

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19302

研究課題名(和文) DNAザイム、固相化DNAプローブ、質量分析を併用した長鎖RNA分析法の開発

研究課題名(英文) Development of method for analysis of long non-coding RNA by combination of DNAzyme, solid-phase DNA probe and mass spectrometry

研究代表者

堀 弘幸 (HORI, Hiroyuki)

愛媛大学・理工学研究科(工学系)・教授

研究者番号：20256960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：RNA配列を修飾ヌクレオシドを含めて分析する場合、もっとも有力な手法は質量分析である。質量分析を利用する場合、リボヌクレアーゼ(RNase)でRNAを分解し、得られた断片を解析するのが一般的である。しかしながら、RNA鎖が長くなるにつれ、同じ配列を持つ断片が生じる確率が高くなり、質量分析を利用することが困難になる。この状況を打破するため、申請者は長鎖RNAをデオキシリボザイムで切断し、生じた断片を固相化DNAプローブ法で精製した後、RNase処理を行ない、質量分析でその配列を修飾ヌクレオシドレベルで分析する手法を開発した。既存のRNA分析法と併用すれば、分析の効率化を図ることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA中には、メチル化されたものやアセチル化されたものなど、様々な修飾ヌクレオシドが含まれます。これら修飾ヌクレオシドは、タンパク質合成系を制御し、発生・分化、発がん、感染、免疫など高次生命現象ともリンクします。従って、どのようなRNAの、どこに、どんな修飾ヌクレオシドが、どのくらいの頻度で存在するのかを調べるのは、現代の生命科学で重要な課題となっています。しかしながら、既存の手法のみで、長鎖RNAの修飾を調べるのは容易ではありません。本研究では、新たな手法を開発しました。この研究成果は、単に分子生物学・生化学分野のみにとどまらず、医学、薬学、農学、理学、工学等、多方面に波及するものです。

研究成果の概要(英文)：In RNA sequencing with modified nucleosides, the most reliable method is mass spectrometry. In general, the target RNA is digested with ribonuclease (RNase) and then the fragments are analyzed by mass spectrometry. In the case of long non-coding RNAs, however, cleavage by ribonucleases often generates duplicated RNA fragments, which possess the same sequence. Therefore, the difficulty of analysis of long non-coding RNAs by MS spectrometry rises with increasing length of RNA. To overcome this problem, we developed a method for analysis of long non-coding RNA. In the method, long non-coding RNA is site-specifically cleaved by deoxyribozyme (DNAzyme) and then its fragments are purified by the solid-phase DNA probe method. The sequence of RNA fragment is determined by mass spectrometry.

研究分野：機能生物化学

キーワード：核酸 酵素 RNA

1. 研究開始当初の背景

Non-coding RNA には、様々な位置に、いろいろな種類の修飾ヌクレオシドが含まれます。これら修飾ヌクレオシドは、non-coding RNA が生理機能を発揮する上で重要な役割を担っています。しかしながら、修飾ヌクレオシドを含めた RNA の配列を解析するのは容易ではありません。もっとも直接的な方法は、RNA を精製し、質量分析を行なうことです。この方法では、リボヌクレアーゼ(RNase)によって RNA を断片化し、液体クロマトグラフィなどで断片を分け、質量分析を行なうのが一般的です。しかしながら、RNA 鎖が長くなるにつれ、同じ配列を持った断片が生じる確率が高まり、修飾ヌクレオシドの位置を決定するのが困難になります。この弱点を補うため、これまで、化学修飾や抗修飾ヌクレオシド抗体を用いるなど、様々な手法が工夫されてきましたが、それらはすべて逆転写反応を伴う間接的な方法です。間接的手法の場合、修飾ヌクレオシドの位置を特定することができても、修飾ヌクレオシド誘導体を区別することは困難です。また、適当な化学修飾の方法がない、抗修飾ヌクレオシド抗体がない等の理由から、間接的手法で、位置を決定できる修飾ヌクレオシドはごく一部の種類に限られます。

2. 研究の目的

上記状況を打破するための新たな分析手法を開発することが、本研究の目的です。

3. 研究の方法

全長の長鎖 non-coding RNA を RNase 処理すると、同じ配列を持った断片が、複数、生じます。そこで、最初に長鎖 non-coding RNA を何らかの方法で大まかに断片化し、それらを精製することが出来れば、質量分析装置を利用した直接的な分析が可能になると考えました。

本研究を申請する前の予備実験により、デオキシリボザイム(DNAzyme)が配列特異的な分解では有効であることが確認できていましたので、まず、DNAzyme 反応の効率化条件を探しました。次に、大まかに断片化した RNA を精製する方法として、固相化 DNA プローブ法を最適化しました。また、固相化 DNA プローブ法で精製可能な RNA の長さおよびトータル RNA 中の存在量について調べました。最後に、実際に得られた RNA 断片の質量分析を行い、目的どおりの断片が得られているか検討しました。

4. 研究成果

(I) DNAzyme 反応については以下のことが判りました。

- (i) 8-17 DNAzyme の切断効率が良い。
- (ii) 8-17 DNAzyme は、2-20 mM 程度のマグネシウムイオン存在下で RNA を切断できる。
このマグネシウムイオン濃度ならば、トータル RNA を用いても不溶性の沈殿を生じない。
- (iii) 切断効率を高めるためには、サーマルサイクラーを用いて、DNAzyme 反応を繰り返す。
- (iv) DNAzyme 反応の繰り返し回数は 5 回以上が必要である。
- (v) 一回の切断反応の時間は 30 分以下がよい(30 分以上、置いても切断効率は上がらない)。
- (vi) サーマルサイクラーを用いて、アニーリング、切断、変性のサイクルを繰り返すため、RNA と相補な DNAzyme 配列の融点は 60 が良い。

(II) 固相化 DNA プローブ法については以下のことが判りました。

- (i) 16S rRNA (1544 nt)を精製でき、鎖長 1500 以上の RNA にも応用できる。
- (ii) tRNA や rRNA よりはるかに存在量が少ない tmRNA も精製できる。

記(I)、(II)の予備実験を行ない、実際に 16S rRNA を断片化し、固相化 DNA プローブ法で RNA 断片を精製し、質量分析で、配列と修飾ヌクレオシドを分析しました。その結果、目的どおり、*Thermus thermophilus* 16S rRNA のアンチシャインダルガーノ領域を含む断片が得られたことがわかりました。

また、同時に、長年議論があった *Thermus thermophilus* 16S rRNA の 3'末端は、U1544 であることを確認しました。この結果は、McCloskey らのグループによる質量分析の結果と一致するものです。さらに、未修飾の RNA 断片が質量分析で観察されないこと

から、1498 位の 3-メチルウリジン、1518 位と 1519 位の N6, N6-ジメチルアデノシンの修飾は、細胞内でほぼ 100% 導入されていることが判りました。すなわち、本手法により、実際に長鎖 non-coding RNA の修飾について情報を得られることが示されました。

本研究により開発された手法と既存の手法を組み合わせることにより、長鎖 non-coding RNA の修飾ヌクレオシドの分析を迅速化・効率化することが期待できます。

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 0件）

1. 著者名 Arakawa Shizuka, Kamizaki Kohsuke, Kuwana Yusuke, Kataoka Naruki, Naoe Chieko, Takemoto Chie, Yokogawa Takashi, Hori Hiroyuki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Application of solid-phase DNA probe method with cleavage by deoxyribozyme for analysis of long non-coding RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上崎晃輔、荒川静花、白水美香子、竹本千重、堀 弘幸
2. 発表標題 DNAザイム切断、固相化DNAプローブ法を併用したThermus thermophilus rRNA中のシュードウリジンの分析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒川静花、上崎晃輔、堀 弘幸
2. 発表標題 デオキシリボザイムと固相化DNAプローブ法を併用したRNA断片精製法の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上崎晃輔、荒川静花、桑名祐輔、白水美香子、竹本千重、堀 弘幸
2. 発表標題 高度好熱菌16S rRNAのアンチ・シャイン・ダルガーノ配列領域に存在する2つのシュードウリジンの合成酵素の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

応用生物化学研究室ホームページ
<http://www.ach.ehime-u.ac.jp/bchem/>

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
研究分担者	横川 隆志 (Yokogawa Takashi) (90242304)	岐阜大学・工学部・教授 (13701)	
研究協力者	上崎 晃輔 (Kamizaki Kohsuke)		
研究協力者	荒川 静花 (Shizuka Arakawa)		
研究協力者	桑名 祐輔 (Kuwana Yusuke)		
研究協力者	竹本 千重 (Takemoto Chie)		