

Title	CRISPR-C2c2法を用いたRNAエピジェネティクス編集法の開発
Author(s)	盛, 真友
Citation	科学研究費助成事業研究成果報告書: 1-5
Issue Date	2020-05-29
Type	Research Paper
Text version	publ isher
URL	http://hdl.handle.net/10119/16751
Rights	
Description	挑戦的研究（萌芽），研究期間：2018～2019，課題番号：18K19289，研究者番号：90466772，研究分野：分子生物学

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19289

研究課題名（和文）CRISPR-C2c2法を用いたRNAエピジェネティクス編集法の開発

研究課題名（英文）Development of RNA epigenetics editing system using CRISPR-C2c2

研究代表者

盛 真友（Sakari, Matomo）

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・研究員

研究者番号：90466772

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では特異的なmRNAのm6A修飾を編集する技術を開発し、m6Aの機能解析とm6A修飾異常疾患に対するRNA編集法の開発を目的とする。RNAメチル化編集プラットフォームの開発として、約80%程度の脱メチル化編集に成功している。また新たな評価系としてメチル化RNA感受性RNaseであるMazFを用いた高感度メチル化評価法を開発した。従来の抗体を用いたIP法と比較してより精度の高い編集効率を算出することが可能となった。これらのRNA編集システムおよび、その評価法の開発によって新たなメチル化RNA編集プラットフォームの有効性が示され、人為的RNA修飾編集法の有用性の一端を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAの多様な化学修飾によるRNAエピジェネティクスの全体像はその大部分が未解明であるものの、近年アデノシンのRNAメチル化酵素複合体としてMETTL3, METTL14, WTAPタンパク質群が見いだされ、またRNA脱メチル化酵素としてALKBH5が同定された。これらの遺伝子群のノックアウトマウスの表現型解析により、癌、糖尿病、肥満、生殖不全やアルコール依存症といった疾患との関連が示唆されている。しかしながら原因となる標的メチル化RNAの直接的な解析手法が少ない。本研究で開発されたRNAメチル化編集法によりm6A修飾の新たな解析法の提示が可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a technique for editing m6A modification of specific mRNA, and to analyze the function of m6A and to develop an RNA editing method for m6A modification abnormal diseases. As a development of RNA methylation editing platform, we have succeeded in demethylation editing of about 80%. As a new evaluation system, we developed a highly sensitive methylation evaluation method using MazF, a methylated RNA-sensitive RNase. It has become possible to calculate the editing efficiency with higher accuracy compared to the conventional IP method using an antibody. The effectiveness of the new methylated RNA editing platform was demonstrated by the development of these RNA editing systems and their evaluation methods, and showed the usefulness of the artificial RNA modification editing method.

研究分野：分子生物学

キーワード：m6A エピトランスクリプトーム

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、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年急速に発展してきた CRISPR-Cas9 法によるゲノム編集のメリットはその簡便性と正確性にある。この手法で用いられる Cas 遺伝子ファミリーは約 40 種類ほど見出されているものの、多くの遺伝子群はその分子機能が明らかになっていない。その中で 2016 年に C2c2 タンパク質をコードする Cas13a 遺伝子が一本鎖 RNA を標的として切断することが報告された。そこで我々は C2c2 の高精度の RNA 識別能に着目して、世界に先駆けて RNA メチル化編集技術の開発を試みる。

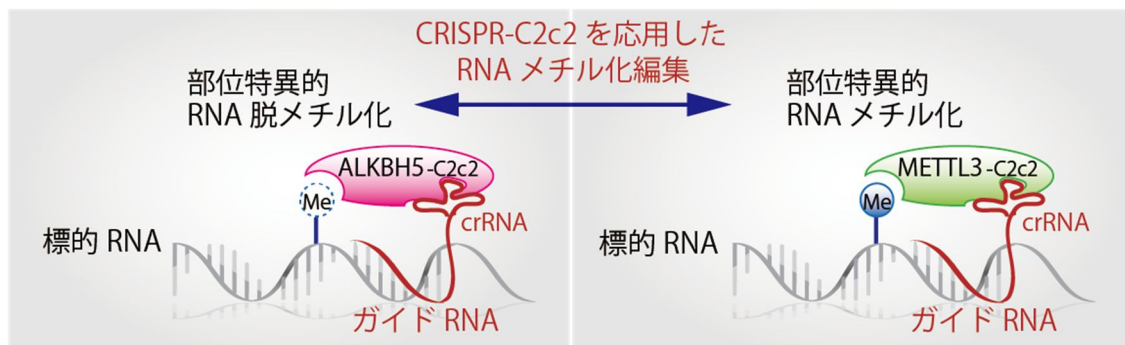
RNA の多様な化学修飾による RNA エピジェネティクスの全体像はその大部分が未解明であるものの、近年アデノシンの RNA メチル化酵素複合体として METTL3, METTL14, WTAP タンパク質群が見いだされ、また RNA 脱メチル化酵素として ALKBH5 が同定された。これらの RNA メチル化修飾遺伝子群のノックアウトマウスの表現型解析により、癌、糖尿病、肥満、生殖不全やアルコール依存症といった疾患との関連が示唆されている。しかしながら原因となる標的メチル化 RNA の直接的な解析手法が少なく、遺伝子機能のレスキュー法は報告がない。本研究で開発を目指す RNA メチル化編集法により m6A 修飾の新たな解析法の提示が可能であると考えられる。また従来の Cas9 タンパク質を用いたゲノムレベルでの編集法は不可逆的であり、医療への応用は限定的である。それに対して RNA レベルでの編集は可逆的であり、遺伝子疾患への応用には多大な貢献をもたらすことが期待できる。

2. 研究の目的

RNA 修飾は現在 100 種類以上知られており、新たに RNA エピジェネティクスの分野が開かれた。ヒトの mRNA において最も多い RNA 修飾の 1 つはアデノシン (A) がメチル化された N6-メチルアデノシン (m6A) でありタンパク質コーディング遺伝子群の約 40% に見られる。これらの m6A 修飾は多くの疾患への関与が示唆されているものの、個別の遺伝子における機能は大部分が未解明である。そこで本研究では 特異的な mRNA の m6A 修飾を編集する技術を開発し、m6A の機能解析と m6A 修飾異常疾患の RNA 編集法の開発を目的とする。

近年、大腸菌や古細菌の二本鎖 DNA 切断酵素である Cas9 を応用した CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集法が急速に発展してきた。この Cas ファミリー遺伝子群の中で新たに一本鎖 RNA 切断酵素である C2c2 が 2016 年に同定された。しかしながらヒト細胞への応用は例がない。そこで、ガイド RNA (gRNA) と結合した C2c2 の高い RNA 識別能を利用して、RNA 脱メチル化酵素である ALKBH5 および RNA メチル化酵素である METTL3 を標的 RNA へと導く。すなわち 特異的な RNA のメチル化編集法を開発を世界に先駆けて達成することを目指す。

個々の遺伝子の RNA メチル化を解析するために、従来法を用いたゲノムレベルで A を編集する手法は有効である。しかしながらタンパク質をコードする ORF 領域ではアミノ酸の置換を伴うため解析が困難である。特に ORF 領域の RNA メチル化はスプライシングなどに重要な機能を担うことが推察されるため、単一 RNA の m6A 編集法の開発が期待されている。



3. 研究の方法

RNA メチル化編集プラットフォームの開発

(1) ヒトコドン最適化 dC2c2 融合タンパク質発現ベクターの構築

ヒト細胞における m6A 修飾の導入はスプライシングに影響を与えることが知られており、その過程は転写と共役して起こることが予想される。そのため RNA メチル化編集は核内において達成される必要があると考える。我々はバクテリアの 1 種である *Leptotrichia buccalis* (Lbu) 由来の C2c2 タンパク質の RNA 切断活性を欠損させた cDNA (dCas13a) 配列を Addgene より入手し、ヒト細胞内で発現するベクターである pcDNA3 へ導入した後、その発現を乳がん由来 MCF-7 細胞内で確認した。さらに、より効率のよいタンパク質発現を獲得するためにバクテリア由来のコドン配列をヒトに最適化したコドンに置き換えた cDNA 配列を合成する。この cDNA 配列を用いて RNA 脱メチル化酵素である ALKBH5 と RNA メチル化酵素である METTL3 との融合タンパク質発現ベクターを構築する。これらの融合タンパク質の融合部位は可塑性の低いアミノ酸として Ala を 1~5 個配置したもの (Ala 融合型) と、可塑性の高いアミノ酸として Gly を配置した構造 (Gly 融合型) を作成する。また dCas9 において核内局在の有効性が示された N 末端と C 末端の両側に NLS を配置する。

(2)gRNA と crRNA とのキメラ gRNA 発現ベクターの構築

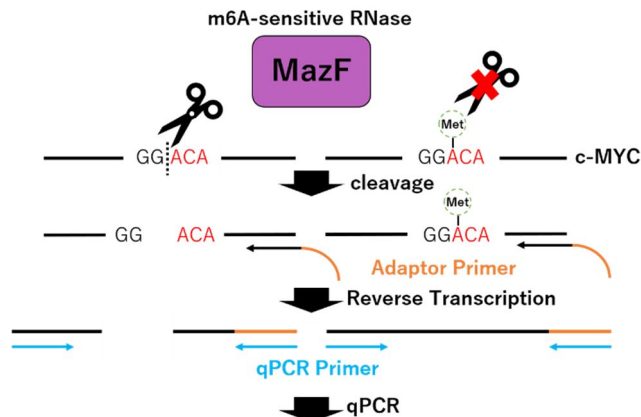
Lbu 由来の C2c2 タンパク質が認識し結合する crRNA 配列は報告されており、この RNA 配列を U6 プロモーターを用いて発現するベクターを構築する。また gRNA とのキメラ型 RNA の発現を行うため、gRNA 導入部位は制限酵素サイトが消失するように Bbs I 認識配列を 2 箇所を導入する。最終的にキメラ gRNA 発現領域は dC2c2 発現ベクターに統合し、単一ベクターとして構築する。

(3)ヒト細胞内での RNA メチル化編集システムの構築とその評価

RNA メチル化編集は最初に十分な発現量を示し単一箇所の m6A 部位が知られている c-MYC 遺伝子をモデル標的とする。c-MYC 遺伝子の pre-mRNA の m6A 部位近傍には dC2c2 が認識可能な PAM 配列 (H:non-G) が多数存在する。そこで gRNA の設定部位の違いによる RNA メチル化編集効率を検討する。標的となる 1 本鎖 RNA は二次構造に加えて、らせん状のねじれ構造をとる。このねじれ構造は約 5 塩基で 1 回転するため、融合タンパク質の位置は厳密に制御される必要がある。そこで Ala 融合型と Gly 融合型の発現ベクターを用いて詳細な解析を行う。m6A の比較定量には m6A 抗体を用いた RNA 免疫沈降 (m6A-IP) が有効であることが示されている。そこで m6A-IP 産物を qPCR によって評価する。またオフターゲット効果の検証は任意の m6A 部位で行う。ここで十分に効率のよいシステムの構築が達成された時点で、次世代シーケンサーを用いた m6A-IP seq を行い、標的 RNA の編集効率とオフターゲット効率を検証する。

(4)メチル化感受性 RNaseMazF を用いたメチル化評価法の開発

メチル化感受性 RNase である MazF 酵素は m6A の標的配列を含む GGACA 配列をメチル化の有無によって切断する。そこでモデル標的である c-MYC 遺伝子の 1088 番目の塩基より続く GG(m6A)CA 配列を標的とする。この部位における RNA の切断効率をメチル化効率として qPCR 法によって解析する手法を検討する (下図)。



乳がん関連遺伝子群をモデル標的とした RNA メチル化編集

(5)SOD1, c-MYC, FOXA1 を標的とした RNA メチル化編集とスプライシング解析

我々はこれまでの m6A の研究においてエストロゲンと m6A 修飾との相関を見出してきた。そこでエストロゲン依存性ヒト乳がん由来の細胞株として MCF-7 細胞を用いる。MCF-7 細胞においてエストロゲン応答性を示す遺伝子群のうち m6A 修飾を受ける遺伝子群は 1000 以上存在する。その中でこれまでに解析を進めてきた 3 種類の遺伝子群

をモデル標的として、m6A 修飾の改変に伴うスプライシング異常の解析を行う。乳がんの進行において、これらの遺伝子群は特にラストエキソンにおいて多くの異常なアイソフォーム生成が見出されている。そこで m6A 修飾を編集することによりスプライシングアイソフォームの形成とその作用機序の解析を行う。

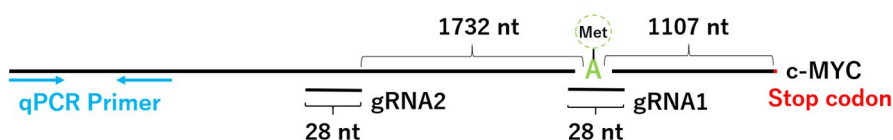
(6)乳がん幹細胞の未分化維持にかかわる遺伝子群の RNA メチル化編集

m6A 修飾は ES 細胞や生殖細胞における未分化性の維持に重要である報告が蓄積されてきている。また RNA メチル化関連遺伝子のノックアウトマウスでは精子形成不全を呈することが知られている。そこで、がん幹細胞におけるメチル化の意義を検討するために、がん幹細胞の未分化性維持にかかわる遺伝子群の RNA メチル化を編集する。MCF-7 細胞では、がん幹細胞を分離する手法が確立されている。我々はすでに単離した MCF-7 幹細胞群を取得しており、これらの細胞群を用いて未分化維持にかかわる遺伝子群の RNA メチル化編集を行い、未分化性を検証する。

4. 研究成果

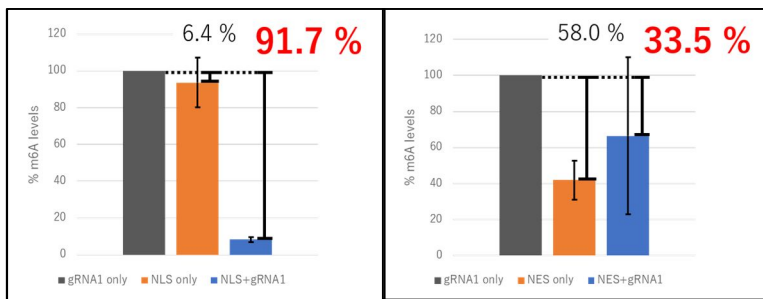
(1)m6A 抗体を用いた免疫沈降法(m6A-IP)による評価

m6A 抗体を用いた免疫沈降法による特異的な RNA 脱メチル化の評価法を検討した。標的 c-MYC 遺伝子に対して gRNA を 2 種類設計した。gRNA1 は標的 m6A と相補的な配列で、gRNA2 は gRNA1 から 1732 nt 上流の配列に相補的とした。また、qPCR の評価プライマー gRNA2 より上流で設計した。また、終止コドンから 1107 塩基上流にある GGAC 配列の m6A を標的に用いた。



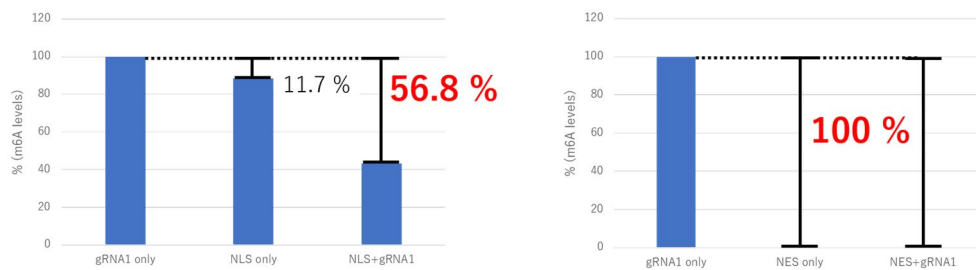
gRNA1 のメチル化 RNA 量と比べて、NLS only は 6.4 %、NLS+gRNA1 は 91.7 %と大幅に減少し、NES only は 58.0 %、NES+gRNA1 は 33.5 %減少した。gRNA1 を用いた結果から、NLS あるいは NES 配列を付加した融合タンパクと導入することで特異的な RNA の脱メチル化が起こっていると考えられる。NLS を付加した融合タンパク質は非常に有効であり、NES を付加した融合タンパク質は

gRNA なしで非特異的な脱メチル化活性を有することが明らかとなった。



(2)m6A 感受性 RNA 切断酵素 MazF を用いた評価

m6A 感受性 RNA 切断酵素 MazF を用いて gRNA1 による脱メチル化システムを評価した。トランスフェクション後の細胞から RNA を Direct-zol™ RNA Miniprep Kits で抽出し、抽出した RNA を DNase で処理し、m6A 感受性 RNA 切断酵素 MazF で ACA 配列特異的に切断した。アダプタープライマーで逆転写を行い、評価プライマーを用いて qPCR を行い、メチル基特異的切断量の評価した。その結果、NLS only は 11.7 %、NLS+gRNA1 は 56.8 %メチル基特異的に切断されていることが確認された。また NES only と NES+gRNA1 のどちらも標的 m6A が脱メチル化され、MazF による mRNA 切断が 100 %起こることが確認された。



(3)総括

本研究の目的は ALKBH5 と Cas13a の融合タンパク質を用いた塩基配列特異的な脱メチル化システムの開発である。これに対し研究を行った結果、この融合タンパク質によって塩基配列特異的な脱メチル化を確認した。これらの単一 m6A 脱メチル化システムを用いて新たな RNA メチル化修飾メカニズムの解明に応用したい。

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 Sasithorn Wanna-Udom, Minoru Terashima, Hanbing Lyu, Akihiko Ishimura, Takahisa Takino, Matomo Sakari, Toshifumi Tsukahara, Takeshi Suzuki	4. 巻 524(1)
2. 論文標題 The m6A Methyltransferase METTL3 Contributes to Transforming Growth Factor-beta-induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Lung Cancer Cells Through the Regulation of JUNB	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 150-155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.01.042	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 盛真友
2. 発表標題 RNAメチル基転移酵素METTL3の転写共役機構
3. 学会等名 HOKURIKU RNA CLUB
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北陸科学技術大学院大学 塚原研究室 http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/tsukahara-www/index.html
--

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
---------------------------	-----------------------	----