

# 博士論文

ヒト由来 m<sup>6</sup>A 修飾酵素 METTL16 の  
構造と機能に関する研究

(Study on the structure and functions of human  
m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL16)

青山 智彦

## 目次

|   |    |
|---|----|
| 第一章 要旨 .....  | 3  |
| 第二章 背景 .....  | 4  |
| 1. RNA の機能と役割   |    |
| 2. N <sup>6</sup> -methyladenosine (m <sup>6</sup> A)                 |    |
| 3. m <sup>6</sup> A 修飾酵素 (writer) と m <sup>6</sup> A 脱メチル化酵素 (eraser) |    |
| 4. m <sup>6</sup> A 修飾結合タンパク質 (reader)                                |    |
| 5. METTL16 (methyltransferase like 16)                                |    |
| 6. U6 snRNA の生合成と m <sup>6</sup> A 修飾の機能                              |    |
| 7. SAM 合成酵素の発現制御と MAT2A mRNA の m <sup>6</sup> A 修飾の機能                 |    |
| 8. 本研究の目的   |    |
| 第三章 実験方法 .....  | 12 |
| 1. タンパク質の発現と精製  |    |
| 2. VCR の結晶化と構造決定  |    |
| 3. 試験管内メチル化活性定量系  |    |
| 4. ゲルシフト解析  |    |
| 5. 免疫沈降   |    |
| 6. m <sup>6</sup> AIP-RT-qPCR   |    |
| 7. 本研究で使用した遺伝子・RNA 基質・プライマーの配列  |    |

第四章 結果 ----- 20

1. METTL16 の m<sup>6</sup>A 修飾活性評価系の確立
2. METTL16 の VCR は U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾を促進する
3. METTL16 の VCR の構造の決定
4. METTL16 の VCR は TUT1 の KA-1 によって機能的に代替可能である
5. METTL16 により m<sup>6</sup>A 修飾される RNA 構造モデルの構築
6. METTL16 の VCR は U6 snRNA の ISL と相互作用する
7. Telestem の構造の不安定化は U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾に必要である

第五章 議論 ----- 41

1. METTL16 による RNA の m<sup>6</sup>A 修飾機構
2. U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾の役割
3. METTL16 の VCR と TUT1 の KA1 の構造的な相似性の意義
4. METTL16 による U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾の種間保存性
5. METTL16 と METTL3/14 複合体
6. METTL16 による細胞内 SAM 恒常性
7. METTL16 と MALAT1
8. 総括

第六章 参考文献 ----- 53

第七章 謝辞 ----- 63

## 第一章 要旨

N<sup>6</sup>-methyadenosine (m<sup>6</sup>A)は、mRNA に多く見られるアデノシンの 6 位の窒素がメチル化された修飾塩基であり、様々な遺伝子発現制御の目印として生体内のタンパク質の発現を調節する。RNA の m<sup>6</sup>A 修飾の有無によって、その物理化学的な性質が変化するだけでなく、遺伝子発現を制御するタンパク質との結合が調節されている。その結果、m<sup>6</sup>A 修飾依存的に、スプライシング・RNA 輸送・RNA 分解・翻訳制御などが変化し、生体内の遺伝子発現が巧妙に制御される。

U6 snRNA は、生体内のスプライシング反応を触媒する機能性 RNA である。U6 snRNA の 43 位の N<sup>6</sup>-methyladenosin (m<sup>6</sup>A 修飾) は、5'-splice site の認識部位に位置することから、スプライシング制御に重要であると考えられている。METTL16 は、U6 snRNA の 43 位を m<sup>6</sup>A 修飾する酵素であり、N 末端側のメチル基転移活性ドメイン (MTD) と C 末端側の脊椎動物保存領域 (VCR) で構成される。METTL16 の特徴は、RNA の一次配列ではなく、特定の構造を認識して RNA を m<sup>6</sup>A 修飾することである。しかし、METTL16 による RNA の m<sup>6</sup>A 修飾機構には不明な点が多く残されていた。

本研究の目的は、METTL16 による RNA の m<sup>6</sup>A 修飾機構の解明である。特に、VCR の機能と構造に着目して解析を進めた。その結果、METTL16 の VCR は、METTL16 による U6 snRNA の認識を効率化し、m<sup>6</sup>A 修飾を促進する機能をもつことを見出した。また、VCR の結晶構造の決定により、METTL16 の VCR は、U6 snRNA 特異的な 3'末端ウリジル化酵素 (TUT1) の RNA 結合ドメイン (KA1) に非常によく似た構造であることが明らかになった。そして、METTL16 の VCR は、U6 snRNA 内の内部ステムループ (ISL) と相互作用し、U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾部位付近の構造変化を補助することが示唆された。以上より、METTL16 は、MTD と VCR が協調的に用いることで、標的 RNA を m<sup>6</sup>A 修飾するという新たな反応モデルが明らかになった。

## 第二章 背景

### 1. RNA の機能と役割

生体内において、DNA に保存された遺伝情報は mRNA に写し取られ、mRNA の遺伝情報をもとに機能分子であるタンパク質が合成される。DNA から mRNA への遺伝情報の伝達は「転写」と呼ばれ、mRNA からタンパク質への遺伝情報の伝達は「翻訳」と呼ばれる。DNA や RNA などの核酸分子は、塩基対を形成する特徴によって、自身のもつ配列情報を他方に正確に伝えることができる。しかし、タンパク質はアミノ酸分子から構成されるため、同様の方法で遺伝情報を伝達することは困難であり、核酸の配列情報のアミノ酸の配列情報への変換を媒介するアダプター分子 (tRNA) や、タンパク質合成装置の構成因子 (rRNA) が機能することで、遺伝子情報の伝達が達成され、生体内の機能分子であるタンパク質が供給される。したがって、RNA は遺伝情報の伝達を媒介することにより、遺伝子発現を実現する過程で中心的な役割を果たしている。

RNA は mRNA・tRNA・rRNA・snRNA・miRNA など、機能や細胞内での局在をもとにした分類がされている。RNA は 4 種のヌクレオチドから合成される直鎖ポリマー分子であるが、転写後にメチル化をはじめとした修飾処理を受けることが広く知られている。RNA は修飾を受けると、物理化学的な性質が変化して細胞内での機能が調節される。また、RNA は遺伝情報の媒体としてだけでなく、自身がタンパク質と同様に機能性分子として働く特徴を持ち、各種 RNA 修飾の有無はそれらの機能を直接制御する。

### 2. N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A)

N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) は、mRNA に多く見られるアデノシンの 6 位の窒素がメチル化された修飾塩基であり、様々な遺伝子発現制御に関与して生体内のタンパク質の発現を調節する(1-4)。RNA の m<sup>6</sup>A 修飾は、mRNA だけでなく tRNA(5)・rRNA(6)・snRNA(7)・microRNA(8)にも含まれている。RNA の m<sup>6</sup>A 修飾の有無によって、物理化学的な性質が変

化するだけでなく、遺伝子発現を制御するタンパク質との結合が調節されている。その結果、m<sup>6</sup>A 修飾依存的に、スプライシング(9)・RNA 輸送(10)・RNA 分解(11,12)・翻訳制御(13-15)などが変化し、生体内の遺伝子発現が巧妙に制御される (Fig.1)。そして、m<sup>6</sup>A 修飾依存的な遺伝子発現制御は、幹細胞の分化、発達、概日リズム、細胞シグナル伝達などにおいて重要な役割を果たすことが明らかにされている(16-20)。

m<sup>6</sup>A 修飾は、翻訳が盛んに行われている mRNA に含まれていることが古くから報告されていた(21)。近年の技術革新により、RNA のどの部位が m<sup>6</sup>A 修飾されているかを網羅的に調べる方法が開発され、生体内の RNA の m<sup>6</sup>A 修飾の位置情報が提供された。その結果、塩基置換や siRNA によるノックダウンなどの方法で m<sup>6</sup>A 修飾を欠失・減少される条件設定が可能となり、RNA に含まれる m<sup>6</sup>A 修飾の様々な遺伝子発現制御への関与が続々と明らかにされている(2,3)。

RNA の m<sup>6</sup>A 修飾は、アデノシンの 6 位の窒素をメチル化する writer、脱メチル化する eraser、m<sup>6</sup>A を認識して RNA の機能や発現を調節する reader により制御される。したがって、RNA の m<sup>6</sup>A 修飾反応は、可逆的であることで外部刺激や細胞内環境の変化に応答し、時空間的な遺伝子発現制御を実現すると考えられている。例えば、免疫応答の制御においては、異物の侵入などによるリン酸化経路を介したシグナル伝達を速やかに遺伝子発現制御に反映する必要がある。そのためには、転写段階の制御に加えて RNA 安定性や翻訳などの転写後制御を介して遺伝子発現を調節することが重要である。m<sup>6</sup>A 修飾を含めた RNA の修飾塩基の特徴は、RNA の 1 次配列や高次構造に特異的付加されることで、標的 RNA 選択的な遺伝子発現制御が可能なことである。実際に、RNA の m<sup>6</sup>A 修飾依存する様式で、RNA 分解や翻訳などの転写後制御が行われることが報告されている。したがって、生体内の遺伝子発現は、RNA に m<sup>6</sup>A 修飾を含めた情報が付加されることで、標的選択性を担保した制御を実現している。

RNA の m<sup>6</sup>A 修飾は、機能分子としての RNA の機能も調節する。RNA を含む核酸分子

の特徴は、分子内または分子間で塩基対を形成できることである。実際に、スプライシング装置であるスプライソソームや翻訳装置であるリボソームは、RNA とタンパク質から構成される複合体であり、RNA の塩基対形成が利用されて機能的な構造や反応過程に必要な活性が提供されている。よって、RNA の m<sup>6</sup>A 修飾の有無により塩基対形成の是非が決定される場合などでは、その欠失は機能的な障害の原因となる。

### 3. m<sup>6</sup>A 修飾酵素 (writer) と m<sup>6</sup>A 脱メチル化酵素 (eraser)

RNA の m<sup>6</sup>A 修飾の多くは、Methyltransferase like 3 (METTL3)/ Methyltransferase like 14 (METTL14) 複合体により導入される。METTL3 は、RRACH (R = A or G, H = A, C or U、下線部がメチル化部位) 配列を含む RNA のアデノシンを m<sup>6</sup>A 修飾する(22)。METTL3/METTL14 複合体の結晶構造から、METTL3 は RNA の m<sup>6</sup>A 修飾活性を有しており S-アデノシルメチオニン (SAM) と相互作用すること、METTL14 は触媒活性を持たず RNA 基質の認識に寄与することが明らかにされている(23-25)。METTL3/METTL14 複合体は、核スペckルに局在することから m<sup>6</sup>A 修飾反応は核内で行われると考えられている。また、METTL14 は、ヒストン修飾である H3K36me3 を認識して結合することから、METTL3/METTL14 複合体は転写共役的に RNA を m<sup>6</sup>A 修飾すると報告されている(26)。ヒト由来のがん培養細胞において、METTL3 の siRNA 処理をすると、アポトーシスが誘導されることが明らかにされている(2)。よって、METTL3 の発現が亢進することによる細胞内 m<sup>6</sup>A 修飾レベルの増加は、癌細胞において細胞死の抑制に寄与すると考えられる。

RNA の m<sup>6</sup>A 脱メチル化は、ALKBH (AlkB homolog) ファミリー分子により触媒される。ALKBH ファミリー分子は、2-オキソグルタル酸と Fe(II)存在下で、アデニンの 6 位の窒素のメチル基を水酸化し、ホルムアルデヒド(HCHO)として脱メチル化する。RNA の m<sup>6</sup>A 脱メチル化酵素としては、ALKBH5 と FTO (ALKBH9)が報告されている(27,28)。ALKBH5 と FTO は、核スペckルに局在することから、脱メチル化反応も核内で行われると考えら

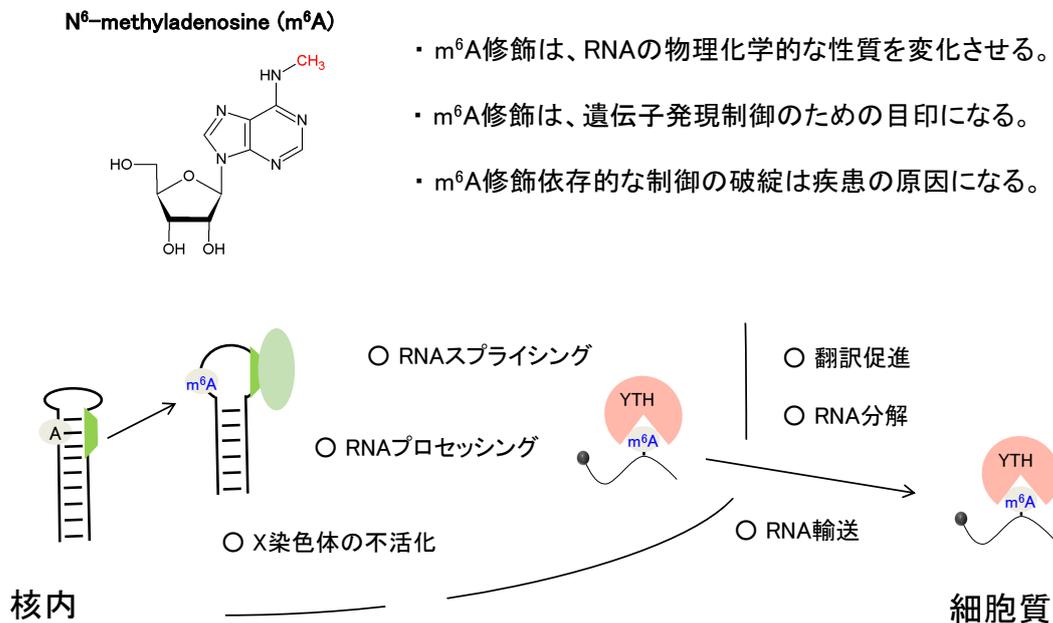


Figure 1. m<sup>6</sup>A 修飾による遺伝子発現制御

れている。ALKBH5 は、神経がんの一種であるグリオブラストーマにおいて高発現していることが報告されている。具体的には、グリオブラストーマ幹細胞様細胞における ALKBH5 は、細胞増殖に寄与する転写因子 FOXM1 の発現を増加させ、予後不良であることが示されている(29)。また、FTO は急性骨髄性白血病 (AML) において高発現していることが報告されている。FTO はがん抑制遺伝子である ASB2 や RARA の mRNA の脱メチル化を介して、これらの遺伝子の mRNA の発現およびタンパク質の発現を低下させ、急性骨髄性白血病 (AML) の進行に寄与していることが示されている(30)。

#### 4. m<sup>6</sup>A 修飾結合タンパク質 (reader)

RNA が m<sup>6</sup>A 修飾を受けると塩基対形成の是非などが調節されるだけでなく、reader タンパク質が m<sup>6</sup>A を認識して結合する。YTH ファミリーは、RNA 結合ドメイン YTH を有

するタンパク質群であり、m<sup>6</sup>A 修飾を含む RNA に結合することが明らかにされている。YTHDF1-3 は、細胞質に局在して m<sup>6</sup>A 修飾依存的な遺伝子発現制御に関与すると考えられている。YTHDF1 は mRNA の翻訳を促進すること(13)、YTHDF2 は、RNA 分解酵素複合体である CCR4-NOT complex を RNA 上にリクルートして、RNA 分解を促すことが示されている(31)。YTHDF3 は mRNA の翻訳と分解を促進する機能が明らかにされている(32)。一方で、YTHDC1-2 は、核内に局在すると考えられている。YTHDC1 は、X 染色体の不活性化(33)、スプライシング制御(34)、RNA 輸送(35)、RNA 分解(36)などの多様な遺伝子発現制御に関与することが明らかにされている。YTHDC1 は、X-inactive specific transcript (XIST)の m<sup>6</sup>A 修飾を認識して結合し、X 染色体の不活性化に寄与することが示されている(33)。また、YTHDC1 は、スプライシング因子である SRSF3 と協調的に機能し、m<sup>6</sup>A 修飾を受けたエクソン配列を含む mRNA となるようにスプライシング反応を誘導することも報告されている(34)。一方で、YTHDC2 は mRNA の翻訳と分解を促進する機能が明らかにされている(37)。HNRNP ファミリーは、転写後の mRNA に結合するスプライシング関連因子として分類されるタンパク質群である。HNRNPA2B1 は、転写後の未成熟な miRNA の m<sup>6</sup>A 修飾を認識して結合し、DROSHA/DGCR8 複合体との相互作用を介して、核内における miRNA のプロセッシングを促進することが報告されている(8)。HNRNPC と HNRNPG は、m<sup>6</sup>A 修飾を認識して RNA に結合して 2 次構造を変化させる機能が報告されている(38,39)。以上のように、RNA の m<sup>6</sup>A 修飾は構造変化を提供するだけでなく、reader タンパク質に認識されることにより、生体内の多様な遺伝子発現制御に関与する。

## 5. METTL16 (methyltransferase like 16)

近年、新たな RNA の m<sup>6</sup>A 修飾酵素として Methyltransferase like 16 (METTL16) が同定された(40)。METTL16 は、SAM 合成酵素 MAT2A (Methionine adenosyltransferase 2A) の mRNA の 3'非翻訳領域と、スプライシング反応に必須の機能性 RNA である U6 small

nuclear RNA (U6 snRNA)の43位を m<sup>6</sup>A 修飾する(40)。

METTTL16 は、MAT2A hairpin RNA や U6 snRNA の UACAGAGAA (下線が m<sup>6</sup>A 修飾部位) 配列を m<sup>6</sup>A 修飾する(40)。しかし、この配列を含むだけでは METTTL16 の m<sup>6</sup>A 修飾の標的にはならない(40)。METTTL16 は、N 末端側のメチル基転位活性ドメイン (MTD) と C 末端側の脊椎動物保存ドメイン (VCR) から構成される。最新の研究で、METTTL16 の MTD と MAT2A hairpin RNA との複合体の結晶構造が決定され、METTTL16 は MTD だけで MAT2A hairpin RNA を認識できることが明らかにされた(41)。METTTL16 と結合した MAT2A hairpin RNA は、m<sup>6</sup>A 修飾されるアデノシンを含む認識配列 (Recognition loop)、遷移領域 (Transition region)、ステム構造 (Stem) から構成される。METTTL16 の MTD は、AGAA-GU 残基による特殊な塩基対を形成する遷移領域に複合体結晶中で相互作用する。そして、MAT2A hairpin RNA の m<sup>6</sup>A 修飾には遷移領域の構造が必要であることが示された(41)。したがって、METTTL16 は、標的配列だけを認識するのではなく、RNA の立体構造を認識して標的 RNA を m<sup>6</sup>A 修飾する。

## 6. U6 snRNA の生合成と m<sup>6</sup>A 修飾の機能

真核生物において、転写反応により合成された pre-RNA は、遺伝子情報を含むエクソン領域と含まないイントロン領域が混在している。RNA スプライシングは、pre-RNA からイントロンを切り出し、機能的な RNA やタンパク質の遺伝子情報もつ成熟 RNA を構築する過程である。スプライソソームは、細胞内で RNA スプライシングを担う活性本体であり、5つの RNA-タンパク質複合体サブユニット (U1, U2, U4, U5, U6 snRNP) から構成される。U6 snRNP は、U6 snRNA、hPrep24、Lsm2-8 ヘテロ 7 量体から構成される(42)。

U6 snRNA は、RNA ポリメラーゼIIIにより転写された後に、多数の RNA 修飾およびプロセッシングを受けて、スプライソソームに取り込まれる。成熟した U6snRNA は、5'末端が  $\gamma$ -monomethylphosphate(43)、3'末端に 2',3'-cyclic phosphate 修飾(44)をもつ。また、

U6 snRNA の修飾残基として、N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A)、2'-O-methyladenosine (Am)、2'-O-methylcytidine (Cm)、2'-O-methylguanosine (Gm)、 pseudouridine (Ψ)、 N<sup>2</sup>-methyladenosine (m<sup>2</sup>G)が明らかにされている(45,46)。

ヒトの U6 snRNA は、ゲノム上では 3'末端に 4 つの連続したウリジンがコードされているが、TUT1 (Terminal uridylyltransferase 1)と Usb1 (U6 biogenesis protein 1)の 2 つの酵素により、5 つの連続したウリジンに整えられ、3'末端が 2',3'-cyclic phosphate に修飾される(47)。まず、転写後の未成熟な U6 snRNA は、TUT1 によって 3'末端がオリゴウリジル化される(48,49)。次に、U6 snRNA の 3'末端は、3'-5'エキソヌクレアーゼである Usb1 により短鎖化される(50,51)。その結果、U6 snRNA は、5 つの連続したウリジンに加え、最末端は 2',3'-cyclic phosphate 修飾が付加される(52,53)。U6 snRNA は、TUT1 と Usb1 のプロセッシングにより、Lsm2-8 ヘテロ 7 量体との結合活性が向上する(54)。その後、U6 snRNP に結合した hPrep24 と Lsm2-8 ヘテロ 7 量体は、U6 snRNA と U4 snRNA のアニーリングを効率化し、U4/U6 di-snRNP の形成が促進される。そして、U4/U6.U5 tri-snRNP を形成し、U1 snRNP と U2 snRNP に認識された RNA のスプライシングサイトに相互作用する(42)。

U6 snRNA は、pre-RNA の 5'側の splice site と塩基対を形成し、エステル転移反応を触媒することによりスプライシング反応を引き起こす。特に、U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾は、5'側の splicing site の認識配列中に位置するため、スプライシング反応に重要と考えられている(55)。実際に、出芽酵母では、m<sup>6</sup>A 修飾部位に相当する位置のアデニン残基の変異は致死である(56)。しかし、U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾の直接的な機能は未だ明らかにされていない。

## 7. SAM 合成酵素の発現制御と MAT2A mRNA の m<sup>6</sup>A 修飾の機能

SAM は、細胞内の多くのメチル化反応でメチル基ドナーとしての役割を担う。よって、細胞内の SAM を一定の範囲に保つことは、ヒストンのメチル化、DNA のメチル化、RNA

のメチル化などの多様な遺伝子発現が制御されるために重要であると考えられる。SAMは、メチオニンとATPからSAM合成酵素(MAT)により合成される。細菌では、SAMと結合するリプレッサー配列によりMAT mRNAの転写が阻害されることや(57)、SAMと結合するリボスイッチによりMAT mRNAの翻訳が阻害されるという(58,59)、SAMの量に応答したフィードバック機構の存在が明らかにされている。哺乳類では、SAM合成酵素MAT2A mRNAの3'非翻訳領域のヘアピン構造のm<sup>6</sup>A修飾を介して、MAT2A mRNAの成熟と安定性が制御されることが報告されている。SAMが十分に存在するとき、METTL16がMAT2A mRNAの3'UTRをm<sup>6</sup>A修飾して分解を促進し、MAT2Aタンパク質の発現を低下させてSAMの合成を抑制すると示されている(36)。MAT2A mRNAのm<sup>6</sup>A修飾は、YTHDC1に認識されることで、mRNAを不安定化させる機能が明らかにされている(36)。一方、SAMが不足しているとき、METTL16はMAT2A mRNAの3'UTRに結合するが、スプライシングを誘導することでMAT2A mRNAを成熟させ、MAT2Aタンパク質の発現を上昇させてSAM合成を促進すると考えられている(40)。

## 8. 本研究の目的

本研究の目的は、メチル基転移酵素METTL16によるRNAのm<sup>6</sup>A修飾機構の解明とした。先行研究で、METTL16によるMAT2A hairpin RNAのm<sup>6</sup>A修飾の分子基盤は報告されている。しかし、METTL16によるU6 snRNAのm<sup>6</sup>A修飾機構は明らかにされていない。また、U6 snRNAのm<sup>6</sup>A修飾におけるVCRの役割も不明であった。以上の背景のもと、VCRの機能と構造に着目し、METTL16によるRNAのm<sup>6</sup>A修飾機構の解明を試みた。

### 第三章 実験方法

#### 1. タンパク質の発現と精製

METTL16 をコードする人工遺伝子 (Eurofins Genomics) を pET22b ベクター (Merck) の NdeI-XhoI サイトにクローニングした。METTL16 の各種変異体をコードする DNA 配列は、pET22\_METTL16 から PCR で増幅し、pET22b ベクターの NdeI-XhoI サイトにクローニングした。タンパク質の発現のために、Escherichia coli BL21 (DE3) 細胞 (Merck Millipore) に、METTL16 およびその変異体をコードしたプラスミドを形質転換し、100  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 液体培地中で、A600 が 1.0 に達するまで 37°C で培養した。タンパク質の発現は、0.1 mM IPTG (イソプロピル-D-D-チオガラクトピラノシド) によって誘導し、18°C で 16 時間培養した。細胞を回収し、Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0、500 mM NaCl、10 mM  $\beta$ -ME、20 mM イミダゾール、および 5% (v/v) グリセロール) で溶解した。精製後のタンパク質は、G Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0、200 mM NaCl および 10 mM  $\beta$ -ME) に溶解させ -80°C で凍結保存した。

#### 2. VCR の結晶化と構造決定

VCR\_ $\Delta$ L (アミノ酸残基 310~410 および 509~562) の精製タンパク質を、シッティングドロップ蒸気拡散法により 20°C で結晶化させた。タンパク質溶液 (VCR\_ $\Delta$ L 5 mg/mL、10 mM DTT、5 mM デキストラン硫酸ナトリウム)、リザーバー溶液 (100 mM Tris-HCl, pH 7.4、20% (w/v) PEG3350、200 mM クエン酸ナトリウム、および 4% (w/v) ホルムアミド) を、それぞれ 200nL ずつ混和した。また、セレノメチオニンを含む VCR\_ $\Delta$ L の結晶化では、タンパク質溶液 (VCR\_ $\Delta$ L 5 mg/mL、10 mM DTT、3mM デキストラン硫酸ナトリウム)、リザーバー溶液 (100 mM Tris-HCl, pH 7.4、20% (w/v) PEG3350、200 mM クエン酸ナトリウム、および 4% (w/v) ホルムアミド)、結晶化を促進するための VCR\_ $\Delta$ L 結晶シード溶液を、順に 300nL、200nL、100nL 混和した。結晶シードは、シー

ドビーズ (Hampton Research) を用いて調製した。データセットは、KEK 高エネルギー加速器研究機構の PF 放射光実験施設が運用するビームライン 17A で取得した。結晶を 25% (v/v) エチレングリコールを含むリザーバー溶液で凍結保護し、100 K の窒素気流で冷却しながら X 線照射することで、結晶の反射データを採取した。初期位相は、セレノメチオン誘導体結晶を用いた単波長異常分散 (SAD) 法により決定した。得られたデータは、XDS(60)、SHELX(61)、Phaser(62)、phenix.refine(63)、Coot(64)を用いて処理し、モデル構造を構築・改良して結晶構造を決定した。

### 3. 試験管内メチル化活性定量系

RNA のメチル化活性の定量は、MTase-Glo™ Methyltransferase Assay (Promega) を用いて行った。製造元の標準プロトコルをもとに引用論文を参考にして一部変更した(65)。Methylation reaction buffer (50 mM HEPES-KCl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM SAM (S-adenosylmethionine) (Cayman Chemical) に、1×MTase-Glo™ Reagent、METTL16 または変異体酵素 (0.1-0.4 μM)、RNA 基質 (0.05-4 μM) を添加し、12.5 μL/sample を 37°C で反応させた。MTase-Glo™ Reagent は、メチル化の副産物である SAH (S-adenosylhomocysteine) を ADP に変換する。反応後、MTase-Glo™ Detection Solution 12.5 μL と混合し、室温で 30 分間静置して ADP を ATP に変換し、ルシフェラーゼ/ルシフェリン反応によりメチル化活性を定量した。発光は、GloMax-Multi Detection System (Promega) を用いて測定した。RNA 基質の非存在下での反応の測定値をバックグラウンドとして、RNA 基質の存在下での反応の測定値から差し引いた。メチル化活性は、少なくとも 10 分まで直線的に推移することを確認し、定常状態の速度論的分析では 4 分の値を用いて反応初速度を計算した。SAH (Promega) を用いて希釈系列を作成し、SAH の 1 pmol は  $1.9 \times 10^5$  light units に対応することを確認し、酵素の時間当たりの反応回数を計算した。RNA 基質 (U6 snRNA、MAT2A\_hp1、各種変異体) は、T7 プロモーターの下流

に RNA をコード化するプラスミドを作成し、試験管内の T7 RNA ポリメラーゼ反応によって合成した。合成 RNA は、変性条件下で 10%(w/v) 変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、切り出したゲルから溶出しエタノール沈殿させて水に溶出して-80°Cに保存したものを使用した。

#### 4. ゲルシフト解析

タンパク質と RNA の見かけの結合定数はゲルシフト解析により求めた。Gel shift Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、120 mM NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10%(v/v)グリセロール)において、METTL16 または変異体の希釈系列を用意し、1 nM の 5'-<sup>32</sup>P 標識 RNA (U6 snRNA、MAT2A\_hp1) と混和して室温で 10 分静置した。6% (w/v) 非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。<sup>32</sup>P 標識された RNA の位置と量を、BAS-5000 または FLA-3000 イメージャー (Fuji Film) を用いて測定した。また、ゲル上でシフトしたすべての RNA バンドを結合したものとして評価した。

#### 5. 免疫沈降

HEK293 細胞 (3.5cm dish) に、Lipofectamine® 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて、pCMV-METTL16\_FL および変異体をトランスフェクションした。37°Cの CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間培養した後、氷冷した RIP Buffer (10mM Tris-HCl pH7.4, 100mM NaCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100) に 0.1U/ $\mu$ L RNase Inhibitor, Recombinant (TOYOBO)、1 $\times$ cOmplete (Roche)、10mM DTT を添加したもので、細胞を 1.5mL チューブに回収した。3 回の凍結融解で細胞からタンパク質を抽出後、10000 $\times$ g で 5 min 遠心分離し、上清を回収してタンパク溶液とした。非吸着コーティング処理がされた 1.5mL チューブ (DNA LoBind Tubes, Eppendorf) に、500  $\mu$ L のタンパク溶液と抗 FLAG タグ抗体 磁気ビーズ (富士フィルム和光純薬) 50  $\mu$ L を入れて、4°Cに静置したローテーターを用い

て 4h 混和した。氷冷した RIP Buffer で 3 回洗浄した後、RNA 溶出用 (500  $\mu$ L) とタンパク質溶出用 (250  $\mu$ L) に分けてそれぞれ溶出した。RNA は ISOGEN II (ニッポンジーン) 200  $\mu$ L で溶出して精製した。タンパク質は 2 $\times$ SDS sample buffer 40  $\mu$ L を加えて 95 $^{\circ}$ C で加熱して溶出した。標的 RNA に特異的な qPCR 用プライマーと One Step TB Green<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて、FLAG-METTTL16 および変異体と共沈した標的 RNA を定量した。また、qPCR 用のプライマーの設計には、ウェブ上で公開されている Primer3Plus を利用した。

## 6. m<sup>6</sup>AIP-RT-qPCR

HEK293 細胞 (10cm dish) に、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Stealth RNAi<sup>™</sup> siRNA for METTTL16 (HSS149088, HSS149090) をトランスフェクションした。37 $^{\circ}$ C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間培養した後、再度 siRNA をトランスフェクションした。さらに、37 $^{\circ}$ C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間培養した後、Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて、pCMV-METTTL16\_FL および変異体をトランスフェクションした。氷冷した PBS buffer 2mL で懸濁して細胞を回収し、NucleoSpin RNA (TaKaRa) を 10cm dish 当たり 2 本のカラムを用いて、RNA を抽出かつ精製した。精製した total RNA 20  $\mu$ g に、RNA fragmentation buffer (10mM Tris-HCl pH7.0, 10mM ZnCl<sub>2</sub>) を添加し、70 $^{\circ}$ C で 5min 加熱した。氷上に移して RNA free water で 100  $\mu$ L にメスアップし、グリコーゲン 6  $\mu$ g、3M KoAc 10  $\mu$ L、100% EtOH 300  $\mu$ L を添加し、ボルテックスで十分に混和して -80 $^{\circ}$ C で一晩静置した後に精製した。免疫沈降には、m<sup>6</sup>A 抗体 (202 003, Synaptic Systems) と Rabbit IgG, monoclonal [EPR25A] - Isotype Control (abcam) を使用した。氷冷した IP buffer (10mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% IGEPAL CA-630) を、1.5mL の DNA LoBind Tubes (Eppendorf) に入れて、上記の抗体 2.5  $\mu$ L と Dynabeads<sup>™</sup> Protein G (Thermo Fisher Scientific) 7.5  $\mu$ L を添加

し、4°Cに静置したローテーターを用いて一晩混和した。断片化して精製した RNA 全量と RNase Inhibitor, Recombinant (TOYOBO) を 80U 添加して、4°Cに静置したローテーターを用いて一晩混和した。氷冷した IP buffer 500  $\mu$ L で 2 回洗浄した後に、新しい 1.5mL の DNA LoBind Tubes に移した。m<sup>6</sup>A elution buffer (20mM m<sup>6</sup>A, 0.1U/ $\mu$ L RNase Inhibitor, Recombinant in IP buffer) 100  $\mu$ L を入れて、4°Cに静置したボルテックスミキサーを用いて溶出した。標的 RNA に特異的な qPCR 用プライマーと One Step TB Green<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて標的 RNA を定量した。また、qPCR 用のプライマーの設計には、ウェブ上で公開されている Primer3Plus を利用した。

## 7. 本研究で使用した遺伝子・RNA 基質・プライマーの配列

### METTL16\_FL

```
ATGGCCCTGAGCAAAGCATGCATGCCCCGTAACCGCTACAAAGATAAGCCGCCGGACT
TCGCATATCTGGCCAGCAAATACCCGGACTTCAAACAGCACGTTTCAGATCAACCTGAA
CGGCCGTGTGAGCCTGAATTTCAAAGACCCGGAGGCAGTTCGTGCCCTGACCTGCAC
CCTGCTGCGTGAGGACTTTGGCCTGAGCATCGATATTCCTCTGGAGCGCCTGATCCCGA
CCGTGCCTCTGCGTCTGAACTATATCCATTGGGTGGAGGATCTGATCGGCCATCAGGAT
AGCGATAAAAGTACCCTGCGCCGCGGTATTGACATTGGTACCGGCGCAAGCTGCATCT
ATCCGCTGCTGGGCGCCACCCTGAATGGTTGGTACTTTCTGGCCACCGAAGTGGACGA
CATGTGTTTCAACTATGCCAAAAGAATGTTGAACAGAACAACCTGAGTGATTTAATTA
AGGTGGTGAAGGTTCCCTCAGAAGACCCTGCTGATGGATGCCCTGAAAGAAGAAAGCG
AAATTATTTATGATTTCTGTATGTGTAATCCGCCGTTCTTCGCCAATCAGCTGGAGGCCA
AGGGCGTTAATAGCCGCAACCCGCGTCGCCCCCCCCCTAGCAGTGTGAATACCGGCGG
TATCACCGAGATTATGGCAGAAGGTGGCGAGCTGGAGTTTGTGAAACGCATCATTCAT
GATAGCTTACAATTAAGAAGCGCCTGCGTTGGTACAGTTGCATGCTGGGCAAAAAT
GTAGCCTGGCCCCGCTGAAGGAAGAACTGCGCATCCAGGGTGTGCCGAAAGTTACCT
ACACAGAGTTTTGCCAAGGCCGCACCATGCGCTGGGCACTGGCATGGAGCTTTTATGA
CGATGTGACAGTGCCGAGCCCCCTAGCAAACGCCGAAACTGGAAAAGCCGCGCAA
ACCGATCACCTTTGTTGTGCTGGCCAGTGTGATGAAGGAGCTGAGTCTGAAGGCCAGC
CCGTTACGCAGCGAAACCGCAGAAGGCATTGTTGTTGTTACCACCTGGATTGAGAAA
```

TTCTGACCGATCTGAAGGTGCAGCACAAACGCGTGCCGTGCGGCAAAGAAGAAGTGA  
GCCTGTTTCTGACCGCCATCGAGAACAGCTGGATTCAATTTACGCCGCAAGAAACGTGA  
ACGCGTTCGTCAGCTGCGTGAAGTTCCTCGCGCACCGGAGGATGTGATTCAGGCCTTA  
GAGGAGAAAAAGCCGACCCCGAAAGAGAGCGGTAATAGCCAGGAACTGGCACGTGG  
TCCGCAGGAACGCACCCCTTGTGGTCCGGCCTTACGTGAAGGCGAAGCCGCCGAGT  
TGAGGGTCCGTGTCCTAGCCAGGAGTCTTTAAGCCAGGAAGAAAACCCGGAGCCGAC  
CGAAGATGAACGCAGCGAAGAGAAGGGTGGTGTGAGGTGCTGGAAAGTTGTCAGG  
GTAGCAGTAACGGTGCCAGGACCAGGAAGCAAGCGAACAGTTTGGCAGCCCGGTG  
GCCGAACGCGGTAAACGTCTGCCGGGCGTTGCCGGTCAGTACCTGTTCAAGTGCCTG  
ATCAACGTGAAGAAAGAGGTTGACGATGCCCTGGTTGAAATGCACTGGGTGGAAGGT  
CAGAACC GCGACCTGATGAATCAGCTGTGCACCTACATCCGCAATCAGATCTTCCGCC  
TGGTTGCAGTTAATTA

**RNA substrate**

|            |   |
|------------|---|
| U6 snRNA   | GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUUAUCUAAAAUUGGAACGAUACAGA<br>GAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGACACGCAAAUUCGUG<br>AAGCGUCCAUAUUUU |
| U6 Δ5'SL   | GAAAAUUGGAACGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAA<br>GGAUGACACGCAAAUUCGUGAAGCGUCCAUAUUUU                              |
| U6 ΔTS1    | GGAACGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGAC<br>ACGCAAAUUCGUGAAGCGUCC  |
| U6 ΔTS2    | GGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGACACGC<br>AAAUUCGUGAAGCC   |
| U6 ΔTS3    | GGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGACACGC<br>AAAUUCGU   |
| U6 TSmt    | GAAAAUUGGAACGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAA<br>GGAUGACACGCAAAUUCGUGAAGAACC AAAUAUUUU                            |
| U6 ΔISL    | GGAUACAGAGAAGAUUCGUCGUGAAGCC  |
| MAT2A_ hp1 | GGGCCUUUUUCCCCAGACUUGUUGGCGUAGGCUACAGAGAAGCC<br>UUCAAGCUCUGAGGGAAAGGGC  |

**DNA primer**

|                               |                                      |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| hMETTL16_5ter_NdeI_Fw         | TTTTTTTTCATATGGCCCTGAGCAAAGCATG<br>C |
| hMETTL16_3ter_nonstop_XhoI_Rv | TTTCTCGAGATTA ACTGCAACCAGGCGGAA      |

|   |   |
|---|---|
|   | GATC  |
| hMETTL16_toD291_nonstop_XhoI_Rv         | TTTTCTCGAGGTCATAAAAGCTCCATGCCAG<br>TGC  |
| hMETTL16_fromK310_NdeI_Fw               | TTTTTTTTTCATATGAAACCGATCACCTTTGTT<br>GTG                                      |
| hMETTL16_delP411P508_Fw                 | CCTTAGAGGAGAAAAAGGGCGTTGCCGGTC<br>AGTAC                                       |
| hMETTL16_delP411P508_Rv                 | GTACTGACCGGCAACGCCCTTTTTCTCCTCTA<br>AGG                                       |
| hMETTL16_3ter_nonsTop_XhoI_Rv_rv<br>C   | GATCTTCCGCCTGGTTGCAGTTAATCTCGA<br>GAAAA                                       |
| hMETTL16_toD291_nonstop_XhoI_Rv_r<br>vC | GCACTGGCATGGAGCTTTTATGACCTCGAGA<br>AAA  |
| AT101_U6RNA_1-26_del_F                  | GAAAATTGGAACGATACAG   |
| AT102_U6RNA_1-26_del_R                  | TATAGTGAGTCGTATTAG  |
| AT014_MAT2A_hp1_WT_F                    | TTTTGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGCC<br>TTTTTTCCCAGACTTGTTGGCGTAGGCTACA<br>GAGAAG |
| AT015_MAT2A_hp1_WT_R                    | TTTTAAGCTTGGATGTGAAGACTTGCCCTTTC<br>CCTCAGAGCTTGAAGGCTTCTCTGTAGCCTA<br>CGC    |
| AT016_M16_F370E_F                       | GTGAGCCTGGAAGTACCAGCCATCGAGAAC  |
| AT017_M16_F370E_R                       | GGCGGTCAGTCCAGGCTCACTTCTTCTTTG  |
| AT018_M16_L519E_F                       | TTCAAGTGCGAGATCAACGTGAAGAAAGAG  |
| AT019_M16_L519E_R                       | CACGTTGATCTCGCACTTGAACAGGTAAGT  |
| AT020_M16_delR382R388_F                 | GTTCGTCAGCTGCGTGAAG   |
| AT021_M16_delR382R388_R                 | TAAATGAATCCAGCTGTTCTCG  |
| AT022_M16_R552A_R557A_nstop_R           | TTTTCTCGAGATTAAGTCAACCAGCGCGAA<br>GATCTGATTCGCGATGTAGGTGCACAGCTG              |
| AT023_M16_K310A_F                       | AAGCCGCGCGCGCCGATCACCTTTGTTGTG  |
| AT024_M16_K310A_R                       | GGTGATCGGCGCGCGGCTTTTCCAGTTTG   |
| AT025_M16_R541A_F                       | GGTCAGAACGCGGACCTGATGAATCAGCTG  |
| AT026_M16_R541A_R                       | CATCAGGTCCGCGTTCTGACCTTCCACCCAG   |
| AT027_M16_Met_K310A_NdeI_F              | TTTTTTTTTCATATGGCGCCGATCACCTTTGTT<br>GTG                                      |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| AT032_M16_W378AH380A_F2   | AACAGCGCAATTGCATTACGCCGCAAGAAAC<br>GTG      |
| AT033_M16_W378AH380A_R2   | GCGTAATGCAATTGCGCTGTTCTCGATGGCG<br>GTC      |
| AT034_M16_K517A_F         | TACCTGTTCGCATGCCTGATCAACGTGAAG              |
| AT035_M16_K517A_R         | GATCAGGCATGCGAACAGGTACTGACCGGC              |
| AT036_M16_H534A_F         | GTTGAAATGGCATGGGTGGAAGGTCAGAAC              |
| AT037_M16_H534A_R         | TTCCACCCATGCCATTTCAACCAGGGCATC              |
| AT047_M16_d2_F_EcoRI      | TTTTTTGAATTCGCCCTGAGCAAAGCATGC              |
| AT048_M16_d562stop_R_XhoI | TTTTTTCTCGAGTTAATTAAGTCAACCAGGC<br>GGAAG    |
| AT049_M16_d291stop_R_XhoI | TTTTTTCTCGAGTTAGTCATAAAAGCTCCATG<br>CCAG    |
| AT050_M16_d292_F_EcoRI    | TTTTTTGAATTCGATGTGACAGTGCCGAGC              |
| AT052_M16_d313stop_R_XhoI | TTTTTTCTCGAGTTAGGTGATCGGTTTGC<br>GCGCG<br>G |
| AT053_M16TUT1mix_F        | AAGCCGCGCAGTAGCCCGAGTAGCCTGCTG              |
| AT054_M16TUT1mix_R        | CGGGCTACTGCGCGGCTTTTCCAGTTTGCG              |
| AT055_U6GAA4648CUU_F      | TACAGACTTGATTAGCATGGCCCCTGC                 |
| AT056_U6GAA4648CUU_R      | CTAATCAAGTCTGTATCGTTCCAATTTTAG              |
| AT057_U6G88C_F            | CAAATTCCTGAAGCGTTCCATATTTTTTG               |
| AT058_U6G88C_R            | CGCTTCAGGAATTTGCGTGTCATCCTTGC               |
| AT059_U6U89A_F            | AAATTCGAGAAGCGTTCCATATTTTTTG                |
| AT060_U6U89A_R            | ACGCTTCTCGAATTTGCGTGTCATCCTTGC              |

#### qPCR primer

|                    |                       |
|--------------------|-----------------------|
| U6_qPCRprimer_F    | CTCGCTTCGGCAGCACA     |
| U6_qPCRprimer_R    | AACGCTTCACGAATTTGCGT  |
| U2_qPCRprimer_F    | TTCTCGGCCTTTTGGCTAAG  |
| U2_qPCRprimer_R    | CTCCCTGCTCCAAAATCCA   |
| EEF1A_qPCRprimer_F | CGGTCTCAGAACTGTTTGTTC |
| EEF1A_qPCRprimer_R | AAACCAAAGTGGTCCACAAA  |

## 第四章 結果

### 1. METTL16 の m<sup>6</sup>A 修飾活性評価系の確立

METTL16 のメチル化活性を評価するため、試験管内で METTL16 による U6 snRNA のメチル化反応を試みた。この時、放射性標識した SAM を利用して酵素活性を定量しようとしたが、METTL16 によるメチル化活性を定量可能な実測値が得られなかった。METTL16 は、MAT2A mRNA の 3'UTR の m<sup>6</sup>A 修飾を介して、細胞内の SAM 濃度を調節するはたらきが報告されている(36,40)。METTL16 は、SAM 濃度が高い時には MAT2A mRNA を m<sup>6</sup>A 修飾して MAT2A (SAM 合成酵素) の発現を低下させ、逆に SAM 濃度が低い時には MAT2A mRNA に相互作用し、m<sup>6</sup>A 修飾を行わずに mRNA 上に滞留して、スプライシングを誘導すると考えられる。この仮説が正しいとすれば、METTL16 は他のメチル化酵素に比べて単位時間当たりの m<sup>6</sup>A 修飾活性が小さい特徴を利用し、細胞内のメチル化反応に適した SAM ホメオスタシスを維持すると推測される。以上のことから、METTL16 の m<sup>6</sup>A 修飾機構を詳細に解析するには、メチル化活性を定量するための新たな実験系の樹立が必要と考えた。

本研究では、Promega 社の MTase-Glo™ Methyltransferase Assay を基にして、メチル化活性定量系を構築した。MTase-Glo システムでは、メチル化反応の結果としての副産物である SAH (S-adenosylhomocysteine) を発光として定量する。METTL16 を含めた多くの RNA のメチル化酵素は、メチル基ドナーである SAM と結合した状態で標的 RNA を認識してメチル基転位反応を触媒する(66)。したがって、METTL16 による RNA の m<sup>6</sup>A メチル化機構について、RNA の認識様式に着目した解析を行うためには、十分な SAM が反応液中に存在する条件を設定する必要があると考えた。

ミカエリス・メンテンの式における Km 値は、小さい場合は酵素と基質の親和性が高く、逆に大きい場合は酵素と基質の親和性が低いことを意味する。METTL16 の SAM に対する見かけの Km 値を求めるために、SAM の希釈系列を用意して METTL16 の全長 (METTL16\_FL: 残基 1-562) による U6 snRNA のメチル化活性を定量した。その結果、

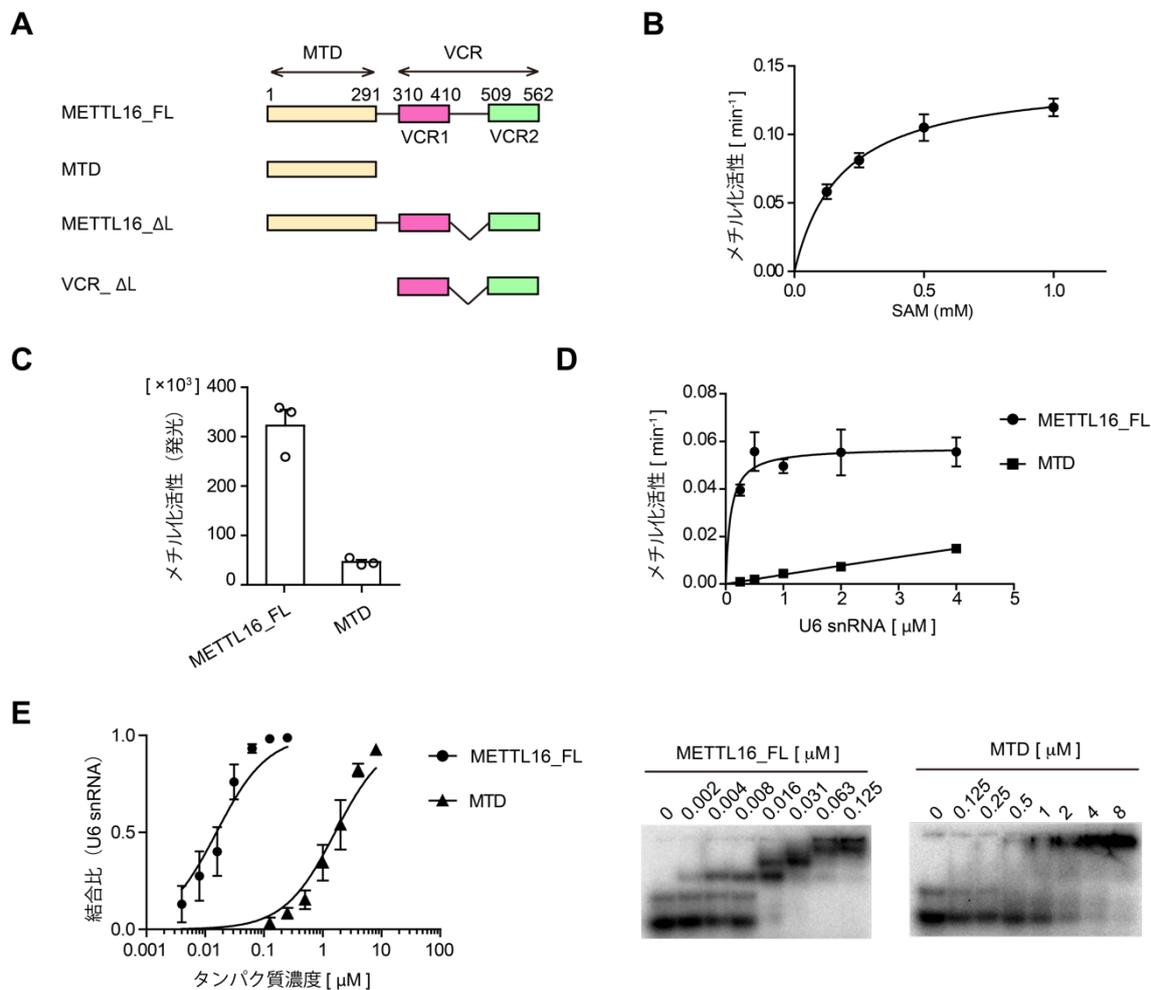
METTL16 の SAM に対する見かけの  $K_m$  値は  $182 \mu M$  であることが明らかになった (Fig.2B)。よって、本研究での試験管内における METTL16 のメチル化活性の定量は、SAM 1mM の条件で行うことにした。

## 2. METTL16 の VCR は U6 snRNA の $m^6A$ 修飾を促進する

METTL16 の VCR の  $m^6A$  修飾活性への効果を評価するために、組換え全長ヒト METTL16(METTL16\_FL:残基 1-562)と、METTL16 のメチル基転移活性ドメイン(MTD:残基 1-291) の精製タンパク質を用意し、試験管内で U6 snRNA に対するメチル化活性をそれぞれ定量した (Fig.2A)。その結果、METTL16\_FL は MTD よりも効率的に U6 snRNA ( $1 \mu M$ ) をメチル化することが示された (Fig.2C)。METTL16 による U6 snRNA の  $m^6A$  修飾機構を詳細に解析するため、U6 snRNA の希釈系列を用意してメチル化活性を定量した。その結果、METTL16\_FL と U6 snRNA の  $K_m$  値は、MTD と U6 snRNA に比べると、 $K_m$  値が 2 桁小さいという結果が得られた (Fig.2D)。また、METTL16\_FL と U6 snRNA および MTD と U6 snRNA 間の親和性を比較するため、ゲルシフト解析を実施した。その結果、METTL16\_FL の U6 snRNA に対する  $K_d$  値は  $0.016 \pm 0.002 \mu M$  であり、MTD の U6 snRNA に対する  $K_d$  値が  $1.6 \pm 0.2 \mu M$  であった (Fig.2E)。よって、METTL16\_FL と U6 snRNA 間の相互作用は、MTD と U6 snRNA に比べて非常に強いことが示された。以上より、METTL16 の VCR は、U6 snRNA の認識に寄与して  $m^6A$  修飾を促進する機能をもつことが明らかになった。

## 3. METTL16 の VCR の構造決定

METTL16 の VCR がどのような分子機構で U6 snRNA の  $m^6A$  修飾を促進するか明らかにするため、METTL16 の VCR の結晶構造の決定を試みた。具体的には、METTL16 の VCR1 と VCR2 の間の領域 (411-508) は、種間の保存性が見られず機能的に重要ではない



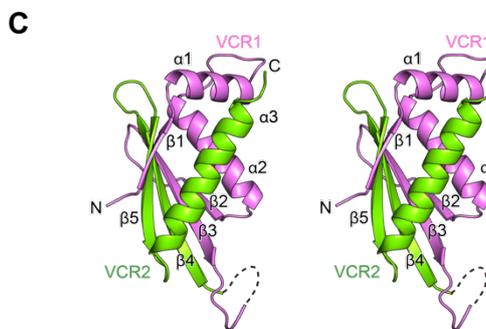
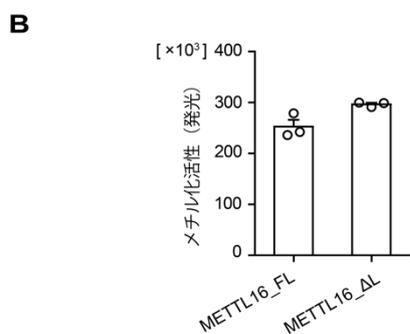
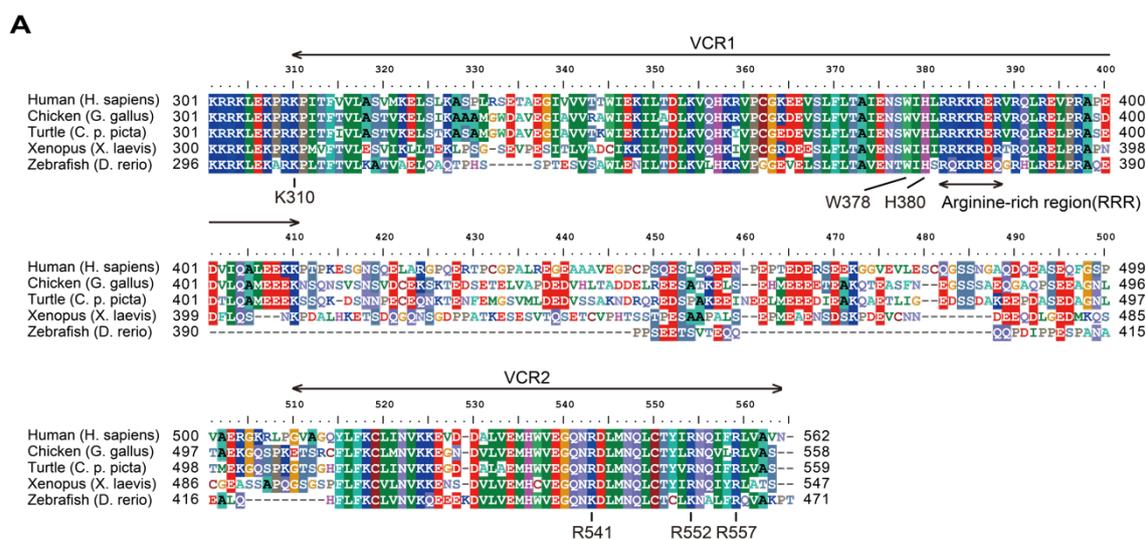
**Figure 2. METTL16 の VCR は U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾を促進する**

(A) METTL16 (human) のドメイン構成。METTL16 の全長 (1-562)、メチル基転移活性ドメイン MTD (1-291)、脊椎動物保存領域 VCR (310-562)。VCR は、VCR1 と VCR2 の 2 つの領域から構成され、種間保存性が見られないリンカー領域 (411-508) を間に含む。

(B) METTL16\_FL による U6 snRNA のメチル化活性の定常状態解析。(C) METTL16\_FL および MTD による U6 snRNA のメチル化活性 (U6 snRNA 1 μM) (D) METTL16\_FL および MTD による U6 snRNA のメチル化活性の定常状態解析。(E) METTL16\_FL (0-0.125 μM) および MTD (0-8 μM) と U6 snRNA のゲルシフト解析。(B-E) それぞれ独立した実験を少なくとも 3 回以上行った。

と考え、該当部分を除いた欠失変異体も設計し、METTL\_FL (1-562)、METTL16\_ΔL (1-410, 509-562)、VCR (310-562)、VCR\_ΔL (310-410, 509-562)の結晶化を試みた (Fig.2A, 3A)。METTL16\_ΔLのU6 snRNAに対するメチル化活性は、METTL16\_FLと同程度であることから、VCR1とVCR2の間の領域(411-508)を除いても、VCRによるRNAのm<sup>6</sup>A修飾促進機構の解析には問題ないと考えた (Fig.3B)。その結果、VCR\_ΔLの結晶化に成功し構造を決定した。初期位相は、VCR\_ΔLのセレノメチオニン誘導体結晶を用いて、単一波長異常分散(SAD)法により決定した。結晶空間群はR32、非対称単位に1つのVCR\_ΔL分子を含んでいた。2.8Åまでの分解能の反射データを使用し、モデル構造を構築・改良して結晶構造を決定した (Fig.3C, Table.1)。VCR\_ΔLは、3つのα-helix (α1-α3)とβ-sheet (β1-β5)から構成されている。結晶化のために除いたVCR1とVCR2の間の領域(411-508)は、β3とβ4の間にあり、VCR1とVCR2は単一のドメインであることが明らかになった。また、領域(382-410)については、明確な電子密度が見られず、モデル構造の構築はできなかった。

METTL3はMETTL14とヘテロダイマーを形成することで、標的RNA配列を認識してm<sup>6</sup>A修飾する。よって、METTL16も同様にダイマーを形成し、RNAをm<sup>6</sup>A修飾することが可能性が考えられる。興味深いことに、VCR\_ΔLは結晶構造中で疎水性表面を合わせることでホモダイマーを形成しているように見受けられた (Fig.4A)。そこで、METTL16\_FL、MTD、VCRをそれぞれのゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、分子量マーカーを基に分画位置から分子量を計算したところ、METTL16\_FLとVCRが本来の分子量より大きい値が算出された (Fig.4B)。よって、METTL16\_FLおよびVCRは水溶液中でダイマーとして存在している可能性が考えられる。ここで、VCR\_ΔLの結晶構造から、F370とL519が疎水性表面の中心に位置してダイマー形成に寄与していると考えた。そこで、F370とL519それぞれグルタミン酸残基に置換したMETTL16の変異体 (F370E/L519E)を作成した。疎水性残基であるフェニルアラニンとロイシンを、親水性残基であるグルタミン酸に変異



**Figure 3. METTL16 の VCR の結晶構造の決定**

(A) METTL16 の脊椎動物における種間保存性。(B) METTL16\_FL および METTL16\_ΔL による U6 snRNA のメチル化活性 (U6 snRNA 1 μM)。独立した実験を少なくとも 3 回以上行った。(C) VCR\_ΔL の結晶構造 (平行法)。モデル化した立体構造は、アミノ酸番号 310~381 と 513~562 を含む。VCR1 は紫、VCR2 は緑に着色した。

Table 1. Data collection and refinement statistics

|   | SeMet-VCRΔL        | Native- VCRΔL      |
|---|--------------------|--------------------|
| <b>Data collection</b>                                  |                    |                    |
| Space group   | <i>R</i> 32        | <i>R</i> 32        |
| Cell dimensions   |                    |                    |
| <i>a, b, c</i> (Å)                                      | 139.59             | 139.61             |
|   | 139.59             | 139.61             |
|   | 53.31              | 53.13              |
| $\alpha, \beta, \gamma$ (°)                             | 90, 90, 120        | 90, 90, 120        |
| Wavelength (Å)  | 0.97800            | 0.98000            |
| Resolution (Å)*   | 50-3.0 (3.11-3.00) | 50-2.8 (2.89-2.79) |
| <i>R</i> <sub>sym</sub> *                               | 0.332 (2.973)      | 0.305 (4.265)      |
| <i>I</i> / $\sigma I$ *                                 | 14.8 (1.9)         | 14.9 (1.1)         |
| <i>CC</i> <sub>1/2</sub> *                              | 0.998 (0.684)      | 0.999 (0.523)      |
| Completeness (%)*                                       | 100.0 (100.0)      | 99.8 (98.4)        |
| Redundancy*   | 40.6 (42.2)        | 40.9 (41.6)        |
| <b>Phasing</b>  |                    |                    |
| Se sites  | 3                  |                    |
| Mean FOM  | 0.378              |                    |
| <b>Refinement</b>                                       |                    |                    |
| Resolution (Å)  |                    | 50-2.8             |
| No. reflections   |                    | 5013               |
| <i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%) |                    | 23.36/26.31        |
| No. atoms   |                    |                    |
| Protein   |                    | 122                |
| <i>B</i> -factors (Å <sup>2</sup> )                     |                    |                    |
| Protein   |                    | 85.4               |
| R.m.s. deviations                                       |                    |                    |
| Bond lengths (Å)  |                    | 0.012              |
| Bond angles (°)   |                    | 1.44               |
| Ramachandran  |                    |                    |
| Preferred (%)   |                    | 92.4               |
| Allowed (%)   |                    | 7.6                |
| Outliers (%)  |                    | 0                  |

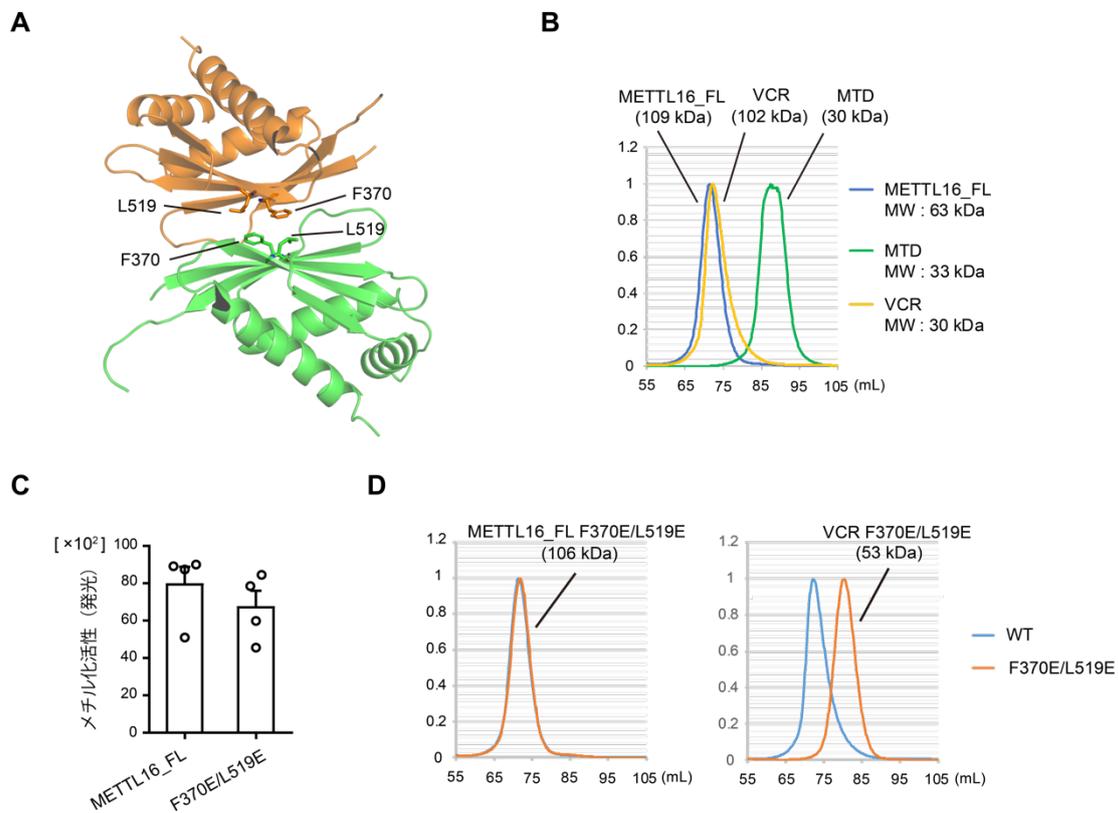
\*Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

させると、ダイマー形成を阻害できると想定した。METTL16\_FL (F370E/L519E) の U6 snRNA (1  $\mu$ M) に対するメチル化活性を定量したところ、METTL16\_FL と比べて大きな差は見られなかった (Fig.4C)。また、METTL16\_FL (F370E/L519E) をゲル濾過クロマトグラフィーで分画したところ、METTL16\_FL の野生型とほとんど同じ位置で分画された (Fig.4D)。一方で、VCR (F370E/L519E) をゲル濾過クロマトグラフィーで分画すると、VCR の野生型と比べておよそ半分程度の分子量の位置に分画された (Fig.4D)。よって、VCR は水溶液中でダイマーを形成していると考えられる。しかし、METTL16\_FL は、F370E/L519E の変異を導入しても、ゲル濾過クロマトグラフィーの分画位置およびメチル化活性に影響はなかった。以上より、METTL16 は VCR の疎水性表面を用いてダイマーを形成する特性を内包はしているが、実際に細胞内で機能する際にはモノマーとして標的 RNA を m<sup>6</sup>A 修飾すると考えられる。

#### 4. METTL16 の VCR は TUT1 の KA-1 によって機能的に代替可能である

METTL16 の VCR のアミノ酸配列は、既知の機能を持つ他のタンパク質に類似したものは見られなかった。しかし、Dali サーバーにおける構造情報を基にした相同検索により (67)、VCR\_ΔL の構造は、U6 snRNA 特異的 3'末端ウリジルトランスフェラーゼ 1 (TUT1) の KA1 ドメインの構造に似ていることが明らかになった [Z-score of 8.2] (Fig.5A-D)。TUT1 の C 末端に存在する KA1 は、RNA 結合ドメインであり、U6 snRNA の成熟と代謝に関与する 3'末端のオリゴウリジル化を促進することが報告されている (68)。

TUT1 の KA1 ドメインと METTL16 の VCR の機能の互換性を調べるため、METTL16 の N 末端 MTD と TUT1 の C 末端 KA1 (MTD + KA1\_wt) からなるキメラ酵素を設計した (Fig.6A)。実際に、U6 snRNA に対するメチル化活性を検証してみたところ、MTD + KA1\_wt は MTD よりも効率的に U6 snRNA をメチル化する結果が得られた (Fig.6B)。さらに、KA1 の変異体 (R779A/R783A) を含むキメラ酵素 (MTD + KA1\_mt) を設計した



**Figure 4. METTL16 の VCR によるダイマー形成の検証**

(A) VCR\_ΔL の結晶構造中のダイマー形成。(B) METTL16\_FL (1-562)、MTD (1-291)、VCR (310-562) のゲルクロマトグラフィー。(C) METTL16\_FL と F370E/L519E 変異体の U6 snRNA (50nM) に対するメチル化活性。独立した実験を少なくとも 3 回以上行った。

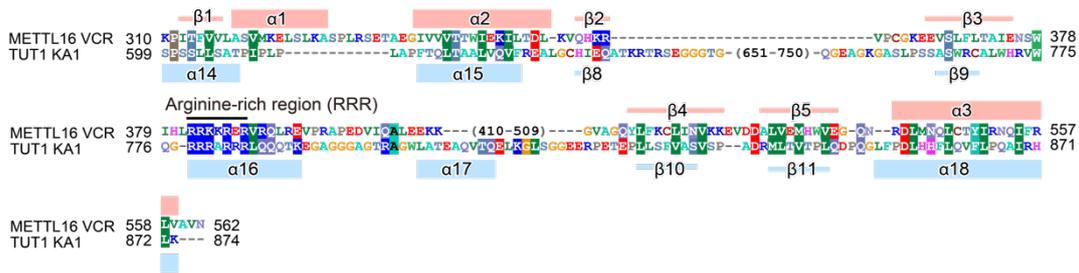
(D) METTL16\_FL (1-562) および VCR (310-562) の F370E/L519E 変異体のゲルクロマトグラフィー。

**A**

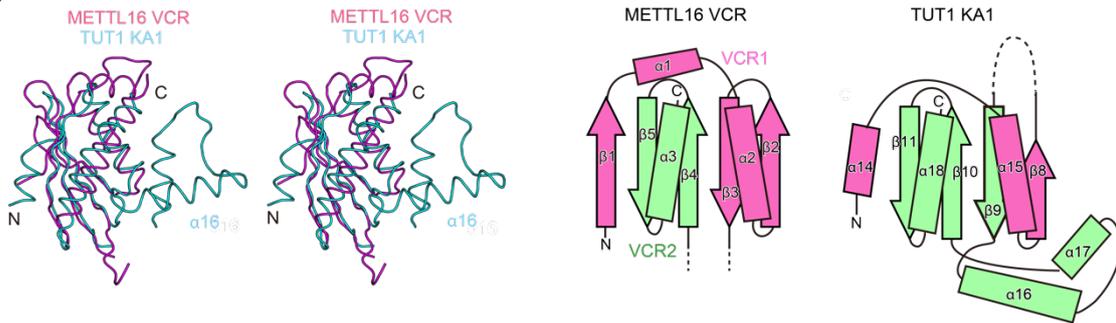
**PDB25 search results from Dali server**

| No. | Z    | %id | Domain      | Gene  |
|-----|------|-----|-------------|---|
| 1   | 11.8 | 11  | KA-1 domain | SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE CHK1                  |
| 2   | 10.8 | 11  | KA-1 domain | SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE BRK1                  |
| 3   | 9.8  | 13  | KA-1 domain | SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE KCC4                  |
| 4   | 8.9  | 15  | KA-1 domain | MAP/MICROTUBULE AFFINITY-REGULATING KINASE 3          |
| 5   | 8.2  | 12  | KA-1 domain | U6 SNRNA-SPECIFIC TERMINAL URIDYLTRANSFERASE 1 (TUT1) |
| ⋮   | ⋮    | ⋮   | ⋮           | ⋮   |

**B**



**C**

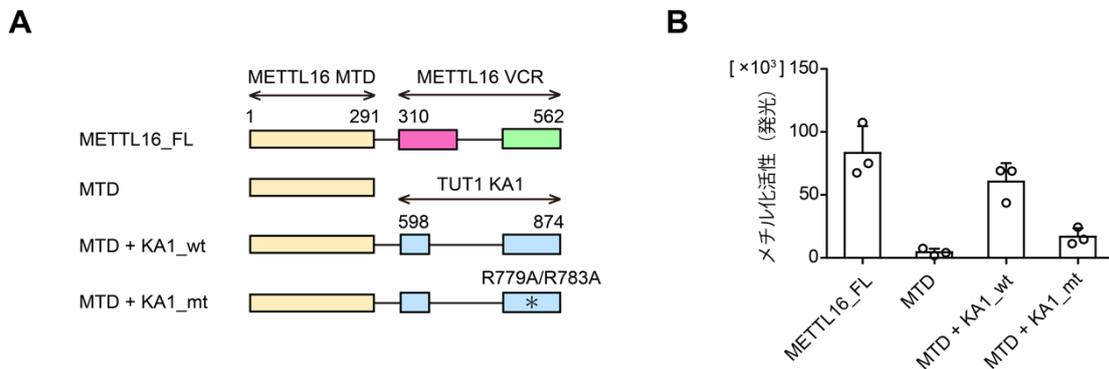


**Figure 5. METTL16 の VCR と TUT1 の KA1 の構造**

(A) Dali サーバーによる立体構造に基づいた相同性検索の結果。(B) METTL16 (human) の VCR と TUT1 (human) の KA1 ドメインの配列のアライメント。VCR と KA1 ドメインの二次構造は、アラインメントの上と下に表記した。(C) METTL16 の VCR (紫) と TUT1 の KA1 ドメイン (青) の結晶構造の重ね合わせ (平行法)。METTL16 の VCR (左) と TUT1 の KA1 ドメイン (右) の比較。N 末端側を桃色、C 末端側を緑色に着色した。

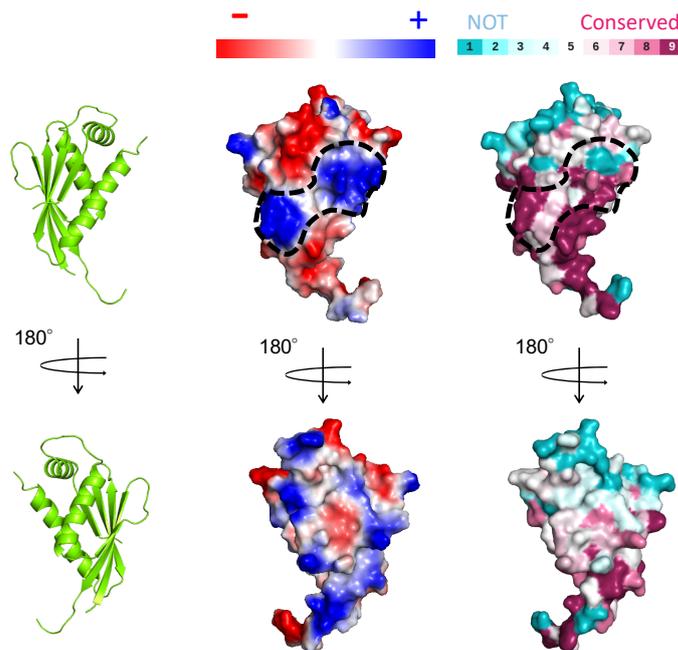
(Fig.6A)。TUT1 の R779A / R783A 変異は、KA1 の RNA 結合活性を低下させ、U6 snRNA に対する TUT1 のオリゴウリジル化活性を低下させることが報告されている(68)。この報告に一致して、MTD + KA1\_mt は、MTD + KA1\_wt に比べてメチル化活性が小さいという結果が得られた (Fig.6B)。以上の結果から、METTL16 の VCR と TUT1 の KA1 は、U6 snRNA の認識において同様の機能をもち、機能的に互換性があることが示唆された。

TUT1 の KA1 ドメインは、U6 snRNA のオリゴウリジル化を促進し、KA1 自体が RNA 結合活性を持つことが報告されている(68)。また、KA1 の  $\alpha$ -helix ( $\alpha 16$ ) は、RNA 結合に重要であることも示されている(68)。アミノ酸配列について立体構造をもとに比較したところ、METTL16 の VCR は、TUT1 の KA1 の RNA 結合能に重要である  $\alpha 16$  に相当する位置に、アルギニン残基に富む領域 (RRR: 382~388) を持つことを見出した (Fig.5B)。VCR の RRR は、 $\beta 3$  と  $\beta 4$  の間の VCR\_ $\Delta$  の結晶構造でモデル化できなかった領域に含まれる (Fig.5B)。しかし、METTL16 の VCR は、TUT1 の KA1 に機能的に置換することが可能であることから、VCR も RRR を介して U6 snRNA に結合して m<sup>6</sup>A 修飾を促進することは十分に考えられる。また、VCR\_ $\Delta$  の結晶構造の静電ポテンシャルを見ると、塩基性残基が集積している部位が確認できた (Fig.7)。また、ConSurf サーバー(69) を用いて VCR\_ $\Delta$ L のアミノ酸残基の種間保存性を結晶構造にマッピングして、VCR 中の m<sup>6</sup>A 修飾活性に寄与する候補残基を選出した (Fig.7)。



**Figure 6. METTL16 の VCR は TUT1 の KA1 と機能的に置換できる**

(A) キメラ酵素のドメイン構成。VCR (310-562) を KA1 (598-874) に置換した。(B) キメラ酵素による U6 snRNA のメチル化活性 (U6 snRNA 50nM)、それぞれ独立した実験を少なくとも 3 回以上行った。



**Figure 7. VCR\_ΔL の静電ポテンシャルとアミノ酸配列の種間保存性**

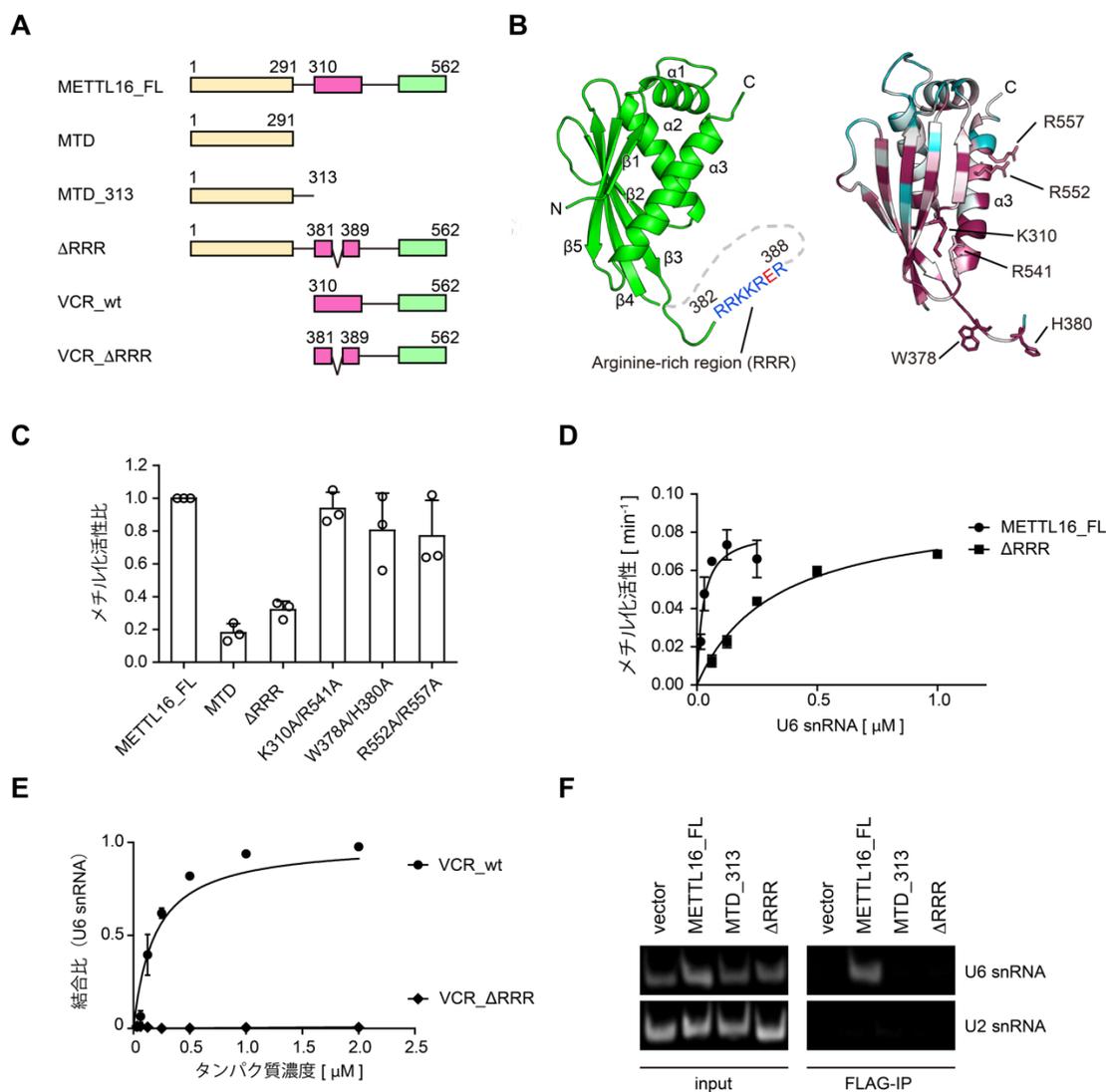
(左) VCR\_ΔL の結晶構造、(中央) VCR\_ΔL の静電ポテンシャル、青が正に帯電し、赤が負に帯電している部位、(右) VCR\_ΔL のアミノ酸配列の種間保存性、青が種間で保存が見られない残基、紫が種間で保存されている残基。

VCRのRNA結合能とm<sup>6</sup>A修飾活性の関係を調べるため、RRR除いた変異体(METTTL16\_ΔRRR)および、VCRの保存された残基のアラニン変異体(K310A/R541A、W378A/H380A、R552A/R557A)を作成し、それぞれのU6 snRNAに対するメチル化活性を定量した(Fig.8A, 8B)。その結果、METTTL16の各種アラニン変異体はMETTTL16\_FLと同程度のメチル化活性を示した(Fig.8C)。一方、METTTL16\_ΔRRRはMETTTL16\_FLと比べてメチル化活性が著しく低下した(Fig.8C)。さらに、METTTL16\_ΔRRRのU6 snRNAに対するK<sub>m</sub>値は0.32±0.05 μMであり、METTTL16\_FLの0.025±0.01 μMに比べると約10倍大きい(Fig.8D)。したがって、METTTL16はVCRのRRRを用いてU6 snRNAを認識し、m<sup>6</sup>A修飾を効率化することが明らかになった。

VCRのRNA結合活性を調べるため、VCR(野生型)とVCR\_ΔRRRの精製タンパク質を用意してゲルシフト解析を行った。その結果、VCRはU6 snRNAと結合したが、VCR\_ΔRRRはRNA結合活性が大きく低下した(Fig.8E)。よって、VCRはRRRを用いてU6 snRNAと相互作用すると考えられる。さらに、細胞抽出液を用いた免疫沈降実験においても、METTTL16はRRR依存的にU6 snRNAに結合した(Fig.8F)。以上より、METTTL16はRRRを用いてU6 snRNAと相互作用し、m<sup>6</sup>A修飾を促進することが明らかになった。

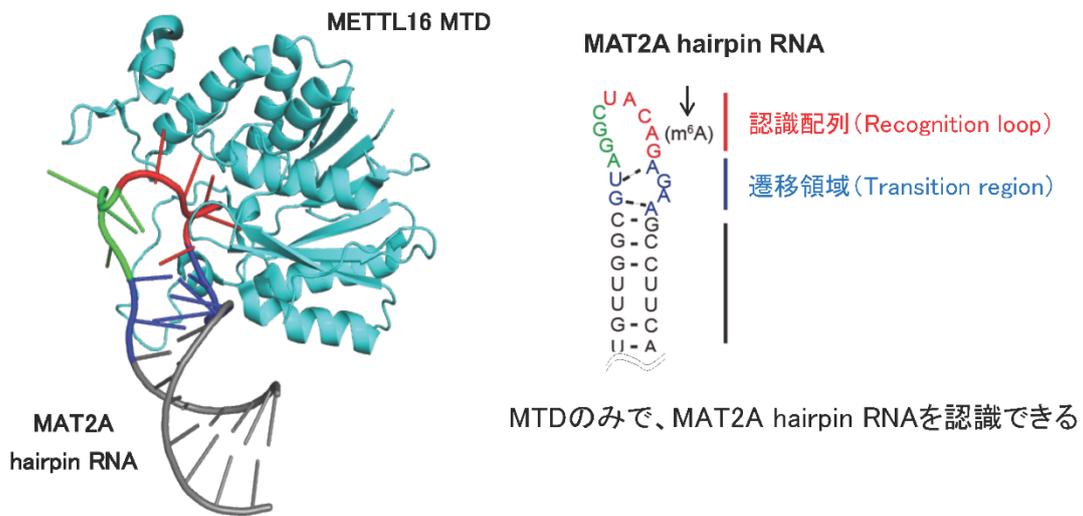
## 5. METTTL16によりm<sup>6</sup>A修飾されるRNA構造モデルの構築

METTTL16は、U6 snRNAやMAT2A mRNAの3'UTRの5'-UACAGAGAA-3'(下線がメチル化位置)をm<sup>6</sup>A修飾すると報告されている(40,55)。最新の研究で、METTTL16のMTDとMAT2A mRNAのm<sup>6</sup>A修飾部位(MAT2A\_hp1)の複合体結晶構造が決定された(41)。METTTL16と結合したMAT2A\_hp1は、m<sup>6</sup>A修飾されるアデニンを含む認識配列(Recognition loop)、遷移領域(Transition region)、ステム構造(Stem)から構成される。そして、METTTL16によるm<sup>6</sup>A修飾にはMAT2A hairpin RNAのAGAA-GU残基による特殊な塩基対である遷移領域の構造が必要と明らかにされている(41)(Fig.9)。



**Figure 8. VCR の RNA 結合活性は U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾を促進する**

(A) METTL16 の変異体の模式図 (B) METTL16 の VCR の種間で保存された残基は紫、保存されていない残基は青で表記。(C) METTL16 変異体による U6 snRNA のメチル化活性。METTL16\_FL 活性に対する相対値。ΔRRR (1-562 Δ382-388)。(D) METTL16\_FL と ΔRRR による U6 snRNA のメチル化活性の定常状態解析。(E) VCR\_wt (310-562) および VCR\_ΔRRR (310-562 Δ382-388) と U6 snRNA のゲルシフト解析。(F) 細胞抽出液を用いた METTL16 変異体と U6 snRNA の免疫沈降。(C-F) それぞれ独立した実験を少なくとも 3 回以上行った。



METTL16が標的RNAを認識するには遷移領域の構造が必要である

Figure 9. METTL16 の MTD と MAT2A hairpin RNA の複合体結晶構造

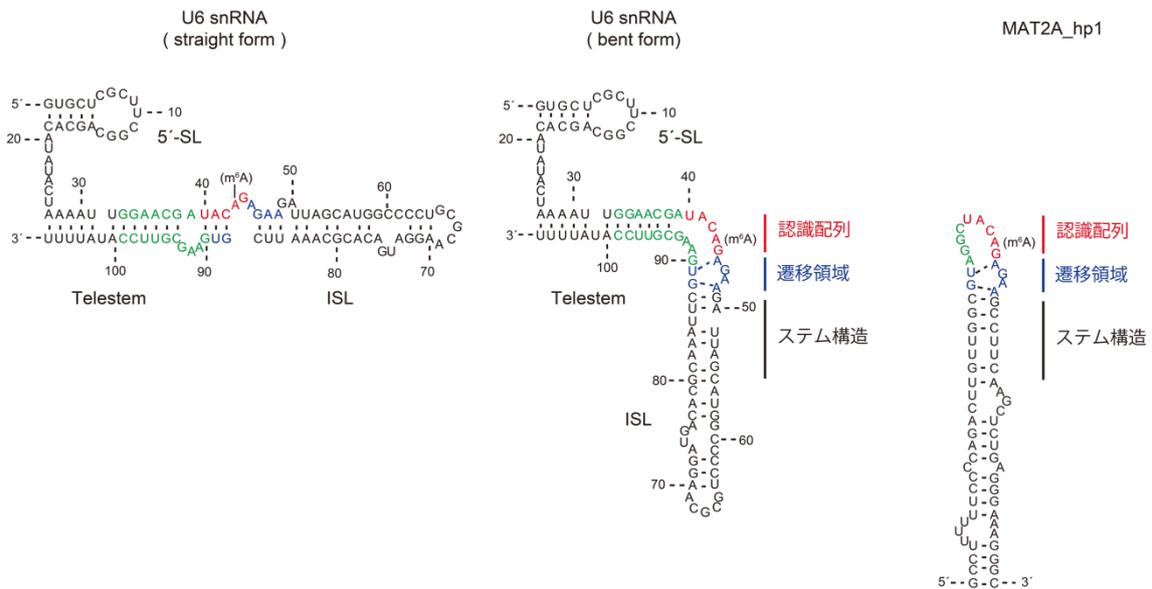


Figure 10. U6 snRNA の 2 次構造モデルの構築

(左) U6 snRNA の straight form、(中央) U6 snRNA の bent form、(右) METTL16 の MTD との複合体中の MAT2A\_hp1 の 2 次構造モデル

METTTL16 の VCR による U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾促進機構を明らかにするため、MTD との複合体結晶構造中の MAT2A hairpin RNA を参考に、METTTL16 から m<sup>6</sup>A 修飾される際の U6 snRNA の 2 次構造モデルを構築した。U6 snRNA が単独で存在するとき、U6 snRNA は telestem-bulge-ISL が直線的に配置した 2 次構造 (straight form) をとると考えられている (70) (Fig.10)。しかし、U6 snRNA はスプライシング反応の過程で構造を変えながら、多様な RNA やタンパク質と相互作用する特徴を持っている (71)。よって、U6 snRNA が MAT2A hairpin RNA と同様に遷移構造を形成し、METTTL16 による認識に適した構造をとるのではないかと考えた。本研究では、U6 snRNA が結晶構造中の MAT2A hairpin RNA に類似した RNA 構造をとると仮定し、METTTL16 の m<sup>6</sup>A 修飾反応における U6 snRNA の 2 次構造モデルの構築を試みた。その結果、U6 snRNA の塩基を telestem-bulge-ISL が折り曲がるように配置させると (U6 snRNA bent form)、MAT2A hairpin RNA と同様の遷移領域を形成できることを見出した (Fig.11A)。

U6 snRNA の bent form の妥当性を調べるために、遷移領域の形成に重要であると推測される残基の変異体を作成した。そして、METTTL16 による U6 snRNA の各種変異体に対するメチル化活性を定量したところ、GAA(46-48)CUU、G88C、U89A の変異は、METTTL16 によるメチル化効率を低下させた (Fig.11B)。先行研究で、MAT2A\_hp1 の遷移領域の変異は、METTTL16 によるメチル化効率を低下させることが示されている (40,41,72)。したがって、U6 snRNA は遷移領域を含む二次構造 (bent form) を形成することで、METTTL16 と相互作用して m<sup>6</sup>A 修飾を受けることが示唆された。

## 6. METTTL16 の VCR は U6 snRNA の ISL と相互作用する

METTTL16 の VCR は RNA 結合能依存的に U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾を促進する。また、METTTL16 が m<sup>6</sup>A 修飾する際には、U6 snRNA は m<sup>6</sup>A 修飾に適した構造に変化することも示唆された。先行研究で、TUT1 の KA1 は U6 snRNA の ISL (internal stem loop) に結合

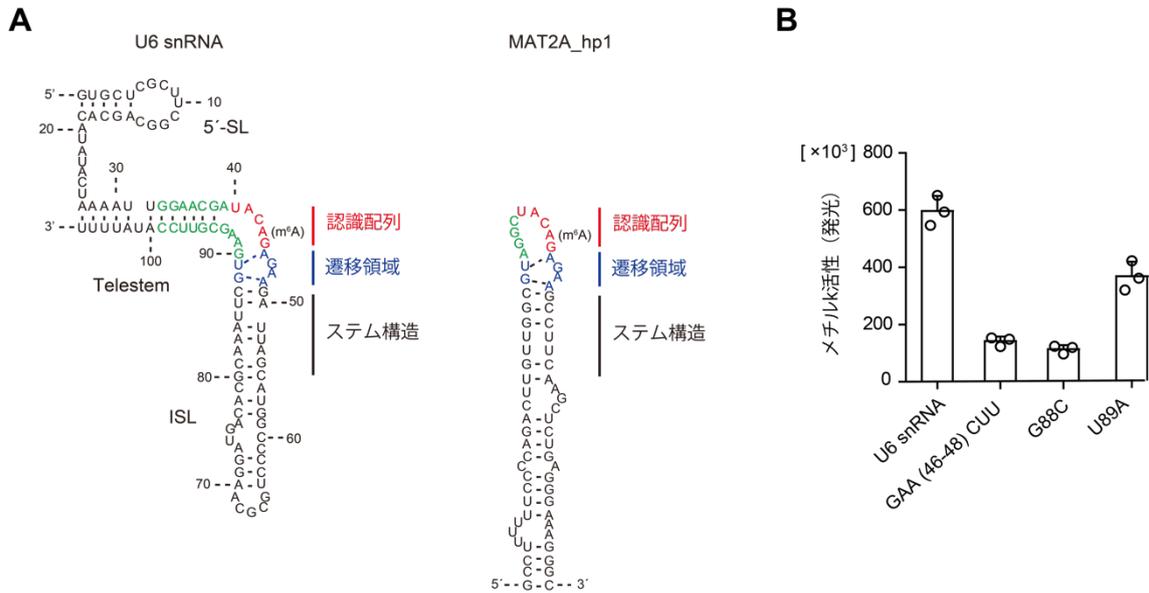


Figure 11. U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾には遷移領域が必要である

(A) 本研究で推定した U6 snRNA の二次構造モデルと MTD との複合体における MAT2A hairpin RNA (MAT2A\_hp1) の二次構造モデル。認識配列、遷移領域、ステム構造から構成される。(B) METTL16\_FL による遷移領域に変異がある U6 snRNA へのメチル活性 (U6 snRNA および変異体 1 μM)、それぞれ独立した実験を少なくとも 3 回以上行った。

し telestem と ISL の間の部位に構造変化を引き起こすことが明らかにされている(68)。METTL16により m<sup>6</sup>A 修飾される U6 snRNA の 43 位のアデニンは、TUT1 の KA1 が構造変化を引き起こす部位に位置する。したがって、METTL16 の VCR と TUT1 の KA1 が同様の様式で U6 snRNA に結合するのであれば、VCR も ISL に結合して m<sup>6</sup>A 修飾部位周辺に構造変化を引き起こす可能性が考えられる。

U6 snRNA 内の VCR 結合領域を特定するため、まず 5' short loop (5'SL) を欠失させた変異体 (U6snRNA\_Δ5'SL) を作成し、METTL16\_FL および MTD によるメチル化活性を定量した (Fig.12A)。その結果、U6snRNA\_Δ5'SL のメチル化は、U6 snRNA と同様に VCR を必要とする結果が得られた (Fig.12B)。よって、VCR は U6 snRNA の 5'SL と相互作用しないことが示唆された。次に、MAT2A mRNA の m<sup>6</sup>A 修飾部位 (MAT2A\_hp1) について、METTL16\_FL および MTD によるメチル化活性を解析した。反応液中に U6 snRNA が 1 μM の条件では、METTL16\_FL と MTD による MAT2A\_hp1 のメチル化効率に大きな差は見られなかった。しかし、MAT2A\_hp1 の希釈系列を用意して詳細に解析したところ、MAT2A\_hp1 の K<sub>m</sub> 値は、METTL16\_FL に対しては 0.027 ± 0.05 μM、MTD に対しては 0.76 ± 0.1 μM という結果が得られた (Fig.12C, 12D)。したがって、METTL16 の VCR は、U6 snRNA だけでなく MAT2A\_hp1 の認識も効率化し、m<sup>6</sup>A 修飾をする効率化することが明らかになった。

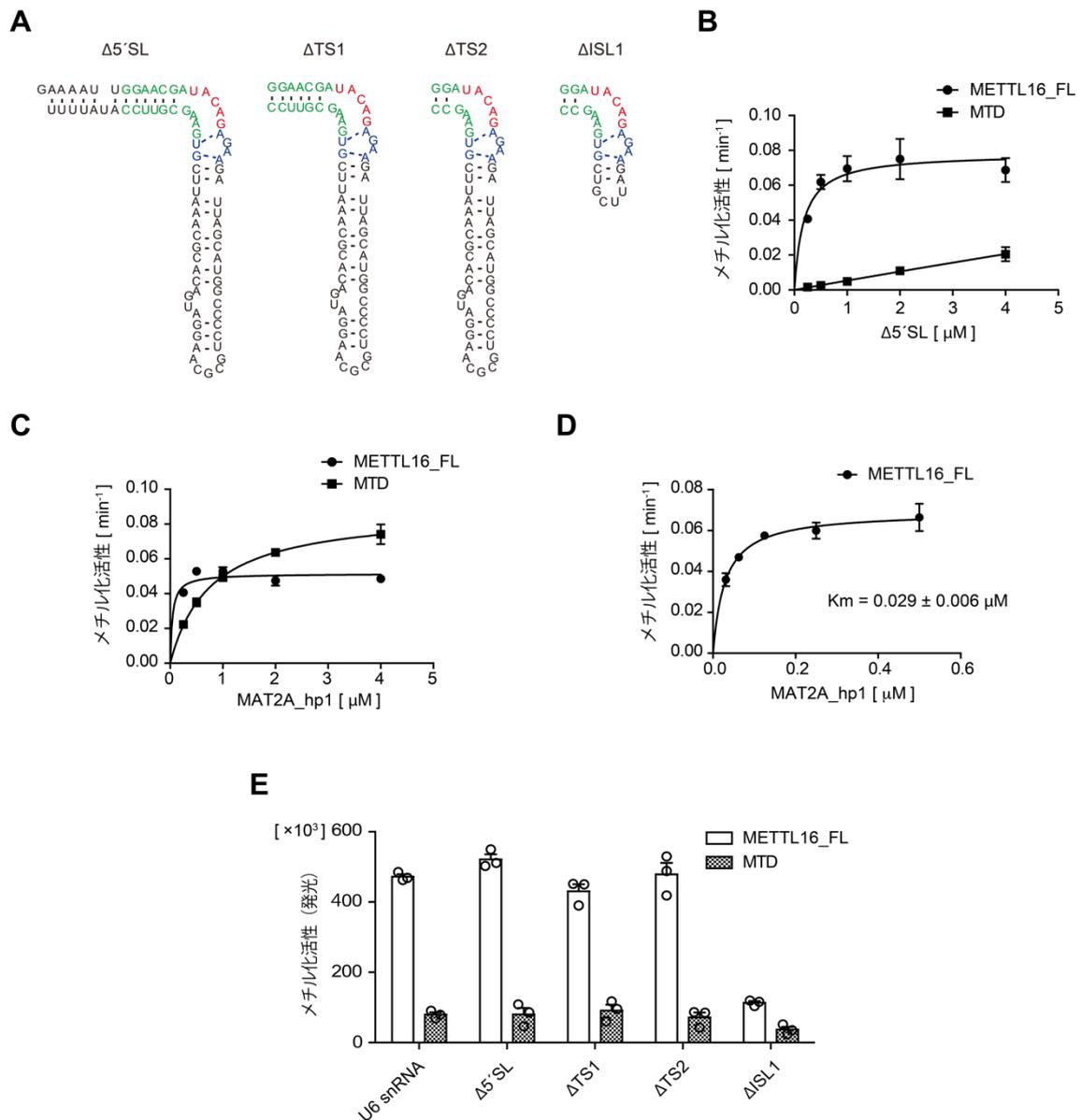
METTL16 の VCR は、METTL16 と RNA 基質の親和性を高めて、U6snRNA と MAT2A\_hp1 のメチル化を促進する。2つの RNA 基質の 2次構造モデルを並べて比較すると、U6 snRNA の telestem に相当する位置には、MAT2A では loop 構造が存在する (Fig.11A)。一方で、U6 snRNA の ISL に相当する位置には、MAT2A においてもステム構造が存在している (Fig.11A)。よって、METTL16 の VCR は、U6 snRNA の telestem ではなく ISL と相互作用することで、m<sup>6</sup>A 修飾を促進するのではないかと考えた。この仮説を検証するため、U6snRNA の各種変異体を作成し、METTL16\_FL と MTD によるメチル化活性を定量した

(Fig.12A)。その結果、METTL16\_FL は、MTD に比べると、telestem を短くした変異体 (U6snRNA\_ΔTS1、ΔTS2) を依然として効率的にメチル化した (Fig.12E)。しかし、ISL を短くした変異体 (U6snRNA\_ΔISL) に対しては、METTL16\_FL によるメチル化活性が MTD と同程度まで低下した (Fig.12E)。このことは、VCR が ISL に結合して U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾を効率化することを示唆している。以上より、METTL16 の VCR は、U6 snRNA の telestem ではなく、ISL と相互作用して m<sup>6</sup>A 修飾を促進することが明らかになった。

## 7. Telestem の構造的不安定化は U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾に必要である

METTL16 の VCR は、U6 snRNA の ISL に結合して m<sup>6</sup>A 修飾に適した構造変化を促すと考えられる。ここで、MAT2A\_hp1 メチル化における VCR の効果は、U6 snRNA メチル化における効果よりも小さいことに着目した (Fig.3C, 9D, 12C, 12D)。具体的には、2つの RNA 基質のメチル化に対する VCR の効果の差が、RNA の認識部位付近の構造的な違いを反映していると考えた。U6 snRNA は、telestem と ISL の間で曲がるように構造変化をして遷移領域を形成すると、METTL16 に認識されて m<sup>6</sup>A 修飾を受けると推測される。よって、U6 snRNA の telestem と ISL の間の接合部の柔軟性は、MTD による認識に影響を与える可能性がある。つまり、U6 snRNA は telestem があることで、m<sup>6</sup>A 修飾部位周辺の構造的な柔軟性が制限されていると考えた。

この仮説を検証するため、U6snRNA の telestem の塩基対合を崩した変異体 (U6 snRNA\_TSmt) を作成した (Fig.13A)。U6 snRNA\_TSmt は、telestem と ISL の間の接合部が、野生型の U6 snRNA より柔軟であると想定した。MTD による U6 snRNA\_TSmt に対する Km 値は  $2.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$  であり、U6snRNA\_Δ5'SL に対する Km 値と比べて小さくなった (Fig.13B)。よって、U6 snRNA の telestem と ISL の間の接合部の柔軟性は、METTL16 の MTD による認識に必要であることが示唆された。さらに、telestem を除いた変異体 (U6snRNA\_ΔTS3) も作成して解析したところ、MTD との Km 値は  $0.98 \pm 0.19 \mu\text{M}$  で



**Figure 12. METTL16 の VCR は U6 snRNA の ISL に相互作用する**

(A) U6 snRNA の欠失変異体の 2 次構造モデル。(B) METTL16\_FL および MTD による U6 snRNA\_Δ5'SL のメチル化活性の定常状態解析。(C) METTL16\_FL および MTD による MAT2A\_hp1 のメチル化活性の定常状態解析。(D) METTL16\_FL による低濃度の MAT2A\_hp1 のメチル化活性の定常状態解析。(E) METTL16\_FL および MTD による U6 snRNA または変異体のメチル化活性 (U6 snRNA 1  $\mu\text{M}$ )。 (B-D) それぞれ独立した実験を少なくとも 3 回以上行った。



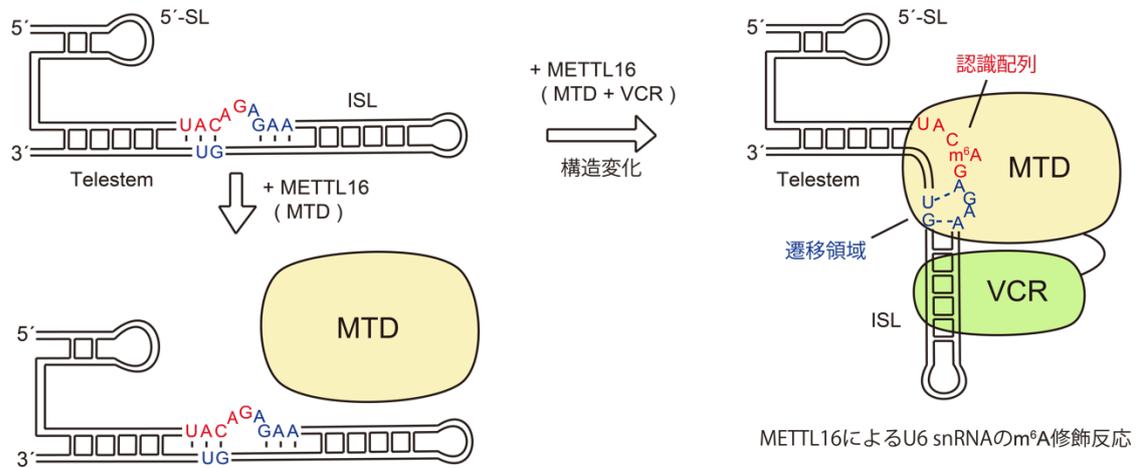


Figure 14. METTL16 による U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾反応モデル

METTL16 は MTD と VCR が協調的に機能することで U6 snRNA を m<sup>6</sup>A 修飾する。VCR が U6 snRNA の ISL に結合することで構造変化が促され、MTD により認識可能な U6 snRNA の構造が提供されることが考えられる。

## 第五章 議論

### 1. METTL16 による RNA の m<sup>6</sup>A 修飾機構

METTL16 の m<sup>6</sup>A 修飾の標的 RNA である MAT2A mRNA と U6 snRNA は、共通の特徴として 5'-UACAGAGAA-3'の配列（下線がメチル化部位）の配列を含む。しかし、次世代シーケンサーを利用した網羅的な解析においても、これら 2 つ以外の標的 RNA は未だ同定されていない。生化学的な解析により、この配列を含むだけでは METTL16 の m<sup>6</sup>A 修飾の基質にはならないことも明らかにされている。したがって、METTL16 は非常に特異性の高い酵素であり、何らかの方法で特定の RNA の特徴を認識して m<sup>6</sup>A 修飾をされると考えられていた。本研究の開始後に、他の研究グループにより METTL16 の MTD と MAT2A mRNA のメチル化部位 (MAT2A hairpin RNA) の複合体結晶構造が決定された。そして、METTL16 の MTD は、5'-UACAGAGAA-3'の配列の内、5'側の 5'-UACAG-3'配列を 1 本鎖の RNA として認識して結合することが示された。さらに、3'側の 5'-AGAA-3'配列は、5'-UG -3'配列と特殊な塩基対（遷移構造）を形成して、METTL16 の MTD と相互作用していることが明らかにになった。したがって、METTL16 の m<sup>6</sup>A 修飾の標的 RNA は 5'-UACAGAGAA-3'の配列を含むだけでなく、5'-UG-3'配列と遷移領域を形成できる必要があると考えられる。

本研究の結果、METTL16 の C 末端側の VCR が、RNA の m<sup>6</sup>A 修飾を促進する機能を持つことが明らかになった。また、VCR の結晶構造を決定したところ、METTL16 の VCR は、U6 snRNA 特異的 3'末端ウリジルトランスフェラーゼ 1 (TUT1) の KA1 ドメインと非常によく似た構造であることを見出した (Fig.3)。キメラ酵素を用いた解析で、METTL16 の VCR は、TUT1 の KA1 に機能的に置換することが可能であった (Fig.6)。また、KA1 と VCR の間に保存されたアルギニン残基を多く含む領域は、U6 snRNA-VCR 相互作用に関与することも示された (Fig.8E, 8F)。したがって、TUT1 の KA1 と METTL16 の VCR は、U6 snRNA の認識において共通の機能を有していると推測される。以上より、TUT1 の KA1 と METTL16 の VCR は、それぞれの触媒活性ドメインと協調的にはたらくことで、U6

snRNA 生合成の各段階を促進すると考えられる。

TUT1 の KA1 は、U6 snRNA の ISL と相互作用し、telestem と ISL の間の部位の構造変化を引き起こすことが示されている(68)。そして、TUT1 の KA1 は、反応中に U6 snRNA が酵素表面から外れるのを防ぎ、TUT1 による U6 snRNA の 3'末端のオリゴウリジル化を促進すると考えられている(68)。本研究により、TUT1 の KA1 と METTL16 の VCR の間の構造的および機能的な類似性が明らかになった。よって、METTL16 の VCR は、TUT1 の KA1 と同様に U6 snRNA の ISL に結合して構造変化を促すことが推測される。この仮説を裏付けるため、生化学的な解析を進めたところ、METTL16 の VCR は ISL に相互作用して U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾を促進することが明らかになった (Fig.12E)。したがって、METTL16 の VCR は、U6 snRNA の ISL に結合することで、TUT の KA1 と同様に telestem と ISL の間の領域の構造変化を引き起こすと考えられる。

先行研究における METTL16 の MTD と MAT2A hairpin RNA の複合体結晶構造の決定により、METTL16 による RNA の m<sup>6</sup>A 修飾機構の理解が進んだ。METTL16 の MTD は、5'-UACAG-3'の配列（下線がメチル化部位）を認識するだけでなく、MAT2A hairpin RNA に特徴的な RNA 構造である遷移領域を認識することが明らかにされている(41)。この報告を参考に、U6 snRNA が METTL16 によって認識される際の 2 次構造モデル (bent form) を構築した。このモデルでは、U6 snRNA は、telestem と ISL の間の部分で折り曲がるようにして、MAT2A hairpin RNA と同様の遷移領域を形成する (Fig.10)。METTL16 は、U6 snRNA の遷移領域を形成すると推測された残基の変異体を効率的にメチル化できなかった (Fig.11B)。また、U6 snRNA-Prp24 複合体において、U6 snRNA は telestem と ISL の間の部分で折り曲がった構造をとるという実績もある(74)。以上を踏まえると、METTL16 は、U6 snRNA の遷移領域の構造を認識して m<sup>6</sup>A 修飾すると考えられる。

METTL16 は、VCR が U6 snRNA の ISL と相互作用して遷移領域の形成を促し、MTD による認識を補助することで m<sup>6</sup>A 修飾すると推測される。METTL16 の VCR は、U6 snRNA

と MAT2A hairpin RNA (MAT2A\_hp1)の 2 種類の RNA と相互作用する結果が得られているが、VCR と RNA の相互作用の配列特異性や構造特異性は不明である。また、VCR と U6 snRNA を混和して静置した後に、MTD によるメチル化活性を定量しても VCR によるメチル化の促進効果は見られなかった。よって、VCR 自体は結合する配列に特異性をもたないことや、特異性があったとしても MTD と協調的に構造変化を引き起こすと考えられる。

METTL16 による m<sup>6</sup>A 修飾の標的 RNA である U6 snRNA と MAT2A hairpin RNA の違いは、U6 snRNA に telestem が存在することである。そして、METTL16 の MTD だけでは、U6 snRNA に対するメチル化活性が著しく低下し、MAT2A に対しては大きな影響がないという結果が得られている (Fig.2D, 12C)。本研究では、U6 snRNA の telestem が、METTL16 による m<sup>6</sup>A 修飾の阻害要因になっていると仮定して解析を進めた。その結果、telestem の塩基対合を崩した変異体や、telestem を完全に除いた U6 snRNA 変異体は、METTL16 の VCR がなくても効率よくメチル化された (Fig.13C)。したがって、telestem の構造が不安定化されると、m<sup>6</sup>A 修飾部位周辺の構造変化が促され、METTL16 の MTD が U6 snRNA を認識可能になると考えられる。

U6 snRNA と METTL16 を混和して静置した後、非変性アクリルアミドゲルで泳動すると、U6 snRNA は非結合と結合の 2 本ではなく複数のバンドとして検出される。このことは、U6 snRNA が水溶液中で METTL16 と複合体を形成する際に、U6 snRNA がいくつかの 2 次構造をとることだけでなく、METTL16 が MTD と VCR の 2 つのドメインを用いて協奏的に U6 snRNA に結合することを反映していると考えられる。本論文では、U6 snRNA の 2 次構造として straight form と bent form の 2 種類を示した。実際の細胞内環境では、これらの 2 次構造だけでなく遷移状態なども含めた多様な構造が平衡状態にあると推察される。METTL16 は、MTD と VCR の 2 つの RNA 結合ドメインを用いて、m<sup>6</sup>A 修飾を受けるのに適した bent form を特異的に認識していると考えられる。

以上のことから、METTL16 の VCR が U6 snRNA の ISL に相互作用することで、telestem

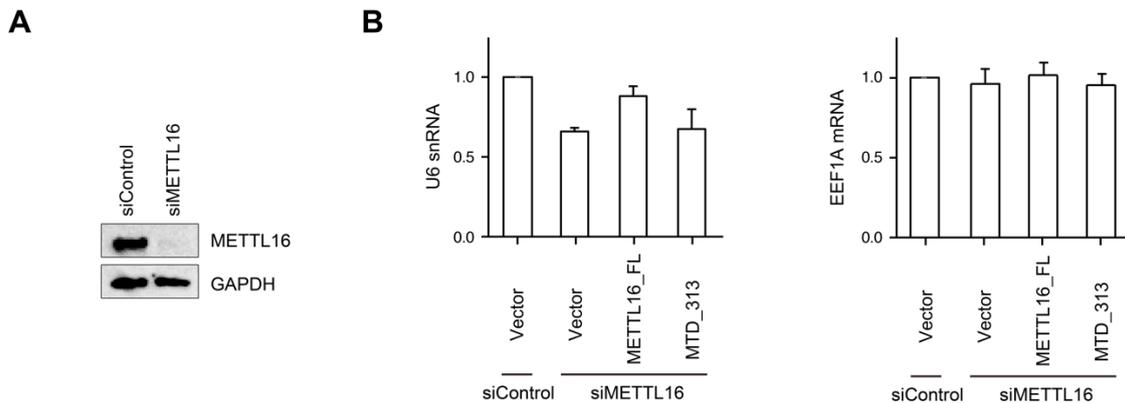
やメチル化部位周辺の構造変化を促進し、MTD が認識配列と遷移領域に結合して m<sup>6</sup>A 修飾するという新たな m<sup>6</sup>A 修飾反応モデルが明らかになった (Fig.14) (73)。

## 2. U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾の役割

本研究では、U6 snRNA の 43 位の m<sup>6</sup>A 修飾機構に着目して、METTL16 の VCR の構造と機能についての解析を行った。U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾は、スプライシング中に未成熟 RNA の 5'側の splice site と塩基対を形成する 5'-ACAGAG-3'配列中に (下線がメチル化部位) 位置しており、RNA のスプライシング調節に関与すると考えられている(55)。しかし、U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾の役割は未だ明らかにされていない。5'側のスプライシング部位の認識配列の”m<sup>6</sup>A”が”A”になることで、特定の splice site が使用できなくなり、不活性型のタンパク質や機能性 RNA が合成されてしまうことは考えられる。METTL16 のノックアウトマウスは胎生致死であり、その原因は MAT2A の発現異常であることが明らかにされている。しかし、MAT2A mRNA の m<sup>6</sup>A 修飾には VCR は必須ではない。したがって、METTL16 の VCR に変異があることで、U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾が困難になった結果、スプライシング異常が生じることによる疾患の存在は考えられる。

HEK293 細胞において、siRNA を用いて METTL16 をノックダウンした上で、U6 snRNA の発現量を RT-qPCR で定量したところ、U6 snRNA の発現量の低下がみられた (Fig.15A, 15B)。また、siRNA 処理をした HEK293 細胞に対して、METTL16 をコードしたプラスミドをトランスフェクションし、人為的に METTL16 の発現させたところ、U6 snRNA の発現が回復した (Fig.15B)。そして、METTL16 の MTD だけでは、U6 snRNA の発現を回復させることができなかった。これらの結果は、U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾が安定性および品質管理の制御に寄与している可能性を示唆している。

U6 snRNA の発現低下が m<sup>6</sup>A 修飾依存的であることを裏付けるため、m<sup>6</sup>A 抗体を用いて免疫沈降を行い、U6 snRNA の共沈量を定量して比較した。具体的には、U6 snRNA の共



**Figure 15. U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾と安定性の関与**

(A) METTL16 に対する siRNA によるタンパク質発現量の低下をウエスタンブロッティングで確認した。(B) METTL16 の siRNA 処理および METTL16 をコードしたプラスミドをトランスフェクションした際の U6 snRNA の発現量を RT-qPCR で定量した。

沈量をいくつかのコントロール (U6 snRNA の input、EEF1A の共沈量) で補正した。その結果、U6 snRNA の今日賃料の実測値、U6 snRNA の共沈量/U6 snRNA の input、U6 snRNA の共沈量/EEF1A の共沈量のいずれにおいても、METTL16 の siRNA 処理やプラスミドの人為的な発現による差は見られなかった。したがって、細胞内で安定に存在する U6 snRNA は、基本的に m<sup>6</sup>A 修飾を含むものであると考えられる。

U6 snRNA と同じく RNA ポリメラーゼIIIによって転写される tRNA は、修飾残基の欠損を指標とした品質管理機構が報告されている。開始メチオニンの tRNA は、58 位の N<sup>1</sup>-methyladenosine (m<sup>1</sup>A) が欠損すると、Trf4 が 3'末端をポリアデニル化して、3'-5'エキソヌクレアーゼである Rrp6 による分解が促進される(75)。セリンの tRNA は、12 位の N<sup>4</sup>-acetylcytidine (ac4C)と 44 位の 2'-O-methyluridine が欠損すると、3'末端に CCA 配列の代わりに CCACCA 配列が付加されて、3'-5'エキソヌクレアーゼである Xrn1 による分解が促進される(76)。これらは、RNA の 3'末端の修飾状態に依存した RNA 分解機構の実例であ

る。以上の結果をあわせると、U6 snRNA が何らかの理由で m<sup>6</sup>A 修飾を含まないとき、TUT1 および Usb1 による 3'末端のプロセッシングが異常となって、品質管理機構により分解される可能性も考えられる。

### 3. METTL16 の VCR と TUT1 の KA1 の構造的な相似性の意義

本研究により、METTL16 の VCR と TUT1 の KA1 は非常によく似た構造をしていることが明らかになった。VCR と KA1 は、共に U6 snRNA を標的とする酵素の RNA 結合ドメインであり、RNA の修飾を効率化することから、機能的にも相似性が見受けられる。先行研究で、TUT1 の KA1 は、U6 snRNA の ISL に結合することが報告されている(52)。本研究の結果、METTL16 の VCR も同様に、U6 snRNA の ISL に結合することが明らかになった。したがって、構造的な相似性も考慮すると、VCR と KA1 は相互排他的に U6 snRNA に結合すると推察される。

本研究と先行研究の結果は、METTL16 の VCR と TUT1 の KA1 ドメインは、U6 snRNA に結合して構造変化を引き起こすことを示唆する(52,73)。そして、METTL16 は U6 snRNA の 43 位を m<sup>6</sup>A 修飾する酵素、TUT1 は U6 snRNA の 3'末端をオリゴウリジル化する酵素であり、双方とも U6 snRNA のプロセッシングに関与する。しかし、METTL16 の VCR と TUT1 の KA1 の構造的な相似性にはどのような意義があるのだろうか。例えば、TUT1 の KA1 と METTL16 の VCR の構造的・機能的な相似性を利用して、修飾酵素や関連因子の結合部位を限定し、適切な順序での U6 snRNA のプロセッシングを制御することが考えられる。また、METTL16 と U6 snRNA の結合や m<sup>6</sup>A 修飾の付加による構造変化は、TUT1 の修飾活性部による U6 snRNA の 3'末端の認識を補助しているのかもしれない。この仮説が正しいとすれば、U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾が欠損すると、TUT1 による 3'末端のプロセッシングに異常が生じるので、先述した U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾を指標にした品質管理機構の存在も裏付けられるのではないだろうか。

#### 4. METTL16 による U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾の種間保存性

本研究により、METTL16 が U6 snRNA を m<sup>6</sup>A 修飾するためには、VCR の機能が重要であることが明らかになった。先行研究により、U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾は少なくとも分裂酵母で保存されていることが示されている。U6 snRNA の配列を種間で比較してみたところ、ヒトを含めた高等生物と分裂酵母 (*S. pombe*) では telestem の配列が異なるように見受けられた (Fig.16A)。分裂酵母の U6 snRNA の telestem は、ヒトに比べて塩基対合の形成がなく、telestem と ISL の間の接合部が構造的に柔軟であると考えられる (Fig.16B)。この特徴は、本研究の過程で作成した U6 snRNA\_TSmt (Fig.13A) と同様であり、分裂酵母においては VCR の寄与が比較的小さいと予想される。

METTL16 のアミノ酸配列を種間で比較してみたところ、脊椎動物だけでなく線虫 (*C. elegans*) と分裂酵母 (*S. pombe*) も VCR を保有している。具体的には、VCR の 2 次構造パターンと、m<sup>6</sup>A 修飾における機能部位である RRR が保存されている (Fig17)。一方で、ショウジョウバエ (*D. melanogaster*) では VCR の保存が見られない。しかし、ショウジョウバエの U6 snRNA の配列は、ヒトを含めた脊椎動物とほとんど同じであるため、VCR がなくては U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾が困難であると推察される。そこで、METTL16 の MTD のアミノ酸配列の種間保存性に着目したところ、ショウジョウバエの METTL16 には SAM の認識を競合的に阻害する K-loop が保存されていないことが見受けられた (Fig.17)。METTL16 の K-loop は、SAM の認識を競合的に阻害する分子内ドメインであり、MAT2A mRNA の m<sup>6</sup>A 修飾を抑制することが示されている(41)。METTL16 を含めた多くの RNA メチル化酵素は、メチル基ドナーである SAM と標的 RNA の双方に相互作用した時に、RNA へのメチル基の転移を触媒する。したがって、ショウジョウバエの METTL16 は、ヒトや他の生物種に比べて SAM と結合しやすいことにより、U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾活性が担保されることが推察される。

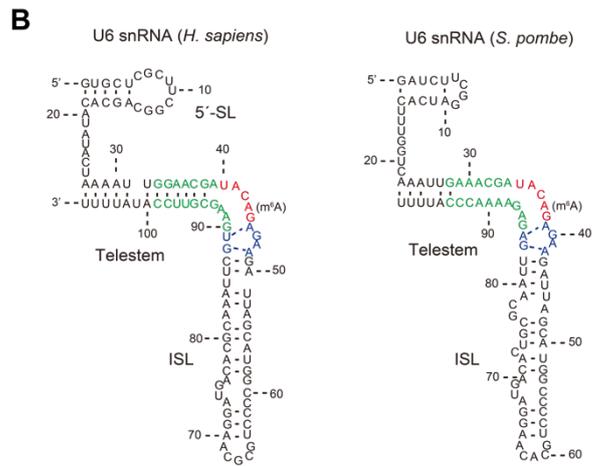
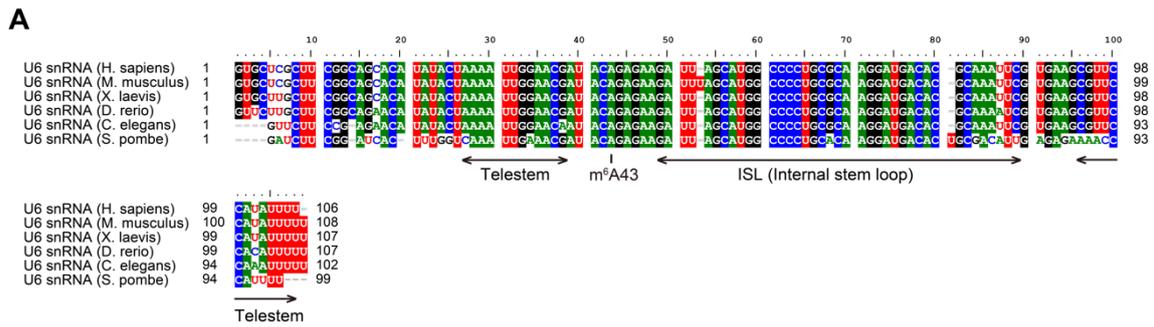


Figure 16. U6 snRNA の配列の種間保存性

(A) U6 snRNA の種間保存性。(B) ヒトの U6 snRNA と分裂酵母の U6 snRNA の 2 次構造の比較。Telestem の部位に違いが見られる。

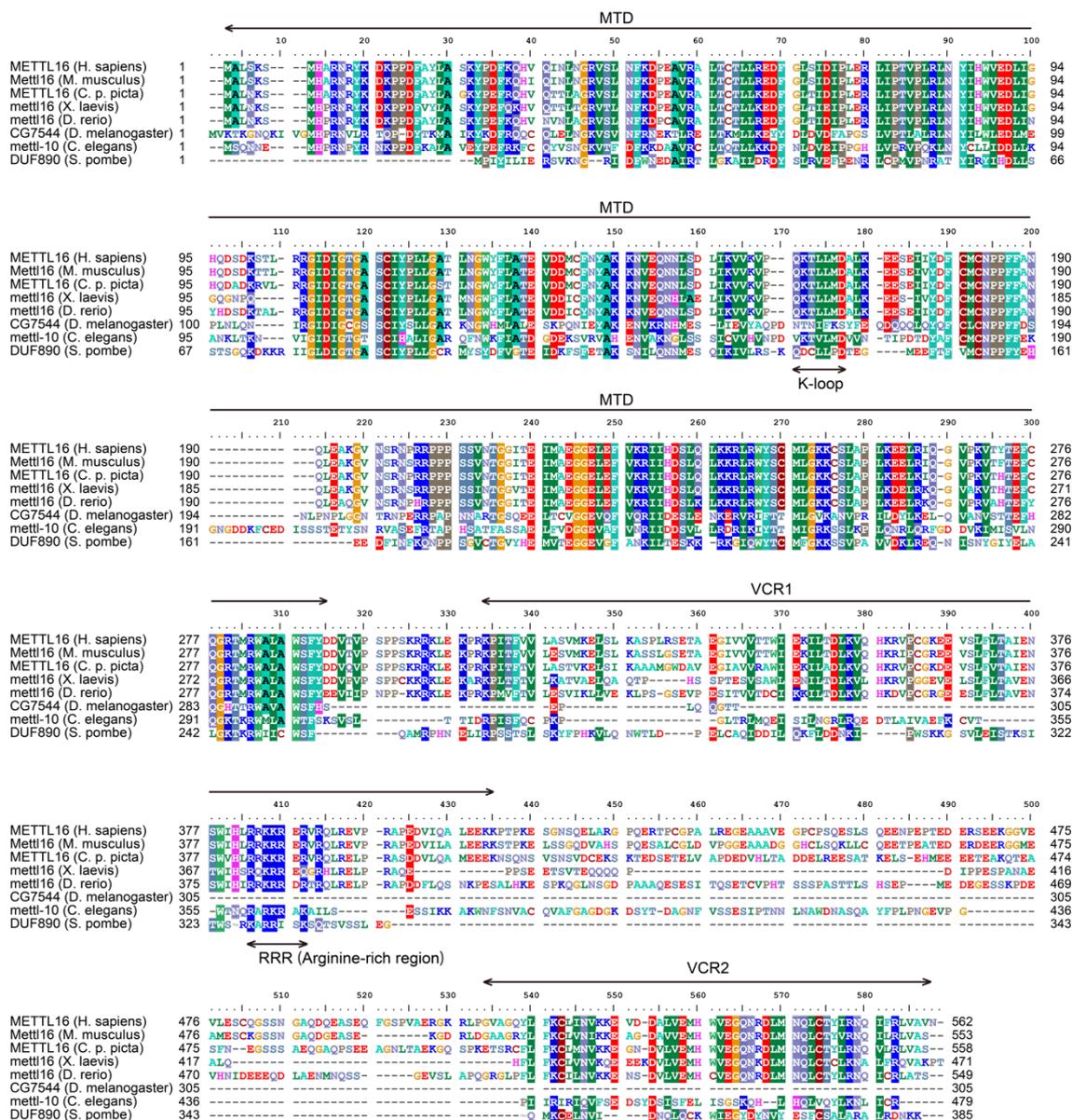


Figure 17. METTL16 のアミノ酸配列の種間保存性

METTL16 の種間保存性。ショウジョウバエは、VCR を持たないが K-loop が機能しないことで U6 snRNA に対するメチル化活性を担保していると考えられる。

## 5. METTL16 と METTL3/14 複合体

METTL3 は METTL14 とヘテロダイマーを形成して RNA を m<sup>6</sup>A 修飾する。また、METTL14 はヒストン修飾である H3K36me3 を認識して結合し、転写共役的に RNA を m<sup>6</sup>A 修飾することが明らかにされている(26)。本研究により、METTL16 の VCR は RNA 結合活性を持つことが明らかになった。よって、METTL16 は、VCR が未成熟 RNA の特定の配列や構造を認識することで、転写共役的に m<sup>6</sup>A 修飾する可能性も考えられる。METTL3/METTL14 複合体結晶構造から、METTL3 と METTL14 はヘテロダイマーを形成し、RNA を挟み込むようにして m<sup>6</sup>A 修飾すると報告されている(77)。本研究により、METTL16 は MTD と VCR の 2つのドメインを使って協調的に標的 RNA を m<sup>6</sup>A メチル化することが明らかになった。よって、METTL16 は、MTD と VCR の 2つのドメインを用いて、標的 RNA を挟むように認識して m<sup>6</sup>A 修飾することも考えられる。

## 6. METTL16 による細胞内 SAM 恒常性

METTL16 は、細胞内 SAM 濃度の変化に応答して、MAT2A タンパク質の発現を調節し、細胞内の SAM ホメオスタシスを維持する役割が報告されている(36,40)。SAM は生体内の多くのメチル化反応に利用されるため、細胞内 SAM 濃度を一定の範囲内で保つことは、生体内の遺伝子発現制御において非常に重要であると考えられる。SAM が十分に存在するとき、METTL16 が MAT2A mRNA の 3'UTR を m<sup>6</sup>A 修飾して分解を促進し、MAT2A タンパク質の発現を低下させて SAM の合成を抑制すると示されている(36)。一方、SAM が不足しているとき、METTL16 は MAT2A mRNA の 3'UTR に結合するが、スプライシングを誘導することで MAT2A mRNA を成熟させ、MAT2A タンパク質の発現を上昇させて SAM 合成を促進すると考えられている(40)。本研究により、VCR 自身が RNA 結合活性をもつことが明らかになった。したがって、METTL16 の MTD が MAT2A mRNA の 3'UTR に結合し、VCR が U6snRNA を含めたスプライシング因子をリクルートすることで、RNA

スプライシングを促進する機構も考えられる。また、VCR\_ΔL の結晶構造から、METTL16 の VCR がホモダイマーを形成できる疎水性表面をもつ可能性が示唆された (Fig.4A)。特定の条件下で、METTL16 が VCR を介してホモダイマーを形成できるとすれば、一方が MAT2A mRNA を認識し、他方が U6 snRNA を認識してスプライシングを誘導することも考えられる。

## 7. METTL16 と MALAT1

METTL16 は、ノンコーディング RNA である MALAT1 (metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript-1) に結合することも報告されている(78)。MALAT1 は転移性肺癌で高発現している非コード RNA として同定された(79)。MALAT1 のノックアウト肺癌細胞をマウスに移植すると、肺組織への転移が抑制されることが報告されている(80)。MALAT1 は、様々なスプライシング因子が存在する核内構造体に局在して、スプライシング調節に関与することが報告されている(81)。しかし、MALAT1 の直接的な機能は明らかにされていない。近年、スプライシングの異常は、機能不全タンパク質を蓄積させて癌化を促進することが示唆されている(71)。実際に、スプライシング因子を標的とした抗がん剤の研究開発も進められている(82)。したがって、MALAT1 の異常発現は、スプライシング異常を引き起こして癌の原因となる可能性が考えられる。

MALAT1 は、3'末端側に 3 重らせん構造 (triple helix) を形成して安定化することが明らかにされている(83,84)。METTL16 は、MALAT1 の 3 重らせん構造を認識して結合する(78)。そして、METTL16 は、MALAT1 に MTD だけでは結合できず、VCR を必要とすることが報告されている(85)。本研究により、METTL16 の VCR が RNA 結合ドメインであり、標的 RNA の認識に寄与していることが明らかになった。よって、METTL16 による MALAT1 の 3 重らせん構造の認識においても、U6 snRNA と類似した様式によって、MTD と VCR が協調的に機能していることは十分に考えられる。しかし、METTL16 による

MALAT1 の RNA 三重らせんを認識する機構は明らかにされていない。また、METTL16 は、MALAT1 を m<sup>6</sup>A 修飾しないことが示されている。よって、METTL16 は、MALAT1 は 3 重らせん構造を安定化することで、生体内の遺伝子発現制御に何らかの役割を果たす可能性が考えられる。

## 8. 総括

当初の計画では、METTL16 による RNA の m<sup>6</sup>A 修飾機構を解明するため、MAT2A hairpin RNA と U6 snRNA それぞれに着目して解析を進めていた。しかし、他の研究グループにより MAT2A hairpin RNA の m<sup>6</sup>A 修飾機構の詳細が先立って報告された(41)。その時点で、METTL16 による m<sup>6</sup>A 修飾活性を厳密に定量可能な反応系の構築に成功しており、U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾には VCR が必要である結果が得られていた。さらに、VCR の結晶構造の決定にも成功しており、結晶構造をもとにした生化学的解析が進んでいた。以上のことから、VCR の構造と機能に着目して U6 snRNA の m<sup>6</sup>A 修飾機構の解析を進めることで、研究の独自性を担保し、METTL16 の m<sup>6</sup>A 修飾機構をより詳細に明らかにできると考えた。

本研究の結果、METTL16 は、MTD と VCR の 2 つのドメインを用いて、U6 snRNA を m<sup>6</sup>A 修飾することが明らかになった。METTL16 の VCR は、U6 snRNA 特異的な RNA 末端修飾酵素である TUT1 の RNA 結合ドメイン (KA-1) と非常によく似た構造をしていることも見出した。そして、METTL16 の VCR と TUT1 の KA1 は、それぞれ U6 snRNA の認識に寄与しており、同様に U6 snRNA の ISL に結合することが示された。したがって、VCR と KA1 が相互排他的に U6 snRNA と結合し、U6 snRNA の生合成の各段階を制御していることも考えられる。今後の研究により、METTL16 による RNA の m<sup>6</sup>A 修飾機構の詳細だけでなく、U6 snRNA 生合成の全体像が解き明かされることが期待される。

## 第六章 参考文献

1. Pan, T. (2013) N6-methyl-adenosine modification in messenger and long non-coding RNA. *Trends Biochem Sci*, **38**, 204-209.
2. Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M. *et al.* (2012) Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, **485**, 201-206.
3. Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E. and Jaffrey, S.R. (2012) Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, **149**, 1635-1646.
4. Yue, Y., Liu, J. and He, C. (2015) RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes & Development*, **29**, 1343-1355.
5. ZAMIR, A., HOLLEY, R.W. and MARQUISEE, M. (1965) EVIDENCE FOR THE OCCURRENCE OF A COMMON PENTANUCLEOTIDE SEQUENCE IN THE STRUCTURES OF TRANSFER RIBONUCLEIC ACIDS. *J Biol Chem*, **240**, 1267-1273.
6. SINGH, H. and LANE, B.G. (1964) THE ALKALI-STABLE DINUCLEOTIDE SEQUENCES IN 18S+28S RIBONUCLEATES FROM WHEAT GERM. *Can J Biochem*, **42**, 1011-1021.
7. Krol, A., Branlant, C., Lazar, E., Gallinaro, H. and Jacob, M. (1981) Primary and secondary structures of chicken, rat and man nuclear U4 RNAs. Homologies with U1 and U5 RNAs. *Nucleic Acids Res*, **9**, 2699-2716.
8. Alarcón, C.R., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S. and Tavazoie, S.F. (2015) HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell*, **162**, 1299-1308.

9. Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.-S., Hao, Y.-J., Sun, B.-F., Sun, H.-Y., Li, A., Ping, X.-L., Lai, W.-Y. *et al.* (2016) Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*, **61**, 507-519.
10. Zheng, Q., Hou, J., Zhou, Y., Li, Z. and Cao, X. (2017) The RNA helicase DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m. *Nat Immunol*, **18**, 1094-1103.
11. Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G.C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G. *et al.* (2014) N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, **505**, 117-120.
12. Fry, N.J., Law, B.A., Ilkayeva, O.R., Holley, C.L. and Mansfield, K.D. (2017) -methyladenosine is required for the hypoxic stabilization of specific mRNAs. *RNA*, **23**, 1444-1455.
13. Wang, X., Zhao, B.S., Roundtree, I.A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H. and He, C. (2015) N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell*, **161**, 1388-1399.
14. Lin, S., Choe, J., Du, P., Triboulet, R. and Gregory, R.I. (2016) The m(6)A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells. *Mol Cell*, **62**, 335-345.
15. Meyer, K.D., Patil, D.P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M.A., Elemento, O., Pestova, T.V., Qian, S.B. and Jaffrey, S.R. (2015) 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell*, **163**, 999-1010.
16. Fustin, J.-M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., Yoshida, M., Isagawa, T., Morioka, Masaki S., Kakeya, H., Manabe, I. *et al.* (2013) RNA-Methylation-Dependent RNA Processing Controls the Speed of the Circadian Clock. *Cell*, **155**, 793-806.
17. Batista, Pedro J., Molinie, B., Wang, J., Qu, K., Zhang, J., Li, L., Bouley, Donna M., Lujan,

- E., Haddad, B., Daneshvar, K. *et al.* (2014) m6A RNA Modification Controls Cell Fate Transition in Mammalian Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, **15**, 707-719.
18. Batista, P.J. (2017) The RNA Modification N6-methyladenosine and Its Implications in Human Disease. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, **15**, 154-163.
  19. Geula, S. (2015) Stem cells. m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, **347**, 1002-1006.
  20. Meyer, K.D. and Jaffrey, S.R. (2017) Rethinking m(6)A Readers, Writers, and Erasers. *Annual review of cell and developmental biology*, **33**, 319-342.
  21. Rottman, F.M., Bokar, J.A., Narayan, P., Shambaugh, M.E. and Ludwiczak, R. (1994) N6-adenosine methylation in mRNA: substrate specificity and enzyme complexity. *Biochimie*, **76**, 1109-1114.
  22. Liu, J. (2014) A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chem. Biol.*, **10**, 93-95.
  23. Wang, P., Doxtader, Katelyn A. and Nam, Y. (2016) Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Molecular Cell*, **63**, 306-317.
  24. Wang, X., Feng, J., Xue, Y., Guan, Z., Zhang, D., Liu, Z., Gong, Z., Wang, Q., Huang, J., Tang, C. *et al.* (2016) Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. *Nature*, **534**, 575-578.
  25. Sledz, P. and Jinek, M. (2016) Structural insights into the molecular mechanism of the m(6)A writer complex. *Elife*, **5**.
  26. Huang, H., Weng, H., Zhou, K., Wu, T., Zhao, B.S., Sun, M., Chen, Z., Deng, X., Xiao, G., Auer, F. *et al.* (2019) Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m. *Nature*, **567**, 414-419.
  27. Zheng, G., Dahl, J.A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C.M., Li, C.J., Vågbo, C.B., Shi, Y.,

- Wang, W.L., Song, S.H. *et al.* (2013) ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, **49**, 18-29.
28. Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.G. *et al.* (2011) N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, **7**, 885-887.
29. Zhang, S., Zhao, B.S., Zhou, A., Lin, K., Zheng, S., Lu, Z., Chen, Y., Sulman, E.P., Xie, K., Bögl, O. *et al.* (2017) m. *Cancer Cell*, **31**, 591-606.e596.
30. Li, Z., Weng, H., Su, R., Weng, X., Zuo, Z., Li, C., Huang, H., Nachtergaele, S., Dong, L., Hu, C. *et al.* (2017) FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N. *Cancer Cell*, **31**, 127-141.
31. Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., Liu, M., Ma, J. and Wu, L. (2016) YTHDF2 destabilizes m(6)A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nat Commun*, **7**, 12626.
32. Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B.S., Ma, H., Hsu, P.J., Liu, C. and He, C. (2017) YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Research*, **27**, 315-328.
33. Patil, D.P., Chen, C.K., Pickering, B.F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M. and Jaffrey, S.R. (2016) m(6)A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, **537**, 369-373.
34. Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.S., Hao, Y.J., Sun, B.F., Sun, H.Y., Li, A., Ping, X.L., Lai, W.Y. *et al.* (2016) Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Mol Cell*, **61**, 507-519.
35. Roundtree, I.A., Luo, G.Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, T., Cui, Y., Sha, J., Huang, X., Guerrero, L., Xie, P. *et al.* (2017) YTHDC1 mediates nuclear export of N. *Elife*, **6**.

36. Shima, H., Matsumoto, M., Ishigami, Y., Ebina, M., Muto, A., Sato, Y., Kumagai, S., Ochiai, K., Suzuki, T. and Igarashi, K. (2017) S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N. *Cell Rep*, **21**, 3354-3363.
37. Hsu, P.J., Zhu, Y., Ma, H., Guo, Y., Shi, X., Liu, Y., Qi, M., Lu, Z., Shi, H., Wang, J. *et al.* (2017) Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Research*, **27**, 1115-1127.
38. Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M. and Pan, T. (2015) N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, **518**, 560-564.
39. Liu, N., Zhou, K.I., Parisien, M., Dai, Q., Diatchenko, L. and Pan, T. (2017) N6-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res*, **45**, 6051-6063.
40. Pendleton, K.E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O.V., Xie, Y., Tu, B.P. and Conrad, N.K. (2017) The U6 snRNA m(6)A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell*, **169**, 824-835.e814.
41. Doxtader, K.A., Wang, P., Scarborough, A.M., Seo, D., Conrad, N.K. and Nam, Y. (2018) Structural Basis for Regulation of METTL16, an S-Adenosylmethionine Homeostasis Factor. *Mol Cell*, **71**, 1001-1011.e1004.
42. Patel, A.A. and Steitz, J.A. (2003) Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 960-970.
43. Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Thérien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J. *et al.* (2007) Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell*, **27**, 262-274.

44. Didychuk, A.L., Montemayor, E.J., Carrocci, T.J., DeLaitsch, A.T., Lucarelli, S.E., Westler, W.M., Brow, D.A., Hoskins, A.A. and Butcher, S.E. (2017) Usb1 controls U6 snRNP assembly through evolutionarily divergent cyclic phosphodiesterase activities. *Nat Commun*, **8**, 497.
45. Harada, F., Kato, N. and Nishimura, S. (1980) The nucleotide sequence of nuclear 4.8S RNA of mouse cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **95**, 1332-1340.
46. Epstein, P., Reddy, R., Henning, D. and Busch, H. (1980) The nucleotide sequence of nuclear U6 (4.7 S) RNA. *J Biol Chem*, **255**, 8901-8906.
47. Yashiro, Y. and Tomita, K. (2018) Function and Regulation of Human Terminal Uridyltransferases. *Frontiers in Genetics*, **9**.
48. Trippe, R., Richly, H. and Benecke, B.J. (2003) Biochemical characterization of a U6 small nuclear RNA-specific terminal uridylyltransferase. *Eur J Biochem*, **270**, 971-980.
49. Trippe, R., Guschina, E., Hossbach, M., Urlaub, H., Luhrmann, R. and Benecke, B.J. (2006) Identification, cloning, and functional analysis of the human U6 snRNA-specific terminal uridylyl transferase. *Rna*, **12**, 1494-1504.
50. Mroczek, S., Krwawicz, J., Kutner, J., Lazniewski, M., Kuciński, I., Ginalski, K. and Dziembowski, A. (2012) C16orf57, a gene mutated in poikiloderma with neutropenia, encodes a putative phosphodiesterase responsible for the U6 snRNA 3' end modification. *Genes Dev*, **26**, 1911-1925.
51. Shchepachev, V., Wischniewski, H., Missiaglia, E., Soneson, C. and Azzalin, C.M. (2012) Mpn1, mutated in poikiloderma with neutropenia protein 1, is a conserved 3'-to-5' RNA exonuclease processing U6 small nuclear RNA. *Cell Rep*, **2**, 855-865.
52. Yamashita, S., Takagi, Y., Nagaike, T. and Tomita, K. (2017) Crystal structures of U6 snRNA-specific terminal uridylyltransferase. *Nat Commun*, **8**, 15788.

53. Nomura, Y., Montemayor, E.J., Virta, J.M., Hayes, S.M. and Butcher, S.E. (2020) Structural basis for the evolution of cyclic phosphodiesterase activity in the U6 snRNA exoribonuclease Usb1. *Nucleic Acids Res*, **48**, 1423-1434.
54. Licht, K., Medenbach, J., Lührmann, R., Kambach, C. and Bindereif, A. (2008) 3'-cyclic phosphorylation of U6 snRNA leads to recruitment of recycling factor p110 through LSM proteins. *RNA*, **14**, 1532-1538.
55. Warda, A.S., Kretschmer, J., Hackert, P., Lenz, C., Urlaub, H., Hobartner, C., Sloan, K.E. and Bohnsack, M.T. (2017) Human METTL16 is a N(6)-methyladenosine (m(6)A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs. *EMBO Rep*, **18**, 2004-2014.
56. Madhani, H.D., Bordonne, R. and Guthrie, C. (1990) Multiple roles for U6 snRNA in the splicing pathway. *Genes Dev*, **4**, 2264-2277.
57. LaMonte, B.L. and Hughes, J.A. (2006) In vivo hydrolysis of S-adenosylmethionine induces the met regulon of Escherichia coli. *Microbiology*, **152**, 1451-1459.
58. Fuchs, R.T., Grundy, F.J. and Henkin, T.M. (2007) S-adenosylmethionine directly inhibits binding of 30S ribosomal subunits to the SMK box translational riboswitch RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 4876-4880.
59. Fuchs, R.T., Grundy, F.J. and Henkin, T.M. (2006) The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 226-233.
60. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**, 125-132.
61. Sheldrick, G.M. (2008) A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A*, **64**, 112-122.
62. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. and Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, **40**, 658-674.

63. Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H. and Adams, P.D. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **68**, 352-367.
64. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**, 486-501.
65. Hsiao, K., Zegzouti, H. and Goueli, S.A. (2016) Methyltransferase-Glo: a universal, bioluminescent and homogenous assay for monitoring all classes of methyltransferases. *Epigenomics*, **8**, 321-339.
66. Roignant, J.Y. and Soller, M. (2017) m6A in mRNA: An Ancient Mechanism for Fine-Tuning Gene Expression. *Trends Genet*, **33**, 380-390.
67. Holm, L. and Rosenström, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Research*, **38**, W545-W549.
68. Yamashita, S., Takagi, Y., Nagaike, T. and Tomita, K. (2017) Crystal structures of U6 snRNA-specific terminal uridylyltransferase. *Nature Communications*, **8**, 15788.
69. Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T. and Ben-Tal, N. (2016) ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res*, **44**, W344-350.
70. Mougin, A., Gottschalk, A., Fabrizio, P., Luhrmann, R. and Branlant, C. (2002) Direct probing of RNA structure and RNA-protein interactions in purified HeLa cell's and yeast spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP particles. *J Mol Biol*, **317**, 631-649.
71. Montes, M., Sanford, B.L., Comiskey, D.F. and Chandler, D.S. (2019) RNA Splicing and Disease: Animal Models to Therapies. *Trends Genet*, **35**, 68-87.
72. Mendel, M., Chen, K.M., Homolka, D., Gos, P., Pandey, R.R., McCarthy, A.A. and Pillai,

- R.S. (2018) Methylation of Structured RNA by the m(6)A Writer METTL16 Is Essential for Mouse Embryonic Development. *Mol Cell*, **71**, 986-1000.e1011.
73. Aoyama, T., Yamashita, S. and Tomita, K. (2020) Mechanistic insights into m6A modification of U6 snRNA by human METTL16. *Nucleic Acids Res*, **48**, 5157-5168.
74. Montemayor, E.J., Curran, E.C., Liao, H.H., Andrews, K.L., Treba, C.N., Butcher, S.E. and Brow, D.A. (2014) Core structure of the U6 small nuclear ribonucleoprotein at 1.7-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol*, **21**, 544-551.
75. Kadaba, S., Wang, X. and Anderson, J.T. (2006) Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA. *RNA*, **12**, 508-521.
76. Wilusz, J.E., Whipple, J.M., Phizicky, E.M. and Sharp, P.A. (2011) tRNAs marked with CCACCA are targeted for degradation. *Science*, **334**, 817-821.
77. Wang, P., Doxtader, K.A. and Nam, Y. (2016) Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Mol Cell*, **63**, 306-317.
78. Brown, J.A., Kinzig, C.G., DeGregorio, S.J. and Steitz, J.A. (2016) Methyltransferase-like protein 16 binds the 3'-terminal triple helix of MALAT1 long noncoding RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **113**, 14013-14018.
79. Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Böing, S., Metzger, R., Schneider, P.M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E. *et al.* (2003) MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin  $\beta$  4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, **22**, 8031-8041.
80. Gutschner, T., Hämmerle, M., Eissmann, M., Hsu, J., Kim, Y., Hung, G., Revenko, A., Arun, G., Stentrup, M., Gross, M. *et al.* (2013) The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res*, **73**, 1180-1189.

81. Tripathi, V., Ellis, J.D., Shen, Z., Song, D.Y., Pan, Q., Watt, A.T., Freier, S.M., Bennett, C.F., Sharma, A., Bubulya, P.A. *et al.* (2010) The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*, **39**, 925-938.
82. Seiler, M., Yoshimi, A., Darman, R., Chan, B., Keaney, G., Thomas, M., Agrawal, A.A., Caleb, B., Csibi, A., Sean, E. *et al.* (2018) H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. *Nat Med*, **24**, 497-504.
83. Brown, J.A., Bulkeley, D., Wang, J., Valenstein, M.L., Yario, T.A., Steitz, T.A. and Steitz, J.A. (2014) Structural insights into the stabilization of MALAT1 noncoding RNA by a bipartite triple helix. *Nat Struct Mol Biol*, **21**, 633-640.
84. Wilusz, J.E., JnBaptiste, C.K., Lu, L.Y., Kuhn, C.D., Joshua-Tor, L. and Sharp, P.A. (2012) A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes Dev*, **26**, 2392-2407.
85. Ruskowska, A., Ruskowski, M., Dauter, Z. and Brown, J.A. (2018) Structural insights into the RNA methyltransferase domain of METTL16. *Sci Rep*, **8**, 5311.

## 第七章 謝辞

本研究は、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻 RNA 生物学分野の富田耕造博士のご指導のもと実施いたしました。恵まれた研究環境のもと、評価系の構築から学术论文の執筆まで綿密なご指導を賜りました。富田先生のもとでの博士後期課程を過ごし、実験結果を懐疑的に評価する視点、対外的に発表できる成果を意識した研究の進め方、結果をもとにした論理の組み立て方など、研究者としてあるべき姿勢をご教授いただきました。ご指導ご鞭撻を賜りましたこと厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院新領域創成科学研究科の山下征輔博士には、X 線結晶構造解析の理論や実験手法、実験の条件設定や具体的な研究の進め方などをご教授いただきました。博士後期課程から研究室に参加した私が円滑に研究を進めて成果を出せるよう、懇切丁寧にきめ細やかなご指導を賜りましたこと深く御礼申し上げます。

学部・博士前期課程においては、名古屋市立大学薬学部（当時）の藤原俊伸博士、深尾亜喜良博士にご指導を賜りました。日常的な議論の中で、研究を進める上での基本的な姿勢をご教授いただきました。国内外の多数の学会発表や、博士後期課程からの新たな研究室への進学など、多くの成長の機会を賜りましたこと心より御礼申し上げます。

大学入学から博士後期課程修了まで、公益財団法人服部国際奨学財団、独立行政法人日本学術振興会、独立行政法人日本学生支援機構より資金援助を賜りました。十全なご支援のもと学業に専心することができました。本当にありがとうございました。

私の大学生活は、名古屋市立大学薬学部、近畿大学薬学部、東京大学大学院新領域創成科学研究科、服部国際奨学財団、東進衛生予備校における多様な環境での経験を与えてくれました。この中での出会いと学びは、今後生きていく上での掛け替えのない財産です。皆様の支援と期待に見合うよう今後も懸命に取り組んでいく所存です。末筆にはなりますが、これまで最も身近なところで支えてくれた友人と家族に心より感謝を申し上げます。

2020年9月 青山智彦