

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19046

研究課題名（和文）配列・環境依存的エピトランスクリプトーム制御法の開発と体内時計制御への展開

研究課題名（英文）Development of a sequence and stimulation dependent regulation method of epitranscriptome and its application to biological clock

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、RNAを標的とした制御の重要性が高まっている。中でも、転写後修飾は多様で、特にN6メチルアデノシン（m6A）は、発生やガン化、体内時計の周期などを決定する重要な修飾塩基として注目されている。RNAメチル化の役割は多岐にわたるため、細胞内RNAのメチル化レベルを一様に変化させてしまう酵素のノックダウンや過剰発現では機能解析に限界がある。そこで本研究では、RNAメチル化調節酵素の機能を外部の環境変化によってスイッチし、かつ配列選択的にメチル化を制御するシステムの構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

m6Aが発生やガン化、体内時計、ウイルス感染などに関わることが最近報告され、その生物学的重要性と創薬標的としての可能性が高まりつつある。一方、m6A研究の手段は、酵素阻害剤の利用、酵素の発現抑制、過剰発現に限られ、個々のサイトのメチル化状態を制御する方法がなかった。RNAメチル化の役割はスプライシング、安定性、翻訳、mRNA輸送と多岐にわたるため、標的選択的に適切なタイミングでRNAメチル化状態を制御する方法論の構築は、様々な生命現象の解明やエピトランスクリプトームを標的とする創薬研究の飛躍的な進展につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the importance of RNA-targeted regulation has increased. Among them, one of the post-transcriptional modifications, N6 methyladenosine (m6A), has attracted attention as an important modifying base that determines development, cancer, and circadian clock cycles, etc. Therefore, these methods are limited in their ability to analyze a wide variety of RNA methylation roles. In this study, we constructed a system to switch the function of RNA methyltransferase regulatory enzymes by external environmental changes and to control methylation in a sequence-selective manner.

研究分野：生物分子化学

キーワード：RNAメチル化 RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

RNAは単なるゲノムのコピーではなく、フェノタイプを決定する重要な情報を含む。したがって、生命現象の機能解明や創薬シード探索に向けて、転写産物である mRNA や ncRNA を標的とした制御が重要である。中でも、転写後修飾(エピトランスクリプトーム)は多様で、特に mRNA の多くで見られる N^6 メチルアデノシン (m6A) は、発生やガン化、体内時計の周期 (Fustin, et al., *Cell*, **155**, 793 (2013)) などを決定する重要な修飾塩基として注目が高まっていた (図1)。このような生命現象への m6A の関わりを示すための方法論として、従来は RNA メチル化酵素や脱メチル化酵素のノックダウンなど、酵素の発現量調節が行われてきた。しかし、RNA メチル化の役割はスプライシングパターンの決定、mRNA の安定性制御、翻訳の調節、mRNA 輸送と多岐にわたる上に、細胞内 RNA のメチル化レベルを一様に変化させてしまう酵素のノックダウンや過剰発現では、副次的に種々の遺伝子の発現が変化してしまう (図2)。また、体内時計研究においては、メチル化されるアデノシンを含む領域をゲノム編集によって変異させることによって領域を限定した m6A の機能解析が行われているが (Fustin, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **115**, 5980 (2018))、この方法においても、mRNA の高次構造が変化することによる影響が懸念される。したがって、種々の生命現象における個々の m6A の寄与を明らかにするための方法論が求められていた。

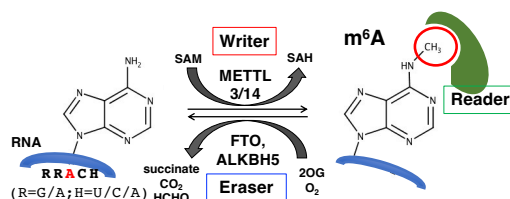


図1. メチル化酵素 (writer proteins) と脱メチル化酵素 (eraser proteins) によるアデノシン N^6 位のメチル化制御

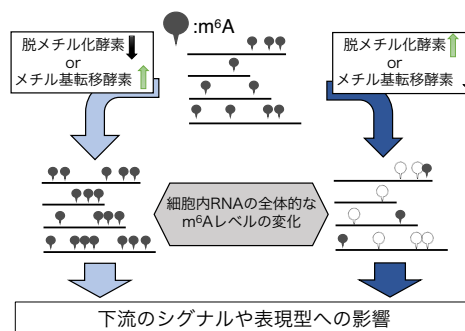


図2. メチル化調節酵素の発現調節に基づく従来の m6A の機能解析法

2. 研究の目的

上述の背景のもと、私たちは、配列選択的に RNA に結合する RNA 結合タンパク質と脱メチル化酵素やメチル基転移酵素の融合体を用いた配列選択的なメチル化調節システムを構築してきた (Shinoda, et al., *Chem. Commun.* **56**, 1365 (2020))。一方、生命現象解明のためのツールとして利用するためには、活性型の酵素そのものを用いることによる非特異的な影響の低減が必須であり、また、体内時計をはじめとする経時的な現象への適用に向けては、機能化のタイミングをコントロールすることが鍵になる。そこで本研究では、RNA メチル化調節酵素の機能を外部の環境変化によってスイッチし、かつ配列選択的にメチル化を制御するシステムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) オフターゲット低減型 m6A 脱メチル化酵素 FTO の作製

当初、単独では脱メチル化活性を発揮せず、リガンドの添加によって酵素活性が回復するような脱メチル化酵素 FTO の再構成系の構築を目指した。その方法として、結晶構造をもと FTO の分割を複数箇所で行い、対応する酵素分割体とリガンド (ラパマイシン) 応答性会合ドメイン FKBP (FK506-binding protein), FRB (FKBP-rapamycin binding domain) との融合体をマルチウエルプレート中で *in vitro* 転写・翻訳システムにより合成することを試みた。しかし、この方法では、安定な分割体のタンパク質発現が困難であった。そこで方針を変え、配列選択的に結合する RNA 結合タンパク質 PUF (Pumilio and FBF homology family proteins) と FTO とをそれぞれリガンド応答性会合ドメインと連結させた融合タンパク質をデザインし、リガンドの添加によって、RNA 結合タンパク質が結合する RNA 領域の近傍を FTO が脱メチル化するような配列選択的/刺激応答性の再構成系の構築を目標とした。これを実現するためには、FTO 単体では m6A 脱メチル化活性を発揮せず、一方、FTO が PUF にガイドされて RNA に近接した場合にのみ、その近傍に存在する m6A を脱メチル化できるような FTO 変異体が求められる。このような性質を持つ FTO 変異体のスクリーニングを行った。

- ① 変異体の作製：HiFi-assembly system (NEB)を用いて FTO 変異体と PUF との融合タンパク質をコードする大腸菌発現用プラスミドを作製した。タンパク質は大腸菌内で発現させ、ヒスチジンタグおよび Strep-TagII を利用した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。
- ② 配列選択的脱メチル化活性の評価：m6A の近傍に PUF の結合配列が存在する配列を含むオリゴヌクレオチド RNA (=オンターゲット RNA) と、m6A は含むが PUF の結合配列は含まないオリゴヌクレオチド RNA (=オフターゲット RNA) に対する PUF-FTO 変異体の脱メチル化活性を MazF アッセイにより評価した。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報告している (Imanishi, et al., *Chem. Commun.*, **53**, 12930 (2017))。すなわち、(m6A)CA 配列を含み末端蛍光標識を有するオリゴヌクレオチドを脱メチル化反応後に MazF で処理すると、脱メチル化された RNA オリゴヌクレオチドは ACA 配列部分で MazF による切断を受け、電気泳動移動度が大きくなる。また、脱メチル化されていない RNA オリゴヌクレオチドは、MazF による切断を受けないため移動度が小さい。したがって、ゲルの画像からバンド強度を測定し、切断された RNA 断片の割合を算出することにより、脱メチル化割合を求めることができる。FAM で標識されたオンターゲット RNA と TAMRA で標識されたオフターゲット RNA を PUF-FTO 変異体と混合し、既報告 (Shinoda, et al., *Chem. Commun.* **56**, 1365 (2020)) の条件に従って脱メチル化反応を行った。反応後の溶液の一部を MazF と混合し、変性ゲル電気泳動を行った。電気泳動後にゲルのイメージングを行い、FAM および TAMRA で標識された RNA の切断量をバンド強度から解析した。
- ③ 変異体の RNA 結合親和性の検討：末端に蛍光標識を有する RNA フラグメントを用い、段階希釈した FTO もしくは FTO 変異体とインキュベートし、マイクロプレートリーダー (TECAN Infinite 200 PRO) で蛍光異方性を測定した。

(2) 配列選択的かつリガンド応答性脱メチル化システムの構築

上で得られた FTO 変異体と PUF との融合体に関して、これを FTO 変異体と PUF とに分割し、それぞれ FKPB、FRB との融合タンパク質として大腸菌発現系より精製した。ラパマイシン非添加時および添加時のオンターゲット RNA およびオフターゲット RNA の脱メチル化量を MazF アッセイで評価した。

(3) 体内時計リズム調節に向けた dCas13 タンパク質との融合体の作製

dCas13 タンパク質と nFTO およびとの融合体を作製し、時計遺伝子発現のレポーター系に用いられる NIH3T3 細胞で発現させた。

4. 研究成果

(1) オフターゲット低減型 m6A 脱メチル化酵素 FTO の作製

FTO-PUF 融合体が高濃度域で PUF 結合配列非依存的な (オフターゲット) m⁶A 脱メチル化を生じる要因として、FTO 自身が RNA 脱メチル化活性と同時に RNA 結合性を有しているためであると推測されたことから、結晶構造をもとに、FTO の基質 RNA への結合親和性を敢えて低下させる変異を導入した。これらの変異体を PUF との融合タンパク質として得ることで、PUF 配列依存的な (オンターゲット) 脱メチル化活性を保持しながら、オフターゲット活性は持たない変異体をスクリーニングした。

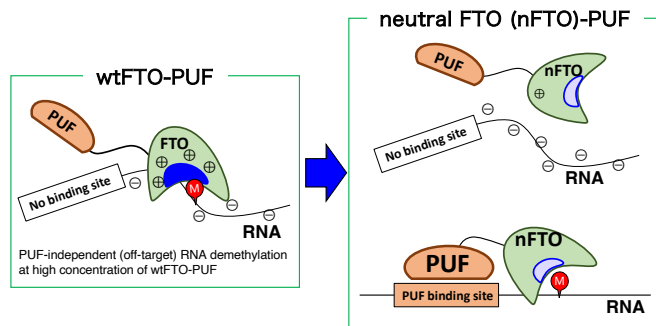


図 3. オフターゲット抑制型 FTO 変異体の作製

その結果、1 アミノ酸の点変異の導入では、オンターゲット活性を含めて FTO の脱メチル化活性自体が不活性化されてしまうような酵素不活化が生じる場合か、活性に変化をほとんど与えずオフターゲットへの活性もほとんど維持される変異のいずれかであった。そこで、活性を維持する変異を組み合わせた変異体を作製してスクリーニングしたところ、高濃度域でオンターゲット m⁶A への脱メチル化活性を発揮しながら、オフターゲット活性は顕著に低下する変異体が得られた。この変異体は、RNA との相互作用面の正電荷が弱められたものであったことから、neutral FTO (nFTO) と名づけた。nFTO 単独での RNA 脱メチル化活性は野生型と比較して顕著に低下しており、nFTO-PUF のオンターゲット m⁶A への脱メチル化活性は、PUF ドメインによる RNA 結合が不可欠であることが示唆された。また、nFTO-PUF 融合体は、低濃度でも高いオンターゲット脱メチル化活性を維持しており、幅広い濃度域で PUF の配列に依存した脱メチル化活性を示すことが明らかになった。FTO および nFTO の RNA 結合親和性を蛍光異方性の測定

により算出したところ、nFTO では野生型に比べて結合親和性の低下が認められた。また、nFTO-PUF 融合体は、PUF 結合配列中もしくは2塩基のみ離れた位置に存在する m6A はほとんど脱メチル化することができないが、4-10 塩基離れた位置に存在する m6A を脱メチル化した。

(2) 配列選択的かつリガンド応答性脱メチル化システムの構築

FKBP と FRB タンパク質は、リガンドであるラパマイシンの結合によって会合しヘテロダイマーを形成することが知られている。PUF と FKBP および nFTO と FRB との融合体を作製し、FKBP-PUF、nFTO-FRB とした。コントロールとして野生型 FTO と FRB との融合体 wtFTO-FRB も作製した。なお、FKBP および FRB と PUF および FTO との組み合わせのパターンや融合部位（アミノ末端側、カルボキシル末端側）に関して種々コンストラクトを作製し、タンパク質発現精製における安定性および、ラパマイシン添加時のオンターゲット m6A への脱メチル化活性から採用するコンストラクトを決定した。まずコントロールとして wtFTO-FRB と FKBP-PUF のオンターゲットとオフターゲットへの脱メチル化活性を調べたところ、ラパマイシンの有無に関わらず、オンターゲットとオフターゲットの両者に対して脱メチル化活性を示した。一方、nFTO-FRB と FKBP-PUF に関しては、ラパマイシンが存在しない場合はオンターゲットもオフターゲットも脱メチル化せず、ラパマイシン添加時にはオンターゲットを有意に脱メチル化した。すなわち、リガンド依存のかつ PUF 配列選択的な脱メチル化活性を発揮した。このことは、標的選択的な RNA 脱メチル化を外部刺激によって任意のタイミングで調節できることを意味している。また、PUF 結合配列と標的 m6A とのスペーシングに関して検討を行った結果、PUF と FTO とをつながるリンカー領域に FKBP-FRB ヘテロダイマーが存在している場合においても、PUF 結合配列から 4-10 塩基離れた m6A の脱メチル化が認められた。

(3) 体内時計リズム調節に向けた dCas13 タンパク質との融合体の作製

nFTO の体内時計制御遺伝子の制御を目指して、CRISPR-dCas13 と nFTO とを融合させたタンパク質や、リガンド応答系を構成するタンパク質を発現するベクターを作製し、標的サイトに結合するガイド RNA とともに NIH3T3 細胞にトランスフェクションした。しかし、研究年度内においては、時計遺伝子発現リズムの変動を確認することはできなかった。細胞への導入効率が低いことが一つの原因と考えられる。条件を今後整えていく必要があるが、標的選択性が高く、またリガンド依存的な機能を発現する本変異体は、種々の生命現象の解明に役立つものと期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Imanishi, M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Mechanisms and Strategies for Determining m6A RNA Modification Sites by Natural and Engineered m6A Effector Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry Asian J.	6. 最初と最後の頁 e202200367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/asia.202200367	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 Yoshida, A., Oyoshi, T., Suda, A., Futaki, S., Imanishi, M.	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 Res.	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今西 未来、音成 兼光、浅見 有璃、二木 史朗
2. 発表標題 オフターゲットを低減した配列選択的RNA脱メチル化酵素の創製
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 RNA化学修飾の検出と選択的制御
3. 学会等名 IRCCS成果報告会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 カスタム遺伝子制御：ゲノム編集のこれから
3. 学会等名 日本薬学会関西支部市民公開講座（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今西未来
2. 発表標題 グアミン四重鎖のエピトランスクリプトーム制御への関与
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 音成 兼光, 浅見 有璃, 二木 史朗, 今西 未来
2. 発表標題 リガンド依存的に配列特異的なRNA脱メチル化を行う新規ツールの創出
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 和無為, 二木 史朗, 今西 未来
2. 発表標題 RNA脱メチル化酵素FT0の阻害剤スクリーニングとFT0の活性におけるL-アスコルビン酸の寄与
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅見 有璃, 音成 兼光, 二木 史朗, 今西 未来
2. 発表標題 ALKBH5を用いた配列特異的なRNA脱メチル化酵素の創出
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 音成 兼光, 篠田 昂樹, 浅見 有璃, 今西 未来, 二木 史朗
2. 発表標題 配列特異的なRNA脱メチル化酵素の創出と活性スイッチング制御
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 Ddemethylation 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

〔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
---------	---------