

令和 4 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22737

研究課題名(和文)鉄代謝におけるRNA修飾を介した転写後調節機構の解明

研究課題名(英文) Posttranscriptional regulation of iron metabolism via RNA methylation

研究代表者

吉永 正憲 (Yoshinaga, Masanori)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70878347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新規m6A RNA修飾酵素METTL16が生体の鉄代謝調節において果たす役割の解明を目的とした。赤芽球特異的METTL16欠損マウスは重度の赤血球造血障害のため胎生致死に至ること、またMETTL16欠損下では、赤芽球に重要な転写因子GATA-1やKLF1、およびトランスフェリン受容体をはじめとする鉄代謝関連遺伝子群の発現が低下していることを見出した。次に、METTL16の下流で作用する分子機構を解析し、MTR4-核内エクソソームを介したmRNA制御の必要性を明らかにした。本研究成果から、METTL16を介した鉄代謝関連遺伝子の発現制御機構が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで不明であったMETTL16の生体における機能の一端が解明された。また、METTL16の下流で作用する分子機構を網羅的に探索し、はじめてm6A修飾とMTR4-核内エクソソームの関係性を明らかにした。本研究成果は貧血をはじめとする鉄代謝異常や造血器疾患の病態の理解に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the roles of a novel RNA m6A methyltransferase METTL16 in the regulation of iron metabolism. We revealed that the mice that lack METTL16 specifically in erythroblasts lead to embryonic death due to severe anemia. Moreover, METTL16-deficient erythroblasts failed to express erythroid transcription factors GATA-1 and KLF1, and iron-related genes including transferrin receptor. Next, we investigated the molecular mechanisms that act downstream of METTL16 and revealed that MTR4-nuclear exosome is critically involved in the mRNA regulation mediated by METTL16. These findings establish the novel mechanisms of gene expression of iron-regulatory transcripts mediated by METTL16.

研究分野：生化学

キーワード：RNA修飾 鉄代謝 赤芽球分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

赤芽球は造血の過程でヘモグロビン産生のために大量の鉄を必要とする。このため、赤芽球は鉄取り込みに必要なトランスフェリン受容体を高発現する。トランスフェリン受容体(TfR1)の発現制御においては、遺伝子発現を mRNA のレベルで調節する転写後調節機構が重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、赤芽球分化の過程において TfR1 の発現を制御する転写後制御機構には未だ不明な点が多い。そこで申請者は、TfR1 の発現を制御する因子の同定のため赤芽球様細胞 K562 を用いて CRISPR スクリーニングを行い、RNA N⁶-methyladenosine (m⁶A) 修飾酵素 METTL16 (METT10D) を TfR1 の発現制御因子として同定した。このことは RNA 修飾を介した鉄代謝制御機構の存在を示唆しているが、その詳細な機構は未だ明らかではない。そこで本研究では、赤芽球での鉄代謝制御における RNA 修飾の役割の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が実施した TfR1 制御因子のスクリーニングにより同定された RNA 修飾酵素 METTL16 の赤芽球特異的欠損マウスを解析することにより、鉄代謝制御における RNA 修飾の役割の解明を目指した。また、TfR1 の発現制御を切り口としてさらに 2 次スクリーニングを行い、METTL16 の新たな機能的パートナーを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 赤芽球特異的 METTL16 欠損マウスの解析

鉄代謝が重要な役割を果たす場である赤血球造血における METTL16 の役割を検討するため、METTL16 の floxed マウスをエリスロポエチン受容体 Cre (Epor-Cre) マウスと交配させることにより、赤芽球特異的 METTL16 欠損マウスを作出した。このマウスを用いて、フローサイトメトリーにより TfR1 の発現、赤芽球分化を解析した。次に赤芽球特異的 METTL16 欠損マウスから、各分化段階での赤芽球細胞を単離し RNA-seq を行い、鉄代謝・赤芽球分化関連遺伝子の発現変動を検討した。また、METTL16 欠損赤芽球をセルソーターにより分取し、GATA-1 の発現について免疫蛍光抗体法により解析した。

(2) METTL16 の機能的パートナーの同定、解析

RNA 修飾はそれ自体が RNA 代謝を調節するのではなく、修飾 RNA を認識する RNA 結合タンパク質が作用することで mRNA の代謝が調節される。そこで、修飾 RNA の代謝に関与する RNA 結合タンパク質を同定するため、METTL16 と他の TfR1 制御因子を二重欠損した際の TfR1 の発現変動を指標として CRISPRi スクリーニングを行い、機能的パートナーを網羅的に同定できる遺伝学的相互作用解析を実施した。この解析により同定された関連因子についてのノックダウン実験を行い鉄代謝関連の遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 赤芽球特異的 METTL16 欠損マウスの解析

赤芽球特異的 METTL16 欠損マウスを作出したところ、このマウスは胎生致死であることを見出した。そこで胎生期のどの段階で致死に至るか詳細に検討を加えたところ、1 次造血が 2 次造血に置き換わる胎生期の E13.5 頃までにこのマウスは死亡することが明らかとなった(図 1A)。ま

た E12.5 において 2 次造血の場である胎仔肝は対照群よりも小さいことを見出した(図 1B)。次に各胎生期における赤芽球についてフローサイトメトリーにより検討した。1 次造血について E10.5 末梢血における赤芽球を解析したところ、これらの細胞では Tfr1 の発現が有意に低下していることを見出した(図 1C-E)。この結果は CRISPR スクリーニングの結果とも一致していた。しかしながら、赤芽球特異的 METTL16 欠損マウスはこの日齢以降もまだ生存していたことから、次に 2 次造血の場である E11.5 胎仔肝における赤芽球分化についても解析したところ、赤芽球特異的 METTL16 欠損マウスにおいて Ter119/CD71 共に陽性の赤芽球の割合が著明に低下しており(図 1F) 2 次造血での著明な赤芽球分化の障害が示唆された。

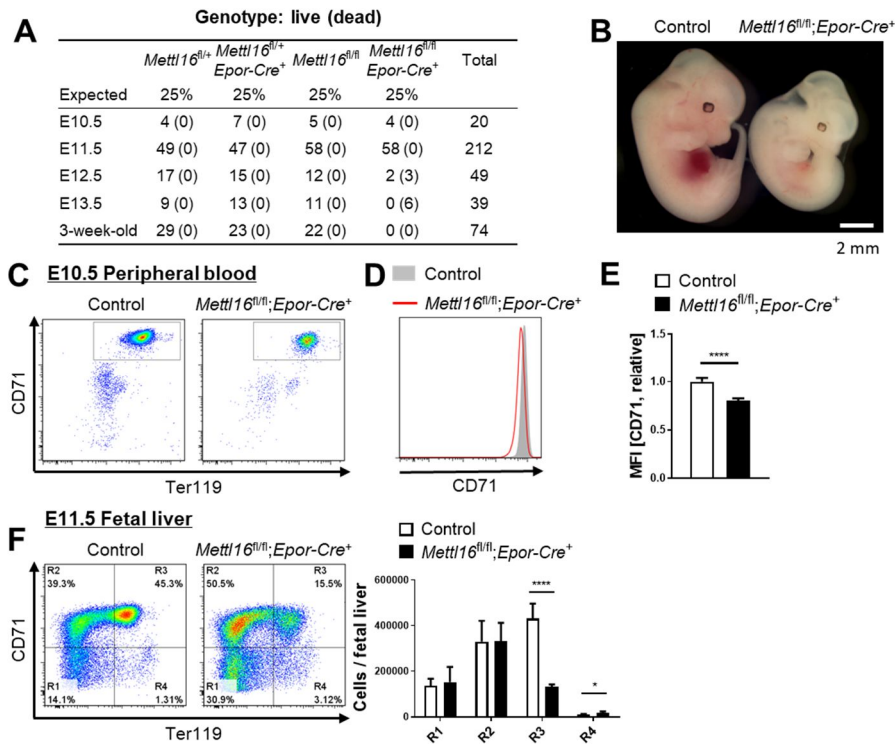
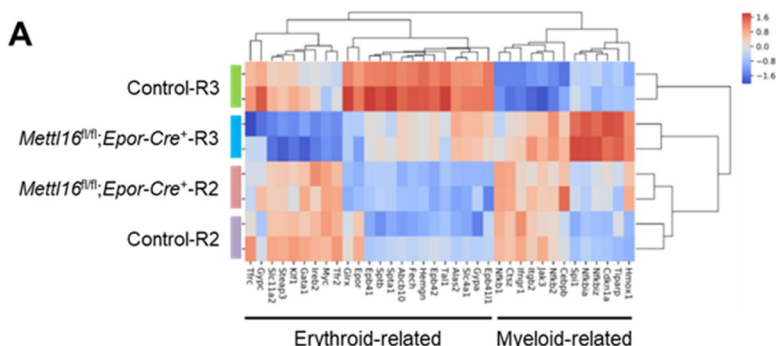


図 1 . RNA 修飾酵素 METTL16 は赤芽球造血に必要である

次に、赤芽球分化における遺伝子発現の調節過程において RNA 修飾が果たす役割を検討した。METTL16 欠損マウスから CD71 陽性、Ter119 陰性(R2 群)と Ter119/CD71 共陽性(R3 群)の赤芽球を単離し RNA-seq を行ったところ、METTL16 欠損下の R3 群においては赤芽球に特徴的な遺伝子発現 (GATA1, KLF1 など) が低下しており、むしろ骨髓系細胞に特徴的な遺伝子の発現 (PU.1, MPO など) が増加していた(図 2A, B)。また、この細胞では鉄代謝とヘモグロビン合成に必要な一群の遺伝子発現 (Tfr1, STEAP3, ALAS2, Hb など) が低下していた。したがって、METTL16 は赤芽球分化・鉄代謝関連の遺伝子発現制御に必要な因子であることが明らかとなった。



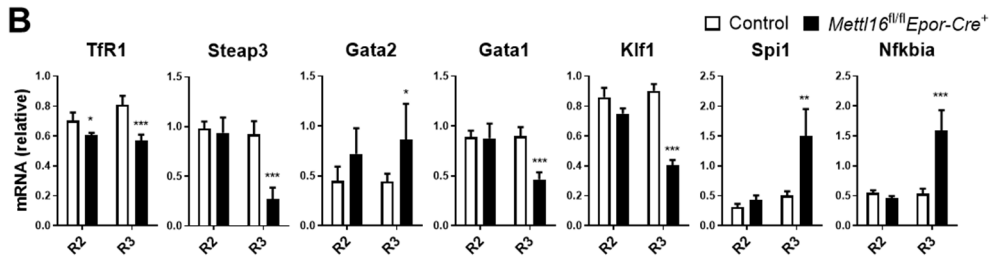


図2 . 赤芽球における METTL16 は鉄代謝・赤芽球分化関連の遺伝子発現に必要である

加えて、RNA-seq の Gene set enrichment 解析結果から、DNA 損傷や p53 に関係する遺伝子群の発現が METTL16 欠損下で増加していることを見出した (図 3A)。実際 METTL16 欠損赤芽球において、DNA 損傷や p53 の下流で誘導される caspase-3 の活性化がみとめられた (図 3B)。Caspase-3 は赤芽球にとって重要な転写因子 GATA-1 を分解することで赤血球造血を制御することが知られている。実際 METTL16 欠損赤芽球においては、GATA-1 の発現が低下していることが確認された (図 3C、D)。KLF1 や TfR1 などの赤芽球分化・鉄代謝関連遺伝子群は GATA-1 の転写活性の標的であることが知られていることから、METTL16 欠損下での遺伝子発現異常には、caspase-3-GATA-1 を介した制御が関与することが示唆された。

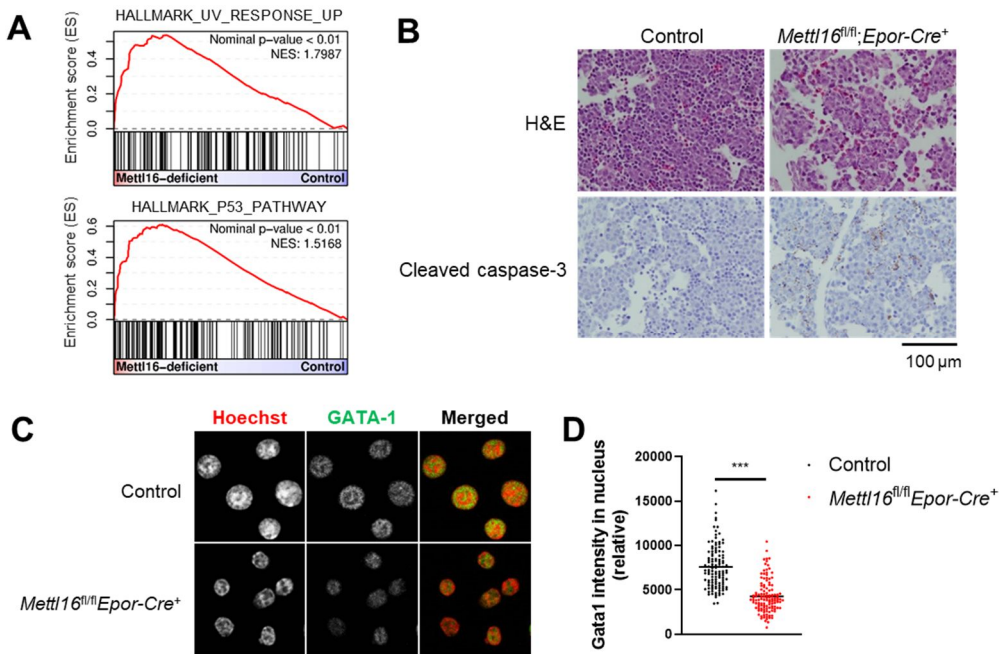


図3 . 赤芽球における METTL16 は転写因子 GATA-1 の発現を制御する

(2) METTL16 の機能的パートナーの同定、解析

METTL16 の下流で作用する因子を同定するため、TfR1 制御因子の CRISPR スクリーニングによって得られた上位 500 遺伝子について METTL16 との遺伝学的相互作用解析を行った (図 4A-C)。遺伝学的相互作用解析の結果、特に METTL16 と強い相互作用を示した遺伝子として核内の RNA エクソソームの構成因子 (DIS3、EXOSC2) とその結合因子 MTR4 を見出した (図 4D)。RNA エクソソームは RNA のプロセッシングや分解に寄与する分子機構であるが、m⁶A RNA 修飾との機能的関連性はこれまで明らかでない。そこで METTL16 による RNA 修飾との関連性をさらに検討することにした。

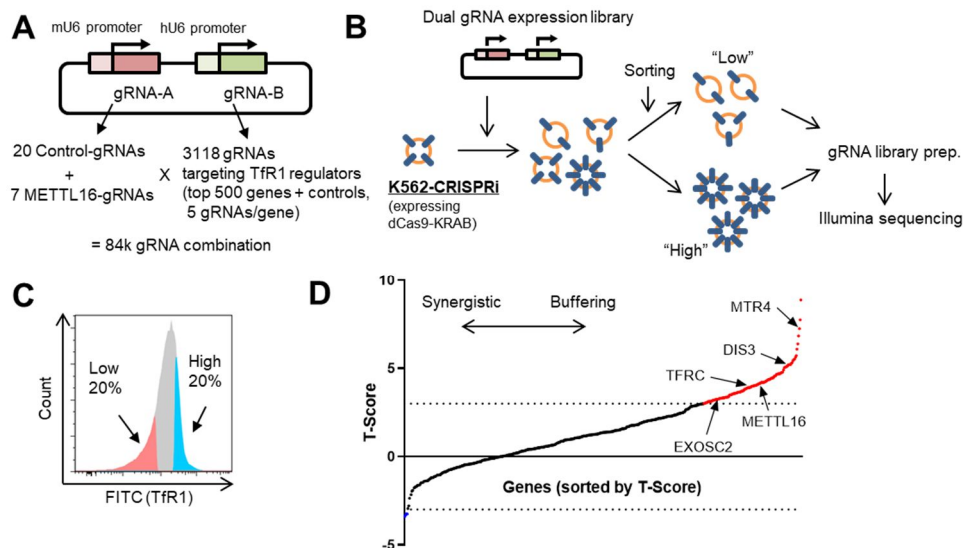


図4 . 遺伝学的相互作用解析による METTL16 の機能的パートナーの同定

まず遺伝学的相互作用の解析の結果を検証するため、METTL16 と MTR4・DIS3 とをそれぞれ、もしくは同時にノックダウンした K562 細胞を樹立し Tfr1 の発現を検討したところ、METTL16 単独ノックダウン下では Tfr1 の減少がみとめられる一方、MTR4 や DIS3 のノックダウン下では METTL16 ノックダウンによる Tfr1 発現変化が減弱することが確認できた(図 5A-D)。次に、マウス胎仔肝由来の赤芽球において MTR4 の欠損で同様の効果がみとめられるか検討したところ、Tfr1 や Klf1 の発現は METTL16 単独欠損下では有意に減少する一方、MTR4 の欠損下では有意な差がみとめられなくなることを明らかにした(図 5E、F)。したがって、MTR4-核内エクソソームが METTL16 を介した mRNA 制御にとって重要であることが示唆された。

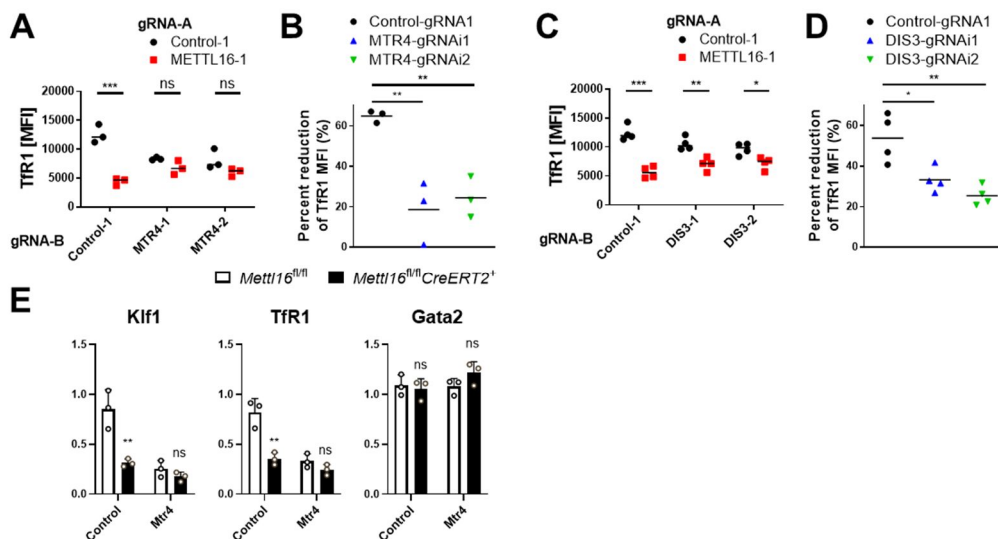


図5 . METTL16 による mRNA 制御には MTR4-核内 RNA エクソソームが必要である

以上のことから、METTL16 は転写因子 GATA-1 の発現制御を介して鉄代謝・赤芽球分化関連遺伝子の発現を調節する RNA 修飾酵素であることが示唆された。また、この mRNA 制御機構は MTR4-核内 RNA エクソソームを介していることを見出した。これらの結果より METTL16 を介した Tfr1 発現制御機構の一端が明らかとなった。今後は METTL16 による RNA 修飾が果たす役割についてさらに解析を加え、METTL16 による鉄代謝・赤芽球分化制御の全容を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chong Yee Kien, Tartey Sarang, Yoshikawa Yuki, Imami Koshi, Li Songling, Yoshinaga Masanori, Hirabayashi Ai, Liu Guohao, Vandenbon Alexis, Hia Fabian, Uehata Takuya, Mino Takashi, Suzuki Yutaka, Noda Takeshi, Ferrandon Dominique, Standley Daron M., Ishihama Yasushi, Takeuchi Osamu	4. 巻 15
2. 論文標題 Cyclin J?CDK complexes limit innate immune responses by reducing proinflammatory changes in macrophage metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.abm5011	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 該当する

1. 著者名 Wakabayashi Atsuko, Yoshinaga Masanori, Takeuchi Osamu	4. 巻 5
2. 論文標題 TANK prevents IFN-dependent fatal diffuse alveolar hemorrhage by suppressing DNA-cGAS aggregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101067	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 Nakatsuka Yoshinari, Yaku Ai, Handa Tomohiro, Vandenbon Alexis, Hikichi Yuki, Motomura Yasutaka, Sato Ayuko, Yoshinaga Masanori, Tanizawa Kiminobu, Watanabe Kizuku, Hirai Toyohiro, Chin Kazuo, Suzuki Yutaka, Uehata Takuya, Mino Takashi, Tsujimura Tohru, Moro Kazuyo, Takeuchi Osamu	4. 巻 57
2. 論文標題 Profibrotic function of pulmonary group 2 innate lymphoid cells is controlled by regnase-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 2000018 ~ 2000018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/13993003.00018-2020	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 -

1. 著者名 吉永正憲, 竹内理	4. 巻 3
2. 論文標題 がん免疫療法における免疫チェックポイント機構とマクロファージのはたらき	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Cancer Immunology	6. 最初と最後の頁 3~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉永正憲、竹内理
2. 発表標題 赤芽球分化を制御する新規転写後調節機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ka Man Tse, Xiaotong Cui, Alexis Vandebon, Keiko Yasuda, Takuya Uehata, Ayuko Sato, Tohru Tsujimura, Masanori Yoshinaga, Tatsusada Okuno, Yoshinari Nakatsuka, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 Manipulation of Regnase-1 mRNA stability by antisense oligonucleotides alleviates inflammatory responses in pulmonary and autoimmune diseases
3. 学会等名 KAI International Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ka Man Tse, Xiaotong Cui, Alexis Vandebon, Keiko Yasuda, Takuya Uehata, Ayuko Sato, Tohru Tsujimura, Takashi Mino, Masanori Yoshinaga, Tatsusada Okuno, Yoshinari Nakatsuka, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 Manipulation of Regnase-1 mRNA stability by morpholino-based antisense oligonucleotides alleviates inflammatory responses in pulmonary and autoimmune diseases
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ka Man Tse, Xiaotong Cui, Alexis Vandebon, Takashi Mino, Takuya Uehata, Keiko Yasuda, Ayuko Sato, Tohru Tsujimura, Fabian Hia, Masanori Yoshinaga, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 Manipulating the expressions of Regnase-1 by stem-loop-targeting-antisense oligonucleotides to counteract inflammatory diseases
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shota Yasukura, Masanori Yoshinaga, Michael C Bassik, Osamu Takeuchi
2. 発表標題 Analysis of metabolic reprogramming in macrophage utilizing genome-wide CRISPR screening
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉永正憲, 竹内理
2. 発表標題 Identification of novel regulators of erythroid differentiation via genome-wide CRISPR screen
3. 学会等名 第1回医薬系研究交流サロン
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			
米国	スタンフォード大学			