

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05110

研究課題名（和文）細胞・個体における環境応答性核酸構造体の多元機能

研究課題名（英文）Biological function of non-canonical nucleic acids

研究代表者

今西 未来 (Imanishi, Miki)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：80362391

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 35,000,000円

研究成果の概要（和文）：N6-メチルアデノシン（m6A）は、メッセンジャーRNAに最も多く存在する修飾塩基であり、種々の生命現象に影響を与える。本研究では、RNAメチル化酵素METTL3/METTL14ヘテロダイマーのグアニン四重鎖（G4）構造RNAに対する結合特異性およびメチル化特性を明らかにした。また、シロイヌナズナの細胞内においてG4構造およびi-モチーフ構造を可視化することに成功した。さらに、ゲノムワイドな遺伝子発現解析から、多くの遺伝子がG4構造の形成による制御を受けていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

N6-メチルアデノシン（m6A）は様々なRNA代謝に関わり、発生や分化、がん化、体内時計の制御やウイルスの生活環など種々の生命現象や疾患に影響を与える。本研究では、エピトランスクリプトーム制御におけるG4構造の関与という新たな知見と同時に、核酸高次構造の新たな機能を示す結果を得た。また、植物個体においても核酸の高次構造が存在し遺伝子制御に関わることが明らかになり、一時配列にとどまらない核酸の役割に関する基礎的な知見を得た。これらの成果は、核酸の高次機能の制御が、種々の生命現象を理解したり、創薬を行う上での新たな観点となることを示すものである。

研究成果の概要（英文）：N6-methyladenosine (m6A) is the most abundant modified base in mRNA and influences various biological phenomena. In this study, we have characterized the binding specificity and methylation properties of the RNA methyltransferase METTL3/METTL14 heterodimer to guanine quadruplex (G4) structured RNAs. We also succeeded in visualizing the G4 structure and i-motif structure in Arabidopsis cells. Furthermore, genome-wide gene expression analysis revealed that many genes are regulated by the formation of G4 structures.

研究分野：生物分子化学

キーワード：核酸高次構造 核酸修飾

1. 研究開始当初の背景

クロマチンの化学修飾が遺伝子発現に寄与することがエピゲノム研究により周知のものとなった。また近年では、RNAの化学修飾の重要性が明らかになりつつある。これらの塩基修飾に加えて、DNA、RNAのグアニンに富む配列は、グアニン4重鎖(G4)という非二重らせん構造をとり、転写や翻訳の制御に関わることが示唆され始め、配列情報を超えた核酸の役割に注目が集まっていた。

メッセンジャーRNAの修飾として最も多く存在するN6-メチルアデノシン(m6A)は、RNAの安定性や局在、スプライシングや翻訳など様々なRNA代謝に関わり、発生や分化、がん化、体内時計の制御やウイルスの生活環など種々の生命現象に影響を与える。アデノシンへのメチル化の導入機構を知ることはこれらの生命現象を理解する上でも重要であるが、メチル化酵素自体のRNA結合特性は不明であった。メチル化酵素複合体を構成するタンパクMETTL14は、G4結合モチーフの一つとして知られるアルギニンとグリシンに富むRGGモチーフをRNA結合モチーフとして持つことから、配列情報を超えた核酸の多元機能として、本研究では、核酸の化学修飾と高次構造との関係性に着目した。

また、核酸の高次構造体は動植物に共通するものであるにもかかわらず、哺乳動物細胞において転写の制御への寄与などが報告されているほかは、核酸構造体の存在や役割はほとんど不明であった。植物をはじめとして、種々の生命体におけるG4構造の実体を明らかにすることが求められていた。

2. 研究の目的

核酸の構造変化は可逆的であり、かつ周辺環境の影響を受けやすい。加えて、種々の核酸構造や化学修飾は動植物に共通する。それ故、環境応答性の核酸構造体は生理的にも重要な役割を秘めていると考えられる。本研究では、化学修飾と核酸構造といった一次配列情報からは知り得ない核酸の多元性の生理機能に関して、エピトランスクリプトーム制御の観点からの知見および、植物個体における核酸高次構造体の基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) エピトランスクリプトーム制御におけるRNA高次構造の役割の解明

① モデル配列を用いたRNAメチル化酵素METTL3/METTL14の結合性、メチル化能の検証
RNAメチル基転移酵素METTL3/METTL14はアデノシンのN6位にメチル基を転移し、N6-methyladenosine(m6A)を合成する酵素である。酵素機能に必須の領域を大腸菌発現系で共発現させてHis-tagおよびStrep-tagIIを利用して、複合体として精製した。安定なG4構造を形成することが知られているテロメアRNA配列に基づくRNA配列にRNAメチル化基質となる配列を挿入した数種のモデル配列およびコントロール配列をデザインし、グアニン四重鎖構造を安定化するカリウムイオンの存在下もしくは、安定化に寄与しないリチウムイオン存在下におけるMETTL3/METTL14のこれらのRNAに対する結合親和性およびメチル化活性を評価した。

② METTL3/METTL14が結合する細胞由来RNA配列の探索

A01班の遠藤(甲南大)が開発した、細胞由来のRNA配列を提示する微粒子R-CAMPを用いて、METTL3/METTL14が結合するA549細胞由来のRNA配列の探索を行った。METTL3/METTL14を蛍光標識することで、蛍光強度を指標としてMETTL3/METTL14が結合している微粒子をセルソータで回収し、次世代シーケンサーで配列を確認した。さらに、A01班の凌(新潟大)との共同研究によって、得られた配列からQGRS Mapperを用いてG4構造形成可能配列を抽出し、またm6Aデータベースとの照合によって、得られた配列中のm6Aサイトを抽出した。

③ METTL3/METTL14のRNA結合とRNAメチル化との関係性の検証

回収した微粒子に提示されたRNAの配列解析の結果、G4形成可能配列の近傍にm6Aサイトが存在するRNA配列に関して、CDスペクトル測定によりG4構造形成能を検証した。また、ゲルシフトアッセイによってMETTL3/METTL14結合親和性を算出し、m6A感受性RNA切断酵素MazFを用いてメチル化能を検証した。

(2) 植物における核酸高次構造の役割の解明

① G4構造の可視化

植物細胞内におけるDNA四重らせん構造の存在を示すために、モデル植物シロイヌナズナを用いた免疫染色に取り組んだ。シロイヌナズナの根を細胞壁分解酵素で処理し、動物細胞で広く使用されているグアニン四重鎖とi-モチーフ構造を認識する抗体を用いて染色を行った。また、グアニン四重鎖とi-モチーフを安定化させるピリドスタチンとフィセチンを処理した根に対して

も同様の操作を行い、コントロールと比較した。

② 核酸高次構造による遺伝子発現の制御

核酸高次構造により発現制御を受ける遺伝子を同定するため、RNA シーケンスを用いたゲノムワイドな遺伝子発現解析を行った。グアニン四重鎖を安定化するピリドスタチンを処理もしくは未処理のシロイヌナズナを用いて、シーケンスデータを比較解析した。また、植物種間での核酸高次構造の比較を目的として、公開されているさまざまな植物のゲノム情報を用いてグアニン四重鎖の予測を行った。予測には QGRS Mapper を用いた。

4. 研究成果

(1) エピトランスクリプトーム制御における RNA 高次構造の役割の解明

RNA メチル基転移酵素 METTL3/METTL14 の G4 構造 RNA への結合性を調べるために、安定な G4 構造を形成するモデル配列として、テロメア RNA の G4 配列 ((GGGUUA)_n) のループ部分もしくは G4 構造の外側にメチル化基質配列を挿入したオリゴ RNA と、G4 構造を形成できないオリゴ RNA を用意し、まず、これらの G4 構造形成能を CD スペクトル測定によって確認した。METTL3/METTL14 の結合親和性を調べた結果、ループの長さに関わらず、G4 構造を形成するオリゴに対して METTL3/METTL14 は高い親和性で結合することが明らかになった。カリウムイオン非存在下 (リチウムイオン存在条件) では結合親和性が大きく低下したことから、METTL3/METTL14 が G4 構造 RNA に対して特異性があることが示唆された。また、RNA メチル化能に関しては、細胞由来の RNA が存在する夾雑条件においては、G4 構造近傍 (ループ部分、G4 隣接領域) に存在するメチル化基質配列中のアデノシンが選択的にメチル化されることが明らかになった。METTL3/METTL14 は、G4 構造 RNA に結合した上で、それを足場として近傍のメチル化標的配列をメチル化している可能性が示唆された。

さらに、モデル配列のような安定な G4 形成配列に限らず、細胞に存在する mRNA 配列の中で METTL3/METTL14 が結合する配列を A549 由来 mRNA 配列を提示した微粒から探索した。METTL3/METTL14 が結合している微粒を回収し、提示されている RNA 配列を次世代シーケンサーで解析した結果、候補となる約 300 配列を得た。これをヒット配列群とし、コントロール群としてトランスクリプトーム中からランダムに、ヒット配列の平均鎖長を持つ同数の配列を抽出した。エンリッチメントモチーフ解析により、コントロール群と比較して GGA に富む配列が濃縮されていることが明らかになった。特に、RGAGGAGGAGGAGGA 配列は 60% 近くものヒット配列中に存在した。また、ヒット配列中およびコントロール配列中の G4 形成可能配列および m6A サイトを抽出した。その結果、コントロール群と比べて、ヒット配列群では G4 形成可能配列の数と m6A サイトの数のいずれも、コントロール群に対して有意に多いことが明らかになった。

候補として得られた RNA 配列が実際に G4 構造を形成するのか、METTL3/METTL14 の結合標的およびメチル化標的となるのかを検証するために、得られたヒット配列の中から、m6A データベースとの照合によりメチル化を受けるアデノシンを有し、かつその近傍に G4 形成可能配列を含む領域を抽出し、オリゴ RNA を合成した。これらの CD スペクトル測定を行なったところ、カリウム存在下では特徴的なパラレル型 G4 構造を形成することが示唆された。また、METTL3/METTL14 が結合し、夾雑 RNA が過剰に存在する条件でも特異的に G4 構造近傍のメチル化サイトをメチル化することを確認した。安定な G4 構造を形成するモデル配列のみならず、細胞の mRNA 由来の配列においても METTL3/METTL14 が G4RNA を認識し、これを足場としてメチル化を進めることが示唆された (図 1)。これらの結果は、RNA の G4 構造がアデノシンメチル化部位の決定に関わる一因であることを示唆するものであり、エピトランスクリプトームの制御における G4RNA 構造の新たな知見を提供した (図 1)。

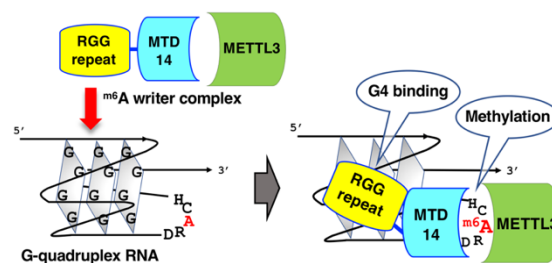


図 1. RNA メチル化酵素は G4RNA 構造結合性を有し、近傍サイトをメチル化する

(2) 植物における核酸高次構造の役割の解明

抗グアニン四重鎖抗体と抗 i-モチーフ抗体を用いた免疫染色の結果、シロイヌナズナの根の細胞においてそれぞれのシグナルが検出された。また、これらのシグナルはピリドスタチン処理もしくはフィセチン処理により増加したことから、コントロール群において観察されたシグナルは核酸高次構造由来であると考えられた。このことから、植物ゲノムにも核酸高次構造が存在することが示唆された。

ピリドスタチン処理もしくは未処理のシロイヌナズナを用いて RNA シーケンスを行った結

果、ピリドスタチン依存的に2倍以上発現変動する遺伝子として1939遺伝子を同定した。Gene Ontology エンリッチメント解析の結果、発現変動遺伝子の多くがストレス応答に関連するものであった。グアニン四重鎖が植物においてストレス応答を制御する新たな可能性を示すことができた(図2)。

QGRS Mapper を用いたさまざまな植物のゲノムにおけるグアニン四重鎖の予測の結果、植物進化系統樹において陸上植物の基部に位置する苔類ゼニゴケのゲノムには多くのグアニン四重鎖が存在する可能性が示唆された。そこで、ピリドスタチン処理したゼニゴケを用いて植物ホルモン応答因子をコードする遺伝子の発現解析を行った結果、コントロールと比較して発現が有意に抑制されることが明らかになった。当該遺伝子のプロモーター上に予測されたグアニン四重鎖は植物ホルモン応答に必要なシス配列の近傍に存在し、またピリドスタチン処理により植物ホルモン応答性が喪失されたことから、核酸高次構造の形成が植物ホルモンに応答した当該遺伝子の発現制御機構に対して抑制的に機能すると考えられた。

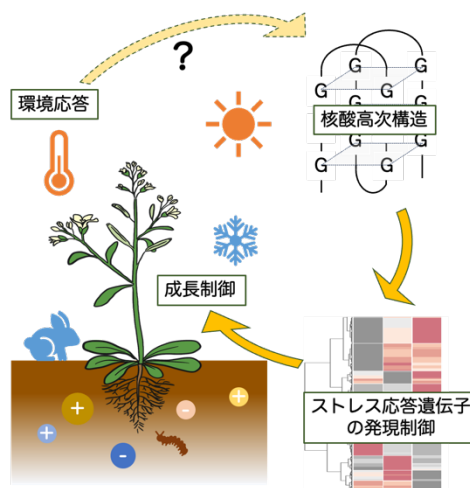


図 2. 核酸高次構造はストレス応答遺伝子を発現制御して植物の成長を制御する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Aki SS, Morimoto T, Ohnishi T, Oda A, Kato H, Ishizaki K, Nishihama R, Kohchi T, Umeda M.	4. 巻 12
2. 論文標題 R2R3-MYB transcription factor GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB1 mediates the cytokinin signal to achieve proper organ development in Marchantia polymorpha	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 21123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-25684-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 K. Tanaka, A. Suda, M. Uesugi, S. Futaki, M. Imanishi	4. 巻 59
2. 論文標題 Xanthine derivatives inhibit FTO in an L-ascorbic acid-dependent manner	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 10809-10812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D3CC02484A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Imanishi, M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Mechanisms and strategies for determining m6A RNA modification sites by natural and engineered m6A effector proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chem. Asian J.	6. 最初と最後の頁 e202200367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/asia.202200367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida, A., Oyoshi, T. Suda, A., Futaki, S., Imanishi, M.	4. 巻 50
2. 論文標題 Recognition of G-quadruplex RNA by a crucial RNA methyltransferase component, METTL14	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 449-457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab1211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計21件(うち招待講演 7件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 M. Imanishi, T. Endoh, Y. Ling, A. Yoshida, T. Oyoshi, S. Futaki
2. 発表標題 G-quadruplex specific binding of METTL3/14 RNA methyltransferase complex
3. 学会等名 Supra FIBER International Summit for Nucleic Acids (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 今西未来, 田中和無爲, 音成兼光, 上杉志成, 二木史朗
2. 発表標題 RNAメチル化の人為的制御
3. 学会等名 第40回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 M. K. Yee, A. Masada, H. Manabe, H. Takatsuka, S. S. Aki, M. Umeda
2. 発表標題 Control of DNA replication by histone methyltransferases ATXR5 and ATXR6 in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miki Imanishi
2. 発表標題 Development of a simple detection method of RNA modification and its application
3. 学会等名 日本薬学会第144年会(招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 配列・タイミング依存的なRNA修飾操作法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 核酸構造の多元機能とエピトランスクリプトームとの接点を知る
3. 学会等名 第13回 CSJ化学フェスタ2023（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 M. Imanishi
2. 発表標題 Detection and sequence-specific control of RNA modifications
3. 学会等名 The 19th Akabori Conference (Japanese-German Symposium on Peptide Science), (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今西 未来
2. 発表標題 核酸の高次情報を制御し理解する
3. 学会等名 第15回タタバイオ分子クラブ（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 今西未来, 吉田敦裕, 大吉崇文, 二木史朗
2. 発表標題 グアニン四重鎖構造を介したRNAアデノシンメチル化
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安喜 史織
2. 発表標題 植物ホルモンによるゲノム恒常性維持機構
3. 学会等名 第7回幹細胞研究会「幹細胞制御に関わるクロマチンおよびDNA高次構造体」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miki Imanishi
2. 発表標題 Targeted RNA methylation and demethylation using artificial RNA binding proteins
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今西未来、吉田敦裕、大吉崇文、二木史朗
2. 発表標題 RNAメチル化酵素複合体主要構成因子METTL14のRNAグアニン四重鎖への選択的結合
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安喜 史織, 梅田 正明
2. 発表標題 オーキシンによるゲノム恒常性維持機構
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kar Yee Moo, 正田晃子, 真鍋はるか, 高塚大知, Shiori Aki, Masaaki Umeda
2. 発表標題 Proteolysis of histone methyltransferases controls cell cycle progression in Arabidopsis
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaaki Umeda, Shiori Aki, Naoki Takahashi
2. 発表標題 Genome maintenance strategies in plant stem cells
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 音成 兼光, 浅見 有璃, 二木 史朗, 今西 未来
2. 発表標題 配列選択的かつタイミング制御可能なRNA脱メチル化ツールの創出
3. 学会等名 日本化学会第13回CSJ化学フェスタ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 和無為, 二木 史朗, 今西 未来
2. 発表標題 RNA脱メチル化酵素FTOに対する新規阻害剤とFTO活性におけるL-アスコルビン酸の寄与
3. 学会等名 日本化学会第13回CSJ化学フェスタ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Otonari, S. Futaki, M. Imanishi
2. 発表標題 Development of higher sequence-selective and timing-controlled m6A demethylation tool
3. 学会等名 FIBER International Summit for Nucleic Acids 2023 (FISNA 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Otonari, Y. Asami, S. Futaki, M. Imanishi
2. 発表標題 Development of higher sequence-selective and timing-controlled m6A demethylation tool
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 音成 兼光, 二木 史朗, 今西 未来
2. 発表標題 活性スイッチング制御が可能な配列特異的RNA脱メチル化酵素の創出
3. 学会等名 第69回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 M. Imanishi, A. Yoshida, T. Oyoshi, S. Futaki
2. 発表標題 Recognition of G-quadruplex RNA by an RNA methyltransferase component, METTL14
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>「多元応答ゲノム」ホームページ https://www.konan-u.ac.jp/hp/dir-gb_fiber/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安喜 史織 (Aki Shiori) (50747946)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------