

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22379

研究課題名（和文）RNA 5'末端の構造的多様性と機能の研究

研究課題名（英文）Investigation of structural diversity and function of 5' terminal structures of RNA

研究代表者

大平 高之（Ohira, Takayuki）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：90727520

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、RNAの5'末端および末端領域の遺伝子発現制御における重要性について新たな知見を得ることを目的とし、様々な5'末端構造を持つRNAをそれぞれ特異的に分離し解析する手法を確立すること、さらには新規の5'末端構造を見出すことを目指した。これまでに本目的に適したRNAサンプルの調製法や有効なツールとなる抗体や脱キャップ酵素の選定を行った。また真核生物由来のRNAの解析の過程で新規の末端構造を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、私たちは様々なRNAの5'末端構造を解析するための精製方法や効率的なサンプルの調製方法を考案し実践するなどRNAの5'末端構造の解析技術の基盤づくりに注力した。従って、本研究を通じて得られた知見や解析手法は今後のRNAの5'末端構造に関する研究に貢献すると期待される。また、本研究では新規の5'末端構造を有するRNAの特定に成功した。本成果はRNAの5'末端構造は従来考えられていたよりも様々な状態を取りうること、5'末端構造は複雑な制御を受ける遺伝子発現における重要な調節領域である可能性を示唆するなど学術的に興味深い知見を提供した。

研究成果の概要（英文）：This study is aimed to develop a method for analyzing RNA with various 5' terminal structures respectively and investigate novel 5' terminal structures for further understanding the biological importance of 5' terminal structure of RNA in precise gene expression. We verified the procedure of RNA preparation and purification having various 5' terminal structures, respectively. In addition, we discovered RNA having a novel 5' terminal structure in eukaryotic cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA 5'末端構造 5' cap修飾 遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の RNA の 5'末端および 1 塩基目から数塩基目には、メチル化グアノシンキャップやリボースや塩基のメチル化修飾といった 5' cap 修飾が施されている。これら 5' cap 修飾は RNA の分解からの保護やキャップ結合タンパク質との相互作用を介してタンパク質合成の開始、RNA の局在化や成熟、RNA ウィルスとの識別に関わるなど遺伝子発現の様々な場面で重要な役割を担っている。また細胞の発生・分化・分裂の過程やストレス条件下では 5' cap 修飾の形成を調節することで遺伝子発現や細胞の性状を変えることが知られ、この調節は修飾酵素の発現量や活性あるいは代謝物の細胞内濃度によって制御されている。また近年、RNA の 5'末端にニコチンアデニンジヌクレオチドが付加した非標準的な 5' cap 修飾の発見や、高等生物において新規のキャップ結合タンパク質や脱キャップ化酵素が複数発見されるなど重要な発見が相次いでいる。これらとは別に私たちは、RNA pol III の転写産物である tRNA 前駆体が 5' cap 修飾されていることを発見した(Ohira and Suzuki, 2016. *Nat. Chem. Biol.*)。さらにごく最近において私たちは新規の 5' cap 修飾 (X cap) を発見した (未発表)。これら事実は、RNA の 5'末端は多様な構造や機能を有しており、生物システムにおける巧妙な遺伝子発現の調節領域として重要な役割を担っていることを強く示唆する。しかし、未だに機能や修飾酵素が不明の 5' cap 修飾も残されているなど RNA 末端の機能や制御に関しては解決すべき課題が多く残されている。

2. 研究の目的

RNA の 5'末端領域は RNA の機能や遺伝子発現を調節する上で重要な制御領域であり、その形成あるいは代謝機構を解明することは分子生物学における基盤原理の理解に繋がる重要な研究課題である。近年の解析から、多くの生物において RNA の 5'末端構造は画一的なものではないこと、また細胞の活動に応じてその構造の制御することによって遺伝子発現が調節されていることが分かってきた。本研究では、RNA の 5'末端構造に基づいた RNA 分画法を確立することを第一の目的とし、最終的には個々の RNA あるいは転写開始点ごとのキャップ修飾率など 5'末端の構造的な不均一性や傾向をトランスクリプトームワイドに明らかにし遺伝子発現との関連性を明らかにすることに挑戦する。さらには新規の 5'末端構造の探索も試みる。新規構造を見出した際には、その構造が RNA の動態や機能に及ぼす影響やその形成に関わるタンパク質を調べるなど種々の解析を通じてその 5'末端構造が有する機能の解明を目指す。

3. 研究の方法

RNA に見られる様々な 5'末端構造に対し、それらの化学構造の違いを利用した化学的あるいは生化学的な処理により特異的に精製または除去する方法を確立する。具体的には抗メチル化グアノシンキャップ抗体の特異性や精製効率の検証や種々の脱キャップ酵素の基質特異性や活性について検証を行う。また、RNA の 5'末端領域以外を分解除去することで 5'末端領域を濃縮した RNA サンプルの調製法を確立する。実験条件の確立にあたり RNA サンプルは 5'末端構造が単純な出芽酵母を用いる。各分離操作が適切に行われていることをノーザンプロットや LC/MS 解析などにより慎重に確認しながら各条件の最適化を目指す。条件が確立され次第、各 RNA 画分について RNA-seq を行い、5'末端構造の分布を明らかにする。新規 5'末端構造の探索については、種々の方法により精製した RNA の 5'末端について LC/MS を用いた詳細な構造解析により行う。特定された新規構造についてはその構造から形成または分解に関わる酵素を推測し、その酵素の遺伝子破壊株や過剰発現株を作成し、その 5'末端構造形成への影響や RNA の動態への影響を調べるといった遺伝学的解析や大腸菌発現系を用いて候補タンパク質を取得し *in vitro* において 5'末端構造形成の再構成を行うなど生化学的解析を行うことでその生合成機構や機能を調べる。

4. 研究成果

RNA 抽出方法と RNA 5'末端領域の濃縮方法の検討と確立

本解析では、まず良質な RNA サンプルの調製方法を確立するため改めて菌体の破碎方法や RNA 抽出方法の検討を行った。全 RNA をゲル電気泳動した時の rRNA のバンドのシャープさを分解の指標としたところ、ビーズを用いた凍結破碎法により細胞を破碎した後に AGPC 法により RNA を抽出する方法が RNA へのダメージが小さいことが分かり、本 RNA 調製方法が本解析に適していると判断した。次に、RNA の 5'末端領域を濃縮した RNA サンプルの調製方法について検討を行った。上述したように本研究では RNA の 5'末端構造に着目しているため、RNA の 5'末端領域以外を除去し 5'末端領域を濃縮した RNA サンプルを用いることは本解析手法の高感度化に繋がると期待される。検討の結果、以下に示す方法を確立した。まず、細胞から抽出した全 RNA を 5'エキソヌクレアーゼ処理することで全 RNA の大半を占める rRNA を分解除去する。次いで、残った RNA を 100~200 塩基程度の長さのものが主となるよう二価カチオンによる断片化処理を施した後、生じた各 RNA 断片の 5'末端にリン酸化酵素でリン酸基を付与し、5'エキソヌクレアーゼの基質となるようにする。再び 5'エキソヌクレアーゼ処理することにより

内部領域に由来する RNA 断片を分解除去し、5'末端を持つ RNA 断片を濃縮する。実際に、本手法によって 5'末端領域が効果的に濃縮されていることを RT-qPCR および RNA-seq により確認した (図 1)。しかしながら、本手法は rRNA などの元々 5'末端がモノリン酸の RNA も分解してしまうため状況に応じて使い分ける必要がある。

抗メチル化グアノシンキャップ抗体の選定

RNA の 5'末端に形成されるメチル化グアノシンキャップはメチル基の数に応じて、モノメチル(m⁷G)、ジメチル(DMG)、そしてトリメチル(TMG)に分けられる。これら構造を特異的に識別する抗体は、RNA の 5'末端構造に基づいた分画を行う際の有効なツールとなる。市販されている抗メチル化グアノシンキャップ抗体には、メチル基の数を特異的に見分けられるものがあるので、実際にこれら抗体の特異性や精製効率を調べ本研究に有用な抗体の選定を行った。具体的には、メチル化グアノシンキャップを持つ RNA と持たない RNA をそれぞれ *in vitro* で転写合成し、これらを混合したバッファー溶液中に抗体および Protein G アガロースを加え反応させた後、抗体結合画分と非結合画分に分画し、それぞれの画分から抽出した RNA をゲル電気泳動により分離し、染色後のキャップを持つ RNA と持たない RNA のバンドの濃さから精製効率や特異性を評価した。

脱キャップ酵素の選定

真核生物には複数の脱キャップ酵素が存在しており、それらの分解活性や基質とする 5'末端構造は様ではないことが知られている。従って、種々の脱キャップ酵素の生化学的特性を明らかにすることは、RNA 5'末端構造の制御機構の理解に繋がる重要な知見であり、本研究において有効なツールとなる酵素の発見に繋がることが期待される重要な試みである。特に X cap に特異的に作用する脱キャップ酵素を見出すことは X cap を持つ RNA の探索に利用できるため優先度は高い。本解析では出芽酵母に存在する複数の脱キャップ酵素を対象とし、それぞれについて出芽酵母 Tet-POP4 株を親株とする遺伝子破壊株を構築し、その欠失による RNA の 5'末端構造の分布への影響を調べた。解析対象として細胞内に多く存在し、かつ私たちの研究において実績のある tRNA 前駆体を選んだ。出芽酵母 Tet-POP4 株は条件的に tRNA の成熟化を阻害でき前駆体を蓄積させられるため解析し易い利点がある。各遺伝子破壊株から単離精製した tRNA 前駆体について LC/MS 解析による 5'末端の構造解析を行った結果、脱キャップ酵素 X の遺伝子破壊株において TMG cap の増加と X cap の減少が確認された (図 2A)。また、脱キャップ酵素 Y の遺伝子破壊株から単離した別の tRNA 前駆体の 5'末端においては X cap を持つ前駆体が 1.3 倍程度と僅かであるが増加していた (図 2B)。その他の遺伝子破壊株では 5'末端構造への影響はほとんど見られなかった。本解析結果は、いくつかの脱キャップ酵素は tRNA 前駆体を基質とするものの多くの脱キャップ酵素は基質とせず別の RNA の脱キャップを行っていること、tRNA 前駆体は複数の脱キャップ酵素が関与する複雑な分解制御を受けている可能性を示唆している。次に、X cap の分解に関わる可能性が示唆された脱キャップ酵素 Y について、出芽酵母以外の生物種におけるホモログ酵素も解析対象に広げ、この酵素ファミリーの基質特異性など生化学的な特性を詳細に調べることにした。大腸菌発現系用にコドン最適化した人工遺伝子を合成し発現ベクターにクローニングした後、大腸菌発現系を用いて各遺伝子の組換え体タンパク質を取得した。次いで、得られた組換え体タンパク質の脱キャップ活性を調べるため、基質として出芽酵母から調製した全 RNA と反応させた後、脱キャップされたかどうか抗メチル化グアノシンキャップ抗体を用いたノースウェスタンにより評価を行った。その結果、どの酵素においても脱キャ

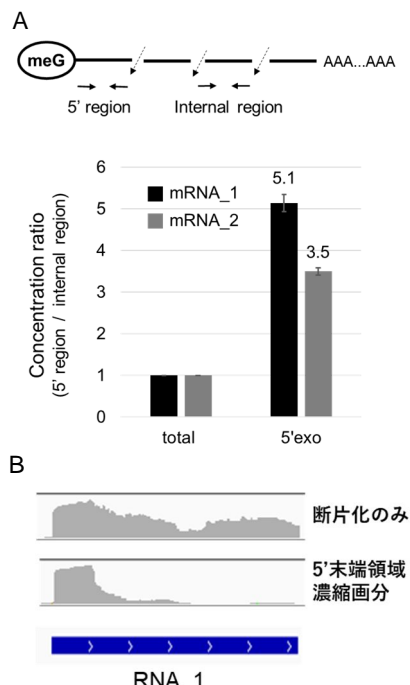


図 1. RT-qPCR (A) または RNA-seq (B) による 5'末端領域の濃縮の確認。(A) 全 RNA 画分 (total) と 5'末端領域濃縮画分 (5'exo) の比較。縦軸は total における 5' region に対する internal region を 1 とした割合を示す。(B) 上段は断片化処理のみのサンプルについて、下段は 5'末端領域濃縮サンプルについて RNA-seq を行い RNA_1 の遺伝子領域にリードをマップした結果。

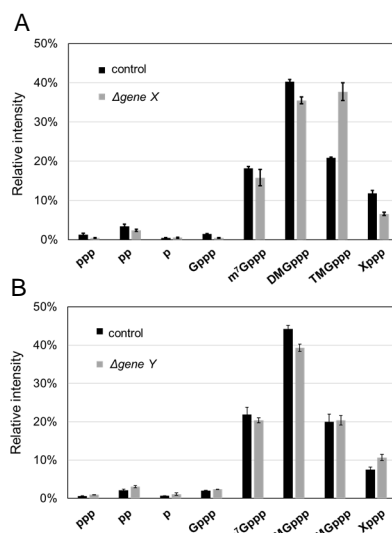


図 2. tRNA 前駆体の 5'末端構造の分布。Tet-POP4 株 (control) と脱キャップ酵素 X (gene X) (A) または Y の遺伝子破壊株 (gene Y) (B) から単離精製した tRNA 前駆体について LC/MS 解析を行い、5'末端構造の分布を示した。縦軸は各 5'末端構造のシグナルの和を 100% としたときの各 5'末端構造の割合を示す。

の基質特異性など生化学的な特性を詳細に調べることにした。大腸菌発現系用にコドン最適化した人工遺伝子を合成し発現ベクターにクローニングした後、大腸菌発現系を用いて各遺伝子の組換え体タンパク質を取得した。次いで、得られた組換え体タンパク質の脱キャップ活性を調べるため、基質として出芽酵母から調製した全 RNA と反応させた後、脱キャップされたかどうか抗メチル化グアノシンキャップ抗体を用いたノースウェスタンにより評価を行った。その結果、どの酵素においても脱キャ

アップ活性が確認されなかった。原因として精製過程で酵素活性が失活してしまった可能性が考えられたため、今後、発現条件や精製条件を改善した上で再度精製しアッセイを行う予定である。また、ノースウェスタンによる検出は感度が低いなどの理由で本実験系の検証に不適切である可能性考えられたのでより高感度な質量分析など別の検出系による評価を行うことを検討している。

新規 RNA 5'末端構造の探索と解析

真核生物由来の全 RNA から調製した RNA の 5'末端構造について LC/MS による構造解析を行った結果、極微量ではあるが一部の RNA において既知の 5'末端構造とは分子量が一致しない末端を持つものが検出され未知のキャップ構造が付加されている可能性が示唆された(図 3 最下段)。詳細な構造解析からこの 5'末端構造は X cap を有しており、X cap 構造との違いは X cap と 1 塩基目を繋ぐリン酸基の数であることが判明した。そこで X cap 付加酵素がこの 5'末端構造の形成に関わるのか調べるため、転写合成した当該 RNA と X cap 付加酵素を *in vitro* において反応させた後、反応物について LC/MS 解析を行った。その結果、この新規の 5'末端構造が形成されることが確認された。また、X cap 付加酵素の発現抑制株においてこの 5'末端構造の形成が阻害されていることが確認された。本研究結果は、X cap 付加酵素が従来の cap 付加酵素よりも基質特異性が広いこと、X cap 付加酵素に類似する酵素は他にも多数存在することから X cap あるいは類似の 5'末端構造は RNA において広く分布している可能性を示唆する。現在、この新規の 5'末端構造の機能や形成機構についてさらに解析を行っている。

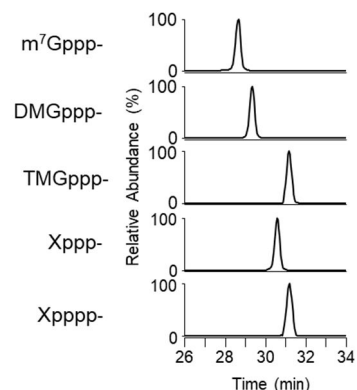


図 3. 真核生物から調製した RNA の 5'末端構造について LC/MS 解析を行った結果。上から m⁷G cap、DMG cap、TMG cap、X cap、および新規の 5'末端構造 (Xpppp-) を有する RNA 断片のマスキロマトグラムを示す。縦軸は各断片の強度を 100% として表す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大平 高之, 菊池 一徳, 中塚 太一, 鈴木 勉
2. 発表標題 出芽酵母におけるpre-tRNA capping の発見と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019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
---------	---------