

## LC-タンデム質量分析による RNA 転写後修飾の解析

中山 洋

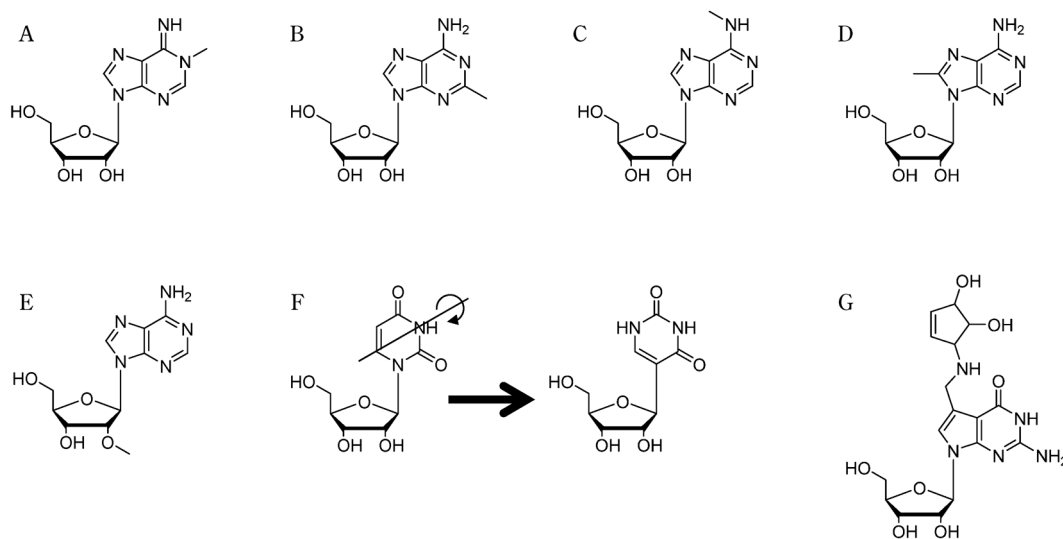
### 1 はじめに

RNAは遺伝子発現の中間体としてだけでなく、RNA-タンパク質 (RNP) 複合体としてタンパク質と協同し、遺伝子発現を中心とした様々な細胞機能の実行部隊として働く。これらのRNAはDNAの単なるコピーではなく、転写後にスプライシングや官能基付加・脱離、異性化、プロセッシングなどのいわゆる転写後修飾 (post-transcriptional modification; PTM) を受けて成熟し、その機能を発現する。現在までに130種を超えるPTMがオンラインデータベースに登録されている<sup>1)2)</sup>。PTMは、メチル化体や擬ウリジン (Y) などの比較的単純なものから、queuosineなど複雑なものまで多岐にわたる (図1)。多くはtRNAで発見されたものであるが、rRNA, snRNA, snoRNA, miRNAなど他のノンコーディングRNAからも検出されている。いくつかのPTMはこれらのRNAの構造安定、機能発現に重要な役割を持つが、大多数の機能は未知である。近年、tRNAやrRNAのPTMの一部が酸化ストレスや生育条件により変動することが明らかとなった<sup>3)4)</sup>。さらに、タンパク質をコードするmRNAにも可逆的なPTMが存在し、修飾を受けたmRNAの機能を調節し

ていることが報告された。このPTMによる遺伝子発現調節は、Epitranscriptome解析と呼ばれる生命科学の分野を生み出し注目を集めている<sup>5)~7)</sup>。これらPTMのほとんどは質量変化を伴うので、質量分析 (MS) により検出可能であり、タンデム質量分析 (MS/MS) を用いればその位置も同定できる。本稿では、筆者らが首都大の磯辺教授、農工大の高橋教授らと開発してきたナノフロー液体クロマトグラフィー (nLC)-MS/MSシステムによるPTM解析の現状について紹介する。

### 2 nLC-MS/MSによるRNA解析システム

RNAのnLC-MS/MSによる分析はproteomicsで一般的に用いられるbottom-upアプローチと同様である (図2)。すなわち、細胞抽出液あるいはaffinity精製したRNP複合体から酸性フェノールクロロホルム法により調製したRNA (混合物) をGuanosineの3'側のリン酸エステル結合を加水分解するRNase T1などの配列特異的エンドヌクレアーゼで消化し、生じたオリゴヌクレオチドをnLC-MS/MSで分析する。RNAは酸性分子なので、ネガティブモードのエレクトロスプレーイオン化法を用いるのが一般的であるが、このイオン化法では放電によりスプレーが不安定化しやすいため、筆者ら



A) 1-methyladenosine (m1A), B) 2-methyladenosine (m2A), C) N<sup>6</sup>-methyladenosine (m6A), D) 8-methyladenosine (m8A), E) 2'-O-methyladenosine (Am), F) uridine (U) から pseudouridine (Y) への異性化反応, G) Queuosine (Q)。本稿のPTMシンボルはMODOMICS (文献1) 表記に基づく。

図1 PTMの例

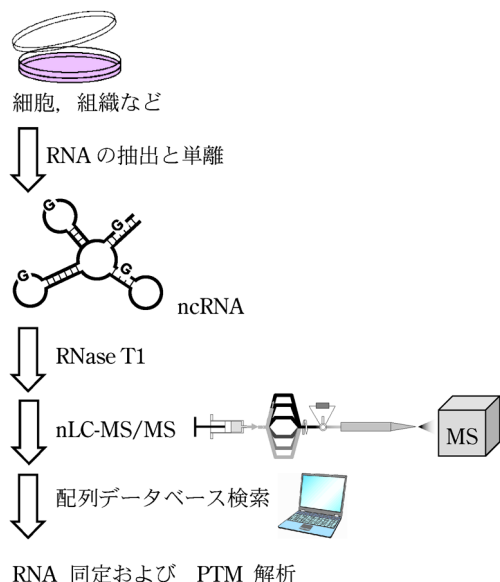


図2 nLC-MS/MSを中心としたRNAのbottom-up解析

はnLC分離を損なうことなくイオン化時に有機溶媒ミストを添加できる補助スプレー装置を考案した。これによりLCグラジエント溶離の全範囲で安定したスプレーが得られ、RNP複合体などから調製したfmolレベルのRNAの化学構造の実態を解析できるようになった<sup>8)</sup>。一方、RNAの逆相LCによる分離・精製はタンパク質と比べて容易なので、RNAを消化せずそのままMS/MSする、いわゆるtop-downアプローチも有望である。例えば、上述のnLC-MS/MSを用いることでヒト細胞から調製したmiRNA(～22 nt, 約7 kDa)の直接配列決定が可能だった<sup>8)</sup>。現時点では、tRNA(～76 nt, 約30 kDa)程度が分析の上限であるが、試料調製法、分析計およびデータ処理法の発展に伴い、より大きなRNAの直接分析が可能となろう。

筆者らは、上述の分析システムで得たMS/MSデータのみを用いてヒトゲノムなどのDNA/RNA配列データベースを検索し、RNAを同定できる検索エンジンAriadneを開発してきた。Ariadneは、(1)確率的アルゴリズムによるヌクレオチド同定ステップ、(2)ステップ(1)で同定した複数のヌクレオチドのゲノム配列上での「密度」を評価するステップの2段階検索により目的のRNAを同定する<sup>9)</sup>。このソフトウェアは、修飾ヌクレオチドとしてRNA modification database<sup>2)</sup>およびMODOMICS<sup>1)</sup>というPTMデータベースのエントリーに加え、ユーザーが定義した任意の残基を検索に利用できる。これによりメチル化やプロセッシングなど詳細なRNA化学構造の解析のみならず、DNA/RNA mixmerや非天然型のモノマーを含む合成核酸の化学構造解析も可能となった。Ariadneは、webサービスとして公開しており、誰でも利用できる(ariadne.riken.jp/)。現在までに、日米独英など12か国から約6500回の検索利用実績がある。

### 3 LC-MS/MSによる異性体PTMのシーケンシング

従来RNAのPTMは、RNAをヌクレオチドまで加水分解して生化学的な方法あるいはUVやMSを検出器としたLCで定性・定量分析されてきた。しかし、これらのヌクレオチド分析では、修飾部位の情報が失われてしまう。一方、2で述べたRNase消化オリゴヌクレオチドのnLC-MS/MSでは予測配列からの質量変化としてPTM部位を同定可能だが、PTMに多い異性体修飾の識別に問題があった。このため、従来PTMの同定にはLC分離したオリゴヌクレオチドのヌクレオチド分析が必要であった。この方法は、実験操作が煩雑で感度も低いためtRNAやrRNAなど存在量の多いRNAしか分析できなかった。これに対して最近では、抗m6A抗体などにより濃縮したRNA試料や化学修飾したRNA試料を逆転写反応により増幅し、生成したcDNAを高速シーケンサーで大規模解析して情報処理することで、試料RNAのPTMを一塩基解像度で検出する方法が開発されている<sup>7)</sup>。この方法は、Y, m1A, m6A, m5Cなどの限られた特定のPTMについては極めて高感度で、従来は困難だったmRNAの修飾解析を可能としたが、抗体や化学修飾反応の特異性に依存し、逆転写産物を分析する間接法であるため、擬陽性や擬陰性が多く<sup>10)</sup>、一回の分析で一つの修飾種の測定しか出来ないなど一般的なPTM解析法とはなり得ない。

そこで、より高感度で一般的なPTM解析法を目指し、MSによる異性体識別が研究されてきた。例えば、部位特異的安定同位体による代謝標識法により異性体間の質量差を生み出す方法が開発された。Popovaらは5,6-D<sub>2</sub>-uracilを代謝標識した大腸菌を用い、ピリミジンヌクレオチド(C/U)の5位へのPTMとその他の部位が修飾された異性体を識別できることを示した<sup>11)</sup>。この方法で標識したRNA試料では、YとU, m3Uとm5U, m3C/m4Cとm5Cを1 Daの質量差として検出できる。この方法は、核酸合成酵素変異体を用いるため動物個体などには適用が難しいものの、従来の化学修飾とMSを組み合わせた方法と比較すると非常に明確に異性体PTM部位を同定できる。

MSによる異性体識別法としては、分析計内での衝突開裂(collision-induced dissociation; CID)における開裂パターンを指標とする方法も開発されている。RNA/DNAのCIDでは、塩基リボース間のN-C結合が開裂しやすく、脱離塩基の質量からメチル化位置が塩基か糖かを識別できる。また、配列情報を与えるproduct ionの3'塩基脱離から、塩基/糖メチル化異性体を部位特異的に識別できる。このような開裂情報の利用をさらに進めることで、山内らはRNA配列中のY部位を標識無しに同定できることを示した<sup>10)</sup>。Yは塩基トリボース

が炭素-炭素結合している唯一のヌクレオシドであり、CIDにより塩基脱離が生じず特異的にYヌクレオシドの2脱水イオンを生じる。このイオンの有無を精密質量MS/MS/MSで分析することでY化部位を同定できる。この方法を用いてスプライシングを行うRNP複合体であるSpliceosomeの構成RNAであるU snRNAsのY部位を解析したところ、これまでに報告された26部位のYすべてに加え、U5 snRNA, U6 snRNAからそれぞれ未報告のYを1か所ずつ同定できた。

さらに、筆者らはこの方法を改良してメチル化部位同定と異性体識別を同時に行えるnLC-MS/MS/MS法の開発を進めている。この方法では、メチル化ヌクレオシドの各構造異性体に特有の開裂パターンを利用することで、それぞれの異性体を従来の直接法の約100倍の感度で識別できる。この方法の開発は、プロテオームの多様性を生むmRNAの可逆的修飾として注目されるEpitranscriptomeの直接解析に道を拓くものである。

#### 4 LC-MS/MSによる修飾部位ごとのPTM修飾率の定量

上述のように全RNAあるいは分画したRNA全体の修飾率は、これらのRNAを加水分解後にヌクレオシド分析すれば得ることができる。しかし、ヌクレオシド分析では、部位ごとの修飾率やその変化を調べることは困難である。プロテオミクス同様に、通常の培地と安定同位体ラベルヌクレオシドを含む培地から調製したRNA試料を混合、RNase消化し、生じたオリゴヌクレオチ

ド混合物をLC-MS/MSで分析することで異なる状態の細胞間で修飾状態の比較ができることも報告されている。しかし、これらのMSを用いた方法でも上述の高速シーケンサーを用いた方法でも、部位ごとの修飾率を知ることはできなかった。田岡らは、安定同位体標識した*in vitro*合成RNAを内部標準として用いる方法(Stable Isotope-Labeled riboNucleic Acid as an internal Standard; SILNAS)を提案し、PTMを部位ごとに同定し定量することができることを示した(図3)。合成RNAを用いた評価では数%以上の修飾率であれば高い定量性が得られた。さらにSILNASは、質量変化を伴わないYもLCの溶離時間の違いから識別し定量結果を得ることができる。もし、目的のヌクレオチドが複数のUを持つ場合には、上述した安定同位体置換体を用いた代謝標識やMS/MS/MS法によりYの位置を決定できる。この方法を分裂酵母<sup>4)</sup>および出芽酵母<sup>12)</sup>のrRNA(5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA, 25S rRNA)に適用し、これらの酵母rRNAのPTMの全貌を明らかにした。これは真核細胞のrRNAのPTMを含む化学構造を完全に決定した最初の例である。これらのPTMをリボゾームの立体構造上にマッピングしたところ、修飾ヌクレオチドはサブユニット間インターフェイスやpeptide exit tunnelに局在しており、rRNAの機能との関連が示唆された。さらに、分裂酵母では細胞の生育条件によりPTMの修飾率が変動することを見いだした<sup>4)</sup>。これらの変動の生理的意義は不明であるが、tRNA, mRNAでの修飾変動と考え合わせると、RNA

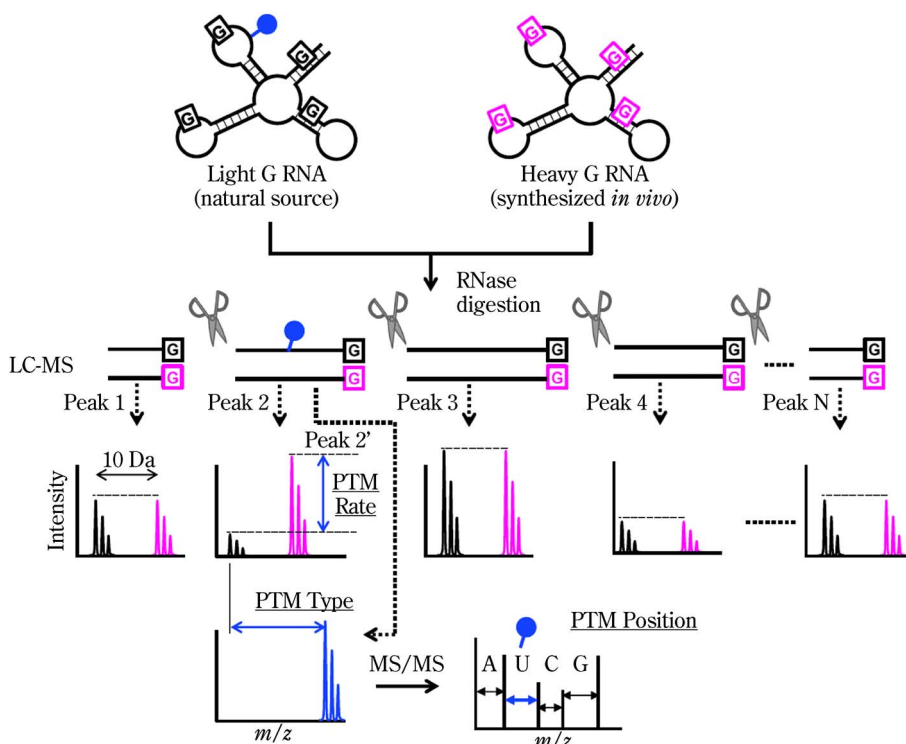


図3 SILNAS法の概要(文献4より許諾を受け転載)

のPTMは細胞の状態に応じて動的に細胞機能を調節しているのかもしれない。

## 5 おわりに

筆者らが開発したnLC-MS/MSを中心としたRNAの直接解析法は、RNP複合体などから調製したfmol量のRNAの詳細な化学構造を得ることが可能である。この技術は、膨大な種類が存在するncRNAの機能解析などを通じて基礎生物学に貢献できるだけでなく、RNA代謝異常症などの機構解析にも有用と考えられる。一方、最近急速に研究・開発が進展している核酸医薬<sup>13)</sup>で用いられる核酸分子は、医薬品としての効果を高め、体内に投与した核酸分子の安定性を向上するため、2',4'架橋したlocked nucleic acid (LNA) やチオリン酸リンカーなど高度に「修飾」された核酸が用いられるため、その解析には分子生物学の技術の適用が困難である。これら非天然核酸も生体由来のDNA/RNAと同様にAriadneにより構造確認や分解物などの同定が可能である。したがって、本稿で紹介した分析技術は、核酸医薬の設計、製造工程の改善、品質管理、体内での安定性や代謝過程さらには体内動態の解析など、創薬研究への展開が期待できる。

## 文 献

- 1) M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki, H. Grosjean : *Nucleic Acids Res.*, **41**, 262 (2012).
- 2) W. A. Cantara, P. F. Crain, J. Rozenski, J. A. McCloskey,

- K. A. Harris, X. Zhang, F. A. Vendeix, D. Fabris, P. F. Agris : *Nucleic Acids Res.*, **39**, 195 (2011).
- 3) C. T. Chan, Y. L. Pang, W. Deng, I. R. Babu, M. Dyavaiah, T. J. Begley, P. C., Dedon : *Nat. Commun.*, **3**, 937 (2012).
- 4) M. Taoka, Y. Nobe, M. Hori, A. Takeuchi, S. Masaki, Y. Yamauchi, H. Nakayama, N. Takahashi, T. Isobe : *Nucleic Acids Res.*, **43**, e115 (2015).
- 5) Y. Saletore, K. Meyer, J. Korfach, I. D. Vilfan, S. Jaffrey, C. E., Mason : *Genome Biol.*, **13**, 175 (2012).
- 6) M. Helm, Y. Motorin : *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 275 (2017).
- 7) X. Li, X. Xiong, C. Yi : *Nat. Methods*, **14**, 23 (2016).
- 8) H. Nakayama, Y. Yamauchi, M. Taoka, T. Isobe : *Anal. Chem.*, **87**, 2884 (2015).
- 9) H. Nakayama, M. Akiyama, M. Taoka, Y. Yamauchi, Y. Nobe, H. Ishikawa, N. Takahashi, T. Isobe : *Nucleic Acids Res.*, **37**, e47 (2009).
- 10) Y. Yamauchi, Y. Nobe, K. Izumikawa, D. Higo, Y. Yamagishi, N. Takahashi, H. Nakayama, T. Isobe, M. Taoka : *Nucleic Acids Res.*, **44**, e59 (2016).
- 11) A. M. Popova, J. R. Williamson : *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 2058 (2014).
- 12) M. Taoka, Y. Nobe, Y. Yamaki, Y. Yamauchi, H. Ishikawa, N. Takahashi, H. Nakayama, T. Isobe : *Nucleic Acids Res.*, **44**, 8951, (2016).
- 13) C. Morrison : *Nat. Biotechnol.*, **35**, 108 (2017).



中山 洋 (Hiroshi NAKAYAMA)

理化学研究所環境資源科学研究センター生命分子解析ユニット (〒351-0198 和光市広沢 2-1)。東京都立大学理学研究科化学専攻修了。博士(理学)。《現在の研究テーマ》質量分析をもちいた生体高分子の化学構造解析。《趣味》散歩。  
E-mail : knife@riken.jp

## 原 稿 募 集

### 創案と開発欄の原稿を募集しています

内容：新しい分析方法・技術を創案したときの着想、新しい発見のきっかけ、新装置開発上の苦心と問題点解決の経緯などを述べたもの。但し、他誌に未発表のものに限ります。

執筆上の注意：1) 会員の研究活動、技術の展開に参考になるよう、体験をなるべく具体的に述べる。物語風でもよい。2) 従来の分析方法や装置の問題点に触れ、記事中の創案や開発の意義、すなわち主題の背景を分かりやすく説明する。3) 図や表、当時のスケッチなどを用いて理解しやす

くすることが望ましい。4) 原稿は図表を含めて4000~8000字(図・表は1枚500字に換算)とする。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304号

(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

〔電話：03-3490-3537〕