

研究終了報告書

「細胞内で機能する新規核酸触媒の開発」

研究期間： 2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者： 山上 龍太

1. 研究のねらい

本研究は、新規核酸触媒の開発を行い、それを細胞内で機能させることによって、細胞を制御する技術を新たに構築しようとするものである。

近年の研究により、RNA は単なるタンパク質の設計図ではなく、さまざまな機能を持つことがわかってきている。例えば、RNA は転写後に様々な編集加工の工程を経ることで、その構造や配列を変化させる。これによって、遺伝子の発現制御や、タンパク質会合、RNA のメチル化など、様々な細胞内現象の制御に関わっている。その一方で、RNA の構造機能の破綻は、ダウン症候群やミトコンドリア病、がんなどをはじめとする様々な病気や疾患の原因となっている。

現在の創薬市場の中心にある抗体医薬や低分子医薬の標的は、主にタンパク質である。一方、核酸医薬は、DNA、RNA、タンパク質を標的にできることから、様々な疾患因子に対して有効に作用する薬剤を開発できる可能性を秘めている。このような背景の元、新しい創薬モダリティ・治療方法の可能性として、細胞内で核酸触媒を機能させ、RNA の機能を制御・改変することで、RNA の機能破綻に関連する疾患を抑制・治療することができるかもしれないことを着想した。

本研究では、2020 年にドイツのグループが開発したメチル基転移リボザイム(MTR1)をモデル核酸触媒として利用した。MTR1 は、6-メチルグアニン塩基をメチル基供与体として用いて、RNA の任意のアデノシンの 1 位をメチル化し、1-メチルアデノシンを合成するリボザイムである。本リボザイムは、その構造や性質が先行研究によって詳細に解析されているため、モデル核酸触媒として最適であると考えた。しかしながら、MTR1 のメチル基供与体である 6-メチルグアニン塩基は細胞内に存在しない。すなわち、MTR1 を細胞内で機能させるためには、細胞外から 6-メチルグアニンを投与する必要がある。さらに、メチル基転移リボザイムを高スループットにスクリーニング解析する手法がないこと、真核生物内での細胞内発現系が実現していないことなど、核酸創薬の技術基盤を構築する上で解決すべき課題がいくつも残っている。本研究では、(A)メチル基転移リボザイムの高スループット解析技術の開発、(B)新規メチル基転移リボザイムの創出、(C)RNA による細胞内触媒反応系の確立の 3 つに着目し、これらの課題を解決すべく、研究を実施した。

2. 研究成果

(1) 概要

(A)メチル基転移リボザイムの高スループット解析技術の開発

次世代 DNA シーケンス技術と変異プロファイリング法を併用することで、メチル基転移リボザイムの機能を高スループットに分析する技術の開発を試みた。本技術を検証するために、既存のメチル基転移リボザイムの全てのパターンの 1ヌクレオチド変異体を作成し、その変異体のリボザイム活性を分析した。変異プロファイリングから得られたデータは、メチル基転移リボザイムの立体構造に矛盾しないことが明らかになった。すなわち、本手法の開発により、多数

のメチル基転移リボザイムのリボザイム活性を一塩基分解能で追跡することができるようになった。

(B) 新規メチル基転移リボザイムの創出

(A)で開発した解析技術を用いて、新規メチル基転移リボザイムの創出を試みた。既存のメチル基転移リボザイムである MTR1 は、試験管内進化法によって創出されている。この方法を参考にして、ランダム RNA プールから S-アデノシル-L-メチオニンをメチル基供与体として用いて 7-メチルグアノシン(m7G)を合成するリボザイムの選抜を試みた。試験管内進化実験によって濃縮された RNA 画分を次世代シーケンスによって配列特定し、候補配列の絞り込みを行った。得られた候補配列を(A)で開発した高スループット解析技術を用いて、分析し、複数の最終候補配列を得た。最終候補配列を生化学的に分析したところ、確かに S-アデノシル-L-メチオニンに由来するメチル基が候補 RNA に転移されていることを確認した。

(C) RNA による細胞内触媒反応系の確立

細胞内でリボザイムが機能しているかを検証するために、MTR1(1-メチルアデノシン合成リボザイム)遺伝子をプラスミド上にクローニングした。ガラクトース依存的に RNA の発現を誘導できる Gal1 プロモーターを用いた。本プラスミドを用いて、酵母を形質転換し、RNA を発現させた。逆転写 PCR にて RNA の発現を検出できた。

(2) 詳細

(A) メチル基転移リボザイムの高スループット解析技術の開発

メチル基転移リボザイム(MTR1)は、2020 年に Scheitl らによって創出された新しい核酸触媒である (Scheitl et al, Nature, 2020)。本研究を開始するにあたり、まず、MTR1 を調製し、その触媒活性を測定した。MTR1 は、確かに 1-メチルアデノシン(m1A)を任意の場所に合成する触媒活性を保持していることを確認できた。その一方で、その反応効率は低く、6 時間の反応で、標的部位に対して、10%未満しか反応しないことが明らかになった。そこで、MTR1 のリボザイム活性の基本性質を理解するために、カリウムイオンの濃度と pH 依存性を検証したところ、細胞内のカリウムイオン濃度 (~150 mM) と pH 条件 (6.5~7.0) で、MTR1 は十分なリボザイム活性を示すことが明らかになった。そこで、MTR1 の配列と触媒活性との相関を検出すべく、高スループット解析技術の開発をおこなった。具体的には、次世代 DNA シーケンス技術に変異プロファイリング法を組み合わせた方法を開発した。まず、MTR1 の触媒ドメインにおいて、全てのパターンの一塩基変異体をデザインし、MTR1 変異体混合物を調製した。この MTR1 変異体混合物と 6-メチルグアニン塩基を用いて、メチル基転移反応を行った。ついで、RNA を cDNA に変換した。この際、MTR1 内の標的部位に 1-メチルアデノシンが合成されている場合、その部位と相補な cDNA に変異が導入される。変異部位を次世代 DNA シーケンスによって解析することができる。標的部位の変異率が高いことは、その MTR1 変異体の触媒活性が高いことを示唆している。一方で、標的部位の変異率が低いことは、その MTR1 変異体の触媒活性が低いことを示唆している。次世代 DNA シーケンスのデータを変異プロファイリング法によって分析したところ、全ての MTR1 変異体の触媒活性を検出することができた。本データから、MTR1 の触媒ドメインの中でも L2 領域と L4 領域に触媒活性に重要なヌクレオチドが集中していることが予想された。本結果を MTR1 の立体構造上にマッピングしたところ、リボザイム活性に重要であると示唆されたヌクレオチドは、メチル基供与体である 6-メチルグアニン塩基と標的アデノシ

ンを適切な空間距離と角度に固定する役割を果たしているヌクレオチドであることが確認できた。以上のことから、変異プロファイリング解析から得られた情報は、MTR1 の立体構造に矛盾しないことが明らかになった。本手法は、原理上、他のメチル基転移リボザイムに応用できる。さらに、本手法は、理論上、5000種以上のリボザイムを一度に分析できるため、スループット性に長けており、さまざまな応用が期待できる。本研究成果を下記の論文としてまとめた。

(1) High-Throughput Mutational Analysis of a Methyltransferase Ribozyme

Ryota Yamagami, Hina Kubota, Emi Kohno, Hiroyuki Hori

Frontiers in RNA Research, in press

(B) 新規メチル基転移リボザイムの創出

本プロジェクトが開始した時点で報告されていたメチル基転移リボザイムは、1-メチルアデノシンを合成する MTR1 のみであり、メチル基転移リボザイムとしての機能は、限定的であった。そこで、この問題点を解決するために、本プロジェクトでは、試験管内進化実験により 7-メチルグアノシンを合成するリボザイムの創出を試みた。試験管内実験では、40 ヌクレオチドから構成されるランダム化された領域と一定領域を持つ RNA プールを出発物質として用いた。さらに、S-アデノシル-L-メチオニンをメチル基供与体として用いた。以下に、試験管内進化実験の方法を示した。

- (a) RNA プールを S-アデノシル-L-メチオニンと様々な 2 価の陽イオンの存在下で反応させた。
 - (b) 7-メチルグアノシンに特異的に結合する抗 7-メチルグアノシン抗体を用いて、RNA プールの中から 7-メチルグアノシンをもつ RNA を精製した。
 - (c) 精製した RNA を逆転写 PCR し、RNA プールの鋳型 DNA を調製した。
 - (d) 鋳型 DNA を用いて、RNA を試験管内転写によって調製した。
- (a)-(d)のステップを1ラウンドとして、この実験を 8 ラウンド繰り返した。8 ラウンド後の RNA プールにおけるメチル基転移活性を放射性同位体で標識された S-アデノシル-L-メチオニンを用いて評価した。その結果、銅イオンとマグネシウムイオンの両方が存在する条件で、わずかにメチル基転移活性を検出することに成功した。そこで、本 RNA プールに存在する RNA 配列を取得するべく、次世代 DNA シーケンス解析をおこなった。取得した約 900 万リードから候補配列の絞り込みをおこなった。具体的には、相同配列のクラスタリング、サイズ選抜、リード数選抜を経て、145 種類のリボザイム候補配列を得た。145 種類のリボザイム候補の転写産物混合物を調製し、S-アデノシル-L-メチオニンと銅・マグネシウムイオンの存在下で反応させた。反応後の RNA を(A)で開発した高スループット解析技術を用いて分析したところ、標的のグアノシンに高い変異率を示すリボザイム候補配列を同定した。これらのリボザイム候補の転写産物を個別に調製し、生化学解析をおこなったところ、S-アデノシル-L-メチオニン由来のメチル基がこれらの RNA に転移されていることを確認できた。

(C) RNA による細胞内触媒反応系の確立

本プロジェクトでは、MTR1 および創出したリボザイム遺伝子を細胞に導入し、細胞内でリボザイムを発現させることで、リボザイムによる細胞内触媒反応系を確立することを目指した。本

研究では、tRNA 1-メチルアデノシン合成酵素(Trm6-62)遺伝子を欠損した酵母を用いた。本酵母株は、tRNA 中の 1-メチルアデノシンを欠損しており、35 度以上の温度で生育阻害の表現系を示すことが過去に報告されている。よって、この酵母株に MTR1 遺伝子を導入し、1-メチルアデノシン合成を復帰させることができれば、35 度において、遺伝子破壊株の生育表現系が野生株様に復帰すると予想した。本システムを用いることで、簡便に MTR1 の細胞内機能を評価することができる。リボザイム遺伝子を導入するためのプラスミドベクターとして、ガラクトースプロモーターを保持したプラスミドを使用し、ガラクトース依存的に MTR1 遺伝子の転写を制御した。MTR1 は、酵母 tRNA を標的とした配列に最適化し、試験管内反応において標的 tRNA に 1-メチルアデノシンを合成することを確認した。本プラスミドを用いて、酵母遺伝子破壊株を形質転換し、ガラクトースによって、MTR1 の発現を誘導した。ついで、細胞から全 RNA を調製し、逆転写 PCR を行ったところ、MTR1 と予想されるバンドをアガロースゲル上で確認することができた。すなわち、MTR1 が酵母細胞内に発現していることが示唆された。現在、放射性同位体ラベルを施した DNA プライマーと逆転写反応を利用したプライマー伸長法によって、tRNA の標的部位に対するメチル基の導入を検証している。また、調製した tRNA 画分をヌクレオシドに分解し、高速液体クロマトグラフィーを用いて分析し、標的 tRNA の 1-メチルアデノシンの含有量を定量している。

3. 今後の展開

ACT-X の研究期間において、完遂できたプロジェクト(A)を論文として報告した。一方、完遂できなかったプロジェクト(B)と(C)について、その目標を達成するべく研究を続ける。プロジェクト(B)に関しては、7-メチルグアノシン合成リボザイムの創出を目指しつつ、その他の修飾ヌクレオチド、例えば、シュードウリジンや4-チオウリジンなどを合成するリボザイムの創出にも注力する。7-メチルグアノシン合成リボザイムを創出することができた場合、核酸創薬研究への応用だけではなく、例えば、金属イオンのセンサー等への応用も期待でき、工学的な分野への波及効果が期待できる。また、プロジェクト(C)に関しては、引き続き、リボザイム活性を細胞内でコントロールするべく、細胞内触媒反応系の最適化を行う。

4. 自己評価

研究開始当初に定めた3つの目標のうち、1つを完遂することができたが、残り2つに関しては、目標を達成することができなかった。よって、研究目的の達成状況からすると、期待通りの成果が得られなかったと評価せざるを得ない。しかしながら、ACT-X の研究期間に、自身の今後の研究につながる結果や萌芽的な結果、経験、人脈等を得ることができた。そのため、研究開始時点に比べて、研究者として大きく前進できたと自負している。研究が予定通り進捗しなかった理由としては、研究を開始した2021年は、現所属研究室に着任直後であり、十分な予備実験を得られていなかったこと、研究の立ち上げに時間を要してしまったこと、研究計画の量的な問題等があげられる。本研究は、完遂には至っていないという理由から、現時点においては、期待した科学技術及び社会・経済への波及効果は、得られていない。当初予定していた研究成果を達成するべく、今後も、本研究を継続したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

1. Ryota Yamagami, Hina Kubota, Emi Kohno, and Hiroyuki Hori, “High-Throughput Mutational Analysis of a Methyltransferase Ribozyme”, *Frontiers in RNA Research*, in press

研究期間累積件数: 1件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Ryota Yamagami, Takumi Wada, Tsuyoshi Morita, Hina Kubota, and Hiroyuki Hori, “High-throughput analysis/screening of methyltransferase ribozymes by mutational profiling”, *The 50th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*, 2023/11/02.