

RNA のたった一か所のメチル化修飾が
タンパク質におけるアミノ酸配列の多様性を生み出す
—RNA スプライシング機構における m⁶A 修飾の役割を解明—

1. 発表者：

石神 宥真（研究当時：東京大学 大学院工学系研究科化学生命工学専攻 特任研究員／
現：Postdoctoral Fellow, Cold Spring Harbor Laboratory）
大平 高之（東京大学 大学院工学系研究科化学生命工学専攻 助教）
磯川 由衣（研究当時：東京大学 大学院工学系研究科化学生命工学専攻 修士課程2年）
鈴木 穰（東京大学 大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻 教授）
鈴木 勉（東京大学 大学院工学系研究科化学生命工学専攻 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆ 様々な生命現象にかかわる N⁶メチルアデノシン（m⁶A）修飾（注1）が、遺伝子の転写後に mRNA 前駆体が切断・連結されるスプライシング（注2）において、重要な役割を演じていることを世界で初めて解明した。
- ◆ スプライソソーム（注3）と mRNA 前駆体の相互作用において、U6 snRNA（注4）の m⁶A 修飾が特定の塩基配列を持つイントロン（注5）との結合を安定化することで、スプライシングの効率を上げる仕組みを見いだした。この機構は U5 snRNA とエキソン（注6）間の相互作用が弱い時に、特に重要であることが判明した。
- ◆ ゲノム中に多数のイントロンを有する真核生物では、U6 snRNA の m⁶A 修飾が 5' スプライス部位におけるエキソン配列に自由度を与えることで、タンパク質のアミノ酸配列の多様性を許容する役割があると考えられる。

3. 発表概要：

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻の石神宥真特任研究員（研究当時）と鈴木勉教授を中心とする研究グループは、U6 snRNA 上の m⁶A 修飾を欠損した分裂酵母株のトランスクリプトーム解析（注7）および遺伝学と生化学を駆使した解析により、mRNA 前駆体のスプライシング反応における m⁶A 修飾の役割を解明した。m⁶A 修飾の欠損により、大きく影響を受けるイントロンの 5' スプライス部位の配列の特徴から、m⁶A 修飾は A-A の塩基対合を強めることにより、U6 snRNA とイントロンの相互作用を安定化する役割があることが判明した。また、この相互作用は、U5 snRNA とエキソンとの相互作用が弱い時に、特に重要であることも判明した。この結果から、多数のイントロンを有する真核生物では、5' スプライス部位において、m⁶A 修飾が U6 snRNA とイントロンの相互作用を安定化することで、U5 snRNA が認識するエキソン配列に自由度を与え、タンパク質のアミノ酸配列の多様性を許容する役割があると考えられる。

本研究は、その発見から 40 年以上謎に包まれていた U6 snRNA 上の m⁶A 修飾の役割を解明しただけでなく、スプライソソームの重要な構成因子である U5 snRNA と U6 snRNA が協調的

に mRNA 前駆体を認識することの機能的な重要性を明らかにした。また多数のイントロンを獲得し、mRNA スプライシングを変化させることで複雑な生命現象を実現した高等真核生物の進化において、RNA 修飾の役割を初めて明らかにした研究成果である。将来的には、RNA 修飾と mRNA スプライシングの関係をより深く理解することで、遺伝子発現調節機構の探究や、ヒトの疾患の発症機構の解明につながることを期待される。本研究成果は 5 月 28 日（金）に科学誌「*Nature Communications*」に掲載される予定である。

4. 発表内容：

RNA は DNA に記された遺伝情報をタンパク質へと変換する役目を担う重要な生体高分子である。さらに、RNA は遺伝子発現を転写や翻訳の各段階で複雑に制御する機能を持ち、さまざまな生命現象に関与することが明らかになりつつある。RNA は転写後に多種多様な修飾を受けて成熟し、その本来の機能を発揮することが知られている。現在までに約 150 種類の RNA 修飾がさまざまな生物種から見つかっている。最近では RNA 修飾の研究をエピトランスクリプトミクスと呼び、転写後段階における新しい遺伝子発現調節機構として、生命科学に大きな潮流を生み出している。^N-メチルアデノシン (m⁶A) は、真核生物の mRNA をはじめ種々の RNA に存在することが知られている。m⁶A 修飾は、RNA の安定性や翻訳に関与することで遺伝子発現を調節し、減数分裂、性決定、概日周期、細胞の増殖・分化・初期化など多くの生命現象に関わっていることが明らかにされつつある。

真核生物において、DNA にコードされたタンパク質遺伝子のアミノ酸配列の情報はエキソンと呼ばれる遺伝子断片に記されており、エキソンとエキソンの間には翻訳されないイントロンと呼ばれる配列が介在している。タンパク質遺伝子は mRNA 前駆体として転写された後に、スプライシングと呼ばれる反応によってエキソンとイントロンの間が切断され、イントロンが取り除かれたのちに、エキソン同士が連結されることで成熟した mRNA が完成する。このスプライシング反応は、核内低分子 RNA である複数の U snRNA (U1, U2, U4, U5, U6 の 5 種類の U snRNA から成る) と多数の関連タンパクが形成するスプライソソームと呼ばれる巨大な複合体の中で進行する。スプライシング反応の第一段階では、mRNA 前駆体 5' スプライス部位が切断されるが、この切断部位を正確に決めるために、U5 snRNA がエキソン側を、U6 snRNA がイントロン側を認識することが重要である。U6 snRNA には RNA 触媒の活性があり、スプライシング反応において中心的な役割を担う。U6 snRNA には複数の RNA 修飾が含まれているが、5' スプライス部位を認識する ACAGA ボックス（注 8）と呼ばれる領域に m⁶A 修飾を一か所持つことが知られている。この m⁶A 修飾は哺乳動物から分裂酵母に至る幅広い真核生物で保存されていることから機能的な重要性が予測されていたが、スプライシング反応においてどのような役割を担っているかは不明であった。

本研究グループは、分裂酵母において U6 snRNA に m⁶A 修飾を導入する酵素 (Mt116) を同定した。この酵素の破壊株 (*mt116Δ*) は、DNA 損傷に対する感受性の増加、高塩濃度条件に対する耐性の低下、ミトコンドリア活性の低下などを示し、U6 snRNA の m⁶A 修飾の生理学的な重要性が示唆された。

m⁶A 修飾の機能を解析するために、*mt116Δ* 株の大規模なトランスクリプトーム解析を行い、

全 mRNA を対象としたスプライシングに与える影響を観察した。その結果、*mt116Δ* 株においてスプライシング効率が顕著に低下し、mRNA 中に保持されたイントロンを多数発見した (図 1 A)。一定以上のリード数をもって検出されたイントロンを対象にスプライシング効率を評価するスコアを計算し、m⁶A 修飾の欠損により強く影響を受けたものと、影響を受けなかったものについて 5' スプライス部位周辺の配列を比較したところ、強く影響を受けたイントロンは、4 番目の残基にアデノシン (A) を有すること (A4 イントロン) が判明した (図 1 B)。スプライソソームの複合体 B (B complex) において、イントロンの 4 番目の残基は U6 snRNA の ACAGA ボックスが 5' スプライス部位を認識した際に m⁶A と直接対合する位置にある (図 1 B) ことから、m⁶A 修飾が A-A の対合を安定化すると考えられた。次に、スプライソソーム中の U6 snRNA と A4 イントロンの相互作用を模したヘアピン RNA を作成し、m⁶A 修飾の有無と 4 番目の残基の違いによる熱安定性を計測した。その結果、イントロン 4 番目が A である場合に、m⁶A 修飾が A-A 対合を安定化する効果があることが判明した。さらに、レポーター遺伝子を作成し、イントロンの 4 番目の塩基を置換して、野生株と *mt116Δ* 株においてスプライシング効率を比較したところ、U6 snRNA の m⁶A 修飾は A4 イントロンのスプライシング効率を向上させる機能があることが判明した。

A4 イントロンの中で m⁶A 修飾の欠損がスプライシングに与える影響を詳しく解析したところ、エキソン側のトリプレット配列 (position -1 から -3) が AAG 配列に類似しているほど、影響を受けにくいことが判明した (図 1 B)。エキソンのトリプレット配列 AAG は、U5 snRNA のループ I と呼ばれる領域と相補的であり、この配列を有する A4 イントロンは U5 snRNA と安定に結合できるために m⁶A 修飾が欠損してもスプライシング効率が低下しないと考えられた。実際に、*mt116Δ* 株にレポーター遺伝子を導入し A4 イントロンのトリプレット配列を AAG 配列に近づけるほど、スプライシング効率が大きく向上した。さらに、変異したトリプレット配列と相補的なループ I を持つ U5 snRNA を発現させることで、m⁶A 欠損により低下したスプライシングが一部改善することが判明した。

以上の結果から、A4 イントロンにおいて、5' スプライス部位のエキソン側トリプレット配列を U5 snRNA が強く認識できる場合は U6 snRNA の m⁶A 修飾の有無にかかわらずスプライシングが効率よく進行するが、エキソンと U5 snRNA の相互作用が弱い場合 m⁶A 修飾が無いと U6 snRNA がイントロンを安定に認識できずに、スプライシングが効率よく行われないうモデルが提唱された (図 2)。このことは、スプライソソームが mRNA 前駆体を認識する際に U5 snRNA と U6 snRNA が協調して 5' スプライス部位を認識することを意味している。図 3 では今回のモデルを車の運転に例えた。A4 イントロンの 5' スプライス部位をハンドルに例えると、U5 snRNA が左手、U6 snRNA が右手であり、どちらか一方の手がハンドルをしっかりと握っている場合は安全な運転が可能であるが、ハンドルから両手を同時に離すと車の制御ができなくなる。

ゲノムにおけるイントロンの総数は、高等真核生物において増加傾向がみられる。ヒトには 20 万個、植物には 12 万個、線虫は 10 万個、分裂酵母でも約 5000 個のイントロンが存在する。これらの生物には共通して m⁶A 修飾酵素である METTL16 あるいはそのホモログ (相同体) を持ち、U6 snRNA に m⁶A 修飾を有する。一方で、出芽酵母 (300 個) やシズン紅藻 (27

個) など、イントロンの総数が少ない生物では U6 snRNA に m⁶A 修飾がないことが知られている。イントロンの数が増加するにつれて、エキソンのトリプレット配列に制約があると、タンパク質のアミノ酸配列に自由度が制限されることから進化的には不利に働くと考えられる。U6 snRNA に m⁶A 修飾を獲得することで、5' スプライス部位におけるエキソンのトリプレット配列に自由度を与え、タンパク質のアミノ酸配列の多様性を許容する役割があると考えられる。本研究は、RNA スプライシングにおける m⁶A 修飾の新たな機能を明らかにし、エピトランスク립トミクス研究のみならず真核生物ゲノムの進化を理解する上でも新たな視点を提供している。

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) の基盤研究 (S) 「RNA 修飾の変動と生命現象」 (代表: 鈴木 勉、18H05272)、特別研究員奨励費「新規 N6-メチルアデノシン修飾酵素の機能解析」 (代表: 石神 宥真、18J13582)、新学術領域研究「先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム」 (代表: 鈴木 穰、16H06279)、および科学技術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業 ERATO「鈴木 RNA 修飾生命機能プロジェクト」 (研究総括: 鈴木 勉、JPMJER2002) の支援を受けて実施された。

5. 発表雑誌:

雑誌名: 「*Nature Communications*」

論文タイトル: A single m⁶A modification in U6 snRNA diversifies exon sequence at the 5' splice site

著者: Yuma Ishigami, Takayuki Ohira, Yui Isokawa, Yutaka Suzuki, Tsutomu Suzuki

6. 問い合わせ先:

<研究に関すること>

東京大学 大学院工学系研究科化学生命工学専攻

教授 鈴木 勉 (すずき つとむ)

E-mail: ts[at]chembio.t.u-tokyo.ac.jp

<報道に関すること>

東京大学 大学院工学系研究科 広報室

Tel: 070-3121-5626

E-mail: kouhou[at]pr.t.u-tokyo.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

Tel: 03-5214-8404

E-mail: jstkoho[at]jst.go.jp

<JST 事業に関すること>

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部グリーンイノベーショングループ

調査役 加藤 豪 (かとう ごう)

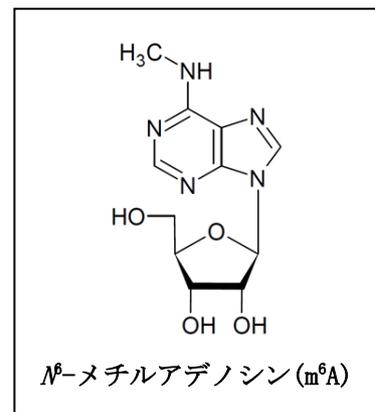
Tel: 03-3512-3528

E-mail: eratowww[at]jst.go.jp

7. 用語解説:

(注1) N^6 メチルアデノシン (m^6A) 修飾

アデニン塩基の N^6 位のアミノ基 ($-NH_2$) の水素のうち片方がメチル基 ($-CH_3$) によって置換された RNA 修飾。真核生物の様々な RNA に含まれるメジャーな RNA 修飾の一つである。ヒトにおいては伝令 RNA (mRNA) をはじめ、ウリジンリッチ核内低分子 RNA (U snRNA) を含む様々な non-coding RNA (タンパク質をコードしない RNA) に存在する。ライター (Writer) と呼ばれる RNA メチル化酵素が SAM (S-アデノシルメチオニン) を基質にメチル基を導入する。 m^6A 修飾により、RNA 間の相互作用が調節され、構造変化が誘起される。mRNA 上の m^6A 修飾はリーダー



(Reader) と呼ばれる RNA 結合タンパクに認識されることで、その情報が読み取られるため、様々な生命現象に関与することが近年の研究により明らかになってきている。

(注2) スプライシング

真核生物のゲノム DNA にコードされたタンパク質遺伝子は、最終的にアミノ酸配列に変換され得る領域 (エキソン) と、取り除かれる部分 (イントロン) が交互に並んで構成されている。これらの配列は mRNA 前駆体として転写されたのちに、エキソンとイントロン間の結合が切断されてイントロンが取り除かれた後に、エキソン同士がつながることで成熟した mRNA が生じる。この一連の反応を RNA スプライシングと呼ぶ。化学的には 2 回のリン酸エステル転移反応が進行する。

(注3) スプライソソーム

mRNA 前駆体のスプライシングを行う複合体のこと。エキソンとイントロンの境界 (5' スプライス部位) とイントロンとエキソンの境界 (3' スプライス部位) 周辺に、U1, U2, U4, U5, U6 snRNA と呼ばれる 5 種の核内低分子 RNA と多数の関連タンパク質が結合することで、mRNA 前駆体の認識とスプライシング反応の進行とともに次々と構成因子を変える複合体が形成される。この一連の反応において出現する複合体を総称してスプライソソームと呼ぶ。はじめに 5' スプライス部位を U1 snRNA が、イントロンのブランチ部位 (のちにイントロンの 5' 端が結合する) を U2 snRNA が認識する。次に 5' スプライス部位のエキソン側を U5 snRNA が、イントロン側を U6 snRNA が認識する。

(注4) U6 snRNA

ウリジンリッチ核内低分子 RNA の一種であり、RNA スプライシングを担うスプライソソーム

の構成要素。mRNA 前駆体の 5' スプライス部位のイントロン側と対合することで認識する。U6 snRNA のリン酸骨格が 2 個のマグネシウムイオンを配位することで、2 回のエステル転移反応を触媒する。

(注 5) イントロン

スプライシングに際して取り除かれる RNA 領域。

(注 6) エキソン

スプライシングによってイントロンが取り除かれた後、互いに連結され残される RNA 配列。アミノ酸配列情報を保持したタンパク質に翻訳される配列はすべてエキソンに含まれる。

(注 7) トランスクリプトーム解析

細胞に発現している全 RNA を大量に配列解析することで、どの遺伝子がどの程度発現しているかを知るための解析技術。得られた RNA 配列 (リード) をリファレンスとしてのゲノム DNA 配列にマッピングし、統計処理を行うことで、遺伝子発現のプロファイルやスプライシングの状態を知ることができる。本研究ではポリ A テールを持つ mRNA を濃縮し、cDNA へ変換した後に次世代シーケンサーを用いて配列解析を行った。

(注 8) ACAGA ボックス

U6 snRNA の内部にある ACAGA という並びの RNA 配列。スプライシングの際に 5' スプライス部位のイントロンと塩基対合を形成することが知られていた。この配列の中央の A が m⁶A 修飾されている。

8. 添付資料:

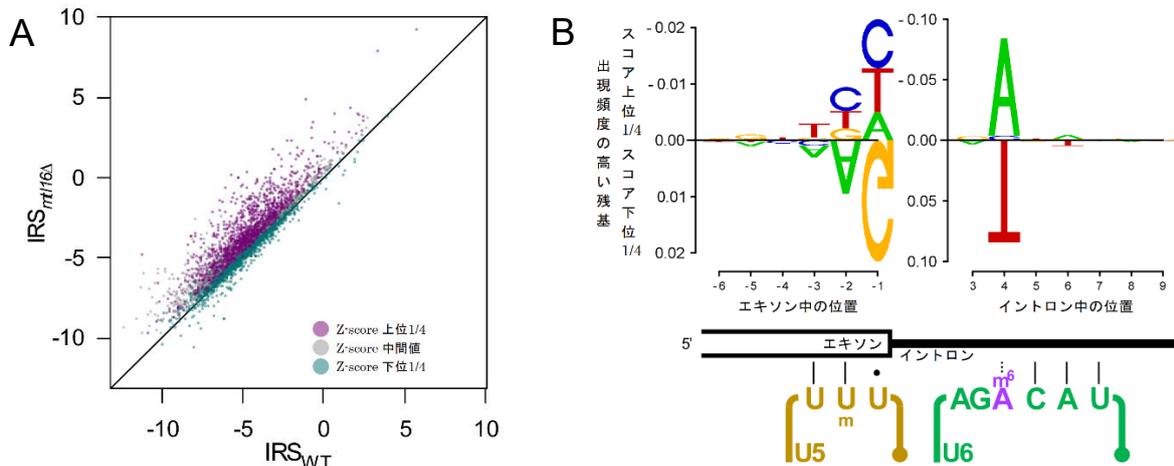


図1 U6 snRNA の m^6A 修飾の欠損は多くのイントロンのスプライシング効率を低下させる

(A)一定以上のリード数をもって検出された全イントロンの保持状態を野生株と *mt116Δ* (破壊) 株の間で比較した散布図。点一つがイントロン一つを表し、mRNA に保持された割合が高いほど IRS (Intron Retention Score) の値が大きくなるため、対角線から左上にあがるほど *mt116Δ* 株においてイントロン保持の割合が高くなることを示す。欠損の影響を受けた度合い (Z-score) を計算し、降順に並べた際に、上位 1/4 のスコアに該当するイントロン群を紫で、下位 1/4 を緑で、残りのものを灰色で表した。

(B) 散布図 (A) において、紫色で示されたスプライシング変化の大きいイントロン群と緑色で示された変化の小さいイントロン群の間で、5' スプライス部位における各残基の出現頻度を比較した。変化の大きいイントロン群は小さい群と比べ 4 残基目の A の出現頻度が高く T の出現頻度が低いこと、またエクソン側のトリプレット配列では AAG の出現頻度が低いことが示されている。

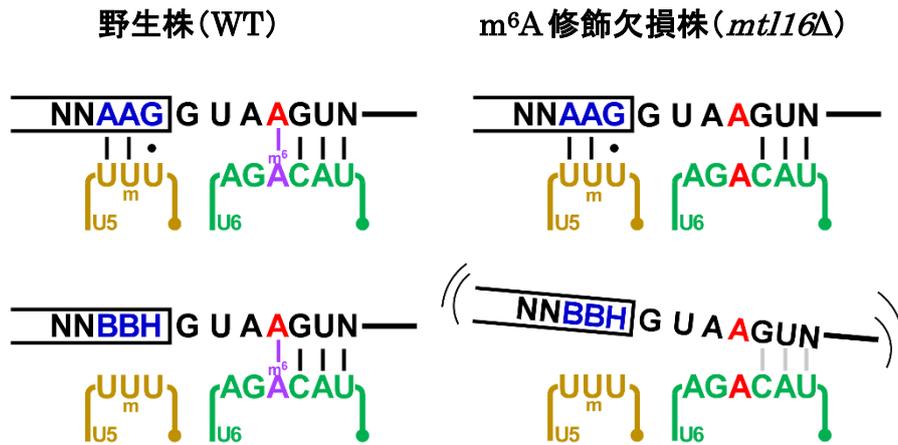


図2 U5, U6 snRNAによる5' スプライス部位の認識と m⁶A 修飾による効果

スプライソソームの複合体 B において、A4 イントロンの 5' スプライス部位を U5 snRNA および U6 snRNA が認識している。U5 snRNA ループ I の UU_mU 配列が、エキソン側のトリプレット AAG 配列を認識し、U6 snRNA の ACAGA ボックスがイントロン側と対合する。野生株において m⁶A 修飾は ACAGA ボックスと A4 イントロンの塩基対合を熱力学的に安定化させるため、U6 snRNA はイントロン側と安定に結合できる。m⁶A 修飾欠損株では、この結合が不安定になるが、エキソン側のトリプレットが AAG 配列の場合は、U5 snRNA のループ I が安定に結合できるため、スプライソソームは 5' スプライス部位を安定に認識できる。一方で、エキソン側のトリプレットが BBH 配列 (B は A 以外、H は G 以外を示す) の場合は、U5 snRNA が安定に結合できないため、U6 snRNA が m⁶A 修飾によってイントロン側と安定に結合することが、A4 イントロンの効率的なスプライシングに重要な役割を担っている。したがって、m⁶A 修飾欠損株では、BBH 配列を持つ A4 イントロンのスプライシング効率が低下する。

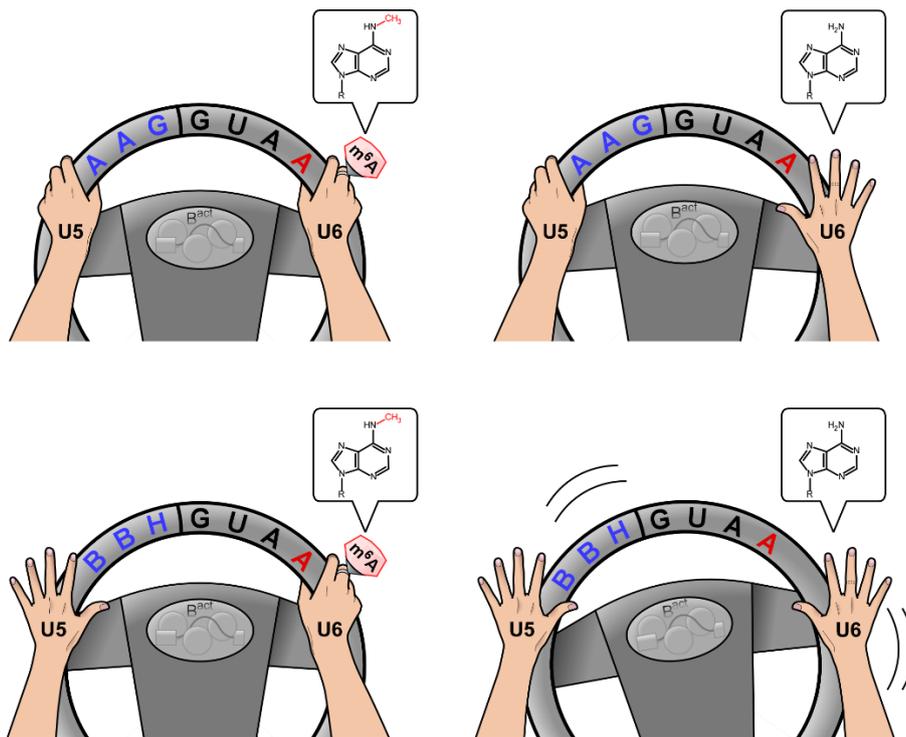


図 3. U5、U6 snRNA による 5' スプライス部位の認識モデル

左手は U5 snRNA、右手は U6 snRNA、ハンドルは A4 イントロンの 5' スプライス部位をそれぞれ表す。エクソン側のトリプレットを AAG または BBH で表記し、イントロン側は GUAA 配列が表記されている。右手の U6 snRNA に指輪で表現された m⁶A 修飾がある場合は、左手の U5 snRNA がハンドルを離していても、右手がしっかり握っている (左下)。m⁶A 修飾がない場合でも、左手の U5 snRNA がハンドルを握っている場合はスプライシングが効率よく進行する (右上) が、左手を離した場合には両手を離れた状態になり、ハンドルの制御ができず、スプライシングの効率が低下する (右下)。