

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19141

研究課題名(和文)脊椎動物特異的なmRNA始端修飾の研究

研究課題名(英文)Research for an mRNA modification specific to vertebrates

研究代表者

鈴木 健夫 (Suzuki, Takeo)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師

研究者番号：90533125

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、mRNA修飾の一種である始端m6Aメチル化酵素の同定に端を発する、始端m6Aに関連する機能的意義の解明を目指した。まず始端m6Aメチル化活性を持つ酵素の特定に成功し、酵素が基質mRNAを識別するために必要な構造的特徴を見出した。メチル化酵素の結晶構造解析で得られた知見を基に、mRNAとの相互作用様式や活性に重要な残基を特定した。また、メチル化酵素の遺伝子ノックアウト細胞株における酸化ストレス感受性を見出し、始端m6A修飾が、始端m6Aを持つmRNAの翻訳効率を増強させる性質を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1970年代における始端m6Aの発見以降、生合成や機能が不明なまま約40年が経過していたが、今回、始端m6A修飾の生合成機構や機能的意義の解明にはじめて成功した。始端m6A修飾は我々ヒトを含む脊椎動物で主に見いだされる、生物種分布が特徴的な修飾である。脊椎動物の生物種としての特徴を深く理解する上でも、始端m6A形成メカニズムの解明は一定の意義があると言えるだろう。

研究成果の概要(英文):We aimed to elucidate the function of the 5'-terminal N6-methyladenosine (1st-m6A) modification which is found only in vertebrates at the 5'-terminus of mRNA. We successfully identified the gene for the methyltransferase (MTase) for 1st-m6A, confirmed enzymatic methylation activity of the gene product in vitro and determined structural features of mRNA which can accept a N6-methyl group to the 1st-adenosine. Crystal structures of the MTase revealed amino acid residues which are essential to the MTase activity and recognition of substrate mRNA. Knocking out of the MTase gene in cultured cells showed the sensitivity to the oxidative stress. Furthermore, deep-sequencing analyses revealed that 1st-m6A modification contributes to enhance translation efficiency of mRNAs harboring 1st-m6A.

研究分野：分子生物学

キーワード：mRNA メチル化 脊椎動物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

RNA は化学修飾などの転写後プロセッシングを経て初めて機能的に成熟する。真核生物では DNA から転写された mRNA 前駆体がプロセッシングを受ける結果、5'末端に 7-メチルグアノシン ( $m^7G$ )修飾を含むキャップ構造が形成される。キャップ構造の形成は多段階の酵素反応により進み、特に脊椎動物において mRNA の 1 番目がアデノシン(A)であると A の  $N^6$  位がメチル化を受け  $N^6$ -メチルアデノシン( $m^6A$ )となり、始端  $m^6A$  が形成される。 $m^7G$ -キャップ部分構造の機能的な重要性と比べ、始端  $m^6A$  の存在は脊椎動物のみと狭い範囲の生物種に限られるため、修飾酵素や修飾の機能は知られていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト(脊椎動物)でのみ特異的に見出される、mRNA 転写開始点修飾である始端  $m^6A$  のメチル化酵素および始端  $m^6A$  修飾の機能的意義の解明を目指した。

脊椎動物にのみ存在する始端  $m^6A$  の役割は、脊椎動物が持つ独特な生体システムの成立に関わるはずと考えられるため、始端  $m^6A$  修飾酵素および被修飾 mRNA に関する生化学的性質の理解や、修飾遺伝子を改変した培養細胞を樹立しての生理的機能の探索といった、分子~細胞、また将来的には動物モデルによる個体レベルでの解析を展開し、始端  $m^6A$  の意義解明を目指す。

### 3. 研究の方法

ヒト培養細胞を対象に始端  $m^6A$  メチル化酵素(cap-specific adenosine- $N^6$ -methyltransferase, CAPAM)の候補遺伝子を同定したことから、組み換え CAPAM を取得し、その活性により始端  $m^6A$  メチル化酵素であることを証明する。CAPAM 自体や基質 mRNA 認識に関する生化学的性質の理解を深める。また、CAPAM 遺伝子を改変(遺伝子ノックアウト, KO)した培養細胞を樹立して野生型(WT)培養細胞との比較による生理的機能の探索を行う。WT と KO における遺伝子発現パターンや翻訳動態への影響を、大規模シーケンス解析により探索する。

### 4. 研究成果

始端  $m^6A$  の修飾酵素 CAPAM の候補遺伝子同定について概説する。ヒトの機能未知メチル基転移酵素の遺伝子を公共データベースから抽出し、始端  $m^6A$  を持たないモデル生物種である酵母においてオーソログを持たない遺伝子をリストアップした。CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムによって各遺伝子を KO した HEK293T 培養細胞株から調製した mRNA のヌクレアーゼ分解物から始端  $m^6A$  が消失するかを LC/MS により測定した。このような絞り込みによる候補以外にも様々な遺伝子の KO 細胞株を作成し、うち 1 つの KO 株について始端  $m^6A$  が消失したことから、この消失に関与した遺伝子を CAPAM の候補とした。そこで CAPAM 遺伝子をクローニングし、組み換え CAPAM を得た。試験管内転写で作成した mRNA に S-アデノシルメチオニン(SAM)と CAPAM を共存させることで *in vitro* における mRNA の始端  $m^6A$  形成が確認されたことから、CAPAM 活性の直接的な証明に成功した。更に  $^{14}C$ -SAM を用いたアッセイ系の構築により CAPAM の SAM に対する速度論的解析を実施し、基本パラメーターである  $K_m$  (約 30  $\mu M$ )と  $V_{max}$  (約 5 nM/sec)を得た。

CAPAM の *in vitro* メチル化アッセイ系を駆使することで、基質 mRNA の認識について、(a)  $m^7G$ -キャップ構造が必要 (b) 始端 A における 2'-O-メチル基が基質親和性を高めることで( $K_m$  約 4  $\mu M$ )、始端  $m^6A$  化を促進 (c) 基質 mRNA となるには 6 ヌクレオチド長が必要 (d) 2 番目以降の塩基配列依存性は低い といった特徴を見出した。

共同研究により、ヒトおよびゼブラフィッシュ CAPAM の結晶構造解析を試みた。本紙において結果を概説すると (a) 基質 mRNA との共結晶構造解析に成功 (b) 始端 A 部分と CAPAM の結合様式は捉えられなかったものの (c) CAPAM と  $m^7G$  キャップ部分の結合様式が明らかになった (d) 既存の構造ドメインと類似性がない、新規ヘリカルドメインが存在する

これらの構造的な知見を元に、 $m^7G$  キャップ結合部位や触媒活性部位等の保存アミノ酸残基について変異体解析を行い、始端  $m^6A$  形成に重要なアミノ酸残基を複数特定した。

CAPAM には RNA ポリメラーゼ II(RNAPII)の C 末ドメイン(CTD)と相互作用する性質が知られる WW ドメインが存在する。共同研究により、翻訳後修飾を導入した CTD ペプチドと WW ドメインとの結合を評価した。その結果、CTD 配列の 5 番目のセリンがリン酸化(pS5)されたペプチドに特異的に結合する性質を見出した。pS5 は RNAPII が転写伸長の初期ステージにあることを示す翻訳後修飾である。

以上の知見を総合すると、CAPAM は転写伸長初期ステージにおいて WW ドメインと CTD の相互作用を介して RNAPII にリクルートされ、 $m^7G$  キャップや始端 2'-O-メチル基が導入された後に始端  $m^6A$  を導入するという、転写の進行と連動した階層的なキャップ構造の構築メカニズムが強く示唆された。

CAPAM を同定する過程において CAPAM KO 細胞を樹立したため、KO 細胞における細胞の性質の変化を探索した。細胞培養中に種々のストレス刺激(栄養飢餓・熱ショック・酸化ストレスなど)を負荷しながら、細胞の生育をレサズリンの還元を指標に評価したところ、過酸化水素による酸化ストレス刺激下において KO 細胞株の生育速度低下が見出された。

最後に、培養細胞の WT と CAPAM KO 細胞における遺伝子発現プロファイルの比較のため RNA-seq を行い、また翻訳スナップショットの比較のためリボソームプロファイリングを行った。各細胞から、それぞれの解析に必要な cDNA ライブラリを作成し、大規模シーケンスにより cDNA のリードを得て、解析を進めた。

RNA-seq において、リファレンスになる mRNA 配列に貼りついたリードの数が mRNA の定常状態量を表す。リファレンス mRNA の 5'末端塩基を始端 m<sup>6</sup>A, A, G, C, U に分類して WT と CAPAM KO の間の定常状態量を比較したところ、始端塩基の種類によらず有意な変化は見られなかった。このことは始端 m<sup>6</sup>A 修飾が mRNA の転写量や安定性に影響しないことを示唆している。一方、リボソームプロファイリングの解析で、先の RNA-seq で得られた各 mRNA の定常状態量あたりの貼りつきリード数で表される翻訳効率(translation efficiency, TE)を算出した。始端塩基の分類で TE を比較したところ、始端 m<sup>6</sup>A を持つ mRNA において、CAPAM KO における TE の低下が観察された。つまり、始端 m<sup>6</sup>A を持つ mRNA は、始端 m<sup>6</sup>A 修飾によりその mRNA の翻訳効率を高める効果を持つことが判明した。

真核生物 mRNA の配列内の A が m<sup>6</sup>A 修飾され(内部 m<sup>6</sup>A)、内部 m<sup>6</sup>A 修飾酵素・m<sup>6</sup>A 脱メチル化酵素・m<sup>6</sup>A 結合タンパク質の相互関係が遺伝子発現制御に重要な役割を果たすという近年の発見を基に、RNA 修飾機能の理解を深めようというエピトランスクリプトミクス概念が広がっている。始端 m<sup>6</sup>A はその中でも主に脊椎動物で見いだされる生物種分布特異的な構造であり、1970 年代における始端 m<sup>6</sup>A の発見以降、生合成や機能が不明なまま約 40 年が経過していた。本研究における CAPAM 遺伝子の発見・同定・生化学的解析、構造解析、大規模シーケンスによるオミクス解析に至るまで、要所々々で共同研究者にも恵まれ、分子から細胞レベルにおける始端 m<sup>6</sup>A の生合成や機能の解明に成功した。これらの成果を論文に公開して以降、始端 m<sup>6</sup>A による翻訳効率増強のメカニズムについて更なる解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akichika Shinichiro, Hirano Seiichi, Shichino Yuichi, Suzuki Takeo, Nishimasu Hiroshi, Ishitani Ryuichiro, Sugita Ai, Hirose Yutaka, Iwasaki Shintaro, Nureki Osamu, Suzuki Tsutomu	4. 巻 363
2. 論文標題 Cap-specific terminal N6-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eaav0080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aav0080	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akichika, S., Hirano, S., Shichino, Y., Suzuki, T., Nishimasu, H., Ishitani, R., Sugita, A., Hirose, Y., Iwasaki, S., Nureki, O., Suzuki, T.
2. 発表標題 Cap-specific terminal N6-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase
3. 学会等名 21st RNA meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akichika, S., Hirano, S., Shichino, Y., Suzuki, T., Nishimasu, H., Ishitani, R., Sugita, A., Hirose, Y., Iwasaki, S., Nureki, O., Suzuki, T.
2. 発表標題 Cap-specific terminal N6-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase
3. 学会等名 20th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, RNA Neobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院工学系研究科 プレスリリース  
[https://www.t.u-tokyo.ac.jp/soe/press/setnws\\_201811270918295542170205.html](https://www.t.u-tokyo.ac.jp/soe/press/setnws_201811270918295542170205.html)

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