

トランスクリプトーム-単一塩基分解能で同時に複数のRNA修飾をプロファイリング

Vahid Khoddami^{a,b,c,1,2}, Archana Yerra^{b,c,1}, Timothy L. Mosbruger^d, Aaron M. Fleming^e, Cynthia J. Burrows^{e,3}, Bradley R. Cairns^{b,c,3}

^aDepartment of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115; ^bハーワード・ヒューズ医学研究所, ユタ大学 School of Medicine, Salt Lake City, UT 84112; ^cDepartment of 腫瘍学的 Sciences, Huntsman Cancer Institute, ユタ大学 School of Medicine, Salt Lake City, UT 84112; ^dBioinformatics Shared Resource, Huntsman Cancer Institute, ユタ大学 School of Medicine, Salt Lake City, UT 84112; AND <ユタ大学>, ソルトレイクシティ, ユタ州 (84112)

執筆: Cynthia J. Burrows, 2019年1月25日 (レビューは2018年10月9日に送付, Juan D. Alfonzo, Thomas Carell, Peter C. Dedonによるレビュー)

修飾されたリボヌクレオチドがRNAの配列、構造、機能、安定性、運命、および他の分子との相互作用に影響を与える可能性があるため、RNA修飾の幅と重要性は急速に増大している。したがって、細胞のRNA修飾を一塩基分解能で知ることは、細胞の状態と運命に関する重要な情報を提供してもよい。現在の主な制限は、トランスクリプトーム全体および単一塩基分解能で同時に複数の修飾の再現可能なプロファイリングを可能にする方法の欠如である。ここで、我々は、 m^5C 、 Ψ および m^1A を単一塩基分解トランスクリプトーム全体で高感度かつ同時に検出することを可能にするRNA重亜硫酸塩配列決定の修飾であるRBS-Seqを開発した。RBS-Seqを用いて、 m^5C および m^1A は、既知のシグネチャー塩基ミスマッチに基づいて正確に検出され、ここで、1-2塩基欠失を示す Ψ 部位と同時に検出される。構造解析から、cDNA合成中にbaseskippingを引き起こす Ψ -monobisulfite内転、熱誘導リボース開環及び Mg^{2+} -assisted再配向を含む欠失シグネチャーの基礎となる機構を明らかにした。これらの修飾をそれぞれ独自の化学的手法で検出することにより、同一RNA中の3つの修飾すべてを高精度にマッピングすることが可能となり、共変動研究が可能となる。HeLa RNAにRBS-Seqを適用すると、tRNAおよびrRNA中のほとんどすべての既知の m^5C 、 m^1A 、および Ψ 部位が明らかになり、非コードRNAおよびmRNA中の数100もの新たな m^5C および Ψ 部位が提供された。しかし、われわれの結果は以前の研究とは大きく異なっており、非コードRNAとコードRNAの m^5C 部位が10倍少ないことを示唆している

mRNAには m^1A がほとんどない。これらを総合すると、今後のepitranscriptome研究に大いに貢献できるものと期待している。

修飾塩基 シュードウリジン | RNAメチル化 | m^1A | メチルアデノシン

RNAのovalentな修飾は数多くあり(1)、トランスクリプトーム全体のプロファイリングにより(2-4)の広範かつ系統的な解析が可能これまでのところ、 N^6 -methyladenosine(m^6A)5-メチルシトシン(m^5C)プソイドウリジン(Ψ)および N^1 -methyladenosine(m^1A)(5-14)を含む限られた数の改変について、トランスクリプトーム全体のプロファイリングが報告されているしかしながら、高感度で真の単一塩基分離能を提供するプロファイリング法は、現在、 m^5C (9, 14, 15)および m^1A (16)に対してのみ利用可能である;これらの(m^6A , m^1A , および Ψ)のうちの3種は、抗体(m^6A または m^1A)(5, 6, 8, 10)に対して、または逆転写(m^1A および Ψ)中のポリメラーゼ休止/終結を含む技術(7,11-13, 17, 18)に対して、初期濃縮または抗体を介する検出を含んでいる。 Ψ (19)の最近の単一塩基技術は検出前のかさ高い付加物形成に依存している。さらに、 Ψ プロファイリングのための現在の方法は有用であるが、大部分は、広範な採用または直接的な候補サイト検証(7,11-13, 20)に必要とされる感度、解像度および技術的容易性に欠ける。 m^5C 、 m^1A 、と Ψ を、同じサンプルからsinglebaseの分解能トランスクリプトーム-ワイドに同時に検出するために、われわれは Ψ のための分子アプローチと解析パイプラインを開発し、 m^5C と m^1A のための改良された配列決定ベースの方法を開発した

最初に、3つの修飾すべての配列決定/mismatchbased検出のための概念的基礎を提供する(図1A)、およびHeLa細胞データセット(図1B および C、SI付録、図中の複数のさらなる例を含む)中の修飾の明瞭さを示す例示的tRNA(グリシン)。S1-S3)。

RNA(およびDNA)中の m^5C の検出は重亜硫酸塩に対する感受性:非メチル化シトシンは、シトシンをウリジンに変換する重亜硫酸イオンによって効率的に脱アミノ化され、その後、脱スルホン化、RT-PCR、および配列決定に続いてチミジンとして読まれる。対照的に、 m^5C は重亜硫酸塩に抵抗し、配列決定後もシトシンのままである(15, 21)(図1A)。我々は、熱と、RNA変性および重亜硫酸塩処理(一本鎖RNAを優先的に修飾する)を改善する強力な化学変性剤ホルムアミドとを組み合わせることによって、従来の m^5C プロファイリング法を改善し、包括的なC→T変換を提供した。

重要性

修飾塩基の分野は、同じRNA中の複数の一般的なRNA修飾をプロファイリングするための高感度で正確な単一塩基分離法の開発によって著しく進歩するであろう。我々の研究は、真の塩基対分解能を有するトランスクリプトーム全体で Ψ 部位をプロファイリングするための(i)定量的方法、我々が観察した Ψ 依存性欠失シグネチャーの化学的理解(iii)、 m^5C および m^1A 、および(iv)をプロファイリングするための改善された方法、ならびに同じRNA中の3つの修飾すべてを同時に検出するためのこれらの方法の組み合わせを含む、この目標に向けたいくつかの進歩を提供する。(ii)これら3の非常に一般的なRNA修飾を含むepitranscriptomeな研究は、この方法によって得られる組合せ能力と実行の比較的安全性によって大いに前進するはずである。

投稿者: V.K. and B.R.C. designed research; V.K., A.Y., and A.M.F. performed research; V.K., A.Y., T.L.M., and A.M.F. contributed new reagents/analytic tools; V.K., A.Y., T.L.M., A.M.F., C.J.B., and B.R.C.解析データ; V.K., C.J.R.C.が論文を書いた。

レビュー担当者: J.D.A., オハイオ州立大学; T.C., Ludwig Maximilians University、およびP.C.D., Massachusetts Institute of Technology。

著者は利害の衝突がないと宣言する。

このオープンアクセス記事は、Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivativesライセンス4.0(CC BY - NC - ND)で配布されている。

データの蓄積: この論文で報告されたデータは、Gene Expression Omnibus(GEO)データベース(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)に保管されている。GSE90963。この文書で報告されているすべてのカスタムコンピュータスクリプトは、GitHub(<https://github.com/HuntsmanCancerInstitute/RBSSeqTools>)に保管されている。

¹ V.K.とA.Y.はこの研究に等しく貢献した。

² Presentの住所: 16635 - 148テヘラン, Academic Center for Education, Culture and Research, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Cell Science Research Center, Department of Stem Cells and Developmental Biology。

連絡先の³ To. Eメール: burrows@chem.utah.eduまたはbrad.cairns@hci.utah.edu。

この記事には、www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1817334116/-DCSupplementalのオンラインでのサポート情報が含まれている。

2019年3月14日発行。

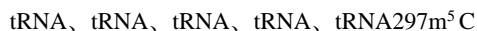


図1. RBS-Seqは m^5C , m^1A , と Ψ の同時塩基対分解能transcriptomewideマッピングを可能にする。(A)重亜硫酸塩に対する修飾ヌクレオチドの反応性の概略図。(上)および修飾ヌクレオチドの同時マッピングの原理(下)。 m^5C では、亜硫酸水素塩処理によってCsが脱アミノ化され(Us)に変換;cDNA配列決定でTs)、 m^1A Csは亜硫酸水素塩に抵抗し(cDNA配列決定でCsのまま)、シトシンのメチル化部位が確立される。 m^1A については、 m^1A を有する部位でのcDNA合成は、しばしばNBSサンプルにおける誤った取り込み/ミスマッチを与える。対照的に、治療中に m^1A はDimroth転位(N^1 から N^6 へのメチルの移動)を介して m^6A に変換され、サンプル中のチミン(cDNAはアデノシンのまま)を忠実に鋳型とする。したがって、NBSサンプルとBSサンプルを比較することにより、 m^1A Aサイトが特定される。 Ψ については、亜硫酸水素塩処理の際の Ψ ヌクレオチドは、安定なmonobisulfite付加物を形成し(図4)、これは、リバーサートランスクリプターゼとの頻繁なバypassを引き起こし、正確な修飾部位に欠失シグネチャーを残す。(B)その周知の複数の m^5C および単一の m^1A および Ψ 改変部位を示すtRNA^{Gly}の模式図。(C)改変ヌクレオチドの正確な位置およびそれらのレベルを示すtRNA^{Gly}遺伝子座についてのHeLa細胞株からの実験的RBS-Seq結果を要約する棒グラフ。40番目と60–66番目の m^5C のレベルが低いことは、tRNAタイプのサブセット(31, 32)であることに示す。

HeLa RNAにおける99.7%の頻度(*SI付録*、[図](#)、[S4–S8](#)),最適化は、二次構造の領域の内部および/または外部に置かれたm⁵C塩基を用いて、合成RNAオリゴマーを介して定量された(*SI付録*、[図S5](#))。RBS-SeqをHeLa RNAに適用し、3種類の入力RNA種[ポリA-選択

(~85 (22)、分析パイプライン(*SI Appendix*,[図S9](#))(23)は、亜硫酸水素塩処理((~200)由来のデータセットを比較した。(~92 このレジメンでは、ヌクレオチドの複雑さが減少した結果生じる不正確なアラインメントによって生じる偽陽性を減少させる。次に、3つの入力タイプすべてからの結果を集計し、C/G経路および強い二次構造に対する計算および目視検査を介して追加の偽陽性を除外し、nonconversion[$\geq 20\%$ (FDR ≤ 0.05)]([SI](#))の閾値を課した

[illegible]