胞障害およびケミカルシャペロンによる機能改善の分子機序

研究テーマ C「RNA 修飾欠損に起因する神経・精神疾患に対する新規診断法の確立」

ミトコンドリア病のうち、ミトコンドリア DNA の $tRNA^{Leu}$ 遺伝子に A3243G 変異をもつ患者が多い。従来のミトコンドリア病診断法は、患者からの筋組織の採取や A3243G を検出する遺伝子診断が必要であり、肉体的な負担のみならず、遺伝情報の告知による精神的な負担も大きい。また、ピルビン酸や乳酸といった検査項目もミトコンドリア病の発症機序を反映しないため、ミトコンドリアの診断はこれまで非常に煩雑であり、専門医による精密な診断が必要であった。興味深いことに、 $tRNA^{Leu}$ は通常タウリン修飾を含んでおり、A3243G 変異を有する $tRNA^{Leu}$ ではタウリン修飾が低下することが知られている。タウリン修飾の低下がミトコンドリア病の発症原因であることが本研究で明らかになったため、タウリン修飾がミトコンドリア病の診断バイオマーカーとして有用であるが示唆された。そこで、本研究では、様々な体液を RNA Modomics で解析し、タウリン修飾ヌクレオシドの測定を行なった。その結果、尿中にタウリン修飾ヌクレオシドが大量に存在することを突き止めた。次に、健常人および MELAS (Mitochondrial myopathy Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes: ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群)患者由来の尿検体で比較検討したところ、MELAS 患者の尿ではタウリン修飾ヌクレオシドの存在量が顕著に低下していた(図3参照)。本結果により、RNA Modomics によるミトコンドリア病の非侵襲的な検査が可能であることが示された。RNA Modomics によるミトコンドリア病の検査については、特許出願を行なった(ミトコンドリア tRNA 修飾の検出法: PCT/JP2017/047099/2017/12/27)。

図3 尿を用いた非侵襲的ミトコンドリア病診断法の開発



健常人およびミトコンドリア病患者(MELAS)から採取した尿の分析結果を示す。MELAS 患者の

尿に含まれるタウリン修飾塩基($\tau\text{m}^5\text{U}$)が健常人と比べて顕著に低下した。

追加研究テーマ D「活性硫黄による RNA 修飾制御」

本研究は、本さがけ領域の西田研究者および東北大学の赤池教授との共同研究である。本共同研究により、ミトコンドリアに局在する CARS2(ミトコンドリア局在型システイン tRNA 合成酵素)が活性硫黄分子の一種であるシステインパースルフィドを産生する酵素であることが見出された。システインパースルフィドは、様々な分子に活性硫黄を転移する活性を有する生体活性分子である。RNA に存在する化学修飾のうち、硫黄を含む修飾が多数存在するため、活性硫黄による RNA 硫黄修飾の制御機構を追加テーマとして検討を行なった。培養細胞に活性硫黄を添加すると、tRNA 中の硫黄修飾が顕著に増えた。一方、活性硫黄の産生を抑制したマウスモデルでは、tRNA 中の硫黄修飾も低下し、高脂肪食条件において耐糖能障害を呈した。これらのことから、活性硫黄は RNA 修飾を制御することが示された。これらの研究成果は、*Nat. Communications* 誌 (vol. 8, no. 1, 1177, 2017) および *Nucleic Acids Research* 誌 (vol. 45, no. 1, pp. 435-445, 2017) に掲載された。

3. 今後の展開

- ・本研究で確立した RNA Modomics 法は高感度かつ汎用性が高く、様々な生体試料における RNA 修飾の測定に応用できる。特に、本研究でその機能が明らかになったミトコンドリア tRNA のタウリン修飾やチオール化修飾は、ミトコンドリアの翻訳を直接的に制御する化学修飾であるため、ミトコンドリア活性を反映するバイオマーカーとして有用であると考えられる。今後は、パーキンソン病やアルツハイマー病などミトコンドリア障害を有する疾患由来の検体で RNA Modomics を応用し、バイオマーカーとしての RNA 修飾の可能性を追求していく予定である。
- ・これまでの研究により、尿検体を用いたタウリン修飾ヌクレオシドの測定がミトコンドリア病の非侵襲的な診断に有用であることが示された。今後は健常人における尿中タウリン修飾ヌクレオシドの基準値の算出や、尿検体の測定方法の標準化を行うことで、本方法の実用化に向けて展開していく予定である。
- ・本研究結果から、TUDCA がミトコンドリア tRNA のタウリン修飾欠乏に起因する細胞障害に対して改善効果を有することが明らかになった。TUDCA が日本では未認可であるため、関連各所と連携を図り、治療薬としての実用化につなげていきたい。

4. 自己評価

RNA 修飾という一般的に測定困難な生体分子に着眼した研究であったが、質量分析計を用いた高感度かつ汎用性の高い測定システム(RNA Modomics)の構築をきっかけに、精神遅滞、急性肝障害やミトコンドリア脳筋症といった神経・精神疾患のメカニズムの解明に成功した。また、研究期間中にこれらの研究成果を論文化することにより、RNA 修飾病という概念を打ち出すことに成功した。特に、ミトコンドリア病については、ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾の欠乏がミトコンドリア機能のみならず、細胞質側の機能にも大きな障害を与えるという新たな現象を発見した。さらに、細胞質の障害を克服できる薬剤候補の発見にも成功しており、今後のトランスレーショナルリーサチに橋渡しできる成果であると考えられる。本研究で構築した RNA Modomics 法はミトコンドリア病の非侵襲的な検査・診断を可能にする技術であり、患者の負担軽減に大きく貢献できると考える。本技術を学会等で紹介してから、他大学病院からの引き合いが多数あり、ミトコンドリア病の非侵襲的な診断に実際成功している。したがって、以上の成果は、社会への実装という本さがけ領域の目標に合致するものであり、当初の目標が十分に達成されたと考える。RNA 修飾については、多くの疾患のバイオマーカーとなる可能性を秘めており、今後のコンパニオン診断技術の発展への寄与が見込まれる。

5. 主な研究成果リスト

- (1)論文(原著論文)発表

<p>1. #M. Fakruddin, #F.-Y. Wei, T. Suzuki, K. Asano, T. Kaieda, A. Omori, R. Izumi, A. Fujimura, T. Kaitsuka, K. Miyata, K. Araki, Y. Oike, L. Scorrano, T. Suzuki, and K. Tomizawa. "Defective Mitochondrial tRNA Taurine Modification Activates Global Proteostress and Leads to Mitochondrial Disease," (#共同第一著者) <i>Cell Rep.</i>, vol. 22, no. 2, pp. 482-496, 2018.</p>
<p>2. N. Takahashi, F.-Y. Wei, S. Watanabe, M. Hirayama, Y. Ohuchi, A. Fujimura, T. Kaitsuka, I. Ishii, T. Sawa, H. Nakayama, T. Akaike, and K. Tomizawa. "Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion," <i>Nucleic Acids Res.</i>, vol. 45, no. 1, pp. 435-445, 2017.</p>
<p>3. T. Akaike, #T. Ida, #F.-Y. Wei, #M. Nishida, Y. Kumagai, M. M. Alam, H. Ihara, T. Sawa, T. Matsunaga, S. Kasamatsu, A. Nishimura, M. Morita, K. Tomizawa, A. Nishimura, S. Watanabe, K. Inaba, H. Shima, N. Tanuma, M. Jung, S. Fujii, Y. Watanabe, M. Ohmuraya, P. Nagy, M. Feelisch, J. M. Fukuto, and H. Motohashi. "Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics," (#共同第二著者) <i>Nat. Commun.</i>, vol. 8, no. 1, 1177, 2017.</p>
<p>4. Y. Wu, F.-Y. Wei, L. Kawarada, T. Suzuki, K. Araki, Y. Komohara, A. Fujimura, T. Kaitsuka, M. Takeya, Y. Oike, T. Suzuki, and K. Tomizawa. "Mtu1-Mediated Thiouridine Formation of Mitochondrial tRNAs Is Required for Mitochondrial Translation and Is Involved in Reversible Infantile Liver Injury.," <i>PLoS Genet.</i>, vol. 12, no. 9, e1006355, 2016.</p>
<p>5. M. Fakruddin, F. Y. Wei, S. Emura, S. Matsuda, T. Yasukawa, D. Kang, and K. Tomizawa. "Cdk5rap1-mediated 2-methylthio-N6-isopentenyladenosine modification is absent from nuclear-derived RNA species," <i>Nucleic Acids Res.</i>, vol. 45, no. 20, pp. 11954-11961, 2017.</p>

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件 (公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表:

1. 招待講演 (国際学会)

題名: tRNA modification in mitochondria disease

学会名: 15th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine (2018)

2. 招待講演 (国際学会)

題名: Taurine-modification of mitochondrial tRNA regulates proteostatic network and contribute to the quality of embryonic stem cells

学会名: 1st International Mitochondria Meeting (2018)

3. 招待講演 (国内学会)

題名: RNA 修飾の生理学

学会名: 第5回 和光ライフサイエンスフォーラム (2017)

4. 招待講演 (国内学会)

題名: RNA 修飾による生体機能制御および酸素応答とのクロストーク

学会名: 第27回 フォーラム・イン・ドージン (2016)

受賞:

1. 第 17 回 日本生理学会奨励賞(2016 年 3 月)
「tRNA 修飾異常による X 染色体連鎖性精神遅滞の発症分子メカニズムの解析」
2. 熊本医学会奨励賞(2017 年 3 月)
「tRNA 修飾の生理学研究」

プレスリリース:

難病「ミトコンドリア病」発症の原因解明～治療薬の開発に道筋～
<https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20180110>