

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02484

研究課題名(和文) エピトランスクリプトーム解析のためのRNAインフォマティクス基盤技術

研究課題名(英文) RNA informatics for epi-transcriptome analysis

研究代表者

浅井 潔 (Asai, Kiyoshi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30356357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：重要な修飾塩基であるイノシンとN6メチルアデノシンの2次構造エネルギーパラメータを、熱測定実験と分子シミュレーションの組合せで同定した。推定誤差の構造予測への影響は理論的解析と計算機実験で評価して発表した。同定したイノシンのパラメータを用いて、miRNAによる翻訳抑制効率に対する A-to-I 編集の影響のモデルを共同研究で構築して発表した。

2次構造確率分布の解析ツールRintDを改良し、塩基対確率の分布を計算するRintWおよび最大塩基対制約で計算を高速化したRintCを開発して発表した。その際、フーリエ変換が数値誤差に与える影響を精度保証計算を用いて解析し、大きな確率は信頼できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重要な修飾塩基であるイノシン、m6Aの未同定のエネルギーパラメータを熱測定実験と分子シミュレーションによって同定し、イノシン、m6Aを含むRNA分子の2次構造予測が可能となった。

RNAの塩基修飾はRNA 2次構造変化をもたらす、他の分子との相互作用の変化はその機能を変化させる。我々の成果により、これまで不可能であったイノシン、m6A修飾の構造・相互作用へ影響の解析が可能となった。イノシンのエネルギーパラメータはmiRNAによる翻訳抑制効率に対する A-to-I 編集の影響のモデルで検証された。

研究成果の概要(英文)：The energy parameters of the important modified bases, inosine and N6 methyladenosine were identified by a combination of thermometric experiments and molecular simulations. The effect of estimation error on structure prediction was evaluated and presented by theoretical analysis and computer experiments. A model of the effect of A-to-I editing on translational repression efficiency by miRNA was constructed and presented in a joint study using the identified inosine parameters.

We have improved RintD, an analysis tool for secondary structure probability distribution, by developing RintW, which calculates the distribution of base pair probability, and RintC, which speeds up the calculation with maximum base pair constraint. At that time, the effect of the Fourier transform on the numerical error was analyzed using the accuracy guarantee calculation, and it was shown that the large probability was reliable.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：修飾塩基 RNA 2次構造 エピトランスクリプトーム バイオインフォマティクス 分子動力学 エネルギーパラメータ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム DNA の大半が RNA に転写されていることが明らかになり、次世代シーケンサー技術から得られる膨大な RNA の機能を網羅的に同定することが重要な課題となっている。生体内の RNA は様々な修飾 (RNA 修飾) を受け、生体機能に影響を及ぼす。例えば、ヒトの RNA 転写物で発見されたイノシンは、てんかん、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 等の神経・精神疾患と強い相関がある。また、N6 メチルアデノシンは、体内時計を制御する因子と関連する。さらに、RNA 修飾が RNA2 次構造を大きく変化させる事例も報告されており、エピトランスクリプトームの関わる生命現象には、RNA 修飾による 2 次構造変化が強く関連していることが示唆されている。しかし、修飾塩基を含む RNA の二次構造解析を実行する実用的なツールは未だに存在しない。なぜなら、RNA2 次構造予測をはじめとする RNA 情報解析では、自由エネルギーによる 2 次構造の安定性評価をその基礎としており、それには塩基対形成に伴うエネルギーパラメタが用いられているが、修飾塩基を含むエネルギーパラメタは、すべての塩基対について整備されておらず不完全なためである。修飾塩基が塩基対形成に関わるエネルギーパラメタが同定できれば、現存する豊富な RNA2 次構造解析ツールに組み込むことが可能となり、従来困難だった RNA 修飾を含む RNA の 2 次構造予測・設計が加速され、様々な生理現象や疾患メカニズムの解明、及び創薬研究の進展に大きく貢献することが期待される。

### 2. 研究の目的

エピトランスクリプトーム研究と RNA 創薬の基盤として、以下の研究・開発を行う。

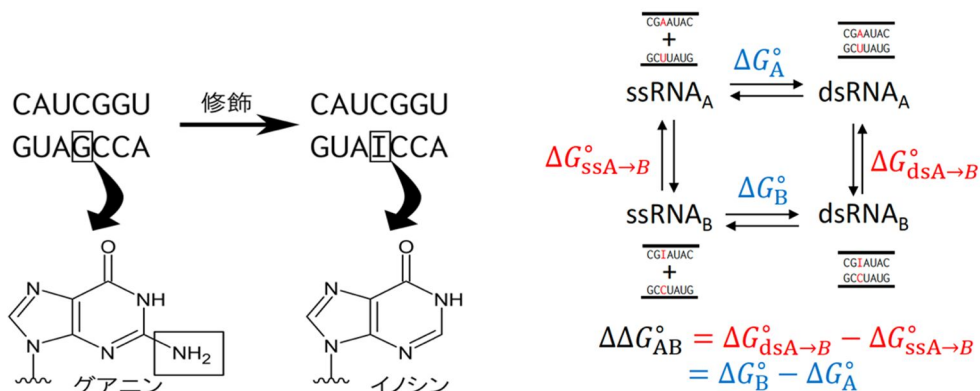
(1) 修飾塩基を含む RNA2 次構造のエネルギーパラメタの同定

(2) 同定したパラメタを用いた 2 次構造情報解析

具体的には、エピトランスクリプトーム解析で重要なイノシン (I) および N6 メチルアデノシン (m6A) について、熱化学測定実験と分子動力学計算を組み合わせるエネルギーパラメタを同定する。同定したパラメタを活用して、修飾塩基を含む RNA の 2 次構造予測、RNA・RNA 相互作用予測を可能にする。本研究により、我々が開発した CentroidFold を含む既開発の多様なソフトウェア群に同定した修飾塩基のパラメタが導入され、修飾塩基を含む RNA の 2 次構造情報解析の実行が多くの研究者に可能となるため、そのインパクトは大きいと考えられる。

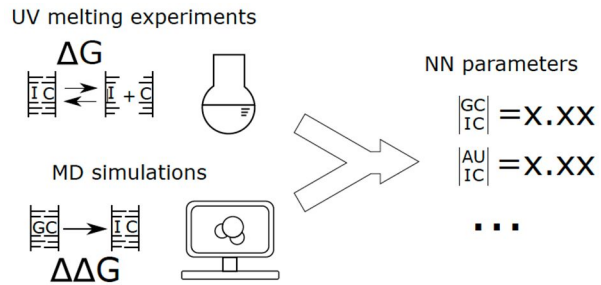
### 3. 研究の方法

本研究計画策定までに、自由エネルギー摂動法 (FEP) と分子動力学法 (MD) を組み合わせによる RNA の塩基変異による熱安定性の変化 ( $\Delta G$ ) の解析から、分子動力学計算は熱力学実験を代用できることを明らかにした (J Phys Chem Lett, 2015)。「RNA 変異」は「RNA 修飾」とよく似た置換からなるため、修飾塩基のエネルギーパラメタ同定に適用できる (下図)。



本研究では、分子動力学計算を小規模の熱化学測定実験と組み合わせ、エネルギーパラメタを同定する（右図）。

Turner らが実験で熱安定性  $G_{WT}$  を求めた RNA 配列ペアに対して修飾塩基による置換を導入し、置換された RNA 配列の FEP（自由エネルギー摂動法）と MD（分子動力



学) 計算を行う。その結果から熱安定性の変化  $G_{WT}$   $MUT$  を求め、Turner らが求めた熱安定性  $G_{WT}$  と組み合わせることで、修飾塩基変異を含む RNA 配列の熱安定性  $G_{MUT}$  ( $= G_{WT} + G_{WT} - MUT$ ) を求める。3 種類の塩基とペアを組むイノシンについては、追加の熱化学測定実験を実施して不足の実験データを補い、FEP+MD 計算と組み合わせることで  $G_{MUT}$  を網羅的に求め、パラメタを同定する。熱測定実験は、イノシンと N6 メチルアデノシンについて、7 塩基対からなる修飾塩基を含む多種類の RNA を合成して実施する。

#### 4. 研究成果

(1) 重要な修飾塩基であるイノシンと N6 メチルアデノシンの 2 次構造エネルギーパラメタを、熱測定実験と分子シミュレーションの組合せで同定した。イノシンのエネルギーパラメタについては、我々が論文を投稿したその日に他のグループが実験のみによって同定したパラメタを論文発表した。その後の解析で、計算のみで同定したパラメタの誤差は、実験で同定したパラメタとほぼ同等の誤差の範囲であることを示した。

(2) RNA の 2 次構造解析で必要となるエネルギーパラメタの精度を明らかにするため、推定誤差の構造予測への影響は理論的解析と計算機実験で評価して発表した。同時に、計算によるデータ (10 個) を組み合わせることによって、少ない実験データ (10 個) でも多くの実験データ (90 個) を用いた場合と同等の精度が得られることを示した。

(3) 同定したイノシンのエネルギーパラメタを用いて、miRNA による翻訳抑制効率に対する A-to-I 編集の影響のモデルを共同研究で構築して発表した。

(4) 2 次構造確率分布の解析ツール RintD を改良し、塩基対確率の分布を計算する RintW および最大塩基対制約で計算を高速化した RintC を開発して発表した。その際、フーリエ変換が数値誤差に与える影響を精度保証計算を用いて解析し、大きな確率は信頼できることを示した。

(5) 複数の安定 2 次構造を持つ RNA の安定性を解析するための手法として、2 つの 2 次構造間の遷移において、塩基対の形成・分離に関する最小ステップ遷移における最小エネルギーバリアを正確に計算する手法を開発・実装して論文採択された。

Hiroki Takizawa, Junichi Iwakiri, Goro Terai, Kiyoshi Asai, Finding the Direct Optimal RNA Barrier Energy and Improving Pathways with an Arbitrary Energy Model, *Bioinformatics* (accepted, 2020).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shen Tian, Goro Terai, Yoshiaki Kobayashi, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe, Kiyoshi Asai, Kumiko Ui-Tei	4. 巻 17
2. 論文標題 A robust model for quantitative prediction of the silencing efficacy of wild-type and A-to-I edited miRNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA biology	6. 最初と最後の頁 264-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15476286.2019.1678364	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 -
1. 著者名 Shimpei Nishida, Shun Sakuraba, Kiyoshi Asai, Michiaki Hamada	4. 巻 15
2. 論文標題 Estimating Energy Parameters for RNA Secondary Structure Predictions Using Both Experimental and Computational Data.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics	6. 最初と最後の頁 1645-1655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/TCBB.2018.2813388	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 -
1. 著者名 Hiroki Takizawa, Junichi Iwakiri, Kiyoshi Asai	4. 巻 21
2. 論文標題 RintC: fast and accuracy-aware decomposition of distributions of RNA secondary structures with extended logsumexp	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12859-020-3535-5	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 -
1. 著者名 Taichi Hagio, Shun Sakuraba, Junichi Iwakiri, Ryota Mori and Kiyoshi Asai	4. 巻 19 (Suppl 1)
2. 論文標題 Capturing alternative secondary structures of RNA by decomposition of base-pairing probabilities	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12859-018-2018-4	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 -

1. 著者名 Takafumi Chishima, Junichi Iwakiri and Michiaki Hamada	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of Transposable Elements Contributing to Tissue-Specific Expression of Long Non-Coding RNAs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes9010023	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Michiaki Hamada, Yukiteru Ono, Kiyoshi Asai, Martin C Frith	4. 巻 33
2. 論文標題 Training alignment parameters for arbitrary sequencers with LAST-TRAIN	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 926-928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bioinformatics/btw742	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 -

1. 著者名 Hideto Maruyama, Ryota Oikawa, Mayu Hayakawa, Shono Takamori, Yasuaki Kimura, Naoko Abe, Genichiro Tsuji, Akira Matsuda, Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe	4. 巻 45
2. 論文標題 Chemical ligation of oligonucleotides using an electrophilic phosphorothioester	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 7042-7048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkx459	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 -

1. 著者名 Junichi Iwakiri, Goro Terai, Michiaki Hamada	4. 巻 12
2. 論文標題 Computational prediction of lncRNA-mRNA interactions by integrating tissue specificity in human transcriptome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biology Direct	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13062-017-0183-4	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Taichi Hagio, Shun Sakuraba, Junichi Iwakiri, Ryota Mori and Kiyoshi Asai
2. 発表標題 Capturing Alternative Secondary Structures of RNA by Decomposition of Base Pairing Probabilities
3. 学会等名 The 28th International Conference on Genome Informatics GIW/BIOINFO 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shimpei Nishida, Shun Sakuraba, Kiyoshi Asai, Michiaki Hamada
2. 発表標題 Estimating energy parameters for RNA secondary structure predictions using both experimental and computational data
3. 学会等名 The 28th International Conference on Genome Informatics GIW/BIOINFO 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shun Sakuraba, Tomoshi Kameda and Kiyoshi Asai
2. 発表標題 Predicting RNA-RNA duplex dimerization energy from the molecular dynamics simulation
3. 学会等名 RNA2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 桜庭 俊, 浅井 潔, 亀田 倫史
2. 発表標題 RNA-RNA の相対結合自由エネルギー計算
3. 学会等名 第19回理論化学討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kiyoshi Asai
2. 発表標題 Algorithms for Marginal Probabilities on RNA Secondary Structures
3. 学会等名 ALGO2016 & WABI2016 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Akihiro Imaeda, Ryota Oikawa, Kiyoshi Asai, Junichi Iwakiri, Shun Sakuraba, Naoko Abe, Fumiaki Tomoike, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe
2. 発表標題 Synthesis of mRNA with site-specific N6-methyladenosine and its translation efficiency
3. 学会等名 ISNAC2018 (第45回国際核酸化学シンポジウム)
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	浜田 道昭 (Hamada Michiaki)  (00596538)	早稲田大学・理工学術院・教授  (32689)	
研究分担者	亀田 倫史 (Kameda Tomoshi)  (40415774)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・主任研究員  (82626)	
研究分担者	阿部 洋 (Abe Hiroshi)  (80415067)	名古屋大学・理学研究科・教授  (13901)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	櫻庭 俊  (Sakuraba Shun)  (90647380)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・関西光科学研究 所 量子生命科学研究部・主任研究員（任常）    (82502)	