

## 論文の内容の要旨

### 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)

氏名 姜 秉一

#### I. 本研究の目的

MicroRNA(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 RISC 複合体を形成する。miRNA-RISC 複合体は、mRNA の 3'末端非翻訳領域の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. マスマ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  $\mu$  m、長さ 5cm）に C18(粒径 3 $\mu$  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。マスペクトルをデコンボリューション処理を行うことにより、個々のmiRNAの分子量を算出した。また、各多価イオンに対し、衝突活性化分解(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。紫外吸収スペクトル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った。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、測定時にその安定同位体標識された SIL-Marker を導入し、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 1,500fmol 存在することが明らかとなり、miR-29 は約 5,000fmol 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 1g 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。バリエーションごとの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 AGO 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 AGO 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 バリエーション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 バリエーションを LC/MS で測定した。低分子画分における miR-9 バリエーションの存在比に対し、AGO2 に含まれる miR-9 バリエーションの存在比を比較したところ、最も長いバリエーションである 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 の各バリエーションを検出したところ、AGO1 には最も長いバリエーションである miR-9(0,0)の含有率が高く、AGO2 には最も短いバリエーションである miR-9(0,-2)の含有率が高かった。これらの結果から、miR-9 のバリエーション特異的な変動は AGO 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、さらにバリエーション特異的な変動を測定することに成功した。

## IV. 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が検出された。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。