

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19234

研究課題名（和文）RNA修飾を任意のRNAに配列特異的に導入する技術の創出

研究課題名（英文）Developing targeted RNA modification technology

研究代表者

中條 岳志（Chujo, Takeshi）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・講師

研究者番号：50788578

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）：第一に、標的RNAに対するガイドRNAを2種類設計し、これらガイドRNAを発現する2つのプラスミドを構築し、培養細胞にそれぞれ導入した。これら細胞のRNAから標的RNAを単離してヌクレオシドの質量分析を実施した結果、標的RNAの標的箇所にメチル化を導入できたことが強く示唆された。第二に、口腔がん細胞株SASと、その抗がん剤（5-FU）耐性株FR2-SASに関して、細胞培地に修飾ヌクレオシド i6Aを入れると、これら細胞で主にリボソームRNAにi6Aが取り込まれることを見出した。さらに、i6Aは特に抗がん剤耐性株FR2-SASへの殺傷能力が高いことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1番目の結果、つまり標的配列特異的にメチル基を導入できた結果は、遺伝子発現に介入する全く新しい原理の手法を開発できたことを示す。

2番目の結果、つまりi6Aを培地に入れると抗がん剤耐性細胞の一種がその親株よりも死にやすかった結果は、i6Aが抗がん剤耐性がんに対抗するための新たな手段となりうるかもしれない可能性を提示する。

研究成果の概要（英文）：We showed that i6A addition to cell culture medium results in i6A incorporation into cellular RNA in 5-FU-resistant human oral squamous cell carcinoma cell line FR2-SAS and its parental 5-FU-sensitive cell line SAS. i6A was predominantly incorporated into rRNAs. Interestingly, at lower i6A concentrations, the cytotoxic effect of i6A was substantially more pronounced in FR2-SAS cells than in SAS cells. Moreover, in FR2-SAS cells, i6A treatment decreased the rate of cellular protein synthesis and increased intracellular protein aggregation, and these effects were more pronounced than in SAS cells. Our work provides insights into the molecular fate of extracellularly applied i6A and suggests investigation of i6A as a candidate for a chemotherapy agent against 5-FU-resistant cancer cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：tRNA修飾 リボソームRNA メチル化修飾 i6A修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトのトランスファーRNA (tRNA)分子には、メチル化や硫黄化など 40 種類以上の RNA 修飾が存在する。tRNA 修飾は酵素が導入し、tRNA 修飾酵素の欠損が引き起こす疾患が 50 種類以上も知られるが、失われた修飾を復活させる方法は無かった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RNA の化学修飾 (RNA 修飾) を RNA の狙った位置に導入する技術の確立である。

3. 研究の方法

第 1 の方法として、標的 RNA に対するガイド RNA を 2 種類設計し、これらガイド RNA を発現する 2 つのプラスミドを構築し、培養細胞にそれぞれ導入した。これら細胞の RNA から標的 RNA を単離してヌクレオシドの質量分析を実施した。

第 2 の方法として、細胞培地に修飾ヌクレオシド N^6 -isopentenyladenosine (i^6A) を入れることを試した。

4. 研究成果

第 1 の方法の研究の結果、標的 RNA の標的箇所に高効率 (修飾率約 70%) にメチル化を導入できた。標的配列特異的にメチル基を導入できた結果は、遺伝子発現に特異的に介入する全く新しい原理の技術を実証するものである。

培養細胞において、ガイド RNA による配列特異的なメチル化が実証できたので、個体レベルでもこの技術が使用可能かを検証するために、弊学の荒木喜美教授との共同研究のもと、このガイド RNA 発現遺伝子をマウスの Rosa26 遺伝子座にノックインし、生まれた F0 世代の戻し交配を進め、F1、F2 世代に人工遺伝子が遺伝することを確認した。現在、マウス組織におけるガイド RNA の発現やメチル化量を調べる実験を進めており、個体でもこの系が有効であれば、このマウスを tRNA のメチル化酵素欠損マウスと交配し、生まれる仔において tRNA のメチル化欠損が引き起こす病気の症状が緩和可能かを調べたい。また、将来的には、ノックインした遺伝子ではなく、アデノ随伴ウイルス等の使用により、生後でも導入可能であるかの検証、生後の導入でも症状の緩和が可能であるかの検証も進めたい。

第 2 の方法の研究により、口腔がん細胞株 SAS と、その抗がん剤 (5-FU) 耐性株 FR2-SAS に関して、細胞培地に修飾ヌクレオシド i^6A を加えると、これら細胞において主にリボソーム RNA に i^6A が取り込まれることを見出した (次頁の図 1)。培地に i^6A を加えた際の RNA への i^6A の取り込みは、細胞内 tRNA の i^6A 修飾酵素 TRIT1 をノックアウトしても維持され、リボソーム RNA を転写する RNA ポリメラーゼ I の阻害剤で阻害されたことから、 i^6A は転写と共役して主にリボソーム RNA に入ることが判明した。さらに、 i^6A は特に抗がん剤耐性株 FR2-SAS への毒性が高く、 i^6A を取り込んだ FR2-SAS 細胞では翻訳量が低下し、細胞内でのタンパク質の凝集と小胞体ストレスが増加することを見出した。これらの結果は、 i^6A が抗がん剤耐性がんに対抗す

るための新たな手段となりうる可能性を提示する。

なお、この第2の方法の成果は、日本RNA学会年会で発表し、以下のようにRNA誌に報告した。

Yakita, Chujo, Wei, Hirayama, Kato, Takahashi, Naganuma, Nagata, Kawahara, Nakayama and Tomizawa. Extracellular N⁶-isopentenyladenosine (i⁶A) addition induces cotranscriptional i⁶A incorporation into ribosomal RNAs. RNA. (2022) 28(7), 1013-1027.

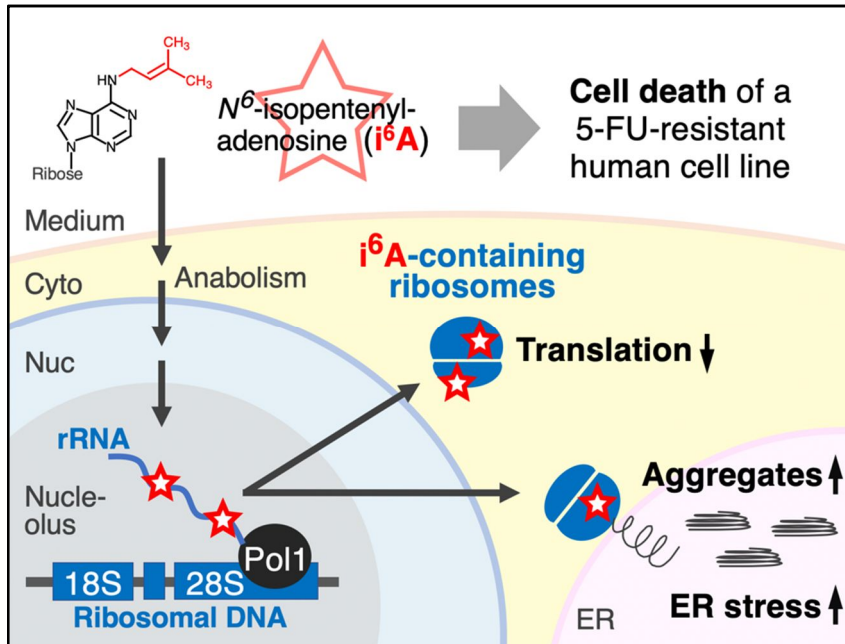


図1. 本研究の第2の方法の研究成果のまとめ

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yakita Maya, Chujo Takeshi, Wei Fan-Yan, Hirayama Mayumi, Kato Koji, Takahashi Nozomu, Naganuma Kenta, Nagata Masashi, Kawahara Kenta, Nakayama Hideki, Tomizawa Kazuhito	4. 巻 28
2. 論文標題 Extraceellular N6-isopentenyladenosine (i6A) addition induces cotranscriptional i6A incorporation into ribosomal RNAs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 1013 ~ 1027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.079176.122	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takeshi Chujo
2. 発表標題 Extraceellular N6-isopentenyladenosine (i6A) addition induces co-transcriptional i6A incorporation into ribosomal RNAs
3. 学会等名 日本RNA学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------