

博士論文

マスマスペクトロメトリーを用いた
マイクロRNAとRNA修飾の解析
(Mass spectrometric analyses of miRNAs and
RNA modifications)

東京大学大学院工学系研究科
化学生命工学専攻
鈴木研究室

姜 秉一

指導教員 鈴木勉 教授

I. 背景

マイクロ RNA(miRNA)は約 18–25 塩基長の低分子 non-coding RNA であり、細胞の増殖や分化など様々な生命現象に関与することが知られている。miRNA は前駆体として DNA から転写されたのち、Drosha や Dicer によるプロセッシングを経て成熟し、Argonaute タンパク質(AGO)などと miRISC 複合体を形成する(図 1)。miRISC 複合体は、mRNA の 3'末端非翻訳領域の

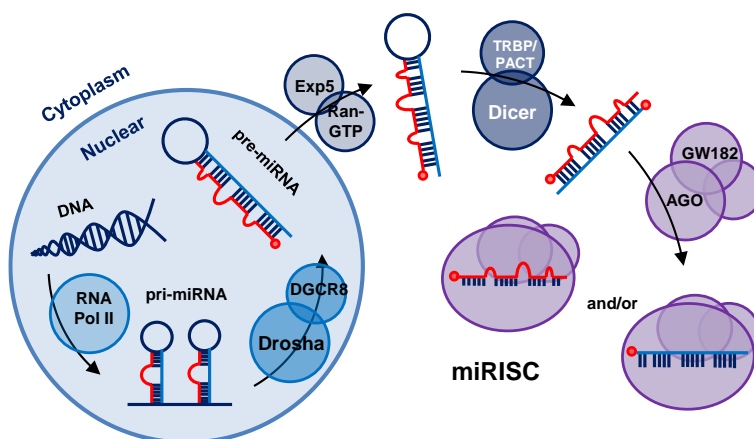


図1. マイクロRNAの生合成機構

ターゲット配列と塩基対を形成することで、翻訳抑制と、mRNA の間接的な分解を引き起こす。ヒトには約 2,600 種類の miRNA が存在すると見積もられており、ヒト全タンパク質の約 7 割が miRNA によって発現制御を受けていると考えられている。これら miRNA の発現プロファイルは細胞の分化と密接な関係があることが知られ、組織特異的、時期特異的に変動する。また様々な疾患で miRNA の発現プロファイルが変化するという報告がある。したがって、miRNA の発現量を定量的に計測する技術の開発は、様々な生命現象の理解につながるだけでなく、疾患の診断や治療などにも大きく貢献することが期待される。

一般的な miRNA の解析法としては、miRNA にアダプターDNA を酵素的に連結後、逆転写反応を用いて cDNA に変換した後、リアルタイム PCR や deep sequencing など解析する手法が挙げられる。また miRNA を直接あるいは cDNA を蛍光標識し、マイクロアレイなどで検出する方法もよく用いられている。これら手法は簡便で広く用いられているが、いずれも間接的な手法であるため、操作の各段階で多くのバイアスが生じることが知られている。miRNA ごとに、アダプターDNA の連結効率の違い、PCR 増幅によるバイアス、蛍光標識効率の差などが生じるため、実際の miRNA 発現プロファイルを反映しないことが指摘されている。

本研究は miRNA の直接的な解析方法の開発を目標としている。具体的には当研究室で確立した RNA の高感度質量分析法(RNA-MS)を利用し miRNA の定量的プロファイリング技術の開発を行う。

II. マススペクトロメトリーを用いたマイクロ RNA の直接解析法の確立

本研究では電場型フーリエ変換式質量分析計を用い、キャピラリーカラム (内径 150 μ m、長さ 5cm) に C18(粒径 3 μ m、ポアサイズ 10nm)樹脂を充填したものを使用した。容離液にはイオンペア試薬として HFIP(hexafluoroisopropanol)と TEAA を用い、メタノールの濃度勾配で RNA を溶出した。流速は 300nl/min であり、イオン化には、nano electrospray 法を用い、m/z 600-1000 の範囲をスキャンした。

1. miRNA 直接解析法

組織(e.g. mouse brain 0.5g)から AGPC(Acid Guanidium Phenol Chloroform)法を用いて total RNA を調製

し、陰イオン交換樹脂(Q sepharose)を用いて低分子 RNA 画分を取得した。さらに、エタノール沈殿と微量透析を行うことで、脱塩処理を行った。このうち、1/10 量をキャピラリーLC/nanoESI-MS に導入し測定を行った。miRNA は分子量 6000-8000 であり、マイナス 8-11 価の多価イオンとして検出された。得られたマスペクトルをデコンボリューション処理により、個々の miRNA の分子量を算出した。また、各多価イオンに対し、衝突活性化解離(collision-induced dissociation)を行い得られたプロダクトイオンを帰属することで、部分配列を取得した。最終的に分子量と部分配列の情報を miRNA データベースと照合することで各 miRNA を同定した。

2. マウス脳由来 miRNA プロファイル

マウス脳由来の低分子 RNA 画分の解析から、約 500 種類の分子量ピークが検出され、その内、約 100 種類の分子量が miRNA として帰属された。脳特異的に発現する miR-124 や miR-9 が特徴的な miRNA として検出された。また、配列の類似性により他手法においての検出が困難である Let-7 family や miR-29 family が分離されたものとして検出された。

さらに、データベースに登録された配列通りの miRNA 以外に、多くの miRNA に 3'末端と 5'末端にそれぞれ塩基の付与や短縮がみられた。多くの miRNA において 5'末端バリエーションは少なく、3'末端バリエーションが多いという傾向が見つかった。3'末端バリエーションは miRNA の標的認識配列である seed region に変動がないため、標的 mRNA に対する認識能は変わらないと考えられる。しかし、5'末端バリエーションにおいては seed region が変動することで、標的 mRNA の種類や認識能が変化すると考えられる。

3. まとめ

本研究で確立されたキャピラリーLC/nanoESI-MS による miRNA の直接解析法により、miRNA を標識することなく、直接的に解析することに成功した。実際に、マウス脳に発現する miRNA を帰属することに成功し、データベースに登録されていない両末端の塩基付加と短縮に由来するバリエーションを多数帰属することができた。

III. マススペクトロメトリーを用いたマイクロ RNA の絶対定量法の確立

LC/MS を用いた miRNA の直接解析法を用いて、個々の miRNA を定量するために、安定同位体標識された miRNA を内部標準として用いる手法を考案した。

1. 安定同位体標識 miRNA(SIL-miRNA)

マスペクトルから得られる各 miRNA のピーク強度は各 miRNA の発現量を反映しているが、配列によるイオン化効率の違いや、同時にイオン化する分子の影響によるイオン化抑制の問題があるため、本研究ではクロマトグラフィーによる分離に差が生じないことが期待される安定同位体標識 miRNA(SIL-miRNA)を内部標準として用いた。実際に、測定対象とする miRNA に対し、SIL-miRNA を作成し高純度に精製した。吸光度測定から精確に定量したものを本手法の内部標準として用いた。実際に、未標識 miRNA と SIL-miRNA を混合し、LC/MS 解析を行ったところ、二つのマスキロマトグラムは完全に重なり、またマスペクトルの分離も確認した。さらに、マスペクトルの比率は二

種類の RNA の混合比と完全に一致することも確認した。

2. miRNA 絶対定量法

実際に組織由来の miRNA を定量するためには、実験ごとに異なる RNA 画分の抽出効率を見積もる必要がある。そこで、RNA を抽出する際に測定対象の miRNA の分子量と重複しない OligoRNA(Marker)を投入し、測定時に安定同位体標識された SIL-Marker を導入し、Marker の回収量を定量することで、組織ごとの抽出効率の標準化を行った。まず、LC/MS 測定により得られた各 miRNA とその SIL-miRNA のマスペクトルの強度比から測定に用いられた miRNA のモル数を算出した。同じく Marker と SIL-Marker のマスペクトル強度比から、サンプル中に残存する Marker の含有量を算出した。はじめに投入した Marker 量に対する、サンプル中に含有する Marker 量の割合から、単位組織重量(g)あたりに存在する各 miRNA のモル数を算出した。24 週齢のマウス脳内 miRNA の発現量を絶対定量した結果、Let7a、miR-16、miR-128 は脳 1g あたり約 1,500 fmol 存在することが明らかとなり、miR-29 は約 5,000 fmol 存在することが判明した。

3. 個体間 miRNA 発現量の比較

本研究で構築した miRNA 絶対定量法を用いて、個体間での miRNA の発現量を比較した。DDY 系統の 24 週齢マウス(♂)の脳 3 個体間において、脳特異的に多く発現する 7 種類の miRNA の発現量を比較した。7 種類の miRNA は 3 個体において最大 30%の誤差範囲で発現量が保存されていた。同系統の 1 週齢マウス(♂)においても同じ miRNA において 3 個体間の発現量を比較したところ、24 週齢と同様個体間で発現量が保存されていた。

4. 加齢によるマウス脳由来 miRNA の発現変動解析

次に、1 週齢から 48 週齢まで加齢におけるマウス脳内 miRNA 発現量の変動を測定した。1、6、12、24、48 週齢のマウス脳を用いて miRNA を絶対定量し、発現量を比較した。miRNA により加齢に対する発現量の変動は異なり、変動を示す miRNA は 1 週齢から 6 週齢の間に最も大きな変動を示した。miR-29 family は加齢において発現量が増加し、特に miR-29b は脳 1 g あたり、約 5,000 fmol 増加した。miR-9、miR-125b、miR-103 は加齢にともない減少し、miR-9(0,0)がもっとも大きく減少した。miR-16 や Let7a はすべての時期において恒常的に発現していた。

5. miR-9 のバリエーション特異的な発現変動

miR-9 は脳特異的な miRNA であり、マウスの成長や加齢にともない発現量が減少することが知られている。本研究においても、1 週齢と比較して 6 週齢では miR-9 の定常状態量が減少することが観測された。しかし、バリエーションごと分離すると、miR-9(0,-1)と miR-9(0,0)の発現量は減少した反面、miR-9(0,-2)は変動がないことが判明した。バリエーションコードによる異なる発現変動はノーザンブロット法でも確認された。

加齢によって miR-124 の長いバリエーションが減少し、短いバリエーションが蓄積することが報告されている。これは Argonaute タンパク質の特性に起因していることが報告されている。Ago2 は他の Argonaute タンパク質より PAZ ドメインによる miRNA 3'末端の認識能が弱く、miRNA の 3'末端が短

縮されやすいことが知られている。胎生期では Ago1 が Ago2 よりも多く存在するが、出生後は、Ago1 が減少し、相対的に Ago2 が優勢になる。そのため、Ago2 に取り込まれた miRNA の末端がトリミングされ、短い miRNA バリエントが増加すると考えられる。そこで、抗 Ago2 抗体でマウス脳抽出液から Ago2 を免疫沈降し、Ago2 に含まれる miR-9 バリエントを LC/MS で測定した。低分子画分における miR-9 バリエントの存在比に対し、Ago2 に含まれる miR-9 バリエントの存在比を比較したところ、最も長いバリエントである miR-9(0,0)は低分子画分における存在比よりも Ago2 に含まれる比率が少ないことが判明した。また抗 Ago1 抗体および抗 Ago2 抗体でマウス脳抽出液より、Ago1 および Ago2 を免疫沈降し、ノーザンブロット法を用いて、miR-9 の各バリエントを検出したところ、Ago1 には最も長いバリエントである miR-9(0,0)の含有率が高く、Ago2 には最も短いバリエントである miR-9(0,-2)の含有率が高かった。これらの結果から、miR-9 のバリエント特異的な変動は Argonaute タンパク質の発現量変化および 3'末端のトリミングに起因することが示唆される。

6. まとめ

本研究で確立された LC/MS による miRNA の絶対定量法により、マウス脳由来 miRNA の発現量を絶対定量することに成功した。マウス個体ごとに、miRNA の発現量を比較することができ、加齢による miRNA の発現量変動、さらにバリエント特異的な変動を測定することに成功した。

IV. マススペクトロメトリーを用いた新規 RNA 修飾の同定

tRNA は mRNA 上のコドンを読み取り、各コドンに対応するアミノ酸を合成中のポリペプチド鎖に転移させるアダプター分子である。tRNA には多くの修飾塩基が存在し、特にアンチコドンの 34 位およびアンチコドン近傍の 37 位に存在する修飾塩基は、正確なコドン認識に重要な役割を持つ。*N*⁶-threonylcarbamoyladenosine(*t*⁶A)は tRNA の 37 位において広く保存されている修飾塩基であり、タンパク質合成において ANN コドンの認識に大きな役割を有する。当研究室の先行研究で、*t*⁶A は大腸菌や酵母を含むさまざまな生物種において、脱水環化した cyclic *t*⁶A(*ct*⁶A)と呼ばれる構造を形成していることが明らかになっている。また、*t*⁶A を *ct*⁶A へ環化する修飾酵素 TcdA が同定されている。枯草菌 *Bacillus subtilis* および原生動物 *Trypanosoma brucei* の tRNA^{Lys}において、*t*⁶A の誘導体である 2-methylthio *N*⁶-threonylcarbamoyladenosine (*ms*²*t*⁶A)が同定されている。*ms*²*t*⁶A の 2-メチルチオ修飾は MtaB により形成され、Lys コドンの正確な解読に必要である。しかし、これらの生物において TcdA のホモログが存在することから、*ms*²*t*⁶A が脱水環化した 2-methylthio cyclic *N*⁶-threonylcarbamoyladenosine (*ms*²*ct*⁶A)が存在することが示唆された。

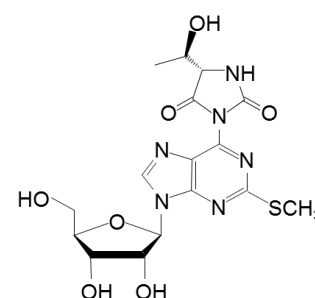


図2. *ms*²*ct*⁶Aの化学構造

第4章では、*B. subtilis* および *T. brucei* において、新規 RNA 修飾 *ms*²*ct*⁶A の同定およびその生合成機構の解析を行った。

1. *ms*²*ct*⁶A の同定

*ct*⁶A は、不安定な *t*⁶A 誘導体であり、弱アルカリ性条件下では加水分解されることが知られている。

通常、total RNA をヌクレオシドに分解する条件は pH 8 で行うが、この条件で *B. subtilis* の total RNA を消化し LC/MS を用いて解析を行うと、t⁶A や ms²t⁶A が観測されたが、それらの Cyclic 体は検出されなかった。次に、*B. subtilis* および *T. brucei* の total RNA を中性条件下で消化すると、ct⁶A と ms²ct⁶A が観測された(図 3A)。更に化学構造を確定するために、化学合成した ms²ct⁶A と *B. subtilis* の total nucleosides を混合し、LC/MS で測定したところ、天然の ms²ct⁶A は化学合成した標品と完全に一致し、同一ピークとして検出された。さらに、塩基部分を衝突誘起解離により分解し、プロダクトイオンの比較を行ったところ、完全に同一のパターンが得られた。また、*B. subtilis* から tRNA^{Lys} を単離し、詳細な LC/MS 解析を行ったところ、ms²ct⁶A が 37 位に存在することも明らかとなった。

2. ms²ct⁶A 形成因子の同定

B. subtilis において、t⁶A に 2 メチルチオ化修飾を行う MtaB、および t⁶A を脱水環化する TcdA の各遺伝子ホモログとして、*yqeV* および *yrvM* が存在する。これらの遺伝子を相同組換え法を用いることで破壊し、遺伝子欠損株 $\Delta yrvM$ および $\Delta yqeV$ と、それらの二重破壊株 $\Delta yqeV/\Delta yrvM$ を作製した。各欠損株から total RNA を抽出し、ヌクレオシド解析を行ったところ、予想通り、 $\Delta yqeV$ では 2-メチルチオ化修飾が失われた ct⁶A および t⁶A が検出され、 $\Delta yrvM$ ではサイクリック体が消失し、ms²t⁶A および t⁶A が観測された。二重欠損株 $\Delta yqeV/\Delta yrvM$ では t⁶A のみが観測された(図 3B)。これらの結果から、*B. subtilis* において、*yqeV* が t⁶A の 2-メチルチオ化を、*yrvM* が t⁶A の脱水環化を行うことで ms²ct⁶A を形成していることが判明した。

T. brucei にはそれぞれホモログである TbTcdA および TbMtaB が存在する。*T. brucei* においてこれらの遺伝子を RNAi 法でノックダウンし、ヌクレオシド解析を行ったところ、それぞれ遺伝子が ms²ct⁶A の環化および 2 メチルチオ化に関わることが証明された。また、シクロヘキシミド存在下において *TbTcdA* の発現を抑制した際に、*T. brucei* の生育が顕著に低下したことから、ct⁶A および ms²ct⁶A がタンパク質合成過程に関わることが示唆された。

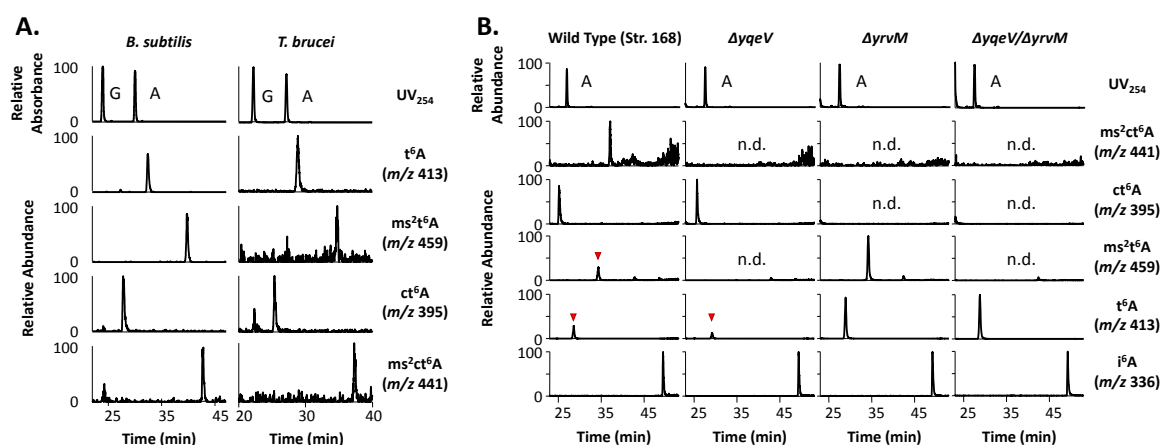


図3. ms²ct⁶A修飾および修飾形成因子の同定

3. まとめ

B. subtilis および *T. brucei* において、 t^6A の新規誘導体である ms^2ct^6A を同定し、化学合成した標品と比較することで、 ms^2ct^6A の化学構造を決定した。また、遺伝子の欠損および発現抑制を行うことで、 ms^2ct^6A 形成因子の同定に成功した。

VI. 結論

本研究では RNA-MS を用いた miRNA の直接的解析方法を確立し、さらには SIL-miRNA を用いた miRNA の絶対定量法を開発した。実際に、マウス組織由来 miRNA のプロファイリングの結果、データベースに登録されていない様々なバリエーションを検出した。また、安定同位体標識 miRNA を用いた手法により、個々の miRNA を絶対定量する系を確立し、個体間における miRNA の存在量の差異や、加齢により変動する miRNA を同定した。本研究は様々な細胞や組織、疾患における miRNA の発現解析に用いることが可能である。さらに、本研究では、*B. subtilis* と *T. brucei* において、新規 RNA 修飾 ms^2ct^6A を同定し、その生合成に関わる修飾酵素を同定した。

VII. 投稿論文

Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Kang, B.L. and Suzuki, T. (2015) Nucleoside Analysis by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry, *Methods Enzymol.*, 560, 19-28

Kang, B.L., Miyauchi, K., Matuszewski, M., D'Almeida, G.S., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D., Inoue, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Sochacka, E. and Suzuki, T. (2016) Identification of 2-methylthio cyclic N⁶-threonylcarbamoyladenine (ms^2ct^6A) as a novel RNA modification at position 37 of tRNAs, *Nucleic Acids Res.*, in press