

Small RNA 修飾のプロファイリングにおける課題



これまで Small RNA のプロファイリングにはシーケンシングが用いられてきましたが、RNA 修飾がシーケンシング定量に及ぼす影響はほとんど見過ごされてきました。m1A、m3C、m1Gなどの様々な RNA 修飾は、シーケンシングライブラリー構築時の逆転写反応を阻害し、Small RNA、特にその修飾の正確な定量を不可能にします。例えば、small RNA-seq データは、ノーザンプロットで観察される 22 塩基長のアイソフォームよりも、18 塩基の 3'-tsRNA に偏る傾向があります。これは TUC ループに存在する m1A が逆転写酵素の進行を阻害するためです。既存の small RNA シーケンスデータの大半は上記ライブラリー構築法で得られているため、修飾された small RNA に関するデータは誤った解釈を招く可能性があります。

また、small RNA-seq による small RNA プロファイリングには複数の PCR 増幅ステップが必要であり、これにより重大な定量バイアス/不正確さが生じるため、独立した直交的な手法を用いることが不可欠です。

実際、修飾研究のためのほとんどのシーケンスベース手法は大量のスタートサンプル (>100 µg Total RNA) を必要とするため、限られたサンプル量しか持たない多くの研究を妨げています。

さらに、small RNA-seq では通常、正規化とサンプル内の相対的 RNA 量を表すために、100 万 RNA リードあたりのリード数 (RPM: Reads Per Million RNA reads) が用いられます。しかし、RPM はサンプル内の small RNA 集団の構成に依存します。ある 1 つの small RNA の RPM が変化すると、実際の絶対発現レベルが変化しなくとも、他のすべての small RNA の値が調整されます。

修飾された small RNA の全スペクトルを高感度かつ正確な化学量論で同定・定量するためには、シーケンシング技術の限界を克服し、非シーケンシングベースの手法を開発する必要があります。

Small RNA の転写後修飾を定量化する技術

Arraystar 社の small RNA 修飾プロファイリング技術（図 1）は、マイクロアレイと RNA 免疫沈降法（RIP）を組み合わせ、同一のアレイ上で修飾を受けた small RNA と非修飾の small RNA レベルを同時に測定します。これにより、miRNA、pre-miRNA、tRNA、および tsRNA（tRFs および tiRNA）などの small RNA における修飾の調節的影響を研究するための重要な情報が得られます。

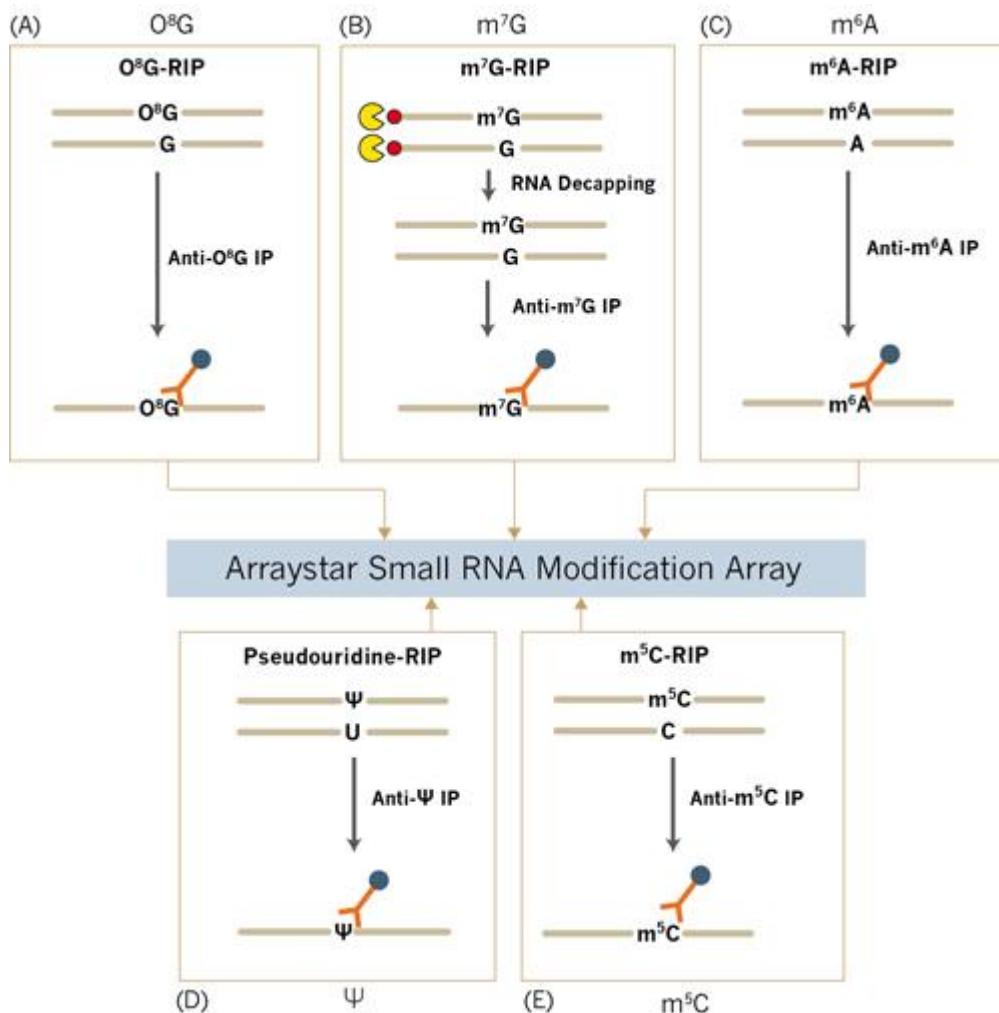


図 1. Arraystar 社の small RNA 修飾プロファイリング技術による small RNA 転写後修飾 (o8G、m7G、m6A、シードウリジン、m5C) の同定と定量。修飾を受けた small RNA は特異的抗体を用いた免疫沈降により濃縮され、その後 Arraystar Small RNA Modification Array を用いて同定・定量される。