

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14253

研究課題名(和文) 質量分析計を用いたヒトRNAにおけるシュードウリジン化修飾同定法の開発

研究課題名(英文) Identification technique development for post-transcriptional modifications of pseudouridylation in human RNA by mass spectrometry

研究代表者

八巻 優佳 (Yamaki, Yuka)

首都大学東京・理学研究科・客員研究員

研究者番号：80781525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトリンパ芽球TK6細胞のウリジンーリン酸合成酵素(UMPS)遺伝子がノックアウトされた、UMPS株に5,6-d2ラベルウリジン処理培養し、細胞内で生合成されたRNAよりU2 snRNAおよびU3 snoRNAを精製した。精製したRNAをRNase消化の後にLC-MSで分析し、得られたスペクトルデータをデータベースAriadneでサーチすることで、U2 snRNAおよびU3 snoRNAにおける新規シュードウリジン化修飾サイトを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シュードウリジン化酵素によりウリジンがシュードウリジン化修飾を受けても、化学的性質に変化は見られず質量に差が生じないことから、質量分析計で両者を判別することは困難であった。しかし、UMPS株とラベルウリジンを用いることで、シュードウリジン化修飾により生じる質量差を利用することで、シュードウリジン化サイトを明らかにすることが可能になった。

研究成果の概要(英文)：U2 snRNA and U3 snoRNA were purified from RNA biosynthesized with uridine-5, 6-d2 in the human TK6 cells deficient in mono phosphate synthase. U2 snRNA and U3 snoRNA were analyzed by LC-MS after digestion with RNase. Spectrum were searched in the database Ariadne, and novel pseudouridylation sites were revealed.

研究分野：分子生物学

キーワード：質量分析 RNA 転写後修飾 シュードウリジン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

RNA が機能性を獲得するためには、DNA から転写された後にさまざまな修飾を受ける必要がある。転写後修飾のひとつとして、ウリジン残基の異性化によるシュードウリジン化が挙げられる。修飾の多くを占めるシュードウリジン化は、核小体低分子 RNA (snoRNA) -タンパク質複合体により行われる。修飾部位の決定には、修飾の標的となるウリジンの近傍と相補的な配列を有する snoRNA がガイド RNA として関与することが明らかにされている。これまで 100 種類にも及ぶ snoRNA が同定された。一方で、snoRNA の配列情報だけではシュードウリジン化サイトの推定に留まり、確定することができない。snoRNA の導きにより、一体どのウリジンがシュードウリジン化修飾を受けるのかを明確にする方法の開発を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトの RNA におけるシュードウリジン化修飾を簡便に、かつ網羅的に同定する方法を開発する。具体的には、ヒト培養細胞より抽出した RNA を RNase で断片化し、質量分析計を用いてシュードウリジンの質量電荷数比 ( $m/z$ ) を検出し、データベースサーチ Ariadne を用いて U snRNA/snoRNA におけるシュードウリジン化サイトを同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ウリジンとシュードウリジンを比較すると、炭素原子間の二重結合の位置の違いから構造的性質が異なり、他分子との水素結合様式に差が生じる。しかし、シュードウリジン化酵素によりウリジンがシュードウリジン化修飾を受けても、化学的性質に変化は見られず質量に差が生じないことから、質量分析計で両者を判別することは困難であった。この問題を解決するために、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞のウリジン—リン酸合成酵素 (UMPS) 遺伝子がノックアウトされた、 $\Delta$ UMPS 株を用いてトータル RNA を抽出した。この細胞株は培地中のウリジンを取込み、RNA を合成するサルベージ経路のみが進行する。5,6-d2 ラベルウリジンを細胞培養液に添加し培養することで、ウリジンに比べて重水素 2 個分 (2Da) だけ質量が増加したトータル RNA が得られた(図 1)。次にエタノール沈殿法を用いてラージ RNA とスモール RNA に分け、スモール RNA 画分を Urea PAGE で分画し、目的の snRNA/snoRNA を取得した。snRNA/snoRNA は逆相液体クロマトグラフィーで精製した後、RNase T1 または RNase A で消化し、LC-MS で分析した。ウリジンがシュードウリジン化されると質量が 1Da 減少することから(図 1)、予め計算しておいた精密質量と実測値を比較することで、修飾サイトを同定した。

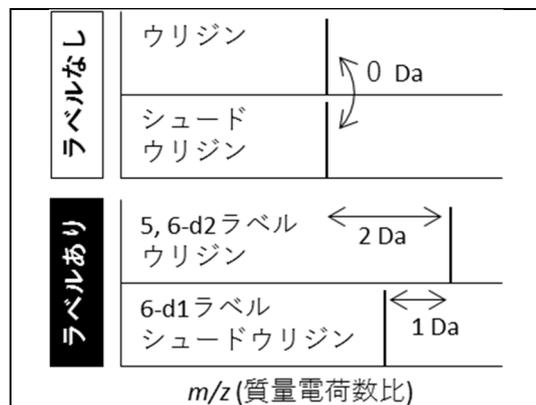


図 1 質量分析計によるシュードウリジンの検出: ラベルウリジンがシュードウリジン化修飾を受けると、質量が減少することを利用し、修飾を検出した。

### 4. 研究成果

(1) 既知のシュードウリジン化サイトを同定した  
これまでに質量分析計を用いたシュードウリジン同定法として、シュードウリジンに特異的なイオンを検出するシュード MS3 法、*in vitro* 合成したラベル RNA と細胞から抽出した RNA を混合し同時に分析・比較する SILNAS 法が開発されてきた (Yamauchi et al., *Nucleic Acids Res.*, 2015; Taoka et al., *Nucleic Acids Res.*, 2016)。シュード MS3 法は 1 回目の分析で RNase 消化断片にシュードウリジンの有無を判断し、2 回目の分析から RNA 断片内のシュードウリジン化サイトを判断するものである。最低でも 2 回測定する分だけ多くの試料を必要とし、微量 RNA の場合は抽出段階での労力が求められる。一方、本研究の  $\Delta$ UMPS 株を用いる方法では、ラベルウリジンを取込ませた細胞から抽出した RNA を RNase で消化し、質量分析を行った(図 2)。得られた質量分析データをデータベース Ariadne でサーチすることで、シュードウリジンの有無を断片ごとに把握した。本研究ではシュード MS3 法を用いて報告された核内 RNA である U1、U2、U4、U5、U6 snRNA について既知の全てのシュードウリジン化サイトを同定した。

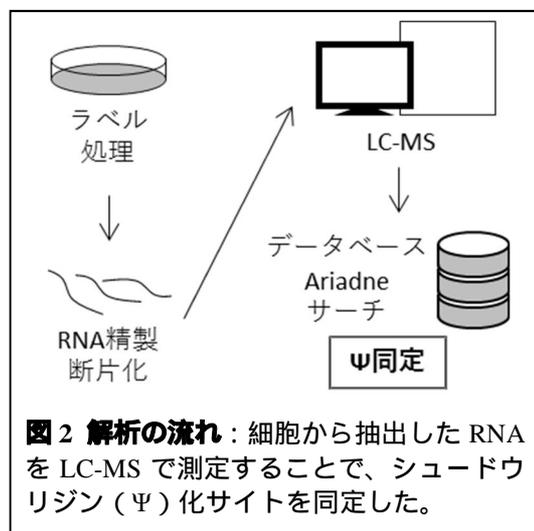


図 2 解析の流れ: 細胞から抽出した RNA を LC-MS で測定することで、シュードウリジン ( $\Psi$ ) 化サイトを同定した。

(2) 未知のシュードウリジン化サイトを明らかにした

本申請研究が採択される以前に、前述のシュード MS3 法では検出されなかった、U2 snRNA における新規シュードウリジン化サイトを、 $\Delta$ UMPS 株を用いた分析で明らかにしていた。そこで U2 に未知修飾があることを確認するために、U2 発現ベクターを構築し、<sup>13</sup>C ラベルを用いた SILNAS 法による検証を行った。その結果、 $\Delta$ UMPS 株を用いて検出された U2 snRNA  $\Psi$ 60 の新規修飾サイトは SILNAS 法によっても同定された。特に  $\Psi$ 60 が含まれる RNase T1 消化断片には他に 2 つの  $\Psi$  が存在したことから、これまで検出が困難であったと推測された。また、シュード MS3 法でシュードウリジンを含む可能性があるがその場所が不明瞭であったヒト U3 snoRNA について解析した結果、 $\Psi$ 8、 $\Psi$ 12、 $\Psi$ 36、 $\Psi$ 49 の新規シュードウリジン化修飾が明らかになった。そこで U3 発現ベクターを作製し、SILNAS 法を用いて、本研究で見出した新規シュードウリジン化サイトが擬陽性でないことを検証した。

(3) 全塩基を網羅的に、もれなく解析した

$\Delta$ UMPS 株より抽出、精製した RNA を RNase T1 または RNase A で消化し、質量分析を行った。RNase T1 はグアノシンの 3'側を特異的に切断し、RNase A はピリミジンの 3'側を特異的に切断する酵素である。これらの消化酵素を用いて RNA を消化することにより、修飾有無を分析する対象 RNA の全塩基を 100% カバーした解析を実現した (図 3)。

また、同定した修飾サイトは検出するイオン化強度により定量化した。各 RNA 断片のシュードウリジンのピーク面積をウリジンとシュードウリジンのイオン強度の総和で除することで、定量化した。

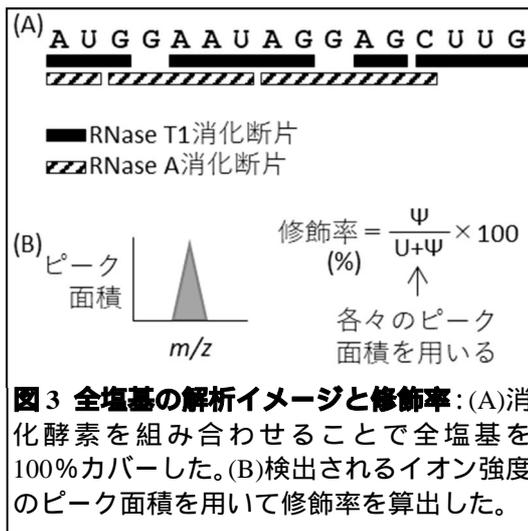


図 3 全塩基の解析イメージと修飾率: (A)消化酵素を組み合わせることで全塩基を100%カバーした。(B)検出されるイオン強度のピーク面積を用いて修飾率を算出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, Sato K, Ishikawa H, Izumikawa K, Yamauchi Y, Hirota K, Nakayama H, Takahashi N, Isobe T.	4. 巻 46
2. 論文標題 Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 9289-9298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gky811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----