

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02850

研究課題名（和文）抗ウイルス活性を指向したRNA修飾の人為的制御

研究課題名（英文）Control of RNA modification aimed at antiviral activities

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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、ウイルスの感染過程においてRNAのメチル化が関わることが明らかになりつつあり、メチル化を制御する酵素の選択的作用薬や、配列選択的にメチル化状態を制御する方法が求められている。また、ウイルスゲノムのRNAメチル化機構に関する知見も不足している。本研究では、独自のスクリーニングシステムを用いて、脱メチル化酵素FTOの選択的阻害剤候補を見出した。またRNAメチル化酵素がRNAの非標準構造を認識することを発見し、バイオインフォマティクス解析から示唆されていたウイルスゲノムにおけるRNA非標準構造とRNAメチル化との関係性を実験的に支持する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ウイルスの感染過程でRNAのメチル化が関わることが示唆されているため、本研究で見出した新規な骨格および阻害様式をもつ脱メチル化酵素阻害剤によってRNAのメチル化状態を変化させることは、新しい抗ウイルス薬開発の基盤となることが期待される。また、ウイルスゲノムにおけるRNA非標準構造とRNAメチル化との関係性を実験的に支持する結果を得たことから、抗ウイルスのための新たな方向性を提起できたといえる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has become clear that RNA methylation is involved in the viral infection process, thus selective compounds or molecules that regulate methylation are expected to be useful against viral infection. In addition, knowledge on the mechanism of RNA methylation of viral genomes is also lacking. In this study, we used an original screening system to find selective inhibitor candidates for an N6-methyladenosine demethylase, FTO. We also found that RNA methyltransferases recognize RNA nonstandard structures, providing experimental support for the relationship between RNA nonstandard structures and RNA methylation in viral genomes that had been suggested by bioinformatics analysis.

研究分野：生物分子化学

キーワード：RNAメチル化 脱メチル化酵素 非標準核酸構造 エピトランスクリプトーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

N6メチルアデノシン (m6A) は mRNA の多くで見られる転写後修飾で、発生やガン化など細胞の運命を決定する重要なエピトランスクリプトミック修飾として注目されている。さらに、m6A は HIV、インフルエンザウイルス、C 型肝炎ウイルス、ジカウイルスなどウイルスゲノム RNA においても見られ、RNA ウイルスの感染や複製過程を制御していることが研究開始当初明らかになってきた (*PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006188)。例えば、宿主細胞の RNA メチル化酵素のサイレンシングによって HIV-1 の複製が 60%以上減少し、逆に脱メチル化酵素のサイレンシングにより 10 倍近く増加する (*Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16011)。一方、C 型肝炎ウイルスやジカウイルスでは、m6A が抑制的に働く (*Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 654)。これらの現象は、RNA メチル化調節酵素の阻害薬がウイルスのライフサイクルに影響を与える可能性を強く示唆していると考えられた。しかしながら、RNA メチル化調節酵素の活性評価が、HPLC を用いたスループット性の低い方法もしくは、放射性標識メチル基を指標とした方法に頼っており、既存の方法では、効率よく RNA メチル化調節酵素選択的な阻害剤探索を行うことが困難であり、報告例はほとんどなかった。一方、研究代表者は、研究開始直前に大腸菌由来の RNA 切断酵素が m6A 感受性であることを見出し、RNA のメチル化状態を簡便迅速に検出する方法を開発しており (*Chem. Commun.* **2017**, *53*, 12930)、この手法を阻害剤探索に活かさないかと考えた。

2. 研究の目的

独自に開発した RNA メチル化調節酵素の簡便な活性評価法を利用して、RNA のメチル化状態を人為的に制御するシステムを構築し、新たな抗ウイルス薬の創薬標的としての“RNA エピトランスクリプトミクス”の可能性を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) RNA メチル化調節酵素活性阻害剤の探索

研究代表者は大腸菌由来の RNA 切断酵素 MazF が RNA の ACA 配列を特異的に切断するが、5'側のアデノシンがメチル化されている(m6A)CA 配列は切断しないことを研究開始までに見出していた。この性質を利用し、(m6A)CA 配列を含み、5'および 3'末端に、それぞれ蛍光基 FAM およびその消光基 BHQ-1 を付加した短い RNA オリゴヌクレオチドプローブをデザインした(図 1)。m6A 脱メチル化酵素 FTO および ALKBH5 によって脱メチル化を受けたプローブは MazF で切断されて蛍光消光が解除される。一方、これらの酵素阻害剤の添加によって脱メチル化が阻害された場合は、MazF による切断は生じず、蛍光強度は低くなる。蛍光強度の抑制を指標に、脱メチル化酵素阻害剤のスクリーニングを行なった。また、ACA 配列を含む同様の RNA プローブは、メチル化酵素によってメチル化されると MazF による切断を受けず蛍光強度が下がる。またメチル化酵素阻害剤存在下ではメチル化が起こらず、MazF によって切断される。蛍光強度の上昇を指標に、メチル化酵素阻害剤のスクリーニングを行った。

また、ヒットした化合物に関して、その酵素選択性を、MazF を用いた FRET アッセイ、および、5mC 抗体を用いた ELISA によって確認した。さらに、酵素阻害様式に関しては、MazF を用いた FRET アッセイ、および、蛍光異方性の測定などにより検討した。

用いた酵素類 (FTO, ALKBH5, METTL3/METTL14) は、代表者等の先行研究に従い、大腸菌で発現させ、His-Trap HP カラムおよび Strep-Trap カラムで 2 段階精製を行った。

(2) 配列選択的に脱メチル化を制御するシステムの構築

ウイルスゲノム中の m6A がウイルスの感染力やホストの免疫応答に関係することからも、特定の アデノシンを狙ってメチル化状態を自在に制御できるシステムは、ウイルスライフサイクルの制御においても有用であると期待される。そこで、RNA 配列選択的に結合する RNA 結合タンパク質 PUF を用いて、PUF と RNA メチル化酵素複合体の必須構成因子である METTL14、もしくは、脱メチル化酵素 FTO との融合タンパク質をコードする遺伝子を含む大腸菌発現プラスミドを作製し、大腸菌内で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにて 2 段階で精製した。PUF としては、UGUAUUAU 配列を標的とする PUFa および、UGGGGUUC 配列を標的とする PUFb を用いた (Shinoda, et al., *Chem. Commun* **56**, 1365 (2020))。また、メチル化酵素複合体構成因子である METTL14 に関しては、触媒活性をもつ METTL3 との相互作用に必要なメチル基転移ドメイン類似配列領域のみ (MTD14d) を用い、RNA 結合を担う RGG リピー

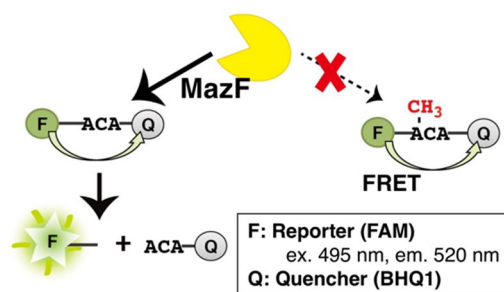


図 1. MazF を利用した非メチル化 (脱メチル化体) アデノシンのハイスループット蛍光検出の原理。ACA 配列選択的一本鎖 RNA 切断酵素 MazF は、(m6A)CA 配列は切断しない。

トドメイン部分を PUF に置き換えた。なお、MTD14d-FTO タンパク質は、酵素活性を持つ METTL3 のメチル基転移ドメイン MTD3 と大腸菌内で共発現させ、*in vitro* での活性測定実験に用いた。

in vitro 条件において、これらの融合タンパク質 FTO-PUF、MTD14d-PUF が、PUF 結合配列近傍のアデノシンのメチル化状態を選択的に制御できることを示すため、PUF 結合配列および非結合配列の近傍に(m6A)CA もしくは ACA を含むオリゴ RNA を用い、脱メチル化もしくはメチル化反応後、サンプルの一部を MazF で処理し、変性ゲル電気泳動にて RNA のメチル化状態を解析した。配列選択性の検討には、FAM もしくは TAMRA でラベルした PUF 結合配列を含むもしくは含まない RNA を共存させ、変性ゲル電気泳動の結果を FAM, TAMRA ラベルされたバンドをそれぞれ検出することによって、同じサンプル中に含まれる 2 種類の RNA のメチル化状態を解析した。

また、細胞内で効率よく標的の RNA を制御する方法として、1 種類の mRNA に対する、複数種類の PUF タンパク質の併用に関して検討した。具体的には、mRNA 不安定化や翻訳抑制を誘発するタンパク質として知られる TTP タンパク質と PUF との融合タンパク質を細胞内で発現させ、種々の PUF の結合配列を 3'UTR に含むレポーターベクターを用いてルシフェラーゼ発光量の抑制を指標に解析した。

(3)RNA 高次構造と RNA メチル化との関連性の検証

ウイルス RNA の高次構造形成領域、特に、グアニン四重鎖(G4)形成 RNA 領域に m6A が存在するというバイオインフォマティクス解析結果が報告されたことから、RNA メチル化制御酵素と RNA 高次構造との関連に関して知見を得ることがエピトランスクリプトームの観点からウイルスの制御を行うためには重要であると考えた。そこで、RNA メチル基転移酵素 METTL3/METTL14 複合体のうち、RNA 結合を担うとされる METTL14 の RNA 結合に関して、ゲルシフトアッセイおよび CD スペクトル測定により検討した。また、G4 形成領域近傍のアデノシンに対するメチル化活性に関して、メチル化反応後にサンプルを MazF で処理し、変性ゲル電気泳動により、その切断パターンを解析し、メチル化量を定量した。

4. 研究成果

(1)RNA メチル化調節酵素活性阻害剤の探索

まず、FTO, ALKBH5, METTL3/METTL14 に対して、MazF を用いたスクリーニング系の Z'ファクターを算出したところ、いずれも 0.6 以上となり、スクリーニング系の妥当性の指標である $Z' = 0.5$ を上回った。内因性化合物ライブラリーおよびアデノシン受容体リガンドライブラリーからスクリーニングを行ったところ、脱メチル化酵素阻害剤としては新規の骨格を持つ化合物数種が FTO 阻害効果を示すものとしてヒットした ($IC_{50} = 1-10 \mu M$)。これらの化合物は、MazF には作用せず、METTL3/METTL14 の活性も阻害しなかった。また、FTO と同じく α -ケトグルタル酸 / Fe(II)依存性ジオキシゲナーゼの一種で、N6 メチルアデノシンを脱メチル化する ALKBH5 や、DNA5 メチルシトシン (5mC) 脱メチル化酵素である TET タンパク質に対しても阻害活性を示さなかったことから、得られた候補化合物は、FTO への選択性が高いと考えられる。また、阻害様式の検討の結果、 IC_{50} 値は α -ケトグルタル酸濃度や Fe(II)イオン濃度の影響を受けないことが明らかになった。また、アデノシンと類似した骨格を持つ化合物であるにもかかわらず、候補化合物は、FTO の RNA への結合は妨げないことも確認できた。一方、 α -ケトグルタル酸 / Fe(II)依存性ジオキシゲナーゼによる酵素反応には、一般に、鉄イオンを還元状態に保つために L-アスコルビン酸が系中に加えられる。アスコルビン酸濃度を変化させたところ、候補化合物の IC_{50} 値が顕著に変化した。このことから、候補化合物とアスコルビン酸との間に競合作用が生じていることが推察された。しかしながら、これまでに、FTO による m6A 脱メチル化反応におけるアスコルビン酸の役割に関する知見がない。そこで、FTO に対する L-アスコルビン酸の寄与に関する知見を得ることが先決だと考えた。その結果、アスコルビン酸は ALKBH5 による m6A の脱メチル化には必須ではないが、FTO による m6A の脱メチル化反応には必須であること、アスコルビン酸以外の代表的な還元剤では代替できないこと、そしてアスコルビン酸は FTO に直接結合するという事を見出した。今回得られた FTO 阻害剤候補化合物を足がかりとして、既知の FTO 阻害剤とは全く別の機構で作用する FTO 阻害剤 / 活性化剤の開発につながる知見が得られたと考えている。

(2) 配列選択的に脱メチル化を制御するシステムの構築

FTO-PUFa は、野生型 FTO が脱メチル化活性をほとんど示さない 100 nM といった低濃度においても、PUFa 結合配列近傍に存在する m6A を脱メチル化することが示された。また、PUFa 結合配列と m6A とのスペーサーの長さを 2-10ヌクレオチドまで変化させたが、脱メチル化量は同程度であった。一方、PUFa 結合配列中に m6A が存在する場合、FTO-PUFa は RNA に結合するにもかかわらず、脱メチル化はほとんど生じなかった。この結果は、PUFa が RNA に結合した上で、その近傍に存在する m6A が脱メチル化を受けていることを示していると考えられる。また、標的配列選択性を検証するために、PUFa あるいは PUFb 結合配列近傍に m6A が存在する RNA[Am]および RNA[Bm]が共存する条件において PUFa-FTO を作用させたところ、RNA[Am]のみが脱メチル化を受けた。また同様に、PUFb-FTO は RNA[Bm]のみを脱メチル化

した。これらの性質は、過剰量の HeLa 細胞由来のトータル RNA が存在する条件においても維持されていた。FTO と PUF の融合タンパク質は、PUF の結合配列に依存した脱メチル化活性を示すことが示唆された。一方、メチル化の制御においても同様に、MTD14d-PUFa, MTD14d-PUFb はそれぞれ、PUFa および PUFb 結合配列近傍のメチル化コンセンサス配列中のアデノシンを選択的にメチル化した。

また、細胞内でより効率よく目的の RNA を標的化するための方法を検討するために、標的とする mRNA の 3'UTR に結合する PUF を複数デザインしそれぞれに標的遺伝子の発現を抑制する TPP タンパク質を融合させた。一種類の PUF を用いる場合と、4 種類の PUF を併用する場合での効果を検討したところ、4 種類の PUF を併用した場合は、単体では効果が検出されない少量のトランスフェクション量で、相乗的な遺伝子抑制効果を認めた。PUF による RNA の代謝制御に展開する上で重要な情報を与える結果である。

(3)RNA 高次構造と RNA メチル化との関連性の検証

METTL14 の G4 形成 RNA への結合能と、METTL14 の RNA 結合が RNA メチル化に及ぼす影響を検討した。ゲルシフトアッセイの結果、METTL14 は G4 構造を安定化するカリウムイオン存在下で、G4 RNA に高い親和性で結合した。また G4 構造を形成しないリチウムイオン存在下では、親和性が低下し、また G4 非形成配列を持つ RNA と比べてほぼ同程度の結合性を示した。また変異体を用いたゲルシフトアッセイの結果から、G4RNA への結合は、METTL14 に存在するアルギニンとグリシンに富んだ RGG リピート領域を介して生じることが明らかになった。また、m6A 感受性 RNA 切断酵素 MazF を用いた *in vitro* における RNA メチル化解析から、夾雑 RNA が過剰に存在する条件においても、METTL3/14 は G4 RNA を特異的にメチル化した。ウイルスゲノムにおけるグアニン四重鎖構造形成配列と m6A との関係性を支持する実験結果であり、グアニン四重鎖構造のウイルス感染における新たな役割を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshida Atsuhiko, Oyoshi Takanori, Suda Akiyo, Futaki Shiroh, Imanishi Miki	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 Research	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 -

1. 著者名 Sugimoto Misaki, Suda Akiyo, Futaki Shiroh, Imanishi Miki	4. 巻 10
2. 論文標題 Effective RNA Regulation by Combination of Multiple Programmable RNA-Binding Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 6803 ~ 6803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app10196803	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 Shinoda Kouki, Suda Akiyo, Otonari Kenko, Futaki Shiroh, Imanishi Miki	4. 巻 56
2. 論文標題 Programmable RNA methylation and demethylation using PUF RNA binding proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 1365 ~ 1368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9cc09298f	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18件（うち招待講演 6件／うち国際学会 4件）

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 田中 和無為、今西 未来、二木 史朗
2. 発表標題 RNA脱メチル化酵素FTO特異的な阻害剤のスクリーニング
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 Miki Imanishi
2. 発表標題 Targeted RNA methylation and demethylation using artificial RNA binding proteins
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenko Otonari, Kouki Shinoda, Miki Imanishi, Shiroh Futaki
2. 発表標題 Targeted RNA demethylation using sequence-specific RNA binding proteins
3. 学会等名 FIBER日本核酸化学会若手フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miki Imanishi, Atsuhiko Yoshida, Takanori Oyoshi, Akiyo Suda, Shiroh Futaki
2. 発表標題 G-quadruplex specific binding of an RNA methyltransferase, METTL14
3. 学会等名 FIBER日本核酸化学会若手フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 核酸メチル化修飾の検出と操作
3. 学会等名 大阪市立大学大学院工学研究科BMEC第9回セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 エピトランスクリプトームを制御する人工タンパク質の創製
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 エピトランスクリプトームを制御するテラーメイドタンパク質
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今西 未来・篠田 昂樹・須田 明代・二木 史朗
2. 発表標題 配列選択的RNA結合タンパク質を用いたRNAメチル化状態の配列特異的制御
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 Targeted RNA methylation and demethylation using artificial RNA binding proteins
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 音成兼光・篠田昂樹・今西未来・二木史朗
2. 発表標題 人工RNA結合タンパク質を用いた修飾RNAの配列特異的な脱メチル化
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田敦裕・今西未来・二木史朗
2. 発表標題 グアニン四重鎖構造を介した特異的RNAメチル化機構に関する研究
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 音成兼光・篠田昂樹・今西未来・二木史朗
2. 発表標題 配列特異的RNA結合タンパク質を利用したRNA脱メチル化反応の標的化
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 RNAを標的とした遺伝子発現操作
3. 学会等名 第22回生命化学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Imanishi, Akiyo Suda, Shiroh Futaki
2. 発表標題 A simple screening system for inhibitors of m6A-regulatory enzymes
3. 学会等名 RNA2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Imanishi
2. 発表標題 A simple screening system for inhibitors of m6A-regulatory enzymes
3. 学会等名 10th Joint RSC-CSJ Symposium: Chemistry for Complex Biological Systems（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 N6-メチルアデノシン調節酵素活性の簡便な検出法の開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Imanishi, Kouki Shinoda, Akiyo Suda, Shiroh Futaki
2. 発表標題 Programmable RNA methylation and demethylation using PUF RNA binding proteins
3. 学会等名 The 3rd IRCCS - The 2nd Reaction Infography Joint International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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