

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05435

研究課題名(和文)細胞膜透過性阻害剤を利用した局所的RNA脱メチル化反応の解析

研究課題名(英文)Development of the inhibitors to RNA demethylases and its application to monitor local demethylation

研究代表者

藤原 芳江 (Fujiwara, Yoshie)

京都大学・高等研究院・研究員

研究者番号：90423095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RNAの化学修飾による翻訳制御メカニズムは細胞が環境へ迅速に応答することを可能にしている。シナプスに局在するmRNAへ付与された可逆的修飾N6-メチルアデノシン(m6A)の脱メチル化が、刺激に応答した局所的翻訳制御過程で起こるのかどうかを調べるため、本研究では細胞膜透過性の脱メチル化阻害剤の取得を目指した。既知化合物の改良とスクリーニングを試み、改良された阻害剤を取得した。またスクリーニングの過程で脱メチル化酵素ノックアウト細胞株を作成した。神経細胞や切片を使った局所的脱メチル化の解析は将来の課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA修飾は細胞機能の発現と関係し、パターンやバランスが崩れると、疾患の原因になることもある。本研究で開発したFTO特異的阻害剤は、神経細胞のみならず、各種細胞へ利用が可能である。

研究成果の概要(英文)：RNA modification is one of the translational regulation mechanisms which allow cells to respond quickly to stimulations from environment. To study if activity dependent demethylation of reversible m6A modification on mRNAs occurs during local translation at synapse, we planned to obtain the demethylase inhibitor with high cell permeability. We developed FTO inhibitor based on a known compound, and confirmed that it works in cells. On the other hand, we found several compounds which show inhibitory activity by screening, but now, their specificity to two demethylases, FTO and ALKBH5, belonging to the same superfamily is low. Docking simulation suggested key amino acids for further improvement of the inhibitor. At the same time, we prepared FTO-KO and ALKBH5-KO cell lines. Further research is required to examine local demethylation. The FTO inhibitor we developed can be used for the examination of local demethylation in future.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：RNAの脱メチル化 阻害剤 細胞膜透過性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞を構成し機能発現に関わる三大要素、DNA・RNA・タンパク質のうち、RNAの化学修飾が可逆的に制御されることが発見されたのは随分と遅く、約10年前のことである。メッセンジャーRNA(mRNA)の転写後制御の研究は、主要な化学修飾、N<sup>6</sup>-メチルアデノシン(m6A)に関して特に盛んに行われており、タンパク質翻訳調節、RNAの細胞内局在調節、RNAの代謝調節などの広範な細胞機能に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあった。

神経細胞は神経突起を複雑に張り巡らしてネットワークを形成し、多数の神経細胞へ情報を伝達している。特有の長い細胞形態にも関わらず伝達されてきた刺激に素早く応答するメカニズムには、すでにシナプスに局在している mRNA の局所的翻訳が重要な役割をしていることから、mRNA 上の RNA 修飾が局所翻訳調節に寄与していることが期待できる。しかし、シナプスに m6A 修飾を受けた RNA が実際に局在していること、神経機能に関連するタンパク質の mRNA がよく m6A 修飾をうけていることは、所属研究室が明らかにしたばかりで (ref.1)、具体的な制御機構は全く不明であった。一方マウス脳の免疫組織染色や初代培養細胞の免疫染色では、m6A 脱メチル化酵素と m6A 認識タンパク質が神経細胞の突起部に局在していることを観察できていた。

神経細胞では記憶や学習にともなってネットワークの強度が組み変わっていくダイナミックな応答が起こる(シナプス可塑性)。このときシナプスでの局所的翻訳制御に RNA 修飾が関わるのであれば、その方法はすでに準備されている RNA 修飾パターンに基づいてのみ行われるのか、それともオンデマンドで修飾パターンが調節されるのか、両方の機構が関わっているのか、いずれの可能性も考えられた。脱メチル化酵素のノックアウトがマウスの恐怖記憶形成に関係するという報告があることから、本研究では脱メチル化反応に注目した。

### 2. 研究の目的

本研究は、神経細胞が神経突起で受けた刺激への応答過程で、m6A の脱メチル化反応が局所で起こることを介しているのかどうかを調べることを最終目標として設定した。また、解析のために利用するツールの開発も目指した。

脱メチル化は酵素反応であるため、酵素が特定の足場をもたなければ、シナプスで情報伝達を受けた瞬間にターゲットとする m6A の近傍に酵素が分布しているのかわからない。もし刺激に伴ってシナプス周辺で脱メチル化が誘導される場合、どの mRNA のどの m6A がターゲットになり、それをどうやって見出しているのか、脱メチル化酵素は mRNA に対してどのように局在分布しているのか、といった、作用機構についての知見が望まれるが、これらは明らかになっていなかった。そこで脱メチル化酵素の阻害剤を利用して、刺激に応答するシナプスに脱メチル化酵素活性が関与しているかどうかを、まず初めに解析する必要があった。

### 3. 研究の方法

m6A 脱メチル化酵素は FTO と ALKBH5 の 2 種類が知られている。両者は同じスーパーファミリーに属し、活性部位の立体構造が類似している。そのためそれぞれに特異的な阻害剤で細胞透過性が良い化合物を取得し、これらを投与して、神経細胞の形態変化(特にシナプス部位)を観察し解析する計画を立てた。

### 4. 研究成果

#### (1) 特異的な阻害剤取得の試み

多くの研究はヒト由来の FTO や ALKBH5 の組換えタンパク質を用いてスクリーニングされている。本研究ではマウスを使って実験を行いたいため、ヒト由来 FTO と ALKBH5 の結晶構造解析で用いられた領域に相当する部分をクローニングし、組換えタンパク質を精製した。

研究開始時点で FTO の阻害剤がいくつか報告されていた。ヒト由来とマウス由来タンパク質のアミノ酸配列は同一性が高いことから、報告されている化合物はマウスの FTO や ALKBH5 に対しても同様の特異性を示すと期待される。市販で入手できるものを試したところ、meclofenamic acid が論文と同じ方法の in vitro アッセイで FTO への特異性を示すことを再現

できた。阻害剤の開発は通常、in vitro アッセイで化合物をスクリーニングするため、細胞へ投与する場合には、そのままでは細胞膜を透過しづらいことが多い。実際、細胞膜透過性と化合物の水溶性は相反する要素で、重要なポイントである。論文では細胞への投与は meclofenamic acid をエステル化した化合物に変換して行われている (ref.2)。

そこで、既に報告されている化合物を元に発展させた阻害剤を設計すること、と、スクリーニング、の二つの視点から本研究の目的にあう阻害剤を取得することを目指した。スクリーニングは細胞膜透過性があると期待される化合物のライブラリーの利用と、インシリコスクリーニングを実施した。すでに報告されている化合物の改良では、FTO への阻害特異性が高まることが期待された。一方スクリーニングでは、ヒットする確率は低い、これまでよりも膜透過性が高い FTO 阻害剤、および、まだ開発されていない ALKBH5 特異的阻害剤のシードをえられる可能性が考えられた。

前者のアプローチについては、既知化合物の構造を土台にして設計した新規化合物の特異性を調べたところ、FTO への特異性を維持した上で IC<sub>50</sub> が小さくなり、阻害剤としての効果が改良されたものを得ることができた。細胞膜透過性の向上を目的に化合物の一部分をエステル修飾したものを細胞株へ投与したところ、細胞へも実際に作用していることを確認できた。

後者のアプローチについては、検討した中から得られた阻害活性を示す化合物は、FTO への阻害活性の方が ALKBH5 に対する活性よりも強いものがほとんどだった。また、この段階ではどちらかの脱メチル化酵素へ特異的と言えるレベルではなかったが、IC<sub>50</sub> を測定したところ、10<sup>-6</sup> オーダーを期待できるものもあった。脱メチル化酵素との相互作用様式を推定するためにドッキングシミュレーションを行なった。その結果、酵素活性中心に対する位置どりと、活性の傾向を照らし合わせ、今後の改良を進める際に注目するアミノ酸の候補がいくつか示唆された。いずれの成果も共同研究者とともに実施した。

## ( 2 ) FTO-KO 細胞、ALKBH5-KO 細胞の作成

阻害剤の候補となる化合物を見出した後、培養細胞へ投与して mRNA の m6A レベル変化を誘導できるかどうかを評価する必要がある。この時、主として LC-MS/MS が使われているが、核酸を解析対象とする装置が設置されている機会は少ない。m6A は mRNA で最も豊富な修飾であるが、その割合は mRNA の全アデニンの 0.1~0.4% であり、阻害剤処理によるレベル変化を LC-MS/MS に頼らず検出可能にすることを目的に、2 倍体の染色体を持つ細胞株 hTERT-RPE1 を使って(ref.3)、FTO-KO 細胞株および ALKBH5-KO 細胞株を構築した。

## ( 3 ) 神経細胞へ投与するための課題

神経細胞は細胞株よりも DMSO に対して敏感であることが知られており、DMSO の影響がかなり出てしまう恐れがある。成長過程の神経細胞に DMSO 投与すると、数日後では DMSO の影響が出てしまうという予備結果を得たことから、処理時間を出来るだけ短くすることが望まれる。本助成期間中に、成熟シナプスの形態変化の観察をする段階に到達できなかったが、観察目的が刺激依存的なシナプスの応答であるため、神経培養細胞や組織切片の DMSO 耐性範囲内で、ケージド化して局所的に作用させることを前提にもっと開発段階から神経細胞へ投与した様子を観察することが、将来この研究目的を達するための近道なのではないかと思われる。

(ref.1) Merkurjev, D. et al. Nat. Neurosci. (2018) 21, 1004-1014

(ref.2) Huang, Y. et al. Nucleic Acids Res. (2015) 43, 373-384.

(ref.3) Kato, Y. et al. Mol. Biol. Cell (2017) 28, 898-906.

5. 主な発表論文等

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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yume Kato, Yoshie Fujiwara, Kanako Hori, Yu-shi Tian, Dan Ohtan Wang, Tatsuya Takagi
2. 発表標題 Identification of candidate inhibitor of m6A-RNA demethylase ALKBH5
3. 学会等名 2018 AIChE Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshie Fujiwara, Yume Kato, Kanako Hori, Yohei Katoh, Kazuhisa Nakayama, Tatsuya Takagi, Yushi Tian, Dan Ohtan Wang
2. 発表標題 Screening and identification of inhibitor candidates against <math>N^6</math>-methyladenosine demethylase ALKBH5
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
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
連携研究者	田 雨時  (Tian Yu-Shi)  (60761252)	大阪大学・薬学研究科・特任助教    (14401)	
連携研究者	王 丹  (Wang Dan Ohtan)  (50615482)	京都大学・高等研究院・特定拠点准教授    (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	鈴木 孝禎  (Suzuki Takayoshi)  (90372838)	大阪大学・産業科学研究所・教授    (14401)	
連携研究者	伊藤 幸裕  (Itoh Yukihiro)  (30636402)	大阪大学・産業科学研究所・准教授    (14401)	

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