

RNA修飾による赤血球造血制御機構を解明

—RNAのメチル化がDNA修復に必要—

概要

京都大学大学院医学研究科 吉永正憲 助教、竹内理 教授らの研究グループは、RNAメチル化修飾酵素として機能するタンパク質METTL16が、赤血球の分化において重要な役割を果たしていることを見出しました。

ヒトの体内では毎日およそ2000億個の赤血球が常時作られています。この際の急速な細胞分裂や鉄取り込みによって、赤血球の前駆細胞である赤芽球はDNA損傷の原因となるストレスにさらされています。そこで赤芽球は高ストレス環境下でも分化を可能にするシステムを有していると考えられますが、その機構は今まで明らかではありませんでした。本研究ではRNAメチル化修飾酵素METTL16に着目し、この因子がDNA修復に関係する遺伝子の発現を正に調節することで赤芽球分化を可能にすることを見出しました。まずMETTL16を欠損した赤芽球においてDNA損傷が高頻度に関わり、著明な赤血球造血障害が起こることを見出しました。また、METTL16はDNA修復に関わる遺伝子群のmRNAにメチル化修飾を付加することで、これらの発現を正に制御することを明らかにしました。加えて、METTL16は核内でのRNA分解を担う核内エクソソームを介して標的mRNA発現を制御することを見出しました。これらの結果から、METTL16がRNAのメチル化により核内のmRNA代謝を調節することで、DNA修復ならびに赤芽球分化を制御する因子であることが示唆されました。今後、METTL16によるRNAメチル化を制御する方法を開発することで貧血や造血器疾患の治療法につながる可能性があると考えています。

本研究成果は、2022年10月28日に国際学術誌「Nature Communications」にオンライン掲載されました。

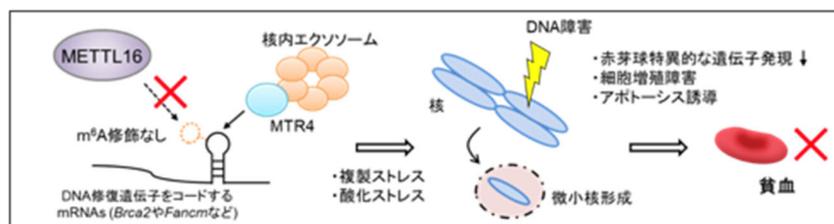


図1. RNA修飾酵素METTL16によるDNA修復調節を介した赤芽球分化制御機構

1. 背景

ヒトの体内では、毎日およそ2000億個の赤血球が常時作られています。赤血球の造血においては、まず造血幹細胞から赤血球の前駆細胞である赤芽球¹が作られ、これらが急速に細胞分裂、分化をすることで大量の赤血球が産生されます。また、赤芽球はヘモグロビン²を産生するため大量の鉄を血中から取り込む必要があります。しかしながら、多量の鉄を取り込むと同時に急速に細胞分裂を行うことは細胞内で酸化ストレス³や複製ストレス⁴を生じ、DNA損傷の原因となります。損傷を受けたDNAが正常に修復されないと細胞分裂が停止したり、細胞死に至り、赤血球造血が障害されます。したがって、赤芽球は高ストレス環境下でも分化を可能にするシステムを有していると考えられますが、その機構は今まで明らかではありませんでした。

RNAは近年メチル化など様々な化学修飾を受けることが明らかになってきました。代表的なRNA修飾としてN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)メチル化が挙げられます。m⁶Aメチル化を受けたmRNAは分解や翻訳、スプライシ

ングなど様々なレベルで制御を受けることが知られていますが、生体におけるm⁶Aの機能については未だ不明な点が多いと考えられます。

そこで、本研究では赤芽球の分化とDNA修復におけるRNA修飾の作用機構について解析しました。

2. 研究手法・成果

本研究では、赤芽球に特徴的な遺伝子発現に寄与する遺伝子を網羅的に同定するため、赤芽球分化過程において発現が強く誘導されるトランスフェリン受容体⁵に着目しました。まずトランスフェリン受容体の発現を制御する遺伝子をゲノムワイドなCRISPRスクリーニング⁶の手法により網羅的に同定しました。この結果、RNA m⁶Aメチル化酵素METTL16がトランスフェリン受容体の発現を正に調節することを見出しました。培養細胞を用いた解析から、METTL16は赤芽球様分化に寄与していること、またMETTL16の発現はマウス造血細胞の中で特に赤芽球において高いこともわかりました。これらのことから、METTL16の赤血球造血における役割が示唆されました。

そこでMETTL16の赤芽球分化における機能を解析するため、METTL16を赤芽球において特異的に欠損したマウスを作製したところ、このマウスは全て胎生致死であることがわかりました。METTL16欠損下では赤芽球分化が著明に障害されており、重度の貧血から胎生致死に至ると考えられました。またMETTL16を欠損した細胞では赤芽球に特徴的な遺伝子（トランスフェリン受容体や赤芽球分化に重要な転写因子KLF1など）の発現が低下していました。加えて、METTL16を欠損した赤芽球ではDNA損傷の頻度が増加しており、その結果生じるアポトーシス誘導分子カスパーゼ-3の活性化も認められました。タンパク質分解酵素であるカスパーゼは、赤血球の分化に必要なトランスフェリン受容体やKLF1の発現を誘導する転写因子GATA-1を分解することが知られており、実際METTL16欠損マウスでGATA-1の発現は低下していました。これらのことから、METTL16欠損赤芽球ではDNA損傷に伴うカスパーゼの活性化により、GATA-1の分解が誘導され正常な赤芽球分化が阻害されることが示唆されました。

次に、METTL16がどのように赤芽球分化を制御するのか検討しました。METTL16はRNA m⁶A修飾酵素として知られていることから、METTL16欠損細胞におけるm⁶A修飾の変動を検討しました。この結果、METTL16により修飾を受ける配列は主としてCAGやAGリッチな部位に存在することがわかりました。興味深いことにDNA修復に関わる遺伝子群におけるm⁶A修飾が特に低下していることが明らかになりました。また、m⁶A修飾を受けるDNA修復関連遺伝子群のmRNAの発現は著明に低下していました。次に、DNA修復関連遺伝子の中でも代表的なBrca2とFancmに着目してMETTL16により修飾を受ける部位を検討したところ、これらのmRNAに存在する2次構造中にあるACAGAR配列（下線部が修飾部位）が修飾を受けることを見出しました。これらの配列を変異させるとMETTL16により発現調節を受けなくなることから、METTL16はm⁶A修飾を介してBrca2やFancmをはじめとするDNA修復関連遺伝子の発現を正に調節する作用を有していることが明らかになりました。

最後に、METTL16がどのようにして遺伝子発現を調節するのか検討しました。このような制御に関連する因子を探索するため、CRISPRi⁷スクリーニングの手法を用いた遺伝学的相互作用解析⁸により、大規模にMETTL16関連遺伝子の同定を行いました。この結果、核内のRNA分解装置である核内RNAエクソソームと、その主要な結合因子MTR4がMETTL16と強い遺伝学的相互作用を有する遺伝子として同定されました。実際、MTR4を細胞で欠損させると、Brca2やFancmなどのDNA修復関連遺伝子や、トランスフェリン受容体やKLF1などの赤芽球分化関連遺伝子のMETTL16による遺伝子発現変化が起こらなくなることがわかりました。

これらの結果から、METTL16がDNA修復関連遺伝子の核内でのmRNA代謝を調節することで、赤芽球分化を可能にする因子であることが明らかになりました。

3. 波及効果、今後の予定

本研究では、METTL16を介したRNA修飾が赤芽球分化にとって重要な役割を果たすことを明らかにしました。近年エピトランスクリプトームの制御異常は、癌や遺伝性疾患など様々なヒト疾患の発症に関与していると考えられるようになりました。METTL16はDNA損傷応答や赤血球造血の制御に重要であることから、METTL16の発現や活性の変化が貧血や血液悪性腫瘍などの疾患にも関連している可能性があります。今後の研究で、そのようなヒトの病態におけるMETTL16を介したRNAメチル化の役割が明らかになることが期待されます。

また、本研究ではMETTL16のほかにも多数のRNA結合タンパク質をスクリーニングにおいて同定しており、これらもまた造血の制御に関係することが予想されますが、その多くについては機能がほとんど明らかになっていません。今後も造血におけるRNA代謝の役割を包括的に明らかにしていきたいと考えています。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤 (S) 18H05278 (研究代表者：竹内 理)、日本医療研究開発機構(AMED) 21ae0121030h0001 (研究開発代表者：竹内 理)、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS) JP18am0101120 (支援番号0985, 研究代表者：竹内 理)、日本学術振興会学術研究助成基金助成金研究活動スタート支援 20K22737 (研究代表者：吉永 正憲)、日本学術振興会学術研究助成基金助成金若手研究 21K15372 (研究代表者：吉永 正憲)、武田科学振興財団医学部博士課程奨学助成 (奨学研究者：吉永 正憲)、藤原記念財団奨励金 (研究代表者：吉永 正憲)、清水免疫学・神経科学振興財団助成金 (研究代表者：吉永 正憲)、Biolegend社・トミーデジタルバイオロジー株式会社LEGEND Research Grant (研究代表者：吉永 正憲)の一環で行われました。

また本研究は、スタンフォード大学、群馬大学、大阪大学、東京大学と共同で行ったものです。

<用語解説>

- *1 **赤芽球**：血液細胞のもとである造血幹細胞より作られ、赤血球になるまでの分化途中の細胞。
- *2 **ヘモグロビン**：赤血球内に大量に存在する赤色のタンパク質。鉄を含むヘムと、タンパク質であるグロビンからなる。肺から取り込んだ酸素を全身に運搬する上で必要である。
- *3 **酸化ストレス**：細胞内で有毒な活性酸素種の蓄積を引き起こすような要因の総称であり、DNA損傷の原因となる。細胞内に存在する2価のフリーな鉄イオンは活性酸素種を生じることで酸化ストレスを引き起こす。
- *4 **複製ストレス**：DNA複製の阻害を引き起こす様々な内因性・外因性の要因の総称であり、DNA損傷の原因となる。
- *5 **トランスフェリン受容体**：血液に含まれる鉄を輸送するための担体であるトランスフェリンに結合する受容体。細胞の鉄取り込みにおいて主要な役割を果たしている。
- *6 **CRISPRスクリーニング**：多数の遺伝子欠損細胞を網羅的に作出し、その細胞集団の中で特定の表現型を示す細胞を調べることで、その表現型発現に寄与する遺伝子群を一挙に同定できるスクリーニング手法。遺伝子を簡便に欠損できるCRISPR/Cas9システムを用いて、多数の遺伝子欠損細胞のプールを作出する。

***7 CRISPRi (CRISPR interference)** : CRISPR/Cas9システムの変法の1つであり、目的の遺伝子を欠損することなく発現の低下を誘導できる。本研究では、DNA切断活性を持たず、転写抑制ドメインを付加したdCas9-KRABを用いて実施した。

***8 遺伝学的相互作用解析** : 2つの遺伝子の関係性について、単独の欠損細胞と2つ同時に欠損した細胞の表現型を比較することで推定する手法。本研究ではCRISPRiスクリーニングの手法と組み合わせることで、METTL16と他の遺伝子間との相互作用を大規模に解明した。

<研究者のコメント>

METTL16が生体において果たす役割については未だ不明な点が多いですが、本研究ではMETTL16を介したRNAメチル化修飾が生体の赤血球造血において重要であることを明らかにすることができました。RNA修飾は様々なRNA代謝機構の制御において重要であり、今後もRNA修飾の生体における多様な役割を明らかにしていきたいと考えています。

<論文タイトルと著者>

タイトル : The N⁶-methyladenosine methyltransferase METTL16 enables erythropoiesis through safeguarding genome integrity (m⁶Aメチル化修飾酵素METTL16はゲノム完全性を保護することにより赤血球造血を可能にする)

著者 : 吉永 正憲*, Kyuho Han, David W Morgens, 堀居 拓郎, 小林 良祐, 鶴山 竜昭, Fabian Hia, 保倉 祥太, 鍛冶屋 麻子, Ting Cai, Pedro HC Cruz, Alexis Vandenbon, 鈴木 穰, 河原 行郎, 畑田 出穂, Michael C Bassik, 竹内 理* (*corresponding author)

掲載誌 : Nature Communications DOI : 10.1038/s41467-022-34078-y