

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14625

研究課題名(和文) シュードウリジン：新しいガンマーカーの探索

研究課題名(英文) Pseudouridine: new biomarker for cancer diagnosis

研究代表者

田岡 万悟 (Taoka, Masato)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：60271160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：シュードウリジン(5-ribosyluracil、)は、質量に変化がない唯一の転写後修飾ヌクレオシドでウリジンとよく似ているために、これまで微量なRNAに適用できる有効な配列決定法がほとんどなかった。本研究では、 の質量分析(MS)に基づく新規な配列決定方法を開発した。この方法を応用することで、出芽酵母やヒトrRNA、ヒト核内低分子RNAに含まれる を同定した。この方法は、RNAのフェムトモル量の直接的な決定を可能にするため、今後、広範なnon-coding RNAの構造/機能研究のための確実かつ有用なツールとして役立つことが期待された。

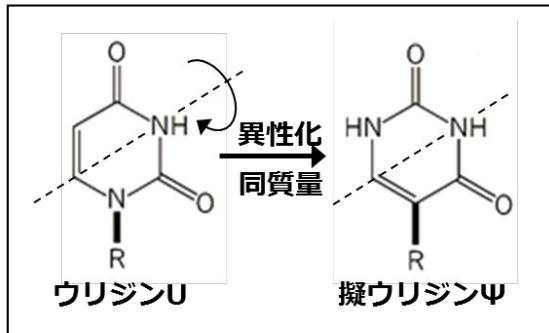
研究成果の概要(英文)：Pseudouridine (5-ribosyluracil,) is the only posttranslational modification with no mass shift, thus there have been few effective analysis methods that can be applied to trace amount of authentic RNAs so far. In this research, we developed a novel analytical method for -containing RNA sequence based on mass spectrometry. By applying this method, we determined -containing sequence in yeast and human rRNA, and human nuclear small RNA. This method should allow to serve as a reliable and useful tool for the structural/functional study of a wide range of non-coding RNA as it enables direct determination of of femtomole amount of RNA.

研究分野：生化学

キーワード：RNA 転写後修飾 質量分析

1. 研究開始当初の背景

生体内で働く RNA に含まれるウリジンは、高頻度に異性化されてシュドウリジン () となっている (図、 はウリジンのピリミジン環が 3-6 位軸を中心に反転した幾何異性体である)。モノマーは古くから血中や尿中のガンマーカーやガンの予後マーカーとして知られており、盛んに研究されている (Ito K, Clin Chim Acta. 1989; 石渡ら、薬学雑誌、1995)。一方で、このモノマーは直接



合成されるわけではなく、ウリジンとして RNA に組み込まれた後に特異的な酵素で合成され、分解物として生じるものであり、その多くはリボソーム RNA (rRNA) の分解物であると考えられた。こうした背景から、ガン化によって rRNA に が増加することが予想されたが、 の決定法は、方法として完成しておらず、ヒト rRNA の サイトには未決定の部分があった。また、ヒトや酵母において、様々な RNA において、未同定の サイトがあることが文献等の調査から、予想された。

2. 研究の目的

本研究では、RNA に含まれる をサイト特異的に同定する新たな方法を構築すること、その方法を利用したヒトおよび酵母 rRNA ならびに他の構成的な RNA の サイトの全同定を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

RNA は、培養した培養細胞 (HeLa・TK6) から抽出し、マクロ多孔性ポリスチレン-ジビニルベンゼン樹脂カラム (Yamauchi Y, J Chromatogr A. 2013;1312:87) を利用して逆相液体クロマトグラフィーにより精製した。精製した RNA に対する RNase T1 による消化は定法で行った。

RNase T1 で消化した RNA 断片は、ナノフロー LC で分離し、四重極-Orbitrap 複合型質量分析計を使って、MS/MS 分析した (Taoka M, Nucleic Acids Res. 2009;37: e140)。MS/MS スペクトルは、分離した RNA フラグメントを低い正規化衝突エネルギー (25%NCE) で CID によって断片化することで得た。RNA の配列決定は、スペクトルデータをクエリーとして、Ariadne (Nakayama, Nucleic Acids Res. 2009;37: e47) によって行った。

それぞれの RNA に含まれる とその配列上での場所の決定のために、イン・ソース断片化の後に MS/MS (疑似 MS3) で分析した。イン・ソース断片化は、質量分析計のイオン導入部に 70-80eV の電圧をかけて、その他は上述の MS/MS と同様の操作によって分析した。 の配列上での場所は、得られた疑似 MS3 スペクトルに見られる 二重脱水ヌクレオシドアニオン ($[C_9H_7N_2O_4]^{-1}$) m/z 207.04 を含む MS3 スペクトルから判断した。

4. 研究成果

(1) 特異的なプロダクトイオンの検出と確認

申請者の MS/MS スペクトルの観察によって、 を含む RNA からは常にプロダクトイオン m/z 207.04 が得られていた。これが様々な配列から検出が可能か、以下の方法 とで確認した。

オリゴ RNA の合成：同配列で を含む RNA とウリジンを含む RNA を複数合成した。

LC-MS/MS 解析：特異イオンの出現を確認した。

(2) 特異的なプロダクトイオンによる の位置情報の取得

上記(1)で記載した を含む合成 RNA を使って、RNA 内での の位置情報を取得するためのスキームを作った。これによって RNA 内に複数のウリジンが存在する場合でも の配列上での位置を特定できた。スキームは以下 ~ 。

LC-MS/MS 解析：特異イオンの有無を確認する。MS スペクトルからその親イオンの質量を確認する。MS/MS から 以外の RNA 配列を決定する。

LC-MS3 解析：親イオンを破断して得られた子イオンをさらに破断し、孫イオンのスペクトルを取得する。

データ処理：孫イオンの中の 特異イオンの有無から の位置を決定した。

(3) 生体から回収した含有量の多い RNA での確認実験

の配列上での位置がほぼ全て決定されている酵母 rRNA を試料とした。生体から回収した試料で申請者の方法がワークするか以下 ~ の方法で確認した。

出芽酵母 rRNA の精製：AGPC 法で粗精製した後にイオンペア LC (Yamauchi Y, J Chromatogr A. 2013) で精製。

rRNA の断片化：RNase T1 で切断して、3' がグアニンの短鎖 RNA にした。

LC-MS/MS 解析：分析後 特異イオンでトレースして、 以外の転写後修飾が類似の MS/MS イオンを形成しないこと (フォールスポジティブがないこと) を確認。

データ処理： 特異イオンが検出された親イオンの質量や MS/MS スペクトルからその RNA が rRNA のどの部位にあたるかを同定した。複雑な rRNA の RNase による切断物から、を含む全ての RNA が検出され、十分な精度 (誤差 10ppm 以内) で観測することで、 を含まない RNA は全く検出されないことが明らかとなった。すなわち、フォールスポジティブがなく、 特異的な検出が可能となった。

この実験と SILNAS 法 (Taoka M, *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e115) を組み合わせることで、出芽酵母由来の rRNA の完全な化学構造を決定した。その化学構造は、112 の修飾部位を含み、これまで同定されていなかった 25S rRNA の 2345 位に新たな を同定した。また、112 のうち、94 サイトはほとんど完全に修飾されていたが、残りの 18 サイトは部分的に修飾されていた。この研究は、出芽酵母 rRNA の全ての転写後修飾サイトと修飾率を確定し、真核生物のリボソームの構造的、機能的および生物発生研究のための重要なリソースを提供することになった (Taoka M, *Nucleic Acids Res.* 2016;44: 8951)。

(4) 生体から回収した微量 RNA での確認実験 同様に、典型的な 5 種類のヒト HeLa 細胞中のスプライソソーム snRNA を精製した (Yamauchi Y, *J Chromatogr A.* 2013;1312: 87) snRNA に含まれる既知の全ての を同定した。これに加え、これらの snRNA のなかに、未知の 2 つの を U5 および U6 snRNA 中に発見した (Taoka M. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44:e59)。

(5) ヒト標準 マップの作成
次に、ヒト TK6 細胞に含まれる rRNA を精製した (Yamauchi Y, *J Chromatogr A.* 2013) 。本方法と SILNAS 法、安定同位体 ラベル法 (未発表) とを組み合わせることで、その サイトを決定した。これにより、未同定の 7 箇所の を含む、104 箇所の 化サイトを同定した。これらの は、ガンにおいて検出される モノマーの起源と考えられた。

この方法は、RNA のフェムトモル量の の直接的な同定を可能にするので、今後、広範な non-coding RNA の構造/機能研究のための確実かつ有用なツールとして役立つことが明らかとなった。また、本研究で決定したヒト rRNA に含まれる がどのようにして血中や尿中のガンマーカーとなるのか、今後の研究による解明が期待された。

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 2件)

"The complete chemical structure of

Saccharomyces cerevisiae rRNA: partial pseudouridylation of U2345 in 25S rRNA by snoRNA snR9." Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, Yamauchi Y, Ishikawa H, Takahashi N, Nakayama H, Isobe T. *Nucleic Acids Res.* 2016;**44**(18):8951-8961

"A mass spectrometry-based method for direct determination of pseudouridine in RNA." Yamauchi Y, Nobe Y, Izumikawa K, Higo D, Yamagishi Y, Takahashi N, Nakayama H, Isobe T, Taoka M. *Nucleic Acids Res.* 2016;**44**(6):e59.

[学会発表](計 6件)

"Mass spectrometry-based determination of the complete chemical structure of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal RNAs" Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, Ishikawa H, Yamauchi Y, Takahashi N, Nakayama H, Isobe T. 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2016

"Identification of isomeric mono-methylated nucleosides in ribonucleic acids by liquid chromatography-highly accurate tandem mass spectrometry" Hiroshi Nakayama, Yoshio Yamauchi, Masato Taoka M, Toshiaki Isobe T. 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2016

「ncRNA の転写後修飾解析」田岡万悟 第 64 回質量分析総合討論会 2016 (招待)

"LC-MS based determination of pseudouridine at single nucleotide resolution in mammalian non-coding RNAs using a uridine synthesis deficient cell line" Yamaki Y; Nobe Y; Nakayama H; Ishikawa H; Yamauchi Y; Takahashi N; Isobe T; Taoka M. 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017

"Characterization of post-transcriptional modifications using low-mass-fragment signatures generated by highly-accurate tandem mass spectrometry" Nakayama H; Nobe Y; Yamauchi Y; Taoka M; Toshiaki Isobe. 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017

「リボヌクレオプロテオーム解析：質量分析を基礎とした網羅的な RNA 転写後修飾解析法の開発」田岡万悟 JPrOS2017 年大会 2017 (招待)

「質量分析を基礎とした RNA 転写後修飾解析法の開発」田岡万悟 第 12 回 GS コロキアム (防衛大学校グローバルセキュリティーセ

ンター主催) (招待)

〔図書〕該当無し

〔産業財産権〕該当無し

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.comp.tmu.ac.jp/proteomicslab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田岡 万悟 (TAOKA Masato)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 60271160

(2) 研究分担者

泉 友則 (IZUMI Tomonori)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00261694