

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03830

研究課題名(和文) マイクロRNAの量的・質的変動を解析するシステムの構築

研究課題名(英文) Development of an analytical system for quantitative and qualitative variation of miRNA

研究代表者

梅村 知也 (Umemura, Tomonari)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：10312901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAをはじめとするncRNAの量的・質的変動を評価するために、質量分析を基盤とする分離分析システムの高機能化と高性能化を図った。RNAの精密分離やRNAの断片化を迅速に行える様々なモノリス型キャピラリーデバイスを開発するとともに、それらを繋ぎ合わせてncRNAの分析に特化した分離計測システムを構築した。また、ヒトiPS細胞やヒト肝がん細胞(HepG2)を様々な条件下で培養し、その細胞内に発現してくるncRNAの網羅的な分析を実施した。化学物質の暴露により、複数種のncRNAの発現量が顕著に増加し、なかには、その近傍に存在する遺伝子の発現量に多大な影響を及ぼすものもあることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In order to quantitatively analyze non-coding RNAs including micro RNAs, mass spectrometry-based separation system was constructed. We have refined our monolithic column technology and produced a variety of capillary-based analytical tools for chromatographic separation, analyte extraction, and catalytic reaction. We have also developed interface devices for optimal coupling of separation techniques with mass spectrometry. We have integrated such analytical tools, devices and instruments to construct highly-efficient analysis system for the evaluation of quantitative and qualitative variation of non-coding RNAs.

研究分野：分析化学

キーワード：クロマトグラフィー モノリスカラム 機能性RNA マイクロリアクター

1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉や miRNA の発見によって、タンパク質をコードしない RNA (non-coding RNA: ncRNA) が実に多彩な生命現象に関与していることが分かってきた (Krol et al., Nat. Rev. Genet., 11, 597-610, 2010)。なかでも塩基長が 20 程度の miRNA は、標的とするメッセンジャー RNA (mRNA) に対して相補的な配列を有しており、その遺伝子の発現を抑制する。これまでの研究から、ヒトでは 2,000 種類以上の miRNA が存在しており、分化や増殖をはじめとする生命現象から、がんや心不全などの疾病とも深く関わっていることが示され、今や ncRNA は診断マーカーや創薬の標的分子として認識されつつある。

一般に、miRNA の測定は、マイクロアレイや次世代シーケンサーにより大量解析が行われる。これらの手法は miRNA の網羅的な発現プロファイルを得る手段として有効であり、その変動を定性的に捉えることができるが、1 つの細胞内にその分子がいくつ存在するかという定量的な観点が欠けている。マイクロアレイによる miRNA の変動解析において、仮に細胞のがん化において miRNA の定常状態量が 2 倍に亢進したというデータが得られても、10 個の miRNA が 20 になったのか、あるいは 1000 個が 2000 個になったのかを区別することができない。細胞内の miRNA が 100 個未満の場合は、ほとんど翻訳抑制効果がない (B.D. Brown, et al., Nat. Biotechnol., 25, 1457-1467, 2007) ことが知られており、変動を相対的に捉えるだけでは不十分である。また、個々の miRNA には鎖長や塩基配列が異なる多くのバリエーションが存在することが知られており、それらを区別することも不可能に近い。そのようなバリエーションも完全に区別して個別に定量するためには、高性能な分離分析法 (HPLC) と高感度な質量分析法 (ESI-MS や MALDI-TOFMS, ICP-MS) とを組み合わせた方法が唯一現実的かつ実用的な方法といえ、本研究でもこの質量分析を基盤とした分析法を採用し、その高性能化に挑戦する。なかでも本申請課題では、我々の研究グループが得意とする分離分析技術やフロー反応デバイスの高性能化と高機能化を中心に飛躍的な性能向上を目指す。

2. 研究の目的

マイクロ RNA (miRNA) をはじめとする非翻訳 RNA (ncRNA) は、多種多様な生命現象を司り、がんや心疾患等の病気にも深く関与していることが明らかになりつつあり、早期診断のためのバイオマーカー、また、核酸医薬品としての利用も期待されている。こうした機能性 ncRNA の役割を正しく理解するためには、発現の有無や増減を議論するだけでなく、その存在量を定量的に把握する必要がある。さらに、生体内での生合成と代謝分解の過程を経時的に追跡することも今後は重要になると予想される。

そこで本課題では、これまで培ってきたモノリスカラム技術と最新鋭の質量分析技術を融合して、細胞内外にごく微量で存在する miRNA の質的・量的な変化を定量的に評価する技術の開発に取り組む。また、様々な培養細胞内で発現している ncRNA を分析し、バイオマーカー候補の探索にも着手する。

3. 研究の方法

本申請課題では、機能性 RNA の動態を定量的に評価する方法の確立を目指し、以下に示す要素技術を完成させるとともに、ライフサイエンス研究への応用を見据えた基礎研究に取り組む。なお、申請書作成当初から RNA 研究は飛躍的に進み、長鎖の ncRNA も極めて重要な役割を担っていることが明らかになった。そのため、長鎖の ncRNA の分析にも適用できるように、RNA の切断を研究項目に新たに加えている。

3.1. miRNA の探索・同定に資する要素技術の開発 (定量のための基盤技術の開発)

a) モノリス型キャピラリーデバイスの開発

ESI-MS は、試料導入流量を毎分 sub- μL にまで低減していくと、イオン化効率と試料導入効率が改善され、検出効率が飛躍的に向上する。本研究では、この nano-spray ESI-MS に適した分離システムを構築するために、モノリスカラム技術を用いて、内径 100 μm 以下 (500 nL/min 以下の流速に対応) の様々なキャピラリーカラムをカスタムメイドする技術を確立する。逆相モードやイオン交換モード、親水性相互作用モードなど様々な分離モードのカラムを試作し、合成オリゴヌクレオチドや酵母由来の RNA を用いてその分離性能を評価する。

b) ハイフネーテッド分析システムの構築 - nano HPLC と各種質量分析計 (ESI-MS/MS, MALDI-TOFMS, ICP-MS) との結合 -

nano HPLC - ESI-MS はすでにライフサイエンス研究で汎用されているが、nano HPLC と MALDI-TOFMS や ICP-MS とを結合させたハイフネーテッド分析システムの開発は遅れている。本申請課題では、nano-spotting システムの改良、全量消費型のマイクロネブライザーの開発、さらには、カラム一体型のネブライザーの開発など、微量試料に対応でき、微量の miRNA の分析に適したインターフェース部の開発に取り組む。

c) ncRNA のオンライン消化 (断片化) システムの構築

RNA 類は、唾液等の混入によって意図せぬ分解が起こる危険性が絶えず付きまとう。そのため、できる限り分析操作の自動化と迅速化が望まれる。本研究では、ncRNA の酵素消化をオンラインで (送液操作の過程で) 行えるように、モノリス担体表層にリボヌクレアーゼ (酵素) を固定化したマイクロリアクターを試作し、その実用可能性を検証する。ま

た、小宮山 (*Chem. Lett.*, **1994**, 1025-1028) らによって見出された希土類元素を利用した RNA の加水分解に関しても、モノリス型リアクターに Ce(IV)等を固定化して、オンラインでの切断の可能性を検証する。

3.2. ライフサイエンス研究への応用を見据えた基礎研究

a) 培養細胞内の ncRNA の安定性の評価

RNA の安定性(代謝分解)は生理機能の制御に深く関与しており、そうした分解のしやすさを切り口とするライフサイエンス研究が近年注目されている。本研究では、定量 PCR 法を用いて、細胞内に発現する ncRNA の経時的な増減を調査する他に、核酸アナログ(プロモウリジン)を用いた安定性の評価法を検討する。具体的には、ncRNA 群を抽出して HPLC で分離後、ICP-MS により RNA 骨格由来の P 及びプロモウリジン由来の Br を計測して、変動する成分を探索する。

b) ncRNA をバイオマーカーとして用いる化学物質の暴露影響評価技術の開発

ヒト iPS 細胞やヒト肝がん細胞 (HepG2) を様々な条件下で培養し、その細胞内で発現してくる ncRNA の網羅的な分析を実施し、バイオマーカーとなりうる候補物質を探索する。また、RNA 干渉法によりノックダウンするなどして、miRNA の分解に関与している分解酵素の探索を併せて行う。

4. 研究成果

a) nano HPLC 用のモノリス型キャピラリーカラムの充実

ESI-MS における検出感度は試料導入流量と密接に関係している。本研究では、nano-spray ESI-MS に適した最善の nano HPLC を構築するために、内径が 250 μm 以下のピークシルチューブをカラム管として用い、その中で様々なモノマー溶液を in situ 重合することにより、逆相やイオン交換、親水性相互作用 (HILIC) など種々の分離モードのキャピラリーカラムをカスタムメイドすることに成功した。

b) モノリス型マイクロリアクターの開発とナノフローシステムの構築

RNA の同定作業で汎用される酵素消化のオンライン化を図るために、モノリス担体表層にリボヌクレアーゼ A (RNase A) を固定化したマイクロリアクターを試作し、その切断能を合成オリゴヌクレオチドや Torula RNA を用いて評価した。数マイクロメートルの微小空間を利用するマイクロリアクターでは数秒もあればほぼ定量的に消化が進み、通常のパルク空間(エペンドルフチューブなど)での反応と比較して格段に効率が向上することを確認した。さらに、十方バルブを介して二つの送液システムをつなぎ、一方を酵素消化に、もう一方を分離分析に利用することで、オンラインで酵素消化と分離分析を

連続的に行うことに成功した。

c) Ce (IV) 固定化モノリス型マイクロリアクターによるリン酸ジエステル結合の切断

モノリス担体表層に様々な希土類金属イオンを固定化したマイクロリアクターを試作し、その加水分解能を調査した。p-ニトロフェニルリン酸 (pNPP) を用いてリン酸ジエステル結合の切断能を評価したところ、Ce (IV) を固定化したマイクロリアクターでは、反応時間 1 分で 90%以上の pNPP が p-ニトロフェノール (pNP) に分解されることを確認した。続いて、トルラ酵母由来の total RNA の断片化を試みたところ、1 分程度でほぼヌクレオチドにまで切断され、さらに 5 分反応させるとヌクレオチドにまで切断が進行することを確認した。なお、核酸塩基由来のピークは観測されなかったことから N-グリコシド結合の切断は起きないことも分かった。さらに、反応時間やセリウムの活性を制御することにより、オリゴヌクレオチドまでの切断に留めるといったリボヌクレアーゼ様の選択的な切断の可能性もあることを示した。

d) nano HPLC と MALDI-TOFMS とのハイフネード分析システムの構築

nano HPLC と MALDI-TOFMS のインターフェースとして市販のナノスポッティング(分注)装置をカスタマイズし、その使用条件の最適化を図りながら、miRNA のイオン化に適したマトリックス試薬の探索を並行して行い、sub-fmol レベルの miRNA の検出に成功した。さらに、ナノ構造体を利用してマトリックスフリーでイオン化する nanostructure-assisted laser desorption ionization (NALDI)の可能性についても期待できる成果が得られた。

e) ICP-MS 用カラム一体型マイクロネブライザーの開発

元素の高感度分析が可能な ICP-MS では、金属元素であれば概ね 90%以上がイオン化されるため、精度よく定量分析を行える。一方、リンや臭素のような非金属元素はイオン化効率が悪いいため、通常は ICP-MS の分析対象となることは少ない。しかし、10%程度はイオン化されており、その割合は安定しているため、選択性に優れ精度もよい定量法として潜在的価値を有する。本研究では、質量分析計に負担が少ないように内径の小さなキャピラリーカラムを採用するとともに、適切な溶離液の選択によりバックグラウンドノイズの低減を図り、RNA の構成要素であるリン(P) および標識として導入したハロゲン元素の高感度検出に成功した。

f) ncRNA をバイオマーカーとして用いる化学物質の暴露影響評価技術の開発

神経幹細胞へと分化させたヒト iPS 細胞に過酸化水素や塩化水銀、シクロヘキシミド、エトポシドのような化学物質を暴露させると、複数種類の ncRNA(バイオマーカー候補)

が顕著に増加した。それらの ncRNA の経時的な代謝過程を調査したところ、分解が抑制されることによって細胞内に蓄積されていることが分かった。また、RNA 干渉法を用いて分解酵素をロックダウンすることにより、ncRNA の分解に関与する酵素をいくつか特定することができた。さらに、ncRNA のなかには、隣接する遺伝子の発現量に深く関与しているものがあることも分かった。

g) 大腸癌患者の KRAS 変異部位の迅速診断

大腸癌は上皮成長因子受容体 (EGFR) の異常発現または KRAS 遺伝子の点変異により引き起こされる。EGFR の異常発現は抗 EGFR 抗体薬による薬物治療が有効であるが、KRAS 遺伝子の点変異には効き目がなく、大腸癌の適切な薬物治療を行うためには、KRAS 遺伝子の変異を簡便かつ高感度に検出する方法の開発が望まれている。本研究では、Albrecht (electrophoresis, **34**, 590-597, 2013) らの方法を参考にして、リガーゼ検出反応 (LDR) と陰イオン交換 HPLC を用いる方法を検討し、変異部位のオリゴ DNA (LDR 生成物) を迅速かつ簡便に識別することに成功した。本法は、特別な技術を必要とせず、また、有害な試薬も使わないことから、病院の検査室レベルでも十分に利用可能であり、大腸がん患者の薬剤耐性を現場で迅速に評価できる方法として期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

Hirose, A., Kasai, T., Aoki, M., Umemura, T., Watanabe, K., Kouzuma, A., Electrochemically Active Bacteria Sense Electrode Potentials for Regulating Catabolic Pathways. *Nature Communications*, **9**, 1083 (2018) 査読有り

Murakami, H., Horiba, R., Iwata, T., Miki, Y., Uno, B., Sakai, T., Kaneko, K., Ishihama, Y., Teshima, N., Esaka, Y., Progress in a Selective Method for the Determination of the Acetaldehyde-derived DNA Adducts by Using HILIC-ESI-MS/MS, *Talanta*, **177**, 12-17 (2018) 査読有り

Tani, H., Okuda, S., Nakamura, K., Aoki, M., Umemura, T., Short-lived Long Non-coding RNAs as Surrogate Indicators for Chemical Exposure and LINC00152 and MALAT1 Modulate Their Neighboring Genes, *PLoS One* **12(7)**: e0181628 (2017) 査読有り

Tani, H., Sato, H., Torimura, M., Rapid Monitoring of RNA Degradation Activity in vivo for Mammalian Cells, *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 523-527 (2017) 査読有り

Sakai, Y., Kotani, A., Umemura, T., Mori, Y., Kusu, F., Yamamoto, K., Hakamata, H., Electrochemical Determination of Synephrine

by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Using a Zwitterionic Monolith Column, *Electroanalysis*, **28**, 1947-1951 (2016) 査読有り

Suzuki, Y., Takenaka, C., Tomioka, R., Tsubota, H., Takasaki, Y., Umemura, T., Accumulation of Arsenic and Copper by Bryophytes Growing in an Aquatic Environment near Copper Mine Tailings, *Mine Water Environ.*, **35**, 265-272 (2016) 査読有り

Sakurai, T., Aoki, M., Ju, X., Ueda, T., Nakamura, Y., Fujiwara, S., Umemura, T., Tsuzuki, M., Minoda, A., Profiling of Lipid and Glycogen Accumulations under Different Growth Conditions in the Sulfothermophilic Red Alga *Galdieria sulphuraria*, *Bioresour. Technol.*, **200**, 861-866 (2016)

[学会発表] (計 36 件)

谷 英典, 奥田 彩也夏, 中村 薫, 青木 元秀, 梅村 知也, ヒト iPS 細胞における新規バイオマーカーとしての長鎖ノンコーディング RNA の解析, 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017/12/9-12, 神戸ポートアイランド, 神戸

宮下 振一, 高江 祥, 藤井 紳一郎, 高津 章子, 梅村 知也, 稲垣 和三, ICP-MS によるヒ素化合物分析のためのカラム組み込み型ネブライザー開発, 第 23 回ヒ素シンポジウム, 2017/12/7-8, つくばイノベーションプラザ, つくば

高江 祥, 和田 堯之, 熊田 英峰, 内田 達也, 青木 元秀, 梅村 知也, モノリス型マイクロリアクターを用いた核酸の切断とその特性評価, 第 14 回茨城地区分析技術交流会, 2017/12/1, いばらき量子ビーム研究センター

Miyashita, S., Takae, S., Fujii, S., Takatsu, A., Umemura, T., Inagaki, K., Development of a Separation Column-integrated Nebulizer for Speciation Analysis by ICP-MS, Asia Pacific Winter Conference 2017, 2017/11/12-17, Matsue, Japan

高江 祥, 和田 堯之, 熊田 英峰, 内田 達也, 青木 元秀, 梅村 知也, 金属触媒固定化モノリス型マイクロリアクターを用いた核酸の切断特性の評価, 日本分析化学会第 66 年会, 2017/9/9-12, 東京理科大学葛飾キャンパス, 東京

谷口 紀恵, 青木 元秀, 矢田部 純, 河口 優子, 横堀 伸一, 橋本 博文, 山岸 明彦, 梅村 知也, 紫外線照射された放射線耐性細菌中の核酸塩基の損傷分析, 日本分析化学会第 66 年会, 2017/9/9-12, 東京理科大学葛飾キャンパス, 東京

梅村 知也 (依頼講演), 高効率な化学反

応空間を提供するモノリス多孔体, 日本分析化学会第 66 年会本部主催シンポジウム“最先端分離化学とその応用”, 2017/9/9-12, 東京理科大学葛飾キャンパス, 東京

梅村 知也 (依頼講演), 各々のメタロミクス - ISM2007 開催から 10 年の歳月を経て -, プラズマ分光分析研究会 第 100 回記念講演会 21 世紀におけるプラズマ分光分析法の展望, 2017/9/5, 幕張メッセ国際会議場 (103 会議室), 千葉

谷 英典, 奥田 彩也夏, 中村 薫, 青木 元秀, 梅村 知也, LINC00152 及び MALAT1 は近傍の遺伝子発現を制御する, 日本 RNA 学会年会, 2017/7/19-21, 富山国際会議場, 富山

梅村 知也 (講師依頼), ショートコース「液体クロマトグラフィーの基礎とプラズマ分光分析法の接点」, プラズマ分光分析研究会 2017 つくばセミナー, 2017/7/6-7 つくばイノベーションプラザ, つくば

Aoki, M., Matsumoto, N., Bessho, K., Kumata, H., Uchida, T., Umemura, T., Preparation and Characterization of Organic Polymer-Based Adsorbent with Phenylboronic Acid Functionality for Capturing Biological cis-Diol-Containing Compounds, the 13th Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII), 2016/12/8-11, The Empress International Convention Center, Chiang Mai, Thailand.

松下 莉那, 井戸 航洋, 藤井 紳一郎, 宮下 振一, 保倉 明子, 梅村 知也, 稲垣 和三, グリッドネブライザーを用いた Standard Dilution Analysis/ICP-OES 法の検討, 日本分析化学会第 65 年会, 2016/9/14-16, 北海道大学, 札幌

和田 堯之, 青木 元秀, 熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, モノリス型マイクロリアクターを用いた RNA 断片化の制御, 日本分析化学会第 65 年会, 2016/9/14-16, 北海道大学工学部, 札幌

松本 七虹, 青木 元秀, 熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, ボロン酸型有機ポリマーモノリスによる糖複合体の固相抽出・濃縮デバイスの開発, 日本分析化学会第 65 年会, 2016/9/14-16, 北海道大学工学部, 札幌

Wada, T., Aoki, M., Kumata, H., Uchida, T., Umemura, T., Ribonuclease A Immobilized Monolithic Microreactor for Rapid Flow-Through Digestion of RNA, RSC Tokyo International Conference 2016, 2016/9/8-9, Makuhari Messe, Chiba

梅村 知也 (依頼講演), モノリス型キャピラリーデバイスを利用した核酸の精密分離分析技術の開発, 第 76 回分析化学討

論会 ~分析化学の未来を展望する~ (ノンコーディング RNA の最先端分析手法にせまる), 2016/5/28-29, 岐阜大学, 岐阜
奥田 彩也夏, 中村 薫, 梅村 知也, 青木 元秀, 谷 英典, ncRNA に着目した生体影響評価技術の開発, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, パシフィコ横浜, 横浜

松本 七虹, 青木 元秀, 熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, ボロン酸型固相抽出モノリスカラムによる糖脂質の選択的捕集と LC-MS/MS による検出, 第 22 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2015/5/28-30, 近畿大学, 東大阪

梅村 知也 (依頼講演), オミックス研究を支援するモノリス型マイクロデバイス・システムの構築, 第 4 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム 医学薬学工学連携で広がる新しい世界, 2015/6/20, 工学院大学アーバンテックホール

青木 元秀, 梅村 知也, 糖脂質のボロン酸型固相抽出モノリスカラムによる精製前処理と ESI-MS/MS による検出, 日本分析化学会第 64 年会, 2015/9/9-11, 九州大学, 伊都キャンパス

[図書] (計 5 件)

梅村 知也, クリスマス分析化学 原書 7 版 II 機器分析編, 丸善 (分担執筆 21 章 液体クロマトグラフィーと電気泳動) 2016

Umemura, T., Matsui, Y., Sakagawa, S., Fukai, T., Fujimori, E., Kumata, H., Aoki, M., Metallomics, Recent Analytical Techniques and Selected Applications (Edited by Y. Ogra and T. Hirata), Springer (分担執筆 Chapter 11 Comprehensive Element Analysis of Prokaryotic and Eukaryotic Cells as well as Organelles by ICP-MS, pp.219-237) 2016

梅村 知也, 機器分析 (エキスパート応用化学テキストシリーズ), 講談社 (分担執筆 13 章 液体クロマトグラフィー, pp. 171-184) 2015

梅村 知也, 基礎分析化学, 朝倉書店 (分担執筆 6 章 クロマトグラフィーと電気泳動, pp. 84-93, pp. 101-110) 2015

梅村 知也, 環境調和型社会のためのナノ材料科学, エコトピア科学シリーズ 2 巻, コロナ社 (分担執筆 6 章 生体を構成する元素の科学 “生物の元素戦略”, pp. 141-160) 2015

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~bioanalchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 知也 (UMEMURA, Tomonari)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：10312901

(2) 研究分担者

手嶋 紀雄 (TESHIMA, Norio)
愛知工業大学・工学部・教授
研究者番号：30292501

谷 英典 (TANI, Hidenori)
産業技術総合研究所・環境管理研究部門・
主任研究員
研究者番号：10635329

リム リーワ (LIM, Lee Wah)
岐阜大学・工学部・准教授
研究者番号：80377689

青木 元秀 (AOKI, Motohide)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号：30418917