

【目的】 近年、RNA 修飾のうち、*N*6 位がメチル化されたアデノシン (m^6A) が RNA の動態や安定性に影響し、翻訳やシグナル伝達を制御することが報告された。そのメチル化レベルの異常は、癌や生活習慣病などの種々の疾病に関与することが明らかになりつつある。一方、癌細胞では、癌種の違いにより、 m^6A メチル化が亢進される場合もあれば抑制される場合もあり、 m^6A 含有 RNA がいかんして癌化に関わっているかは、未だ不明な点が多い。このため、 m^6A 含有 RNA の簡便かつ精密な検出技術の開発は、 m^6A 含有 RNA の関わる生命現象の解明と疾病の診断や創薬において、極めて重要な課題となっている。そこで、本研究では、この問題を解決するために、化学原理を精査して分子設計することで、 m^6A 含有 RNA に結合すると蛍光強度が上昇する「化学プローブ」を開発し、このプローブの *in vitro* における蛍光特性を評価するとともに、生細胞イメージングを行う。

【方法】 目的とする化学プローブは、次の 3 つの部位から構成されるように設計した。1 つは m^6A に結合する YTHDF2 由来の YTH ドメインであり、もう 1 つは RNA と相互作用し蛍光強度を上昇させる合成核酸結合色素であり、最後の 1 つはタグタンパク質 PYP である。我々は、PYP タグとそのリガンドを利用して標的タンパク質に合成色素を特異的に導入するタンパク質ラベル化法を開発してきた。本研究では、このラベル化法を利用して YTH ドメインに PYP タグを介して合成核酸結合色素を導入し、*in vitro* および細胞内で化学プローブを構築した。化学プローブの RNA 結合特性や蛍光特性を調べ、細胞内構築を行った後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

【結果】 PYP タグリガンドと合成核酸結合色素を連結したラベル化分子を YTH と PYP タグ変異体の融合タンパク質 YTH-PYP 変異体とインキュベートしゲル電気泳動法にて解析したところ、YTH-PYP 変異体に色素が導入されることが確認され、*in vitro* にて化学プローブが構築できることが分かった。この化学プローブと m^6A 含有 RNA をインキュベートして、蛍光強度を測定したところ蛍光強度の上昇が見られた。一方、 m^6A 非含有 RNA と反応させたときも、同程度に蛍光強度が上昇した。そこで、YTH および PYP に変異を導入し最適化すると、 m^6A 非含有 RNA 反応時の蛍光強度が低下することが示された。次に、YTH-PYP 変異体を細胞で発現させ、ラベル化分子を添加しインキュベートしたところ、細胞内から蛍光が観測され、細胞内においても化学プローブを構築できることが示された。さらには、その蛍光が RNA に由来することが分かった。以上の研究により、本研究では、タンパク質と合成色素からなる新しいタイプの化学プローブを細胞内で構築し、RNA を可視化することが可能となった。

化学プローブのメチル化 RNA 検出原理

