

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560076

研究課題名(和文) RNAメチル化制御食事性因子の同定ならびに胎児への影響の解明

研究課題名(英文) Identification of diet contents regulating RNA methylation and those effects on fetal growth

研究代表者

河合 智子 (Kawai, Tomoko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・室長

研究者番号：40423404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子情報をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)を構成する核酸塩基のうちのアデニンにメチル化修飾が入ることにより、そのmRNAが細胞内で果たす役割が変化する可能性が示唆されており、細胞レベルのRNAメチル化制御による遺伝子発現制御の解明、並びにその調節因子の同定はここ数年で指数関数的に増加している。一方で、生体レベルでメチル化修飾の変化の役割を検証した報告は数少ない。我々は本研究において、ヒト胎盤検体を用いて、胎児発育と関連する、mRNAメチル化制御を介した遺伝子発現制御が胎盤に存在することを明らかにし、生体レベルでmRNAメチル化制御が果たす役割を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Adenine methyl modification of mRNA is known to regulate mRNA fates and alter the mRNA function. The reports elucidating mRNA methylation roles in the specified cells are increasing in an exponential manner. On the other hands, the studies exploring the mRNA methylation status at transcriptome-wide manner in vivo are limited. We investigated human placental transcriptome-wide methylation status and revealed that placental post-transcriptional gene expression regulation mechanism through mRNA methylation might be associated with fetal growth.

研究分野：栄養学 分子生物学

キーワード：胎児発育 胎盤 RNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

2012年に、初めて哺乳類の細胞で、mRNAのmethyl-6-Adenosine(m6A)修飾が網羅的に明らかにされ、Epitranscriptomeという言葉が誕生した(Meyer and Saleore et al. Cell 2012 Jun, Dominissini et al. Nature 2012 May)。一方、胎児発育に関連する研究の中で、胎盤中のFat mass and obesity-associated gene (FTO)の発現と胎児の発育に相関があることが報告されている(Bassols et al. Int J Obes 2010 Sep)。FTOは肥満と関連して一塩基変異が見られる遺伝子として2007年に同定され、上記の研究も肥満因子と胎児発育との関連という観点から研究された。しかし、FTOがmRNAのm6A修飾を脱メチル化する作用を持つことが後に報告され(Jia et al. Nat Chem Biol 2011 Oct)、胎盤のmRNAメチル化修飾に胎児発育との関連が示唆される。これまでに胎児発育と関連して、ヒト胎盤由来サンプルでEpitranscriptome解析を行った報告はない。

2. 研究の目的

低出生体重児は、出生後の成長が遅れるだけではなく、成人における心血管疾患をはじめとした生活習慣病の発症率の上昇に關与していることが示唆されている。しかし、胎児発育不全は原因不明な点が多く、管理できない場合が多い。本研究では、Epitranscriptome機構に注目し、胎児発育不全の原因を明らかにすることを目的としている。Epitranscriptome機構とは転写後調節の一つであり、mRNAの化学修飾を意味する。Epitranscriptome機構は栄養状態の改善により、調整できる可能性があり、研究成果を周産期の栄養管理に応用することを目的とする。胎児発育と胎盤のmRNAの化学修飾の実態を網羅的に明らかにし、その調節機構と病態への関連を明らかにするとともに、Epitranscriptome機構に関わる栄養環境を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) m⁶A mRNA 修飾の網羅的な検出法の確立

Saleore *et al.*が論文発表したmRNA m⁶A修飾の網羅的解析に用いたcell lineであるHEK293T cell lineを用いて、我々のmRNA m⁶A修飾検出系の整合性を確認した。Methylated RNA immunoprecipitation followed by sequencing (MeRIP-seq)を次世代シーケンサーを用いて行い、m⁶A修飾の標的箇所を同定するため、peak領域検出法を改変した。peakとして同定された領域のモチーフ解析を行い、既報の報告と比較し、我々の検出法の精度を確認した。

(2) ヒト胎盤のm⁶A mRNA 修飾の網羅的な検出

次に、ヒト胎盤より、分解されていないintact RNAを抽出するため、抽出法を検討した。帝王切開分娩の胎盤より分娩後15分以内に、絨毛組織をRNA抽出溶液内でホモジネ

ートし、total RNAを抽出後、バイオアナライザー電気泳動装置を用いて、品質を確認後、品質が確保されたもののみ実験に用いた。

(3) 様々な出生体重の新生児の胎盤RNAの収集

胎盤のepitranscriptomeが胎児の発育に及ぼす影響を解明するため、予定帝王切開分娩の妊婦さんより、文書でインフォームドコンセントを得た後に、分娩後胎盤絨毛組織を採取して解析した。胎児発育が胎齢の平均体重の10%未満の新生児(small for gestational age; SGA)7例、10%以上90%未満の新生児(adequate for gestational age; AGA)6例、90%以上の新生児(large for gestational age; LGA)5例より胎盤絨毛RNAを抽出した。

4. 研究成果

(1) m⁶A mRNA 修飾の網羅的な検出法を確立した

我々の手法によるMeRIP解析において、既報と同等の結果を得た。m⁶A修飾は遺伝子領域において、stop codon近傍と3'UTRで50%近くの確立で認められた(図1)。ピーク領域で最も頻繁にみられる配列として、以下のGGACを含む配列が最上位に検出された(図2)。このモチーフを持つ配列のAdenineが最もメチル化修飾を受けやすい可能性が示唆される結果は、既報と同様であり、他の研究グループと比類ない検出法を確立できたと考えた。

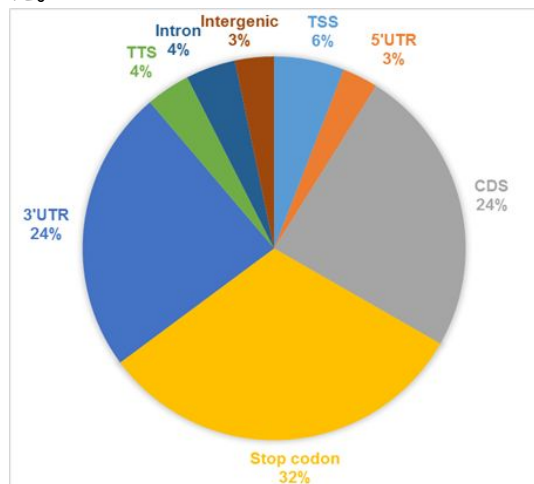


図1 我々のMeRIP実験法で同定したpeak領域の遺伝子上の位置の割合



図2 我々のMeRIP実験法で同定したpeak領域内で最上位に認められたモチーフ配列

(2) ヒト胎盤のm⁶A mRNA 修飾の網羅的な検出

上記(1)で確立した手法を用い、これまでに報告のないヒト胎盤由来のRNAを用いてMeRIPを行い、初めてヒト胎盤

epitranscriptome を明らかにした。peak 領域の遺伝子上の位置は HEK293T cell line と同様の分布を示した。peak 領域に最高頻度で認められたモチーフ配列も同じく GGAC であった。したがって、この特徴は組織、細胞を問わず普遍的であると考えられた。

HEK293T cell line のレプリケート実験、異なる 3 人の胎盤検体、それぞれにおいて共通して Stop codon 近傍に m⁶A 修飾の認められた mRNA、それぞれ 6,123 遺伝子、4,124 遺伝子について、peak の高い上位 1,000 遺伝子の gene ontology(GO) 解析を行ったところ、どちらも上位 1,000 に最も多く含まれていた遺伝子は、"transcription" に関わる遺伝子であった。したがって、転写に関わる遺伝子は、どの細胞でも共通して、stop codon 近傍の m⁶A 修飾を介して遺伝子発現制御を受けていることが判明した。

一方、検出される割合はわずかではあるが、5' UTR に m⁶A 修飾を受ける mRNA について同様の解析を行った。HEK293T も胎盤検体も stop codon 近傍に修飾を受ける遺伝子の 6 分の 1 近くの遺伝子数、それぞれ 1,138 遺伝子、646 遺伝子が 5' UTR で修飾を受けていたが、GO 解析で有意に共通した機能を持つ遺伝子は検出されなかった。

(3) 出生体重と関連して m⁶A 修飾をうける胎盤 mRNA

出生体重別に収集した胎盤検体 3 群 (SGA, AGA, LGA) 計 18 例の胎盤検体を用いて、さらなるヒト胎盤 epitranscriptome 解析を行ったところ、それぞれの遺伝子 mRNA の stop codon 近傍の m⁶A 修飾の相関は、平均して 0.84 で群に関わらず個人間で相関が高かった。一方、5' UTR の m⁶A 修飾の相関は stop codon 近傍より低く、平均して 0.72 と個人差がみられやすかった。それぞれの遺伝子領域で m⁶A 修飾をうけた遺伝子の peak 量をもとに、検体を分類すると、stop codon 近傍の m⁶A 修飾量によって、群を分ける結果は得られなかったが、5' UTR の m⁶A 修飾量によって SGA と AGA の胎盤は分類された。この結果は、胎盤で発現する mRNA の 5' UTR の m⁶A 修飾の調節を介した胎盤機能の変化と胎児発育への関連を示唆する結果であった。

さらに、群別に stop codon 近傍、5' UTR の m⁶A 修飾量が異なる遺伝子を抽出することができた。これらの mRNA の 9 割以上は発現量に群別で差は生じないが、m⁶A 修飾量のみが異なっていることを明らかにした。

(4) まとめ

本研究結果より、世界で初めてヒト胎盤の epitranscriptome の実態を把握することができた。Stop codon 近傍の mRNA m⁶A 修飾は個人間で共通した修飾が多く認められるのに対し、5' UTR の m⁶A 修飾は個人間で差が認められやすく、標的遺伝子もさまざまであった。胎盤の mRNA 5' UTR の m⁶A 修飾変化による遺伝子発現調節が出生体重と関連している可能性が示唆された。今後は、mRNA

5' UTR の m⁶A 修飾の上位にある調節因子と栄養環境の関連を明らかにし、適正出生体重を目的とした胎盤機能の解明を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Taniguchi K, Kawai T, Okamura K, Ogata H, Ohashi M, Nakabayashi K, Hata K, Epitranscriptome of human placental tissue, 国際 RNA 学会、2016 年 6 月 30 日 京都国際会館
谷口公介, 河合智子, 中林一彦, 秦健一郎, 胎児・新生児発育と胎盤肥満関連遺伝子発現解析、第 4 回日本 DOHaD 研究会 学術集会、2015 年 8 月 2 日、昭和大学医学部 (東京)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 智子 (KAWAI, Tomoko)
国立成育医療研究センター研究所・室長
研究者番号：40423404

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

谷口 公介 (Taniguchi, Kosuke)