

令和元年5月21日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19352

研究課題名(和文) 部位特異的RNAメチル化効率定量法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the method to quantify methylation efficiency at a specific site

研究代表者

河原 行郎 (Kawahara, Yukio)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80542563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNAは転写後に多様な化学修飾を受けるが、その一つにアデノシンのN6位に生じるメチル化修飾(m6A)がある。このメチル化修飾の異常は肥満やガン化とも関連しており、細胞の恒常性に極めて重要である。しかし、個別部位のメチル化効率を定量し、その動態を可視する良い方法がない。そこで本研究では、メチル化効率を精度高く定量するため、人工核酸BNAの高い結合能と塩基識別感度を用いて、BNAプローブ法を開発することに成功した。本手法では、m6Aを含むRNAと含まないRNAとの融解温度の差を従来のDNAプローブ法より広げることになり、この温度差を利用して未知のメチル化効率を測定できるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発に成功したBNAプローブ法は、従来定量が不可能であった個別部位でのRNAメチル化効率の測定を可能にした。特に、リボソームRNAなどの豊富に発現しているRNA中のメチル化効率は、高感度で定量できることを示した。本研究の成果は、これまで知ることのできなかつたRNAメチル化動態を計測することを可能にただけでなく、同じ原理を利用すれば他のRNA化学修飾の定量にも応用できることを示唆している。また、その結果としてガンなどの疾患の発症病態の解明に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In general, RNAs are subject to post-transcriptional modifications, which affects their fate. Among these modifications, N6-methyladenosine (m6A) is a relatively abundant modification. Given that m6A methylation is related to various diseases, such as obesity and cancer, it is important to know the dynamics of this modification and its regulatory mechanism. However, there has been no sensitive method established to measure methylation efficiency with high accuracy in a site-specific manner. In this study, we found insertion of bridged nucleic acid (BNA) into DNA probes increases the difference in melting temperature between m6A-containing RNA and unmethylated RNA. Applying this principle, we developed a dual BNA probe method, with which we successfully quantified methylation efficiency at m6A sites with high accuracy.

研究分野：RNA生物学

キーワード：RNA修飾 m6A メチル化 エピトランスクリプトーム ガン 肥満

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の伝達や制御において中核的な役割を果たす核酸 RNA には 100 を超える様々な修飾が施されていることが知られている。これらの修飾は RNA の機能、局在、安定性などに影響を与え、RNA の運命を決定付ける。その中でもアデノシンの N⁶位のメチル化修飾によって生じる N⁶-methyladenosine (m⁶A)は RNA 修飾の中でも特に多く生じていることが知られている。古典的には、ヒト 18S rRNA の 1832 番目の A (A1832)や大腸菌 23S rRNA の 1618 番目の A (A1618)と 2030 番目の A (A2030)が 100%安定的にメチル化されていることが知られている (①-③)。大腸菌 23S rRNA A1618 と A2030 におけるメチル基転移酵素はそれぞれ RlmF (YbiN)と RlmJ (YhiR)であり、YhiR 酵素欠損株 (Δ yhiR)は明らかな異常を呈さないが、YbiN 酵素の欠損株 (Δ ybiN)は増殖遅延を引き起こす (①-③)。

一方、同定手段が質量分析法などに限定されてきたことから、発現量の少ない mRNA にはどの程度含まれているのか長年に渡って不明であった。こうした状況の中、抗 m⁶A 抗体による m⁶A 含有 RNA の免疫沈降と次世代シーケンサーを組み合わせた網羅的解析手法が開発され、ヒト mRNA に約 80,000 箇所 m⁶A 部位が同定されるに至った (④-⑥)。これら RNA 修飾は、RNA の半減期を規定するなどの情報を付加しており、epitranscriptome と総称されるようになった。m⁶A のメチル化効率のダイナミックな制御を読み解き、その生理的意義を明らかにするためには、部位特異的なメチル化効率測定法の開発が必須である。しかし、m⁶A は、薬剤や酵素処理をしても塩基置換が生じないことから検出が難しく、これまで測定法は質量分析法に限定され、簡便で高精度な定量手法の確立が望まれてきた。こうした中、Golovina らは、DNA プロブを用いた m⁶A の検出を試みた。その結果、メチル化 RNA への DNA プロブの結合効率は、非メチル化 RNA への結合効率に比べ、有意に低いことを見出した (⑦, ⑧)。しかし、m⁶A を含む RNA と A を含む RNA との間で、DNA プロブの融解温度 T_m の差が小さく、安定的にメチル化効率を定量することはできなかった。

2. 研究の目的

本研究では、部位特異的な m⁶A メチル化効率測定法の測定精度を上げるため、人工核酸アナログを含む核酸プロブを用いた手法の開発に挑戦することを目的とした。人工核酸アナログ 2', 4' -BNA^{NC} (2' -O, 4' -C-aminomethylene bridged nucleic acid、以下 BNA^{NC})や LNA (Locked nucleic acid)は、DNA と比べてより高い二重鎖結合能を持ち、標的 RNA との一塩基のミスマッチをより高感度に検出できる。そこで、一例として BNA^{NC}を用いたプロブ (以下 BNA プロブ)を使用すれば、m⁶A と A の違いを識別できるのではないかと着想し、この原理を利用したメチル化効率測定法を確立することを目指した。最終的に、どの程度の発現量の RNA まで適用できるのかも検討することとした。

3. 研究の方法

(1) シングル BNA プロブを用いた融解温度の測定

3' 末端塩基がシトシン (C)である DNA オリゴヌクレオチドの 3' 側に蛍光物質 FAM を付加した蛍光プロブは、標的 RNA に結合するとプロブの 3' 末端シトシンと RNA 上のグアニン残基との結合により蛍光が消退する性質がある。このため、反応温度を変えながら蛍光強度を測定することで標的 RNA との融解温度 T_m を測定することができる。大腸菌 23S rRNA A2030 部位付近の配列を参考にし、17 塩基長の合成 RNA である SynRNA、また m⁶A を含む SynMetRNA を合成した (図 1A)。また蛍光プロブとして様々な塩基長で、BNA^{NC} や LNA を含むプロブを合成した。これらを混合して温度を徐々に上げ、FAM に由来する蛍光強度 (RFU: Relative Fluorescence

Units) を測定し、 $-d(\text{RFU})/dt$ が最小値をとる温度を融解温度 T_m とした。

(2) デュアル BNA プローブを用いた融解温度の測定

m^6A 部位を含む領域に結合するプローブの 3' 末端に Alexa488 を付加し、これを 3' プローブとした。この 3' プローブは極力短くし、また Alexa488 と m^6A 部位の距離が短くなるように設計した (図 3A)。一方、もう一つのプローブの 5' 末端に Alexa594 を付加し、これを 5' プローブとした。こちらの 5' プローブは極力長くして、部位特異性を担保した。これら 2 つのプローブが接近した時にのみ生じる蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) を利用し、融解温度 T_m を測定した。大腸菌 23S rRNA A2030 部位付近の配列を参考にして合成した 32 塩基長の SynRNA2、SynMetRNA2 を合成し標的 RNA とした (図 3A)。その上で、SynRNA2 または SynMetRNA2 と、2 つのプローブを混合し、ハイブリッド複合体の融解温度 T_m の測定を行なった。この実験では複合体を形成した時のみ蛍光が検出されるため、 $-d(\text{RFU})/dt$ が最大値をとる温度を融解温度 T_m とした。

(3) 統計解析

すべての値は平均値 \pm SEMで提示した。有意差検定はStudentのt検定で行い、有意差は $^*p<0.05$, $^{\#}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{\#\#}p<0.01$ で示した。有意差無しは n. s. で示した。

4. 研究成果

(1) BNA プローブは DNA プローブよりも感度高く m^6A を含む標的 RNA を識別する

まず 12mer の DNA プローブ (DNA1)、LNA プローブ (LNA1)、BNA プローブ (BNA1) を合成し (図 1B)、17 塩基長の SynDNA、SynRNA または SynMetRNA と混合して T_m 値を測定した。まず DNA1 を用いた時の T_m 値は、SynDNA が最も低く、次に SynMetRNA で、SynRNA の方が SynMetRNA よりも (ΔT_m) 約 1.1°C 高かった (図 1C, D)。この結果から、プローブは、SynRNA に最も安定的に結合することが確かめられた。一方、LNA1 や BNA1 プローブの方がより T_m 値が高くなり、更に ΔT_m も約 3.2°C まで広がった (図 1C, D)。この結果から、人工核酸アナログを挿入したプローブの方がより安定的に RNA に結合し、 m^6A を感度高く識別できることが分かった。LNA1 と BNA1 プローブ間で ΔT_m に差は無かったので、これ以降 BNA プローブを用いることとした。

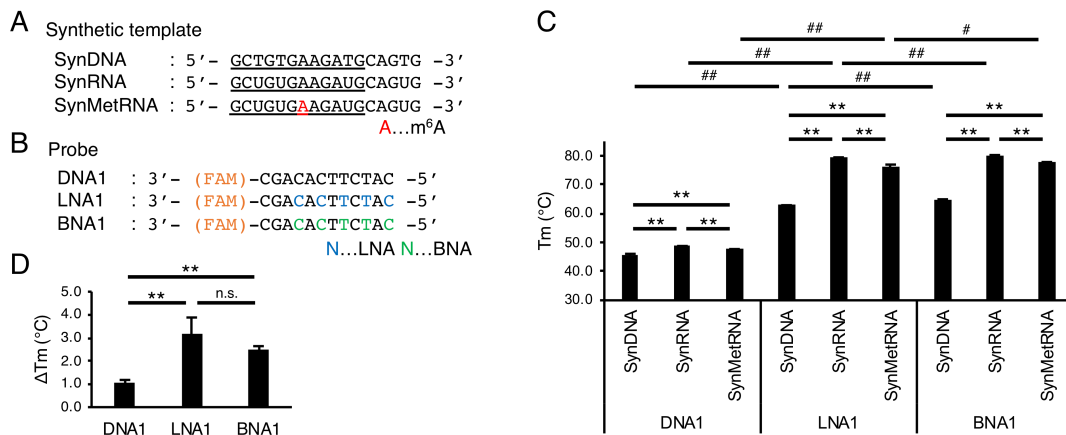


図 1 標的 RNA から蛍光シングルプローブが解離する融解温度 T_m の測定
 A. 標的 RNA と DNA の配列, B. FAM 付加シングルプローブの配列, C. 各種プローブの T_m 値, D. 各プローブの SynRNA と SynMetRNA の融解温度の差。

次にプローブの長さや、FAM と m^6A との距離が T_m に与える影響について解析することとした。まず、長さは変えずに、FAM と m^6A との距離を 3 塩基分短くした BNA2 プローブを合成し (図 2A)、 T_m 値を測定した。その結果、 T_m 値は BNA1 よりも下がったが、 ΔT_m は差がなかった (図 2B, C)。一方、プローブの長さを 12mer から短くした BNA3 (10mer)、BNA4 (9mer) についても T_m 値を測定した。その結果、プローブ長が短くなるに比例して結合力が弱まるため T_m 値が下がり、一方

ΔT_m は広がった (図 2B, C)。プローブ内での BNA^{NC}の挿入位置は ΔT_m には影響しなかった。これらの結果より、メチル化 RNA と非メチル化 RNA への結合効率の差はプローブの長さが短いほど広がるが、一方で短くするほど T_m 値が低下することが分かった。

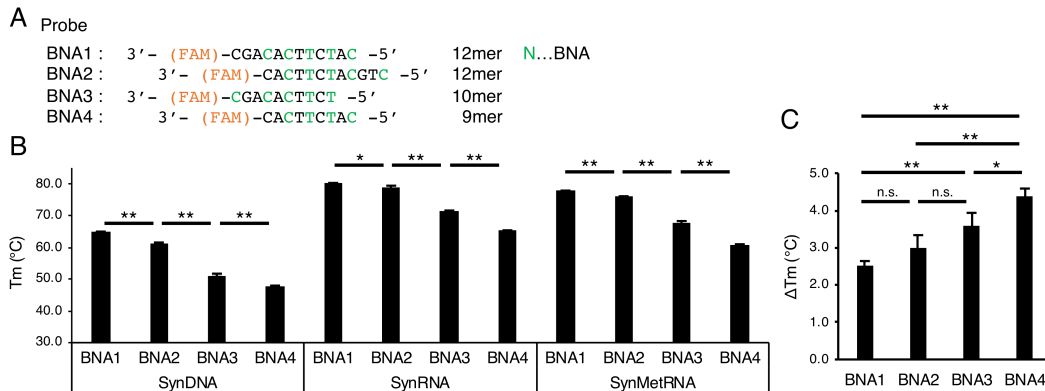


図 2 異なる長さ・結合部位を持つ BNA シングルプローブの融解温度測定値

A. 各種 BNA プローブの配列, B. 各種プローブの T_m 値, C. 各プローブの SynRNA と SynMetRNA の融解温度の差。

(2)デュアル BNA プローブによる m^6A メチル化効率測定法の確立

これまでの解析から、プローブの長さが短くなるほど ΔT_m が拡大することが分かったが、一方でプローブ長が短くなると配列特異性が低下する。また、FAM を用いたシングルプローブでは、3' 末端をシトシンにしなければならないというプローブ設計上の制約もある。このため、次に 2 本のプローブを用いたデュアルプローブについて検討することとした。 m^6A 部位を含む領域に結合するプローブの 3' 末端に Alexa488 を付加する。この 3' プローブは極力短くし、また Alexa488 と m^6A 部位の距離が短くなるように設計する (図 3A)。一方、もう一つのプローブの 5' 末端に Alexa594 を付加する。こちらの 5' プローブは極力長くして、部位特異性を担保する。これら 2 つのプローブが接近した時にのみ生じる FRET を利用し、融解温度 T_m を測定するこ

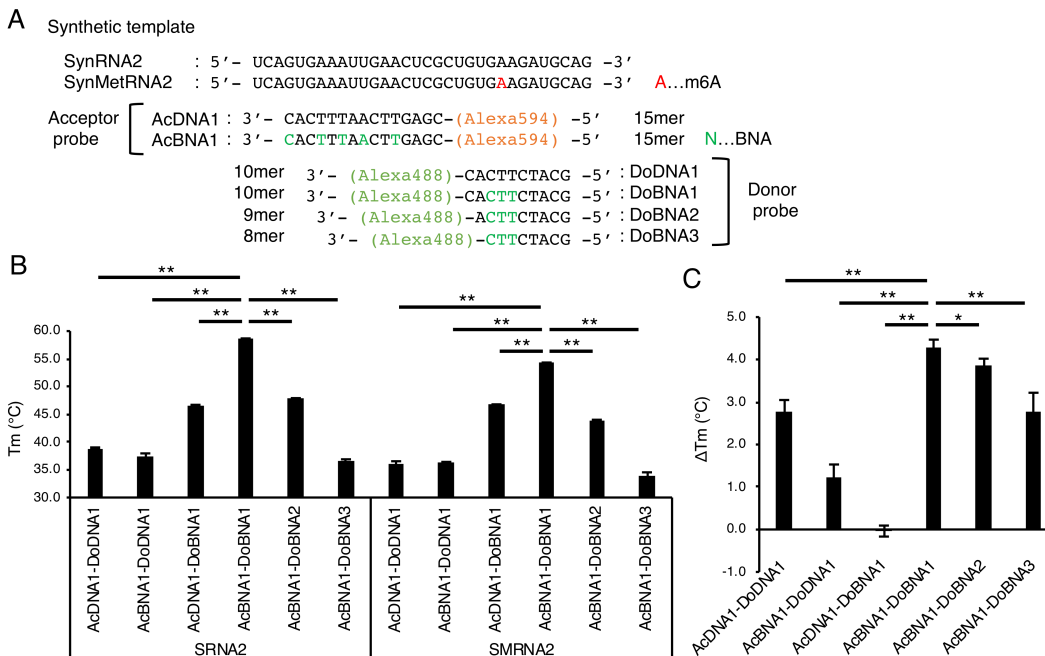


図 3 デュアル BNA プローブを用いた標的 RNA との融解温度 T_m の測定

A. デュアルプローブ用の合成標的 RNA と各種プローブの配列,

B. 各種プローブの T_m 値, C. 各プローブの SynRNA2 と SynMetRNA2 の融解温度の差。

とにした。大腸菌 23S rRNA A2030 部位付近の配列を参考にして合成した 32 塩基長の SynRNA2、SynMetRNA2 を合成し標的 RNA とした (図 3A)。5' プローブについては 15 塩基長で固定した。一方、3' プローブについては、長さをできるだけ短く設計し (8-10 塩基長)、また Alexa488 と

m⁶A 部位の距離 (1-3mer) や 5' プローブとの距離 (2-4mer) を様々に変えたプローブを準備した (図 3A)。T_m および ΔT_m を測定した結果、やはりデュアル DNA プローブよりも、デュアル BNA プローブの方が T_m 値は高く、また ΔT_m も AcBNA1-DoBNA1 で 4.3°C あり、これは AcDNA1-DoDNA1 よりも 1.5°C 高かった (図 3B, C)。しかし、3' プローブの長さがこれ以上短くなると、T_m 値も ΔT_m も一層低くなった。これらの結果は、シングルプローブと比較して、デュアルプローブの T_m 値が低くなることに起因していると考えられた。

(3) デュアル BNA プローブ法を用いた大腸菌由来 rRNA 中の m⁶A メチル化効率の測定

次に、プローブを AcBNA1-DoBNA1 で固定し、合成 RNA 中の m⁶A メチル化効率の測定が可能かどうかを検討した。SynRNA2 と SynMetRNA2 を 10:0 (m⁶A/A=0%)、8:2 (20%)、6:4 (40%)、4:6 (60%)、2:8 (80%)、0:10 (100%) の比率で混合し、これらの T_m を測定した。その結果、SynMetRNA2 の比率 (m⁶A の比率) を上げていくにつれて T_m が徐々に低下していくことが観察された (図 4A)。測定された T_m 値と既知のメチル化効率の間で単回帰分析を行い、近似直線を描いたところ、決定係数 R² は 0.948 と強い相関関係があることがわかった (図 4A)。これらの結果より、デュアル BNA プローブを用いて、部位特異的な m⁶A の検出、メチル化効率の測定が可能であることが示唆された。

次に、実際に大腸菌 total RNA を用いて、これに含有される rRNA の m⁶A のメチル化効率測定が可能かどうかを検討した。大腸菌野生株 (WT) BW25113 では、23S rRNA A2030 部位のメチル化効率はほぼ 100% であることが報告されている (③)。この m⁶A のメチル化を触媒する責任酵素は RlmJ (YhiR) であり、yhiR 欠損株 (ΔyhiR) では A2030 部位のメチル化が消失している (③)。このため、ΔyhiR 株と WT 株の total RNA を 10:0 (m⁶A/A=0%)、8:2 (20%)、6:4 (40%)、4:6 (60%)、2:8 (80%)、0:10 (100%) の比率で混合し、それらを AcBNA1-DoBNA1 を用いて融解温度 T_m を測定した。その結果、合成 RNA の時と同様、WT 株の total RNA の比率 (m⁶A の比率) が高まるほど T_m が徐々に低下していくことが観察された (図 4B)。m⁶A の比率と T_m 値をプロットしたグラフのデータより単回帰分析を行い、近似直線を描いたところ、決定係数 R² は 0.939 であり、合成 RNA を用いた時と同様、m⁶A の比率と融解温度 T_m の間に強い相関関係があることがわかった (図 4B)。同様に、23S rRNA A1618 部位についても、責任酵素 RlmF (YbiN) を欠損した ΔyhiN 株と WT 株の total RNA を混合して同様の解析を行ったところ、やはり決定係数 R² は 0.978 と高い精度で定量することが確かめられた (図 4C)。これらの結果より、実際の生体内の存在する RNA を材料とした場合でも、デュアル BNA プローブを用いることで部位特異的な m⁶A のメチル化効率を測定することができることが確認できた。

以上から、本研究を通して、m⁶A 部位のメチル化効率を精度高く定量するため、DNA プローブ法を改良し、新たにデュアル BNA プローブ法を開発することに成功した。rRNA のような発現量の

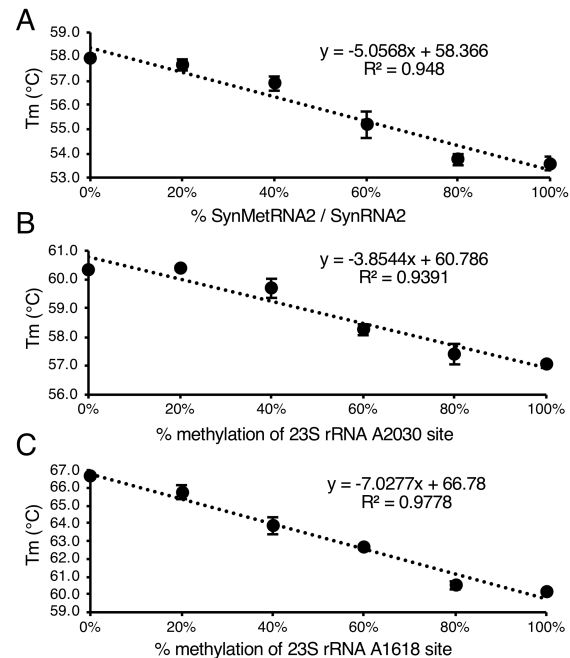


図 4 デュアル BNA プローブを用いた大腸菌 rRNA のメチル化効率測定
SynRNA2 と SynMetRNA2 (A), 大腸菌野生株 (WT) BW25113 と ΔyhiR から抽出した total RNA (B), BW25113 と ΔybiN から抽出した total RNA (C) を図に示した比率で混合し、デュアル BNA プローブを用いて融解温度 T_m を測定しプロットした。

高い RNA には適用可能であるが、一方で発現量の少ない mRNA への適用はかなり難しいことが確認され、更なる改良が必要と考えられた。

〈引用文献〉

- ① Maden. *J. Mol. Biol.* **189**, 681-699 (1986).
- ② Sergiev *et al. J. Mol. Biol.* **375**, 291-300 (2008).
- ③ Golovina *et al. RNA* **18**, 1725-34 (2012).
- ④ Meyer *et al. Cell* **149**, 1635-1646 (2012).
- ⑤ Dominissini *et al. Nature* **485**, 201-206 (2012).
- ⑥ Linder *et al. Nat. Methods* **12**, 767-772 (2015)
- ⑦ Golovina, *et al. Nucleic Acids Res.* **42**, (2014).
- ⑧ Kierzek, E. & Kierzek, R. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4472-4480 (2003).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① Oshima T, Ishiguro K, Suzuki T, *Kawahara Y. Quantification of methylation efficiency at a specific *N*⁶-methyladenosine position in rRNA by using BNA probes. **Chemical Communications**, 54(69); 9627-9630, 2018. doi: 10.1039/c8cc03713b. 査読有
- ② Nakahama T, Kato Y, Kim JI, Vongpipatana T, Suzuki Y, Walkley CR, *Kawahara Y. ADAR1-mediated RNA editing is required for thymic self-tolerance and inhibition of autoimmunity. **EMBO Reports**, 19; e46303, 2018. doi: 10.15252/embr.201846303. 査読有
- ③ Gallego A, Hartasánchez DA, Brasó-Vives M, Garcia-Ramallo E, Lopez-Valenzuela M, Baena N, Guitart M, Fernández-Bellón H, Kondova I, Bontrop R, Kawahara Y., Espinosa-Parrilla Y. RNA editing independently occurs at three mir-376a-1 sites and may compromise the stability of the microRNA hairpin. **Gene**, 628; 109-116, 2017. doi: 10.1016/j.gene.2017.07.032. 査読有
- ④ Uemura Y, Oshima T, Yamamoto M, Reyes CJ, Costa Cruz PH, Shibuya T, *Kawahara Y. Matrin3 binds directly to intronic pyrimidine-rich sequences and controls alternative splicing. **Genes to Cells**, 22(9); 785-798, 2017. doi: 10.1111/gtc.12512. 査読有
- ⑤ Kanemitsu Y, Fujitani M, Fujita Y, Zhang S, Su YQ, Kawahara Y., Yamashita T. The RNA-binding protein MARF1 promotes cortical neurogenesis through its RNase activity domain. **Scientific Reports**, 7(1); 1155, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-01317-y. 査読有

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① Costa Cruz PH, Kato Y, Nakahama T, Shibuya T, Kawahara Y. Precise determination of responsible ADARs for each RNA editing site in vivo. Gordon Research Conference on RNA editing ルッカ イタリア 2019年3月24-29日 (ポスター)
- ② Nakahama T, Kato Y, Kim JI, Vongpipatana T, Suzuki Y, Walkley CR, Kawahara Y. ADAR1-mediated RNA editing is required for thymic self-tolerance and inhibition of autoimmunity. Gordon Research Conference on RNA editing ルッカ イタリア 2019年3月24-29日 (ポスター)
- ③ Vongpipatana T, Nakahama T, Kato Y, Walkley CR, Kawahara Y. ADAR1 regulates early T cell development via MDA5-dependent and -independent pathways. Gordon Research Seminar on RNA editing ルッカ イタリア 2019年3月23日 (口演)
- ④ Kawahara Y. The role of ADAR1-mediated RNA editing in development. ConBio2017 神戸国際展示場 神戸 2017年12月9日 (招待講演)
- ⑤ Uemura Y, Oshima T, Yamamoto M, Reyes CJ, Costa Cruz PH, Shibuya T, Kawahara Y. Matrin3 binds directly to intronic pyrimidine-rich sequences and controls alternative splicing. RNA2017 富山国際会議場 富山 2017年7月19-21日 (ポスター)
- ⑥ Kawahara Y. The role of RNA editing in T cell development. 第43回内藤カンファレンス ガトーキングダム 北海道 2017年6月29日 (招待講演)

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 該当なし
- (2) 研究協力者 該当なし

※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。