

課題番号 10

## 2-ヒドロキシグルタル酸による RNA メチル化亢進の検証

### [1] 組織

代表者：澤 智裕  
(熊本大学大学院生命科学研究部)  
対応者：本橋 ほづみ  
(東北大学加齢医学研究所)  
分担者：金森 政之  
(東北大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 235,007 円，旅費 131,100 円，  
その他 33,893 円

### [2] 研究経過

イソクエン酸脱水素酵素 1 (*IDH1*) 遺伝子には、白血病や脳腫瘍において高頻度に機能獲得型変異が見いだされる。この変異により、イソクエン酸を酸化して  $\alpha$  ケトグルタル酸に変換する本来の酵素活性が失われ、 $\alpha$  ケトグルタル酸を還元し 2 ヒドロキシグルタル酸 (2HG) を産生する活性が獲得される。2HG はがん細胞特異的な代謝物 (オンコメタボライト) であり、 $\alpha$  ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ群を阻害しがん化を促進するとされている。とりわけ、ヒストン脱メチル化酵素 Jumonji タンパク質や、DNA 脱メチル化酵素 TET の機能を阻害してヒストンや DNA の過メチル化状態をもたらす、エピゲノムの攪乱により細胞をがん化すると理解されている。一方、本橋は、*IDH1* 変異脳腫瘍では、悪性化をドライブする転写因子 NRF2 の機能が抑制され、抗がん剤の感受性が改善し、比較的前後が良好であることを見いだしているが、その分子メカニズムは不明である。

申請者は、これまで核酸の修飾体の分析法の確立とその生物学的意義の解明を行い、一酸化窒素と活性酸素のセカンドメッセンジャーとして 8-nitro-cGMP を同定し、酸化ストレス応答と生体防御における重要性を明らかにしており、化学修飾ヌクレチドのケミカルバイオロジーにおいて永年の実績と高いレベルの分析技術を有している。近年、mRNA 中のアデノシンのメチル化が mRNA 安定性や翻訳制御に関与すること、その脱メチル化が ALKBH5 により触媒されることが報告された。ALKBH5 も  $\alpha$  ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼであり、2HG による

抑制を受ける可能性がある。そこで、*IDH1* 変異体による NRF2 機能抑制がエピトランスクリプトーム制御によるものと予想し、本研究では、RNA メチル化のバイオマーカーとしてメチルアデノシンの分析法を確立し、*IDH1* 遺伝子変異を有する脳腫瘍検体におけるメチルアデノシンの増加を検証することを目的とした。

本研究では、2 度にわたり加齢研での研究打ち合わせを実施し、質量分析によるメチル化リボヌクレオチドの測定条件の検討を実施した。その後、東北大学における臨床検体を用いたサンプルの検討を行う予定であったが、メチル化リボヌクレオチドの測定系の構築がやや難航したことから、臨床検体の検討は予備的な段階のみを実施した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

6-メチルアデノシン (6mA) は、mRNA 中に比較的多く存在し、特に、mRNA の終始コドン周辺に見いだされる。また、1-メチルアデノシン (1mA) も mRNA の 5' UTR に存在しており、翻訳効率を制御するとされている。6mA の脱メチル化酵素は ALKBH5 で、1mA の脱メチル化酵素は ALKBH3 であり、いずれも 2HG による抑制を受ける可能性がある。そこで、安定同位体標識 6mA と 1mA 各種内部標準を用いて、イオン化効率を補正することで定量的なタンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を検討した。予備実験から、1mA はカラム保持が悪く夾雑物の影響を受けやすいことが分かっているので、1mA をアルカリ処理にて 6mA に変換して測定する方法についても検討を行った。さらに、<sup>13</sup>C 標識 6mA と 1mA を合成し内部標準として使用し、定量性のある測定方法を確立した。

脳腫瘍検体を用いた予備的な結果では、*IDH* 変異を有する脳腫瘍検体で 1 割程度であるが、6mA の有意な増加が認められた (図 1)。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究の成果は、オンコメタボライト 2HG による発がん過程において、エピゲノム制御の攪乱に加えて、エピトランスクリプトームの攪乱が関与する可能性を示唆するものと期待される。今回の予備

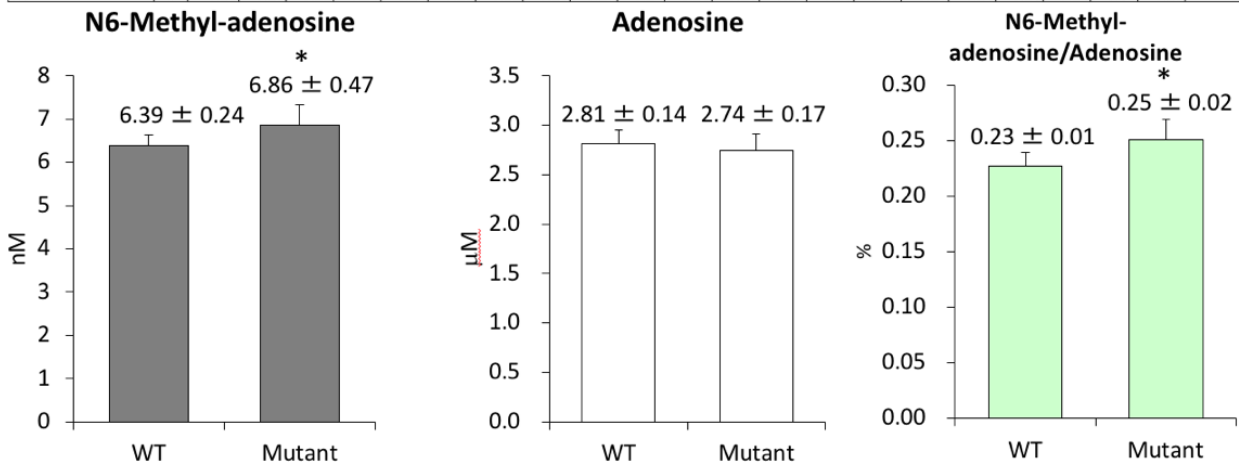
的検討で、*IDH1* 変異腫瘍でRNAメチル化レベルが上昇が確認されたことから、今後、さらに症例数を増やした検討が必要である。さらに、将来的には、影響をうけるRNAを同定するために、メチル化RNA免疫沈降シーケンス (meRIP-seq) 解析を実施することを視野にいれている。

[4] 成果資料

本共同研究成果はまだ成果発表には至っていない。

図1 脳腫瘍検体を用いた6mAの定量。WT、Mutantは、それぞれ、*IDH1* 遺伝子に変異がない症例、ある症例、を意味する。13C1-アデノシン、13C1-N6メチルアデノシンを内部標準とした定量方法を用いた。

Sample No	WT								Mutant								TTEST						
	49	106	345	369	401	445	649	279	366	450	492	580	604	636	661	713		724	50-2	139-2	580-2	713-2	
Adenosine	2.6	2.9	3.0	2.9	2.6	2.8	2.8	2.5	2.7	2.7	2.5	2.9	3.1	2.8	2.9	2.5	2.7	2.9	2.9	2.6	2.8	0.38	
Methyl-Adenosine	6.5	6.7	6.8	6.1	6.3	6.1	6.2	5.8	7.4	6.6	6.3	6.7	7.2	6.5	6.7	6.7	7.1	7.4	7.0	7.7	6.9	0.03	
Methyl-Adenosine/Adenosine																							
	%	0.25	0.23	0.22	0.21	0.24	0.22	0.22	0.23	0.27	0.24	0.25	0.23	0.23	0.23	0.23	0.27	0.26	0.26	0.24	0.30	0.25	0.01



10/26受領サンプルを1nM [<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]methyl-adenosineを含む0.1%FAで100倍(methyl adenosine測定用)、10nM [<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]adenosineを含む0.1%FAで1000倍(adenosine測定用)希釈して、LC-MS/MSに10μl injection

各濃度はそれぞれスパイクしたInstdのピーク面積から算出した。

Mean ± SD