

配列選択的な RNA 修飾制御ツールの開発に関する研究

2024

音成 兼光

目次

序論		4
第一章	基質認識様式に基づくオフターゲット効果抑制型脱メチル化 酵素の創出	 8
第一節	m ⁶ A 脱メチル化酵素の基質認識能低下を指向した変異導入	 11
第一部	FTO に対する変異導入	
第二部	ALKBH5 に対する変異導入	
第二節	Cap 構造上の m ⁶ A _m に対する配列選択的脱メチル化ツール への応用	 25
第二章	リガンド制御可能な配列選択的脱メチル化ツールの創出	 34
総括		40
実験の部		42
引用文献		49
謝辞		53

略号 一覽

ACN: Acetonitrile

ALKBH5: AlkB homolog 5

AP: ALKBH5-PUF

A_m: 2'-*O*-methyladenosine

BSA: Bovine serum albumin

CID: Chemically inducible dimerization

CIP: Calf intestinal alkaline phosphatase

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

Dcp2: Decapping mRNA 2

D-MEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DSBH: Double stranded beta helix

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

eIF4E: eukaryotic initiation factor 4E

FAM: 6-Carboxyfluorescein

FKBP: FK506 binding protein

FP: FTO-PUF

FRB: FKBP-rapamycin-binding domain of FKBP12-rapamycin associated protein

FTO: Fat mass and obesity-associated protein

GTP: Guanosine triphosphate

HEK293: Human embryonic kidney 293

HFBA: Heptafluorobutyric acid

IVT: *In vitro* transcription

imodAP: Ligand-inducible modALKBH5-PUF

imodFP: Ligand-inducible modFTO-PUF

modALKBH5: modulated RNA-binding ALKBH5

modAP: modALKBH5-PUF

modFP: modFTO-PUF

modFTO: modulated RNA-binding FTO

mTOR: mammalian target of rapamycin

m⁶A: N⁶-methyladenosine

m⁶A_m: N⁶, 2'-O-dimethyladenosine

m⁷G: 7-methylguanosine

NRL2: Nucleotide recognition lid 2

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PBS: Phosphate-buffered saline

PCIF1: Phosphorylated C-terminal domain interacting factor 1

PPi: Pyrophosphate

PUF: Pumilio and fem-3 mRNA-binding factor

RppH: RNA 5' pyrophosphohydrolase

SAH: S-adenosylhomocysteine

SAM: S-adenosylmethionine

SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SPE: Solid phase extraction

TAMRA: 5-Carboxytetramethylrhodamine

TBE: Tris-borate EDTA buffer

5' UTR: 5' untranslated region

序論

RNA は転写されたのちに様々な化学修飾を受けることが明らかにされてきており、その種類は 150 種を超え、塩基配列以上の情報を生み出す一因として理解されている。また、次世代シーケンサーや遺伝子改変技術などの成熟により、新たな修飾塩基の発見やその転写産物上の分布、及び修飾編集酵素の同定が進んできた¹⁻⁶。一方で、修飾 RNA 塩基の機能を明らかにしようとする研究も、近年では注目を集めている。その一例として、SARS-CoV-2 に対する mRNA ワクチンに修飾 RNA 塩基を導入し、その安定性や翻訳効率を向上させたように⁷、修飾 RNA の機能を応用した核酸医薬品の開発が精力的に進められており、設計の基礎となる修飾 RNA の機能解明は非常に重要な研究課題の一つと言える。これら修飾 RNA の機能を解明する手法として、修飾を導入する酵素や除去する酵素の発現量を、ノックアウトや強制発現によって操作することで転写産物全体の修飾レベルを制御し、そこから得られてきたシグナルや表現型の変化に基づいて、標的とした修飾 RNA が担う機能を推察する手法が一般的である^{6,8,9} (Fig. 0-1)。しかしながら、転写産物全体の修飾レベルを変化させてしまうため、様々な遺伝子上に存在する修飾 RNA の内、どの遺伝子上の、どの配列に存在する修飾 RNA が要因であったのかというミクロな情報を得ることが出来ないというデメリットが存在する。特に、局所的に多様な二次構造を形成する RNA に関して、修飾 RNA が担う機能を解明する上で、修飾 RNA 周辺の配列情報と修飾 RNA が発揮する活性の関連性は非常に重要な要素であるため、更なる修飾 RNA 研究の発展には、特定の配列上に存在する修飾 RNA の修飾状態を制御するツールや手法の開発が必要不可欠である。

この課題に対して近年では、特定の配列に選択的に結合する RNA 結合タンパク質と修飾 RNA 編集酵素を融合させ、結合配列近傍の修飾 RNA を編集酵素の標的にするツールの開発が報告されてきた。所属研究室では、adenosine の 6 位の窒素がメチル化された *N*⁶-methyladenosine (m⁶A) を、配列選択的に脱メチル化するツールとして、任意の配列を認識して結合するように設計可能な RNA 結合タンパク質である Pumilio and fem-3 mRNA-binding factor (PUF) と m⁶A 脱メチル化酵素 (m⁶A-eraser) の 1 つで

ある Fat mass and obesity-associated protein (FTO) を融合させた FTO-PUF (FP) を開発し、PUF 標的配列近傍の m⁶A を選択的に脱メチル化することに成功した¹⁰ (Fig. 0-2)。しかしながら、FP の濃度依存的に、PUF 標的配列を持たない RNA 上の m⁶A に対する活性が表れてしまうオフターゲット効果も確認され、幅広い濃度域で狙った m⁶A に対する選択性を示すためには改良の余地があることも同時に示唆されていた¹⁰ (Fig. 0-3)。また類似するツールとして、DNA や RNA の切断活性を不活性化した catalytically-dead CRISPR Cas9 もしくは 13 (dCas9 もしくは dCas13) を配列選択的な RNA 結合タンパク質として、m⁶A-writer や m⁶A-eraser と融合させたツールがこれまでに報告されてきたが、オフターゲット効果の問題を考慮してツール設計をした研究は極めて少なく、潜在的に克服すべき課題として残存していると考えられる¹¹⁻¹⁵。そこで本研究では、FP を基盤としてオフターゲット効果を克服する手法を確立し、オフターゲット効果抑制型の配列選択的 RNA 修飾制御ツールを開発した【第一章】。更に、配列選択的な RNA 修飾の制御をリガンド依存的なものに改変し、任意のタイミングで活性を発揮させるツールへの応用を図った【第二章】。

これら脱メチル化ツールの開発により、特定の遺伝子上の m⁶A をより正確かつタイミングを制御して脱メチル化し、標的 m⁶A がその遺伝子の発現量や翻訳量の変化に与える純粋な影響、およびその変化に伴う生理学的機能の検証が可能になる。ひいては、m⁶A が担う機能の作用機序解明や、m⁶A が関与する疾患原因の特定などに大きく貢献することが期待される。

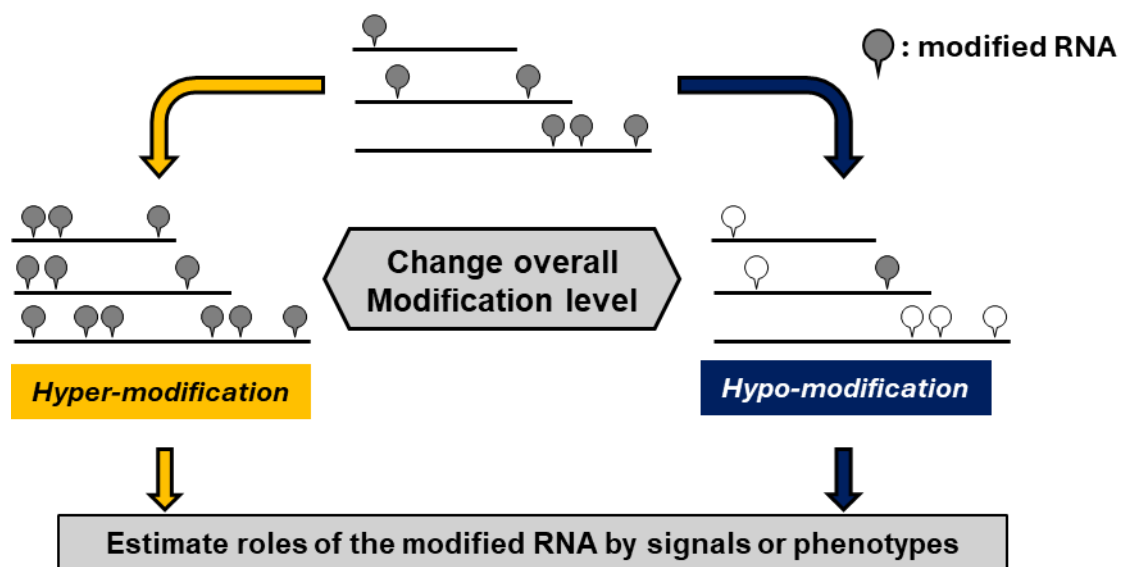


Fig. 0-1 Schematic illustration of general strategy for elucidating roles of modified RNAs.

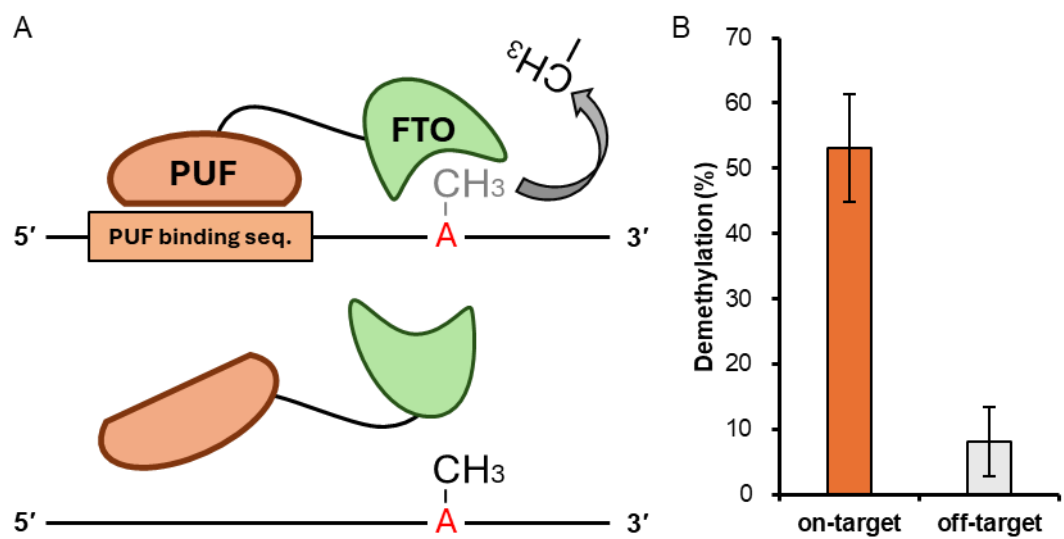


Fig. 0-2 (A) Schematic illustration of sequence-selective demethylation by FTO-PUF (FP) and **(B)** its demethylation activities to on-target RNA and off-target RNA at 100 nM of protein¹⁰.

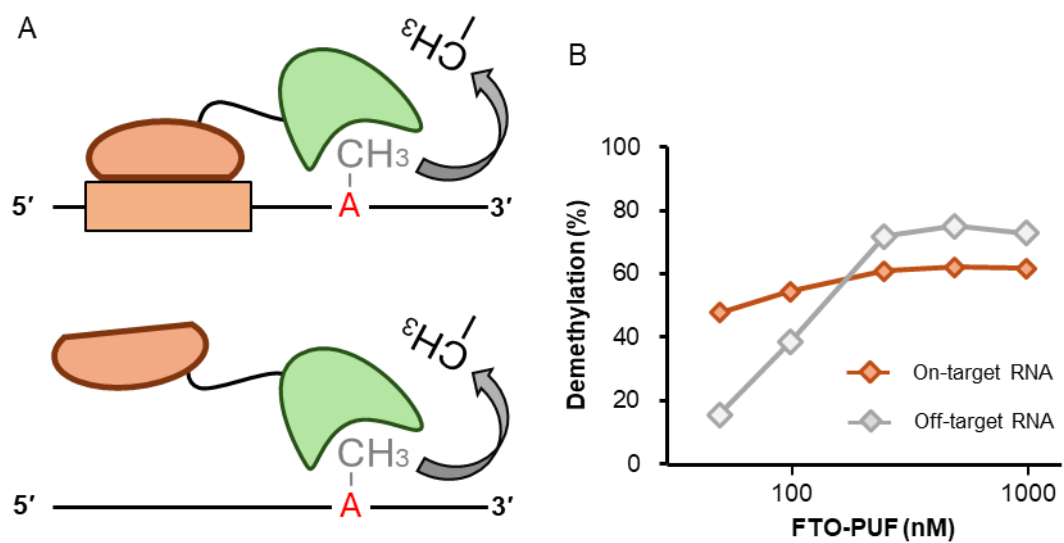


Fig. 0-3 (A) Schematic illustration of off-target effect by FP and **(B)** its concentration-dependent demethylation activities to on-target RNA and off-target RNA.

第一章

基質認識様式に基づく

オフターゲット効果抑制型脱メチル化酵素の創出

M⁶A は、mRNA 上に存在する修飾 RNA の中で最も頻繁に存在する修飾であり、METTL3/14 や METTL16 といったメチル化酵素 (m⁶A-writer) によって、転写と共役して adenosine がメチル化される¹⁶。また、FTO⁴や AlkB homolog 5 (ALKBH5)⁶などの m⁶A 脱メチル化酵素 (m⁶A-eraser) によって adenosine へと脱メチル化され、その修飾状態が制御される。さらに、m⁶A 認識タンパク質によって認識されることで、mRNA の細胞内局在¹⁷や選択的スプライシング¹⁸などを制御し、その結果、脂質合成⁸や精子形成⁶、概日リズムの制御^{19,20}など多様な機能を発揮することがこれまでに報告されている (Fig. 1-1)。所属研究室では以前、配列選択的な m⁶A 脱メチル化ツール FTO-PUF (FP) を開発し、PUF 標的配列の近傍に m⁶A を含む RNA オリゴ (on-target RNA) と、PUF 標的配列を含まない m⁶A 修飾 RNA オリゴ (off-target RNA) に対する脱メチル化を評価した結果、on-target RNA 上の m⁶A を優先的に脱メチル化することを示した¹⁰ (Fig. 0-2)。一方で、FP の濃度上昇に伴って PUF の標的配列を持たない off-target RNA 上の m⁶A に対する脱メチル化活性 (オフターゲット効果) が生じることとも確認されていた¹⁰ (Fig. 0-3)。この原因として、元来 FTO が有する RNA への結合親和性により、PUF による RNA への結合を介さずとも off-target RNA 上の m⁶A を認識し、脱メチル化することが原因であると推測した。したがってオフターゲット効果を克服するためには、FTO の RNA との結合親和性に基づく認識能を調節する必要があり、PUF の標的配列への結合によって標的 m⁶A に近づいた時だけ脱メチル化する、高い配列選択性を持つ脱メチル化ツールを目指した。

本章ではまず、FTO-ssDNA 複合体の結晶構造データから、FTO の RNA 認識に重要なアミノ酸残基を絞り込み、それらをアラニン置換した変異体を作製し、RNA との結合親和性の低下を狙った。また、FTO と同じ m⁶A 脱メチル化酵素である ALKBH5 に

対しても、同様の戦略によって RNA 認識に重要なアミノ酸を絞り込み、結合親和性を調節した変異体を作製し、オフターゲット効果抑制型 m^6A 脱メチル化ツールを開発した【第一節】。更に、 m^6A と同じく FTO の脱メチル化基質である $N^6, 2'$ -O-dimethyladenosine (m^6A_m) に対しても、配列選択的な脱メチル化を可能にするツールの創出に挑戦した。mRNA はその成熟過程で、5'末端に 7-methylguanosine (m^7G) が付加された Cap-0 構造が形成され、続く 1 塩基目のリボース 2 位のヒドロキシ基もメチル化されると Cap-1 構造と呼ばれる²¹。この時、 m^7G に続く 1 塩基目が adenosine だった場合、更に 6 位の窒素がメチル化され m^6A_m が生み出され、生体内において m^6A_m のほとんどはこの Cap- m^6A_m として存在する^{22,23} (Fig. 1-2)。Cap 構造は、mRNA の安定性や翻訳効率の向上、非自己 RNA との区別など非常に重要な機能を持つことが知られている一方で、cap- m^6A_m が担う機能は未解明である。第二節では、第一節で得られた変異体のデザイン基盤に基づき、cap- m^6A_m を配列選択的に脱メチル化する新規ツールの開発について報告する。

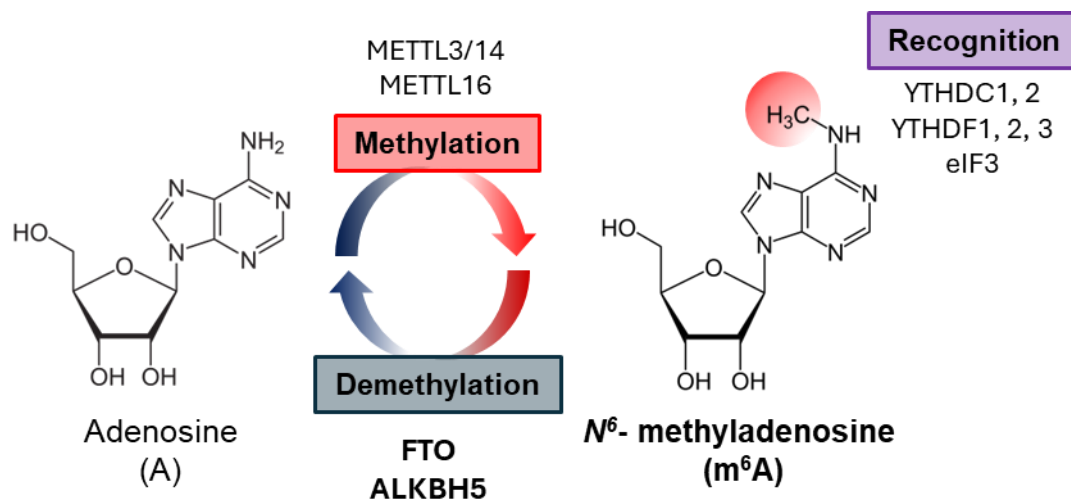


Fig. 1-1 Schematic illustration of m⁶A regulation by m⁶A-writers, erasers and readers.

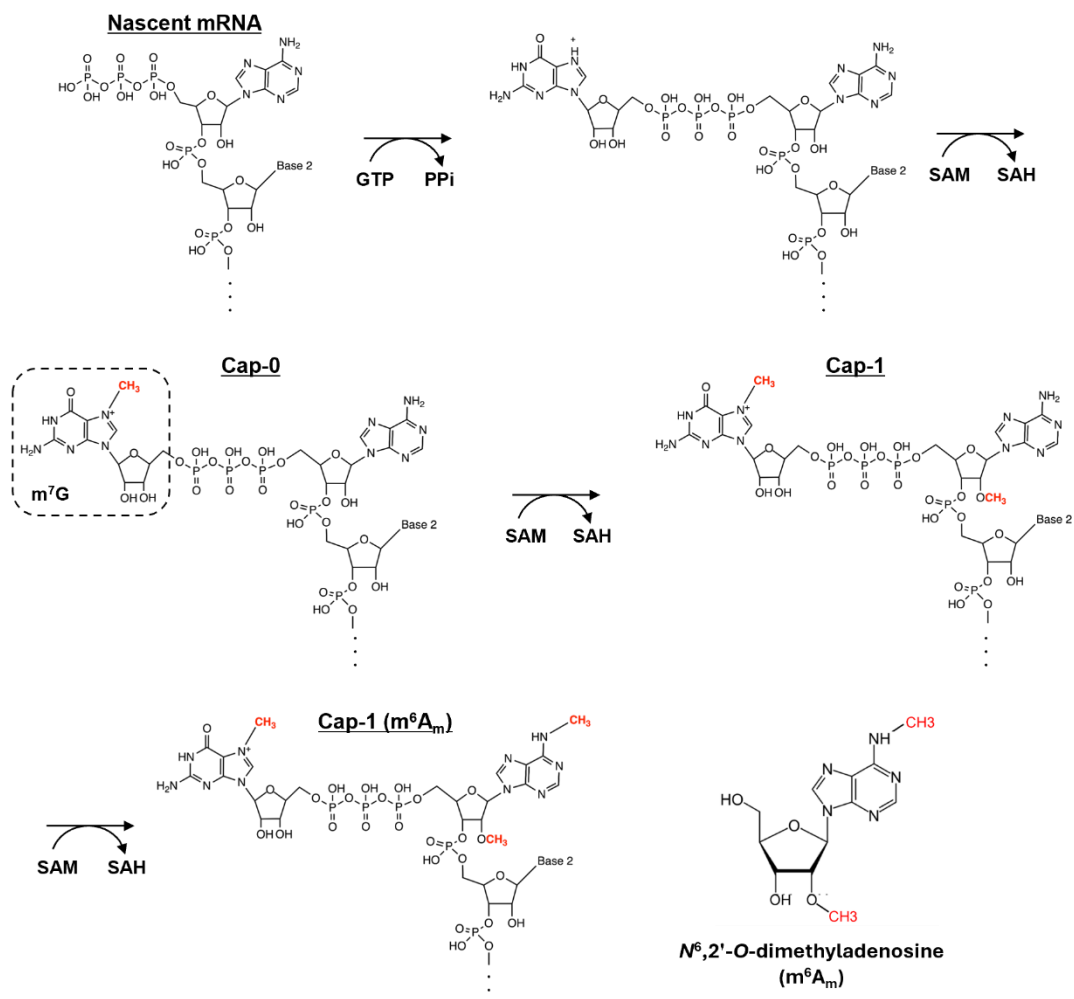


Fig. 1-2 Schematic illustration of addition of cap-0 and cap-1 structures at 5' end of nascent mRNA and m⁶A_m modification during mRNA maturation.

第一節 m⁶A 脱メチル化酵素の基質認識能低下を指向した変異導入

第一項 FTO に対する変異導入とその活性評価

FTO は AlkB ファミリーに属する 505 アミノ酸からなる分子量約 58 kDa のタンパク質であり、 α -ケトグルタル酸と Fe(II) 要求性の m⁶A 脱メチル化酵素である。活性中心を形成する double-stranded β -helix (DSBH) ドメインが N 末端側に存在し、C 末端には機能未知の α -helical ドメインが存在する。FTO の RNA 認識に重要なアミノ酸を精査するにあたり、FTO と一本鎖 DNA の共結晶構造を解析した先行研究を参考に²⁴。この複合体結晶構造において、FTO は正に帯電した溝状の構造で、負に帯電した核酸と静電的に相互作用していることが示唆されていた。特に、2つのリジン残基 (K88, K213) の側鎖が核酸を挟み込むような構造 (pincer structure) で結合していることが示されていた (Fig. 1-3)。そこで、FTO の RNA との結合親和性を低下させるため、共結晶構造上において核酸と相互作用可能な位置関係に存在する塩基性アミノ酸を探し、pincer structure を構成する 2つのリジンに加え、K107 を変異導入の候補とし、それぞれアラニン置換体を PUF 融合体として作製した。

配列選択的な脱メチル化活性の評価法としては、m⁶A 感受性の RNA エンドヌクレアーゼである MazF を用いた系を使用した^{10,25} (Fig. 1-4)。MazF は 5'-ACA-3' の RNA 配列を選択的に切断するが、5' 側のアデノシンの N6 位がメチル化されていると切断しなくなる性質が知られている。蛍光標識した m⁶A 修飾 RNA を、作製した変異体を用いて脱メチル化反応を行った後、MazF による切断処理を行い、変性ゲル電気泳動によって脱メチル化された RNA とされなかった RNA を分離した。そして、各蛍光の励起光を当てて撮像したゲル画像から、脱メチル化された RNA 由来の蛍光強度の割合を算出し、脱メチル化活性を評価した。

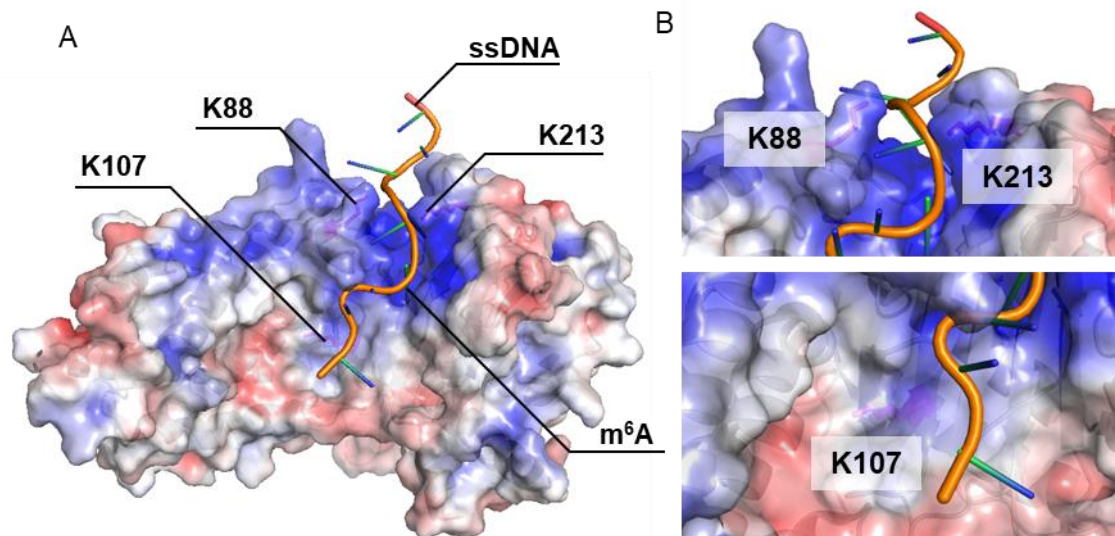


Fig. 1-3 Crystal structure of the complex of FTO (electrostatic surface) and m⁶A-modified single-strand DNA (PDB ID: 5ZMD). **(A)** Overall perspective and **(B)** enlarged views of the 3 basic residues.

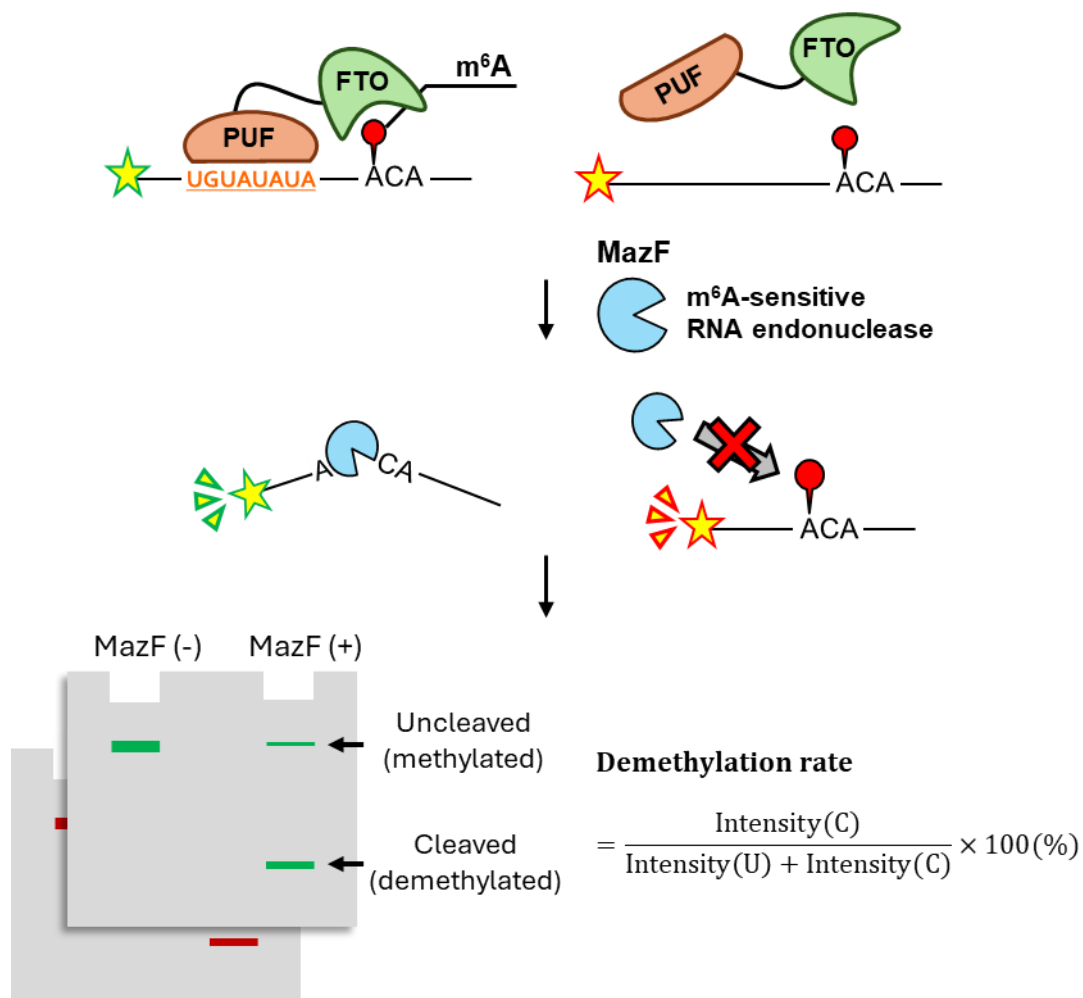


Fig. 1-4 Schematic illustration of MazF cleavage assay for measuring demethylation activities to FAM-labeled on-target RNA and TAMRA-labeled off-target RNA.

塩基性アミノ酸に対するアラニン置換体の作製と活性評価

まず候補となった 3 つの塩基性アミノ酸に対してそれぞれアラニン置換を導入した単一アラニン置換体を作製し、on-target RNA と off-target RNA に対する濃度依存的な活性を MazF アッセイにより評価した。その結果、FTO^{K88A}-PUF, FTO^{K107A}-PUF では野生型 FP と同様に、低濃度では on-target RNA の脱メチル化が off-target RNA への脱メチル化を上回ったが、高濃度域ではオフターゲット効果の抑制は確認されなかった。一方で、FTO^{K213A}-PUF は、高濃度域においても on-target RNA への脱メチル化が off-target RNA への脱メチル化を上回り、オフターゲット効果の抑制が確認された (Fig. 1-5)。なお、1 μ M における off-target RNA への脱メチル化活性は 50% を示しており、完全に抑制するには至らなかった。

これらの結果を受け、on-target RNA への活性を保持したまま、より強力にオフターゲット効果を抑制するためには更なる改良の余地があると考え、変異の組み合わせを行う戦略を取った。作製した 3 つの単一アラニン置換体の中で最も有望であった K213A は pincer structure の構成要素の一つであり、対となる K88 を同時にアラニン置換した FTO^{K88A/K213A}-PUF を作製し、配列選択的な脱メチル化活性を評価した。その結果、FTO^{K88A/K213A}-PUF は on-target RNA に対する脱メチル化活性を保持したまま、off-target RNA に対する脱メチル化活性を強力に抑え、1 μ M で用いても off-target RNA への活性は 10% 未満に留まっていた (Fig. 1-5)。作製した変異体のうち、on-target RNA への活性を保持したまま最も強くオフターゲット効果を抑制する FTO^{K88A/K213A}-PUF において、脱メチル化を担う FTO^{K88A/K213A} を modulated-RNA-binding FTO (modFTO) と名付けた。

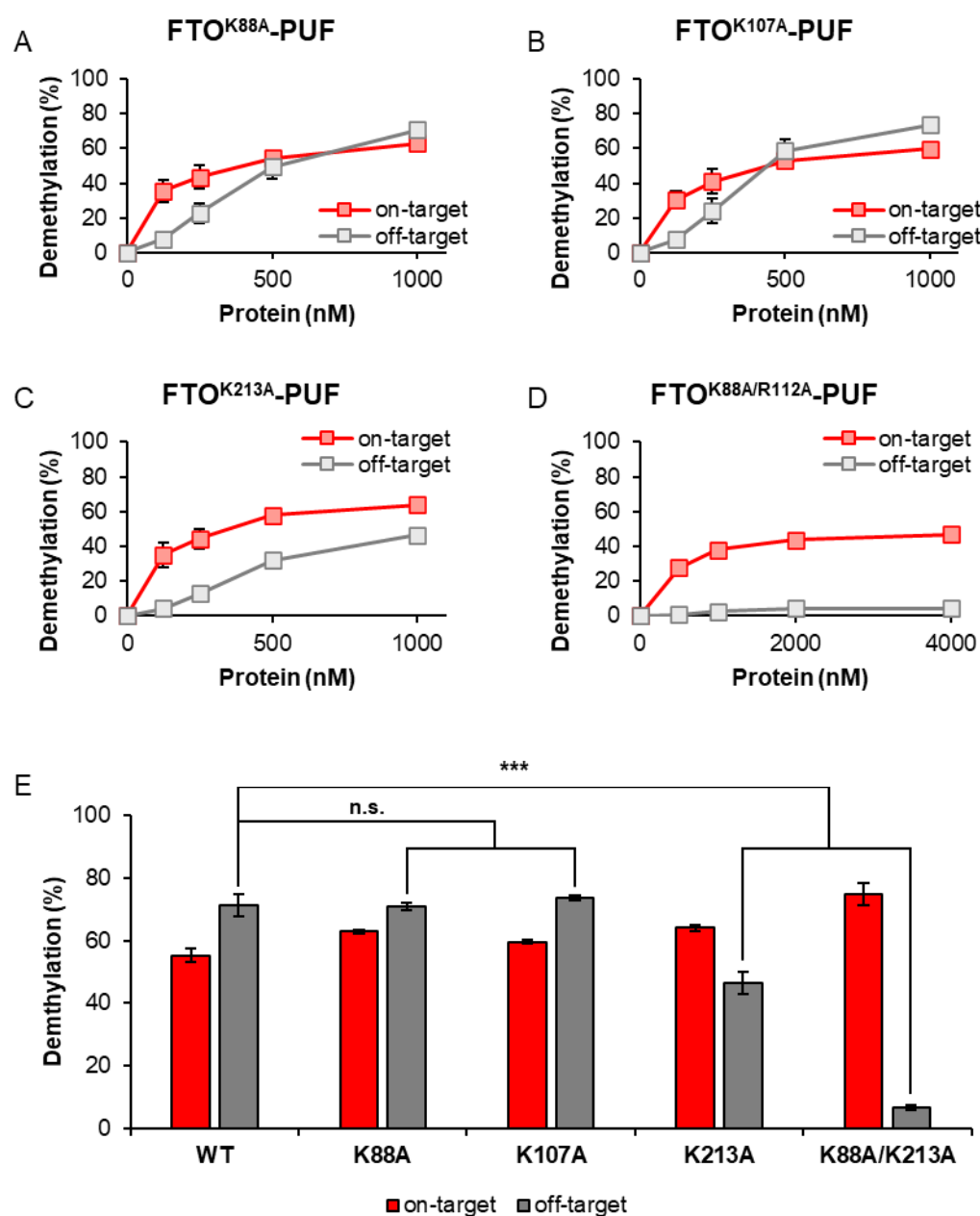


Fig. 1-5 Demethylation activities to on-target RNA and off-target RNA of (A) FTO^{K88A}-PUF, (B) FTO^{K107A}-PUF, (C) FTO^{K213A}-PUF and (D) FTO^{K88A/K213A}-PUF. (E) Comparison of demethylation activities of FTO-PUF (WT) and its mutants at 1 μM. Values and error bars indicate mean ± SEM (n=3, Tukey; ***: $p < 0.001$, n.s.: not significant).

PUF 標的配列と m⁶A 間の距離の影響

modFTO-PUF (modFP) の配列選択的な脱メチル化活性は、PUF が自身の標的配列に結合し、融合された modFTO がその近傍に存在する m⁶A に近づくことによって発揮されると考えられる。そこで、近接効果による配列選択的脱メチル化における、PUF 標的配列と標的 m⁶A 間の距離の影響を検討した。上記の変異体活性スクリーニングで使った on-target RNA は、PUF 標的配列と標的 m⁶A 間に 6 塩基存在しており、それを基準に 2, 4, 8, 10 塩基距離のある m⁶A 修飾オリゴに対する、modFP の脱メチル化活性を評価した。その結果、modFP は 6 塩基以上離れている場合に最大活性を発揮するが、2 塩基しか離れていないと活性が低下し、4 塩基離れている場合でも、最大活性から約 10%の活性低下が確認された (Fig. 1-6)。この結果より、PUF 標的配列と m⁶A との距離が 6 nt より短い場合には、PUF による立体障害が生じている可能性が示唆され、m⁶A と PUF 標的配列とが適切な位置関係にあることが、modFTO の活性発揮に重要であると考えられる。

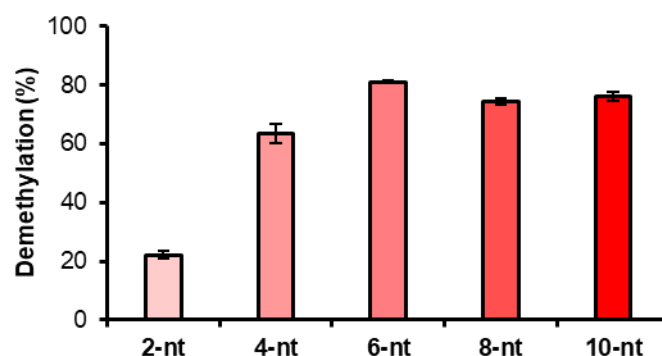


Fig. 1-6 Demethylation activities of modFP at 1 μ M to 2, 4, 6, 8, 10-nt RNAs containing the indicated nucleotides between PUF targeting sequence and m⁶A. Values and error bars indicate mean $\pm$ SEM (n=3).

RNA に対する結合親和性評価と modFTO 単独の活性評価

次に、獲得した modFTO 自身の性質を評価した。modFTO 単体の脱メチル化活性に関しては、最大 4 μ M まで modFTO の濃度を上げて on-target RNA および off-target RNA 上の m⁶A に対する脱メチル化活性を評価したが、ほとんど活性を示さないことがわかった(Fig. 1-7)。また、modFTO の RNA に対する結合親和性を求めるため、末端に蛍光修飾を持つ RNA オリゴと野生型 FTO もしくは modFTO とを混合し、蛍光異方性を測定した。その結果、野生型 FTO は $K_D = 0.93 \pm 0.39$ (μ M)、modFTO は $K_D = 2.89 \pm 0.64$ (μ M) を示し、変異導入によって RNA に対する結合親和性が約 3 倍低下していたことが示された (Table 1, Fig. 1-8)。これらの結果より、2 つの変異導入によって結合親和性は確かに低下したが、modFTO の脱メチル化活性の顕著な低下を説明するには結合親和性の 3 倍の低下のみでは不十分であり、今後、詳細な反応速度論パラメータを考察する必要があると言える。

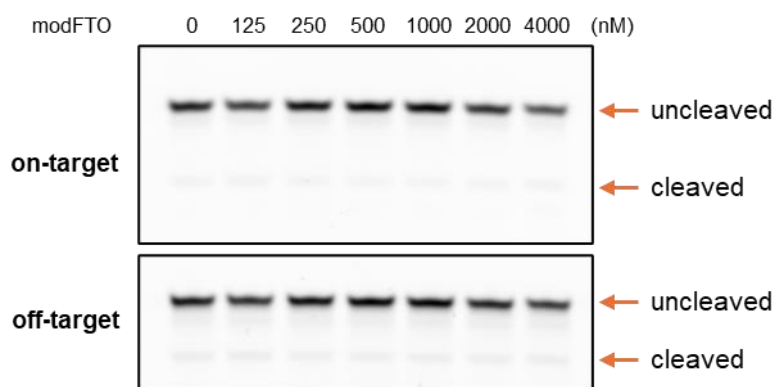


Fig. 1-7 PAGE images of MazF assay after demethylation to on-target RNA and off-target RNA by modFTO.

Table 1 K_D values of wild-type FTO and modFTO analyzed by fluorescence polarization assay. Values indicate mean $\pm$ SEM (n=3).

	K_D (μ M)
Wild-type FTO	0.93 ± 0.39
modFTO	2.89 ± 0.64

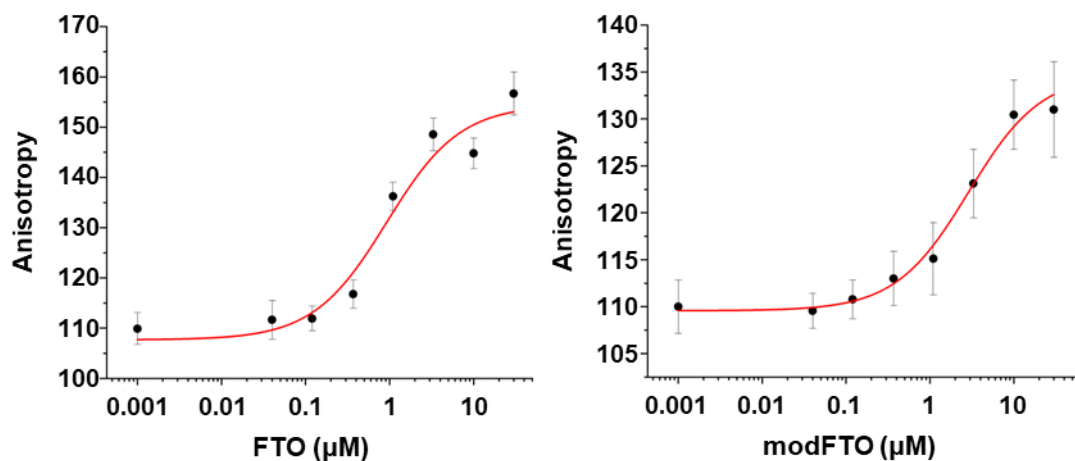


Fig. 1-8 The plots of anisotropy at each concentration of proteins from 10 nM to 30 μ M. Values and error bars indicate mean $\pm$ SEM (n=3).

培養細胞由来の mRNA に対する脱メチル化活性評価

また、合成 RNA オリゴではなく細胞内における実際の脱メチル化基質に対する活性を評価するため、培養 HEK293T 細胞から回収した mRNA に対して、FTO または modFTO、及び FP または modFP を用いて脱メチル化を行い、m⁶A の含有量を LC-MS/MS にて定量した。FTO はその脱メチル化反応に Fe(II)を必要とすることから、先行研究と同様にコントロールとして EDTA を添加した反応液を用いた²⁶。その結果、FTO や FP は約 70% の m⁶A を脱メチル化したが、modFTO はほとんど脱メチル化活性を発揮せず、また modFP により約 30% の脱メチル化が検出された (Fig.1-9)。modFTO と modFP に活性に違いが生じた点について、PUF が持つ配列非依存的な RNA との結合親和性が、modFP としての RNA との結合親和性を生み、非特異的な脱メチル化活性を示したと推測される。

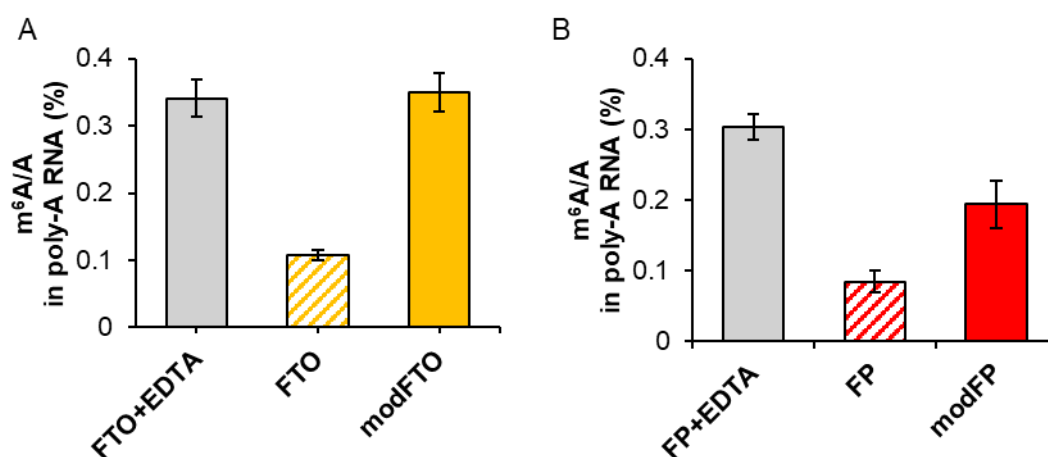


Fig. 1-9 Quantification of the m⁶A/A in poly-A RNA demethylated with 1 μM of (A) FTO and modFTO, (B) FP and modFP by LC-MS/MS. Controls were demethylated in the presence of EDTA. Values and error bars indicate mean ± SEM (n=3).

第二項 ALKBH5 に対する変異導入

ALKBH5-PUF の脱メチル化活性評価

オフターゲット効果抑制型 m⁶A 脱メチル化ツールである modFP の設計指針の一般性を示すと同時に、利用可能な m⁶A 脱メチル化ツールを拡張するために、FTO と同じ AlkB ファミリーに属するもう一つの m⁶A-eraser である ALKBH5 を利用して、高い配列選択性を持つ脱メチル化ツールの開発を試みた。ALKBH5 は 394 アミノ酸からなる約 44 kDa のタンパク質で、FTO と同じく α -ケトグルタル酸と Fe (II) 要求性の脱メチル化酵素であり、活性中心を持つ DSBH ドメインのみで構成される。まず初めに、FTO-PUF と同じ骨格で ALKBH5 と PUF を融合させた ALKBH5-PUF (AP) を作製し、その配列選択性と脱メチル化活性を評価した。その結果、予想された通り、AP が低濃度域では on-target RNA に対する配列選択的な脱メチル化活性を示す一方で、高濃度域ではオフターゲット効果が上昇し、PUF の標的配列依存的な脱メチル化活性の喪失が確認された (Fig. 2-1)。これも、野生型 ALKBH5 自身が有する RNA への結合親和性に起因するオフターゲット効果であると予想され、RNA 認識に重要なアミノ酸に対してアラニン置換を導入することにした。先行研究において、ALKBH5 と一本鎖核酸の複合体結晶構造が解き明かされており、nucleotide recognition lid2 (NRL2) と β IV-V loop が RNA の認識に重要であり、静電相互作用と π - π スタッキングによる結合が重要であることが示唆されていた^{27,28} (Fig. 2-2)。

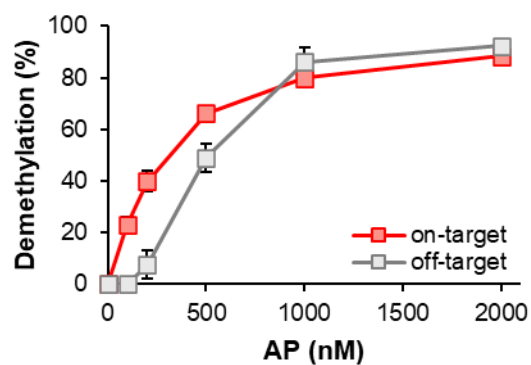


Fig. 2-1 Demethylation activities of AP to on-target RNA and off-target RNA at indicated concentration. Values and error bars indicate mean $\pm$ SEM (n=3).

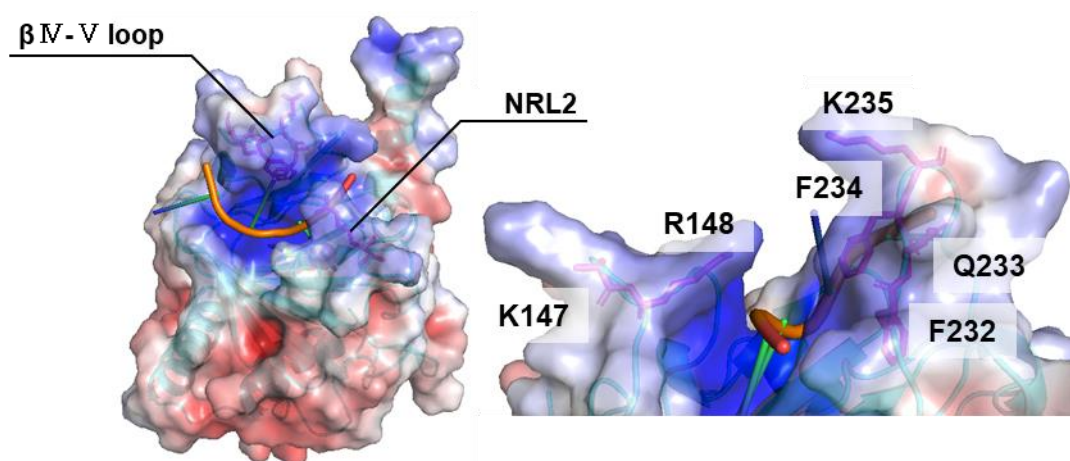


Fig. 2-2 Crystal structure of the complex of ALKBH5 and m⁶A-modified single-strand RNA (PDB ID: 7WKV). Overall perspective (left image) and enlarged views of the RNA-recognition region (right image).

各種 ALKBH5-PUF アラニン置換体の作製と活性評価

そこでまず初めに、静電相互作用を調節するため、NRL2 と β IV-V loop の表面に露出した塩基性アミノ酸から、核酸と相互作用出来る距離に存在するものとして K147, R148, K235 を選択し、それぞれアラニン置換を導入した変異体を作製し、その脱メチル化活性を評価した。その結果、ALKBH5^{K147A}-PUF, ALKBH5^{R148A}-PUF, ALKBH5^{K235A}-PUF の全てにおいて、AP と同程度のオフターゲット効果がみとめられた (Fig. 2-3, 4)。そこで、modFTO と同様に複数のアラニン置換を組み合わせ、オフターゲット効果の抑制を試みた。ここでは、NRL2 に含まれる K147, R148 をアラニン置換した ALKBH5^{K147/R148A}-PUF と、さらに β IV-V loop に含まれる K235 に対するアラニン置換を加えた ALKBH5^{K147/R148/K235A}-PUF を作製し、活性を評価した。しかし結果として、いずれの変異体もオフターゲット効果を抑制しなかった (Fig. 2-3, 4)。続いて、 π - π スタッキングを生み出す芳香族アミノ酸の存在に着目した。ALKBH5 の基質認識部位の中でも β IV-V loop 上に 2 つのフェニルアラニンが存在しており、先行研究では、それらが RNA 塩基と π - π スタッキング効果を生み出し結合していることが示されていた^{27,28}。そこで、これら 2 つのフェニルアラニンを含む連続した 3 アミノ酸に変異を加えた ALKBH5^{F232A/Q233A/F234A}-PUF を作製し、活性を評価した。その結果、AP では 1 μ M で約 80% のオフターゲット効果が生じていたのに対して、ALKBH5^{F232A/Q233A/F234A}-PUF は 1 μ M において約 40% までオフターゲット効果を抑制した (Fig. 2-3, 4)。しかし、2 μ M まで濃度を上げると、on-target RNA に対する脱メチル化活性と同等の活性を off-target RNA に対しても発揮しており、更なる基質認識能の低下を必要とすることも示唆された (Fig. 2-4)。

これらの結果を踏まえ、静電相互作用と π - π スタッキングの両方の相互作用を同時に取り除くことで、より強力にオフターゲット効果を抑制できるのではないかと推察し、上記 6 つのアラニン置換を組み合わせた変異体を作製した。まず、部分的にオフターゲット効果の抑制を示した ALKBH5^{F232/Q233/F234A}-PUF に対して K147/R148A の変異を加えた 5 重アラニン置換体を作製し、活性を評価したところ、on-target RNA に対する活性は保持したまま、1 μ M における off-target RNA への活性は約 25% であり、より強力にオフターゲット効果を抑制することに成功していた (Fig. 2-3, 4)。更に、K235A の変異を加えた 6 重アラニン置換体では、on-target RNA に対する脱メチル化活性は保持したまま、オフターゲット効果をより強力に抑制する結果が示され、1 μ M でも off-target RNA に対する活性は検出できないレベルまで抑制することが出来ていた。そこで、この 6 重アラニン置換体を modALKBH5 と名付けた。

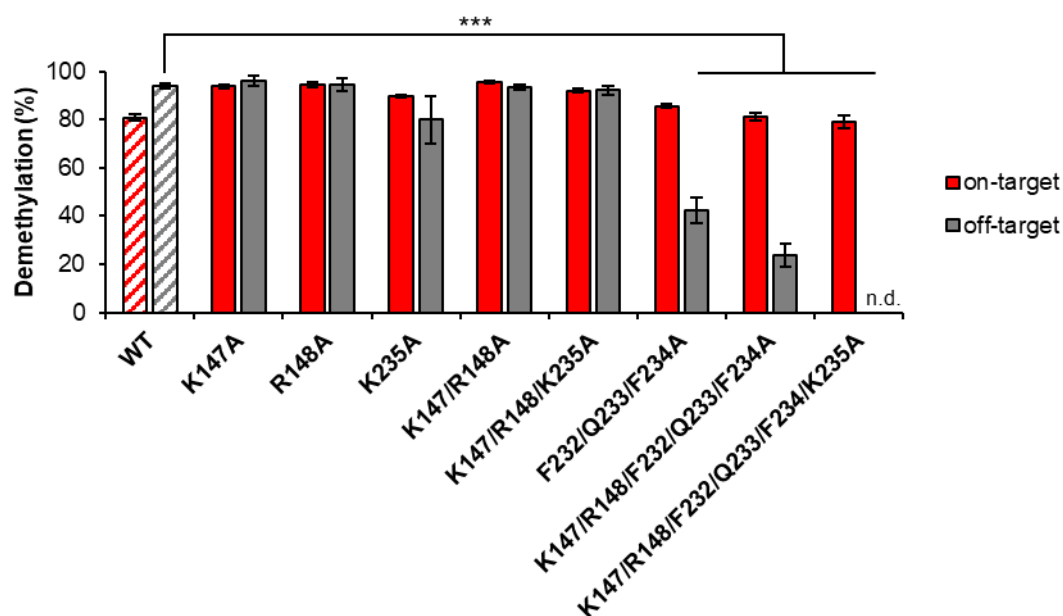


Fig. 2-3 Comparison of demethylation activities among ALKBH5-PUF and its mutants at 1 μ M. Values and error bars indicate mean $\pm$ SEM (n=3, Tukey; ***: $p < 0.001$, n.d.: not detected).

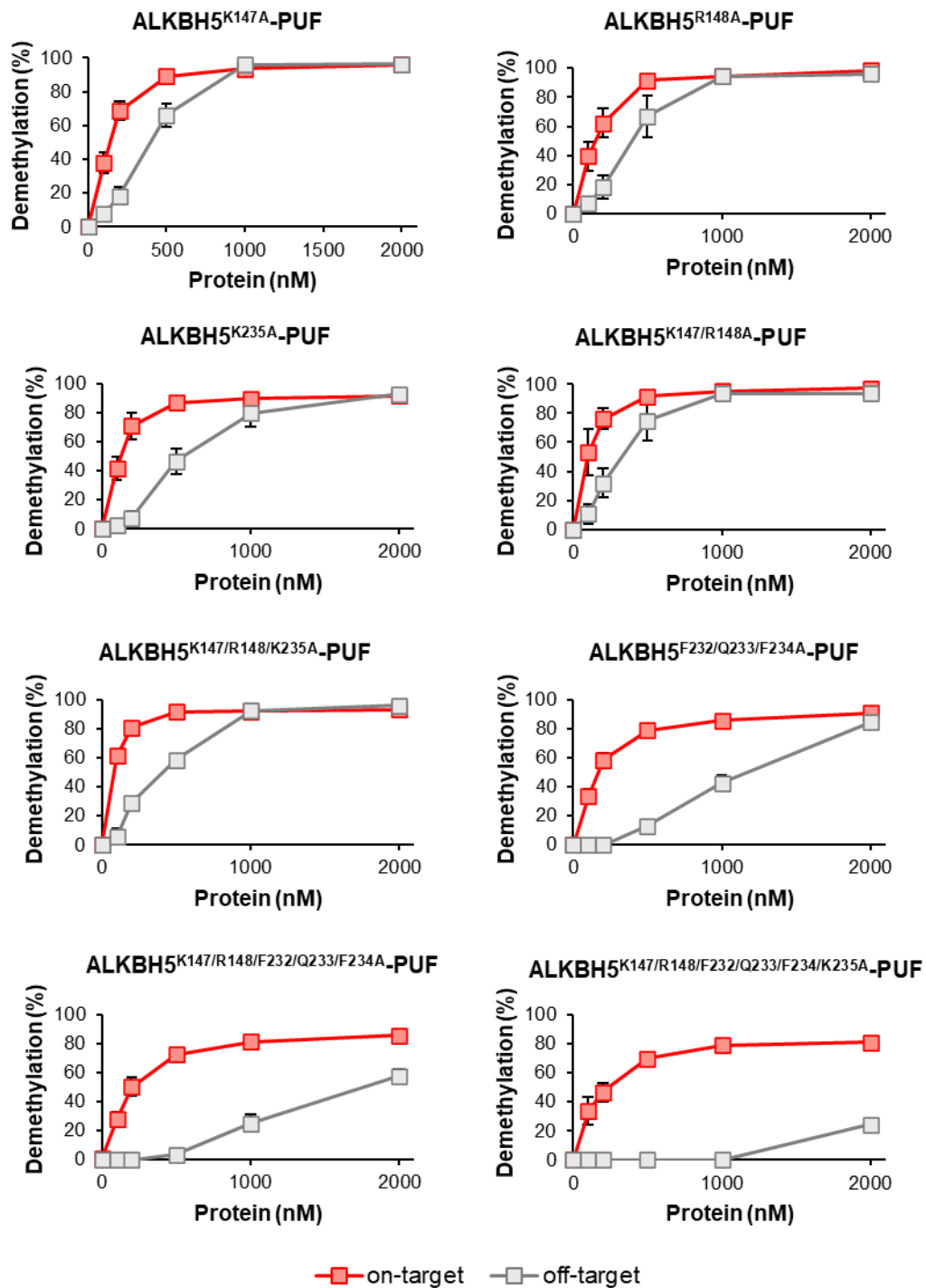


Fig. 2-4 Demethylation activities to on-target RNA and off-target RNA of (A) ALKBH5^{K147A}-PUF, (B) ALKBH5^{R148A}-PUF, (C) ALKBH5^{K235A}-PUF, (D) ALKBH5^{K147/R148A}-PUF, (E) ALKBH5^{K147/R148/K235A}-PUF, (F) ALKBH5^{F232/Q233/F234A}-PUF, (G) ALKBH5^{K147/R148/F232/Q233/F234A}-PUF, (H) ALKBH5^{K147/R148/F232/Q233/F234A/K235A}-PUF. Values and error bars indicate mean ± SEM (n=3).

第一節の小括

第一節では、FTO 及び ALKBH5 の一本鎖核酸との複合体結晶構造から、それぞれの RNA 認識様式に基づいて結合親和性に重要なアミノ酸を精査し、アラニン置換を適宜導入することによって RNA との結合親和性を調節した。その結果、PUF と融合させ、PUF 標的配列近傍の m⁶A を、高い選択性で脱メチル化する、オフターゲット効果抑制型の m⁶A 脱メチル化ツールの開発を達成した。

一方、培養細胞由来の mRNA に対して modFP を用いて脱メチル化した結果、約 30% の脱メチル化活性を示した。約 70% の m⁶A を脱メチル化した野生型 FP と比較すると、オフターゲット効果の抑制は達成されているものの、この結果は、modFP を細胞内で発現させた際に潜在的なオフターゲット効果が 30% 程度存在することを示唆する。原因として PUF の標的配列への選択性が十分ではなく、配列非特異的な mRNA に対する結合が考えられ、より選択性の高い dCas13 などの RNA 結合タンパク質の利用を検討する必要がある。

第二節 Cap 構造中の m⁶A_m に対する配列選択的な脱メチル化ツールの創出

mRNA が転写された後の 5'末端には、m⁷G が付加された cap-0 構造、そして 1 塩基目のリボース 2 位のヒドロキシ基がメチル化された cap-1 構造が形成され、mRNA 分解抑制や核外輸送、翻訳効率の向上など重要な役割を担っている²⁹。一方で、m⁷G に続く 1 塩基目が adenosine である場合、更にアデノシン 6 位の窒素がメチル化を受けて m⁶A_m に修飾されることが知られている (Fig.1-2)^{22,23}。また、m⁶A_m のほとんどはこの cap-m⁶A_m として存在するが、その機能は未解明なままである。最近の先行研究において、m⁶A_m メチル化酵素である Phosphorylated CTD Interacting Factor 1 (PCIF1; CAPAM) を遺伝子的にサイレンシングした培養細胞を使用し、mRNA の発現量や翻訳効率の変化を網羅的に検証した結果、mRNA の発現や翻訳を促進する遺伝子もあれば抑制される遺伝子もあり、その機能は cap-m⁶A_m 修飾の存在だけではなく、5'UTR の配列にも依存すると推測されていた³⁰⁻³³。このように、転写産物全体の修飾レベルを変化させるだけでは得ることの出来ない特定の cap-m⁶A_m が担う機能を明らかにするためにも、配列選択的な cap-m⁶A_m 脱メチル化ツールを開発することを目指した。また、FTO は m⁶A だけではなく m⁶A_m も脱メチル化し、2'-O-methyladenosine (A_m) に変換することが出来る一方で、ALKBH5 は m⁶A_m を脱メチル化しないことが知られている。そこで、modFP を基盤として cap-m⁶A_m を配列選択的に脱メチル化するツールが開発できると考えた。

Cap-m⁶A_m に対する modFP の脱メチル化活性評価

まず初めに、第一章・第一節で開発した modFP が Cap-m⁶A_m を配列選択的に脱メチル化することができるかどうか検証した。ここでは Cap-m⁶A_m を持つ人工合成 RNA オリゴを脱メチル化基質とし、PUF 標的配列を持つ on-target RNA と持たない off-target RNA の 2 種類を使用した (Table 2)。また、活性の評価には LC-MS/MS を用いた評価法を使用した。脱メチル化した RNA サンプルをヌクレオシド単位まで分解し、各サンプルに含まれる m⁷G と m⁶A_m を定量し、m⁷G に対する m⁶A_m の存在量を脱メチル化活性の指標として比較した (Fig. 3-1)。

その結果、modFP は on-target RNA をほぼ 100% 脱メチル化したが、off-target RNA の Cap-m⁶A_m も約 80% が脱メチル化された (Fig. 3-2)。また、野生型 FTO および modFTO 単体が持つ m⁶A_m 脱メチル化能を調べるため、培養 HEK293T 細胞から抽出した mRNA に対して、野生型 FTO 及び modFTO を用いて脱メチル化反応を行い、反応後の m⁶A_m 含有量を LC-MS/MS を利用して定量した。FTO 処理サンプルでは m⁶A_m が検出されないレベルまで低下した。また、modFTO 処理サンプルにおいても約 60% の m⁶A_m 量の低下が確認された (Fig. 3-2)。これにより、第一節で述べた HEK293T 細胞由来の mRNA 中の m⁶A に対する脱メチル化活性と比較して、FTO も modFTO も、m⁶A より m⁶A_m を脱メチル化しやすいことが示された (Fig. 1-9)。これらの結果は、modFTO に導入した 2 つのアラニン置換によって低減させた RNA 認識能とは別に、Cap-m⁶A_m を認識する機能や構造が FTO には備わっていることを示唆している。また、mRNA 内部に存在する m⁶A よりも、m⁶A_m の方が FTO によって脱メチル化されやすいという先行研究の結果とも合致しており^{24,26,33}、Cap-m⁶A_m の認識に関わるアミノ酸に対して、オフターゲット効果の無い配列選択的な脱メチル化ツールを開発するには、更に変異を加える必要性が示唆された。

Table 2 Sequences of on-target RNA and off-target RNA with cap-m⁶A_m. PUF targeting site is underlined (orange).

	Sequence (5'→3')
On-target cap-RNA	m ⁷ G-ppp-m ⁶ A _m -GCACUU <u>UGUAUAU</u> ACAUUUUCAU
Off-target cap-RNA	m ⁷ G-ppp-m ⁶ A _m -GCACUUUGGGGUUCCAUUUUCAU

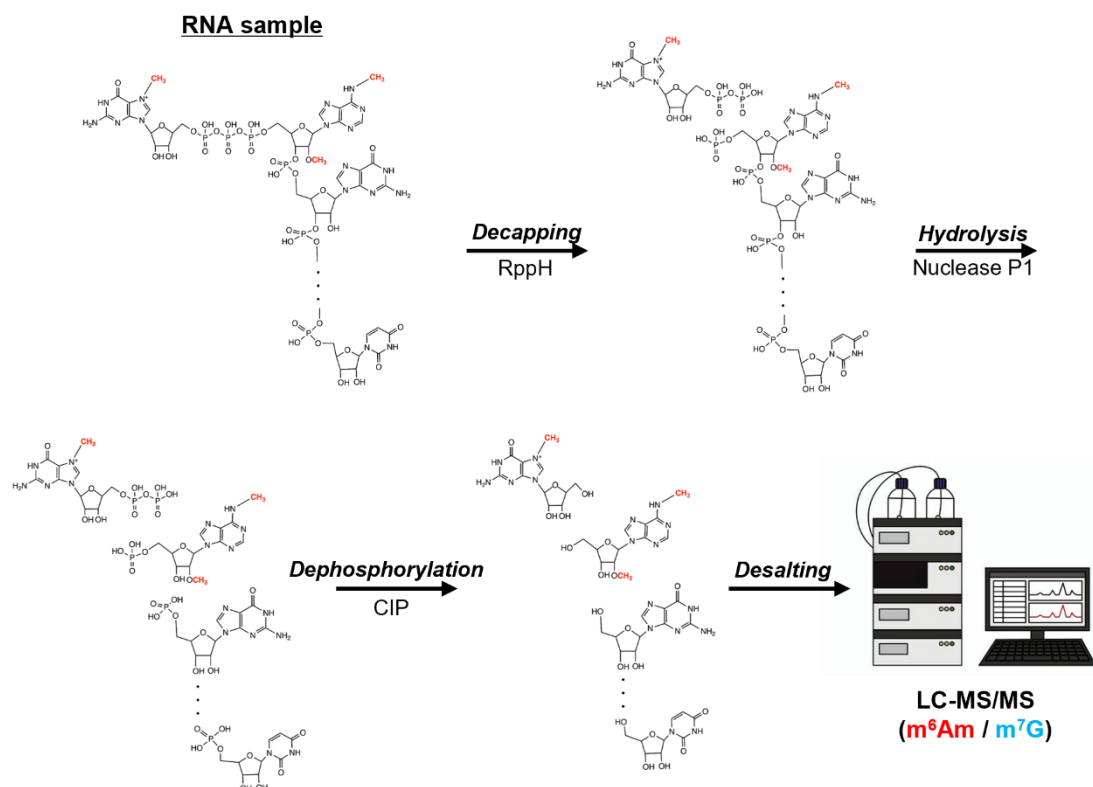


Fig. 3-1 Schematic illustration of RNA sample preparation for LC-MS/MS measurement.

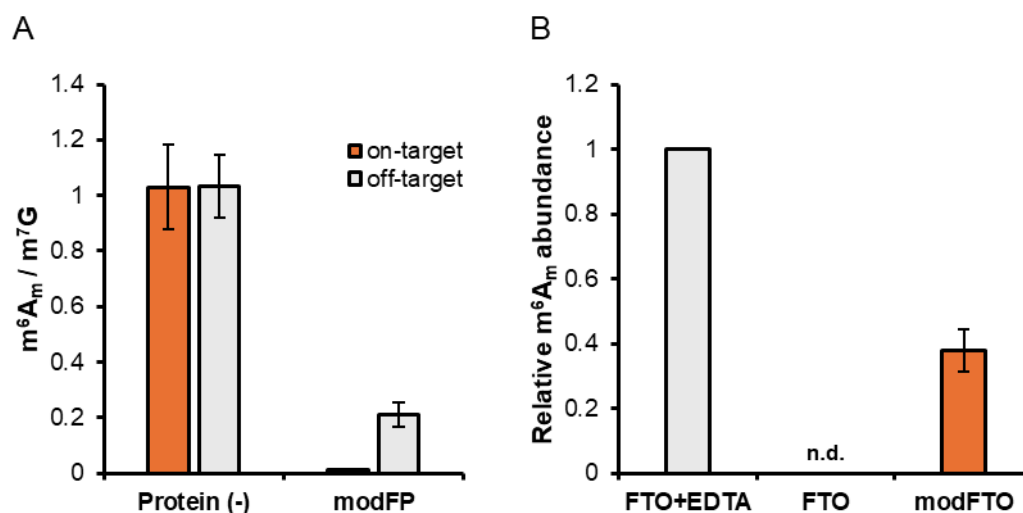


Fig. 3-2 (A) Amounts of m⁶A_m compared to m⁷G in on-target cap-RNA or off-target cap-RNA measured by LC-MS/MS. The RNA oligos were demethylated by 1 μM of modFP. (B) Relative m⁶A_m / A in poly-A RNA isolated from HEK293T cells demethylated by 1 μM of wild-type FTO or modFTO. Values and error bars indicate mean ± SEM (n=3; n.d.: not detected).

Cap 構造認識に関わるアミノ酸の探索

Cap-m⁶A_m に対する modFTO の認識能を調節するため、変異を導入する基質認識に関与するアミノ酸の絞り込みを行った。しかし、FTO と Cap 構造の複合体結晶構造は解き明かされておらず、cap 構造の認識部位や認識様式に関する情報が無い。そこで、Cap 構造との結晶構造が既に解かれている eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)³⁴ や、Decapping mRNA 2 (Dcp2)³⁵ の複合体結晶構造を参照した。eIF4E および Dcp2 と m⁷GTP の複合体結晶構造から、2 つの芳香族アミノ酸が m⁷G を挟み込む形で配置されることで π - π スタッキングを形成するという共通の認識様式の存在が確認された (Fig. 3-3)。これを受けて、FTO 上において m⁷GTP を挟み込む形で認識できる位置関係に存在する芳香族アミノ酸を探索した。

FTO 中の m⁷GTP を認識する領域に関する手がかりを得るために、FTO と ALKBH5 との構造の違いに着目した。これらの酵素は、同じ AlkB ファミリータンパク質であり、かつ m⁶A 脱メチル化酵素でありながら、FTO は m⁶A_m を脱メチル化出来るが、ALKBH5 は脱メチル化出来ないという性質の違いがある。この違いを生んでいる FTO 特有の構造が存在すると推察した。9 つある AlkB ファミリータンパク質間で、二次構造に基づくアミノ酸配列のアライメントを実施した先行研究より、FTO には特有のループ構造が Q210-V226 に存在することが示唆されていた³⁶。また、このループ上に存在する芳香族アミノ酸は Y214, Y220, F221 の 3 つであった。一方、活性中心に cap-m⁶A_m が配位する位置を基準に、5' 方向に三リン酸を挟んで m⁷G が存在し得る領域を考慮した時、m⁷G と相互作用し得るアミノ酸は Y220 であると予想された (Fig. 3-4)。次に、Y220 と共に m⁷G を挟み込む芳香族アミノ酸が存在するか、Y220 の周辺にある芳香族アミノ酸を精査したところ、W230 と W278 の 2 つが確認できた。そこで、これら 3 つの芳香族アミノ酸が、cap 構造認識に寄与する可能性があると予想し、アラニン置換を導入することとした (Fig. 3-4)。

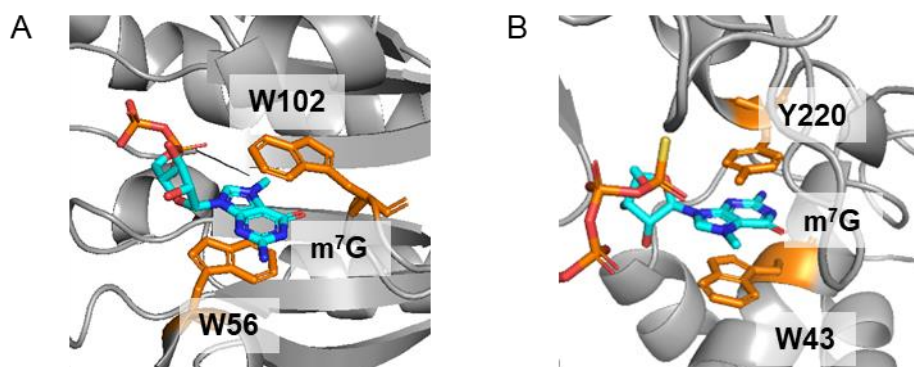


Fig. 3-3 Crystal structure of the complex of (A) eIF4E and m⁷GDP (PDB ID: 1EJ1), (B) Dcp2 and cap analog (PDB ID: 5KQ4). m⁷G is colored in light blue and aromatic amino acids involved in cap-structure recognition are colored in orange.

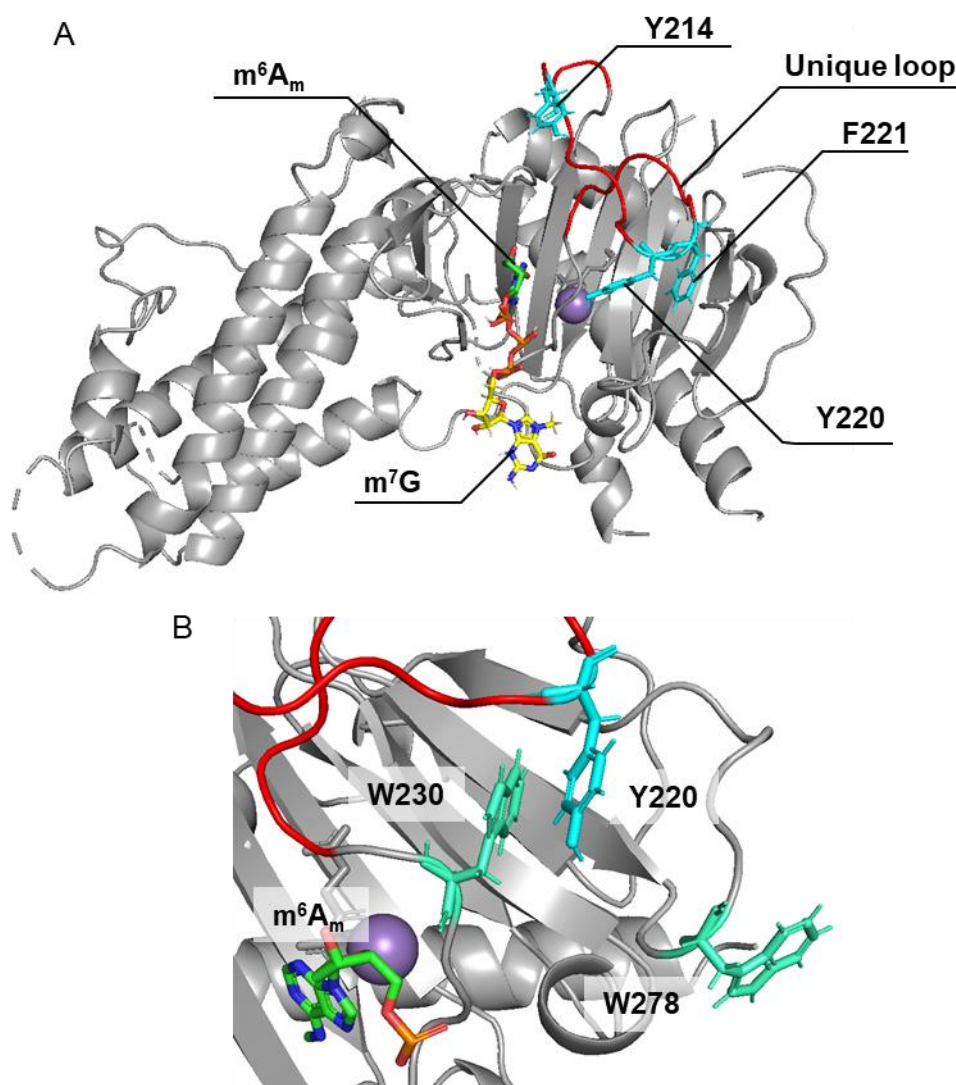


Fig. 3-4 The candidate residues involved in the recognition of cap-structure estimated from the crystal structure of the complex of FTO and m⁶A-modified single-strand DNA (PDB ID: 5ZMD). 3D structure of m⁷GTP was superposed on the crystal structure. (A) Overall perspective and (B) enlarged view of the 3 aromatic residues. The FTO's unique loop is colored in red, aromatic residues are colored in light blue or lime green and m⁷G is colored in yellow.

芳香族アミノ酸アラニン置換体の作製と活性評価

まず、これら 3 つの芳香族アミノ酸をアラニン置換した変異体 (modFTO^{Y220/W230/W278A}-PUF) を作製し、その配列選択的な脱メチル化活性を LC-MS/MS によって評価した。その結果、modFP と比べて on-target RNA に対する活性が大きく低下してしまった (Fig. 3-5)。原因として、FTO の脱メチル化活性に重要な、Fe (II) と結合する 229 番のヒスチジン (H229) に隣接する W230 に変異を加えたことで、活性中心の構造が崩れてしまったことが推測された。

そこで、アラニン置換を Y220 と W278 に絞り、modFTO^{Y220/W278A}-PUF の配列選択的な脱メチル化活性を評価したところ、on-target RNA では m⁶A_m がほとんど検出されず、活性は保持されていた (Fig. 3-6)。一方で、off-target RNA では未反応のコントロールと同程度の m⁶A_m が検出され、オフターゲット効果が抑制された (Fig. 3-6)。この結果より、W230A の変異が脱メチル化活性の低下に影響を及ぼしており、Y220, W278 の 2 つが cap 構造認識に関与している事が示唆された。更に、2 つの芳香族アミノ酸のそれぞれが、どの程度 cap 構造認識に寄与しているのかを検証するため、それぞれの単一アラニン置換体 (modFTO^{Y220A}-PUF, modFTO^{W278A}-PUF) を作製し、その活性を評価した。その結果、いずれの変異体も modFTO^{Y220/W278A}-PUF と同様に、on-target RNA に対する活性は保持したまま、off-target RNA に対しては活性をほとんど示さなかった (Fig. 3-6)。これらの結果から、Y220 と W278 は、それぞれが cap 構造認識には必要であり、認識能に大きく寄与していることが示唆された。またこの結果は、eIF4E などのキャップ構造認識タンパク質が 2 つの芳香族アミノ酸で m⁷G を挟み込み、 π - π スタッキングによってキャップ m⁷G と結合するという相互作用様式と類似しており、FTO も 2 つの芳香族アミノ酸が m⁷G を挟み込む形で cap 構造認識機能の一部を担っていることが示唆された。

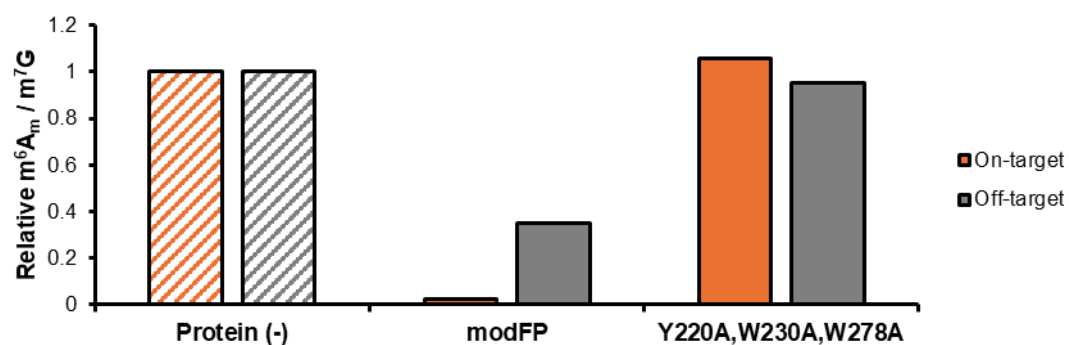


Fig. 3-5 Relative m^6A_m / m^7G compared to control (protein (-)) measured by LC-MS/MS. The RNA oligos were treated with 1 μ M of modFP or modFTO^{Y220/W230/W278A}-PUF.

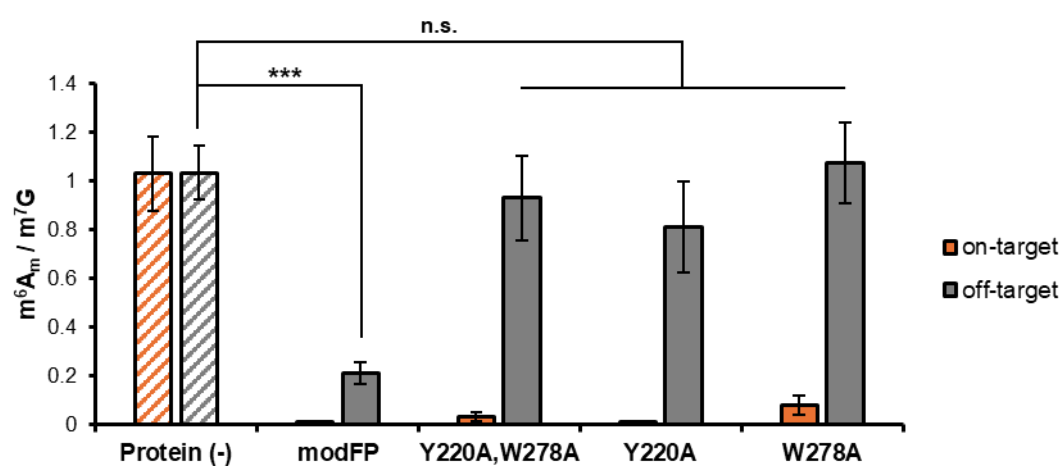


Fig. 3-6 Demethylation activities to on-target cap-RNA and off-target cap-RNA by 1 μ M of modFP and its mutants. Values and error bars indicate mean $\pm$ SEM (n=3~5, Tukey; ***: $p < 0.001$, n.s.: not significant).

RNA 内部の m⁶A に対する脱メチル化活性評価

また、これらの FTO 芳香族アミノ酸変異体の RNA 内部の m⁶A に対する脱メチル化活性を、MazF を用いて評価した。その結果、modFP と比較して、芳香族アミノ酸の各種変異体の m⁶A 脱メチル化活性に変化は表れなかった (Fig. 3-7)。この結果は、FTO における 2 つの芳香族アミノ酸である Y220, W278 は、RNA 内部の m⁶A 認識および m⁶A の脱メチル化活性には影響せず、cap 構造認識に特異的なアミノ酸として機能していることを示すものである。

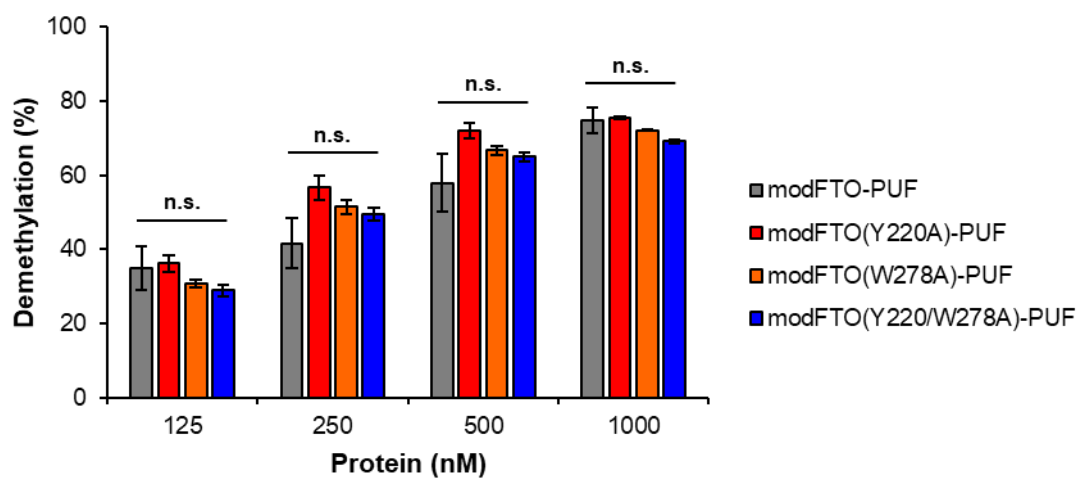


Fig. 3-7 Demethylation activities to inner m⁶A by modFP or its mutants measured by MazF assay. Values and error bars indicate mean $\pm$ SEM (n=3, Tukey; n.s.: not significant).

第二節の小括

第二節では、FTO が有する cap 構造認識能に重要なアミノ酸を、その他の cap 構造認識タンパク質の認識様式から推察し、FTO 特有のループ構造から Y220 を、それと協同して cap 構造認識に寄与する W278 を同定した。そして、modFTO^{Y220/W278A}-PUF によって、配列選択的に cap-m⁶A_m を脱メチル化するツールの開発を達成した。またこの結果は、複合体結晶構造の解明や結合親和性測定などより詳細な検証が必要ではあるものの、未解明である FTO の cap 構造認識様式を新たに提唱する結果でもある。

第二章

リガンド制御可能な配列選択的脱メチル化ツールの創出

生体内において、 m^6A は、細胞分化や発生^{9,37}、細胞周期³⁸、そして概日リズム^{19,20}などの現象に関与することがこれまでに報告されている。これらの現象は複数の連続した段階や周期的な性質の変化を伴うにもかかわらず、 m^6A がどのタイミングでどのように関与しているのか、タイミング依存的な機能に関する報告は少ない。そのため、タイミング依存的な機能を詳細かつ正確に明らかにするため、特定の m^6A の配列選択的な脱メチル化に加え、そのタイミングを制御するツールの開発が求められている。

第一章で開発した、modulated RNA-binding FTO (modFTO) と Pumilo and fem-3 mRNA-binding factor (PUF) を融合させた modFTO-PUF (modFP) が発揮する活性のタイミングを制御するため、rapamycin に応答してヘテロ二量体を形成する FK506 binding protein (FKBP) と FKBP-rapamycin-binding domain of FKBP12-rapamycin associated protein (FRB) を利用した。FKBP と FRB は、それぞれを融合させた 2 つのタンパク質をリガンド依存的に会合させ、機能を発揮させる Chemically inducible dimerization (CID) という技術として広く用いられている³⁹。本章では、modFTO と PUF に FKBP と FRB を融合させたタンパク質を作製し、rapamycin に応答して配列選択的脱メチル化活性を発揮する系を構想した。また、modALKBH5-PUF (modAP) も同様に活性を rapamycin で制御する系に利用し、その応用性を検証した。

リガンド応答性 modFTO-PUF の設計と活性評価

まず、FKBP と FRB を modFTO と PUF のどちらに融合させるかについて検討するため、modFTO-FKBP と FRB-PUF のタンパク質ペアと、modFTO-FRB と FKBP-PUF のタンパク質ペアを大腸菌発現系で精製し、その rapamycin 依存的な活性を確認した。各タンパク質を 1 μ M 加えた脱メチル化反応溶液に 2 μ M の rapamycin を加え、その配列選択的な脱メチル化活性を MazF によって評価した。その結果、modFTO-FKBP/FRB-PUF のペアは、オフターゲット効果は確認されなかったものの、on-target RNA に対する活性が約 20% と、一体型である modFP (同約 80% (Fig. 1-6)) と比べ、大きく活性が減弱した。一方、modFTO-FRB/FKBP-PUF のペアは、オフターゲット効果はほとんど確認されず、on-target RNA に対する活性も保持されていた (Fig. 4-1)。この結果から、modFTO-FRB/FKBP-PUF の組み合わせを採用し、より詳細な活性の評価を行うこととした。

modFTO-FRB/FKBP-PUF の rapamycin 応答性を検証するため、各タンパク質を 1 μ M 加えた脱メチル化反応液に、2 μ M rapamycin を添加したサンプル (rap. (+))と、同量の DMSO を加えたサンプル (rap. (-)) を作製し、それぞれ on-target RNA と off-target RNA に対する脱メチル化活性を評価した。また、比較対象として、野生型 FTO を用いた rapamycin 会合系を作製した (Fig. 4-1)。野生型 FTO を用いた場合、rap. (-) サンプル、rap. (+) サンプルのいずれにおいても、on-target RNA と off-target RNA 共に高い脱メチル化活性を示し、配列選択性や rapamycin 応答性は確認されなかった。この結果は、FTO に強い RNA 認識能が備わっているままであり、rapamycin の有無や PUF 結合配列の有無に関わらず、FTO が m⁶A を脱メチル化できたということを意味している。一方、modFTO を使用した系では、rap. (-) サンプルにおいて on-target RNA, off-target RNA 共に活性は 10% 程度に留まり、rap (+) サンプルでは on-target RNA に対してのみ脱メチル化活性を発揮した。これは、FTO の RNA 認識能が変異導入によって弱められ、modFTO 単独では脱メチル化活性を発揮できない特性 (Fig. 1-9) に基づいた結果であるといえる。ここで、modFTO-FRB/FKBP-PUF の組み合わせを ligand-inducible modFTO-PUF (imodFP) とした。

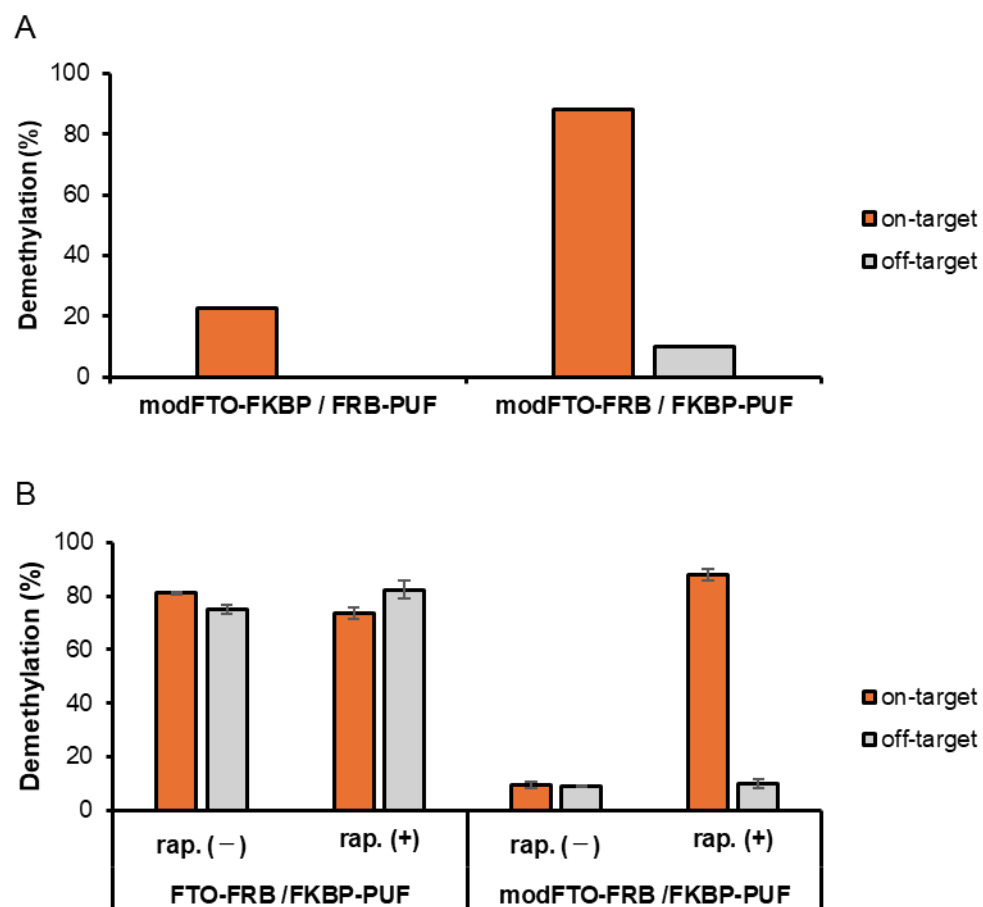


Fig. 4-1 (A) Demethylation activities of 1 μ M of modFTO-FKBP and FRB-PUF, or modFTO-FRB and FKBP-PUF to on-target RNA and off-target RNA in the presence of 2 μ M of rapamycin assessed by MazF assay. **(B)** Evaluation of the rapamycin-dependent demethylation activities. Values and error bars indicate mean $\pm$ SEM (n=3).

PUF 標的配列と m⁶A 間の距離の影響

imodFP の性質をより理解するため、modFP 開発時に行った PUF 結合配列と標的 m⁶A 間の距離と脱メチル化活性の関係性について検討した。第一章と同様の 2, 4, 6, 8, 10-nt 離れた 5 種類の RNA オリゴに対して、1 μ M imodFP および 2 μ M rapamycin を加え、脱メチル化活性を評価した。その結果、一体型の modFP と同様に、6-nt より短い場合はその距離に応じて活性が低下していき、6-nt 以上の距離がある場合は十分に活性が発揮されていた (Fig.4-2)。

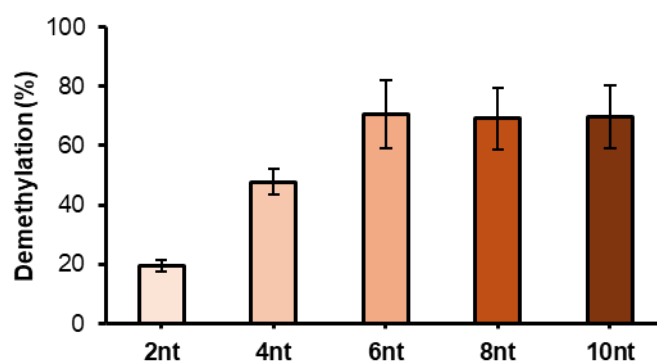


Fig. 4-2 Demethylation activities of imodFP to 2, 4, 6, 8, 10-nt RNA at 1 μ M in the presence of 2 μ M of rapamycin. Values and error bars indicate mean $\pm$ SEM (n=3).

Rapamycin 応答性 modAP の設計と活性評価

imodFP においては、FTO の C 末端に FRB を、PUF の N 末端側に FKBP を融合させる組み合わせが適していることが示唆されたことから、同様に modAP に対しても、FKBP と FRB を利用した rapamycin 応答性の配列選択的な脱メチル化ツール imodAP を modALKBH5-FRB と FKBP-PUF の組み合わせで作製した。各タンパク質 1 μ M における rapamycin 応答性および配列選択的な脱メチル化活性を評価した。野生型 ALKBH5 を使用した場合、FTO と同様に配列選択性も rapamycin 応答性もなく、脱メチル化活性を示した。一方 modALKBH5 を使用した場合、rap. (−) ではいずれの RNA に対しても活性を 10% 未満に抑え、rap. (+) では on-target RNA 選択的な脱メチル化活性を発揮していた。1 μ M の野生型 ALKBH5 や一体型 modAP が発揮する脱メチル化活性が 80% 以上であるという結果 (Fig. 2-4) と比較すると、imodAP の最大活性は約 60% と約 20% の低下が認められた。imodAP では、imodFP における modFTO を modALKBH5 に置き換えたが、その配向性や連結配列を最適化することにより、オフターゲット効果を抑制しながらも、より on-target への活性が高い rapamycin 誘導型 ALKBH5 がデザインできる可能性がある。

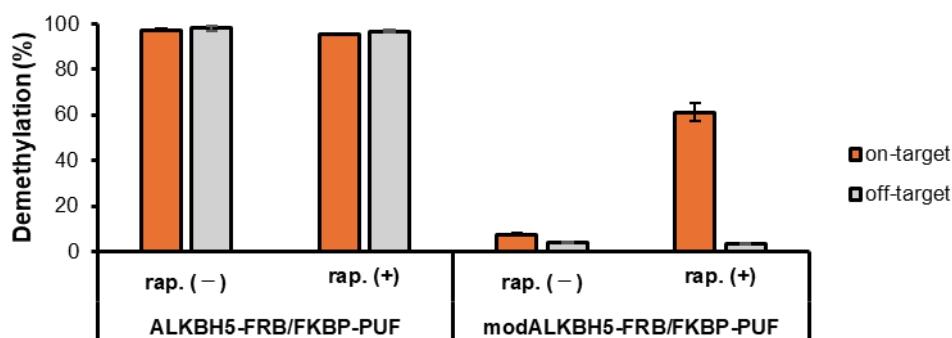


Fig. 4-3 Evaluation of the rapamycin-dependent demethylation activities between in the absence of and presence of rapamycin. Values and error bars indicate mean $\pm$ SEM (n=3).

第二章の小括

第二章では、rapamycin 存在下でヘテロ二量体を形成する FKBP と FRB を利用し、それぞれを modFTO と PUF に融合させた modFTO-FRB, FKBP-PUF を rapamycin の添加に応答して会合させ、配列選択的な脱メチル化活性を発揮させる系を構築し、imodFP と名付けた。imodFP は rapamycin 添加に応答して配列選択的な脱メチル化活性を発揮するが、rapamycin 非存在下では脱メチル化活性を発揮しない性質を示した。imodFP の高いリガンド応答性は、modFTO に導入された K88A, K213A の変異によって、融合された PUF による標的 RNA への誘導が無ければ脱メチル化活性を発揮できない modFTO の性質が生かされた設計である。また同様に、modALKBH5 と PUF を用いた imodAP を作製し、rapamycin に応答して配列選択的脱メチル化を誘起できることを示した。しかし、imodAP の最大活性には一体型の modAP の最大活性と比較して約 20% の低下が認められ、より高い活性を発揮できる設計が可能であることも示唆された。

また、今回、その応答性の高さから、rapamycin を介して会合する FKBP および FRB を *in vitro* におけるリガンド応答性検証に利用したが、rapamycin は *in vivo* において、細胞成長や代謝、タンパク質合成など多様なシグナルの制御に関与する mammalian target of rapamycin (mTOR) を阻害する活性を持つ⁴⁰。したがって、今後培養細胞や個体レベルでの応用を目指すにあたり、rapamycin を用いない CID システムとの代替や、特定の波長の光に応答して会合するタンパク質の利用など、様々な刺激応答性の配列選択的脱メチル化ツールとして利用する必要性も考えられる。

総括

本研究では、所属研究室で開発した配列選択的な m⁶A 脱メチル化ツールである FTO-PUF (FP) を基盤として、課題であった高濃度域でのオフターゲット効果を抑制し、真に配列選択的な脱メチル化ツールの開発を目的とした。

オフターゲット効果の原因として、脱メチル化酵素の RNA との結合親和性が強すぎるということが考えられたため、第一章では、FTO および ALKBH5 の RNA 認識様式に着目し、結合親和性の低下を指向した変異を導入した。その結果、静電相互作用を担う塩基性アミノ酸や、 π - π スタッキングを形成する芳香族アミノ酸にアラニン置換を導入することで、オフターゲット効果抑制型の modFTO-PUF (modFP) や modALKBH5-PUF (modAP) を開発した【第一節】。また、mRNA 5' 末端の cap 構造に存在する m⁶A_m に対しても、modFP を基盤に配列選択的な脱メチル化ツールを開発した。modFP を用いても cap-m⁶A_m に対してオフターゲット効果が確認されたため、modFTO に cap 構造との結合親和性低下を指向した更なる変異の導入を試みた。Cap 構造認識タンパク質に共通する、m⁷G を 2 つの芳香族アミノ酸が挟み込むようにして π - π スタッキングを形成する認識様式を参照し、FTO 上で cap 構造認識に重要な 2 つの芳香族アミノ酸を同定した。また、それらにアラニン置換を導入することでオフターゲット効果を抑制し、配列選択的な cap-m⁶A_m の脱メチル化ツールを開発した【第二節】。

なお本研究では、脱メチル化酵素単体では活性を示さず、配列特異的に RNA に結合する RNA 結合ユニットと組み合わせた場合にのみ近接効果によって脱メチル化活性を発揮する酵素変異体の獲得を目指すにあたり、RNA 結合ユニットとして PUF タンパク質を用いた。その理由として、大腸菌発現系によるタンパク質調整が容易である上に、同じく任意の配列に結合するよう改変が可能な CRISPR-Cas システムで必要なガイド RNA の調整が不要で、単一の融合タンパク質で機能できるという点が変異体スクリーニングにおいて有利であることが挙げられる。一方、将来的に細胞内で利用する場合には、RNA 認識配列が 8 ヌクレオチドと短い PUF タンパク質では不十分であることは否めない。本研究で開発したオフターゲット低減型脱メチル化酵素と、CRISPR-Cas13

システムなどのより長い標的配列を正確に認識できる RNA 結合ユニットとを組み合わせることで、真にオフターゲットが抑制された配列選択的な RNA 脱メチル化制御が達成できるものと期待される。

第二章では、配列選択的な m⁶A 脱メチル化活性をリガンド制御するツールの開発を目指した。ここでは、rapamycin 存在下で会合する FKBP/FRB を modFP に応用した ligand-inducible modFTO-PUF (imodFP) を開発し、rapamycin の添加に応答して配列選択的な脱メチル化を発揮させることを可能にした。また、modFP と同様に、modAP にも FKBP/FRB の系を応用することによって、活性のリガンド制御を達成した。

一方、以上の活性検証が *in vitro* レベルの検討に留まっており、今後の課題として、開発した配列選択的脱メチル化ツールを培養細胞に発現させ、内在性の mRNA 上の特定の m⁶A および m⁶A_m を脱メチル化する能力を検証する必要がある。近年では、先述した dCas9 や dCas13 と m⁶A-eraser や m⁶A-writer を融合させたタンパク質を培養細胞に発現させて特定の m⁶A の修飾状態を制御した報告例もある¹¹⁻¹⁵。したがって、オフターゲット低減型の変異を導入した modFTO や modALKBH5 をこれらの CRISPR-dCas システムと組み合わせることで、内在性 mRNA 上の m⁶A や m⁶A_m の真に標的選択的な脱メチル化が期待される。また本研究の結果は、その他の RNA 修飾編集酵素にも応用可能なタンパク質設計の指針を示しており、配列選択的な RNA 修飾制御ツールの開発および、個々の修飾 RNA が発揮する機能解明に貢献すると言える。

実験の部

【大腸菌発現用プラスミドの構築】

・ FTO-PUF 及びその変異体

His tag – FTO – PUF – Strep tag の配列が組み込まれた pET28b ベクターを鋳型とし、アラニン置換体をコードするフラグメント及びベクター領域を PCR によって増幅した。これらを HiFi assembly (NEB) を用いて環状化することにより、各変異体の大腸菌発現用ベクターを作製した。

・ ALKBH5-PUF 及びその変異体

His tag – FTO – PUF – Strep tag の配列が組み込まれた pET28b ベクターの、FTO をコードする領域の外側をベクターとして PCR によって増幅し、ALKBH5 をコードする配列も同様に PCR により増幅した。これらを HiFi assembly によって環状化し、His tag – ALKBH5 – PUF – Strep tag の配列をコードする大腸菌発現用のベクターを作製した。また、FTO-PUF 変異体と同様に、このベクターを鋳型とし、アラニン置換体をコードするフラグメント及びベクター領域を PCR によって増幅した後、HiFi assembly によって環状化することで、各変異体の大腸菌発現用ベクターを作製した。

・ FKBP, FRB 融合体

FKBP および FRB 融合タンパク質をコードするベクター作製のため、FKBP と FRB をコードする合成フラグメントを購入した (gBlocks: IDT)。このフラグメントを PCR によって増幅し、同じく PCR で増幅した各タンパク質をコードする pET28b ベクターと、HiFi assembly によって環状化し、各種融合タンパク質の、大腸菌発現用ベクターを作製した。

これらのベクター配列は、Eurofin Genomics のシーケンス解析によって正しく作成できていることを確認した。

【タンパク質精製】

作製した上記のベクターで *E. coli* BL21 (DE3) 株をトランスフォーメーションした後、Kanamycin (Kan) 含有 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 Kan 含有 LB 培地に加え、37 °C, 200 rpm にて OD₆₀₀ = 0.6 ~ 1.0 になるまで培養する。その後、最終濃度 0.1 mM となるように IPTG を加え、18 °C, 100 rpm にて終夜培養した。遠心分離 (4000×g, 20 °C, 10 min) により集菌したペレットを、His tag A buffer に懸濁し、超音波破碎した後、遠心分離 (4 °C, 20000×g, 30 min) によって可溶性画分を得た。この可溶性画分を His tag アフィニティーカラム (HisTrap FF: Cytiva) に吸着させ、His tag B buffer によって溶出した。続けてこの溶出液を、Strep tag アフィニティークロマトグラフィー (StrepTrap XT: Cytiva) に吸着させ、Strep tag B buffer によって溶出し、2 段階精製を行った。その後、限外ろ過フィルター (Amicon Ultra, 30 kDa NMWL: Merck Millipore) によって濃縮・バッファー置換を行った。使用した各種バッファーは以下の通りである (Table 3)。

タンパク質濃度は Nanodrop (Thermo Fisher) によって計測、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、-80 °C で保存した。

Table 3 Component of buffers used for recombinant-protein purification.

Buffer	組成
His tag A buffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM DTT, pH 7.4
His tag B buffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, 1 mM DTT, pH 7.4
Strep tag A buffer	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8.0
Strep tag B buffer	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Biotin, 1mM DTT, pH 8.0
限外ろ過 buffer	25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM DTT, pH 7.5

【In vitro 転写による RNA 合成】

T7 プロモーター配列下流に EGFP をコードするベクターから、T7 プロモーターおよび EGFP の配列を PCR によって増幅し、1× T7 RNA Polymerase Buffer (Takara) 中で T7 RNA Polymerase ver 2.0 (Takara) と混合し、37 °C, 4 時間インキュベーションして in vitro transcription (IVT) を実施した。その後、フェノール-クロロホルム抽出によって精製した後、Qubit4 RNA High Sensitivity (Thermo Fisher) によって濃度を測定した。

【脱メチル化反応】

・ m⁶A 修飾合成 RNA オリゴの脱メチル化

Demethylation buffer 1 (25 mM Tris-HCl, 283 μM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 300 μM α-ketoglutarate, 2 mM L-ascorbate, 50 ng/μL BSA, 50 ng/μL total RNA from HeLa cell, 0.02% Tween 20, 50 mM NaCl, pH 7.5) 中で、蛍光標識した m⁶A 修飾合成 RNA オリゴ (50 nM, Table 4) と精製したタンパク質を混合し、25 °C で 1 時間インキュベートした。その後、95 °C で 3 分間加熱し直ちに氷上で冷却した。

・ Cap-m⁶A_m 修飾合成 RNA オリゴの脱メチル化

Demethylation buffer 2 (25 mM Tris-HCl, 283 μM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 300 μM α-ketoglutarate, 2 mM L-ascorbate, 50 ng/μL IVT GFP RNA, 150 mM NaCl, pH 7.5) 中で、Cap-m⁶A_m 修飾合成 RNA オリゴ (20 ng, Table 4) と精製したタンパク質を混合し、25 °C で 1 時間インキュベートした。その後、95 °C で 3 分間加熱し直ちに氷上で冷却した。

・ 培養細胞由来 mRNA の脱メチル化

Demethylation buffer 1 中で、HEK293T 細胞から抽出した mRNA 400 ng と精製したタンパク質を混合し、37 °C で 10 分間インキュベートした。その後、5 mM EDTA を加え、95 °C で 3 分間加熱し直ちに氷上で冷却した。脱メチル化したサンプルは、NucleoSpin miRNA (Macherey-Nagel) を用いて精製した。

・ Rapamycin 応答性の脱メチル化

Demethylation buffer 1 中で、50 nM の on-target RNA と off-target RNA、1 μ M のタンパク質、そして 2 μ M の rapamycin を混合し、25 °C, 60 分間インキュベートして脱メチル化を行った。imodAP の活性測定においては、on-target RNA として 2-nt RNA (Table 4) を使用した。Rapamycin に対するコントロールとして、同量の DMSO を加えたものを作製した。インキュベーション後、95 °C, 3 分間加熱して反応を停止させ、直ちに氷上で冷却した。

Table 4 Sequences of synthesized RNA oligos used in this research. PUF target sequence is bold.

Oligo	Sequence (5'→3')
On-target RNA (6-nt RNA)	FAM-AU UGUAUAUA UCUAAG(m ⁶ A)CAUUUUA
Off-target RNA	TAMRA-AUAUCUCUUGGGUUCUAUUAG(m ⁶ A)CAUUU
RNA for fluorescence anisotropy assay	FAM-AUUGUAUAU(m ⁶ A)CAUUUA
2-nt RNA	FAM-AU UGUAUAUA AG(m ⁶ A)CAUUUUA
4-nt RNA	FAM-AU UGUAUAUA UUUG(m ⁶ A)CAUUUGGGGUUCUU
8-nt RNA	FAM-AU UGUAUAUA UCCUUUAG(m ⁶ A)CAUUUUA
10-nt RNA	FAM-AU UGUAUAUA UCGGCUUUAG(m ⁶ A)CAUUUUA
On-target cap-RNA	(m ⁷ G)-ppp-(m ⁶ A _m) GCACUU UGUAUAUA CAUUUUCAU
Off-target cap-RNA	(m ⁷ G)-ppp-(m ⁶ A _m) GCACUUUGGGGUCCAUUUUCAU

【MazF による脱メチル化活性測定】

脱メチル化反応後のオリゴ RNA (10 nM) と MazF (500 nM) を MazF buffer (40 mM リン酸ナトリウム緩衝液、0.01% Tween 20、5 mM EDTA) 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 3 分間加熱した反応溶液を TBE buffer を用いて 20% 変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することにより、切断された RNA と未切断の RNA を分離した。電気泳動後のゲルは Amersham Typhoon scanner

(Cytiva) により可視化し、バンド強度を ImageJ software (NIH, version 1.53a) により定量した。非メチル化オリゴ RNA 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、脱メチル化割合とした。

【蛍光異方性測定】

バッファー (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.01% Tween20) 中で、FP アッセイ用の 5' 末端 FAM 標識 RNA オリゴ (20 nM, Table 4) と 3×10^4 nM から 7 段階に 3 倍希釈した FTO (WT) 及び modFTO を混合し、96-well プレート (96 Well Half Area, Flat Bottom, Non-Binding Surface, Black Polystyrene : CORNING) へ 30 μ L ずつ 3 ウェルに分注した。25 °C で 1 時間インキュベーションした後、Infinite F Plex (TECAN) に 485 nm の励起光と 535 nm 蛍光波長フィルターをセットし、蛍光異方性を測定した。測定結果はカレイダグラフ (Synergy software, version 4.5.2.) により解析し、結合解離定数は以下の式より算出した。

$$A = \left(\frac{([P] + [R] + K_d) - \sqrt{([P] + [R] + K_d)^2 - 4[R]K_d}}{2[R]} \right) \times (A_{\infty} - A_0) + A_0$$

([P] : タンパク質濃度, [R] : RNA 濃度, A : 異方性, A₀ : RNA 単独の異方性, A_∞ : 全ての RNA にタンパク質が結合した時の異方性)

【培養細胞からの mRNA 抽出】

ヒト胎児腎細胞 293T (HEK293T) 細胞は、10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS : gibco) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (D-MEM (+), low glucose : Fujifilm) 中にて、37 °C, 5% CO₂ 条件下で培養し、80~90% コンフルエントの状態、2-3 日毎に継代を行った。

培養した HEK293T 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) で 2 回洗浄後、0.05% trypsin-EDTA (gibco) により細胞を剥離し、D-MEM (+) を加えて回収した。回収した細胞は遠心分離 (1200 × g, 3 分間) で上清を取り除き、PBS (-) で懸濁した後、再度遠心分離 (800 × g, 5 分間) で分離しペレットを回収した。NucleoSpin RNA Plus

(Macherey-Nagel) を用いて回収した細胞ペレットから total RNA をメーカープロトコルに則り、抽出した。Nanodrop による濃度測定後、Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Thermo Fisher) を用いて、メーカープロトコルに則り、mRNA として poly-A RNA 画分を単離し、Nanodrop によって濃度を測定した。

【LC-MS/MS を用いた修飾ヌクレオシド量の測定】

脱メチル化した 20 ng の Cap-m⁶A_m 修飾合成 RNA オリゴ (Table 4) を含む脱メチル化反応溶液に、脱キャップバッファー (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, pH 8.8) と 5 U RppH (NEB) を加え、37 °C, 200 rpm で 3 時間インキュベーションし、脱キャッピングを行った。続けて、20 mM NH₄OAc, pH 5.3 と 50 U Nuclease P1 (NEB) を加え、37 °C, 200 rpm で 12 時間インキュベートし、ヌクレオチドに分解した。さらに、200 mM NH₄HCO₃ と 2.5 U quick-CIP (NEB) を加え、37°C で 2 時間、10 分ごとに 800 rpm の振盪を 1 分間かけながらインキュベーションによる脱リン酸化を行い、ヌクレオシドに変換した。

続いてヌクレオシドサンプルを脱塩処理するため、Sep-Pak tC18 1 cc Vac Cartridge 100 mg (Waters) に 1 mL の SPE-B buffer を通して活性化し、同じく 1 mL の SPE-A buffer で平衡化した後、SPE-A buffer で 1 mL になるように希釈したサンプルを吸着させた。1 mL の SPE-A buffer でウォッシュ後、1 mL の SPE-B buffer で溶出した。溶出画分は SpeedVac で脱溶媒し、40 µL の移動相 A buffer に再溶解した (Table 5)。このサンプル 10 µL を LC-MS 8060 (SHIMADZU) にインジェクションし、各ヌクレオシドを定量した。ヌクレオシドサンプルは C18 カラムで分離した。細胞由来の mRNA に含まれる修飾 RNA の定量には移動相 A 及び B buffer を、Cap-m⁶A_m 修飾合成 RNA の定量には、移動相 A' 及び B' buffer を使用した (Table 5)。使用した各バッファーの組成は以下の通りである。

Table 5 Component of buffers used for LC-MS/MS nucleoside measurement.

Buffer	組成
SPE A buffer	0.1% heptafluorobutyric acid (HFBA) in H ₂ O
SEP B buffer	0.1% HFBA, 80% acetonitrile (ACN) in H ₂ O
移動相 A buffer	0.1% formic acid in H ₂ O
移動相 B buffer	0.1% formic acid in ACN
移動相 A' buffer	5 mM NH ₄ OAc in H ₂ O pH 5.2
移動相 B' buffer	60% ACN in H ₂ O

引用文献

- 1 D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, M. Kupiec, R. Sorek and G. Rechavi, *Nature*, 2012, 485, 201–206.
- 2 Y. Zeng, S. Wang, S. Gao, F. Soares, M. Ahmed, H. Guo, M. Wang, J. T. Hua, J. Guan, M. F. Moran, M. S. Tsao and H. H. He, *PLoS Biol.*, 2018, 16, e2006092.
- 3 M. A. Garcia-Campos, S. Edelheit, U. Toth, M. Safra, R. Shachar, S. Viukov, R. Winkler, R. Nir, L. Lasman, A. Brandis, J. H. Hanna, W. Rossmanith and S. Schwartz, *Cell*, 2019, 178, 731–747.e16.
- 4 G. Jia, Y. Fu, X. Zhao, Q. Dai, G. Zheng, Y. Yang, C. Yi, T. Lindahl, T. Pan, Y. G. Yang and C. He, *Nat. Chem. Biol.*, 2011, 7, 885–887.
- 5 F. Liu, W. Clark, G. Luo, X. Wang, Y. Fu, J. Wei, X. Wang, Z. Hao, Q. Dai, G. Zheng, H. Ma, D. Han, M. Evans, A. Klungland, T. Pan and C. He, *Cell*, 2016, 167, 816–828.e16.
- 6 G. Zheng, J. A. Dahl, Y. Niu, P. Fedorcsak, C.-M. Huang, C. J. Li, C. B. Vågbø, Y. Shi, W.-L. Wang, S.-H. Song, Z. Lu, R. P. G. Bosmans, Q. Dai, Y.-J. Hao, X. Yang, W.-M. Zhao, W.-M. Tong, X.-J. Wang, F. Bogdan, K. Furu, Y. Fu, G. Jia, X. Zhao, J. Liu, H. E. Krokan, A. Klungland, Y.-G. Yang and C. He, *Mol. Cell*, 2013, 49, 18–29.
- 7 K. Karikó, H. Muramatsu, F. A. Welsh, J. Ludwig, H. Kato, S. Akira and D. Weissman, *Mol. Ther.*, 2008, 16, 1833–1840.
- 8 X. Zhao, Y. Yang, B.-F. Sun, Y. Shi, X. Yang, W. Xiao, Y.-J. Hao, X.-L. Ping, Y.-S. Chen, W.-J. Wang, K.-X. Jin, X. Wang, C.-M. Huang, Y. Fu, X.-M. Ge, S.-H. Song, H. S. Jeong, H. Yanagisawa, Y. Niu, G.-F. Jia, W. Wu, W.-M. Tong, A. Okamoto, C. He, J. M. R. Danielsen, X.-J. Wang and Y.-G. Yang, *Cell Res.*, 2014, 24, 1403–1419.
- 9 S. Geula, S. Moshitch-Moshkovitz, D. Dominissini, A. A. Mansour, N. Kol, M. Salmon-Divon, V. Hershkowitz, E. Peer, N. Mor, Y. S. Manor, M. S. Ben-

- Haim, E. Eyal, S. Yunger, Y. Pinto, D. A. Jaitin, S. Viukov, Y. Rais, V. Krupalnik, E. Chomsky, M. Zerbib, I. Maza, Y. Rechavi, R. Massarwa, S. Hanna, I. Amit, E. Y. Levanon, N. Amariglio, N. Stern-Ginossar, N. Novershtern, G. Rechavi and J. H. Hanna, *Science*, 2015, 347, 1002–1006.
- 10 K. Shinoda, A. Suda, K. Otonari, S. Futaki and M. Imanishi, *Chem. Commun.*, 2020, 56, 1365–1368.
- 11 C. Wilson, P. J. Chen, Z. Miao and D. R. Liu, *Nat. Biotechnol.*, 2020, 38, 1431–1440.
- 12 X. M. Liu, J. Zhou, Y. Mao, Q. Ji and S. B. Qian, *Nat. Chem. Biol.*, 2019, 15, 865–871.
- 13 A. A. Smargon, D. B. T. Cox, N. K. Pyzocha, K. Zheng, I. M. Slaymaker, J. S. Gootenberg, O. A. Abudayyeh, P. Essletzbichler, S. Shmakov, K. S. Makarova, E. V. Koonin and F. Zhang, *Mol. Cell*, 2017, 65, 618–630.e7.
- 14 J. Li, Z. Chen, F. Chen, G. Xie, Y. Ling, Y. Peng, Y. Lin, N. Luo, C. M. Chiang and H. Wang, *Nucleic Acids Res.*, 2020, 48, 5684–5694.
- 15 K. Rau, L. Rösner and A. Rentmeister, *RNA*, 2019, 25, 1311–1323.
- 16 J. Liu, Y. Yue, D. Han, X. Wang, Y. Fu, L. Zhang, G. Jia, M. Yu, Z. Lu, X. Deng, Q. Dai, W. Chen and C. He, *Nat. Chem. Biol.*, 2014, 10, 93–95.
- 17 I. A. Roundtree, G.-Z. Luo, Z. Zhang, X. Wang, T. Zhou, Y. Cui, J. Sha, X. Huang, L. Guerrero, P. Xie, E. He, B. Shen and C. He, *Elife*, e.31311.
- 18 W. Xiao, S. Adhikari, U. Dahal, Y.-S. Chen, Y.-J. Hao, B.-F. Sun, H.-Y. Sun, A. Li, X.-L. Ping, W.-Y. Lai, X. Wang, H.-L. Ma, C.-M. Huang, Y. Yang, N. Huang, G.-B. Jiang, H.-L. Wang, Q. Zhou, X.-J. Wang, Y.-L. Zhao and Y.-G. Yang, *Mol. Cell*, 2016, 61, 507–519.
- 19 J.-M. Fustin, M. Doi, Y. Yamaguchi, H. Hida, S. Nishimura, M. Yoshida, T. Isagawa, M. S. Morioka, H. Kakeya, I. Manabe and H. Okamura, *Cell*, 2013, 155, 793–806.
- 20 J. M. Fustin, R. Kojima, K. Itoh, H. Y. Chang, Y. Shiqi, B. Zhuang, A. Oji, S. Gibo, R. Narasimamurthy, D. Virshup, G. Kurosawa, M. Doi, I. Manabe,

- Y. Ishihama, M. Ikawa and H. Okamura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2018, 115, 5980–5985.
- 21 I. Topisirovic, Y. V. Svitkin, N. Sonenberg and A. J. Shatkin, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2011, 2, 277–298.
- 22 A. K. Banerjee, *Microbiol. Rev.*, 1980, 44, 175–205.
- 23 J. M. Keith, M. J. Ensinger and B. Moss, *J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 5033–5039.
- 24 X. Zhang, L.-H. Wei, Y. Wang, Y. Xiao, J. Liu, W. Zhang, N. Yan, G. Amu, X. Tang, L. Zhang and G. Jia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2019, 116, 2919–2924.
- 25 M. Imanishi, S. Tsuji, A. Suda and S. Futaki, *Chem. Commun.*, 2017, 53, 12930–12933.
- 26 J. Wei, F. Liu, Z. Lu, Q. Fei, Y. Ai, P. C. He, H. Shi, X. Cui, R. Su, A. Klungland, G. Jia, J. Chen and C. He, *Mol. Cell*, 2018, 71, 973–985.e5.
- 27 S. Kaur, N. Y. Tam, M. A. McDonough, C. J. Schofield and W. S. Aik, *Nucleic Acids Res.*, 2022, 50, 4148–4160.
- 28 C. Feng, Y. Liu, G. Wang, Z. Deng, Q. Zhang, W. Wu, Y. Tong, C. Cheng and Z. Chen, *J. Biol. Chem.*, 2014, 289, 11571–11583.
- 29 V. H. Cowling, *Biochem. J.*, 2010, 425, 295–302.
- 30 E. Sendinc, D. Valle-Garcia, A. Dhall, H. Chen, T. Henriques, J. Navarrete-Perea, W. Sheng, S. P. Gygi, K. Adelman and Y. Shi, *Mol. Cell*, 2019, 75, 620–630.e9.
- 31 K. Boulias, D. Toczydłowska-Socha, B. R. Hawley, N. Liberman, K. Takashima, S. Zaccara, T. Guez, J.-J. Vasseur, F. Debart, L. Aravind, S. R. Jaffrey and E. L. Greer, *Mol. Cell*, 2019, 75, 631–643.e8.
- 32 S. Akichika, S. Hirano, Y. Shichino, T. Suzuki, H. Nishimasu, R. Ishitani, A. Sugita, Y. Hirose, S. Iwasaki, O. Nureki and T. Suzuki, *Science*, 2019, 363, eaav0080.

- 33 J. Mauer, X. Luo, A. Blanjoie, X. Jiao, A. V Grozhik, D. P. Patil, B. Linder, B. F. Pickering, J.-J. Vasseur, Q. Chen, S. S. Gross, O. Elemento, F. Debart, M. Kiledjian and S. R. Jaffrey, *Nature*, 2017, 541, 371–375.
- 34 J. Marcotrigiano, A.-C. Gingras, N. Sonenberg and S. K. Burley, *Cell*, 1997, 89, 951–961.
- 35 J. S. Mugridge, M. Ziemniak, J. Jemielity and J. D. Gross, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2016, 23, 987–994.
- 36 C. Xu, K. Liu, W. Tempel, M. Demetriades, W. Aik, C. J. Schofield and J. Min, *J. Biol. Chem.*, 2014, 289, 17299–17311.
- 37 P. J. Batista, B. Molinie, J. Wang, K. Qu, J. Zhang, L. Li, D. M. Bouley, E. Lujan, B. Haddad, K. Daneshvar, A. C. Carter, R. A. Flynn, C. Zhou, K.-S. Lim, P. Dedon, M. Wernig, A. C. Mullen, Y. Xing, C. C. Giallourakis and H. Y. Chang, *Cell Stem Cell*, 2014, 15, 707–719.
- 38 M. Hirayama, F.-Y. Wei, T. Chujo, S. Oki, M. Yakita, D. Kobayashi, N. Araki, N. Takahashi, R. Yoshida, H. Nakayama and K. Tomizawa, *Cell Rep.*, 2020, 31, 107464.
- 39 L. A. Banaszynski, C. W. Liu and T. J. Wandless, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 4715–4721.
- 40 V. Panwar, A. Singh, M. Bhatt, R. K. Tonk, S. Azizov, A. Saquib Raza, S. Sengupta, D. Kumar and M. Garg, *Sig. Transduc. Target. Ther.*, 2023, 8, 375.

謝辞

終わりに臨み、終始ご懇篤なるご指導ならびにご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。

数々のご指導、ご助言をいただきました、今西 未来 准教授(京都大学化学研究所)、広瀬 久昭 特定准教授(京都大学化学研究所)、川口 祥正 助教(京都大学化学研究所)、河野 健一 助教(京都大学化学研究所)に深く感謝いたします。

LC-MS/MS 測定に際し、多くのご指導、ご助言をいただきました、石濱 泰 教授、小形 公亮 助教、金尾 英佑 助教、富岡 郁那 修士(京都大学大学院薬学研究科 生体分子計測学分野)に深くお礼申し上げます。ならびに、第一章・第二節において Cap-m⁶A_m 修飾 RNA オリゴを提供していただいた、阿部 洋 教授、多田 瑞紀 修士(名古屋大学大学院理学研究科)に深くお礼申し上げます。そして、実験の一部を担当してくださいました浅見 有璃 修士、須田 明代 様をはじめ、京都大学化学研究所 生体機能設計化学領域の皆様にご心より感謝いたします。

また、本研究の一部は京都大学大学院教育支援機構の援助によるものであり、改めて感謝いたします。最後に、私の研究活動を温かく見守り、支えてくださった家族、友人に、この場を借りて深くお礼申し上げます。