

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15123

研究課題名(和文) 癌におけるRNA修飾異常の解明とエピトランスクリプトーム治療の開発

研究課題名(英文) Elucidating Abnormal RNA Modifications in Cancer

研究代表者

三宅 浩太郎 (Kotaro, Miyake)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80726787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：様々な癌種で変異ホットスポットとなるMETTL14 R298P変異に着目して研究を行った。CRISPR-Cas9を用いてこの変異をノックインした細胞株を作成してMeRIP-Seq解析を行ったところ、通常は5'-AC-3'であるm6A修飾モチーフが5'-AU-3'に変化していることを発見した。5'-AU-3'におけるm6A修飾はreader proteinに結合せず、それ自体は遺伝子発現に与える影響は小さいようであった。しかし異常モチーフがm6A修飾される際に周辺のモチーフが修飾されることによって遺伝子発現が調整されるということを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAのメチル化(m6A修飾)は5'-(m6A)C-3'というモチーフに書き込まれており、幅広い遺伝子発現を制御するメカニズムである。今回の研究は、正しいモチーフにm6Aを書き込むためにはMETTL14 R298が重要であること、正しくないモチーフに書き込まれたm6Aは機能を失うこと、正しくないモチーフにm6Aが書き込まれる時に、周囲の正しいモチーフが副次的にm6A修飾されることによって遺伝子発現が調整されうること を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We conducted a study focusing on the METTL14 R298P mutation, a mutation hotspot in various types of cancer. By utilizing CRISPR-Cas9, we generated cell lines with this specific mutation and performed MeRIP-Seq analysis. Our findings revealed that the canonical m6A modification motif, 5'-AC-3', was altered to 5'-AU-3'. The m6A modification at the 5'-AU-3' motif appeared to have a minimal direct impact on gene expression, as it did not bind to reader proteins. However, we discovered that gene expression regulation occurred due to the modification of adjacent motifs when the aberrant motif was m6A-modified.

研究分野：基礎医学

キーワード：RNA METTL14 c-MET c-MYC

1. 研究開始当初の背景

RNA は転写後に様々な修飾を受け、その運命が制御される。これらの修飾の一つに、哺乳類の mRNA に豊富に存在する N6-methyladenosine (m6A) がある。抗 m6A 抗体を用いた RNA 免疫沈降と次世代シーケンサーの組み合わせにより、全トランスクリプトームにおける包括的な m6A 修飾サイトの検出が可能となった (MeRIP-Seq)。これらの研究により m6A は mRNA の 1/3 を修飾する幅広い現象であることや、終始コドン近傍に修飾が起きることが明らかとなった。m6A 修飾の最も確立された機能は mRNA の安定性の制御である。m6A 修飾は、細胞増殖、免疫ホメオスタシス、幹細胞分化、有糸分裂、性決定など、多様な生理機構に影響を及ぼす。さらに、異常な m6A 修飾は、ガンを含む多数の疾患の発症と進行に関与していることが示されている。

m6A の修飾レベルは「Writer」と「Eraser」と呼ばれるいくつかのタンパク質によって動的に調節される。さらに m6A 修飾は「Reader」タンパク質を介して効果を発揮する。典型的な Writer 複合体には、METTL3 と METTL14 が含まれており、この中で METTL3 が主要な RNA メチルトランスフェラーゼである。一方、最近の構造研究により、METTL14 が RNA 結合に関与し、METTL3 を支援していることが示された。Writer 複合体は、特徴的な配列モチーフ内の adenosine をメチル化する。興味深いことに、モチーフは種によって微妙な差があるものの、3'側は常に Cytosine である。例えば、代表的なモチーフは、人間では [G/A][G/A]ACU (=RRACU) または GGACU、マウスでは [G/A][G/A]AC[A/C/U] (=DRACH)、ショウジョウバエやアラビドプシスでは [G/A][G/A]AC[A/C/U] (=RRACH) と報告されている。さらに、m6A 修飾は、最大で 15 の m6A 残基を含む数百ヌクレオチドのクラスターに見られる。しかし、METTL14 によるターゲット認識とその生物学的役割のメカニズムは、大部分が未解明である。

一方で、さまざまな癌種のゲノムを網羅的に解析することにより、METTL14 の高度に保存されたアミノ酸残基である「R298」に変異のホットスポットが発見された。METTL14 R298P 変異は主に子宮内膜がんの患者で見つかり、R298C と R298H の変異は複数の固形腫瘍に存在した。これは R298 が METTL14 の機能において重要な役割を果たしており、その変異が METTL14 の機能に影響を与えている可能性を示唆する。実際、METTL3-METTL14 ヘテロダイマーの間には RNA が結合する溝が存在することが分かっているが、R298 はちょうどその溝に面した位置に存在し、RNA 認識において何らかの重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、以前の研究では、子宮内膜がん細胞での METTL14 R298P は m6A 量を低下させるものの、m6A 修飾モチーフの変化を引き起こさないと報告されていた。

2. 研究の目的

METTL14 R298P 変異に着目し、変異が m6A 修飾および癌細胞の増殖に与える影響を明らかにすること。またその変異がどのように遺伝子発現に影響を与えているのか明らかにすること。

3. 研究の方法

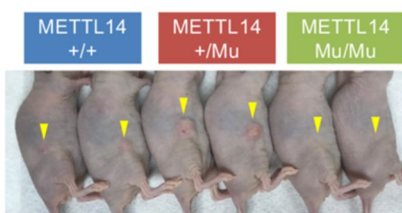
CRISPR-Cas9 を用いて、METTL14 R298P 変異をノックインした細胞株を樹立した。細胞株は METTL14^{WT/WT}、METTL14^{WT/Mu}、METTL14^{Mu/Mu} の 3 種類の接合状態について、それぞれ複数クローンが樹立された (Mu = R298P 変異)。樹立されたクローンを用いて *in vitro*、*in vivo* で細胞増殖を評価した。また MeRIP-Seq、RNA-seq およびバイオインフォマティクス解析により、m6A 修飾を受ける位置について解析を行った。

4. 研究成果

(1) METTL14^{WT/Mu} は癌を促進するが、METTL14^{Mu/Mu} は癌を抑制する

ICGC データベースを用いた解析によると、METTL14 R298P 変異は癌患者において METTL14^{WT/Mu} の状態で存在していると考えられた。実際我々のノックイン細胞株においても、METTL14^{WT/Mu} は癌細胞の増殖を促進した。一方で意外なことに、METTL14^{Mu/Mu} は癌細胞の増殖を抑制することが明らかになった。この知見は *in vivo* (図 1) でも *in vitro* でも共通していた (図 1)。すなわち癌細胞の増殖に対して、METTL14 R298P 変異はヘテロ接合性とホモ接合性で全く逆の効果を持つことが明らかになった。

図 1 METTL14^{WT/Mu} は癌を促進するが METTL14^{Mu/Mu} は癌を抑制する (*in vivo*)



(2) METTL14^{WT/Mu} は m6A 修飾量を低下させ、METTL14^{Mu/Mu} はさらに m6A 修飾量を低下させる

既報によると METTL14 R298P 変異は m6A 量を低下させると報告されていたため、我々はノックイン細胞株の m6A を質量分析で解析した。その結果、METTL14^{WT/Mu} は m6A 修飾量を低下させ、METTL14^{Mu/Mu} はさらに m6A 修飾量を低下させるということが明らかになった(図 2)。

これらの結果より、METTL14^{WT/Mu} と METTL14^{Mu/Mu} は細胞増殖の点では逆の効果を持つが、m6A 量の点では同じ方向の効果を持つことが明らかになった。

(3) METTL14 R298P 変異は m6A モチーフを変化させる

我々は、METTL14 R298P 変異が m6A 修飾に与える影響は、単にその量が低下するというだけではなく、m6A の位置にも変化を与えるのではないかと仮説を立てた。そこで我々は、MeRIP-Seq 解析を行った。その結果、METTL14^{WT/WT}、METTL14^{WT/Mu}、METTL14^{Mu/Mu} のいずれにおいても、修飾されている遺伝子はオーバーラップしており変化していなかった。また、修飾される位置も終始コドン周囲で変化していないということを確認した。

我々は m6A 修飾の位置をさらに詳細に調べるために、モチーフ解析を行った。その結果、METTL14^{WT/WT}、METTL14^{WT/Mu} は既報の通り 5' -AC-3' を含むモチーフが検出された。しかし METTL14^{Mu/Mu} は 5' -A[C/U]-3' を含むモチーフが検出された(図 3)。この結果は、METTL14 R298P 変異が単に m6A の量だけではなく m6A の位置に影響を与えること、さらに R298 は m6A 修飾を正確なモチーフに書き込むために重要な役割を果たしていることを示す。

(4) METTL14 R298P 変異は、oncogene の発現に複雑な影響を与える

METTL14 R298P 変異が癌細胞の増殖に与える影響を調べるため、RNA-seq 解析および GSEA 解析を行った。その結果、METTL14^{WT/Mu} は cell cycle が亢進しており、かつ c-Myc のターゲット遺伝子の発現が亢進していた。一方で METTL14^{Mu/Mu} は cell cycle が低下しており、同時に c-Myc のターゲット遺伝子の発現が低下していた。一方で c-Myc の mRNA の分解速度は METTL14^{WT/Mu} と METTL14^{Mu/Mu} で変化しておらず、どちらも分解速度が低下していた。さらに c-Myc の上流にあたる c-MET の発現に着目したところ、METTL14^{WT/Mu} は野生型と同程度だが、METTL14^{Mu/Mu} でのみ c-MET の発現が低下していた。

(5) 異常なモチーフに存在する m6A 修飾が遺伝子発現に与える影響

我々は、(3)で認められた異常なモチーフに書き込まれた m6A 修飾が遺伝子発現に対してどのような影響を与えるのか調べた。その結果、異常なモチーフ(5' -AU-3')に書き込まれた m6A 修飾は、遺伝子発現に影響を与えていないことが明らかになった。しかし「m6A 修飾が正常なモチーフに起こりうる部位」が異常なモチーフ(5' -AU-3')の近隣にあるときには、遺伝子発現を抑制することが判明した。さらに我々は、異常なモチーフ(5' -AU-3')には Reader タンパク質の結合が低下することを EMSA assay で確認した。

一般的に、m6A 修飾は Reader タンパク質が結合することによって RNA の分解を促進する役割を持つ。したがって「異常なモチーフ(5' -AU-3')における m6A 修飾には Reader タンパク質の結合が低下し、かつ実際に遺伝子発現にも影響を与えてない」というのは一貫した結果である。一方で異常なモチーフと正常なモチーフが協調して効果を持つというのは意外な結果と言える。既報において m6A 修飾は近い範囲に連続して観察されることが知られている。今回はおそらく異常なモチーフにリクルートされた Writer タンパク質が近隣の正常モチーフにおいても m6A 修飾を行ったのではないかと考えられた。

(6) METTL14^{Mu/Mu} において c-MET mRNA は異常モチーフにおいて m6A 修飾され、さらに近接する正常モチーフにおいても m6A 修飾を受けている

最後に我々は、METTL14^{Mu/Mu} でのみ c-MET の発現が低下していたメカニズムを詳細に検討した。MeRIP-Seq の解析によると、METTL14^{Mu/Mu} では終始コドン周囲に METTL14^{WT/WT} よりも m6A 修飾が亢進している領域があることが分かった。この部位では、異常モチーフにおける m6A 修飾と、正常なモチーフにおける m6A 修飾の双方が亢進していることが SELECT assay で確認された。したがって METTL14^{Mu/Mu} で観察された細胞増殖の低下(c-Met およびその下流の c-Myc の低下)は、異常モチーフおよび正常モチーフにおける m6A 修飾の協調効果が一因であると考えられた。

図 2 METTL14 R298P 変異は m6A 量を低下させる

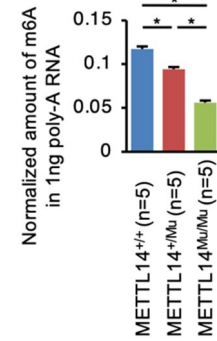
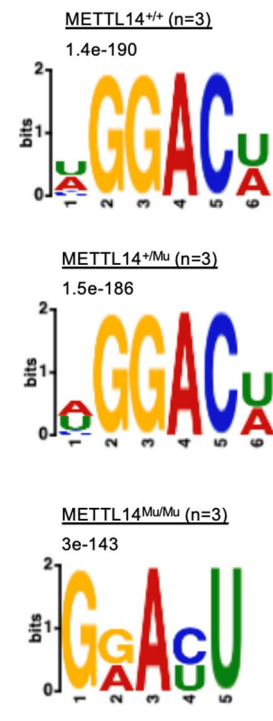


図 3 METTL14 R298P 変異は m6A モチーフを変化させる



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Kotaro Miyake, Pedro Henrique Costa Cruz, Izumi Nagatomo, Yuki Kato, Daisuke Motooka, Shingo Satoh, Yuichi Adachi, Yoshito Takeda, Yukio Kawahara, Atsushi Kumanogoh. A cancer-associated METTL14 mutation induces aberrant m6A modification affecting tumor growth. Cell Reports. (2023, in press, 2023/5/18時点)

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------