

PUF を基盤とした機能性 RNA 結合タンパク質の創製

2018

篠田 昂樹

目次

序論 5
第一章 PUF 伸長骨格の構築 9
第一節 8 リピート挿入による 16 リピート PUF の作製 10
第二節 16 リピート PUF の RNA 結合能の検討と伸長骨格の選出 12
第三節 選出された 16 リピート PUF の結合能の検証 14
第二章 PUF を基盤とした標的 RNA の特異的制御 18
第一節 標的 RNA 特異的な脱メチル化酵素の創出 19
第二節 単一 RNA 配列を標的とする遺伝子発現抑制の検討 25
総括 31
実験の部 32
引用文献 43
謝辞 46

略号 一覧

本論文で使用した略号は以下の通りである。

3'UTR: Three prime untranslated region

5'UTR: Five prime untranslated region

BHQ1: Black Hole Quencher-1

BSA: Bovine serum albumin

CRISPR/Cas: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/

CRISPR associated protein

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EMSA: Electrophoretic mobility shift assay

FAM: 5/6-Carboxyfluorescein

FTO: Fat mass and obesity-associated protein

HRP: Horseradish peroxidase

m⁶A: N⁶-methyladenosine

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PPR: Pentatricopeptide repeat

PUF: Pumilio and fem-3 mRNA-binding factor

PUM1: Human Pumilio 1

PVDF: Polyvinylidene difluoride

RIPA: Radio-immunoprecipitation assay

SDS: Sodium dodecyl sulfate

TTP: Tristetraprolin

VEGFA: Vascular endothelial growth factor A

序論

RNA は、DNA から転写された後、分解されるまでの間に様々な制御を受け、このような制御は遺伝子発現において重要な役割を担っている。したがって、特定の RNA に対する制御を自在にコントロールすることができれば、遺伝子発現を人工的に制御できるだけでなく、転写後制御機構や細胞機能の詳細な解明、疾患治療などの生命科学技術への応用が期待される。

RNA 結合タンパク質は、スプライシングや輸送、翻訳など RNA 代謝の様々な過程と関連がある。また、多くの RNA 結合タンパク質はモジュール構造を持ち、RNA 結合ドメインと機能ドメインから成る。したがって、特定の RNA と結合する RNA 結合ドメインは、様々な機能ドメインと組み合わせることによって、標的 RNA に対する人為的な機能制御が可能になると期待される (Fig. 0-1) [1–3]。様々な RNA 結合タンパク質の中でも、ユニット単位で RNA 塩基を認識するモジュール構造をもつ Pumilio and fem-3 mRNA-binding factor (PUF) や Pentatricopeptide repeat (PPR) は、各ユニットの認識塩基を変更することによって、任意の RNA 配列を標的にすることができる配列特異的 RNA 結合タンパク質であり、RNA 制御の基盤となる RNA 結合ドメインとして有望である [1,4]。また、Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/ CRISPR associated protein (CRISPR-Cas9) システムの 1 つである CRISPR-Cas13 も guide RNA を介して任意の RNA 塩基配列を標的にすることができることが報告されている [5,6]。

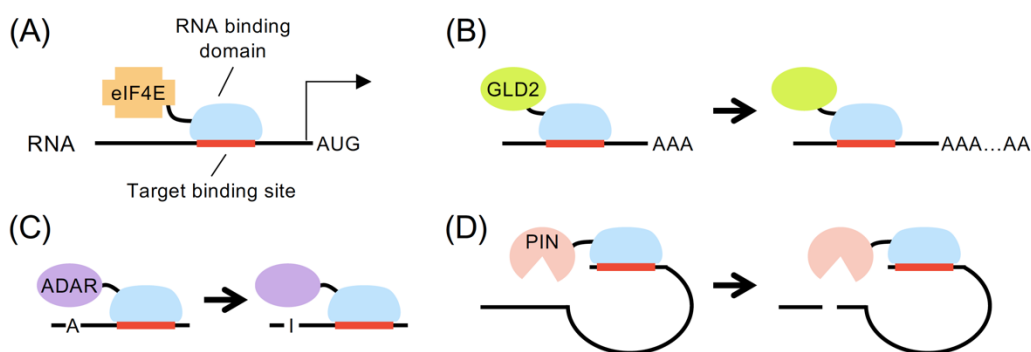


Fig. 0-1 Schematics of engineered RNA regulation tools with sequence specific RNA binding domains. (A) Induction of translation using eIF4E. (B) Polyadenylation of mRNA using GLD2. (C) RNA editing using ADAR. (D) Cleavage of RNA using the PIN domain.

PUF は約 36 アミノ酸からなる類似構造リピートを含む RNA 結合タンパク質であり、1つのリピートが RNA の1塩基を認識する(Fig. 0-2) [7]。これらの RNA 結合リピートの 12 番目と 16 番目のアミノ酸の組み合わせによって認識する塩基が決定される。天然の PUF の結晶構造解析から A、U、G に対応するアミノ酸の組み合わせが同定されたことに加えて、天然に存在しない C に対応するアミノ酸の組み合わせも報告されている(Fig. 0-2) [8–12]。このため、一般に 8 リピートから成る PUF は、各リピートの特定のアミノ酸を置換することで、認識する塩基配列 8 塩基を自由に変更することができる[1,8,9,11–13]。このことから、これまでに、8 リピート PUF を機能タンパク質と融合することによって特定の RNA を制御する手法が報告されてきた[11,14–19]。一方、8 リピート PUF が認識可能な 8 塩基 RNA の配列パターンは理論上 $4^8 \approx 6.6 \times 10^4$ 通りであり、ゲノム DNA の配列多様性を考慮すると、トランスクリプトーム中では複数の転写産物に同じ 8 塩基配列が存在する可能性が高い[1,13]。したがって、PUF を基盤とする RNA 制御ツールは、細胞内で標的遺伝子の転写産物以外の RNA に対しても作用することが懸念される。このことから、PUF の認識塩基数の制限は、特定の RNA に対する正確な制御を達成するために大きな障害となる。また、RNA の制御は多岐にわたり、これまでにいくつかの RNA 制御ツールが報告されているものの、全てを網羅することはできていない。RNA を自在に制御するためには、さらなるツール開発が求められる。

そこで本研究では、PUF の認識塩基数の増加と新規 RNA 制御ツールの創出に取り組むことで、選択的な RNA 制御法の向上を目指した。第一章では、PUF の認識塩基数を増やすために伸長骨格の構築を行い、第二章では、PUF を基盤とする RNA 制御法として、標的 RNA 特異的な m⁶A 脱メチル化酵素の創出および細胞内での内在 RNA の制御における標的選択性の向上に成功した。以下にその研究成果の詳細について述べる。

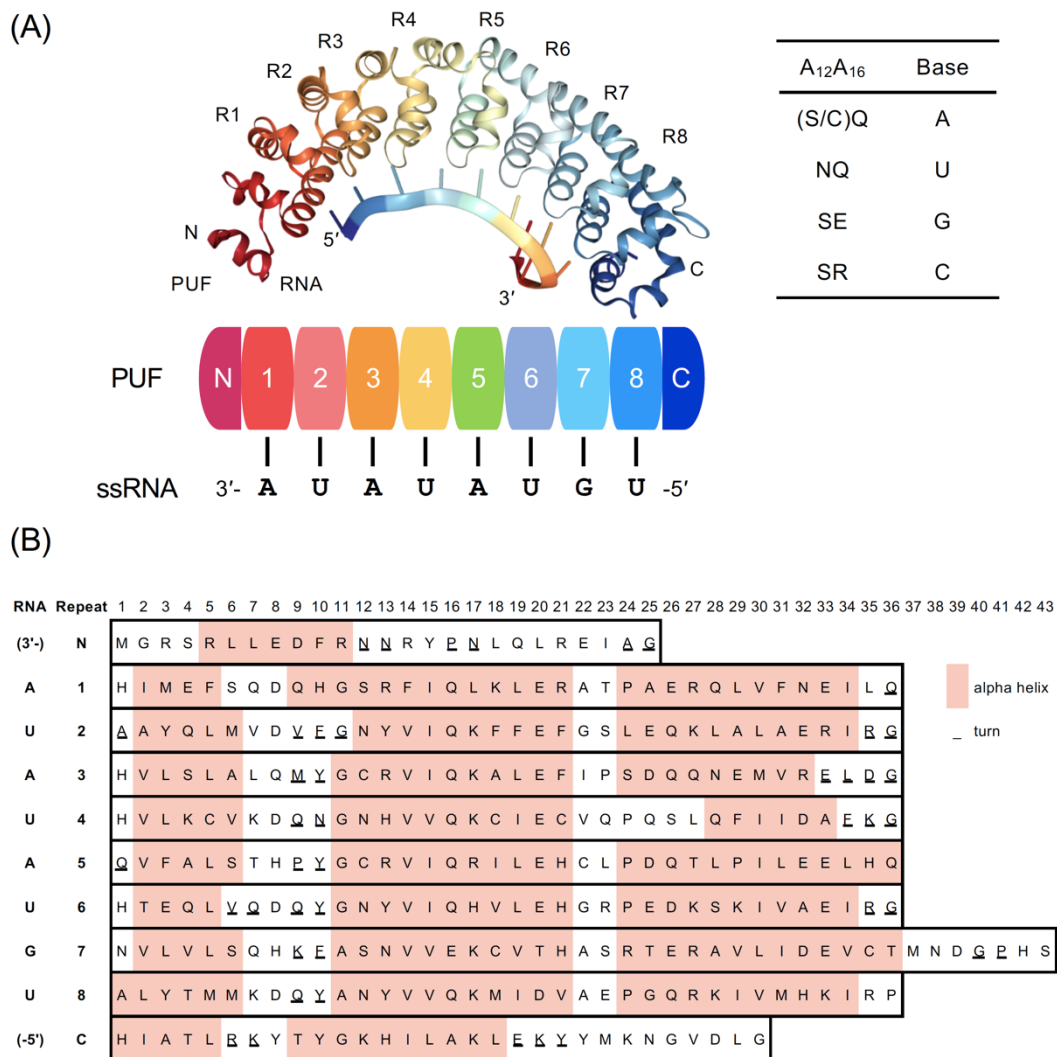


Fig. 0-2 Structure and amino acid sequence of PUF. (A) Crystal structure of Pumilio 1 (PUM1), a PUF protein, bound to RNA, adapted from PDB ID: 1M8Y. 12th and 16th amino acids (A₁₂ and A₁₆) in each repeat of PUF interact with one RNA base. The combinations of A₁₂A₁₆ and RNA bases are shown in the right. (B) Amino acid sequence of PUM1.

第一章

PUF 伸長骨格の構築

PUF の各リピートでは、RNA 塩基と相互作用する 2 つのアミノ酸が同定されており、各リピート中の RNA 認識に関わるアミノ酸の種類を変えることによって、PUF は任意の塩基配列を標的にすることができる[1,8,9,11-13]。一方、8 リピート PUF の認識塩基数は 8 塩基に制限される。したがって、細胞内では複数の転写産物中に標的となる配列が含まれる可能性がある。さらに長い RNA 塩基配列を認識する RNA 結合ドメインを創出できれば、標的遺伝子の RNA に対する特異性の向上が期待される。

これまでに、Filipovska らによって、PUF の 1 つである human Pumilio 1 (PUM1) の PUF ドメインの 5 番目と 6 番目のリピート間に、さらにリピート 1~8 を挿入した 16 リピート PUF が作製され、連続した 8 つのリピートを挿入することで認識塩基数が増加することが報告された[12]。PUF の認識塩基数を増やすためのアプローチとして、リピート数を増やすことが有効であると考えられる。一方、PUF の 8 つのリピートは類似した構造をもつが、それぞれのアミノ酸配列は異なり、各リピートの性質は完全に同じではない(Fig 0-2B) [7]。したがって、新たに導入するリピートの種類とその位置が PUF の認識塩基数の増加に影響する可能性があり、認識塩基数を増加させるためには、さらに最適な伸長骨格を検討する余地があると考えた。本章では、標的配列を人工的にデザインした 2 種類の 8 リピート PUF を用いて挿入位置の異なる 16 リピート PUF を作製し、その塩基認識能を評価することによって、8 リピートの最適な挿入方法を検討するとともに、PUF 伸長骨格の構築を試みた。

第一節 8リピート挿入による16リピート PUF の作製

本研究では、RNA の認識様式が結晶構造解析から明らかになっており、野生型の標的配列以外にもいくつかの配列を標的として結合が検討されてきた PUM1 の RNA 結合ドメインを 8リピート PUF の骨格配列として用いた[7,9,10]。標的 RNA に対する結合が確認された 2 種類の人工 8リピート PUF を組み合わせて 16リピート PUF を作製した。具体的には、RNA 配列:5'-UGAUAUUA-3'を標的とする 8リピート PUF (PUF_S) [10]と RNA 配列:5'-UUUUUUUU-3'を標的とする 8リピート PUF (PUF_U)を用いた(Fig.1-1A)。PUF_Uは12番目と16番目のアミノ酸にUを認識するように変異を導入したリピートを並べて作製し、その結合能を確認した(Fig.1-1B)。PUF_Uの各リピート間に、PUF_Sのリピート1~8を挿入することで、異なるリピート骨格を持つ16リピート PUF: PUF_U n S ($n=0\sim 8$)を作製した(n は挿入された PUF_S の 8リピートの N 末端側に隣接する PUF_U のリピート数と一致し、挿入位置を示す)(Fig.1-1A)。

RNA を標的とする場合には、その配列によって立体構造などが異なり、PUF との結合親和性に影響することが懸念される。各リピートが同じ塩基を認識する PUF_U を用いることで、PUF_U n S の標的配列は共通の標的 RNA 配列 (US) : 5'-UUUUUUUUUGAUAUUAUUUUUUUU-3'に含まれる。そこで本検討では、標的 RNA 配列がそれぞれ異なる 16リピート PUF の RNA 結合能を、共通配列を含む RNA を用いて評価した。

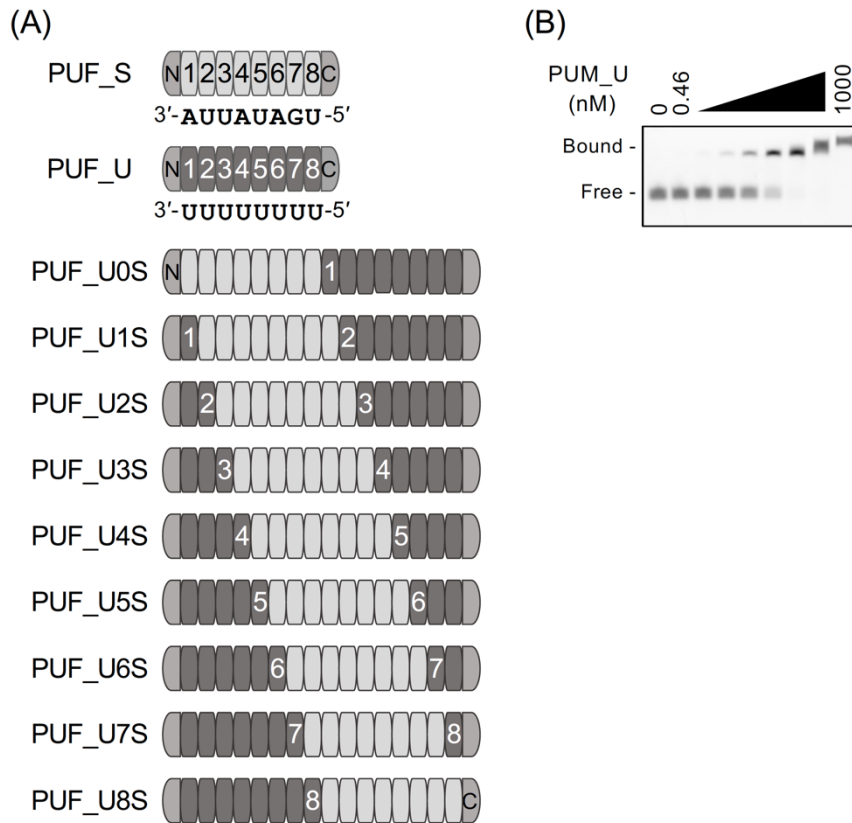


Fig. 1-1 Design of 16-repeat PUFs (A) Schematic diagrams of 8-repeat and 16-repeat PUFs. PUF_S and PUF_U are artificial 8-repeat PUFs with eight repeats flanked by N- and C-terminal regions. The target RNA sequences of PUF_S and PUF_U are shown below the corresponding repeats. PUF_U0S to PUF_U8S are 16-repeat PUFs in which the eight-repeat of PUF_S was inserted between two repeats of PUF_U. (B) Specific binding of PUF_U to the target RNA. A representative EMSA result of PUF_U with the RNA fragment containing target sequence is shown. RNA sequence: 5'-UUGGUUUUUUUUUGGACAUGUAUAUAGU-3' (the target sequence of PUF_U is underlined).

第二節 16リピート PUF の RNA 結合能の検討と伸長骨格の選出

リピート挿入位置の異なる 16リピート PUF と標的 RNA との結合を検証するために、レポーターアッセイを行った。開始コドン直前の 5'非翻訳領域(5'UTR)に PUF_Us の共通標的配列である US を 3 カ所に導入したルシフェラーゼ遺伝子(3×US reporter)を作製した(Fig. 1-2A)。PUF_Us 発現ベクターと 3×US reporter 発現ベクターを NIH3T3 細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。本アッセイでは、発現した PUF がレポーター mRNA 中の標的配列と結合し、レポーター遺伝子の翻訳が阻害されることでルシフェラーゼ活性が低下すると期待される[16,20]。測定されたルシフェラーゼの発現抑制を指標として、PUF の RNA 結合能を評価した。その結果、ルシフェラーゼの発現抑制レベルは 16リピート PUF ごとに異なり(20-85%)、8リピートの挿入位置によって 16リピート PUF の RNA 結合能が違うことが明らかになった(Fig. 1-2B)。特に PUF_U0S と PUF_U6S は 80%程度の抑制を示した。さらに、PUF_U の代わりに、5'-GGGGGGGG-3'を標的配列とする PUF_G に PUF_S を挿入した PUF_GnS ($n = 0\sim 8$)を用いてアッセイを行ったところ、類似した抑制パターンを示した(Fig. 1-2C)。すなわち、PUF_GnS の共通標的 RNA 配列(GS):5'-GGGGGGGGUGAUUAUUAGGGGGGGGG-3'を 3 カ所に導入した 3×GS レポーターに対して、PUF_G0S、PUF_G6S および PUF_G8S が顕著な発現抑制効果を示した(~70%)。なお、ウェスタンブロットイングアッセイによって、発現抑制の強さに関わらず、PUF_Us、PUF_GnS の発現が確認された(Fig. 1-2D, E)。以上のことから、8リピートの挿入によって PUF を伸長させる際に、挿入位置 $n = 0, 6, 8$ にリピートを挿入することが PUF の認識塩基数の増加に対して有望であることが示唆された。

本検討では、PUF_U や PUF_G を用いた 16リピート PUF をデザインすることにより、単一かつ共通のレポーターを用いて各 PUF の結合能を評価した。その結果、レポーター間の RNA 配列や立体構造の違いを考慮することなく、有望な挿入位置を発見することができた。また、16リピート PUF ($n = 0, 6, 8$)は Filipovska らの報告例に対応する PUF_U5S や PUF_G5S よりも高いレポーター発現抑制効果を示した。16リ

ピート PUF ($n = 0, 8$) は 2 つの 8 リピートが保持されていることで安定な構造をとりやすく、認識塩基数が増えたと考えられる。またこれまでに、PUF の伸長骨格としてリピート 6 の連結体が報告されている[21]。このことから、リピート 6 は立体構造の変化を許容し、16 リピート PUF ($n = 6$) において隣接するリピートが変わってもリピート 1~6 の構造を保持できることによって、認識塩基数が増えたと推測される。挿入位置 $n = 0, 8$ はいずれも 8 リピートのタンデムな連結という点で同様であることを考慮し、以後は挿入位置 $n = 0, 6$ について実験を行った。

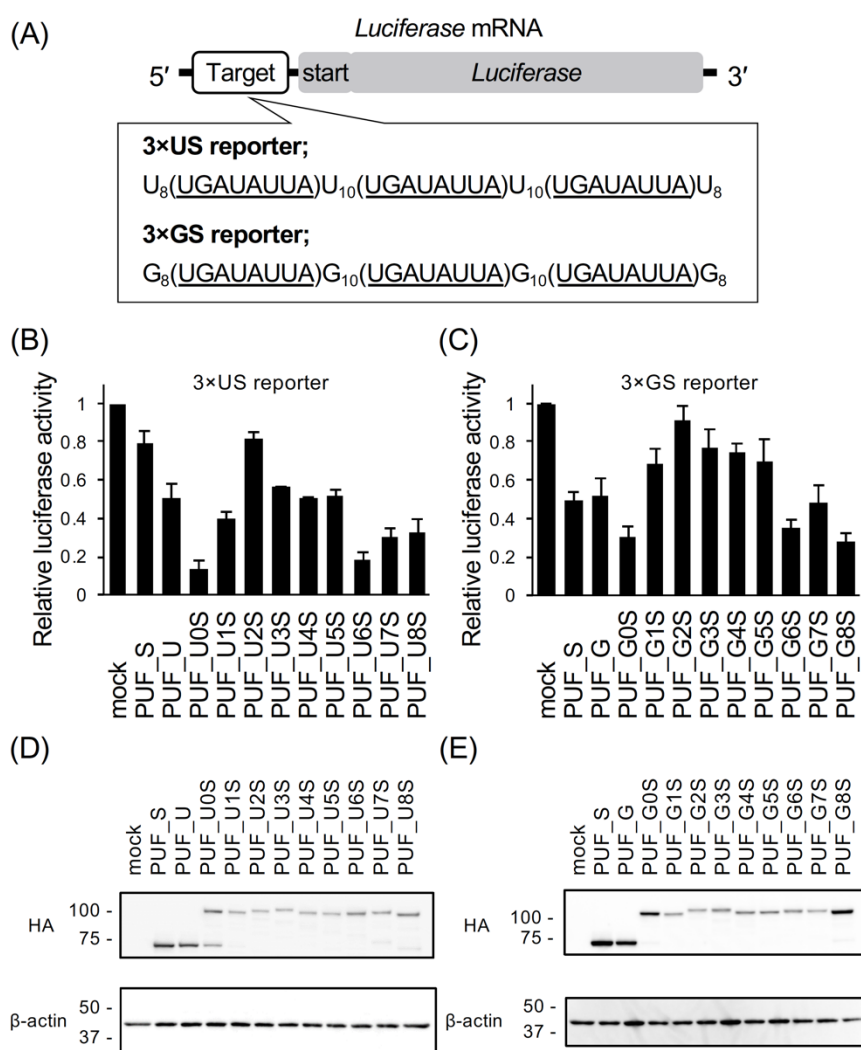


Fig. 1-2 RNA-binding abilities of 16-repeat PUFs based on luciferase reporter assays. (A) Design of the luciferase reporter. The target site was inserted in the 5'UTR of the *luciferase* mRNA. The 3xUS and 3xGS reporters contained three PUF binding sites of the PUF_U n Ss and PUF_G n Ss, respectively. (B) and (C) Repressive effects of PUFs on luciferase reporter activity. Luciferase activities were standardized to that of mock (empty vector) transfection for each reporter. At least three replicates were performed. Data are the mean \pm S.D. (D) and (E) Expression of PUFs in NIH3T3 cells was analyzed by western blotting assay.

第三節 選出された 16 リピート PUF の結合能の検証

16 リピート PUF は、リピート数が増加したことによって標的 RNA の 16 塩基と結合すると考えられる。一方、16 リピート PUF には PUF_S 由来の連続するリピート 1~8 が挿入されていることから、オリジナルの 8 リピート PUF_S の結合特異性も保持している可能性、すなわち、挿入された 8 リピートが独立して 8 塩基を認識することが懸念される。そこで、16 リピート PUF の標的配列 16 塩基を含む完全一致 RNA および挿入された 8 リピートに対応する 8 塩基のみが一致する部分一致 RNA を用いてゲルシフトアッセイを行った。16 リピート PUF である PUF_U0S と PUF_U6S について、完全一致 RNA として PUF_U n S の共通標的配列 RNA(US)を、部分一致配列として挿入された PUF_S の標的 8 塩基のみが一致する RNA(CS)を用いた。大腸菌内で発現させて精製した PUF_U0S と PUF_U6S を用いてそれぞれゲルシフトアッセイを行ったところ、PUF_U0S と PUF_U6S は RNA(US)に対して顕著な結合を示した (Fig. 1-3A)。一方、PUF_U0S と PUF_U6S は、部分一致標的配列 RNA(CS)に結合を示さなかった (Fig. 1-3B)。RNA(CS)が何らかの構造をとることで PUF_S の結合を許容できない可能性を検証するために、8 リピート PUF である PUF_S を用いて RNA(CS)との結合親和性を確認した。その結果、RNA(US)に対する結合と同程度の結合親和性を示した (Fig. 1-3A, B)。同様の結合特性が、PUF_G0S および PUF_G6S と完全一致する標的 RNA 配列:RNA(GS)、部分一致標的 RNA 配列:RNA(CS)の組み合わせでも示された (Fig. 1-4)。

以上のことから、挿入された 8 リピートは独立した RNA 認識能を持たず、16 リピート PUF は標的 16 塩基に特異的に結合することが示唆された。16 リピート PUF 中で、PUF_S 由来の 8 リピートは、野生型 8 リピート PUF とは異なり、N 末端および C 末端領域を含んでいない。PUF_S 由来の 8 リピートを含む 16 リピート PUF が部分的に一致する標的配列とはほとんど結合しなかった理由として、両末端領域の欠損によって、挿入された 8 リピートの RNA 結合能が低下したことが考えられる。これらの結果

は、挿入位置 $n = 0, 6$ への 8 リピート挿入という PUF の骨格伸長のアプローチが認識塩基数の増加および選択能の向上にとって有効であることを支持するものである。

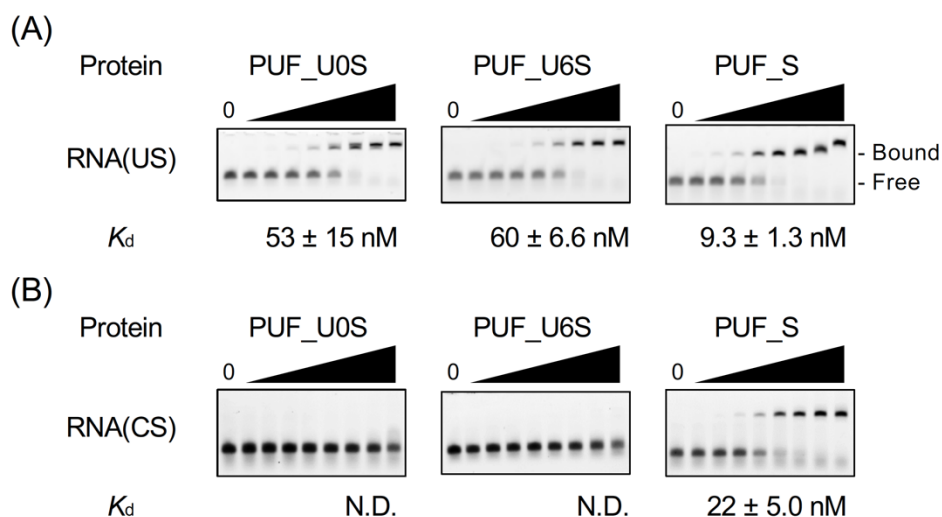


Fig. 1-3 EMSA of PUF_U0S, PUF_U6S and PUF_S to fully matching or partially matching RNA. (A) and (B) Representative results for PUF_U0S, PUF_U6S and PUF_S are shown. Each panel indicates the binding of PUF proteins to RNA(US) (A) and RNA(CS) (B), respectively. Lane 1: protein-free; Lanes 2–9: 0.46–1000 nM of PUF_U0S, PUF_U6S or PUF_S; RNA(US): 5'-CCUUUUUUUUUGAUUUUUUUUUUCC-3'; RNA(CS): 5'-UUCCCCCCCCUGAUUUUACCCCCCUU-3' (the target sequence of PUF_S is underlined); the K_d value indicates the mean \pm S.D. ($n = 3$); N.D.: not determined due to low binding.

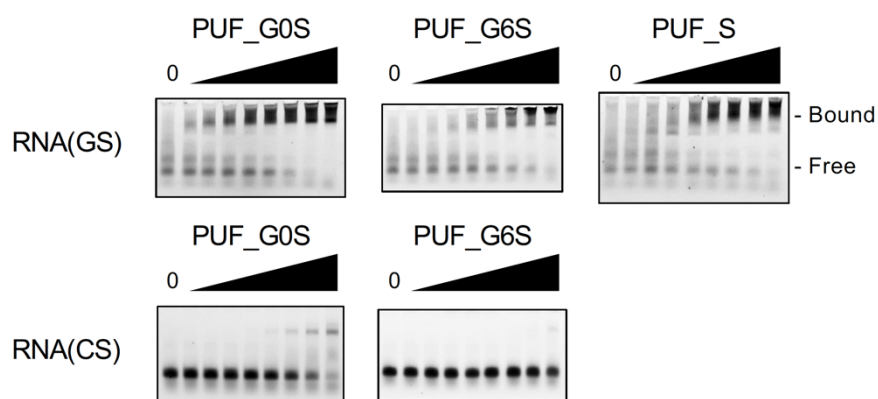


Fig. 1-4 EMSA of PUF_G0S, PUF_G6S and PUF_S to fully matching RNA or partially matching RNA. Representative results of PUF_G0S, PUF_G6S and PUF_S are shown. Upper and lower panels indicate the binding of PUF proteins to RNA(GS) and RNA(CS), respectively. Lane 1: protein free; Lanes 2–9: 0.46–1000 nM of PUF_G0S, PUF_G6S or PUF_S; RNA(GS): 5'-UUGGGGGGGGUGAUUUAGGGGGGGGUU-3' (the target sequence of PUF_S is underlined). K_d for binding to RNA(GS) was not calculated because of the smear band patterns of RNA(GS), which probably resulted from structured RNA containing the G-rich sequence.

本章では、PUF のリピート 1~8 を別の PUF のリピート間に挿入することによって挿入位置の異なる 16 リピート PUF を作製した。16 リピート PUF の RNA 認識能はそれぞれ異なり、リピート挿入位置が重要であることが示唆された。特に、8 リピートのタンデムな連結体およびリピート 6、7 間への 8 リピートの挿入体が PUF 伸長骨格として有望であることが示唆された。また、これらの 16 リピート PUF は認識塩基数が増えたことにより、8 リピート PUF に比べて、優れた配列選択能をもつことが示唆された。

第二章

PUF を基盤とした標的 RNA の特異的制御

RNA をターゲティングする配列特異的 RNA 結合ドメインとしての PUF と、様々な機能タンパク質との融合タンパク質をデザインすることによって、特定の RNA を制御することができる期待される。これまでに、翻訳開始因子や RNA 不安定化因子と融合した翻訳制御ツール[10,15,16]、スプライシングファクターと融合した選択的スプライシングツール[11,14]、蛍光タンパク質と融合した RNA イメージング[19,22–24]など、複数の RNA 制御ツールが報告されてきた。一方、細胞内での RNA 制御を行うにあたり、PUF を用いた RNA 制御ツールはその種類に制限があり、多様な RNA の修飾や制御を網羅できていない。そこで本章では、新規の RNA 制御法として塩基修飾制御法の創出に取り組んだ。また、細胞内で内在の転写産物の制御を実現するためには、標的 RNA に対する特異性の向上が求められる。そこで 16 リピート PUF を用いて内在 mRNA を標的とした遺伝子発現抑制の検討を行った。

第一節 標的 RNA 特異的な脱メチル化酵素の創出

RNA において 100 種類以上の塩基修飾が知られており、塩基修飾を介する RNA の構造変化やタンパク質との相互作用の変化が遺伝子発現制御に関与することが報告されている[25]。さらに詳細な機能解明を行うためにも、塩基修飾を標的 RNA 特異的に制御する手法が求められる。*N*⁶-methyladenosine (*m*⁶A)は、真核生物の mRNA において広範にみられる修飾塩基である(Fig. 2-1A)[26,27]。近年、メチル基転移酵素と脱メチル化酵素が発見され、アデニンのメチル化修飾が細胞内で動的に制御され、その修飾状態が mRNA 代謝と関連することが報告されている[28–34]。これまでに、関連遺伝子の過剰発現、ノックダウン、ノックアウトといった遺伝子操作によって、細胞包括的に *m*⁶A の機能解析が行われてきた。しかし、その機能の詳細は不明な点が多い。PUF を RNA のターゲティングに用いることによって、PUF と標的 RNA の結合を足場として、周辺の *m*⁶A を特異的にメチル化、あるいは脱メチル化することが期待される。

Fat mass and obesity-associated protein (FTO)は、*m*⁶A 脱メチル化酵素として知られている[32]。そこで、FTO の C 末端に 8 リピート PUF として PUM1 を融合した FTO-PUM1 を作製し、脱メチル化活性を評価した(Fig. 2-1B)。なお、脱メチル化活性の評価にはメチル化感受性 RNA ヌクレアーゼ MazF を利用した(Fig. 2-1C)。MazF は RNA 配列:5'-ACA-3'を認識して RNA を切断するが、5'末端側の A がメチル化された配列 5'-(*m*⁶A)CA-3'を切断しない[35]。RNA 配列 5'-(*m*⁶A)CA-3'を含むオリゴ核酸を FTO によって脱メチル化した後、MazF で切断して、その脱メチル化活性を評価した。

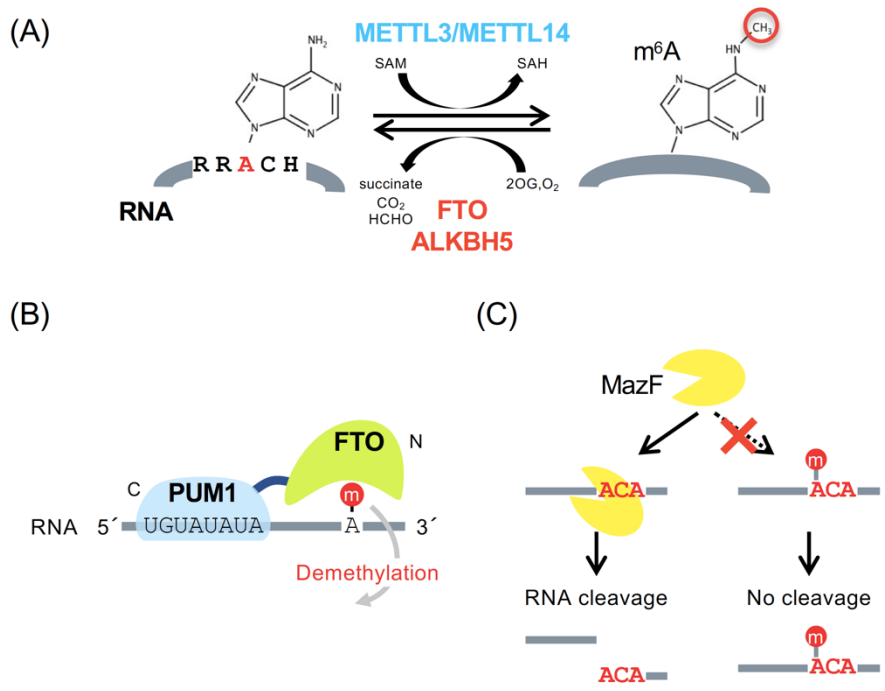


Fig. 2-1 m⁶A RNA methylation. (A) Methylation occurs at the consensus RNA sequence 5'-RRACH-3' (R = G/A, H = U/C/A) by the METTL3/METTL14 complex and demethylation is mediated by FTO or ALKBH5. (B) Schematic design of FTO-PUM1. PUM1 was fused to the C-terminal end of FTO demethylase. m: -CH₃ (methyl group). (C) Methyl-sensitive MazF RNA endonuclease. MazF cleaves non-methylated RNA but not methylated-RNA, which enables the specific detection of the methylation states of RNA.

はじめに、FTO と PUM1 を、6 アミノ酸(GSSGSS)をリンカーとして連結した FTO-PUM1 融合体を作製し、PUM1 の融合が FTO の脱メチル化活性に与える影響について調べた。その際に、RNA への PUM1 の配列非特異的な結合による脱メチル化活性への影響を除くために、m⁶A を含む RNA と DNA のキメラオリゴ核酸(配列: 5'-FAM/ d(CAT)r(G(m⁶A)CA)d(TATGT)/ BHQ1-3')を用いた。この核酸は、MazF によって切断されると消光が解消され、切断量に対応した蛍光が観察される。FTO および FTO-PUM1 の各濃度における脱メチル化活性を、MazF によるオリゴ核酸の切断反応で測定された蛍光強度を指標として評価した。その結果、FTO-PUM1 は FTO と同程度の濃度依存的な脱メチル化活性を有することが確認された (Fig. 2-2)。

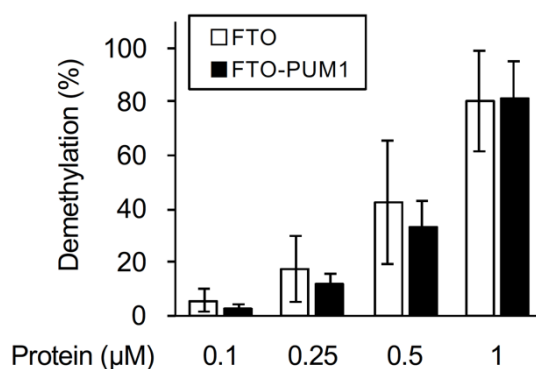


Fig. 2-2 Demethylation activities of FTO and FTO-PUM1. m⁶A RNA/DNA chimera probes with a FRET pair at the ends (5'-FAM/ 3'-BHQ1) were incubated with FTO or FTO-PUM1. After demethylase reaction, probes were mixed with MazF, and the fluorescent signals from the cleaved probe were monitored. Fluorescence intensities were normalized to that of the non-methylated probe. m⁶A probe: 5'-FAM/ d(CAT)r(G(m⁶A)CA)d(TATGT)/ BHQ1-3'. Data are the mean ± S.D. (n = 4)

m⁶A の近傍に PUM1 結合配列がある場合には、FTO-PUM1 は野生型 FTO が脱メチル化活性を示さない低濃度においても、PUM1 と RNA の結合を介して近傍の m⁶A を脱メチル化することが期待される。そこで、PUM1 標的配列を含むオリゴ RNA に含まれる m⁶A (Table 1) に対する脱メチル化活性を低濃度条件下で調べた。まず、ゲルシフトアッセイを行って、FTO-PUM1 がどちらの RNA とも結合することを確認した。5'末端を FAM で標識した各 RNA 断片を脱メチル化反応後に MazF で切断して、電気泳動パターンから切断割合を算出した。その結果、FTO-PUM1 は、PUM1 結合配列から 2、6、10 塩基離れた位置にある m⁶A を脱メチル化し、いずれの場合にも FTO よりも高い活性を示すことが明らかになった (Fig. 2-3)。一方、PUM1 結合配列中の m⁶A に対しては脱メチル化活性を示さなかった。これらのことから FTO-PUM1 が標的配列近傍の m⁶A を選択的に脱メチル化することが示唆された。

Table 1. Sequences of RNA oligomers containing m⁶A with different spacers between PUM1 binding site and m⁶A. m = m⁶A. The target sequences of PUM1 are underlined.

m ⁶ A RNA	Sequence (5'---3')	Spacer (nt)
m ⁶ A -1	AUUGUAUAU <u>m</u> CAUUUUUA	0
m ⁶ A +2	AUUGUAUAUAAG <u>m</u> CAUUUUUA	2
m ⁶ A +6	AUUGUAUAUAUCUAAG <u>m</u> CAUUUUUA	6
m ⁶ A +10	AUUGUAUAUAUCGGCUUUAG <u>m</u> CAUUUUUA	10

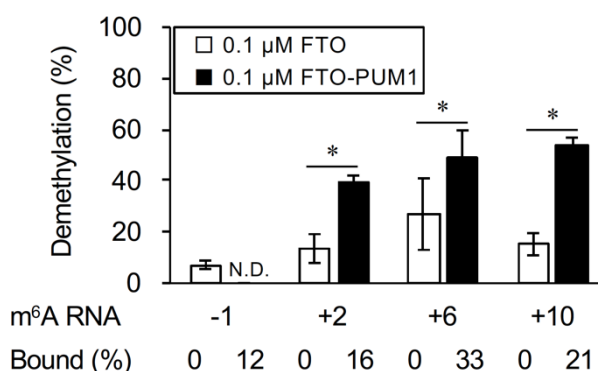


Fig. 2-3 Demethylation activity of FTO-PUM1 to m⁶A with target RNA sequence. RNA oligomers containing m⁶A and PUM1 binding site were incubated with 0.1 μM of FTO or FTO-PUM1. Demethylated RNA was detected by PAGE following the cleavage with MazF. The sequence of RNA is shown in Table 1. Binding to the target RNA was examined by EMSA after demethylase reaction. Data are the mean ± S.D.; N.D.: not detectable; *: p < 0.01 (n ≥ 3, Student t-test). Demethylation activities were normalized to the cleaved ratio of non-methylated RNA.

また、FTO-PUM1 におけるリンカー長の影響を調べるために、FTO と PUM1 の間に長さの異なるリンカーをもつ FTO-PUM1 を作製し、脱メチル化活性を調べた。これまでの実験で用いた 2×GSS (6 残基)に加えて、1×GSS (3 残基)、3×GSS (9 残基) および XTEN リンカー (39 残基) [25]をもつ FTO-PUM1 を作製した (Table 2)。その結果、いずれの FTO-PUM1 も同程度の脱メチル化活性と結合活性を有することがわかった (Fig. 2-4)。したがって、FTO と PUM1 の間のリンカーは脱メチル化活性にほとんど影響しないことが確認された。そこで以後の実験では、これまでと同様に 2×GSS をリンカーとする F2P を FTO-PUM1 として使用した。

Table 2. The linker of FTO-PUM1. FTO-PUM1 with different lengths of linker are shown.

FTO-PUM1		Linker	Length (mer)
F1P	GSS		3
F2P	GSSGSS		6
F3P	GSSGSSGSS		9
FXP	GSSGPSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSAS		39

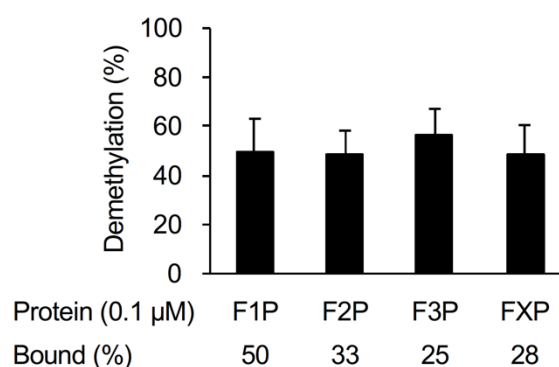


Fig. 2-4 Demethylation activities of FTO-PUM1 with different linkers. Designed FTO-PUM1 are shown in Table 2. After incubation of m⁶A +6 RNA with FTO-PUM1, binding to m⁶A +6 RNA and demethylation activity of each FTO-PUM1 were examined by EMSA and MazF cleavage assay, respectively. Data are the mean ± S.D. (n ≥ 3). Demethylation activities were normalized to the cleaved ratio of non-methylated RNA.

最後に、FTO-PUM1 の PUM1 結合配列近傍の m⁶A に対する選択的な脱メチル化活性が PUM1 と PUM1 結合配列との結合に起因することを確かめるために、競合条件での m⁶A 脱メチル化活性を調べた。競合阻害剤としては、PUM1 標的配列を含む RNA (標的 RNA) および PUM1 標的配列を含まない非特異的な RNA (非特異的 RNA) を用いた。その結果、標的 RNA を m⁶A RNA の 10 倍量添加すると、FTO-PUM1 の脱メチル化活性は有意に低下し、100 倍量を添加するとさらに活性が低下することがわかった (Fig. 2-5)。一方、非特異的 RNA を 100 倍量添加した場合にも、FTO-PUM1 の脱メチル化活性が有意に低下したが、10 倍量の添加では活性の低下はほとんど見られなかった。以上の結果から、PUM1 結合配列近傍の m⁶A に対する FTO-PUM1 選択的な脱メチル化活性には、PUM1 と標的 RNA との結合が関与していることが示唆された。

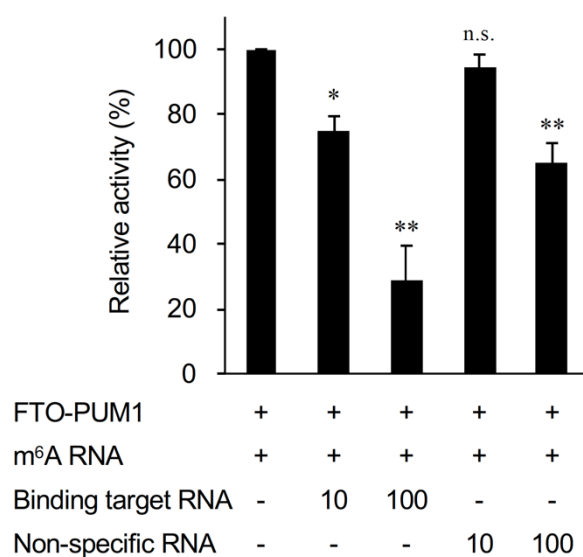


Fig. 2-5 Competitive demethylation activity of FTO-PUM1. Competition for the demethylation activity of 0.1 μ M FTO-PUM1 to m⁶A +6 RNA was achieved with binding target RNA or non-specific RNA. 10- and 100-times fold excesses of each competitor were added. Demethylation activities with competitor were normalized to that without competitor. Data are the mean \pm S.D.; *: $p < 0.01$; **: $p < 0.0001$; n.s.: not significant ($n \geq 3$, one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc analysis).

第二節 単一 RNA 配列を標的とする遺伝子発現抑制の検討

細胞内で内在性 RNA 代謝を自在に操作することは、PUF を用いた RNA 制御ツールの最終目標である[1-3]。細胞内で 8 リピート PUF を用いる際には、標的遺伝子の転写産物以外にも PUF と結合する配列を含む RNA が存在する可能性が高く、標的遺伝子以外の転写産物に結合することで標的遺伝子に対するツールとしての効果が弱まることが懸念される。Abil らは、転写後調節因子である Tristetraprolin (TTP) の C 末端に 8 リピート PUF を融合した TTP-PUF による遺伝子発現抑制法を報告した[10]。血管内皮増殖因子 *VEGFA* mRNA を標的にして、そのタンパク質産生の抑制効果を調べると、*VEGFA* mRNA 中の複数ヶ所に存在する 8 塩基を標的配列とする場合には強い抑制効果が示された。その一方で、*VEGFA* mRNA 中に 1 ヶ所にしかみられない 8 塩基を標的配列とする TTP-PUF (Fig.2-6、以下本論文内では TTP-PUF_V とする) では抑制効果が弱かった。このように、PUF は内在遺伝子の配列 1 ヶ所を標的とする場合にはその活性が弱いことがある。これは、PUF が他の転写産物に含まれる標的配列とも結合することが原因と考えられる。認識塩基数が増えれば、標的 RNA に対する選択能が向上し、より効果が強くなると期待される。そこで本研究では、第 1 章で作製した 16 リピート PUF を用いて *VEGFA* mRNA 中の単一配列を標的にした場合に、TTP-PUF が抑制効果を示すことができるかどうかの検討を行った。そのために、TTP-PUF_V のリピート 1~8 を用いて、8 リピートのタンデム連結体である 16 リピート PUF: PUF_T およびリピート 6、7 間への 8 リピート挿入体である 16 リピート PUF: PUF_I をそれぞれ作製した (Fig.2-6)。

作製した 16 リピート TTP-PUF が標的 RNA と結合するかどうかを調べるために、PUF ドメインを大腸菌内で発現させて精製したタンパク質と、各 PUF の標的 RNA 配列を含む RNA (*VEGFA*) (配列: 5'-FAM-GAAAUACAGAUUAUUCUUA AAAA-3') を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、PUF_V、PUF_T、PUF_I は同程度の結合親和性を示し、 K_d の違いは 2 倍以内であることがわかった (Fig. 2-7)。

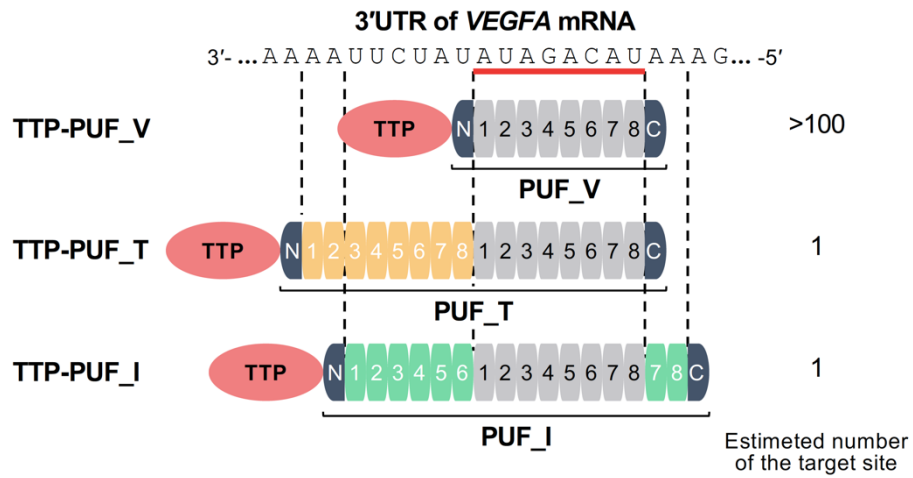


Fig. 2-6 Design of TTP-fused PUFs (TTP-PUFs) targeting the 3'-UTR of *VEGFA* mRNA and the estimated numbers of their target sites in human transcriptome. Schematic representation of PUF_V, PUF_T and PUF_I and their target sequences in the 3'-UTR of *VEGFA* mRNA are shown. Homology search of PUF target sequences against the human transcriptome was performed with GGRNA, a transcript-oriented search engine.

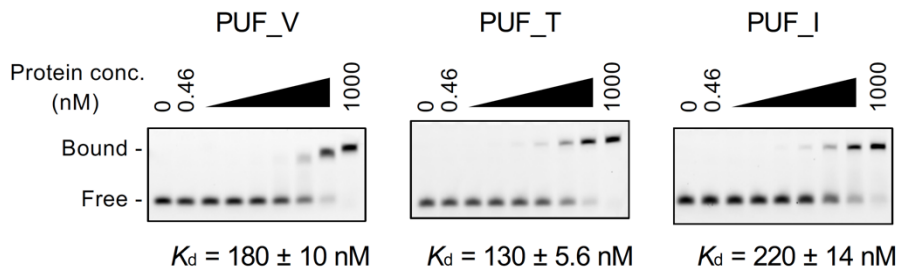


Fig. 2-7 EMSA of PUF domains, PUF_V, PUF_T and PUF_I, targeting *VEGFA* mRNA, to RNA(*VEGFA*). Representative results are shown. K_d indicates the mean \pm S.D. (n = 3).

PUFと標的 RNA 配列との結合が確認されたことから、TTP-PUF による *VEGFA* 遺伝子の発現抑制効果を調べた。TTP は AU-rich element への結合を介して mRNA の分解と翻訳抑制を行う転写後制御因子である[36–38]。なお本研究では、先行研究と同様に、RNA 結合能を失わせた TTP 変異体を用いた[39]。PUF と標的 mRNA の結合によって、TTP-PUF が mRNA の分解や翻訳抑制を行う複合体を誘導することで遺伝子発現を抑制することが期待される。各 TTP-PUF 発現ベクターを Flp-In 293 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に *VEGFA* の発現誘導剤として知られている 500 μ M CoCl_2 を含む培地に交換した[40,41]。さらに 24 時間培養した後、培地を回収して、分泌された *VEGFA* 濃度を ELISA 法によって定量した。先行研究と同様に、TTP-PUF_V は *VEGFA* のタンパク質産生を抑制できなかった (Fig. 2-8)。一方、16 リピート PUF をもつ TTP-PUF_T および TTP-PUF_I によって、*VEGFA* タンパク質産生は有意に抑制された。また *VEGFA* mRNA に標的配列を持たない 16 リピート PUF である PUF_U0S と PUF_U6S を用いた TTP-PUF_U0S および TTP-PUF_U6S の場合には、抑制効果は確認されなかった。なお、各 TTP-PUF の発現はウエスタンブロッティングアッセイによって確認された (Fig. 2-8)。以上の結果から、mRNA の単一配列を標的にする 16 リピート PUF を用いることで、内在遺伝子の発現を抑制できることが示された。

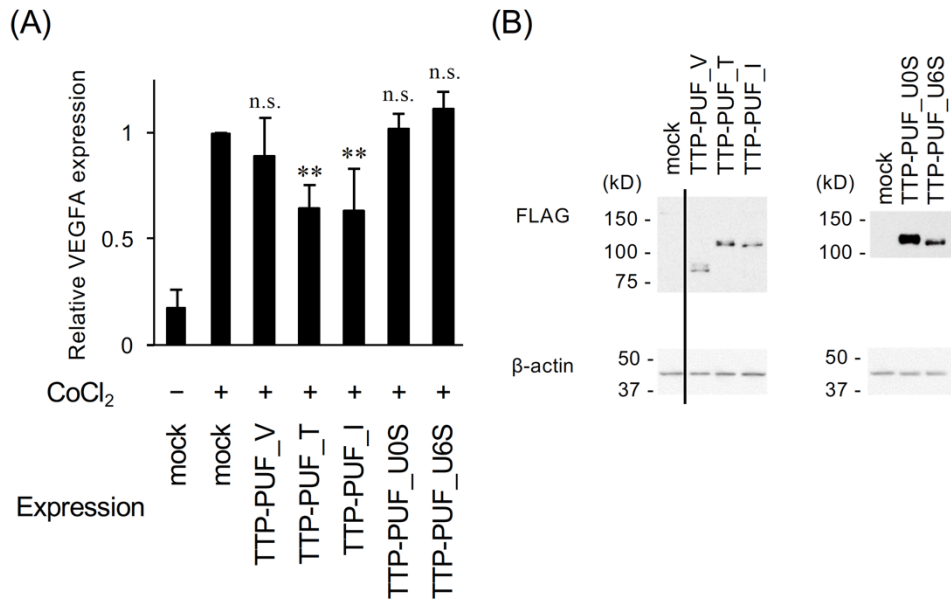


Fig. 2-8 Repression of endogenous VEGFA by 16-repeat TTP-PUFs. (A) Inhibition of hypoxia-induced VEGFA expression in cells transfected with engineered TTP-PUF expression vectors or the empty vector (mock). VEGFA was induced by treatment with CoCl₂ 24 h after transfection, and cells were incubated for an additional 24 h. Secreted VEGFA levels were measured by ELISA. TTP-PUF_U0S and TTP-PUF_U6S, targeting 5'-UUUUUUUUUGAUAUUA-3' and 5'-UUUGAUUAUUUUUUU-3', respectively, have no target sequence in *VEGFA* mRNA. VEGFA protein production levels were normalized to the total amount of protein and compared with mock treated with CoCl₂. Data are the mean ± S.D.; **: p < 0.0001; n.s.: not significant (n ≥ 3, one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc analysis). (B) Confirmation of TTP-PUF expression by western blotting assay.

興味深いことに、8リピート PUF を用いた TTP-PUF_V と 16リピート PUF を用いた TTP-PUF_T および TTP-PUF_I では、結合親和性や発現量に大きな差が見られないにも関わらず、TTP-PUF による VEGFA 産生の抑制効果に違いが生じた。これは、8塩基を標的配列とする TTP-PUF_V が VEGFA mRNA 以外の RNA に対しても結合できる可能性に起因すると考えられる。実際に、ヒトのトランスクリプトームにおける標的 RNA 配列のホモロジー検索を行ったところ、PUF_V の標的配列は VEGFA に加えて、様々な遺伝子の RNA に 100 サイト以上見つかった (GGRNA) [42]。一方、16リピート PUF である PUF_T や PUF_I の標的配列はどちらも VEGFA mRNA の 3'UTR にしか見つからなかった。そこで、共通する PUF_V の標的配列以外をランダムな配列とした類似 RNA 配列を競合 RNA として用いることで、標的 RNA に対する各 PUF の結合選択性を調べた。PUF_V の場合には、200 倍量の競合 RNA 添加によって標的 RNA との結合は消失した (Fig. 2-9)。一方、16リピート PUF である PUF_T や PUF_I の場合には、600 倍量の競合 RNA を添加しても標的 RNA との結合が保持された。このことから、16リピート PUF が 8リピート PUF よりも標的 RNA に高い選択性をもつことが確認された。

以上の結果から、TTP-PUF_T および TTP-PUF_I は、標的 VEGFA mRNA に対する結合選択性が TTP-PUF_V に比べて向上したことによって、VEGFA の高い発現抑制効果を示したと考えられる。

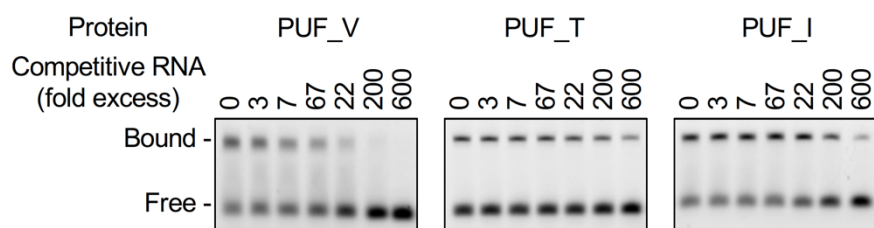


Fig. 2-9 Competitive RNA-binding assay of PUFs targeting VEGFA mRNA. Representative results are shown. Competition for the binding of PUFs to fluorescently labeled RNA: RNA(VEGFA) was achieved with unlabeled competitive RNA: 5'-NNNNNACAGAUNNNNNNNNNN-3'. N = A, U, G or C. The target sequence of PUF_V is underlined. Fold excesses of competitive RNA are shown above each lane.

本章では、8 リピート PUF を脱メチル化酵素 FTO と融合することで、標的 RNA との結合を介して、その近傍の m⁶A を特異的に脱メチル化する塩基修飾制御ツールを創出した。また 16 リピート PUF を用いることで内在性 mRNA 中の単一の配列を標的にしてその発現を抑制することができた。

総括

本研究では、配列特異的 RNA 結合タンパク質である PUF を基盤として、機能性 RNA 結合タンパク質の創出に取り組んだ。第一章では、PUF のリピート 1~8 を挿入することで作製した 16 リピート PUF について、挿入位置によって RNA 結合能が異なることを示すとともに、8 リピートの連結体およびリピート 6 と 7 の間への 8 リピート挿入体が、認識塩基数を増やすための伸長骨格として有効であることを見出した。第二章では、PUF を基盤とする新規 RNA 制御ツールとして RNA 特異的脱メチル化ツールを創出した。さらにトランスクリプトーム中で単一の RNA 配列を標的とする 16 リピート PUF を用いて、内在遺伝子の発現を抑制することができた。以上のことから、本研究によって、PUF を基盤とした RNA 制御法に塩基修飾制御が加えられたとともに、これまでよりも標的 RNA 選択的に RNA の制御が可能になったと考えられる。今後、転写後制御機構や細胞機能の研究、疾患治療法の開発など、多方面への応用が期待される。

実験の部

第一章に関する実験

プラスミド DNA の構築

1. 哺乳類発現ベクター： pCI-PUF-Halo-HA

PUF Assembly kit (Addgene #1000000051)の RNA 結合ドメインをコードする塩基配列を PCR 法により増幅した。この断片を、Gibson Assembly によって哺乳類細胞において強発現を誘導する pCI ベクターに挿入した。さらに C 末端側に Halo-tag、HA-tag を導入した哺乳類発現ベクターを作製した。8リピート PUF として、PUF_U、PUF_S および PUF_G を Golden Gate Assembly によって作製した。さらに、PCR 法により増幅した PUF_S のリピート 1~8 をコードする DNA 断片を、Gibson Assembly によって PUF_U のリピート挿入位置 $n = 0\sim 8$ に導入することで、16 リピート PUF: PUF_U0S~U8S を発現するプラスミド DNA を作製した。同様に、PUF_S のリピート 1~8 を PUF_G に導入した 16 リピート PUF: PUF_G0S~G8S を発現するプラスミド DNA を作製した。

2. 大腸菌発現ベクター： pET-His6-PUF

哺乳類発現ベクターと同様の方法で、8リピート PUF 骨格を pET28b ベクターの His-tag C 末端側へ導入した大腸菌発現用ベクターを作製した。8 リピート PUF として PUF_U、PUF_S および PUF_G を作製した。さらに、PUF_S のリピート 1~8 をコードする DNA 断片を PUF_U のリピート挿入位置 $n = 0, 6$ に導入することで、PUF_U0S および PUF_U6S を作製した。同様に、PUF_S のリピート 1~8 を PUF_G に導入した 16 リピート PUF: PUF_G0S~G8S を発現するプラスミド DNA を作製した。

第一章で作製した PUF について、各リピートで RNA と相互作用するアミノ酸 (A₁₂A₁₆) と標的 RNA 配列を Table 3 に示す。

3. ルシフェラーゼレポーターベクター： 3×GS, 3×US

pmirGLO ベクター (Promega) にコードされたホタルルシフェラーゼ遺伝子の 5'UTR

に標的 RNA 配列 3×US および 3×GS に対応する DNA 配列を導入したレポーターベクターを作製した。導入した標的配列 DNA を Table 4 に示す。

本研究で使用した全てのプラスミド DNA はシーケンス解析によって正しく作製できていることを確認した。

Table 3. The amino acids, A₁₂A₁₆ in each repeat, interacting with RNA bases and target RNA sequences are shown. A₁₂A₁₆ in the repeat 1-8 of PUF_S and their recognition bases are underlined. Nt and Ct mean N-terminal and C-terminal, respectively.

Protein	A ₁₂ A ₁₆ in repeat 1-8		Target RNA
	Ct		sequence
			5' - - - - -3'
PUF_S	<u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u>		<u>UGAUUUUA</u>
PUF_U	8NQ-7NQ-6NQ-5NQ-4NQ-3NQ-2NQ-1NQ		UUUUUUUU
PUF_U0S	8NQ-7NQ-6NQ-5NQ-4NQ-3NQ-2NQ-1NQ- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u>		UUUUUUUUUGAUUUUA
PUF_U1S	8NQ-7NQ-6NQ-5NQ-4NQ-3NQ-2NQ- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -1NQ		UUUUUUUUUGAUUUUAU
PUF_U2S	8NQ-7NQ-6NQ-5NQ-4NQ-3NQ- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -2NQ-1NQ		UUUUUUUGAUUUUAUU
PUF_U3S	8NQ-7NQ-6NQ-5NQ-4NQ- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -3NQ-2NQ-1NQ		UUUUUUGAUUUUAUUU
PUF_U4S	8NQ-7NQ-6NQ-5NQ- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -4NQ-3NQ-2NQ-1NQ		UUUUUGAUUUUAUUUU
PUF_U5S	8NQ-7NQ-6NQ- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -5NQ-4NQ-3NQ-2NQ-1NQ		UUUUGAUUUUAUUUUU
PUF_U6S	8NQ-7NQ- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -6NQ-5NQ-4NQ-3NQ-2NQ-1NQ		UUUGAUUUUAUUUUUU
PUF_U7S	8NQ- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -7NQ-6NQ-5NQ-4NQ-3NQ-2NQ-1NQ		UUGAUUUUAUUUUUUU
PUF_U8S	<u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -8NQ-7NQ-6NQ-5NQ-4NQ-3NQ-2NQ-1NQ		UGAUUUUAUUUUUUUU
PUF_G	8SE-7SE-6SE-5SE-4SE-3SE-2SE-1SE		GGGGGGGG
PUF_G0S	8SE-7SE-6SE-5SE-4SE-3SE-2SE-1SE- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u>		GGGGGGGGUGAUUUUA
PUF_G1S	8SE-7SE-6SE-5SE-4SE-3SE-2SE- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -1SE		GGGGGGGGUGAUUUUAG
PUF_G2S	8SE-7SE-6SE-5SE-4SE-3SE- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -2SE-1SE		GGGGGGGGUGAUUUUAGG
PUF_G3S	8SE-7SE-6SE-5SE-4SE- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -3SE-2SE-1SE		GGGGGGGGUGAUUUUAGGG
PUF_G4S	8SE-7SE-6SE-5SE- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -4SE-3SE-2SE-1SE		GGGGGGGGUGAUUUUAGGGG
PUF_G5S	8SE-7SE-6SE- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -5SE-4SE-3SE-2SE-1SE		GGGGGGGGUGAUUUUAGGGGG
PUF_G6S	8SE-7SE- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -6SE-5SE-4SE-3SE-2SE-1SE		GGGGGGGGUGAUUUUAGGGGGG
PUF_G7S	8SE- <u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -7SE-6SE-5SE-4SE-3SE-2SE-1SE		GGGGGGGGUGAUUUUAGGGGGGG
PUF_G8S	<u>8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ</u> -8SE-7SE-6SE-5SE-4SE-3SE-2SE-1SE		GGGGGGGGUGAUUUUAGGGGGGGG

Table 4. DNA sequences inserted in 5'UTR of pmirGLO for luciferase reporter assay.

Reporter	DNA sequence (5' --- 3')
3×US	AATTCCTTTTTTTTTTGATATTATTTTTTTTTTTTGGATATTATTTTTTTTTTTTGATATTATTTTTTTTCGAT
3×GS	AATTCGGGGGGGGGTGATATTAGGGGGGGGGGTGATATTAGGGGGGGGGGTGATATTAGGGGGGGGCGAT

細胞培養

マウス胎児線維芽細胞 (NIH3T3 細胞) は、10%非働化ウシ胎児血清 (FBS, Gibco) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, Wako) 中にて培養した。37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、80~90%コンフルエントの状態にて 2-3 日毎に継代を行った。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ (RNA 結合能の評価)

作製した哺乳類細胞発現ベクター (120 ng)、ルシフェラーゼレポーターベクター (1 ng)、および pCI (80 ng) を 70~80%コンフルエントの状態の NIH3T3 細胞に同時にトランスフェクションした。トランスフェクションは Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用い、推奨プロトコールに従って行った。トランスフェクションしてから 24 時間後のホタルルシフェラーゼ活性を Dual luciferase reporter system (Promega) を用いて測定した。得られたホタルルシフェラーゼ活性は、レポーターベクターにコントロールレポーターとして導入されているウミシイタケルシフェラーゼ活性を用いて標準化した。

タンパク質発現の確認 (ウエスタンブロッティングアッセイ)

哺乳類細胞発現ベクターをトランスフェクションした NIH3T3 細胞を 24 時間培養した。細胞を RIPA buffer で溶解した後に超音波処理し、遠心分離によって上清を回収した。回収された上清中のタンパク質濃度を Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) によって測定した。各上清に 2×SDS sample buffer を加えて 95°C で熱変性させた。SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜へ転写した。転写した PVDF 膜に対して高親和性抗 HA 抗体 (Roche: 3F10) (1:1000)、抗 β-actin 抗体

(Sigma Aldrich: AC-74)(1:4000)を1次抗体としてTBS-T (0.5% Tween20、5% スキムミルク含有 TBS)に希釈してインキュベーション後、HRP 標識抗ラット IgG 抗体 (Beckman Coulter: 732664) (1:5000)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham: NA93) (1:5000)をそれぞれ二次抗体としてTBS-T に希釈しインキュベーションした。抗原-抗体複合体は Amersham ECL Prime (GE Healthcare)により可視化し、LAS 3000 mini (Fujifilm)によって検出した。

タンパク質精製

作製した大腸菌発現用ベクターで *E. coli* BL21(DE3)株をトランスフォーメーションした後、Km-LB 寒天プレートに播種して 37°C で終夜培養した。形成されたコロニーから採取した大腸菌を 37°C、LB 培地で培養後、OD₆₀₀ = 0.6~1.0 の時点で最終濃度 0.1 mM となるように IPTG を加え、20°C で終夜培養した。遠心分離によって集菌した後、Buffer A (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 40 mM imidazole, pH 7.4)に懸濁し、超音波破碎した後に遠心分離によって可溶性画分を得た。この可溶性画分をアフィニティークロマトグラフィーによって精製した[カラム: HisTrap FF (GE Healthcare); 溶出液= Buffer B (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 7.4)]。続いて限外濾過によって濃縮後、Buffer C に置換した[フィルター: AmiconUltra 0.5 (Merck Millipore); Buffer C = 20mM HEPES, 100mM KCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT, pH7.4]。タンパク質純度は SDS-PAGE とその後の Coomassie blue staining によって確認し、タンパク質は Glycerol (50% v/ v)を添加して-80°C で保存した。

RNA 結合親和性の評価(Electrophoretic mobility shift assay (EMSA))

結合反応は、10 mM HEPES、50 mM KCl、0.5 mM EDTA、2 mM DTT、0.2 U/μL Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega)、0.1 mg/mL BSA、0.1 mg/mL yeast tRNA (Ambion)、0.01% Tween20、2% Ficoll を含む緩衝液中で 5 nM 5'末端 FAM 修飾 RNA 断片と 500 nM から 3 倍ずつ段階希釈した

精製タンパク質を 25°C で 1 時間インキュベートすることにより行った。タンパク質と RNA の結合反応後、反応液の一部を、0.5×TBE を用いて 5%非変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動することで、遊離の RNA とタンパク質と結合している RNA を分離した。泳動後のゲルは Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare)によって可視化した。さらに、Image J software (NIH)とカレイダグラフ (Synergy Software)を用いて解析した。

EMSA に使用したオリゴ RNA の配列を Table 5 に示す。

Table 5. Sequences of RNA oligomers for EMSA.

RNA oligomer	Sequence (5' --- 3')
PUF_U target RNA	[FAM] -UUGGUUUUUUUUGGACAUGUAUAUAGU
RNA(US)	[FAM] -CCUUUUUUUUUGAUUAUUUUUUUUUCC
RNA(CS)	[FAM] -UUCUUUUUUUGAUUAUUUUUUUUUCC
RNA(GS)	[FAM] -UUGGGGGGGUGAUUAUUAGGGGGGGUU

第二章に関する実験

プラスミド DNA の構築

1. 大腸菌発現ベクター: pET-His6-FTO-strep, pET-His6-FTO-PUM1-strep

マウス FTO をコードする cDNA 断片を pET28b ベクターの His-tag をコードする配列の 3'末端側へ導入した pET-His6-FTO-strep を作製した。さらに PUM1配列をコードする塩基配列を PCR 法により増幅し、2×GSS リンカーをコードする配列と共に、FTO をコードする配列の 3'末端側に導入した pET-His6-FTO-2×GSS-PUM1-strep を作製した。同様に 1×GSS、3×GSS および XTEN リンカーを持った FTO-PUM1 をそれぞれ作製した。また PUF_V、PUF_T および PUF_I をコードするプラスミド DNA の作製は第一章と同様に行った。

2. 哺乳類発現ベクター: pCMV-TTP(C147R)-GG-PUF

PUF Assembly kit の pCMV-TTP(C147R)-GG-PUF ベクターを用いて Golden Gate Assembly により TTP-PUF_V 発現ベクターを作製した。16リピート TTP-PUF 発現プラスミド DNA は第一章の 16 リピート PUF 作製と同様に PCR 法により増幅したリピート 1~8 をコードする DNA 断片を Gibson Assembly によって 8 リピート TTP-PUF の対応する位置へ導入することで作製した。

第二章で作製した PUF について、各リピートで RNA と相互作用するアミノ酸 (A₁₂A₁₆) と標的 RNA 配列を Tables 6 に示す。

Table 6. The amino acids, A₁₂A₁₆ in each repeat, interacting with RNA bases and target RNA sequences are shown. A₁₂A₁₆ in the repeat 1-8 of PUF_V and their recognition bases are underlined. Nt and Ct mean N-terminal and C-terminal, respectively.

Protein	A ₁₂ A ₁₆ in repeat	Target RNA sequence	
		Nt	5'- ---- -3'
PUM1	8NQ-7SE-6NQ-5CQ-4NQ-3CQ-2NQ-1SQ		UGUAUUAU
PUF_V	<u>8NQ-7CQ-6SR-5CQ-4SE-3CQ-2NQ-1SQ</u>		<u>UACAGAU</u>
PUF_T	<u>8NQ-7CQ-6SR-5CQ-4SE-3CQ-2NQ-1SQ</u> -8NQ-7CQ-6NQ-5SR-4NQ-3NQ-2CQ-1SQ		<u>UACAGAUUAUCUUA</u>
PUF_I	8CQ-7CQ- <u>8NQ-7CQ-6SR-5CQ-4SE-3CQ-2NQ-1SQ</u> -6NQ-5CQ-4NQ-3SR-2NQ-1NQ		<u>AAUACAGAUUAUCUU</u>
PUF_U0S	8NQ-7NQ-6NQ-5NQ-4NQ-3NQ-2NQ-1NQ-8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ		UUUUUUUUUGAUUAUA
PUF_U6S	8NQ-7NQ-8NQ-7SE-6CQ-5NQ-4CQ-3NQ-2NQ-1CQ-6NQ-5NQ-4NQ-3NQ-2NQ-1NQ		UUUGAUUAUUUUUUU

タンパク質精製

作製した大腸菌発現用ベクターで *E. coli* BL21(DE3)株にトランスフォーメーションした後、Km-LB 寒天プレートに播種し、37°C で終夜培養した。形成されたコロニーから採取した大腸菌を 37°C、LB 培地で培養後、OD₆₀₀ = 0.6~1.0 の時点で最終濃度 0.1 mM となるように IPTG を加え、18°C で終夜培養した。遠心分離によって集菌した後、Buffer A に懸濁し、超音波破碎した後に遠心分離によって可溶性画分を得た。この可溶性画分をアフィニティークロマトグラフィーによって精製した[カラム: HisTrap FF; 洗浄液= Buffer A; 溶出液= Buffer B]。次に、TTP-PUF_V、TTP-PUF_T お

よび TTP-PUF_I を限外濾過によって濃縮した後、Buffer C に置換した[フィルター: AmiconUltra 0.5]。FTO および FTO-PUM1 は、さらにアフィニティークロマトグラフィーによって精製し[カラム: StrepTrap HP (GE Healthcare); 洗浄液= Buffer D (274 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 20 mM Na₂HPO₄, 4 mM KH₂PO₄); 溶出液= Buffer E (274 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 20 mM Na₂HPO₄, 4 mM KH₂PO₄, 2.5 mM desthiobiotin)]、限外濾過によって濃縮した後 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) に置換した[フィルター: AmiconUltra 0.5]。精製したタンパク質の純度を SDS-PAGE とその後の Coomassie blue staining によって確認し、Glycerol (30 or 50% v/v) を添加して -80°C で保存した。

脱メチル化反応

1. m⁶A の脱メチル化

Demethylation buffer (150 μM α-ketoglutarate, 70 μM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 1 mM ascorbic acid, 50 mM NaCl, 50 μg/mL BSA, 100 μg/mL yeast tRNA, 0.01% Tween 20, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5) 中で、5′末端 FAM 標識オリゴ RNA 断片 (100 nM) あるいは 5′末端 FAM、3′末端 BHQ-1 標識 RNA/DNA キメラオリゴ核酸断片 (500 nM) を FTO または FTO-PUM1 と混合し、25°C で 1 時間インキュベートした。脱メチル化反応後、反応液の一部と 5% Ficoll を 1:1 で混合し、0.5×TBE を用いて 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動することで RNA を分離し、Typhoon FLA 9000 によって可視化し、RNA への結合の確認を行った。さらに、残りの反応液を 90°C で 3 分間インキュベートし、脱メチル化反応サンプルの 1/10~1/5 量を MazF による切断反応に用いた。

2. RNA 競合条件での m⁶A の脱メチル化

Demethylation buffer 中で、5′末端 FAM 標識オリゴ RNA 断片 (100 nM) と 0.1 μM FTO-PUM1 および標識 RNA 断片に対してヌクレオチド比で 10 倍あるいは 100 倍量の Competitor RNA (Binding target RNA または Non-specific RNA) とを混合し、25°C で 1 時間インキュベートした。脱メチル化反応後、反応液を 90°C で 3 分

間インキュベートし、1/10~1/5 量を MazF による切断反応に用いた。

脱メチル化反応に使用したオリゴ核酸および Competitor RNA の配列を Table 7 に示す。

Table 7. Sequences of oligonucleotides and competitor RNA for demethylation assay. The target sequence of PUM1 is underlined. A, U, G and C: RNA bases; dA, dT and dG; DNA bases.

Oligomer	Sequence (5' --- 3')
m ⁶ A RNA/DNA	[FAM] - dCdAdTdAG (m ⁶ A) CAdTdAdTdGdT - [BHQ-1]
A RNA/DNA	[FAM] - dCdAdTdAGACAdTdAdTdGdT - [BHQ-1]
m ⁶ A -1	[FAM] - AUUGUAU <u>AU</u> (m ⁶ A) CAUUUUA
A -1	[FAM] - AUUGUAU <u>AU</u> ACAUUUUA
m ⁶ A +2	[FAM] - AUUGUAU <u>AUA</u> AG (m ⁶ A) CAUUUUA
A +2	[FAM] - AUUGUAU <u>AUA</u> AGACAUUUUA
m ⁶ A +6	[FAM] - AUUGUAU <u>AUAUC</u> UAAG (m ⁶ A) CAUUUUA
A +6	[FAM] - AUUGUAU <u>AUAUC</u> UAAGACAUUUUA
m ⁶ A +10	[FAM] - AUUGUAU <u>AUAUCGGC</u> UUUAG (m ⁶ A) CAUUUUA
A +10	[FAM] - AUUGUAU <u>AUAUCGGC</u> UUUAGACAUUUUA
Binding target RNA	[Biotin] - CCAGAAUUGU <u>UUAUAUAUAUAUA</u> UUCG GGGCCCGCCUGUUUACGGUGCCGUGGCCGGUUAAAGGUUGCACCGUGAAAUAUACGGAAGCCGAA AUUGC GGCCGCAUGUCAGACCUUCCUGAAACUGAACGAUUACCUGCAGGUUGAAACGAUCCAGGC GCUGGAAGAACUGGCCGUUCGCGAAAAAGCCAAUGAAGAUGCAGUGCCGUGUGCAUUGGCAGAAU
Non-specific RNA	UUCCGCGUGCGGGCGUUGGUCCGAGCUGUGAUGAUGAAGUGGAUCUGAAAUCUCGCGCGGCCUUAU AACGUGACCCUGCUGAAUUUUUAUGGAUCCGCAGAAAUGCCGUAUCUGAAAAGAAGAACCGUACUU CGGCAUGGGUAAAUGGCAGUUAGUUGGCAUCACGAUGAAAACCUGGUGGAUCGUAGCGCAGUGG CGGUUUUAUUCUUA

蛍光強度測定による MazF 切断の検出

Corning nonbinding surface 96 well half area microplate (Corning)において、メチル化反応後のオリゴ RNA/DNA キメラプローブ (50 nM)と 0.08 U/μL MazF を MazF reaction buffer (40 mM sodium phosphate (pH 7.5), 0.01% Tween 20, 5 mM EDTA) 中で混合し、Arvo sx 1420 multilabel counter (Perkin Elmer)によつ

て 37°C で 20-30 秒ごとに約 1 時間、蛍光強度を測定した[励起フィルター: F485、吸収フィルター: F535]。測定時間に対して蛍光強度をプロットし、飽和した蛍光強度の平均値を各サンプルの測定値とした。非メチル化プローブを MazF で切断した際の平均飽和蛍光強度に対して、各サンプルの測定値を標準化し、脱メチル化活性とした。

PAGE による MazF 切断の検出

脱メチル化反応後のオリゴ RNA 断片 (10 nM) と MazF (0.1 U/μL) を MazF reaction buffer 中で混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。MazF 反応後、Hi-Di formamide (Thermo Fisher Scientific) を 1:1 で混合し、95°C で 1 分加熱した反応溶液を 0.5×TBE 緩衝液中で 15%変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、切断された RNA と未切断の RNA を分離した。泳動後のゲルは Typhoon FLA 9000 によって可視化し、Image J software にて解析した。非メチル化プローブを MazF で切断した際の RNA 切断割合に対して各サンプルの RNA 切断割合を標準化し、脱メチル化活性とした。

細胞培養

ヒト胎児腎細胞由来 Flp-In 293 細胞 (Thermo Fisher Scientific) は、10%FBS を含む DMEM 中にて培養した。37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、80~90%コンフルエントの状態 で 2-3 日毎に継代を行った。

VEGFA 発現の評価

TTP-PUF 発現ベクター (500 ng)、あるいは pCI (500 ng) を 70~80%コンフルエントの状態の Flp-In 293 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションは Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用い、推奨プロトコールに従って行った。トランスフェクション後 24 時間で 500 μM CoCl₂ を添加した培地に交換し、さらに 24 時間培養した。培地上清を回収し、Human VEGF DuoSet kit (R&D Systems) を用いて VEGFA タンパク質分泌量を測定した。Flp-In 293 細胞は RIPA

buffer で溶解、遠心分離後、BCA Protein Assay kit を用いて総タンパク質濃度を測定した。VEGFA 発現レベルは VEGFA タンパク質分泌量を総タンパク質濃度によって標準化した。

TTP-PUF 発現の確認(ウエスタンブロットイングアッセイ)

哺乳類細胞発現ベクターをトランスフェクションした Flp-In 293 細胞を 24 時間培養した。細胞を RIPA buffer で溶解後、超音波処理し、遠心分離によって上清を回収した。回収された上清中のタンパク質濃度は BCA protein assay kit によって測定された。各上清に 2×SDS sample buffer を加えて 95°C で熱変性させた。SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜へ転写した。転写した PVDF 膜に対して抗 FLAG 抗体 (Sigma Aldrich: F3165)(1:1000)、抗 β -actin 抗体 (Sigma Aldrich: AC-74)(1:4000) を 1 次抗体として TBS-T に希釈してインキュベーション後、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham: NA93)(1:4000) を二次抗体として TBS-T に希釈しインキュベーションした。抗原-抗体複合体は Amersham ECL Prime により可視化し、LAS 3000 mini によって検出した。

RNA 結合親和性の評価

1. 標的 RNA に対する結合親和性の評価

結合反応は 5 nM 5'末端 FAM 修飾 RNA[RNA(VEGFA)]と 500 nM から 3 倍ずつ段階希釈した精製タンパク質を緩衝液(10 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.2 U/ μ L Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, 0.1 mg/mL BSA, 0.1 mg/mL yeast tRNA, 0.01% Tween20, 2% Ficoll)中で 25°C で 1 時間インキュベートすることにより行った。反応後、0.5×TBE を用いて 5%非変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動することで RNA を分離した。泳動後のゲルは Typhoon FLA 9000 によって可視化し、Image J software とカレイダグラフを用いて解析した。

2. 競合結合実験

各 PUF タンパク質が 50%以下の RNA 結合能を示すように、それぞれ 120 nM PUF_V、120 nM PUF_T および 200 nM PUF_I を用いた。結合反応は、上記で用いた緩衝液中に 5 nM RNA(VEGFA)と精製タンパク質、3 μ M から 3 倍ずつ段階希釈した Competitive RNA を 25°C で 1 時間インキュベートすることにより行った。結合反応後、上記と同様に遊離 RNA と PUF と結合している RNA を分離して可視化した。

実験に使用したオリゴ RNA の配列を Table 8 に示す。

Table 8. Sequences of RNA oligomers for EMSA and competitive binding assay. N: A, G, U or C.

RNA oligomer	Sequence (5'---3')
RNA(VEGFA)	[FAM] -GAAAUACAGAUUAUCUAAAA
Competitive RNA	NNNNUACAGAUANNNNNNNNNN

RNA 配列相同性検索

PUF_V、PUF_T および PUF_I の標的配列と完全に一致する配列を含む転写産物数を GGRNA (<http://GGRNA.dbcls.jp/>) において検索した。検索結果において、各遺伝子の転写産物バリエーションを同一とみなし、性質不明の転写産物を結果から除外した。

引用文献

1. Abil, Z. & Zhao, H. Engineering reprogrammable RNA-binding proteins for study and manipulation of the transcriptome. *Mol. Biosyst.* 11, 2658 (2015).
2. Mackay, J. P., Font, J. & Segal, D. J. The prospects for designer single-stranded RNA-binding proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 256 (2011).
3. Chen, Y. & Varani, G. Engineering RNA-binding proteins for biology. *FEBS J.* 280, 3734 (2013).
4. Hall, T. M. T. De-coding and re-coding RNA recognition by PUF and PPR repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 36, 116 (2016).
5. East-Seletsky, A. *et al.* Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature* 538, 270 (2016).
6. Abudayyeh, O. O. *et al.* RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 550, 280 (2017).
7. Wang, X., Zamore, P. D. & Hall, T. M. T. Crystal structure of a Pumilio homology domain. *Mol. Cell* 7, 855 (2001).
8. Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P. D. & Hall, T. M. T. Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* 110, 501 (2002).
9. Cheong, C. G. & Hall, T. M. T. Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13635 (2006).
10. Abil, Z., Denard, C. A. & Zhao, H. Modular assembly of designer PUF proteins for specific post-transcriptional regulation of endogenous RNA. *J. Biol. Eng.* 8, 7 (2014).
11. Dong, S. *et al.* A specific and modular binding code for cytosine recognition in Pumilio/FBF (PUF) RNA-binding domains. *J. Biol. Chem.* 286, 26732 (2011).
12. Filipovska, A., Razif, M. F. M., Nygård, K. K. A. & Rackham, O. A universal code for RNA recognition by PUF proteins. *Nat. Chem. Biol.* 7, 425 (2011).
13. Wang, Y., Wang, Z. & Hall, T. M. T. Engineered proteins with Pumilio/fem-3 mRNA binding factor scaffold to manipulate RNA metabolism. *FEBS J.* 280, 3755 (2013).
14. Wang, Y., Cheong, C. G., Hall, T. M. T. & Wang, Z. Engineering splicing factors with designed specificities. *Nat. Methods* 6, 825 (2009).
15. Cooke, A., Prigge, A., Opperman, L. & Wickens, M. Targeted translational regulation using the PUF protein family scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15870 (2011).
16. Cao, J., Arha, M., Sudrik, C., Schaffer, D. V & Kane, R. S. Bidirectional

- regulation of mRNA translation in mammalian cells by using PUF domains. *Angew. Chemie Int. Ed.* 53, 4900 (2014).
17. Choudhury, R., Tsai, Y. S., Dominguez, D., Wang, Y. & Wang, Z. Engineering RNA endonucleases with customized sequence specificities. *Nat. Commun.* 3, 1147 (2012).
 18. Mori, T. *et al.* Cleavage of influenza RNA by using a human PUF-based artificial RNA-binding protein e staphylococcal nuclease hybrid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 479, 736 (2016).
 19. Yamada, T., Yoshimura, H., Inaguma, A. & Ozawa, T. Visualization of nonengineered single mRNAs in living cells using genetically encoded fluorescent probes. *Anal. Chem.* 83, 5708 (2011).
 20. Cao, J. *et al.* A universal strategy for regulating mRNA translation in prokaryotic and eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res.* 43, 4353 (2015).
 21. Adamala, K. P., Martin-Alarcon, D. A. & Boyden, E. S. Programmable RNA-binding protein composed of repeats of a single modular unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E2579 (2016).
 22. Yamada, T. *et al.* Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres. *Sci. Rep.* 6, 38910 (2016).
 23. Yoshimura, H., Inaguma, A., Yamada, T. & Ozawa, T. Fluorescent probes for imaging endogenous β -actin mRNA in living cells using fluorescent protein-tagged pumilio. *ACS Chem. Biol.* 7, 999 (2012).
 24. Ozawa, T., Natori, Y., Sato, M. & Umezawa, Y. Imaging dynamics of endogenous mitochondrial RNA in single living cells. *Nat. Methods* 4, 413 (2007).
 25. Schellenberger, V. *et al.* A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nat. Biotechnol.* 27, 1186 (2009).
 26. Meyer, K. D. *et al.* Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* 149, 1635 (2012).
 27. Dominissini, D. *et al.* Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature* 485, 201 (2012).
 28. Liu, J. *et al.* A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nat. Chem. Biol.* 10, 93 (2013).
 29. Wang, X. *et al.* Structural basis of N⁶-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. *Nature* 534, 575 (2016).

30. Wang, P., Doxtader, K. A. & Nam, Y. Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases. *Mol. Cell* 63, 306 (2016).
31. Śledź, P. & Jinek, M. Structural insights into the molecular mechanism of the m⁶A writer complex. *Elife* 5, e18434 (2016).
32. Jia, G. *et al.* N⁶-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* 7, 885 (2011).
33. Zhao, B. S., Roundtree, I. A. & He, C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 31 (2016).
34. Zheng, G. *et al.* ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol. Cell* 49, 18 (2013).
35. Imanishi, M., Tsuji, S., Suda, A. & Futaki, S. Detection of N⁶-methyladenosine based on the methyl-sensitivity of MazF RNA endonuclease. *Chem. Commun.* 53, 12930 (2017).
36. Brooks, S. A. & Blackshear, P. J. Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gene Regul. Mech.* 1829, 666 (2013).
37. Qi, M. Y. *et al.* AU-rich-element-dependent translation repression requires the cooperation of tristetraprolin and RCK/P54. *Mol. Cell. Biol.* 32, 913 (2012).
38. Franks, T. M. & Lykke-Andersen, J. TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev.* 21, 719 (2007).
39. Lai, W. S. *et al.* Evidence that Tristetraprolin Binds to AU-Rich Elements and Promotes the Deadenylation and Destabilization of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4311 (1999).
40. Osera, C. *et al.* Induction of VEGFA mRNA translation by CoCl₂ mediated by HuR. *RNA Biol.* 12, 1121 (2015).
41. Piret, J., Mottet, D., Raes, M. & Michiels, C. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 443 (2002).
42. Naito, Y. & Bono, H. GGRNA: an ultrafast, transcript-oriented search engine for genes and transcripts. *Nucleic Acids Res.* 40, W592 (2012).

謝辞

終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました京都大学化学研究所 二木 史朗 教授に謹んで感謝の意を表します。

数々の御指導、御助言を頂きました 今西 未来 博士（京都大学化学研究所 講師）、河野 健一 博士（京都大学化学研究所 助教）、武内 敏秀 博士（大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座講師）に深く感謝致します。

折りに触れ、活発なご討議を戴き、研究以外の面でも大変御世話になりました 奥 彰彦 博士（アストラゼネカ株式会社）、川口 祥正 博士（塩野義製薬株式会社）、辻 将吾 博士（国立長寿医療研究センター）、村山 知 博士（警察庁）および京都大学化学研究所 生体機能設計化学研究領域の皆様にご心より感謝致します。

最後に、私が研究の道に進むことを理解し、惜しみないご支援を下さった父、母、兄、祖父母、親族の方々、友人達に、この場をお借りして心から感謝致します。