

(様式 10)

(海外特別研究員事業)

平成 31 年 4 月 28 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 549

氏 名 寺嶋 秀騎

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：USA (国名：米国)

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

生物時計システムにおける RNA 修飾の重要性

3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日

4. 受入機関及び受入研究者

Chuan He, The University of Chicago

5. 派遣終了後の所属

機関名

The University of Chicago, Department of Chemistry,

可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

「研究計画-1: m⁶A 修飾による概日時計制御の分子メカニズムの解明」

近年のめざましい次世代シーケンサーの技術発展により、真核生物における多様な mRNA 修飾が次々とトランスクリプトームワイドに同定され、エピトランスクリプトミクスと呼ばれるこの研究分野は大変注目を集めている。哺乳類 mRNA においてもっとも豊富に存在する RNA 修飾の一つであるアデノシン N6 位のメチル化修飾 (m⁶A) は、種を超えて広く保存されており、細胞の分化や発生に必須の転写後制御である。また m⁶A 修飾の生物学的意義の一つとして、概日時計の周期長決定に関与しているとの報告がなされたが、どの m⁶A 関連因子がいかなる mRNA において m⁶A 修飾を触媒し、概日時計の周期を決定しているのか、具体的な分子メカニズムについては未解明である。そこで申請者は、概日時計制御における m⁶A 修飾の作用点解明を目指した。

申請者ははじめに、概日時計制御を受ける mRNA が最も大きなリズム振幅を伴って発現する組織の一つである肝臓における m⁶A 修飾の役割に着目した。m⁶A 修飾を受けた mRNA 特異的に結合する YTHDF1 を欠失したマウスから、一日の様々な時刻に肝臓を抽出し時計遺伝子の発現を調べたところ、PER2 発現リズムの振幅が減弱していることを見出した。m⁶A 修飾 mRNA は YTHDF1 により翻訳促進を受けること、また別の m⁶A 特異的結合因子である YTHDF2 により mRNA 分解を受けることが知られている。このような制御機構により、m⁶A 修飾はタンパクを一過的に発現させた後、速やかに mRNA を分解することにより、短い時間幅の一過的な遺伝子発現を可能にしており、これが m⁶A 修飾の生理的役割の一つではないかと考えられている。申請者の発見は、この m⁶A 修飾および YTHDF1 による一過的発現制御が、PER2 時計タンパク質を必要な時刻に適切な量で発現させることを可能にしていると考えられる。

さらに、申請者は概日時計システムにおいて重要な役割を果たす ADAR タンパク質ファミリーが m⁶A 修飾を受けることも見出した。ADAR ファミリーは mRNA 修飾の一種である A-to-I RNA 編集を担う酵素であり、申請者の以前の研究により、ADAR2 は体内時計の周期調節や出力に寄与することが明らかにされている。そこで申請者は、ADAR ファミリーの発現制御における m⁶A 修飾の役割に着目した。ADAR1 タンパク質はインターフェロン刺激により急速に発現上昇し、ウィルス感染時などのインターフェロン応答機構に重要な役割を果たすことが知られている。YTHDF1 をノックダウンした glioblastoma 細胞株においてインターフェロン刺激を行ったところ、コントロール siRNA 処理を行った細胞よりも ADAR1 タンパクの発現上昇幅が減弱していることが判明した。実際にこの細胞株においてインターフェロン刺激による A-to-I RNA 編集効率の上昇幅も低下していることを確認している。これらの結果は、PER2 と同様に

ADAR1 の急速発現にも YTHDF1 が重要であることを示唆する。インターフェロンにより発現誘導される mRNA は二本鎖構造を取るものが含まれるが、ADAR1 はこれらを A-to-I RNA 編集することにより二本鎖 RNA 応答経路の活性化を阻害し、過剰なインターフェロン応答の誘起を防ぐことが知られている。申請者は、YTHDF1 をノックダウンした細胞株ではインターフェロン応答遺伝子が過剰に発現することを見出した。また二本鎖 RNA 応答経路のシグナル伝達因子である TBK1 や I κ B α などが過剰に活性化していたことなどから、YTHDF1 のノックダウンによってインターフェロン刺激時の ADAR1 発現誘導が不十分となり、A-to-I RNA 編集を受けない二本鎖 RNA が蓄積することにより過剰なインターフェロン応答を引き起こしている可能性が示唆された。この仮説を証明するため、現在申請者は、ADAR1 の過剰発現により YTHDF1 欠失が引き起こす過剰なインターフェロン応答を回復できるか実験を行っている。また YTHDF1 を欠失した glioblastoma 細胞株をマウスに移植し、その増殖率をコントロールがん細胞と比較することにより、YTHDF1 をターゲットとしたがん治療の可能性の検証を計画している。以上の結果が得られ次第、今夏までに原著論文を筆頭著者として投稿する予定である。

「研究計画-2: リズミックな A-to-I RNA 編集による概日時計の入力系への寄与」

ほとんどの生物には、外界からの光刺激を受けて概日時計の位相をリセットし、体内の概日時計を外界の光環境に同調させる光入力系の分子機構が備わっている。申請者は、これまでに体内時計の周期調節や出力において A-to-I RNA 編集酵素である *Adar2* が重要な役割を果たすことを示してきたが、今回概日時計の光入力系においても *Adar2* が寄与していることを見出した。夜間の後半にマウスへの光照射を行うと、マウスの活動リズムの位相前進が観察されるが、*Adar2* 欠損マウスではこの位相前進幅が野生型よりも大きくなっていた。このことから、ADAR2 は光刺激による過剰な位相前進を抑制し、概日時計の適切な光応答シフト幅に寄与していることが判明した。一方、夜間の前半における光照射が引き起こす位相後退においては、*Adar2* 欠損マウスと野生型マウスに差が見られなかったことから、ADAR2 は光位相前進に特異的なシグナル経路を制御している可能性が示唆された。またこの結果により、光受容能そのものは ADAR2 欠損により影響を受けないことが示された。さらに、海外旅行を模すように、マウスの飼育環境における光の明暗サイクルを 8 時間ずらす jet lag 実験においても、同様の仮説を支持する結果が得られた。

これらの観察結果に基づき、申請者は、脳の視床下部に存在する視交叉上核 (SCN) と呼ばれる概日時計の中核における A-to-I RNA 編集に着目した。まず、野生型と *Adar2* 欠損マウスの SCN から RNA を抽出し、様々な受容体をコードする mRNA における A-to-I RNA 編集効率をダイレクトシーケンスにより確認した。興味深いことに、グルタミン酸受容体やセロトニン

受容体、電位依存カルシウムチャネルなどの A-to-I RNA 編集部位においては、ADAR2 がその RNA 編集の大部分を担う責任酵素であると判明した。意外なことに、これらの A-to-I RNA 編集部位においては、その A-to-I RNA 編集効率に夜と昼の違い、すなわち日周変動は観察されなかった。さらに、マウスへの夜間後半における光刺激は A-to-I RNA 編集効率の変化を引き起こさなかった。これらの事実は、ADAR2 が時刻特異的に光シグナル経路を制御しているのではなく、光位相前進に特異的なシグナル経路を構成する因子が A-to-I RNA 編集による制御を受けている可能性を示唆する。

外界の光刺激を直接受け取る網膜から、時計中枢である SCN への光情報の伝達においては、グルタミン酸と pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) の重要な寄与がよく知られている。ADAR2 が制御する光位相前進特異的なシグナル経路を絞り込むために申請者は、概日時計の位相を Luciferase の化学発光によりモニタリングすることが可能な PER2::Luc マウスと *Adar2* 欠損マウスをかけあわせ、マウス SCN 切片の時計位相を *ex vivo* で継時観察した。マウス個体の夜間後半に相当する時刻に、SCN 切片へ神経伝達物質を投与し、その位相前進幅を野生型と *Adar2* 欠損マウス由来の SCN 切片において比較することにより、ADAR2 が寄与するシグナル経路を特定することができる。申請者は、グルタミン酸受容体をコードする mRNA における ADAR2 依存的な A-to-I RNA 編集部位の同定に成功しているため、まず初めに、グルタミン酸の SCN 切片への投与実験を行った。しかし、グルタミン酸の神経細胞への毒性のためか、SCN 切片の位相前進を再現よく引き起こすことができなかった。一方、大変興味深いことに、*Adar2* 欠損マウス由来の SCN 切片に PACAP を投与すると、その位相前進に異常が観察された。マウス SCN 切片を用いた先行研究により、PACAP がグルタミン酸受容体を介したシグナル経路を正に制御することが知られていることから、PACAP が引き起こす位相前進シグナル経路に ADAR2 が寄与していることを示した。

申請者は *Scientific Reports* 誌に筆頭著者として上記の実験結果を報告した[1]。

[1] Terajima, H., Yoshitane, H., Yoshikawa, T., Shigeyoshi, Y. & Fukada, Y
“A-to-I RNA editing enzyme ADAR2 regulates light-induced circadian phase-shift.”

Scientific Reports. **8**, 14848 (2018).