

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06192

研究課題名(和文) 抗体のRNA高次構造特異的な認識を利用したエピトランスクリプトーム解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of epitranscriptome analysis method using the specific recognition of antibodies to the higher order structures of RNA

研究代表者

吉岡 恭子 (Yoshioka, Kyoko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：50358321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RNA-DNAハイブリッド鎖の高次構造、特にバルジ構造内にある核酸塩基が自由に運動でき、抗体がその核酸塩基を選択的に認識することを利用したRNAの特定N6-メチルアデノシン検出法を考案し、大腸菌RNAの特定N6-メチルアデノシン塩基の配列特異的な検出が可能であることを示した。本イムノアッセイ法を、表面プラズモン共鳴法を用いたマイクロデバイスに適用し、RNA増幅せずに、少量の試料量でRNAの修飾情報を迅速に取得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

本研究で提案したRNA-DNAハイブリッド鎖高次構造内にある塩基を抗体が選択的に認識できることに基づく検出原理を利用したイムノアッセイ法は、特定のRNA塩基の修飾情報を簡便・迅速に測定できる方法であり、網羅的なエピトランスクリプトーム解析技術とともに、有用な情報が得られる測定法であると考えられる。将来、特定のRNA修飾と疾病等の関連性が明らかになれば、本イムノアッセイ法を適用したマイクロデバイス等を利用することで、医療現場等で当該RNAの修飾情報をオンサイトで迅速・正確に得ることができると考える。

研究成果の概要(英文)：We developed a method for detecting RNA specific N6-methyladenosine by utilizing the selective recognition of antibodies to a nucleobase in the higher-order structure of the RNA-DNA duplex, especially in the bulge structure, that can move freely. We confirmed that a N6-methyladenosine in a specific sequence of rRNA of E. coli could be selectively detected with our immunoassay method. This immunoassay method was applied to a microdevice using the surface plasmon resonance method, and it was shown that the information of a modified RNA can be rapidly obtained using this microdevice, with a small amount of RNA sample without the RNA amplification.

研究分野：分析化学、生化学、細胞生物学

キーワード：RNAエピジェネティクス N6-メチルアデノシン イムノアッセイ法 表面プラズモン共鳴法 マイクロデバイス

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

mRNA のアデノシン塩基の N6 メチル化動態が、さまざまな生体機能や糖尿病、がん等の疾患に関与していることが報告されている。申請者らは、これまでに抗体の DNA 二重鎖の高次構造選択的な認識を利用したイムノアッセイを実現し、DNA メチル化検出エピゲノムセンサを提案した。この検出原理を RNA 修飾塩基の検出に適用し、さらにセンサデバイスの開発を行うことで、エピトランスクリプトーム解析の進展に寄与すると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、核酸塩基を認識する抗体が核酸二重鎖の高次構造、特にバルジ構造内の塩基を選択的に認識することを利用した RNA 修飾塩基の配列特異的な新規検出法の開発を目的としている。RNA の増幅を必要とせず、少量の試料で、高感度、かつハイスループットな検出法の開発を目指す。さらに、マイクロ流体技術を利用したエピトランスクリプトーム解析デバイスの開発を行う。

3. 研究の方法

(1) RNA-DNA ハイブリッド鎖のバルジ構造形成を利用した修飾塩基の検出

ターゲット RNA のモデル配列として、先ずは大腸菌の 23S リボソーム RNA (rRNA) 2058 位の N6 メチルアデノシン (m6A) を含む配列を用いる。プローブは、二重鎖内のターゲット塩基部位にバルジ構造を形成する DNA 配列とし、5' 側には短い T リンカーとセンサー表面に固定化するためのビオチン末端を有する。プローブ DNA はターゲット RNA とハイブリダイズし、形成された二重鎖はアビジンを固定化したセンサー表面上に捕捉される。抗体はバルジ構造内のターゲット塩基を選択的に認識する (図 1)。抗体の結合量を ELISA 法や表面プラズモン共鳴法 (SPR) により測定する。

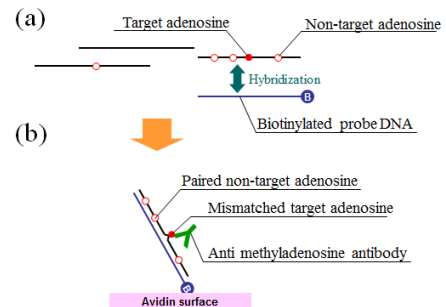


図 1 RNA 修飾塩基の検出原理

大腸菌や培養細胞より全 RNA を抽出・精製し、ターゲット配列の m6A が検出可能か調べる。制限酵素や物理的方法による断片化処理の検出感度への効果を調べる。大腸菌の N6 メチルトランスフェラーゼ遺伝子欠損株より RNA を調製し、ターゲット塩基のメチル化を測定することにより、当該遺伝子機能の有無を調べることが可能か検証する。また、メチル化率の異なる試料を調製し、本手法によりメチル化の有無やメチル化率の判定が可能か検証する。

(2) マイクロデバイスによるハイスループット化と RNA エピジェネティクスへの適用

申請者らはこれまでに携帯型の SPR 角計測器を開発しており、この計測器を読み取り装置とする使い捨てのマイクロデバイスを作製する。マイクロデバイス内の検出面には、予めアビジン (SA) を固定化しておく。ビオチン化 DNA とハイブリダイゼーションした測定対象 RNA をデバイスへ送液することでセンサー表面上へ固定し、その後、検知したい修飾 RNA 塩基を認識する抗体を導入するだけで、抗体との結合、つまり RNA 塩基の修飾状態を SPR 角変化から検知する (図 2)。

恒常的な RNA 修飾だけでなく、mRNA やマイクロ RNA のアデノシンのメチル化状態のダイナミックな変化を追跡することが可能か検証するために、ポリチミジンと結合する RNA 試料 (メッセンジャー RNA (mRNA) に相当する試料) について、本イムノアッセイ法を用いてメチル化状態を調べを試みる。ターゲット配列には、すでに知

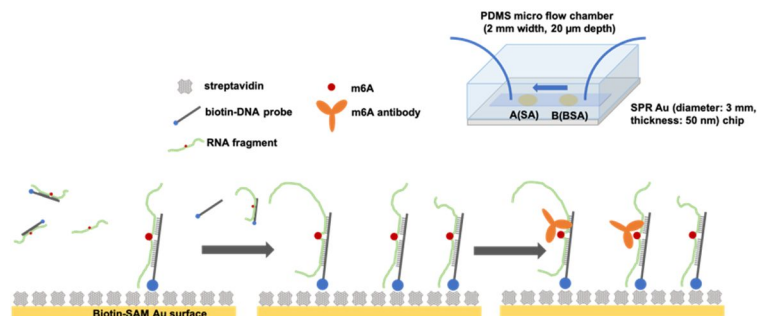


図 2 RNA マイクロデバイスと修飾塩基の検出スキーム

られている mRNA 配列中のアデノシンのメチル化頻度の高い配列モチーフやマイクロ RNA が結合する RNA 配列を想定し、DNA プローブ配列をデザインする。薬剤添加による培養細胞の状態の変化に応じた RNA 修飾状態の変化についても調べる。

4. 研究成果

(1) RNA-DNA ハイブリッド鎖のバルジ構造形成を利用した修飾塩基の検出

まずは、ターゲットの m6A を含む合成オリゴ RNA を用いて、本研究で提案した検出原理が実証できるか検証した。図 3 は、大腸菌の 23S rRNA2058 位の m6A を含む合成オリゴ RNA について、マイクロプレートを用いた ELISA 法により m6A 量を測定した結果である。ターゲット修飾塩基の検出範囲は 0.5-5 nM RNA、検出限界濃度は、0.5 nM RNA であった。また、メチル化率を変化させて測定した結果、メチル化率の変化に応じた直線性の良い検量線が得られた。RNA 増幅なしに特定 m6A の配列選択的な検出が可能であることを示した。(Anal. Chem. 2018, 90, 12, 7578-7582)

次に、実試料でも本測定法が適用できるかを調べるために、大腸菌 RNA や培養細胞 RNA のターゲットアデノシンのメチル化を同様の方法で測定した。RNA 試料を、RNA 制限酵素で断片化処理すると、より効率よく検出されることが分かった。大腸菌の N6 メチルトランスフェラーゼ遺伝子を欠損させた株(欠損株)と野生株の RNA について、ターゲットアデノシンのメチル化を、ELISA 法により測定した。野生株では、1 バルジ形成 DNA プローブとのハイブリッド鎖を用いることで抗体の結合が見られた。一方、欠損株では、用いる DNA プローブ間で抗体の結合量に違いが見られないことから、ターゲットアデノシンの非メチル化を確認することができた(図 4 上)。本測定法では、50 μ L/well の試料量が必要であり、測定は 3-4 時間程度かかった。しかし、同時に複数の試料を測定できるメリットがある。

さらに、欠損株と野生株の RNA 試料を混合し、さまざまなメチル化率の試料を調製した。これらの試料の m6A 量を測定することにより検量線を作成した。1 バルジ形成 DNA プローブを用いると、メチル化率に比例した直線性の良い検量線が得られた(図 4 下)。ターゲット塩基のメチル化状態の検出に必要な RNA 試料は、細胞が良く増殖した培養液 1 mL 程度から十分量精製できた。本研究で提案した免疫アッセイ法が、実試料 RNA の特定塩基のメチル化の有無やメチル化率の判定に利用できることを示した。

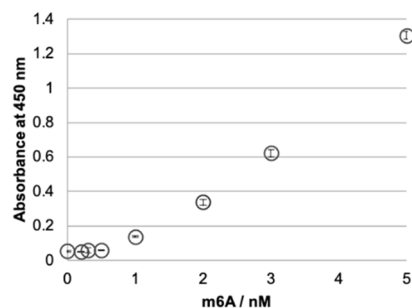


図 3 合成オリゴ RNA 修飾塩基検出検量線

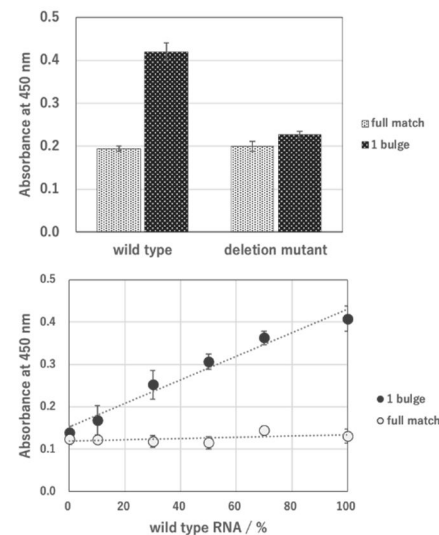


図 4 大腸菌野生株とメチル化酵素遺伝子欠損株 RNA のメチル化計測 (ELISA)

(2) マイクロ流路デバイスを用いた大腸菌 RNA m6A の検出 (SPR 測定)

DNA プローブ (10 nM) と RNA 制限酵素により断片化した大腸菌 RNA フラグメント (10 ng/ μ L) とのハイブリッド鎖を、アビジンを固定化した SPR センサー表面に固定化した。固定化は流速 2 μ L/min、約 15 分でほぼ飽和状態に達し、SPR 角変化は約 100 ミリ度であった。センサー表面に RNA/DNA ハイブリッド鎖がほぼ密に固定化されたと考えられた。続けて、抗 m6A 抗体 (10 μ g/mL) を約 15 分間流したところ、m6A への抗体結合による SPR 角変化量の増加がみられた。図 5 上に SPR センサーグラムの一例を示す。およそ 15 分後にランニング緩衝液に切替え、90 秒後の SPR 角変化量を抗体結合量とした。野生株と欠損株の RNA フラグメントを 1 バルジ形成 DNA プローブ、またはフルマッチ DNA プローブを使用して、ターゲットアデノシンのメチル化の有無を調べた。その結果、野生株で、1 バルジ形成 DNA プローブとのハイブリッド鎖でのみ抗体の結合による SPR 角変化量の増加が見られた。一方、欠損株では、抗体結合量に違いがなかった(図 5 下)。

この結果より、欠損株では N6 メチルトランスフェラーゼが発現していないことが示された。1 回の測定に必要な RNA/DNA ハイブリッド鎖の試料量は、30-50 μ L、測定時間は約 40 分であった。また、センサー表面を再生することで、繰り返し測定できることも確認した。従来の免疫アッセイ法である ELISA 法に比べ、少ない試料量で測定でき、また、測定時間も短縮できることを示すことができた。

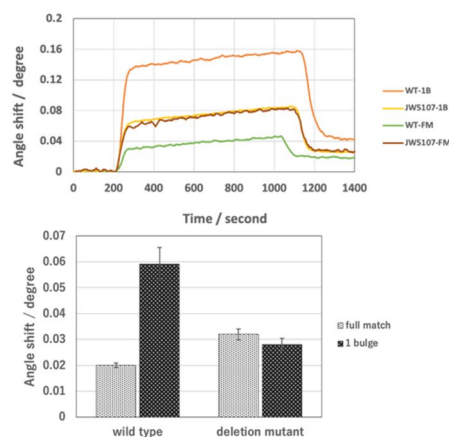


図 5 SPR を用いた大腸菌 RNA のメチル化計測

トランスクリプトーム解析への適用に向けて、mRNA アデノシンのメチル化の測定も試みた。mRNA 配列中のアデノシンのメチル化頻度の高い配列モチーフやマイクロ RNA が結合する RNA 配列を参考に DNA プローブをデザインした。薬剤を添加し細胞状態を変化させた培養細胞（肝がん細胞）の mRNA のメチル化状態の変化を、肝細胞に特異なマイクロ RNA 配列を参考にデザインした DNA プローブを用いて調べた。残念ながらメチル化状態の変化を明らかにするまでには至らなかった。しかし、生体機能や疾病等に関連する RNA の修飾塩基配列が新規に発見された時には、この配列をマーカーとして、RNA の修飾状態を追跡することが可能となると考えられる。本研究で提案した RNA 修飾測定方法は、今後、トランスクリプトーム解析研究の進展の一助になると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 小島直、須田友美、藤井紳一郎、平野和己、波平昌一、栗田僚二	4. 巻 167
2. 論文標題 Quantitative analysis of global 5-methyl- and 5-hydroxymethylcytosine in TET1 expressed HEK293T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosensors & Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 112472-112478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2020.112472	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 菅井祥加、富田峻介、石原紗綾夏、吉岡恭子、栗田僚二	4. 巻 92
2. 論文標題 A Microfluidic Sensing System with a Multichannel Surface Plasmon Resonance Chip: Damage-Free Characterization of Cells by Pattern-Recognition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 14939-14946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02220	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 栗之丸隆章、小島直、栗田僚二	4. 巻 91
2. 論文標題 Sequential Assessment of Multiple Epigenetic Modifications of Cytosine in Whole Genomic DNA by Surface Plasmon Resonance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 13933-13939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b03423	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 栗之丸隆章、小島直、栗田僚二	4. 巻 77
2. 論文標題 Immobilization of DNA on Biosensing Devices with Nitrogen Mustard Modified Linkers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry	6. 最初と最後の頁 e85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpnc.85	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 小島直、須田友美、栗之丸隆章、栗田僚二	4. 巻 1043
2. 論文標題 Immobilization of DNA with nitrogen mustard-biotin conjugate for global epigenetic analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 107-114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2018.09.008	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 吉岡恭子、栗田僚二	4. 巻 90
2. 論文標題 N6-Methylation Assessment in Escherichia coli 23S rRNA Utilizing a Bulge Loop in an RNA-DNA Hybrid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 7578-7582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.8b01223	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17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 菅井祥加、富田峻介、石原紗綾夏、吉岡恭子、栗田僚二
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴の特徴パターンを出力するマルチチャンネル型チップによる培養細胞の非破壊的評価
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅井祥加、富田峻介、石原紗綾夏、吉岡恭子、栗田僚二
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴の応答パターンを出力可能なマイクロ流体デバイスによる細胞評価
3. 学会等名 2020年度細胞アッセイ研究会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅井祥加、富田峻介、石原紗綾夏、吉岡恭子、栗田僚二
2. 発表標題 パターン認識に基づいて細胞を評価するセンサチップの開発
3. 学会等名 S A Tテクノロジー・ショーケース 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島直、須田友美、栗之丸隆章、栗田僚二
2. 発表標題 Immunochemical Assessment of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine Using Nitrogen Mustard Modified Linkers
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, The 3rd Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗田僚二
2. 発表標題 Development of New Material and Device for Biomolecular Analysis
3. 学会等名 4th International Conference on Nutraceuticals and Chronic Diseases
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗田僚二
2. 発表標題 エピゲノムの迅速分析に向けた材料創成とマイクロデバイス化
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗田僚二
2. 発表標題 Electrochemiluminescence derived from Surface Accumulable Co-reactant for Biomolecular Determinations
3. 学会等名 17th ISEAC & 3rd ECL
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗田僚二
2. 発表標題 特異/非特異プローブによるマイクロフルイディクスでの生体分子検出
3. 学会等名 JASISカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅井祥加、富田峻介、石原紗綾夏、吉岡恭子、栗田僚二
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴チップによるパターン認識に基づく培養細胞の非破壊的評価
3. 学会等名 第14回ナノ・バイオメディカル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅井祥加、富田峻介、石原紗綾夏、吉岡恭子、栗田僚二
2. 発表標題 生体試料の特徴パターンを出力する表面プラズモン共鳴センサチップの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅井祥加、富田峻介、石原紗綾夏、吉岡恭子、栗田僚二
2. 発表標題 細胞の特徴パターンを出力する表面プラズモン共鳴センサの開発
3. 学会等名 Chem-Bio Joint Seminar 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡恭子、栗田僚二
2. 発表標題 抗体のバルジ構造特異的な認識を利用したrRNA修飾塩基検出法
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗之丸隆章、小島直、栗田僚二
2. 発表標題 Detection of Cytosine Variants of DNA Using Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay
3. 学会等名 第45回国際核酸化学シンポジウム日本核酸化学会第2回年会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗之丸隆章、小島直、栗田僚二
2. 発表標題 エピゲノム修飾の包括的評価にむけたSPRイムノアッセイの開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島直、栗之丸隆章、須田友美、栗田僚二
2. 発表標題 核酸固定化試薬の開発とメチル化シトシンイムノアッセイへの応用
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第4回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗之丸隆章、小島直、栗田僚二
2. 発表標題 シトシンバリエーションの一括計測に向けたSPRイムノアッセイの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第37回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島直、栗之丸隆章、須田友美、栗田僚二
2. 発表標題 Immobilization of Genomic DNA with Bifunctional Linker Molecules for 5-Methylcytosine Immunoassay
3. 学会等名 9th Annual symposium of the Indian Scientists Association in Japan (国際学会)
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	栗田 僚二 (Kurita Ryoji) (50415676)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 グループ長 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------