



Title	マウス胎仔発生に関連するRNA修飾の探索およびRNA修飾酵素ALKBH8の機能解析
Author(s)	仲井, 愛
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101938
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (仲 井 愛)

論文題名

マウス胎仔発生に関連するRNA修飾の探索およびRNA修飾酵素ALKBH8の機能解析

論文内容の要旨 (2,651 字)

RNAは転写後に300種類以上の多彩な修飾を受ける。RNAの修飾異常は疾患の原因となることが報告されており、一部のRNA修飾において胎仔発生にも関わる可能性が示されている。本研究では、複数あるRNA修飾の中から発生に関連する新たなRNA修飾の発見を目指し、マウス胎仔発生に関連するRNA修飾の探索および発生期におけるRNA修飾酵素の機能解析を目的とした。

マウス受精後発生に関わるRNA修飾の探索を行う為、マウス受精卵(前核期/2細胞期/桑実胚/胚盤胞)、胎仔(E10.5/13.5/16.5/19.5)および新生仔P0個体よりtotal RNAを抽出し、UPLC-MS/MSを用いてRNA修飾の定量解析に取り組んだ。これまでに、マウス受精後発生におけるRNA種プロファイル変化やRNA修飾変化を発生段階ごとに比較した知見はないため、本研究では両方を検討することにした。

各段階で抽出したtotal RNA中のRNA種プロファイルを確認するため、エレクトロフェログラムピークにより、28S rRNA、18S rRNA、200 nt未満のsmall RNAの3つに分類して解析したところ、未受精卵、前核期および2細胞期ではsmall RNAの割合が高く、桑実胚以降のステージではRNA種プロファイルに顕著な変化を示さないことが分かった。RNA修飾解析では、RNA種プロファイルの変化に応じて多くのRNA修飾に変化がみられたが、他のRNA修飾と比較して、5-メトキシカルボニルメチルウリジン(mcm5U)は2細胞期とE10.5以降の胎仔発生後期で増加した。したがって、total RNA中のmcm5Uが発生過程に関連する可能性を考えた。

現在報告されているmcm5U修飾酵素の1つであるAlkB homolog 8(ALKBH8)は5-カルボキシメチルウリジン(cm5U)のmcm5Uへのメチル化を触媒し、ヒトALKBH8機能欠失型変異は低体重発達遅延が観察されている。よって、ALKBH8を介したmcm5U修飾が発生への関連性を考え、マウス発生過程における*Alkbh8*の挙動を調べるため、qPCRによるmRNA発現量を確認したところ、*Alkbh8*遺伝子はmcm5U上昇タイミングと同じ、E10.5以降の胎仔期に増加した。したがって、ALKBH8を介したmcm5U修飾が胎仔期に関連する可能性が示唆された。

発生との関連性が未知であるmcm5Uとその修飾酵素であるALKBH8の機能解析を行うため、当研究室で作製した*Alkbh8*欠損マウスを用いた表現型解析に着手した。*Alkbh8*ヘテロ欠損マウス同士を交配させた際の仔マウスのジェノタイプ比率をE10.5、13.5、19.5、P0および離乳直後のP28で確認したところ、E10.5、E13.5までは野生型:ヘテロ欠損型:ホモ欠損型の割合がほぼ1:2:1のメンデルの法則に従うのに対し、E13.5より後の胎齢ではホモ欠損型の比率の減少がみられた。また、ホモ欠損型ではE13.5時点で体長減少がみられ、P56まで低体重であった。

続いて、体外受精-胚移植(IVF-ET)法を用いた検証を行った。*Alkbh8*ホモ欠損型雄の精子と、ヘテロ欠損型雌の卵を用いて体外受精を行い、ICR野生型の子宮内に移植して産仔を取得した。16匹のICR義母マウスから得られた産仔のジェノタイプ比率を解析したところ、P7時点でヘテロ欠損型52匹に対しホモ欠損型14匹であり、メンデルの法則通りの1:1ではなく、ホモ欠損型が少なかった。また、P7からP21にかけて死亡個体が発生したが、ほとんどがホモ欠損型であった。さらに、自然交配と同様P56までホモ欠損型マウスは低体重であった。このことから、育て親の影響とは関係なく*Alkbh8*ホモ欠損マウスはE13.5以降から離乳前の生存率が低く、生き残ったとしても小さく産まれることが分かり、ALKBH8は発生に何らかの影響を与えていることが示唆された。

Mcm5Uは、tRNA中の34番目アンチコドンループゆらぎの位置に存在が確認されており、ヒト細胞においてALKBH8はtRNAの中でもtRNA^{Arg}(UCU)、tRNA^{Glu}(UUC)、tRNA^{Sec}(UCA)、tRNA^{Gly}(UCC)、tRNA^{Lys}(UUU)を標的とし、DNA損傷応答やミトコンドリア機能に影響を与えることが報告されている。しかし、ALKBH8によるtRNAバランスへの影響やミトコンドリアtRNA(mttRNA)に対する作用、mcm5U修飾を受けたtRNAの生体内での変化については未解明である。そこで、体長減少がみられ始めたE13.5胎仔期に着目し、mcm5U修飾酵素ALKBH8によるtRNAへの影響について解析を行った。*Alkbh8*野生型とホモ欠損型E13.5胎仔全身から抽出したRNAを200 nt以上のlarge RNAと200 nt未満のtRNAを多く含むsmall RNAに分画してRNA修飾解析を行った。その結果、既報通り*Alkbh8*ホモ欠損マウスではcm5Uからmcm5Uへの修飾作用の減弱を確認した。続いて、E13.5胎仔におけるtRNA-seqを行ったところ、野生型と比較して*Alkbh8*ホモ欠損型で76種の増加、

および11種の減少が確認され、ALKBH8の標的として報告あるtRNA tRNA^{Lys} (TTT) 遺伝子の有意な増加を確認した。また、変動を示したtRNAには、ALKBH8の標的となりうるtRNAアンチコドンループゆらぎの位置がウリジンとなるtRNA以外にもミトコンドリアtRNAが含まれており、*Alkbh8*ホモ欠損マウスでは細胞質tRNAとミトコンドリアtRNAの両方のバランス変化をもたらしている可能性が推察された。

*Alkbh8*ホモ欠損マウスでみられたtRNA修飾とtRNAバランスの両方の変化がもたらす生理学的機能を調べるため、tRNAのタンパク質翻訳能を検討した。ルシフェラーゼRNAおよびアミノ酸と翻訳因子を含む*in vitro*翻訳系に、*Alkbh8*野生型とホモ欠損型E13.5胎仔から抽出したsmall RNAを添加し、翻訳されたルシフェラーゼの活性により翻訳効率を評価したところ、ホモ欠損型由来small RNAではタンパク質翻訳効率が有意に減少した。続いて、プロテオーム解析を行ったところ、*Alkbh8*ホモ欠損型胎仔において21タンパク質の上昇および111タンパク質の減少が見られた。減少した111タンパク質におけるエンリッチメント解析では、プロトポリフィリン代謝プロセスや、赤血球様細胞または赤血球前駆細胞への関連性が示され、CEACAM1, ALAS2, FECH, PKLR, AHSG, UROS, PNPO, GATA1などの因子の関連が示唆された。

胎仔期の赤血球分化に着目し、マウスE13.5前後での赤血球生成主要臓器である肝臓中の赤血球分化を、CD71とTer119の赤芽球表面マーカーを用いたフローサイトメトリー解析により評価した。その結果、*Alkbh8*ホモ欠損型において、赤血球前駆細胞の有意な増加、および分化の進んだ赤血球細胞の減少が認められた。病理組織学的解析では、ホモ欠損型において大型・超小型の赤芽球が多くみられた。さらに、コロニー形成ユニット (CFU) アッセイによる血球分化能評価では、*Alkbh8*ホモ欠損胎仔では赤血球系列BFU-Eのコロニー形成数の減少が見られた一方、顆粒球・単球・マクロファージを形成するCFU-GMや骨髄系の前駆細胞であるCFU-GEMMは変化がなかった。よって、*Alkbh8*ホモ欠損マウスでは赤血球前駆細胞における分化異常が示された。

本研究により、マウス受精後発生におけるRNA種プロファイルおよびRNA修飾の変化を見出した。また、発生過程で特徴的な挙動を示したmcm5Uの修飾酵素の1つ、ALKBH8の機能として、*Alkbh8*欠損マウスの表現型解析により、tRNAのmcm5U修飾誘導、tRNA種バランスへの影響、tRNAのタンパク質翻訳効率の変化、そして、正常な赤血球分化に関わることを示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (仲 井 愛)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	辻川和丈
	副 査	教授	藤尾 慈
	副 査	教授	深田宗一朗

論文審査の結果の要旨

DNAやタンパク質とともにRNAの塩基や糖鎖も特異的な修飾酵素により多様な修飾を受けていることが最近明らかとなってきた。またそのRNA修飾により、RNAの安定性、タンパク質翻訳効率、RNAの高次構造、細胞内の局在性や、mRNA選択的ポリアデニル化とスプライシングが調整されることも示されている。さらに、RNAの修飾異常はがんや精神神経疾患などの疾患発症や悪性化の原因となることの報告も相次いでおり、epitranscriptomicsという新たな学問領域が創出されている。

本博士論文では、このRNA修飾と発生との関連性を探る研究が進められた。マウス受精卵（前核期/2細胞期/桑実胚/胚盤胞）、胎齢10.5/13.5/16.5/19.5日および生後0日の各個体に含まれるRNA修飾変化をUPLC/MS/MSを用いて解析したところ、5-carbamoylmethyluridine (mcm5U) が胎仔期に特徴的に増加していることを見出した。このmcm5UはAlkB homolog 8 (ALKBH8) によりm5Uを基質として触媒されることが知られていることから、*Alkbh8*欠損マウスを用いた表現型の解析を進めた。その結果、*Alkbh8*欠損マウスでは胎齢13.5以降に生存率低下および生存個体の体長減少が見られた。また*Alkbh8*欠損マウスではmcm5U修飾の低下とともにtRNA種のバランスの変化も認められた。そこで*Alkbh8*欠損マウス由来tRNAを用いて *in vitro* 翻訳アッセイが行われ、タンパク質翻訳効率の低下を認めた。次に*Alkbh8*野生型とホモ欠損型の体齢13.5胎仔を用いてプロテオーム解析を行ったところ、ホモ欠損型胎仔において減少が認められたタンパク質のエンリッチメント解析により、ALKBH8とプロトポリフィリン代謝プロセスや赤血球様細胞または赤血球前駆細胞への関連性が示された。*Alkbh8*欠損マウス胎仔で赤血球関連タンパク質の低下が認められたことから、胎仔肝臓における赤血球分化をフローサイトメトリーで解析した。その結果、野生型と比較して*Alkbh8*欠損マウスにおいて、赤血球前駆細胞の有意な増加、および分化の進んだ赤血球細胞の減少が認められた。*Alkbh8*欠損胎齢13.5マウス肝臓の病理組織学的解析では、大型・超小型の赤芽球が多く見られたのみならず未熟で小型のものや非分葉単核、裸核の巨核球が多く観察された。さらに、胎齢13.5胎仔肝臓を用いて、コロニー形成アッセイによる血球分化能評価を行った結果、*Alkbh8*ホモ欠損胎仔では赤血球系列BFU-Eのコロニー形成数の減少が見られた。これらの解析結果は、*Alkbh8*欠損マウスでは赤血球前駆細胞における分化異常が生じていることを示した。

以上、本研究成果はALKBH8がmcm5U含有tRNAによるタンパク質翻訳調整という生理機能を介し、赤血球分化能を調節することにより発生を制御するRNA修飾酵素であることを初めて示すものであり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。