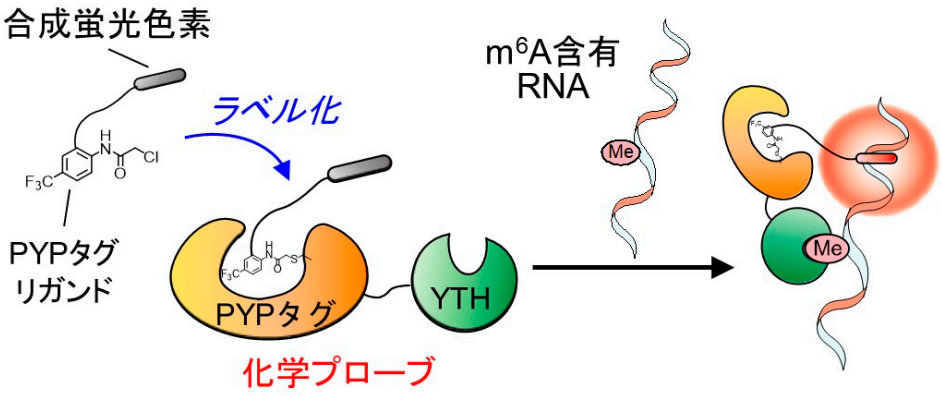
13　メチル化RNAを可視化する化学プローブの開発	堀　雄一郎

【目的】近年、RNA 修飾のうち、*N* 6 位がメチル化されたアデノシン（m^6A）が RNA の動態や安定性に影響し、翻訳やシグナル伝達を制御することが報告された。そのメチル化レベルの異常は、癌や生活習慣病などの種々の疾病に関与することが明らかになりつつある。一方、癌細胞では、癌種の違いにより、m^6A メチル化が亢進される場合もあれば抑制される場合もあり、m^6A 含有 RNA がいかにして癌化に関わっているかは、未だ不明な点が多い。このため、m^6A 含有 RNA の簡便かつ精密な検出技術の開発は、m^6A 含有 RNA の関わる生命現象の解明と疾病の診断や創薬において、極めて重要な課題となっている。そこで、本研究では、この問題を解決するために、化学原理を精査して分子設計することで、m^6A 含有 RNA に結合すると蛍光強度が上昇する「化学プローブ」を開発し、このプローブの *in vitro* における蛍光特性を評価するとともに、生細胞イメージングを行う。
【方法】目的とする化学プローブは、次の 3 つの部位から構成されるように設計した。1 つは m^6A に結合する YTHDF2 由来の YTH ドメインであり、もう 1 つは RNA と相互作用し蛍光強度を上昇させる合成核酸結合色素であり、最後の 1 つはタグタンパク質 PYP である。我々は、PYP タグとそのリガンドを利用して標的タンパク質に合成色素を特異的に導入するタンパク質ラベル化法を開発してきた。本研究では、このラベル化法を利用して YTH ドメインに PYP タグを介して合成核酸結合色素を導入し、*in vitro* および細胞内で化学プローブを構築した。化学プローブの RNA 結合特性や蛍光特性を調べ、細胞内構築を行った後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。
【結果】PYP タグリガンドと合成核酸結合色素を連結したラベル化分子を YTH と PYP タグ変異体の融合タンパク質 YTH-PYP 変異体とインキュベートしゲル電気泳動法にて解析したところ、YTH-PYP 変異体に色素が導入されることが確認され、*in vitro* にて化学プローブが構築できることが分かった。この化学プローブと m^6A 含有 RNA をインキュベートして、蛍光強度を測定したところ蛍光強度の上昇が見られた。一方、m^6A 非含有 RNA と反応させたときも、同程度に蛍光強度が上昇した。そこで、YTH および PYP に変異を導入し最適化すると、m^6A 非含有 RNA 反応時の蛍光強度が低下することが示された。次に、YTH-PYP 変異体を細胞で発現させ、ラベル化分子を添加しインキュベートしたところ、細胞内から蛍光が観測され、細胞内においても化学プローブを構築できることが示された。さらには、その蛍光が RNA に由来することが分かった。以上の研究により、本研究では、タンパク質と合成色素からなる新しいタイプの化学プローブを細胞内で構築し、RNA を可視化することが可能となった。

化学プローブのメチル化 RNA 検出原理



13. メチル化 RNA を可視化する化学プローブの開発

堀　雄一郎

九州大学 大学院理学研究院 化学部門 動的生命化学研究室

Key words：メチル化 RNA，可視化，ハイブリッド分子，タンパク質ラベル化

緒　言

近年、RNA 修飾のうち、*N*6 位がメチル化されたアデノシン（m^6A）が RNA の動態や安定性に影響し、翻訳やシグナル伝達を制御することが報告された［1］。そのメチル化レベルの異常は、癌や生活習慣病などの種々の疾病に関与することが明らかになりつつある。一方、癌細胞では、癌種の違いにより、m^6A メチル化が亢進される場合もあれば抑制される場合もあり、m^6A 含有 RNA がいかにして癌化に関わっているかは、未だ不明な点が多い。このため、m^6A 含有 RNA の簡便かつ精密な検出技術の開発は、m^6A 含有 RNA の関わる生命現象の解明と疾病の診断や創薬において、極めて重要な課題となっている。特に、m^6A 含有 RNA の動態が RNA の機能制御に関わっているため、生細胞で m^6A 含有 RNA の局在変化や量的変化を可視化する技術が求められている。現在、生細胞中で m^6A 含有 RNA を可視化するには、蛍光タンパク質を m^6A 結合タンパク質 YTH に融合させ、その細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察する手法が用いられている。しかしながら、この手法では、m^6A 含有 RNA に結合していない遊離の融合タンパク質から蛍光が観測されてしまい、m^6A 含有 RNA 由来の蛍光シグナルとの区別がつかないという問題がある。そこで、本研究では、この問題を解決するために、化学原理を精査して分子設計することで、m^6A 含有 RNA に結合すると蛍光強度が上昇する「化学プローブ」を開発した。このプローブの *in vitro* における蛍光特性を評価するとともに、細胞内での動態を可視化した。

方　法

1. 化学プローブの設計・開発

目的とする化学プローブは、3 つの部位から構成されるように設計した（図 1）。1 つは m^6A に結合する YTHDF2 由来の YTH ドメインであり［2］、もう 1 つは RNA と相互作用し蛍光強度を上昇させる合成核酸結合色素であり、最後の 1 つは YTH ドメインに合成蛍光色素を連結するためのタグタンパク質 PYP とした。我々は、これまでに、目的タンパク質に PYP タグなどのタグタンパク質を融合し、その特異的リガンドとタグのラベル化反応を利用することで色素を目的タンパク質に導入する技術を開発してきた［3〜7］。本研究では、PYP タグリガンド PCAF と核酸結合色素 BO を異なる長さを持つ 3 種類のリンカーで連結したラベル化分子（PCAF-BO、PCAF-L1-BO、PCAF-L2-BO）を合成し、PYP タグ融合 YTH ドメインをラベル化することで、化学プローブを構築した。

2. ラベル化反応および RNA 結合反応の評価

各ラベル化分子と YTH-PYP を反応させインキュベートした後に、変性ゲルを用いた SDS-PAGE を行い、蛍光画像を取得するとともに、CBB 染色を行い、ラベル化反応について解析した。また、ラベル化反応により構築した化学プローブを m^6A 含有 RNA と反応させインキュベートした後に、非変性ゲルを用いたゲルシフトアッセイを行い、RNA 結合活性を評価した。また、色素部位のラベル化に伴う蛍光強度や、RNA 結合前後の蛍光強度を測定した。また、m^6A 含有 RNA に対して親和性が上昇することの知られている変異体 YTH（D422N）

［8］を用いて、同様の RNA 結合・蛍光強度解析を行った。

3. 化学プローブの細胞内構築と RNA イメージング

YTH 融合タンパク質の遺伝子に mCherry を融合し、HeLa 細胞に導入し、ラベル化分子を添加後、蛍光顕微鏡観察を行った。

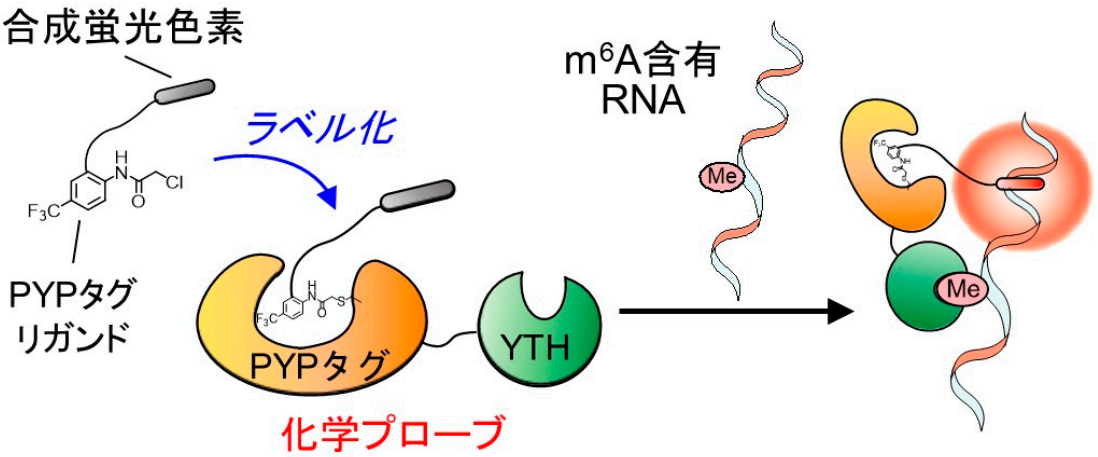


図 1. 化学プローブの設計・開発
YTH と PYP タグ（変異体）の融合タンパク質を PYP タグリガンドと合成蛍光色素を連結したラベル化分子を結合させ化学プローブを構築する。このプローブは、YTH 部位が m^6A と結合すると色素部位が周辺の RNA と相互作用し蛍光強度を上昇させる。

結果および考察

1. ラベル化反応および RNA 結合反応の評価

PYP タグは酸性タンパク質であり、核酸との静電反発が予想されたため、リガンド結合部位付近の 3 つの酸性アミノ酸を Arg に変化させた変異体 PYP3R を YTH に融合した YTH-PYP3R を用いた。このたんぱく質と各種プローブを反応させ、SDS-PAGE を行ったところ、YTH-PYP3R のバンドから色素由来の蛍光が観測された。このことからラベル化反応は進行し目的とする化学プローブを構築できたと考えられる。さらに、この化学プローブを用いて m^6A 含有 RNA と反応させたところ、蛍光強度の上昇が確認された。一方、ラベル化分子のみと m^6A 含有 RNA を反応させても蛍光強度の上昇は確認されなかった。このことから、化学プローブは、m^6A 含有 RNA との結合により蛍光強度が上昇することが示された。次に、化学プローブを m^6A 非含有 RNA と反応させたところ、蛍光強度が上昇し、m^6A 含有 RNA との反応時と大きな差はないことが分かった。そこで、m^6A 非含有 RNA と化学プローブが非特異的に反応した可能性が考えられたため、その原因がカチオン性のアミノ酸変異体 PYP3R を用いたことで静電相互作用が促進されたことによると仮説を立てた。

そこで、3 つの Arg を中性アミノ酸に変異した PYP NQN を用いて YTH に融合し、化学プローブを構築した後、RNA 結合実験を行った。その結果、m^6A 非含有 RNA と反応させたときの蛍光強度の上昇を、PYP3R を用いたときに比べ抑制できることが分かった。さらに、m^6A 含有 RNA との結合親和性が高い YTH（D422N）変異体を用いて、同様の実験を行ったところ（図 2）、化学プローブ単独の時に比べ m^6A 含有 RNA と反応させると蛍光強度は 17 倍上昇したのに対し、m^6A 非含有 RNA の時は 6 倍しか蛍光強度が上昇しなかった（図 2c）。このように、化学プローブを用いることで、m^6A 含有 RNA を検出し、m^6A 非含有 RNA との差を出すことができることが判明した。

2. 化学プローブの細胞内構築と RNA イメージング

YTH（D422N）-PYP NQN-mCherry の遺伝子を HeLa 細胞で発現させ、PCAF-L1-BO を添加しインキュベート後、蛍光イメージングを行った。遺伝子発現細胞からは、mCherry 由来の蛍光と化学プローブ由来の蛍光がそれぞれ異なる蛍光チャンネルで観測され、それらの蛍光は重なった。一方、遺伝子非発現細胞に PCAF-L1-BO を添加したところ、蛍光は観測されなかった。このため、細胞内で YTH（D422N）-PYP NQN-mCherry は発現し、PCAF-L1-BO と反応し化学プローブが生細胞内で構築されたと考えられた。さらに、細胞を固定し膜透過処理を行った後に、RNase 処理をしたところ、細胞内の強い蛍光が消失していることが判明した。このことから、化学プローブは細胞内で RNA と結合し、蛍光強度を上昇させる機能を持っていることが示唆された。

本研究では、タンパク質と合成色素からなる新しいタイプの化学プローブを細胞内で構築し、RNA を可視化する技術の構築に成功した。今後は、観測された蛍光のうち、m^6A による寄与がどの程度あるかをさらに検証する必要があるとともに、さらなる S/N の向上をする分子設計を行っていくことが課題である。もっとも、この化学プローブのコンセプトは、核酸修飾部位に結合するドメインがあれば、それを化学プローブの中に取り入れることにより、様々な修飾核酸の可視化に応用展開できるポテンシャルがあるため、今後より汎用的な化学ツールとして発展していくことが期待できる。

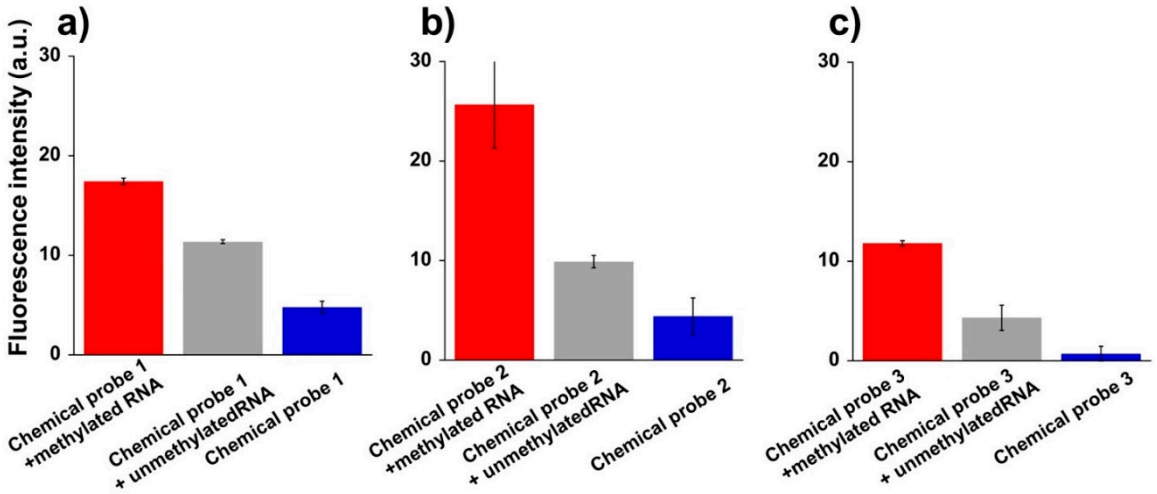


図 2. 化学プローブによるメチル化 RNA の蛍光検出

a）化学プローブ 1（PCAF-BO と YTH（D422N）-PYP 変異体の複合体）、
化学プローブ 1 と m^6A 含有／非含有 RNA を反応させたときの蛍光強度。

b）化学プローブ 2（PCAF-L1-BO と YTH（D422N）-PYP 変異体の複合体）、
化学プローブ 2 と m^6A 含有／非含有 RNA を反応させたときの蛍光強度。

c）化学プローブ 3（PCAF-L2-BO と YTH（D422N）-PYP 変異体の複合体）、
化学プローブ 3 と m^6A 含有／非含有 RNA を反応させたときの蛍光強度。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院理学府動的生命化学研究室の上川拓也修士、同研究室の足立惇弥助教、大阪大学大学院工学研究科ケミカルバイオロジー領域の菊地和也教授、ならびに同研究室の松木星修士である。本研究についてご支援いただいた公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝します。

文　献

1) Jiang X, Liu B, Nie Z, Duan L, Xiong Q, Jin Z, Yang C, Chen Y. The role of m6A modification in the biological functions and diseases. Signal Transduct Target Ther. 2021 Feb 21;6(1):74. doi: 10.1038/s41392-020-00450-x. PMID: 33611339; PMCID: PMC7897327.

2) Hazra D, Chapat C, Graille M. m^6A mRNA Destiny: Chained to the rhYTHm by the YTH-Containing Proteins. Genes (Basel). 2019 Jan 15;10(1):49. doi: 10.3390/genes10010049. PMID: 30650668; PMCID: PMC6356822.

3) Kumar N, Hori Y, Nishiura M, Kikuchi K. Rapid no-wash labeling of PYP-tag proteins with reactive fluorogenic ligands affords stable fluorescent protein conjugates for long-term cell imaging studies. Chem Sci. 2020 Mar 9;11(14):3694-3701. doi: 10.1039/d0sc00499e. PMID: 34094058; PMCID: PMC8152630.

4) Reja SI, Hori Y, Kamikawa T, Yamasaki K, Nishiura M, Bull SD, Kikuchi K. An "OFF-ON-OFF" fluorescence protein-labeling probe for real-time visualization of the degradation of short-lived proteins in cellular systems. Chem Sci. 2022 Jan 11;13(5):1419-1427. doi: 10.1039/d1sc06274c. PMID: 35222926; PMCID: PMC8809410.

5) Nishiura M, Hori Y, Umeno M, Kikuchi K. Visualization of multiple localizations of GLUT4 by fluorescent probes of PYP-tag with designed unnatural warhead. Chem Sci. 2023 May 15;14(22):5925-5935. doi: 10.1039/d3sc00724c. PMID: 37293637; PMCID: PMC10246691.

6) Torii K, Benson S, Hori Y, Vendrell M, Kikuchi K. No-wash fluorogenic labeling of proteins for reversible photoswitching in live cells. Chem Sci. 2023 Dec 18;15(4):1393-1401. doi: 10.1039/d3sc04953a. PMID: 38274070; PMCID: PMC10806661.

7) Reja SI, Minoshima M, Hori Y, Kikuchi K. Recent advancements of fluorescent biosensors using semisynthetic probes. Biosens Bioelectron. 2024 Mar 1;247:115862. doi: 10.1016/j.bios.2023.115862. Epub 2023 Dec 10. PMID: 38147718.

8) Xu C, Liu K, Ahmed H, Loppnau P, Schapira M, Min J. Structural Basis for the Discriminative Recognition of N6-Methyladenosine RNA by the Human YT521-B Homology Domain Family of Proteins. J Biol Chem. 2015 Oct 9;290(41):24902-13. doi: 10.1074/jbc.M115.680389. Epub 2015 Aug 28. PMID: 26318451; PMCID: PMC4598999.