

修飾RNAの代謝と細胞外での役割

小川 亜希子, 魏 范研

高次生命を調節する分子機構として細胞内RNA修飾の機能解析が進んでいる一方で、RNAが分解・代謝後どのような運命をたどるかについての報告は少ない。修飾されたRNAが分解・代謝されると修飾ヌクレオシドが生成されて血液中や尿中に多量に存在するが、その中には生理活性因子として機能するものや、細胞毒性を持つために独自の代謝機構で解毒されるものが存在する。すなわち修飾ヌクレオシドが新たな核酸型液性因子として生体のホメオスタシス維持に寄与する、あるいは疾患の原因となる可能性が明らかになりつつある。

1. はじめに

高次生命を調節する重要な分子機構として細胞内RNA修飾の機能解析が進んでいる一方で、RNAが分解・代謝後どのような運命をたどるかについての報告は少ない。RNA分解で生じる未修飾のヌクレオシドは、一般的に核酸合成へ再利用されるサルベージ経路や尿酸や β -アミノイソ酪酸/ β アラニンへの分解経路をたどる。一方、RNA分解で生じる化学修飾を含むヌクレオシドは基本的には脱修飾されずに「修飾ヌクレオシド」として、細胞外である血清や尿中へ排出される^{1,2)}が、その生理活性意義についてはほとんど解明されていない。最近、筆者らは、修飾されたRNAが代謝後に修飾ヌクレオシドとなり細胞外へ分泌され、受容体を活性化する生理活性因子として機能することを報告した³⁾。また、一部の修飾ヌクレオシドは細胞毒性を持ち、速やかに無毒化される代謝機構があることも明らかにした⁴⁾。すなわちRNA修飾は細胞内だけでなく細胞外でも生理作用・病態に影響する。そこで本稿では現在までに明らかになった細胞内外でのRNA修飾の意義につ

いて概説する。

2. 未修飾ヌクレオシドの生理機能

RNAの未修飾ヌクレオシドはアデノシン(A)、ウリジン(U)、シチジン(C)、グアノシン(G)の4種類に大別され、その生理作用については細胞内外においてよく調べられている。たとえばアデノシンは細胞内でエネルギー代謝の中心的な役割を果たす分子の一つであり、ATPの加水分解や双方向性ヌクレオシドトランスポーター、複数の酵素を介して細胞外における濃度が調整されている。ATP、ADP、AMPといったヌクレオチドは細胞のエネルギー通貨として機能し、エネルギーの貯蔵や利用に関与する。これらの分子はAMPK (AMP-activated protein kinase) を介してエネルギーセンサーとして機能し、エネルギー供給と需要のバランスを保つ役割を持つ⁵⁾。

細胞外では、アデノシンは細胞膜上の受容体に結合してシグナル伝達を介し、免疫応答、血管拡張、心拍数の調整など、さまざまな生理機能を調節する^{6,7)}。特に、アデノシンは抗炎症作用を持ち、炎症性疾患や虚血再灌流障害において保護的な役割を果たすことが示されている⁸⁾。また、アデノシンの濃度はストレスや傷害に応じて急速に上昇することが知られる⁹⁾が、その由来は主に細胞外に放出されたATPの加水分解や双方向性トランスポーターを介したものである。細胞外に放出されたアデノシンはその後、双方向性トランスポーターにより細胞内へ再度取り込まれ、あるいは変換酵素によって速やかにイノシンへと変換されて短時間で定常状態へ戻る¹⁰⁾。このように、アデノシンは細胞内外で多機能な役割を果たし、エネルギー代謝や遺伝子発現から免疫調節や炎症応答まで広範な生理的ブ

東北大学加齢医学研究所モドミクス医学分野 (〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町4-1)

Functional roles and metabolic pathways of modified nucleosides released from modified RNA

Akiko Ogawa and Fan-Yan Wei (Department of Modomics Biology and Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer (IDAC), Tohoku University, 4-1 Seiryō, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2024.960824

© 2024 公益社団法人日本生化学会

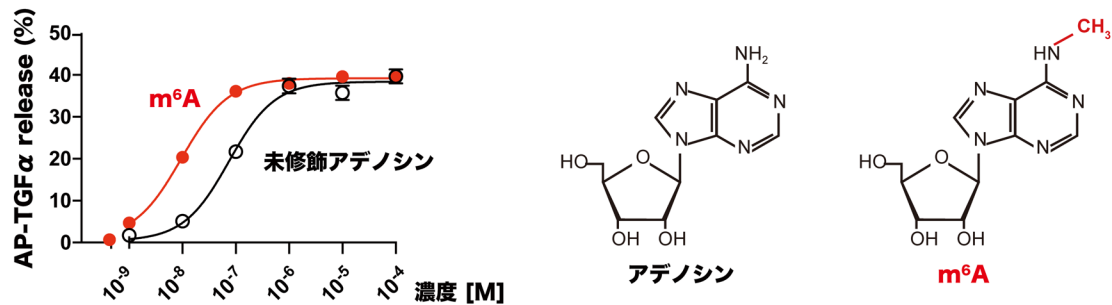


図1 m⁶AのアデノシンA3受容体活性

(左)アデノシンA3受容体活性をshedding assay法 (Inoue et al., *Nat Methods* 2012)²⁴)で測定したところ、m⁶AのアデノシンA3受容体活性は未修飾アデノシンの10倍以上も強力であった。(右)m⁶AはアデノシンのN⁶位がメチル化された修飾アデノシンである。

ロセスに参与している。

ウリジンはプリンヌクレオシド・ピリミジンヌクレオシドの中では最も豊富に血中に含まれており¹¹⁾、糖新生やグリコーゲン合成をサポートし、エネルギーバランスを調節する。また、ウリジンは中枢神経系においても重要な役割を担い、神経保護やシナプス形成に参与するとされる¹²⁾。ウリジンの不足は、発育障害や神経系の異常を引き起こす可能性があり、栄養学的にも重要視される¹³⁾。ピリミジンの*de novo*経路(新規合成経路)における律速酵素はジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼであり、この酵素はミトコンドリア内膜上の呼吸鎖複合体IIとIIIの間に位置し、ジヒドロオロト酸のオロト酸への変換を担う。ミトコンドリアDNAを欠失したp⁰細胞ではミトコンドリアの電子伝達系が不全となるため、ピルビン酸に加えてウリジンを添加することで生存可能となることが知られ、ウリジンによるミトコンドリア機能向上の可能性が示唆される¹⁴⁾。

また従来Toll様受容体TLR7/TLR8はウイルスや死細胞に由来する一本鎖RNAを認識して自然免疫反応を引き起こすことが知られているが、RNAの分解産物としてのヌクレオシドが反応の契機となる機構が近年明らかになった。たとえばTLR7がグアノシンやその誘導体を^{15, 16)}、そしてTLR8がウリジンや一本鎖由来の短い分解産物を認識して活性化される¹⁷⁾。

以上のように、未修飾ヌクレオシドについては幅広くその機能や調節機構が研究されている。

3. 修飾ヌクレオシドの機能³⁾

RNA修飾の分解・代謝によって生じた修飾ヌクレオシドは古くからがんや感染症などの病態により量が変動するバイオマーカーとして知られていたが^{1, 2)}、その作用については未解明であった。ヒトを含む生物種の体液中にはRNA修飾由来の修飾ヌクレオシドが多種多様に存在しており、たとえばヒト血漿中に存在するヌクレオシドの約半分が修飾ヌクレオシドである。そこで血液中で量の多い修飾ヌクレオシドの受容体活性を調べたところ、N⁶-methyladenosine (m⁶A)がアデノシンA3受容体に対する

特異的な活性を有していることがわかり、さらに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左)。m⁶Aはアデノシンの6位の窒素原子がメチル化された修飾アデノシンであり(図1右)、細胞内のmRNA、rRNA、tRNAなどさまざまなRNAに存在する修飾である。特にmRNA上のm⁶A修飾は研究が盛んであり、mRNAの局在や安定性、翻訳効率を制御し、造血系や中枢神経系の発達、卵母細胞の成熟や精子形成などの生殖の過程に関わることが知られている¹⁸⁾が、細胞外における生理的意義や機能は不明であった。

アデノシン受容体のサブタイプはA1, A2A, A2B, およびA3の4種類に分類され、すべてが7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体である。A1およびA3受容体の受容体刺激によりアデニル酸シクラーゼが抑制されcAMP産生が低下し、A2AおよびA2B受容体の受容体刺激によりアデニル酸シクラーゼが活性化されcAMP産生が亢進する。今回明らかになったm⁶Aが活性を持つ受容体はA3受容体であり、ホルスコリン刺激により上昇するcAMPレベルをm⁶Aが下げていることからm⁶Aが受容体を介した新しいシグナル因子であることが示唆された。

未修飾のアデノシンを含む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、次にm⁶Aが変動するか調べたところ、細胞障害などの外的刺激が加わった際に、生体や培養細胞でm⁶Aが特異的に増えることがわかった。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、細胞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あるといえる。アデノシンA3受容体はアレルギーを含む炎症応答に関わるため、細胞・動物モデルを用いてm⁶Aの作用を調べたところ、m⁶AはI型(即時型)アレルギー反応や炎症性サイトカインの産生を誘導しており、この反応は受容体経路に依存していた。

なぜm⁶Aが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調べたところ、m⁶Aのメチル基がA3受容体に存在する疎水性アミノ酸残基と強く分子間力で作用していることを見いだした(図2)。さらにこのアミノ酸残基は生物の進化の過程で大きく変動し、配

列の相違と m^6A 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^6A のアデノシン A3 受容体活性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高い。さらに最近、筆者のグループは m^6A と A3 受容体のクライオ電子顕微鏡による構造解析も行いその相互作用を裏づける報告をしている¹⁹⁾。

4. 修飾ヌクレオシドの代謝機構⁴⁾

以上により、RNA由来の修飾ヌクレオシドは新たな核

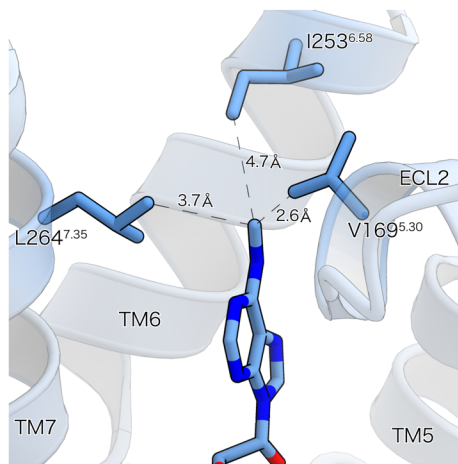


図2 予想された m^6A と A3 受容体の結合様式
ヒト A3 受容体 (PDB:6D9H) において予想される m^6A の結合サイトと相互作用する疎水性残基。

酸型液性因子であることがわかったが、さらに修飾ヌクレオシドの機能について知見を得るために筆者らがさまざまな修飾ヌクレオシドをヒト細胞に投与したところ、 m^6A を含む3種類の N^6 位修飾アデノシン [m^6A , N^6,N^6 -dimethyladenosine ($m^{6,6}A$), N^6 -isopentenyladenosine (i^6A)] が細胞毒性を持っていることがわかり、この3種類の N^6 位修飾アデノシンをラモカイン (Ramokine; RNA modification + kine) と名づけた (図3)。

これらのラモカインは通常、血液中に存在する濃度は低く保たれている。また、ラモカインを細胞培養上清あるいはマウスに経静脈的に投与すると、ほかの大部分の修飾ヌクレオシドは安定して存在するがラモカインは短期間に消失することから、ラモカインはほかの修飾ヌクレオシドと異なる代謝・分解機構が存在することが示唆された。

そこで代謝に関連する化合物のスクリーニングを行うことで、ラモカインが ADK (adenosine kinase) の新たな基質であること、そして ADK によってそれぞれのモノリン酸化体にリン酸化された後、ADAL (adenosine deaminase-like) によってイノシンモノリン酸 (IMP) へと脱アミノ化されて *de novo* 経路やサルベージ経路といった核酸代謝へ合流するという修飾ヌクレオシドの新たな二段階の代謝経路が明らかになった (図4)。

興味深いことに、未修飾アデノシンとラモカイン (修飾アデノシン) はどちらも ADK の基質となりリン酸化されるが、リン酸化された後は、未修飾 AMP は AMPD (AMP deaminase) により IMP へ、その一方で修飾 AMP は ADAL により IMP へと脱アミノ化される (図4)。ADK は元来未

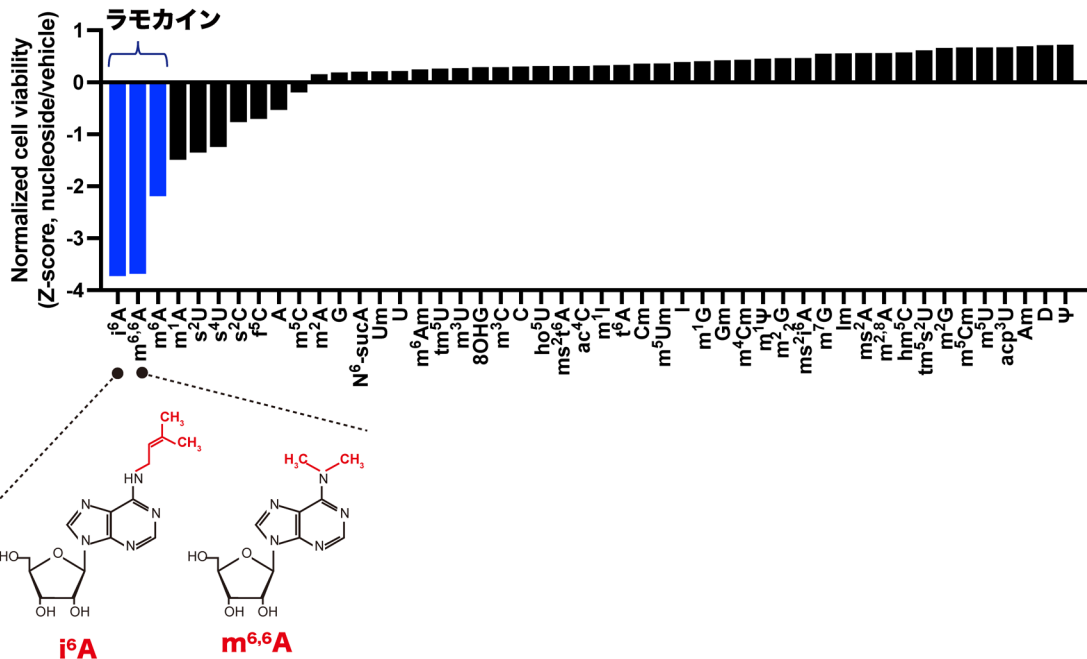


図3 修飾ヌクレオシドの毒性スクリーニング

(上) THP1 細胞に $500 \mu\text{M}$ の修飾・未修飾ヌクレオシドを添加した際の生細胞数の変化を WST8 assay で評価したところ、 m^6A , $m^{6,6}A$, i^6A の3種で顕著な細胞毒性が認められた。 m^6A , $m^{6,6}A$, i^6A をラモカイン (RNA modification + kine) と名づけた。(下) m^6A , i^6A の構造式。 $m^{6,6}A$ はアデノシンの N^6 位がジメチル化された修飾アデノシン、 i^6A はイソペンテニル化された修飾アデノシンである。

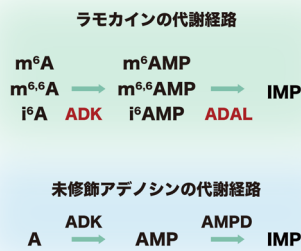


図4 ラモカインの2段階の代謝経路

未修飾のアデノシンはadenosine kinase (ADK)によりリン酸化されてadenosine monophosphate (AMP)となり、AMPはAMP deaminase (AMPD)により脱アミノ化されてinosine monophosphate (IMP)となる。一方で、ラモカインはADKによりリン酸化されて m^6AMP 、 $m^{6,6}AMP$ 、 i^6AMP となった後でadenosine deaminase-like (ADAL)により脱アミノ化されてIMPとなる。

修飾のアデノシンをAMPへとリン酸化する酵素として知られているが、ラモカインへの触媒効率はアデノシンと同等もしくはそれ以上であり、内在性の新たなリガンドが明らかになったことになる。一方でADALは分類上はADA (adenosine deaminase) ファミリーの一つであるが、特に哺乳動物ではその機能についてほとんど明らかになっていなかった^{20,21)}。

そこでADALの機能を調べるためにADALノックアウトマウスを作製して解析を行ったところ、ADALノックアウトマウスは耐糖能異常を示した。ADALノックアウトマウスではADAL以下の経路が機能しないため、その中間代謝体である修飾AMP (m^6AMP 、 $m^{6,6}AMP$ 、 i^6AMP)が蓄積している。そこで耐糖能異常を示すメカニズムとして筆者らはAMPKに着目した。

AMPKは細胞内のエネルギーセンサーとして機能し、飢餓などでAMP/ATP比が大きくなると活性化されて解糖、脂肪酸酸化および糖取り込みを促進しATP産生を亢進させるとともに、糖新生酵素の発現抑制などにより糖新生や脂肪酸合成などのATP消費経路を抑制してATPのレベルを回復させる作用を持つ²²⁾。そのためAMPKの活性化は血糖降下や抗肥満作用を示すことが期待される。

AMPKに対する修飾AMPのホモロジーモデリングを施行した結果、修飾AMPはAMPに対するアロステリックな阻害効果を示すことがわかった (図5)。さらに細胞の飢餓時あるいはマウスの絶食時において、AMPKがなく修飾AMPが増えている場合にはAMPによるAMPKの活性化作用が減じており、ADALノックアウトマウスでは修飾AMPが蓄積することでAMPKの活性が落ちることが耐糖能異常を示すメカニズムの一つであると考えられた。

一方でADKはミスセンス変異に伴う欠損症が報告されており、遺伝形式は常染色体潜性(劣性)の遺伝形式をとるまれな先天性代謝異常である。肝障害、奇形、てんかんや発達異常といった重篤な症状を呈し、アデノシン経路の異常に伴う上流の高メチオニン血症とされるが、その詳細

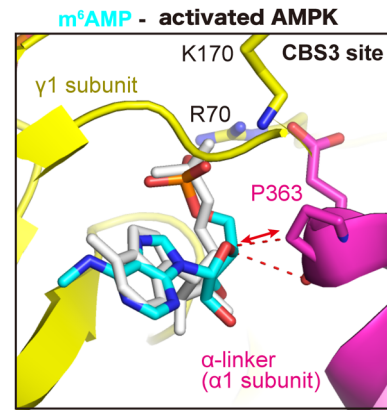


図5 修飾AMPはAMPK活性をアロステリックに抑制する(左) m^6AMP (水色)と活性型AMPK (PDB:4RER)とのドッキングモデル。 m^6AMP は未修飾のAMP(グレー)同様にAMPKの $\gamma 1$ サブユニット(黄色)に結合していることが予想される。さらにAMPKの α -linkerのP363残基と m^6AMP のリボース部分では反発が生じており(赤両矢印)、これによって α -linkerと $\gamma 1$ サブユニットとの相互作用が弱まることでAMPKの活性化が抑制される。 $m^{6,6}AMP$ 、 i^6AMP も同様にAMPKの活性化を抑制することが予測され、修飾AMPはアロステリック阻害効果を示すと考えられる。

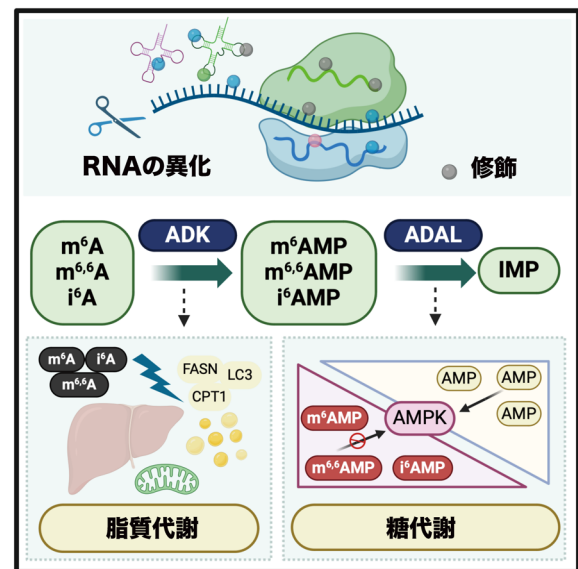


図6 ラモカインの代謝経路とその異常による病態

なメカニズムはわかっておらず有効な治療法も存在しない²³⁾。

これまで報告されているADK変異をADKノックアウト細胞へ入れ戻して各基質に対するリン酸化能を調べたところ、ラモカインリン酸化体である修飾AMPが著明に減少し、対応するように培地中(細胞外)のラモカインは増加していた。また、ADKノックアウトマウスは全個体が生後8日以内に死亡する重篤な表現型を示し、有意なラモカインの上昇がみられた。そこでラモカインとADK欠損症の関連を調べるためにADKノックアウトマウスの肝臓を採取してメタボローム解析およびRNAseqを施行したところ、メチオニン代謝は不変であったが脂質代謝関連遺伝子

の大幅な低下が認められ、病態として脂質代謝異常が考えられた。さらに細胞でのエネルギー貯蔵と供給を行う脂肪滴 (lipid droplets : LDs) の形成がADK阻害によって減少するが、ラモカインの添加によりさらに減少しており、ADK欠損症やストレス下ではラモカインの蓄積による脂質代謝阻害が主要な病態として示唆された (図6)。

このように、細胞はRNA修飾の分解産物の修飾ヌクレオシドのうち毒性を持つラモカインを2段階の代謝で無害なIMPに解毒する経路を有していることが本研究で明らかになった。また、この経路が破綻することで糖質や脂質などの代謝異常が生じるといって修飾ヌクレオシドに起因する新たな病態が明らかになった。

文 献

- Mandel, L.R., Srinivasan, P.R., & Borek, E. (1966) Origin of urinary methylated purines. *Nature*, **209**, 586–588.
- Borek, E., Baliga, B.S., Gehrke, C.W., Kuo, C.W., Belman, S., Troll, W., & Waalkes, T.P. (1977) High turnover rate of transfer RNA in tumor tissue. *Cancer Res.*, **37**, 3362–3366.
- Ogawa, A., Nagiri, C., Shihoya, W., Inoue, A., Kawakami, K., Hiratsuka, S., Aoki, J., Ito, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., et al. (2021) N(6)-methyladenosine (m(6)A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand. *Mol. Cell*, **81**, 659–674.e657.
- Ogawa, A., Watanabe, S., Kawakami, T., Tsai, A.Y.-L., Fuse, J., Araki, K., Sawa, S., Inaba, K., & Wei, F.-Y. (2024) A sequential, RNA-derived, modified adenosine pathway safeguards cellular metabolism. *bioRxiv*, 2024.2005.2023.595515.
- Steinberg, G.R. & Carling, D. (2019) AMP-activated protein kinase: The current landscape for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **18**, 527–551.
- Shryock, J.C. & Belardinelli, L. (1997) Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: Biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am. J. Cardiol.*, **79**(12A), 2–10.
- Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 759–770.
- Engler, R.L. (1991) Adenosine. The signal of life? *Circulation*, **84**, 951–954.
- Jackson, E.K., Kotermanski, S.E., Menshikova, E.V., Dubey, R.K., Jackson, T.C., & Kochanek, P.M. (2017) Adenosine production by brain cells. *J. Neurochem.*, **141**, 676–693.
- Eltzschig, H.K., Warner, D.S., & Warner, M.A. (2009) Adenosine: An old drug newly discovered. *Anesthesiology*, **111**, 904–915.
- Yamamoto, T., Koyama, H., Kurajoh, M., Shoji, T., Tsutsumi, Z., & Moriwaki, Y. (2011) Biochemistry of uridine in plasma. *Clin. Chim. Acta*, **412**, 1712–1724.
- Wurtman, R.J., Cansev, M., & Ulus, I.H. (2009) Synapse formation is enhanced by oral administration of uridine and DHA, the circulating precursors of brain phosphatides. *J. Nutr. Health Aging*, **13**, 189–197.
- Cansev, M. (2006) Uridine and cytidine in the brain: Their transport and utilization. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **52**, 389–397.
- King, M.P. & Attardi, G. (1989) Human cells lacking mtDNA: Repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, **246**, 500–503.
- Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Krayukhina, E., Taoka, M., Yamauchi, Y., Tanji, H., Isobe, T., Uchiyama, S., Miyake, K., et al. (2016) Structural analysis reveals that toll-like receptor 7 is a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA. *Immunity*, **45**, 737–748.
- Shibata, T., Ohto, U., Nomura, S., Kibata, K., Motoi, Y., Zhang, Y., Murakami, Y., Fukui, R., Ishimoto, T., Sano, S., et al. (2016) Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7. *Int. Immunol.*, **28**, 211–222.
- Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K., & Shimizu, T. (2015) Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 109–115.
- Jiang, X., Liu, B., Nie, Z., Duan, L., Xiong, Q., Jin, Z., Yang, C., & Chen, Y. (2021) The role of m6A modification in the biological functions and diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **6**, 74.
- Oshima, H.S., Ogawa, A., Sano, F.K., Akasaka, H., Kawakami, T., Okamoto, H.H., Iwama, A., Nagiri, C., Wei, F.-Y., Shihoya, W., et al. (2024). Structural insights into the agonist selectivity and structure-based engineering of the adenosine A3 receptor. *bioRxiv*, 2024.2003.2023.586386.
- Chen, M., Urs, M.J., Sánchez-González, I., Olayioye, M.A., Herde, M., & Witte, C.P. (2018) m(6)A RNA degradation products are catabolized by an evolutionarily conserved N(6)-methyl-AMP deaminase in plant and mammalian cells. *Plant Cell*, **30**, 1511–1522.
- Maier, S.A., Galellis, J.R., & McDermid, H.E. (2005) Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminase. *J. Mol. Evol.*, **61**, 776–794.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D.G. (2005) AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.*, **1**, 15–25.
- Bjursell, M.K., Blom, H.J., Cayuela, J.A., Engvall, M.L., Lesko, N., Balasubramaniam, S., Brandberg, G., Halldin, M., Falkenberg, M., Jakobs, C., et al. (2011) Adenosine kinase deficiency disrupts the methionine cycle and causes hypermethioninemia, encephalopathy, and abnormal liver function. *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 507–515.
- Inoue, A., Ishiguro, J., Kitamura, H., Arima, N., Okutani, M., Shuto, A., Higashiyama, S., Ohwada, T., Arai, H., Makide, K., et al. (2012) TGF α shedding assay: An accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat. Methods*, **9**, 1021–1029.

著者寸描

●小川 亜希子 (おがわ あきこ)

東北大学加齢医学研究所 助教。博士 (医学) (熊本大学)。

■略歴 神奈川県生まれ。2012年東京大学医学部医学科卒業、東京厚生年金病院で初期臨床研修。14年熊本大学眼科入局、15年熊本大学大学院医学教育部博士課程 (眼科学専攻)。19年より現職、21年より熊本大学眼科客員講師 (兼任)、23年より科学技術振興機構創発的研究支援事業2022年度創発研究者 (兼任)。

■研究テーマと抱負 RNA修飾代謝物 (修飾ヌクレオシド) を含む液性因子、生理活性因子の生体内でこれまで分かっていない機能を解明したい。眼科医の観点から、特にアイフレイル (老化や様々な原因による目の機能の低下) の治療、予防に貢献したい。

■趣味 食べること、実験すること、海外旅行。