



Title	癌細胞におけるAlkB homolog3(ALKBH3)によるRNAメチル化修飾制御の意義
Author(s)	上田, 裕子
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/72184">https://doi.org/10.18910/72184</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博 士 論 文

癌細胞におけるAlkB homolog3(ALKBH3)による  
RNAメチル化修飾制御の意義

学位申請者 上田 裕子

## 目次

目次	1
緒論	2
本論	4
第1章 膵癌における ALKBH3 の検出と評価	4
第1節 実験材料	4
第2節 実験方法	7
第3節 膵癌臨床検体における ALKBH3 の発現解析と術後予後の解析	9
第4節 膵癌細胞株 PANC-1 における ALKBH3 発現抑制時の表現型解析	11
第5節 膵癌細胞株 <i>xenograft</i> モデルにおける ALKBH3 発現抑制時の表現型解析	12
第6節 小括	12
第2章 ALKBH3 による RNA メチル化制御基質の同定	13
第1節 実験材料	13
第2節 実験方法	17
第3節 ALKBH3 により脱メチル化される RNA 修飾の同定	22
第4節 ALKBH3 により脱メチル化される tRNA の同定	24
第5節 小括	27
第3章 癌細胞における ALKBH3 による tRNA 脱メチル化制御が翻訳機構に与える影響	28
第1節 実験材料	28
第2節 実験方法	29
第3節 ALKBH3 による tRNA メチル化制御を介したタンパク質合成に対する影響	31
第4節 細胞内における ALKBH3 による tRNA 脱メチル化制御を介したタンパク質	32
翻訳制御	
第5節 ALKBH3 発現抑制が tRNA の安定性に対する影響	32
第6節 ALKBH3 発現抑制により翻訳過程で影響を受けるタンパク質	33
第7節 小括	34
総括	35
結論	37
謝辞	38
参考文献	39
略語一覧	44

## 緒論

2003年にヒトゲノム計画が完了し、疾患と遺伝子の関係が解明されることが期待されたが、DNA配列の異常のみで説明がつく疾患は一部に過ぎず、DNAの塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構の存在が示された。このDNAの塩基配列の変化を伴わない、DNAのメチル化やヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化などの後天的修飾による遺伝子発現制御機構は「エピジェネティクス」と呼ばれている。これらエピジェネティクスの異常は、癌の発生、悪性化の要因となっており(1)、新たな癌治療創薬ターゲットとして注目されている。

一方、RNAも転写後に様々な修飾を受けることが知られおり、メチル化、水酸化、アセチル化、チオール化など100種類を超える多様な修飾が存在する(2)。これらRNA修飾は、transfer RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA), ribosomal RNA (rRNA)をはじめとする様々なRNAに存在し(2)、それぞれのRNAが細胞内で適切に機能する上で非常に重要であると考えられている。

1970年代にはじめてその存在が明らかとなった mRNA 中の N6-methyladenosine (m6A)は、発見当時は RNA 中のどこに存在するか不明であった。近年、修飾塩基に対する抗体の開発と次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析の進歩により、m6A は mRNA にランダムに存在するのではなく、3'非翻訳領域 (3'-untranslated region: 3'-UTR)やストップコドン周辺に集中して存在することが明らかとなった(3-5)。さらに、m6A は、メチル化酵素 METTL3, METTL14, WTAP (6)、脱メチル化酵素 fat mass and obesity-associated protein (FTO)(7), AlkB homolog 5 (ALKBH5) (8)により可逆的にメチル化が制御されることが明らかとなった。また m6A を認識しその機能を果たす分子として YTHDF1-3 が同定された(9)。これら認識分子は、m6A を目印として YT521-B homology domain family (YTHDF)1, YTHDF3 は mRNA の翻訳促進に(10-12)、YTHDF2 は mRNA の分解に寄与している (Fig.1) (9,13)。

m6A の制御分子機構が明らかとなる中で、m6A 修飾が幹細胞の分化(14, 15)、概日リズムの調節(16)、癌(17, 18)を含む疾患と関連があることがわかってきた。このように、遺伝子発現が RNA 修飾変化により制御される機構は「エピトランスクリプトミクス」という新たな概念として提唱され始めてい

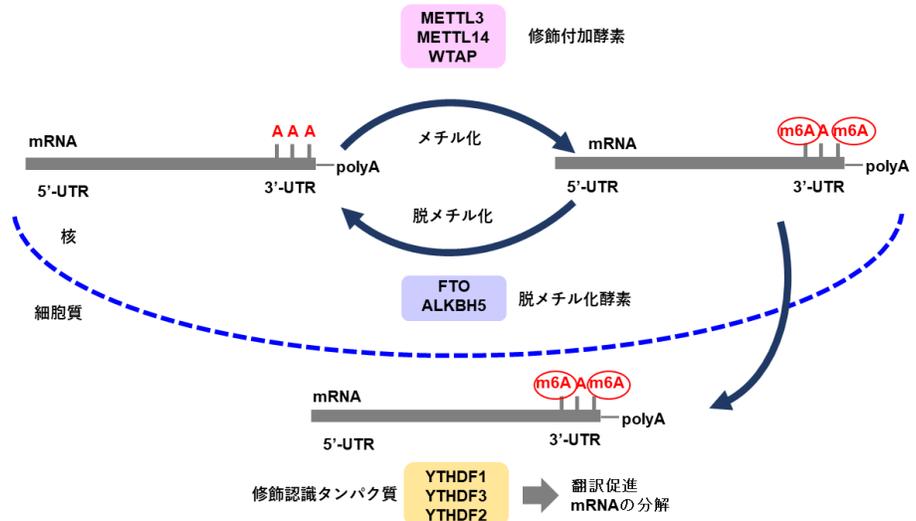


Fig.1. Regulation of gene expression by N6-methyladenine (m6A) in mRNA.

る。しかしながら、多くの RNA 修飾の生物学的意義やその制御分子機構さらには疾患との関連性について十分に明らかとなっていない。

本研究室では、前立腺癌の治療標的分子として 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase ドメインを有する DNA/RNA 脱メチル化酵素 prostate cancer antigen-1 (PCA-1)を同定し(19)、前立腺癌細胞株を用いた *in vitro* および *in vivo* 解析において、PCA-1 の発現抑制が癌細胞の増殖抑制作用並びに抗腫瘍作用を示すことを報告している(20)。PCA-1 は、大腸菌の AlkB とアミノ酸レベルで 23%と高い類似性を示すヒト ALKBH ファミリーに属するタンパク質であり、現在 ALKBH3 と呼ばれている。ALKBH3 は、大腸菌タンパク質 AlkB と同様にメチル化剤で誘導された一本鎖 DNA の 1-methyladenine (m1A)、3-methylcytosine (m3C)を脱メチル化する DNA 損傷修復酵素である(Fig.2) (21)。一方、ALKBH3 は、メチル化剤により誘導された RNA の m1A、m3C も脱メチル化し RNA 損傷修復酵素として機能することが知られている(22)。しかしながら、前述のとおり RNA には m1A や m3C を含む多種の修飾が存在していることから、ALKBH3 はメチル化損傷時のみならず、生理的にメチル化された RNA 修飾の脱メチル化を行っている可能性が考えられ、新たなエピトランスクリプトミクス制御分子として機能することが推測された。

本研究では、最も難治性の癌である膵癌臨床検体において ALKBH3 が高発現していることを示し、ヒト膵癌細胞株を用いた解析から、ALKBH3 が膵癌の病態に促進的に機能していることを示唆した。さらに、これまでメチル化剤により誘導されたメチル化 RNA の脱メチル化酵素として知られていた ALKBH3 が、生理的にメチル化された RNA も基質として特異的に脱メチル化活性を発現することも認めた。さらに tRNA の脱メチル化に着目し、膵癌細胞株を用いた解析により、ALKBH3 の発現抑制が、tRNA の脱メチル化制御を介してタンパク質翻訳制御していることを明らかにした。これらの研究結果は ALKBH3 の高発現がエピトランスクリプトミクスのかく乱を介して膵癌の発症や悪性化に関わる新しい機序を示すものである。

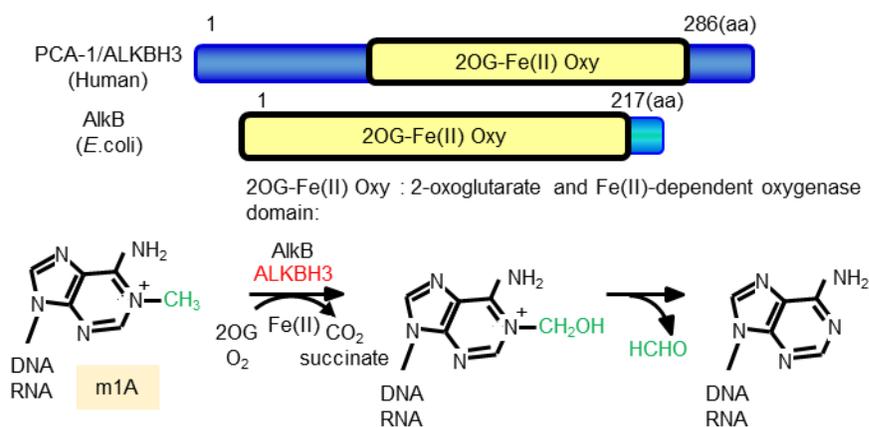


Fig.2. Oxidative demethylation of 1-methyladenine and 3-methylcytosine residues in DNA/RNA by AlkB and ALKBH3.

## 本論

### 第1章 膵癌における ALKBH3 の検出と評価

現在最も難治性の癌である膵癌における ALKBH3 の発現を、膵癌臨床検体を用いて検討した。さらに、ALKBH3 の癌細胞における機能を膵癌細胞株、膵癌細胞株 *xenograft* モデルを用いて評価した。

#### 第1節 実験材料

##### 臨床検体

奈良県立医科大学消化器・総合外科の協力により、正常膵管、膵上皮内腫瘍、膵癌の臨床検体および 1996 年から 2008 年の期間に手術を受けた 116 例の膵癌術後検体を得た。検体は、10%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定後、パラフィン包埋した。

##### 免疫組織化学染色

- Target Retrieval Solution, pH 9.0 (DAKO)
- Antibody Diluent (DAKO)
- 一次抗体
  - 抗 Ki67 モノクローナル抗体 (Zymed Laboratories)
  - 抗 PCA-1/ ALKBH3 血清 (当研究室で作製)(19)
- 二次抗体
  - EnVision+ Single Reagent (HRP. Mouse) (DAKO)
  - EnVision+ Single Reagent (HRP. Rabbit) (DAKO)

##### TUNEL 染色

- Tumor TACS In Situ Apoptosis Detection Kit (R&D System)

##### 細胞培養

- ヒト膵癌細胞株 PANC-1 (American Type Culture Collection)
- ヒト膵癌細胞株 MIA Paca-2 (American Type Culture Collection)
- ヒト膵癌細胞株 PK-1 (American Type Culture Collection)
- ヒト膵癌細胞株 BxPC-3 (American Type Culture Collection)
- ヒト膵癌細胞株 PC-1 (American Type Culture Collection)
- FCS

- 100 mM ピルビン酸ナトリウム (Wako)
- RPMI-1640 (Wako)
- DMEM (Wako)

#### siRNA トランスフェクション

- Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- siRNA は GeneDesign 社から購入した。本研究で用いた siRNA の配列を以下に示す。

	Sense	Antisense
Control siRNA	auccgcgcgauaguacguaTT	uacguacuaucgcgggauTT
ALKBH3 siRNA#1	gagagaagcuucacugaaaTT	uuucagugaagcuucucucTT
ALKBH3 siRNA#2	gaaagaagcugacuggauaTT	uaaccagucagcuucuuucTT

#### RNA 抽出, cDNA 合成

- illustra RNA spin (GE Healthcare)
- QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN)
- miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)
- Experion RNA StdSens 解析キット (BIO-RAD)
- PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa)

#### Real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

- SYBR Premix Ex Taq (Takara)
- Primer

Primer Name	Sequence
ALKBH3 forward	5'-TAC CAC TGC TAA GAG CCA TCT CC-3'
ALKBH3 reverse	5'-GAC AGG CTG ATT TCA TAC ACA CC-3'
GAPDH forward	5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG-3'
GAPDH reverse	5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG-3'

#### Western blot

- Cell lysis buffer
  - RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific)
  - Protease inhibitor (Nacalai Tesque, Inc.) RIPA buffer に終濃度 1%となるように添加した。
  - Phosphatase inhibitor (Nacalai Tesque, Inc.) RIPA buffer に終濃度 1%となるように添加した。

- 6×sample buffer: 0.35 M Tris-HCl (pH6.8), 10% SDS, 30% glycerol, 0.018% BPB
- 10%ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad)
- PVDF 膜 (Millipore)
- SDS-PAGE running buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS
- TBS-T: 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween20
- Transfer buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol
- Blocking buffer: 5% skim milk (森永)/ TBS-T
- 抗体希釈 buffer
  - Can Get Siganl solution 1 (TOYOBO)
  - Can Get Siganl solution 2 (TOYOBO)
- 一次抗体
  - 抗 ALKBH3 抗体 (Millipore)
  - 抗β-actin モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich)
- 二次抗体
  - HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体、HRP 標識抗 mouse IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)
- 発光試薬
  - ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)

#### 細胞増殖能解析

- WST-1 (DOJINDO)
- 1-methoxy PMS (DOJINDO)

#### 細胞浸潤能・細胞遊走能の解析

- CIM Plate (Roche)
- xCELLigence DP system (Roche)
- マトリゲル (Corning)
- フィブロネクチン (Sigma-Aldrich)

#### 膵癌細胞株 PANC-1 を用いた Xenograft モデルを用いた ALKBH3 の評価

- C.B-17/lcr-scid/scid Jcl (SCID) マウス, 6 週齢雌 (CLEA Japan)
- AteloGene Local Use (Koken)
- ALKBH3 siRNA (QIAGEN): 5'-cagaggauuaacuuaucTT

## 第2節 実験方法

### 膵癌術後予後の推定

膵癌術後検体 116 例について、抗 ALKBH3 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、ALKBH3 陽性率 20%以上を ALKBH3 低発現群、ALKBH3 陽性率 50%以上を ALKBH3 高発現群と 2 群に分類した。その 2 群について Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線の推定を行った。2 群間の生存曲線の比較は log-rank 検定を用いた。

### 免疫組織化学染色

ホルマリン固定パラフィン包埋したサンプルブロックを 5  $\mu\text{m}$  に薄切後、エタノール系列で脱パラフィンおよび脱水処理を行った。その後、Target Retrieval Solution, pH 9.0 を用いて熱処理により抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼの不活化のために、切片を 0.3%過酸化水素水に浸し、室温で 10 分間インキュベートした後、PBS で 3 回洗浄した。その後、Antibody Diluent で希釈した一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。二次抗体を室温下で 1 時間反応させた後、DAB による発色を行った。ヘマトキシリンによるカウンターステイン後に脱水・透徹して封入した。臨床検体における ALKBH3 の評価は、1000 細胞当たりの ALKBH3 陽性細胞の割合で行った。

### TUNEL 染色

摘出腫瘍をホルマリン固定パラフィン包埋し、5  $\mu\text{m}$  に薄切後、Tumor TACS In Situ Apoptosis Detection Kit を用いて、添付のプロトコールに従いアポトーシス陽性細胞の検出を行った。

### 細胞培養

PANC-1 および PK-1 細胞株は 10% FCS を添加した RPMI-1640 で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。MIA Paca-2 細胞株は 10% FCS を添加した DMEM で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。BxPC-3 および AsPC-1 細胞株は 20% FCS および 1 mM ピルビン酸ナトリウムを添加した RPMI-1640 で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。

### siRNA のトランスフェクション

PANC-1 細胞株に Lipofectamine 2000 を用いて siRNA をトランスフェクションした。6 well plate に  $1 \times 10^5$  cells/well 播種し、希釈した siRNA (終濃度 10 nM) と Lipofectamine 2000 の複合体を播種した細胞に添加した。

### RNA 抽出, cDNA 合成

ALKBH3 の発現量測定に用いた RNA は、5 種類の細胞株から各々、illustra RNA spin を用いて、添付のプロトコールに従って抽出した。

ALKBH3 を発現抑制した細胞からは、以下の方法で RNA を抽出した。トランスフェクション後 48 時間の細胞を回収し、細胞ペレットを PBS で 2 回洗浄した後、700  $\mu$ L の QIAzol Lysis Reagent 添加しホモジナイズした。miRNeasy Mini Kit を用い、添付のプロトコールに従い total RNA を抽出した。抽出した total RNA の品質は、Experion RNA StdSens 解析キットを用いて、Experion 自動電気泳動システム (BIO-RAD) で確認した。得られた total RNA 500 ng を用いて、PrimeScript RT reagent Kit を用いて添付のプロトコールに従い cDNA 合成後、nuclease-free H<sub>2</sub>O により 10 倍希釈して実験に使用した。

### Real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

以下に示す組成に従ってサンプルを調製し、LightCycler (Roche)を用いて測定した。

サンプル組成		Real-time PCR条件		
		Gene	Condition	Cycle
SYBR Premix Ex Taq II	5.0 $\mu$ L	ALKBH3	95°C 30 sec	1
10 $\mu$ M Forward primer	0.2 $\mu$ L		95°C 5 sec	55
10 $\mu$ M Reverse primer	0.2 $\mu$ L		60°C 30 sec	
cDNA	1.0 $\mu$ L	GAPDH	95°C 30 sec	1
Nuclease free water	3.6 $\mu$ L		95°C 15 sec	45
Total volume	10.0 $\mu$ L		60°C 30 sec	
			72°C 15 sec	

### ウェスタンブロット

トランスフェクション後 48 時間の細胞を回収し、細胞ペレットを PBS で 2 回洗浄した後、Cell lysis buffer で懸濁した。氷上で 5 分間インキュベート後、14,000 g で 15 分間遠心した上清をタンパク質ライセートとした。ウェスタンブロットには、タンパク質ライセートに 6×Sample buffer を加えて 95°C、10 分間インキュベートし、熱変性させたサンプルを用いた。SDS-PAGE はポリアクリルアミドゲルを用いて、200 V 定電圧下で行った。PVDF 膜をメタノールと滅菌水で親水化処理し、Transfer buffer で 5 分間振とうした後、トランスファーを行った。その後メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄し、5%スキムミルク溶液で 1 時間のブロッキングを行った。再度 TBS-T で 3 回洗浄し、一次抗体を 4°Cで一晩反応させた。翌日メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄し、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、再び TBS-T による洗浄を行った後、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents を用いて発光させ、ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare) によるバンドの撮影を行った。

### 細胞増殖能解析

トランスフェクション後 48 時間に細胞を剥離し、96 穴プレートに 10<sup>3</sup> cells/well で播種した。24 時間後から 24 時間ごとに 6 日間、WST-1 溶液および 1-methoxy PMS 溶液 を 9:1 で混合したものを各ウェル 10  $\mu$ l 添加し、2 時間後に 450 nm で吸光度を測定した。対照波長として 630 nm を使用した。

### 細胞浸潤能解析

CIM Plate の Upper chamber を 1%マトリゲルでコーティングした。Lower chamber に化学誘因物質として 20% FCS を含む RPMI-1640 を添加した。トランスフェクション後 48 時間に細胞を剥離し、Upper Plate に  $4 \times 10^4$  cells/well となるように無血清培地に懸濁して再播種した。浸潤能は、リアルタイム細胞アナライザー xCELLigence DP (ACEA Biosciences) でマトリゲルを浸潤する細胞数を数値化することにより評価した。

### 細胞遊走能解析

CIM Plate の Upper chamber を 10  $\mu$ g/mL フィブロネクチンでコーティングした。Lower chamber に化学誘因物質として 15% FCS を含む RPMI-1640 を添加した。トランスフェクション後 48 時間に細胞を剥離し、Upper Plate に  $4 \times 10^4$  cells/well となるように無血清培地に懸濁して再播種した。遊走能は、リアルタイム細胞アナライザー xCELLigence DP (ACEA Biosciences) でフィブロネクチン上を走化する細胞数を数値化することにより評価した。

### 膵癌細胞株 PANC-1 を用いた Xenograft モデルを用いた ALKBH3 の評価

PANC-1 細胞株  $4 \times 10^6$  cells を SCID マウスの皮下に移植し、移植後 10 日目より AteloGene と混合した ALKBH3 siRNA および Control siRNA を腫瘍周囲に投与した。投与は、1 nmol/匹、週 2 回、2 週間投与した。腫瘍体積は、次の式を用いて算出した。腫瘍体積 = (腫瘍長径)  $\times$  (腫瘍短径)<sup>2</sup>  $\times$  0.5  
細胞移植後 28 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍重量の測定を行った。

### 統計解析

特に記載がない限り、2 群間の検定は、Student's t-test を用いて行った。

### 第 3 節 膵癌臨床検体における ALKBH3 の発現解析と術後予後の解析

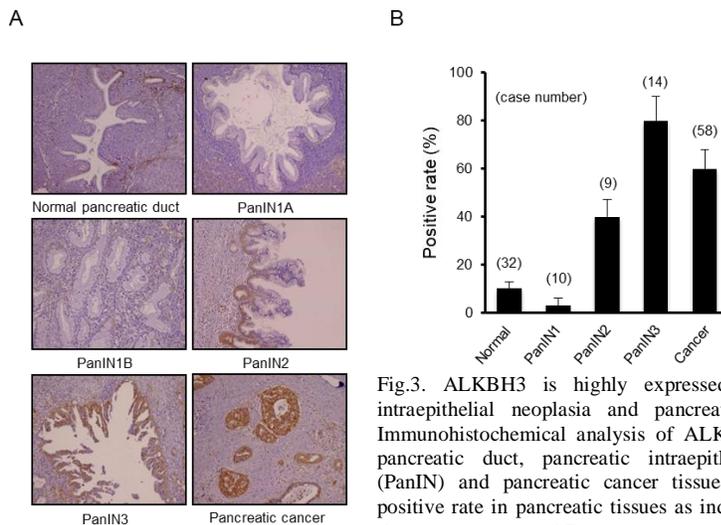


Fig.3. ALKBH3 is highly expressed in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic cancer. (A) Immunohistochemical analysis of ALKBH3 in normal pancreatic duct, pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and pancreatic cancer tissue. (B) ALKBH3 positive rate in pancreatic tissues as indicated. Data are shown as mean  $\pm$  S.D.

前立腺癌で高発現する分子として同定された ALKBH3 が、膵癌においても高発現し癌の悪性化に寄与する可能性があるか、検討を行うこととした。その結果、膵癌病理組織の約 60%において ALKBH3 の高発現が認められた。また、膵癌の前癌病変とされる膵上皮内腫瘍においてもグレードの上昇に伴い ALKBH3 の陽性率が高いことが明らかとなった (Fig.3A, 3B)。さらに、膵癌臨床

検体 116 例に対して免疫組織化学染色を行ったところ、癌組織の全症例において ALKBH3 陽性を示す染色像が得られた。全癌組織での ALKBH3 陽性率の中央値の平均は 62.5%であった。これら ALKBH3 陽性を示した検体を ALKBH3 の陽性率 20%以下を低発現群、陽性率 50%以上を高発現群として分類したところ(Fig.4A)、浸潤性を示す T 因子および病期ステージとの高い相関関係が認められた(Table 1)。さらに、ALKBH3 高発現群では、低発現群に比べて術後予後が悪いことが明らかとなった(Fig.4B)。

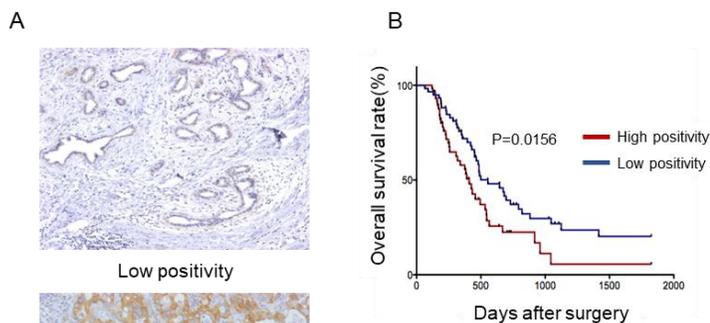


Fig.4. High expression of ALKBH3 is correlated with poor prognosis after surgery. (A) Immunohistochemical staining of ALKBH3 in pancreatic cancer tissue. ALKBH3 positive rate 20 -50% was defined as low positivity, while >50% was defined as high positivity. Representative images are shown as indicated. (B) Overall survival of 116 patients with pancreatic cancer associated with ALKBH3 status. Tumors with high positivity of ALKBH3 expression had significantly poor prognosis compared to those with low positivity (P=0.0156).

Table 1. Clinicopathological characteristics according to ALKBH3 expression

Characteristics	ALKBH3 low (n=59)	ALKBH3 high (n=57)	P value
Age, y	66 (42-81)	66 (33-80)	0.6480
Gender			
Male	33 (55.9%)	34 (59.7%)	0.6854
Female	26 (44.1%)	23 (40.4%)	
Histopathological grading			
G1	17 (28.8%)	17 (29.8%)	0.6156
G2	34 (57.6%)	31 (54.4%)	
G3	5 (8.5%)	8 (14.0%)	
G4	3 (5.1%)	1 (1.8%)	
pT category			
pT1/pT2/pT3	53 (89.9%)	40 (70.2%)	0.0079
pT4	6 (10.2%)	17 (59.6%)	
pN category			
pN0	28 (47.5%)	19 (40.4%)	0.1214
pN1	31 (52.5%)	38 (59.6%)	
pM category			
pM0	57 (96.6%)	50 (87.7%)	0.0735
pM1	2 (3.4%)	7 (12.3%)	
UICC stage			
IA/IB	14 (23.7%)	7 (12.3%)	0.0144
IIA/IIIB	38 (64.4%)	29 (50.9%)	
III	5 (8.5%)	14 (24.6%)	
IV	2 (3.4%)	7 (12.3%)	

#### 第4節. 膵癌細胞株 PANC-1 における ALKBH3 発現抑制時の表現型解析

膵癌臨床検体において ALKBH3 の高発現が認められたことから、ヒト膵癌細胞株を用いて表現型解析を行った。表現型解析を行うにあたり、5種類の膵癌細胞株 MIA Paca-2, PANC-1, PK-1, BxPC-3, AsPC-1 における ALKBH3 mRNA の発現を調べた。その結果、最も発現の高い PANC-1 を以降の解析に用いることとした (Fig.5)。ヒト膵癌細胞株 PANC-1 において異なる2種類の ALKBH3 siRNA を用いて ALKBH3 を発現抑制したところ、トランスフェクション後 48 hr において、ALKBH3 mRNA の発現量は約20%にまで低下した(Fig.6A, 6B)。この2種類の ALKBH3 siRNA を用いて、

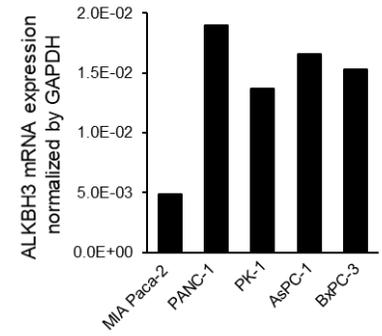


Fig. 5. ALKBH3 mRNA expression levels in various pancreatic cancer cell lines.

PANC-1 細胞株における細胞増殖能を WST-1 法で評価したところ、ALKBH3 発現抑制により増殖能の低下が認められた (Fig.6C)。癌の特性の1つとして「浸潤能および転移能の活性化」が挙げられる(23)。そこで、ALKBH3 の浸潤能および遊走能に与える影響を細胞の状態変化を電気抵抗値として測定可能な xCELLigence を用いて評価した。浸潤能はマトリゲルへの浸潤性で、遊走能はフィブロネクチン上の走化性としてそれぞれ評価した。その結果、ALKBH3 の発現抑制により浸潤能および遊走能の低下が認められた (Fig.6D, 6E)

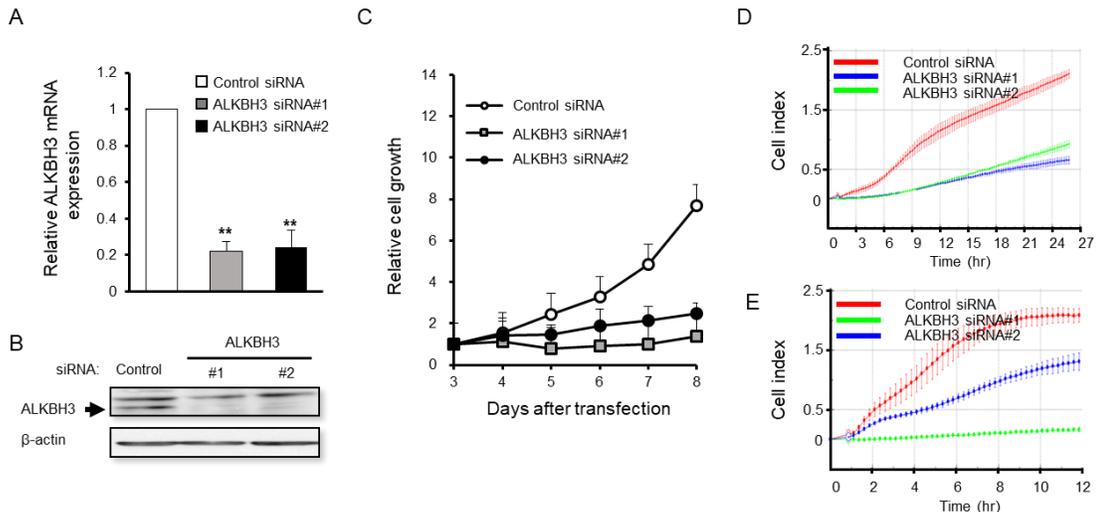


Fig. 6. ALKBH3-knockdown decreases cell proliferation, cell invasion and cell migration in PANC-1 cells. (A) The relative expression of ALKBH3 mRNA was determined by quantitative real-time PCR. ALKBH3 expression was significantly decreased in PANC-1 cells. Data are shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \*\*p < 0.01. (B) Cell lysates were immunoblotted with anti-ALKBH3 and anti- $\beta$ -actin antibodies. (C) Decreased cell growth of ALKBH3-knockdown PANC-1 cells. Cell growth was assessed using WST-1 assay. Data are shown as mean  $\pm$  S.D. (D) Decreased cell invasion in ALKBH3-knockdown cells. Invasion assay was performed using 1% matrigel-coated CIM-plate 16. (E) Decreased cell migration in ALKBH-knockdown cells. Migration assay was performed using 10  $\mu$ g/ml fibronectin-coated CIM-plate 16. The media containing 20% and 15% FCS were used as a chemoattractant in the lower chamber for (D) and (E), respectively.

## 第5節. 膵癌細胞株 *xenograft* モデルにおける ALKBH3 発現抑制時の表現型解析

*In vitro* における解析から、膵癌細胞株において ALKBH3 の発現抑制が増殖や浸潤能の抑制を誘導することが明らかとなった。そこで、*in vivo* における ALKBH3 の膵癌細胞に対する評価を行った。膵癌細胞株 PANC-1 を SCID マウスの皮下に  $4 \times 10^6$  個移植した。移植後 10 日目より、ALKBH3 siRNA および control siRNA を週 2 回、2 週間にわたって投与したところ、ALKBH3 siRNA 投与群では control siRNA 投与群に比べて、有意な腫瘍退縮効果が認められた (Fig.7A, 7B)。さらに摘出した腫瘍を免疫組織化学染色により ALKBH3 の発現を調べた

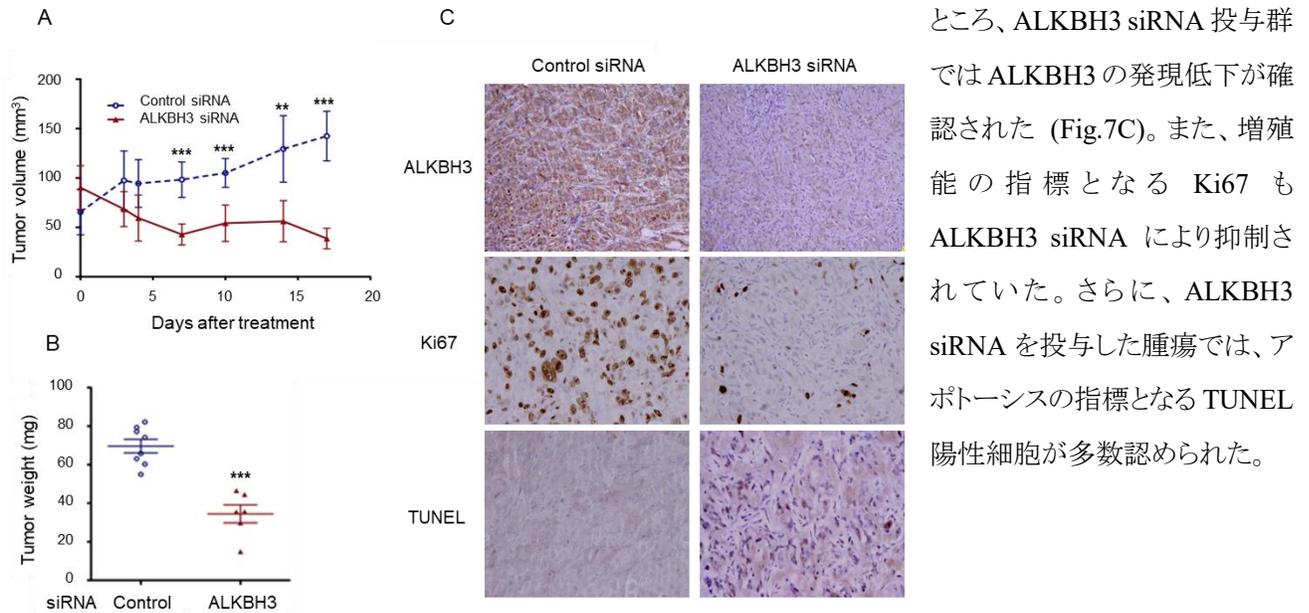


Fig.7. ALKBH3 siRNA demonstrates a substantial antitumor effect *in vivo*. (A) SCID mice were inoculated s.c. with  $4 \times 10^6$  PANC-1 cells. Mice were then locally injected either control siRNA (n = 8) or ALKBH3 siRNA with AteloGene (n = 6) on days 0, 3, 7, and 10. Data are shown as mean  $\pm$  S.D. (Control siRNA n=8, ALKBH3 siRNA n=6). \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 vs control siRNA. (B) Tumor weight from ALKBH3 siRNA- or control siRNA-treated mice were measured at sacrifice on 28 days after tumor cell injection. Each symbol represents an individual mouse; long horizontal lines indicate the mean tumor weight at sacrifice. (n=8 for Control siRNA, n=6 for ALKBH3 siRNA). \*\*\*p < 0.001 vs control siRNA. (C) Immunohistochemical staining. A significant decrease in ALKBH3 and Ki67 expression is evident in tumor tissue samples from ALKBH3 siRNA-treated mice compared to those from mice given control siRNA. TUNEL-positive cells were increased in tumor tissue samples from ALKBH3 siRNA-treated mice compared to those from mice given control siRNA.

## 第6節 小括

1. 膵癌臨床検体において ALKBH3 は高発現していた。
2. ALKBH3 の高発現は、術後予後不良と高い相関性を示した。
3. ヒト膵癌細胞株 PANC-1 において、ALKBH3 発現抑制により増殖能、浸潤能、遊走能の低下が認められた。
4. 膵癌細胞株 *Xenograft* モデルにおいて、ALKBH3 の発現抑制により腫瘍退縮作用が認められた。

## 第2章 ALKBH3 による RNA メチル化制御基質の同定

RNA には、100 種類以上の修飾が存在することが知られているが(2)、その多くの修飾について生理的意義並びに制御分子についてほとんど明らかとなっていない。一方、ALKBH3 は、メチル化剤により誘導された RNA の m1A、m3C を 2OG, Fe(II)依存的に酸化的脱メチル化し RNA 損傷修復酵素として機能することが知られている(19)。ALKBH3 はメチル化損傷時のみならず、生理的にメチル化された RNA の脱メチル化の脱メチル化にも関与している可能性があると考えられたため、ALKBH3 による RNA メチル化制御基質の同定を行うこととした。

### 第1節 実験材料

#### カイコリコンビナント ALKBH3 の作製

- FLAG-His-ALKBH3 発現ベクター (Link Genomics)
- ABv バキュロウイルス DNA (Sysmex)
- カイコ培養細胞 BmN 細胞 (Sysmex)
- Lysis buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM benzamidine, 1 mM phenylmethylsulfonyl, and 1 mM DTT
- Elution buffer A: liner gradient of 60 mM to 280 mM imidazole in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10% glycerol, and 0.1% Triton X-100
- Elution buffer B: liner gradient of 50 mM to 500 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol, and 0.1% Triton X-100
- Binding buffer: 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 10% glycerol, and 0.1% Triton X-100
- Dialysis buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 50% glycerol, and 0.1% Triton X-100
- AKTA Prime Plus (GE Healthcare)
- HisTrap HP affinity column, 5 mL, 1.6×2.5 cm (GE Healthcare)
- Mono Q 5/50 GL anion ion exchange column (GE Healthcare)
- 10%ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad)
- CBB 染色液: SimplyBlue SafeStain (Thermo Fisher Scientific)

#### Total RNA, small RNA, large RNA の抽出

- QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN)
- miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)
- RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN)
- Experion RNA StdSens 解析キット (BIO-RAD)

## 6 種類の RNA 画分の分画精製

- 変性アガロースゲル: 1% agarose, 2% formaldehyde, and 1×MOPS
- 変性ポリアクリルアミドゲル: スーパーセップ TMRNA, 15%, 4M Urea (Wako)
- 1×MOPS buffer (Nacalai tesque)
- 0.5×TBE: 6.5 mM Tris, 2.25 mM Boric acid and 0.125 mM EDTA, pH 8.3
- Gel loading buffer II: 95% Formamide, 18 mM EDTA and 0.025% each of SDS, XC, and BPB (Thermo Fisher Scientific)
- SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific)
- Gel elution buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.25 M Sodium acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0), and 0.25% SDS
- フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25: 24: 1 (PCI) (Nacalai tesque)
- クロロホルム (Wako)
- エタノール (Wako)
- UltraPure Glycogen (Thermo Fisher Scientific)
- Magnosphere UltraPure mRNA Purification Kit (TaKaRa)
- Agilent Small RNA キット (Agilent)

## カイコリコンビナントタンパク質を用いた RNA の脱メチル化反応

- カイコリコンビナント ALKBH3
- カイコリコンビナント ALKBH5 (Sysmex)
- Reaction buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM ascorbate, 0.1 mM 2OG, and 40 μM FeSO<sub>4</sub>

## ヌクレオチドのヌクレオシドへの分解

- Nuclease P1 (Wako)
- Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) (BAP) (TaKaRa)
- 1 M ammonium acetate (pH 5.3)
- LC/MS 用 超純水 (Wako)

## 質量分析装置を用いた RNA ヌクレオシドの定量

- 高速液体クロマトグラフ用 1 M 酢酸アンモニウム溶液 (Wako)
- LC/MS 用 超純水 (Wako)
- LC/MS 用 メタノール (Wako)
- Adenosine (Wako)

- Guanosine (Sigma-Aldrich)
- Cytidine (Sigma-Aldrich)
- Uridine (Sigma-Aldrich)
- 2'-O-methyladenosine (東京化成)
- N2,N2-dimethylguanosine (Toronto Research Chemicals)
- N4-acetylcytidine (Carbosynth)
- 5,2'-O-dimethyluridine (Carbosynth)
- N6-threonylcarbamoyladenosine (Bio log)
- 1-methylinosine (Toronto Research Chemicals)
- 5-methoxycarbonylmethyluridine (Carbosynth)
- 2'-O-methylcytidine (東京化成)
- 2'-O-methylguanosine (東京化成)
- 2'-O-methyluridine(東京化成)
- 7-methylguanosine (Santa cruz)
- Inosine (Wako)
- 5-methylcytidine (東京化成)
- 5-methyluridine (東京化成)
- 3-methylcytidine (Toronto Research Chemicals)
- N1-methyladenosine (Carbosynth)
- N6-methyladenosine (Carbosynth)
- N2-methylguanosine (Sigma-Aldrich)
- N1-methylguanosine (Carbosynth)
- 5-hydroxymethylcytidine (Berry & Associates)
- Pseudouridine (Carbosynth)
- 2'-deoxyguanosine 15N5 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)

抗 m1A 抗体を用いた RNA の免疫沈降

- Dynabeads Protein G (30 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific)
- Dithiothreitol, DTT (Wako)
- 抗 1-methyladenosine 抗体(MBL)
- RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific)
- RIP-Assay Kit *for microRNA* (MBL)

RIP-Assay kit for microRNA mi-Lysis Buffer, RIP-Assay Kit for microRNA mi-Wash Buffer, mi-Solution I, mi-Solution II, mi-Solution III, mi-Solution IV

- Lysis buffer: RIP-Assay kit for microRNA mi-Lysis Buffer, containing 1.5mM DTT and 200U/ml RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor
- Wash buffer: RIP-Assay Kit for microRNA mi-Wash Buffer, containing 1.5mM DTT and 200U/mL RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor
- Master Mix Solution: RIP-Assay Kit for microRNA, mi-Solution I: mi-Solution II=10 μL: 240 μL

#### DNAプローブを用いた tRNA の単離

- Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (10 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific)
- 1 × B&W buffer: 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA and 1 M NaCl
- 2 × B&W buffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA and 2 M NaCl
- Solution A: 0.1 M NaOH in DEPC-treated water
- Solution B: 0.05M NaCl in DEPC-treated water
- 6 × SSC: 0.9M NaCl and 0.09M Sodium Citrate
- 3 × SSC: 0.45M NaCl and 0.045M Sodium Citrate
- 1 × SSC: 0.15M NaCl and 0.015M Sodium Citrate
- 0.1 × SSC: 0.015M NaCl and 0.0015M Sodium Citrate
- 200 mM ビオチン化 ss DNA オリゴ (GeneDesign) (Table 2)

Table 2. The Sequences of tRNA isolation probes.

Probe Name	5'→3'	Probe Name	5'→3'
Ala01(UGC)	tggagatgcc ggggattgaacc ggggcct	Leu02(CAA)	tgtcagaagtgggattcgaacc cacgcctc
Arg01(CCU)	caccccagatgggactcgaacc cacaatcc	Lys01(CUU)	cgcccaacgtgggctc gaacc cac gacc c
Asn01(GUU)	cgccctgggtggc tc gaacc acc aacct	Met01(CAU)	tgcc cgtgtgaggatc gaactcac gacct
Asp01(GUC)	ctcccgtcgggaatcgaacc cggctctc	Met02(CAU)	tgcc cctctgaggatcgaactc aggaacct
Cys01(GCA)	agggggc accc ggattgaacc ggggactt	Pro01(CGG)	gggctcgtc cgggattgaacc cgggacct
Gln01(UUG)	aggtc caccgagattgaactcggatc gc	Ser01(CGA)	cgctgtgagcaggattgaacc tgcgc ggg
Gln02(UUG)	aggtc caccgagattcgaactcggattgc	Ser02(GCU)	cgacgaggatgggattcgaacc accgctg
Glu01(UUC)	ttcgttacc cgggaatcgaacc cgcgttaa	Thr01(CGU)	aggcacggac ggggttc gaacc ccgc gatct
Gly01(UCC)	tgcgttggcgggaatc gagc ccgggtcaa	Val01(UAC)	tggttcc actgggctcgaacc caggacct
His01(GUG)	tgccgtgactcggattcgaacc gaggttgc	Val02(CAC)	tgttccgcccagtttc gaacc cggggacct
Ile01(UAU)	tgctcc aggtgagc tc gaactcacaacct	Val03(AAC)	tgttccgcccagtttc gaacc cggggacct
Ile02(AAU)	tggcccgtagcgggattcgaacc cgcgaacct	Phe01(GAA)	tgcc gaaacc cgggattgaacc agggacct
iMet01(CAU)	tagcagaggatggtttagatccatcgacct	SeC01(UCA)	gcccgaaagggtgaattgaaccactctgtc
iMet02(CAU)	tagcagaggatggtttagatccatcgacct	Tyr01(GUA)	tccttcgagcc ggaatcgaaccagcgacct
Leu01(AAG)	tggcagcgggtgggattc gaacc cac gccc		

### 抗 m1A 抗体を用いた Immuno-northern blot

- 0.5×TBE: 6.5 mM Tris, 2.25 mM Boric acid and 0.125 mM EDTA, pH 8.3
- Gel loading buffer II: 95% Formamide, 18 mM EDTA and 0.025% each of SDS, XC and BPB (Thermo Fisher Scientific)
- 変性ポリアクリルアミドゲル: スーパーセップ TMRNA, 15%, 4M Urea (Wako)
- SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific)
- ナイロンメンブレン (Hybond N+, GE Healthcare)
- 一次抗体: 抗 1-methyladenosine (m1A) 抗体(MBL)
- 二次抗体: HRP 標識抗 mouse IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)

## 第 2 節 実験方法

### カイコリコンビナント ALKBH3 の作製

FLAG-His-ALKBH3 発現ベクターを ABv バキュロウイルス DNA とともに BmN 細胞にトランスフェクションし、リコンビナントウイルスを得た。カイコ蛹にリコンビナントウイルスを感染させ、6 日後に FLAG-His-ALKBH3 を発現したカイコ蛹を Lysis buffer 中でホモジナイズした。1% Triton X-100 を添加したホモジナイズ溶液を 4°C、1 時間インキュベートし可溶化し、その後 100,000g で 4°C、1 時間遠心した。得られたタンパク質ライセートは、Elution buffer A を用いて AKTA Prime Plus で HisTrap HP affinity column を用いて精製した。溶出液を Binding buffer で 5 倍に希釈した後、Elution buffer B を用いて AKTA Prime Plus で Mono Q 5/50 GL anion ion exchange column を用いて精製した。得られた溶出液を Dialysis buffer を用いて透析し、FLAG-His-ALKBH3 を含む最終生成物を得た。最終生成物は、SDS-PAGE を行い、CBB 染色により FLAG-His-ALKBH3 の発現を確認した。

### ウェスタンブロット

ウェスタンブロットには、精製したカイコリコンビナント ALKBH3 に 6×sample buffer を加えて 95°C、10 分間インキュベートし、熱変性させたサンプルを用いた。一次抗体には、抗 ALKBH3 抗体を、二次抗体には HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体を用いて、第 1 章、第 1 節に記載した手順に従って行った。

### Total RNA, small RNA, large RNA の抽出

膵癌細胞株 PANC-1 を剥離し、細胞ペレットを PBS で 2 回洗浄した後、700 μL の QIAzol Lysis Reagent を添加しホモジナイズした。total RNA は、miRNeasy Mini Kit を用いて、small RNA (200 nt 以下の RNA) および large RNA (200 nt 以上の RNA) は、miRNeasy Mini Kit と RNeasy MinElute Cleanup Kit を用いて添付のプロトコールに従ってそれぞれ抽出した。抽出した total RNA, small RNA および large RNA の品質を、Experion RNA StdSens 解析キットを用いて、Experion 自動電気泳動システム (BIO-RAD) で確認した。

## 6 種類の RNA 画分の分画精製

Total RNA および small RNA を等量の Gel loading buffer II を添加し、95°Cで 5 分間インキュベートした後、氷冷し熱変性させた。熱変性させた後、変性ポリアクリルアミドゲルで 200 V 定電圧下で電気泳動を行った。電気泳動後、ポリアクリルアミドゲルを SYBR Gold を含む  $0.5 \times$  TBE 中で 30 分間振盪し染色を行い、tRNA, 5S rRNA および 5.8S rRNA に相当するバンドを切り出した。

Large RNA を等量の Gel loading buffer II を添加し、95°Cで 5 分間インキュベートした後、氷冷し熱変性させた。熱変性させた後、変性アガロースゲルで 50 V 定電圧下で電気泳動を行った。電気泳動後、アガロースゲルを SYBR Gold を含む  $1 \times$  MOPS 中で 30 分間振盪、染色し、18S rRNA および 28S rRNA に相当するバンドを切り出した。切り出したバンドに 400  $\mu$ L の Gel elution buffer を添加し、37°Cで 1 時間インキュベートした。その後、15,000 rpm、室温で 10 分間遠心し、上清を分取した。上清の 2 倍量の PCI を添加し、15,000 rpm、37°Cで 10 分間遠心し、上清を分取した。さらに等量のクロロホルムを添加し、15,000 rpm、37°Cで 10 分間遠心し、上清を分取した。上清の 1/10 量の Glycogen および 2 倍量の 100%エタノールを添加し、-20°Cで 1 時間以上冷却する。冷却後、12,000 g、4°Cで 20 分間遠心し、上清を廃棄した後、氷冷した 80%エタノールを添加した。12,000 g、4°Cで 20 分間遠心し、上清を廃棄した後、RNA ペレットを風乾後、nuclease free water で再溶解した。

mRNA は、large RNA から Magnosphere UltraPure mRNA Purification Kit を用いて、添付のプロトコールに従い単離した。

単離した各 RNA は、Experion RNA StdSens 解析キットおよび Agilent Small RNA キットを用いて分離精製されていることを確認した。

## リコンビナントタンパク質を用いた RNA の脱メチル化反応

RNA とカイコリコンビナント ALKBH3 または ALKBH5 を重量比で 1: 0.5 となるように Reaction buffer に添加し、37°Cで 2 時間インキュベートした。反応終了後、エタノール沈殿により RNA を精製した。

## ヌクレオチドのヌクレオシドへの分解

500 ng の RNA 溶液 30  $\mu$ L に対し、1 ng/ $\mu$ L の 2'-deoxyguanosine 15N5 溶液を 5  $\mu$ L、0.1 M ammonium acetate (pH5.3)を 5  $\mu$ L、0.5 U/ $\mu$ L Nuclease P1 (Wako)を 1  $\mu$ L および超純水を 5  $\mu$ L 添加した後、45°Cで 2 時間インキュベートした。さらに 0.05 U の BAP を含む溶液を 5  $\mu$ L 添加し、37°Cで 2 時間インキュベートすることにより RNA をヌクレオシドにまで完全に分解した。さらに、0.1 N HCl を 1.3  $\mu$ L および超純水を 57  $\mu$ L 添加し、ボルテックスした後、さらにクロロホルム 20 mL を添加し、再びボルテックスした後、5,000 g で 5 分間の遠心分離により徐タンパクを行った。上清を遠心濃縮機 (TOMY)にて濃縮乾固した後、50  $\mu$ L の超純水にて再溶解し、10 ng/ $\mu$ L の RNA ヌクレオシド溶液とした。測定に際しては、修飾ヌクレオシドの測定には 1 ng/ $\mu$ L、非修飾ヌクレオシドの測定には 0.01 ng/ $\mu$ L のサンプルを用いた。

## 質量分析装置を用いた RNA ヌクレオシドの定量

RNA 中の修飾ヌクレオシド、非修飾ヌクレオシドの測定は以下の条件で行った。

### 【UPLC 分析条件】

- ・装置 ACQUITY UPLC H-Class (Waters)
- ・移動相 A : 5 mM 酢酸アンモニウム/超純水  
B : 5 mM 酢酸アンモニウム/メタノール
- ・流速 0.4 ml/分
- ・注入量 10  $\mu$ l
- ・カラム ACQUITY UPLC C18 CSH 1.7  $\mu$ m 2.1 $\times$ 100 mm (Waters)
- ・カラム温度 42°C

### ・グラジエント

時間 (分)	流速 (ml/分)	%A	%B
initial	0.4	99.0	1.0
6.0	0.4	68.0	32.0
6.5	0.4	1.0	99.0
9.5	0.4	1.0	99.0
10.0	0.4	99.0	1.0
15.0	0.4	99.0	1.0

### 【MS 分析条件】

- ・装置 Xevo TQ-S 四重極 MS/MS (Waters)
- ・イオン化モード Electrospray ionization (ESI) Positive
- ・キャピラリー電圧 0.5 kV
- ・脱溶媒ガス 1000 l/hr、400°C
- ・ソース温度 150°C

【モニターイオン】

Table 3. Selected reaction monitoring transitions and parameters for RNA samples

Compound Name	Symbol	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage	Collision energy
Adenosine	A	268.09	135.948	25	15
Guanosine	G	284.057	151.956	20	15
Cytidine	C	244.137	111.937	20	15
Uridine	U	245.164	112.84	15	15
2'-O-methyladenosine	Am	282.099	135.914	30	15
N2,N2-dimethylguanosine	m2,2G	312.105	179.979	20	20
N4-acetylcytidine	ac4C	286.085	153.905	10	10
5,2'-O-dimethyluridine	m5Um	273.094	126.922	10	10
N6-threonylcarbamoyladenine	t6A	413.107	280.966	10	15
1-methylinosine	m1I	283.078	150.916	20	10
5-methoxycarbonylmethyluridine	mcm5U	317.079	184.954	15	10
2'-O-methylcytidine	Cm	258.103	111.936	10	10
2'-O-methylguanosine	Gm	298.061	151.924	15	10
2'-O-methyluridine	Um	259.098	112.89	25	15
7-methylguanosine	m7G	298.2	166.1	10	14
Inosine	I	269.06	136.967	20	15
5-methylcytidine	m5C	258.083	125.939	10	15
5-methyluridine	m5U	259.077	126.93	10	10
3-methylcytidine	m3C	258.083	125.949	10	15
N1-methyladenosine	m1A	282.104	149.939	10	20
N6-methyladenosine	m6A	282.133	149.949	10	20
N2-methylguanosine	m2G	298.08	165.937	15	15
N1-methylguanosine	m1G	298.082	165.957	10	15
5-hydroxymethylcytidine	hm5C	274.087	141.94	25	10
Pseudouridine	Y	245.034	208.963	20	10
2'-deoxyguanosine 15N5	dG15N5	273.024	156.932	10	10

抗 m1A 抗体を用いた RNA の免疫沈降

1.5 mg の Dynabeads Protein G を洗浄した後、15 µg 抗m1A 抗体を含む 200 µL の Wash buffer に懸濁し、4°C で 2 時間インキュベートした。上清を除いた後、200 µL の Lysis buffer で洗浄した。その後、total RNA を 40 µg 含む 300 µL の Lysis buffer に再懸濁し、4°C で 2 時間インキュベートした。上清を除いた後、300 µL の Wash buffer で 4 回洗浄した。Dynabeads-抗体複合体に 250 µL の Master Mix Solution を添加し、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。さらに、150 µL の mi-Solution III を添加し、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。その後、上清を 2 µL の mi-Solution IV を添加したチューブに移した。その溶液に、400 µL の氷冷した 100%エタノールを添加し、混和した後、-20°C で 30 分間冷却後、4°C で 10 分間遠心した。2 µL の mi-Solution IV を再び添加した後、400 µL の氷冷した 100%エタノールを添加し、混和した後、-20°C で 30 分間冷却後、4°C で 10 分間遠心した。上清を除いた後、500 µL の氷冷した 70%エタノールで 2 回、RNA ペレットを洗浄した。RNA ペレットを 5-15 分間かけて風乾した後、nuclease-free water に再溶解した。再溶解した RNA は、フェノール・クロロホルム精製を行った後、エタノール沈殿した。

### シーケンス解析

抗m1A 抗体を用いた免疫沈降により得られた RNA を Ribo-Zero Magnetic Gold Kit (Human/Mouse/Rat) (Epicentre)を用いて添付のプロトコールに従い、細胞質 rRNA およびミトコンドリア rRNA を除去した。次に、SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep Kit (Agilent Technologies)を用いて次世代シーケンサーHiSeq 用ライブラリーを調製した。シーケンス解析には、HiSeq 2000 (Illumina)を用いた。解析プログラム CASAVA ver1.8.2 (Illumina)を用いて、得られたリードから FASTQ ファイルを作成した。FASTQ ファイルから信頼性の低いリードを除去した後、リファレンス hg19 (UCSC)へのマッピングを経て BAM ファイルを作成した。以上の解析は、MBL に委託した。

### ALKBH3 で脱メチル化される tRNA isodecoder の同定

シーケンス解析により作成された BAM ファイルを Partek Genomics Suites 6.6 (菱化システム) Mock, ALKBH3 間で SNP が存在するものを抽出し、さらに、その中で tRNA に該当するものを抽出した。m1Aを対象としているので、まず A または T でミスマッチ (non-A または non-T)が出現しているものを抽出した。抽出した候補を、以下の条件のもと選別を行った。リード数が 10 以上、ALKBH3 で脱メチル化させたサンプルでのミスマッチの割合が 10%以下かつ脱メチル化させていないサンプルでのミスマッチの割合が 20%以上を満たす。上記の過程で、抽出された ALKBH3 で脱メチル化の制御を受けると推定される tRNA 候補について Integrative Genomics Viewer (IGV) (Broad Institute)でマッピングデータの可視化し、修飾位置の同定を行った。

### DNA プローブを用いた tRNA の単離

シーケンス解析により ALKBH3 の基質であると同定した isodecoder のうちアミノ酸別に 26 種類、データベースでは m1A の存在が報告されているが、今回の解析で ALKBH3 の基質として同定されなかった 3 種類についてプローブを作製した。各 isodecoder の 3'末端側から 30 塩基に対して相補的な DNA 配列をプローブとして作製し、その 5'側にビオチン修飾を付加した (Table 2)。10  $\mu$ L の Dynabeads MyOne Streptavidine C1 を 1 mL の 1 $\times$  B&W buffer で 3 回洗浄した。続いて RNase 除去の目的でビーズと等量の Solution A を添加し、2 回洗浄した後、ビーズと等量の Solution B で洗浄した。その後、20  $\mu$ L の 2 $\times$  B&W buffer を添加し、5  $\mu$ g/ $\mu$ L となるように再懸濁した。そこへ 20  $\mu$ L 中に 50 pmol のビオチン化 ssDNA オリゴを含む溶液を添加し、室温で 15 分間ゆっくりと攪拌させた。上清を除いた後、40  $\mu$ L の 1 $\times$  B&W buffer で 3 回洗浄した。20  $\mu$ L の 6 $\times$  SSC を添加し、65 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートする。そこへ 20  $\mu$ L の RNA 溶液を添加し、10 分間インキュベートした。その後、3 時間ゆっくりと室温で攪拌させた。ビーズ-オリゴ DNA-RNA の複合体を 3 $\times$  SSC で 3 回、1 $\times$  SSC で 2 回、0.1 $\times$  SSC で数回洗浄した。0.1 $\times$ SSC での洗浄は、上清中の RNA 濃度を測定し、OD260 nm が 0 になるまで繰り返した。洗浄後、65 $^{\circ}$ Cに加熱した nuclease free water を 10  $\mu$ L 添加し、65 $^{\circ}$ Cで 5 分間インキュベートした後、上清を回収した。

### 抗 m1A 抗体を用いた Immuno-northern blot

単離した tRNA は、等量の Gel loading buffer II を添加し、95°C で 5 分間インキュベートした後、氷冷し熱変性させた。熱変性させた tRNA を変性ポリアクリルアミドゲルで 200 V 定電圧下で電気泳動を行った。電気泳動後、ポリアクリルアミドゲルを SYBR Gold を含む 0.5×TBE 中で 30 分間振盪し染色を行った。0.5×TBE buffer に浸したナイロンメンブレンにトランスファーした。その後メンブレンを DEPC-treated water で 1 分間すすぎ、風乾した。UV クロスリンカーで 120 mJ/cm<sup>2</sup> で UV 照射により、RNA をメンブレンに固定した。その後、2% スキムミルク溶液で 1 時間のブロッキングを行った。再度 TBS-T で 3 回洗浄し、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄し、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、再び TBS-T による洗浄を行った後、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents を用いて発光させ、ImageQuant LAS 4000mini によるバンドの撮影を行った。

### 第 3 節 ALKBH3 により脱メチル化される RNA 修飾の同定

ALKBH3 の生理的にメチル化された RNA に対する脱メチル化作用を明らかにするために、カイコリコンビナント ALKBH3 を作製した。作製したリコンビナントタンパク質は、CBB 染色により最終生成物として、ALKBH3 の分子量に相当する 37 kDa 付近に単一バンドを (Fig.8A)、抗 ALKBH3 抗体を用いたウェスタンブロットにより、得られたタンパク質が ALKBH3 であることを確認した (Fig.8B)。作製したカイコリコンビナント ALKBH3 を膵癌細胞株 PANC-1 から抽出した total RNA と反応させたところ、2OG、Fe(II) 依存的に m1A および m3C を脱メチル化した (Fig.9A, 9B)。このとき、熱処理により不活化した ALKBH3 と反応させても脱メチル化されなかった。一方、DNA においてその存在がよく知られている m5C については脱メチル化しなかった (Fig.9C)。

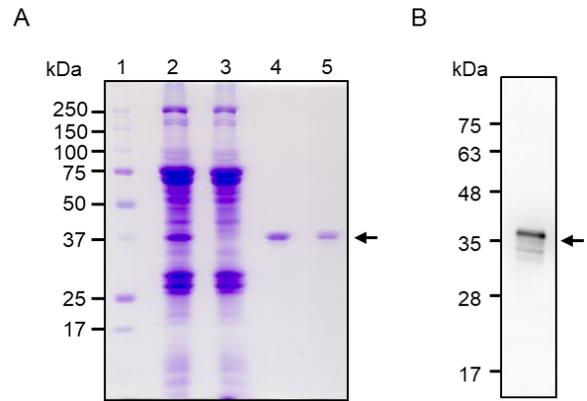


Fig.8. Purification of recombinant FLAG-His-ALKBH3 protein from silkworm pupae. (A) Recombinant FLAG-His-ALKBH3 protein were purified by affinity chromatography. Aliquots of the homogenate supernatant and purified fraction were resolved on a 10% SDS-PAGE gel and then stained with CBB. Lane 1, protein molecular weight markers; lane 2, input lysate; lane 3, flow-through fraction of nickel column; lane 4, eluent from nickel column; lane 5, eluent purified by ion-exchange column. (B) Western blot of purified recombinant FLAG-His-ALKBH3 protein using an anti-ALKBH3 antibody.

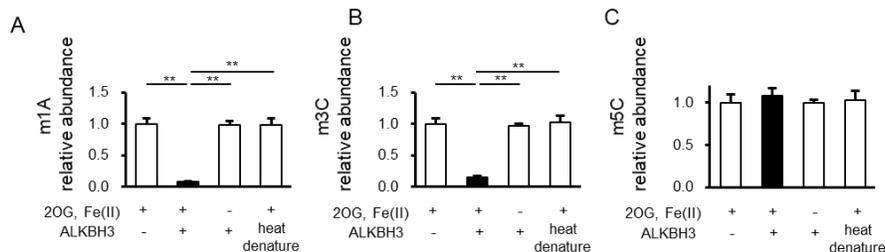


Fig. 9. Recombinant ALKBH3 demethylates m1A and m3C in total RNA. Total RNA purified from PANC-1 cells was incubated in the absence or presence of silkworm recombinant ALKBH3 and then enzymatically digested to nucleosides by treatment with nuclease P1 and alkaline phosphatase. The nucleosides were subjected to UPLC-MS/MS and the peak areas of methylated nucleosides were normalized for that of cytidine. Relative abundance levels of m1A (A), m3C (B) and m5C (C) are shown. ALKBH3 demethylated m1A and m3C in the presence of 2OG and Fe(II) but does not in their absence. Heat-denatured ALKBH3 was used as a non-enzymatic control. Data are shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \*\*p < 0.01.

細胞内には、tRNA, mRNA, rRNA など構造や機能の異なる RNA が存在している。ALKBH3 が基質とするメチル化 RNA 塩基はいずれの RNA 種に含まれるのか、tRNA、5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA、mRNA の 6 種の RNA 画分を分取し検討を行った(Fig.10)。その結果、分画した 6 種類の RNA 画分のいずれにおいても ALKBH3 は m1A と m3C を脱メチル化することが明らかとなり、さらに、tRNA については m6A も ALKBH3 の基質となる可能性が示された(Fig.11)。これまでに m6A は、mRNA に最も多く存在し、ALKBH ファミリー分子に属する ALKBH5、FTO が脱メチル化することが知られ

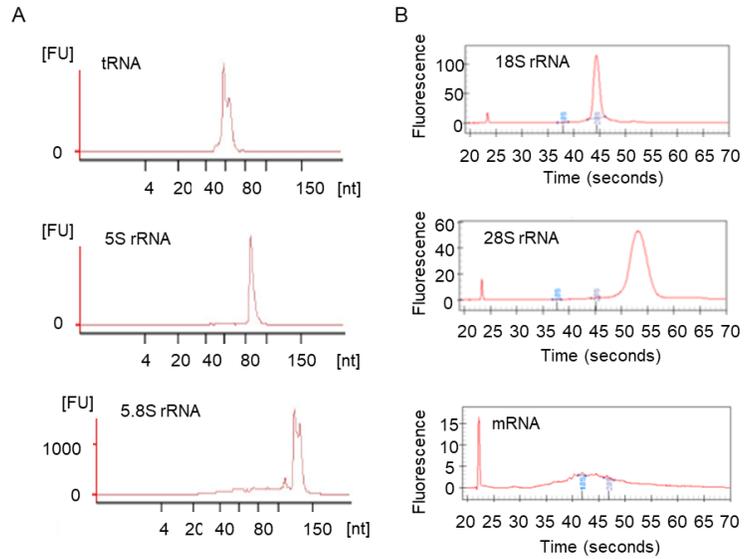


Fig. 10. Electropherogram of RNA fractions. (A) tRNA (Top), 5S rRNA (Middle) and 5.8S rRNA (Bottom) were analyzed using 2100 Bioanalyzer (Agilent) according to the manufacturer's protocol. (B) 18S rRNA (Top), 28S rRNA (Middle), and mRNA (Bottom) were analyzed using Experion (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol.

ている(7-8)。そこで、ALKBH3 と ALKBH5 の m6A に対する脱メチル化作用について比較したところ、ALKBH3 が tRNA の m6A を脱メチル化するのに対して、ALKBH5 は mRNA の m6A を脱メチル化し、両者の RNA に対する指向性が異なることが明らかとなった(Fig.12)。

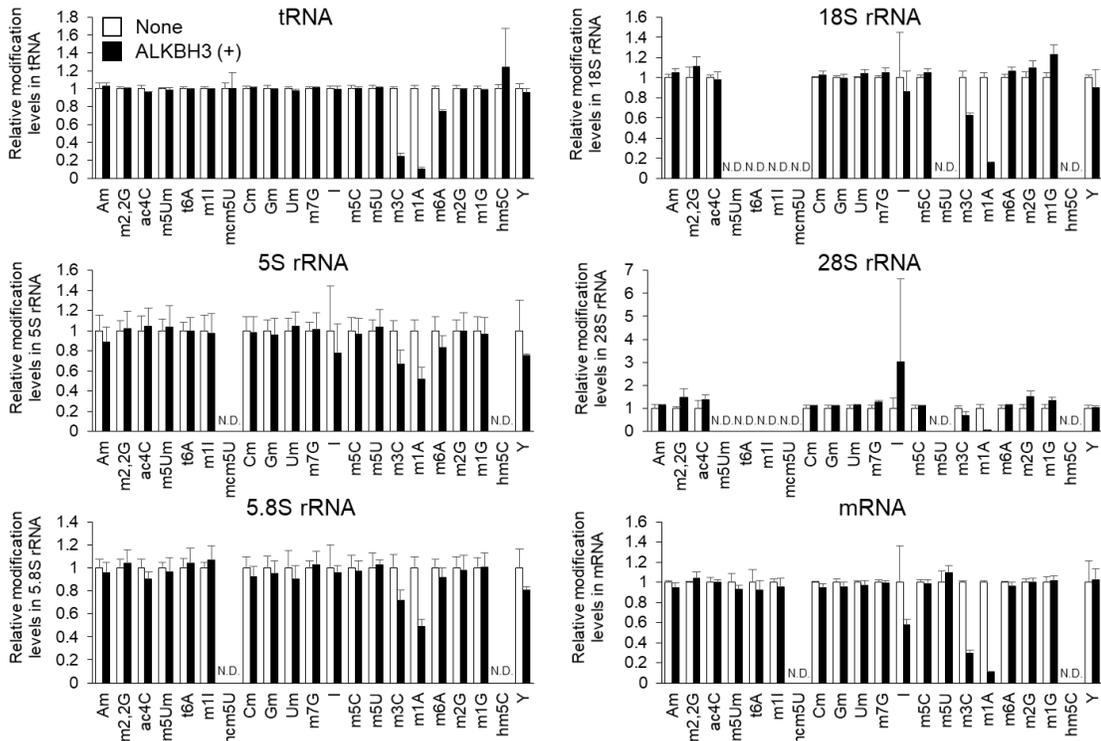


Fig. 11. ALKBH3 demethylates m1A and m3C in various RNA species. Data are shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3). N.D., not detected.

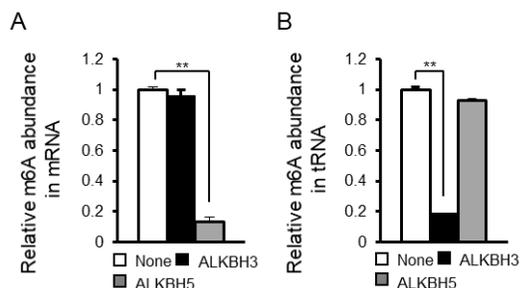


Fig.12. ALKBH3 and ALKBH5 have distinct roles in RNA demethylation. tRNA and mRNA were incubated in the absence (None) or presence of ALKBH3 or ALKBH5, enzymatically degraded to nucleosides, and then subjected to UPLC-MS/MS. (A) ALKBH5, but not ALKBH3, demethylates m6A in mRNA. (B) ALKBH3, but not ALKBH5, demethylates m6A in tRNA. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\*p < 0.01.

#### 第4節 ALKBH3により脱メチル化される tRNA の同定

第3節の結果より、ALKBH3はRNA種の中でもとりわけ tRNA の脱メチル化制御に重要であることが示唆された。tRNA には、m1A, m3C のみならず多種多様な修飾が存在することが知られている(2)。また tRNA には、アンチコドンが共通で骨格配列の異なる tRNA 遺伝子(tRNA isodecoder)が存在し、その数は約 600 にも上る(24)。近年のシーケンス技術の進歩により、これら tRNA isodecoder ごとの転写後修飾に関する情報がデータベースに蓄積されつつある(24)。ALKBH3 がどのような種類の tRNA isodecoder の、どの位置の修飾を制御するの

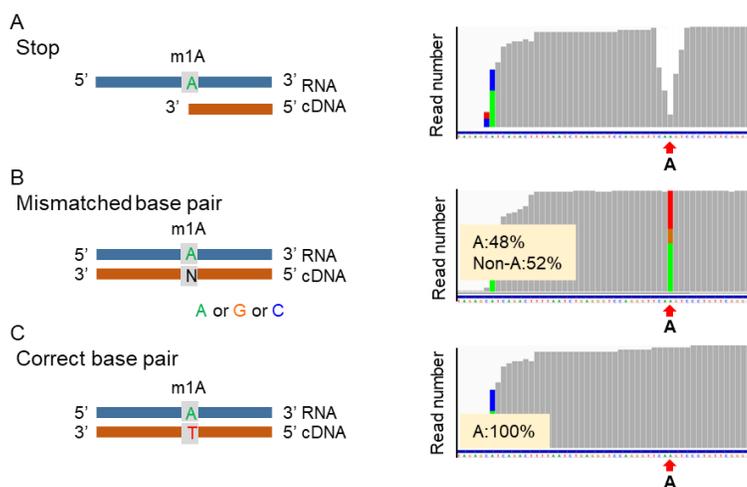


Fig. 13. Three possible patterns of reverse transcription reaction in the presence of m1A and the representative sequencing results visualized by IGV. (A) The reaction is terminated at the m1A site, which decreases the sequence read number at the corresponding position. (B) A mismatched base is placed at the m1A site, which increases frequency of non-A as indicated. (C) Correct base pair is formed at the m1A site. In this case, all reads are A at the corresponding position.

か抗 m1A 抗体と次世代シーケンサーを用いて同定を行った。ALKBH3 で脱メチル化した total RNA および脱メチル化させていない total RNA を用いて抗 m1A 抗体で免疫沈降した後、逆転写反応を行った。その際、m1A が存在していると、水素結合を介したワトソクリック型塩基対が形成されず、その位置で反応が停止、あるいはミスマッチ塩基対形成が起こる (Fig.13A, 13B)。その結果、シーケンス解析後、リファレンス配列にマッピングすると、その位置のリード数が減少、あるいはシーケンスミスの結果、本来の読まれるはずの塩基以外のリード数の割合が高くなる (Fig. 13A, 13B)。一方、m1A が存在しない場合には、正しい塩基対が形成され、シーケンスミスが生じないと考えられる (Fig. 13C)。例えば、tRNA-iMet-CAT-1-1 の 58 位の A では、ALKBH3 で脱メチル化させた場合には、ミスマッチの割合が 1% に対して、脱メチル化させない場合には 30% であり、この位置に m1A が存在し、ALKBH3 で脱メチル化されると考えられた (Fig.14A)。一方、tRNA-Tyr-GTA-2-1 の 58 位の A では、ALKBH3 で脱メチル化させた場合、および脱メチル化させない場合いずれにおいてもミスマッチの割合が 52%

66%と高く、この位置に m1A が存在するが、ALKBH3 では脱メチル化されないと考えられた(Fig.14B)。このように解析した結果、ALKBH3 で脱メチル化される m1A を含む tRNA isodecoder が 101 種類同定された。さらに、その修飾位置は、tRNA のクローバーリーフ構造のリボソーム認識部位とされる T-loop に位置する 58 位であった。この中には、データベースとの比較により、新たに 58 位に m1A が存在する可能性が見出されたものも含まれていた (Table 4)。

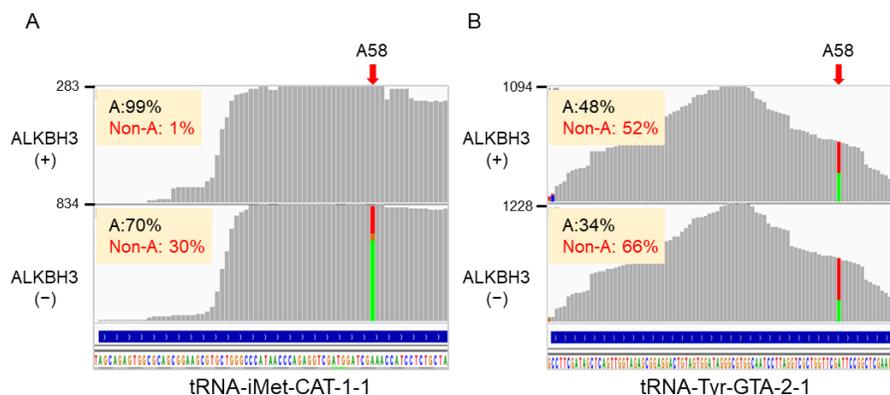


Fig. 14. Identification of tRNA isodecoders demethylated by ALKBH3. (A) In tRNA-iMet-CAT-1-1, the ratio of non-A at position 58 (A58) decreased from 30% to 1% by addition of ALKBH3, suggesting that A58 is demethylated by ALKBH3. (B) In tRNA-Tyr-GTA-2-1, non-A at A58 was abundant (more than 50%) in both the presence and absence of ALKBH3, suggesting that m1A at A58 is not demethylated by ALKBH3.

Table 4. Identification of tRNA isodecoders demethylated by ALKBH3 .

Amino acid type	Anticodon(number of ALKBH3 target/ number of sequence on data base)	Organelum	Position in tRNA
Ala	AGC (1/31)	Cytosolic	A58
	<b>UGC(1/10)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
Arg	<b>ACG(3/7)/ CCG(3/4)/ UCG(2/6)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
	<b>CCU(4/5)/ UCU(2/7)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
Asn	GUU(7/34)	Cytosolic	A58
Asp	<b>GUC(2/17)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
Cys	<b>GCA(2/38)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
Gln	CUG(3/23)/ UUG(4/18)	Cytosolic	A58
Glu	<b>UUC(1/14)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
Gly	<b>UCC(1/9)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
His	<b>GUG(2/10)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
Ile	<b>AAU(3/18)/ UAU(2/5)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
iMet	CAU(7/10)	Cytosolic	A58
Leu	<b>AAG(2/12)/ CAG(2/11)/ UAG(1/4)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
	CAA(2/11)/ UAA(2/9)	Cytosolic	A58
Lys	<b>CUU(6/24)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
	<b>UUU(3/20)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
Met	CAU(4/10)	Cytosolic	A58
Pro	<b>AGG(2/10)/ GGG(1/1)/ UGG(1/8)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
Ser	<b>AGA(5/12)/CGA(2/4)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
	<b>GCU(4/8)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
Thr	<b>AGU(5/10)/ CGU(4/7)</b>	<b>Cytosolic</b>	<b>A58</b>
Val	AAC(1/12)/ UAC(4/8)	Cytosolic	A58

Red characters indicate tRNA isodecoders demethylated by ALKBH3 identified in this study.

さらに、シーケンス解析に対するバリデーション解析として、ALKBH3 の基質として同定した tRNA isodecoder に対して相補的な配列を DNA プローブとして作製し、tRNA の単離を行い、抗 m1A 抗体を用いた immunonorthern blot により tRNA 中の m1A の検出を行ったところ、ALKBH3 の基質として同定された tRNA-iMet-CAU, tRNA-Leu-CAA, tRNA-Ser-GCU では、ALKBH3 により m1A が脱メチル化されていた (Fig.15A)。この 3 種類を含む 26 種類の tRNA 単離用プローブを用いて同様の検討を行ったところ、単離できなかった tRNA-Glu-UUC を除いて、すべて ALKBH3 で m1A が脱メチル化されていた (Fig16)。一方、データベースでは m1A が存在すると報告されているが、シーケンスによる解析では ALKBH3 の基質として同定されなかった tRNA-Phe-GAA, tRNA-Tyr-GUA および tRNA-SeC-UCA について同様の検討を行ったところ、単離できなかった tRNA-SeC-UCA を除き、tRNA-Phe-GAA, tRNA-Tyr-GUA のいずれにおいても m1A は存在するが、ALKBH3 で脱メチル化されないことがこの解析からも明らかとなった (Fig.15B)。

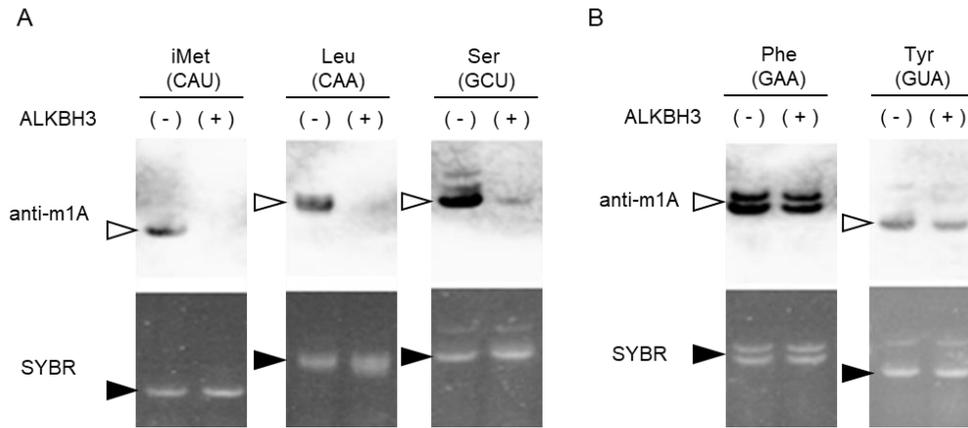


Fig. 15. m1A levels of isolated tRNA detected by immuno-northern blot. (A) m1A was profoundly decreased by addition of ALKBH3 in tRNA-iMet-CAU, tRNA-Leu-CAA, and tRNA-Ser-GCU (white arrowhead), which were identified as substrates for ALKBH3 by the NGS data. (B) m1A is similarly detected in the presence and absence of ALKBH3 in tRNA-Phe-GAA and tRNA-Tyr-GUA (white arrowhead). Both of these were not identified as substrates for ALKBH3 by the NGS data. SYBR-stained gel was used for detection of loading control (black arrowhead).

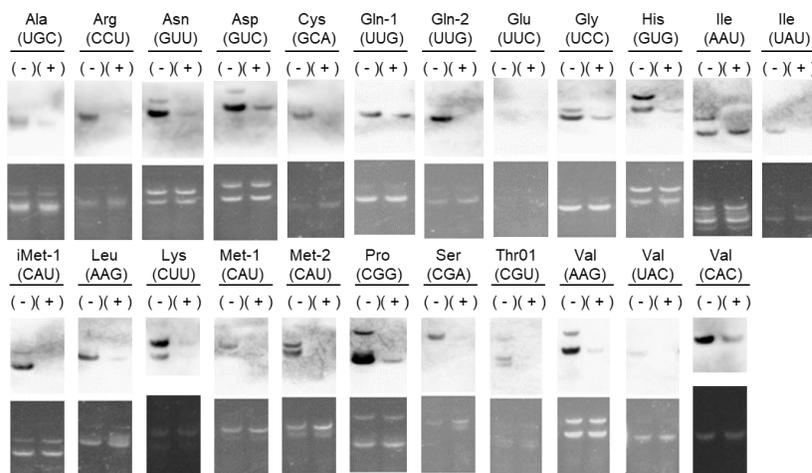


Fig. 16. m1A levels of isolated tRNA detected by immuno-northern blot. m1A was decreased by addition of ALKBH3 in all tRNAs, except for tRNA-Glu-UUC, which could not be isolated.

## 第5節 小括

1. ALKBH3 は、2OG, Fe(II)依存的にヒト細胞株由来 total RNA の m1A, m3C を脱メチル化した。
2. ALKBH3 は tRNA, 5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA, mRNA の m1A, m3C を脱メチル化し、tRNA においては m6A も脱メチル化することが明らかとなった。
3. ALKBH3 と ALKBH5 では、m6A の脱メチル化において RNA に対して異なる指向性を示した。
4. ALKBH3 により m1A が脱メチル化される tRNA isodecoder を同定し、その位置は 58 位であることが明らかとなった。

### 第3章 癌細胞における ALKBH3 による tRNA 脱メチル化制御が翻訳機構に与える影響

第1章において、膵癌において ALKBH3 が腫瘍促進的に機能することを示し、第2章においては、ALKBH3 が生理的にメチル化された RNA に対する脱メチル化酵素として機能し、特に tRNA の脱メチル化制御に深く関わっていることが明らかとなった。そこで、ALKBH3 が、tRNA の脱メチル化制御を介して、癌細胞の生存にどのように寄与しているか検討を行うこととした。癌細胞は、タンパク質合成を包括的に制御、あるいは癌細胞の生存に有利となるような mRNA の翻訳を選択的に制御することが近年明らかにされつつあり、タンパク質の翻訳制御は、癌進展において重要な要素の一つとされる(25)。そこで、癌細胞において ALKBH3 が tRNA の脱メチル化制御を介したタンパク質の翻訳制御に関与する可能性を検討した。

#### 第1節 実験材料

##### In vitro translation assay

- Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega)
- Luciferase Assay Reagent (Promega)

##### 新生タンパク質合成の評価

- Click-iT<sup>®</sup> AHA Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Protein Synthesis HCS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Methionine-free RPMI (Thermo Fisher Scientific)
- 3.7% ホルムアルデヒド (Wako)
- 3% BSA (Sigma-Aldrich)
- 0.5% Triton X-100

##### RNA dot blot

- PVDF 膜 (Millipore)
- 2×SSC: 0.3 M NaCl and 0.03M Sodium Citrate
- PBS-T: 0.1% Tween20/ PBS
- Blocking buffer: 5% skim milk (森永)/ PBS-T
- 一次抗体: 抗 m1A 抗体(MBL)
- 二次抗体: HRP 標識抗 mouse IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)

##### アンチコドン別 tRNA の網羅的発現解析

- rtStar<sup>™</sup> tRNA-optimized First-Strand cDNA Synthesis Kit (Arraystar)
- rtStar<sup>™</sup> Human tRNA Repertoirre PCR Array (Arraystar)

## Gene array を用いた網羅的遺伝子発現解析

- Ambion<sup>®</sup> WT Expression Kit (Applied Biosystems)
- GeneChip<sup>®</sup> WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix)
- GeneChip<sup>®</sup> Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix)
- GeneChip<sup>®</sup> Hybridization Wash and Stain Kit (Affymetrix)

## 第 2 節 実験方法

### *In vitro* translation assay 用の脱メチル化ウシ tRNA の作製

ウシ肝臓由来 tRNA (Sigma-Aldrich) 15  $\mu$ g を基質として 50 mM Tris-HCl (pH8.0)、2 mM ascorbate、0.1 mM 2OG、40  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> 溶液中、10  $\mu$ g のカイコリコンビナント ALKBH3 と 37°C で 2 時間インキュベートした。反応終了後、エタノール沈殿によりウシ tRNA を精製した。非脱メチル化ウシ tRNA は、カイコリコンビナント ALKBH3 を添加せずに上記と同様の処理をしたものを用いた。ALKBH3 による脱メチル化効率の測定は、第 2 章、第 2 節に記載したヌクレオチドのヌクレオシドへの分解および質量分析装置を用いた RNA ヌクレオシドの定量の手順に従って行った。

### *In vitro* translation assay

Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System を使用して、以下の組成でサンプルを調製し、30°C で 10 分間インキュベートした。*In vitro* translation 反応液 1  $\mu$ L に対して Luciferase Assay Reagent 50  $\mu$ L を加えよく混和し、20/20 Luminometer (Promega) で発光強度を測定した。

### *In vitro* translation 反応の組成

Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System	7.0 $\mu$ L
1 mM Amino Acid Mixture, Minus Leucine	0.1 $\mu$ L
1 mM Amino Acid Mixture, Minus Methionine	0.1 $\mu$ L
2.5 M Potassium Chloride	0.28 $\mu$ L
1 mg/mL Luciferase Control RNA	0.2 $\mu$ L
Demethylated tRNA	7.0 $\mu$ L
Nuclease free-water	7.0 $\mu$ L
Total volume	10 $\mu$ L

### siRNA トランスフェクション

第 1 章、第 2 節に記載された方法に従って行った。

## RNA 抽出

第 1 章、第 2 節に記載された方法に従った。

## 新生タンパク質合成の評価

96 well plate に細胞を播種し、siRNA トランスフェクション 48 時間後、methionine-free RPMI を 50  $\mu$ M L-azidohomoalanin (AHA) に調製して培地交換し、2 時間培養した。その後の操作は、Click-iT<sup>®</sup> AHA Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Protein Synthesis HCS Assay Kit の添付のプロトコールに従った。細胞の固定は 3.7% ホルムアルデヒドを含む PBS を用いて 15 分間行い、透過処理は 0.5% Triton X-100 を含む PBS で 20 分間行った。測定は 2104 Envision マルチラベルカウンター (PerkinElmer) により Hoechst 33342; Ex/Em = 340/440 nm、FITC-Alexa Fluor<sup>®</sup>; Ex/Em = 485/535 nm により行った。

## RNA dot blot

トランスフェクション 48 時間後に細胞を回収し、第 1 章、第 2 節に記載した方法に従い、small RNA を抽出した。95°C で 5 分間インキュベートした後、氷冷し熱変性させた small RNA を 200 ng から 2 倍希釈系列で PVDF 膜にスポットした。その後、メンブレンを 2 $\times$ SSC で洗浄した後、風乾し、80°C で 2 時間バイクすることによりメンブレンに small RNA を固定した。Blocking buffer で 1 時間のブロッキングを行った。再度 PBS-T で 3 回洗浄し、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日メンブレンを PBS-T で 3 回洗浄し、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、再び PBS-T による洗浄を行った後、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents を用いて発光させ、ImageQuant LAS 4000mini によるドットの撮影を行った。

## アンチコドン別 tRNA の発現解析

トランスフェクション 48 時間後に細胞を回収し、第 1 章、第 2 節に記載した方法に従い、total RNA を抽出した。抽出した total RNA は、rtStar<sup>™</sup> tRNA-optimized First-Strand cDNA Synthesis Kit を用いて脱メチル化させた後、cDNA 合成を行った。その後、rtStar<sup>™</sup> Human tRNA Repertoirre PCR Array を用いて、アンチコドン別の tRNA 発現解析を行った。PCR の反応条件は以下の通りである。

Real-time PCR条件	
Condition	Cycle
95°C 10 min	1
95°C 10 sec	40
60°C 1 min	

### Gene array を用いた網羅的遺伝子発現解析

Total RNA 100 ng より Ambion® WT Expression Kit を用いて cDNA 合成を行った。得られた cDNA 5.5 µg を GeneChip® WT Terminal Labeling Kit により断片化、ビオチン化した。ビオチン化された cDNA をもとに Hybridization Cocktail を作製し、得られた Cocktail を GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array に注入し、45°C、60rpm で 17 時間 Hybridization を行った。その後、Fluidics Station (Affymetrix)を用いて GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit により array の自動洗浄および染色を行い、GeneChip® Scanner 3000 により array をスキャンし、データを取得した。取得したデータは、Partek Genomics Suite 6.5 を用いて、発現解析を行った。

### iTRAQ 法を用いた網羅的タンパク質発現解析

トランスフェクション 48 時間後、1% Protease inhibitor および 1% phosphatase inhibitor を含む RIPA Buffer で細胞ライセートを得た。得られたタンパク質ライセートを限外ろ過カートリッジ 50 mM TEAB に Buffer 置換を行った後、ジスルフィド結合の切断、チオール基のアルキル化による保護、トリプシン消化を行った。iTRAQ Reagent-4Plex Kit (AB Sciex)を用いて iTRAQ 標識を行った。陽イオン交換カラム CEX カラム (AB Sciex)で 8 分画にしたのち、逆相カラムを用いて分画と同時に質量分析装置にて解析を行った。データ解析は ProteinPilot TM Software 4.0(AB Sciex)を用いて行った。以上の解析は、株式会社医学生物学研究所 (MBL)に委託した。

### 第 3 節 ALKBH3 による tRNA メチル化制御を介したタンパク質合成に対する影響

第 2 章の結果から、ALKBH3 が tRNA の脱メチル化制御に深く関わっていることが明らかとなった。tRNA のアミノアシル化や翻訳機能は、化学的にメチル化修飾を受けた大腸菌 tRNA-Phe の存在下では阻害されるが、これらは AlkB や ALKBH3 による脱メチル化により回復するとの報告がある (26)。そこで、タンパク質翻訳効率が ALKBH3 による tRNA の脱メチル化制御により影響を受けるかどうか解析を行った。*In vitro* における翻訳効率は、ルシフェラーゼ RNA およびアミノ酸を添加したウサギ網状赤血球抽出物に、ALKBH3 で脱メチル化したウシ由来 tRNA および脱メチル化させていない tRNA を添加し、ルシフェラーゼ活性を測定することで評価した。その結果、ALKBH3 で脱メチル化させた tRNA では、脱メチル化させていない tRNA を添加した場合に比べて、ルシフェラーゼ活性が有意に上昇しており (Fig.17A, 17B)、ALKBH3 は tRNA の脱メチル化を介してタンパク質の翻訳効率を上昇させる可能性が示された。

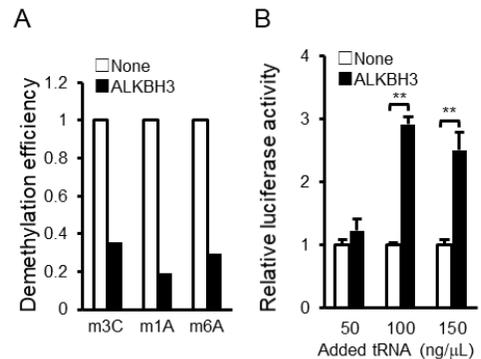


Fig. 17. ALKBH3-pretreated tRNA shows increased *in vitro* translation efficiency. (A) tRNA was incubated in the absence (None) or presence of ALKBH3 for 2 hr and used for *in vitro* translation. The demethylation efficiency of tRNA was determined by UPLC-MS/MS analysis. (B) The *in vitro* translation mixture was incubated for 10 min at 30 °C and the resultant luciferase activity was measured. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\*p < 0.01.

#### 第4節 細胞内における ALKBH3 による tRNA 脱メチル化制御を介したタンパク質翻訳制御

第3節において、*in vitro* 翻訳評価系において、ALKBH3 で脱メチル化させた tRNA は翻訳効率を上昇させることが明らかとなった。細胞レベルにおいても、ALKBH3 による tRNA 脱メチル化制御を介してタンパク質の翻訳制御に影響するのか検討を行った。PANC-1 細胞株に ALKBH3 siRNA をトランスフェクションし、トランスフェクション 48 時間後に抽出した small RNA 中の m1A を、抗 m1A 抗体を用いた RNA dot blot により検出したところ、ALKBH3 の発現抑制により m1A の蓄積を認めた(Fig.18A, 18B)。さらに、新規タンパク質合成能をメチオニンアナログである AHA 用いて評価したところ、PANC-1 細胞株において ALKBH3 の発現抑制により、新規タンパク質合成は有意に低下していた(Fig.18C)。この結果は、細胞内において ALKBH3 が tRNA 脱メチル化制御を介して翻訳制御する可能性を示している。

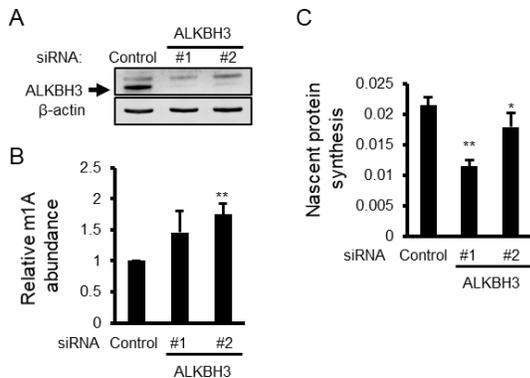
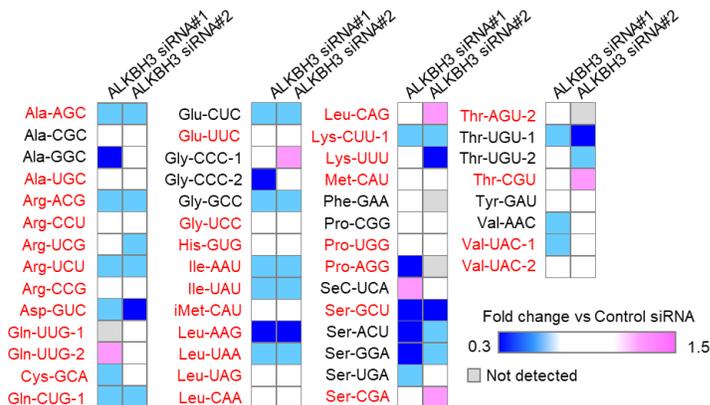


Fig. 18. ALKBH3-knockdown decreases nascent protein synthesis of pancreatic cancer cells accompanying accumulation of the methylated RNA. (A) Immunoblotting showing the successful knockdown of ALKBH3 expression in the transfected PANC-1 cells. (B) Detection of m1A levels in the small RNA fractions from control and ALKBH3 siRNA-transfected PANC-1 cells. After extraction and purification, serial dilutions of the small RNA fraction (200, 100, 50, and 25 ng) were blotted and probed using an anti-m1A antibody. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\*p < 0.01. (C) Nascent protein synthesis in PANC-1 cells transfected with control or ALKBH3 siRNAs were assessed using the Click-iT AHA Alexa Fluor 488 Protein Synthesis HCS Assay. Data are shown as mean  $\pm$  SD (n = 5). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

#### 第5節 ALKBH3 発現抑制が tRNA の安定性に対する影響

tRNA の修飾の役割の一つに tRNA 構造の安定性への寄与が挙げられる(27)。通常 tRNA は、細胞内で正確な立体構造を形成することで安定化し、この立体構造に変化が生じると RNA 分解酵素により分解されると考えられている。そこで、ALKBH3 による tRNA の脱メチル化制御が tRNA の安定性に寄与しているのではないかと考え、ALKBH3 発現抑制時のアンチコドン別の tRNA の発現解析を行った。その結果、コントロールと比べて、ALKBH3 発現抑制により、検出された 50 種の tRNA のうち、発現低下していた tRNA は 16 種であり、そのうち 14 種類が ALKBH3 で脱メチル化される m1A を含む tRNA であった。(Fig.19)。この結果により、



ALKBH3 による脱メチル化制御の破綻が、基質となる tRNA の安定性を変化させ、tRNA の分解を惹起し、発現量低下の一因となった可能性が示された。

Fig.19. tRNAs expression in ALKBH3-knockdown cells. tRNAs expression was analyzed using nrStar™ Human tRNA Repertoire PCR Array. Red characters indicate tRNAs that are demethylated by ALKBH3, identified in this study.

## 第6節 ALKBH3 発現抑制により翻訳過程で影響を受けるタンパク質

これまで結果より、ALKBH3 による tRNA の脱メチル化制御を介したタンパク質翻訳制御機構の存在が示唆された。次に、網羅的遺伝子発現解析と網羅的タンパク質発現解析により、ALKBH3 により翻訳過程で制御されるタンパク質の探索を行った。PANC-1 細胞株において、ALKBH3 siRNA トランスフェクション 48 時間後に、total RNA およびタンパク質を抽出し、ジーンアレイおよびプロテオーム解析を行った。その結果、コントロールに比べて ALKBH3 発現抑制により 0.67 倍に発現低下したタンパク質を 44 種類同定した。そのうち、ジーンアレイによる遺伝子発現変化が|1.5|以下のタンパク質を 20 種類同定した(Table 5)。同定されたタンパク質には、タンパク質翻訳の場となるリボソームを構成するタンパク質やタンパク質の分解を担うプロテアソームを構成するタンパク質が含まれていた(Table 5)。これらのタンパク質は、特に翻訳過程において ALKBH3 により制御を受けると考えられた。

Table 5. Down-regulated proteins in ALKBH3-knockdown PANC-1 cells.

Gene symbol	Description	Fold change vs Control
AAAS	aladin WD repeat nucleoporin	0.669
MLEC	malectin	0.583
BUB1B	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B	0.613
CDK9	cyclin dependent kinase 9	0.598
BTF3L4	basic transcription factor 3 like 4	0.579
EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	0.662
RPL19	ribosomal protein L19	0.516
RPL27A	ribosomal protein L27a	0.650
RPL35	ribosomal protein L35	0.644
NUFIP2	FMR1 interacting protein 2	0.661
SCYL1	SCY1 like pseudokinase 1	0.661
POMP	proteasome maturation protein	0.617
PSMA2	proteasome subunit alpha 2	0.605
PSMB2	proteasome subunit beta 2	0.605
PSMB3	proteasome subunit beta 3	0.610
PSMB6	proteasome subunit beta 6	0.546
PSMB7	proteasome subunit beta 7	0.535
TPM3	tropomyosin 3	0.527
TPM4	tropomyosin 4	0.638
KRT10	keratin 10	0.521

Ribosome-associated proteins, highlighted in blue. Proteasome-associated proteins, highlighted in yellow.

## 第7節 小括

1. *In vitro* 翻訳系において、ALKBH3 で脱メチル化 tRNA は翻訳効率を上昇させた。
2. ALKBH3 を発現抑制した膵癌細胞株では、m1A の増加と新規タンパク質合成能の低下が認められた。
3. ALKBH3 を発現抑制した膵癌細胞株では、アンチコドン別 tRNA の発現が低下していた。
4. ALKBH3 を発現抑制した膵癌細胞株では、リボソームおよびプロテアソームを構成するタンパク質が翻訳レベルで発現低下していた。

## 総括

ヒトゲノムプロジェクトにより、ヒトゲノムの解読が完了し、癌などの疾患と遺伝子との関連が明らかとなり、疾患発症メカニズムの解明が飛躍的に進むことが期待された。しかしながら、DNA の配列異常で説明される疾患は一部で、DNA の塩基配列の変化を伴わず、DNA やヒストンの修飾制御を介した遺伝子発現制御機構「エピジェネティクス」という概念が、多くの疾患や生命現象に深く関わっていることが明らかとなってきた(1)。さらに、近年の修飾抗体の開発と次世代シーケンスによるトランスクリプトーム解析技術の確立により(3, 28, 29)、RNA の修飾制御を介した遺伝子やタンパク質発現調節機構の存在が明らかとなり、「エピトランスクリプトミクス」という新しい概念として注目されている。DNA やヒストンの修飾が数種類に限られるのに対し、RNA には 100 種類以上の修飾が存在する(2)。しかしながら、修飾の分布や修飾制御分子の同定まで至っているものは、m6A や m1A などごく一部であり(3-13, 30-32)、多くの修飾については明らかとなっていないのが現状である。一方、我々が前立腺癌で高発現する分子として同定した ALKBH3 は、DNA/RNA 脱メチル化酵素として機能し、メチル化剤で誘導された一本鎖 m1A, m3C を脱メチル化することが報告されている(20)。m1A や m3C が存在するとワトソクリック型の塩基対異形成が障害され、これが修復されないと細胞死が誘導される。ALKBH3 は DNA ヘリカーゼである ASCC3 と会合して存在することで、DNA のメチル化損傷修復を効率よく行っていることが報告されている(33)。しかしながら、RNA 脱メチル化酵素としての ALKBH3 については、メチル化剤で誘導された RNA の m1A, m3C を脱メチル化するとの報告があるが(22)、生体内で生理的にメチル化された RNA に対する機能については明らかとなっていない。

本研究では、膀胱癌における ALKBH3 の発現について膀胱癌臨床検体を用いて検討したところ、膀胱癌細胞において ALKBH3 は高発現しており、ALKBH3 の高発現は術後予後不良と高い相関性を示した。さらに、膀胱癌細胞株を用いた *in vitro*, *in vivo* 解析により、ALKBH3 が膀胱癌において腫瘍促進的に機能することが明らかとなった。次に、膀胱癌細胞において、ALKBH3 の RNA 脱メチル化酵素としての役割に着目して機能解析を行った。まず、ALKBH3 が生理的にメチル化された RNA を基質とするか、膀胱癌細胞株より抽出した RNA を用いて検討を行った。その結果、ALKBH3 は tRNA, 5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA, mRNA の m1A, m3C を脱メチル化することが示された。さらに、tRNA は m6A も脱メチル化することが明らかとなった。また、mRNA の m6A は、ALKBH5 で脱メチル化されるのに対し、tRNA の m6A は ALKBH3 が脱メチル化することが明らかとなった。同じメチル化塩基に対しても RNA 種により脱メチル化酵素の指向性が異なることが示唆された。この結果から、ALKBH3 は生理的にメチル化された RNA に対する脱メチル化酵素として機能し、特に tRNA に対し特異的指向性があることが考えられた。

tRNA は、76 塩基前後からなり、クローバーリーフ型の二次構造をとることが知られている。また、RNA の中でも最も修飾の種類が多く(2)、その修飾の種類や修飾位置により、生理的な役割が異なることも知られている(27)。

tRNA には、アンチコドンが共通で骨格配列の異なる複数の tRNA 遺伝子(tRNA isodecoder)が存在する(24)。例えば、tRNA-Met-CAU では、10 種類の isodecoder が存在し、その中には、複数の修飾塩基が存在するものもあれば、修飾の存在が知られていないものも存在する(24)。ALKBH3 が、どの isodecoder 由来の、どの位置のメチル化修飾を脱メチル化し得るのか、この点を明らかにすることは ALKBH3 による tRNA のメチル化制御が生体内でどのような意味をもつのかを考える上で需要となる。そこで tRNA 中に豊富に存在する m1A(30)に対する特異的抗体とシーケンス解析を用いて ALKBH3 の tRNA 基質の同定を行った。その結果、ALKBH3 で脱メチル化される m1A を含む isodecoder が 101 種類同定された。さらに、修飾部位はすべて、tRNA のクローバーリーフ構造の T-loop に位置する 58 位のアデニンであった。tRNA-Phe-GAA, tRNA-Tyr-GUA は、データベース上では m1A 存在が報告されているものの、今回の解析では、ALKBH3 の基質として同定されなかった。このことは、同じ位置の m1A に対しても基質特異性が存在することを示している。

最後に、本研究では、*in vitro* 評価系において ALKBH3 により脱メチル化した tRNA がタンパク質の翻訳効率を上昇させることを明らかにした。さらに、細胞株を用いた検討で、ALKBH3 の発現抑制により tRNA を多く含む small RNA 画分での m1A の蓄積と新規タンパク質合成能低下することを明らかにした。これらの結果は、ALKBH3 による tRNA の脱メチル化制御が翻訳効率を制御する可能性を示すものである。

一方、tRNA の修飾の役割のひとつとして、tRNA の安定性への寄与がある。通常 tRNA は、細胞内で正確な立体構造を形成することで安定化し、この立体構造に変化が生じると RNA 分解酵素で分解されると考えられている。酵母において、tRNA の m1A58 は、tRNA-iMet-CAU の安定性の維持に重要であると報告されている (34, 35)。一方で、tRNA-Met-CAU, tRNA-Ile-UAU, tRNA-Ser-CGA は、m1A58 がなくても安定性に影響しないとの報告があり (34, 36)、その修飾意義については統一的な見解が得られていない。ALKBH3 による、m1A58 における tRNA の脱メチル化制御が tRNA の安定性を変化させるのか、tRNA array を用いて ALKBH3 発現抑制のアンチコドン別の tRNA の発現解析を行った。その結果、コントロールに比べて ALKBH3 発現抑制時に、アンチコドン別の tRNA の多くが発現低下しており、その大部分は ALKBH3 の基質となる tRNA であった。この結果は、ALKBH3 は tRNA の脱メチル化制御を介して、tRNA の安定性の制御に関与し、発現量を変化させる可能性を示している。さらに、さらに、ALKBH3 の発現抑制により翻訳レベルでの制御を受けるタンパク質としてリボソームやプロテアソームを構成するタンパク質が含まれていた。癌細胞では、リボソーム合成が亢進している(37)。またプロテアソーム活性も亢進しており(38, 39)、酸化ストレスや炎症性刺激などにより、プロテアソームは転写因子 NF- $\kappa$ B の抑制因子である I $\kappa$ B を分解し、NF- $\kappa$ B を活性化することで、血管新生や転移を誘導し、p21, p27, p53 といった細胞周期を抑制的に制御する分子や癌抑制遺伝子産物の分解することで、癌細胞の生存に有利となるよう機能している。このように、癌細胞は、ストレス環境下においても増殖できるようなタンパク質ホメオスタシスを保つ仕組みを有することが知られている(40)。一方、tRNA を介した翻訳制御機構として、(i)tRNA プールにおける各コドンに対する tRNA の存在比率(コドンバイアス)、(ii) tRNA の安定性、(iii) tRNA の局在への寄与などが挙

げられる (41-44)。ALKBH3 は、癌細胞において特定の tRNA の脱メチル化制御を介して、tRNA の安定性を変化させることで、翻訳制御に寄与していることが考えられた。

本研究の成果は、ALKBH3 が、生理的にメチル化された RNA の m1A, m3C を脱メチル化することを明らかにし、とりわけ tRNA においては、特定の tRNA のメチル化制御を介して、翻訳制御に寄与していることを示した。その結果、制御されるタンパク質には、翻訳の場となるリボソームを構成するタンパク質や、プロテアソームを構成するタンパク質が含まれており、ALKBH3 は tRNA メチル化制御を介して、ストレス環境下でも生存できるような癌細胞におけるタンパク質の恒常性の維持に寄与していることが考えられた。最近、膵癌では同一患者での原発腫瘍と転移腫瘍の比較ゲノム解析が行われ、転移腫瘍では新たな癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異は認められず、エピジェネティックな変化が生じることで原発腫瘍の一部に転移能が付加され、転移が引き起こされるのではないかと報告された(45)。しかし膵癌における悪性化の機序には、エピジェネティクス制御機構のみならず、エピトランスクリプトミクス制御機構の関与も大いに考えられる。また、乳癌では、特定のアンチコドンを有する tRNA (tRNA-Glu-UUC, tRNA-Arg-CCG)の発現が上昇するといった tRNA の発現分布のゆがみが生じており、これらに対応するコドンを多く含むタンパク質の発現上昇が癌の悪性化に関連しているとの報告もある(46)。このような、特定のアンチコドンを有する tRNA の発現が変化する機構は、明らかとなっていないが、エピトランスクリプトミクス制御を介して、これら tRNA の発現分布のゆがみがもたらされている可能性も十分に考えられる。今後さらに、癌を含めた疾患におけるエピトランスクリプトミクス制御機構が明らかにしていくことで、ALKBH3 を含めたエピトランスクリプトミクス制御分子が新たな治療標的となることが期待される。

## 結論

1. ALKBH3 は、膵癌臨床検体において高発現しており、術後予後不良と高い相関性を示した。
2. 膵癌細胞株 PANC-1 を用いた *in vitro* および *in vivo* 解析において、ALKBH3 の発現抑制が癌細胞の増殖抑制作用ならびに腫瘍退縮作用を示した。
3. ALKBH3 は、膵癌細胞株 PANC-1 由来の tRNA, 5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA および mRNA において 2OG, Fe(II) 依存的に m1A, m3C を脱メチル化し、tRNA については m6A も脱メチル化した。
4. ALKBH3 は、特定の tRNA の 58 位の m1A を脱メチル化した。
5. *In vitro* 翻訳系において、ALKBH3 で脱メチル化した tRNA は翻訳効率を上昇させた。
6. ALKBH3 を発現抑制した膵癌細胞株 PANC-1 では、m1A の増加と新規タンパク質合成能の低下が認められた。その際、アンチコドン別 tRNA の発現量が低下していた。
7. ALKBH3 を発現抑制した膵癌細胞株 PANC-1 では、リボソームおよびプロテアソームを構成するタンパク質が翻訳レベルで発現低下していた。

## 謝辞

本研究を学位論文としてまとめるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野教授、辻川和丈先生に心より謝意を表します。

また、種々のご指導を頂きました大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野助教、長谷拓明先生、大塩郁幹先生、神宮司健太郎先生に感謝申し上げます。

また、膀胱癌臨床検体の御供与及び種々のご指導を頂きました奈良県立医科大学消化器・総合外科、庄 雅之教授、山戸一郎先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を賜りました北恵郁緒里特任研究員、小池和央博士、房前裕順修士、稲垣貴昭修士、信貴奈緒子修士、河口恵修士、小垣孝弘学士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野の皆様心より感謝致します。

## 参考文献

1. Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annual Review Genet.* 30, 441-64 (1996).
2. Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piatkowski P, Baginski B, Wirecki TK, de Crécy-Lagard V, Ross R, Limbach PA, Kotter A, Helm M, Bujnicki JM. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.* nar/gkx1030 (2017).
3. 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, 201–06 (2012).
4. Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell.* 149, 1635–46 (2012).
5. Ke S, Alemu EA, Mertens C, Gantman EC, Fak JJ, Mele A, Haripal B, Zucker-Scharff I, Moore MJ, Park CY, Vågbø CB, Kusnierzcyk A, Klungland A, Darnell JE Jr, Darnell RB. A majority of m6A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes Dev.* 29, 2037-53 (2015).
6. Liu J, Yue Y, Han D, Wang X, Fu Y, Zhang L, Jia G, Yu M, Lu Z, Deng X, Dai Q, Chen W, He C. A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat Chem Biol.* 10, 93–95 (2014).
7. Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol.* 7, 885-87 (2011).
8. Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, Vågbø CB, Shi Y, Wang WL, Song SH, Lu Z, Bosmans RP, Dai Q, Hao YJ, Yang X, Zhao WM, Tong WM, Wang XJ, Bogdan F, Furu K, Fu Y, Jia G, Zhao X, Liu J, Krokan HE, Klungland A, Yang YG, He C. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell.* 49, 18–29 (2013).
9. Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T, He C. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature.* 505, 117–20 (2014).

10. Xiao W, Adhikari S, Dahal U, Chen YS, Hao YJ, Sun BF, Sun HY, Li A, Ping XL, Lai WY, Wang X, Ma HL, Huang CM, Yang Y, Huang N, Jiang GB, Wang HL, Zhou Q, Wang XJ, Zhao YL, Yang YG. Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Mol Cell*. 61, 507-19 (2016).
11. Li A, Chen YS, Ping XL, Yang X, Xiao W, Yang Y, Sun HY, Zhu Q, Baidya P, Wang X, Bhattarai DP, Zhao YL, Sun BF, Yang YG1. Cytoplasmic m6A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res*. 27, 444-47 (2017).
12. Shi H, Wang X, Lu Z, Zhao BS, Ma H, Hsu PJ, Liu C, He C. YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*. 27, 315-28 (2017).
13. X. Wang, C. He. Reading RNA methylation codes through methyl-specific binding proteins. *RNA Biol*. 11, 669-72 (2014).
14. Wang Y, Li Y, Toth JI, Petroski MD, Zhang Z, Zhao JC. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 16, 191-98 (2014).
15. Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, Mansour AA, Kol N, Salmon-Divon M, Hershkovitz V, Peer E, Mor N, Manor YS, Ben-Haim MS, Eyal E, Yunger S, Pinto Y, Jaitin DA, Viukov S, Rais Y, Krupalnik V, Chomsky E, Zerbib M, Maza I, Rechavi Y, Massarwa R, Hanna S, Amit I, Levanon EY, Amariglio N, Stern-Ginossar N, Novershtern N, Rechavi G, Hanna JH. m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*. 347, 1002-06 (2015).
16. Fustin JM1, Doi M, Yamaguchi Y, Hida H, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, Morioka MS, Takeya H, Manabe I, Okamura H. RNA-Methylation-Dependent RNA Processing Controls the Speed of the Circadian Clock. *Cell*. 155, 793-806 (2013).
17. Wang S, Sun C, Li J, Zhang E, Ma Z, Xu W, Li H, Qiu M, Xu Y, Xia W, Xu L, Yin R. Roles of RNA methylation by means of N6-methyladenosine (m6A) in human cancers. *Cancer Lett*. 408, 112-20 (2017).
18. Visvanathan A, Patil V1, Arora A, Hegde AS, Arivazhagan A, Santosh V4, Somasundaram K. Essential role of METTL3-mediated m6A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance. *Oncogene*. onc.2017.351. (2017)
19. Konishi N, Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Mitsui E, Yoshikawa R, Yamamoto H, Tsujikawa K. High

- expression of a new marker PCA-1 in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res.* 11, 5090-97 (2005).
20. Koike K, Ueda Y, Hase H, Kitae K, Fusamae Y, Masai S, Inagaki T, Saigo Y, Hirasawa S, Nakajima K, Ohshio I, Makino Y, Konishi N, Yamamoto H, Tsujikawa K. anti-tumor effect of AlkB homolog 3 knockdown in hormone- independent prostate cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets.* 7, 847-56 (2012).
  21. S.C. Treweek, T.F. Henshaw, R.P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature.* 419, 174–78 (2002).
  22. Aas PA, Otterlei M, Falnes PO, Vågbø CB, Skorpen F, Akbari M, Sundheim O, Bjørås M, Slupphaug G, Seeberg E, Krokan HE. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature.* 421, 859–63 (2003).
  23. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144, 646-74 (2011).
  24. Chan PP, Lowe TM. GtRNAdb 2.0: an expanded database of transfer RNA genes identified in complete and draft genomes. *Nucleic Acids Res.* 44, D184-9 (2016).
  25. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer.* 10, 254-66 (2010).
  26. Ougland R, Zhang CM, Liiv A, Johansen RF, Seeberg E, Hou YM, Remme J, Falnes PØ. AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation. *Mol Cell.* 16, 107-16 (2004).
  27. Väre VY, Eruysal ER, Narendran A, Sarachan KL, Agris PF. Chemical and Conformational Diversity of Modified Nucleosides Affects tRNA Structure and Function. *Biomolecules.* 7, biom7010029 (2017).
  28. Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Salmon-Divon M, Amariglio N, Rechavi G. Transcriptome-wide mapping of N(6)-methyladenosine by m(6)A-seq based on immunocapturing and massively parallel sequencing. *Nat Protoc.* 8, 176-89 (2013).
  29. Chen K, Lu Z, Wang X, Fu Y, Luo GZ, Liu N, Han D, Dominissini D, Dai Q, Pan T, He C. High-resolution N(6)-methyladenosine (m(6)A) map using photo-crosslinking-assisted m(6)A sequencing. *Angew Chem Int Ed Engl.* 54, 1587-90 (2015).
  30. Saikia M, Fu Y, Pavon-Eternod M, He C, Pan T. Genome-wide analysis of N1-methyl-adenosine modification

in human tRNAs. *RNA*. 16, 1317-27 (2010).

31. Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, Peer E, Kol N, Ben-Haim MS, Dai Q, Di Segni A, Salmon-Divon M, Clark WC, Zheng G, Pan T, Solomon O, Eyal E, Hershkovitz V, Han D, Doré LC, Amariglio N, Rechavi G, He C. The dynamic N(1)-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature*. 530, 441-46 (2016).
32. Li X, Xiong X, Wang K, Wang L, Shu X, Ma S, Yi C. Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N(1)-methyladenosine methylome. *Nat Chem Biol*. 12, 311-16 (2016).
33. Dango S, Mosammaparast N, Sowa ME, Xiong LJ, Wu F, Park K, Rubin M, Gygi S, Harper JW, Shi Y. DNA unwinding by ASCC3 helicase is coupled to ALKBH3-dependent DNA alkylation repair and cancer cell proliferation. *Mol Cell*. 44, 373-84 (2011).
34. Anderson J, Phan L, Cuesta R, Carlson BA, Pak M, Asano K, Björk GR, Tamame M, Hinnebusch AG. The essential Gcd10p-Gcd14p nuclear complex is required for 1-methyladenosine modification and maturation of initiator methionyl-tRNA. *Genes Dev*. 12, 3650-62 (1998).
35. Ozanick SG, Bujnicki JM, Sem DS, Anderson JT. Conserved amino acids in each subunit of the heterologous tRNA m1A58 Mtase from *Saccharomyces cerevisiae* contribute to tRNA binding. *Nucleic Acids Res*. 35, 6808-19 (2007).
36. Anderson J, Phan L, Hinnebusch AG. The Gcd10p/Gcd14p complex is the essential two-subunit tRNA(1-methyladenosine) methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 5173-78 (2000).
37. Chan JC, Hannan KM, Riddell K, Ng PY, Peck A, Lee RS, Hung S, Astle MV, Bywater M, Wall M, Poortinga G, Jastrzebski K, Sheppard KE, Hemmings BA, Hall MN, Johnstone RW, McArthur GA, Hannan RD, Pearson RB. AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Sci Signal*. 4(188), scisignal.2001754 (2011).
38. Ren S, Smith MJ, Louro ID, McKie-Bell P, Bani MR, Wagner M, Zochodne B, Redden DT, Grizzle WE, Wang Nd, Smith DI, Herbst RA, Bardenheuer W, Opalka B, Schütte J, Trent JM, Ben-David Y, Ruppert JM. The p44S10 locus, encoding a subunit of the proteasome regulatory particle, is amplified during progression of cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*. 19, 1419-27 (2000).

39. Chen L, Madura K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Res.* 65, 5599-606 (2005).
40. Dai C, Sampson SB. HSF1: Guardian of Proteostasis in Cancer. *Trends Cell Biol.* 26, 17-28 (2016).
41. Qian W1, Yang JR, Pearson NM, Maclean C, Zhang J. Balanced codon usage optimizes eukaryotic translational efficiency. *PLoS Genet.* 8, journal. pgen.1002603 (2012).
42. Gingold H, Tehler D, Christoffersen NR, Nielsen MM, Asmar F, Kooistra SM, Christophersen NS, Christensen LL, Borre M, Sørensen KD, Andersen LD, Andersen CL, Hulleman E, Wurdinger T, Ralfkiær E, Helin K, Grønbæk K, Ørntoft T, Waszak SM, Dahan O, Pedersen JS, Lund AH, Pilpel Y. A dual program for translation regulation in cellular proliferation and differentiation. *Cell.* 158, 1281-92 (2014).
43. Pavon-Eternod M, Gomes S, Rosner MR, Pan T. Overexpression of initiator methionine tRNA leads to global reprogramming of tRNA expression and increased proliferation in human epithelial cells. *RNA.* 19, 461-66 (2013).
44. Orioli A. tRNA biology in the omics era: Stress signalling dynamics and cancer progression. *Bioessays.* 39, bies.201600158 (2017).
45. Roe JS, Hwang CI, Somerville TDD, Milazzo JP, Lee EJ, Da Silva B, Maiorino L, Tiriác H, Young CM, Miyabayashi K, Filippini D, Creighton B, Burkhardt RA, Buscaglia JM, Kim EJ, Grem JL, Lazenby AJ, Grunkemeyer JA, Hollingsworth MA, Grandgenett PM, Egeblad M, Park Y, Tuveson DA, Vakoc CR. Enhancer Reprogramming Promotes Pancreatic Cancer Metastasis. *Cell.* 170, 875-88 (2017).
46. Goodarzi H, Nguyen HCB, Zhang S, Dill BD, Molina H, Tavazoie SF. Modulated Expression of Specific tRNAs Drives Gene Expression and Cancer Progression. *Cell.* 165, 1416-27 (2016).

略語一覽

1-methoxy PMS	1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate
ALKBH	AlkB homolog
BPB	Bromophenol blue
BSA	Bovine serum albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
cDNA	complementary DNA
DAB	3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethyleneglycoltetraacetic acid
Ex/ Em	Excitation/ Emission
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HRP	Horseradish peroxidase
MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic acid
PBS	Phosphate buffered saline
PCA-1	Prostate cancer antigen-1
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism
TBS	Tris buffered saline
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick and labeling
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
WST-1	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt
XC	Xylene cyanol