

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

磯辺 俊明

(首都大学東京大学院理工学研究科 教授)

「RNA 代謝解析のための質量分析プラットフォームの開発」

1. 研究実施の概要

近年、RNA の高次の調節機能や新しい機能性 RNA が次々と発見され、RNA あるいは RNA/蛋白質複合体が担う多彩な細胞機能が注目されている。これらの多くは前駆体である非コード RNA やコード RNA のイントロンから生じ、複雑な転写後修飾を受けるため、実際の細胞に内在する RNA の種類や構造、存在量などの詳細は殆ど知られていない。本研究では、最新の質量分析法を駆使した包括的な RNA 解析のプラットフォームを開発し、細胞の機能発現や制御に重要な低分子 RNA や RNA/蛋白質複合体の実態を明らかにすることで、プロテオミクスと低分子 RNA 研究が融合した細胞機能ネットワーク解析の基盤作りを目指す。研究の初年度にあたる平成 18 年度は、今後の開発計画を進めるための大型機器の導入と使用環境の整備、国際的な研究の現状と動向の分析などから問題点を把握するとともに、RNA の質量分析法の開発に向けた基礎的な検討を行った。

2. 研究実施内容

1) 質量分析法を基礎とした RNA 同定技術の開発

1-1) LC 分離技術の開発

首都大のグループが担当する本研究では、プロテオミクス研究に向けて開発した LC-MS 法を基本にした RNA の自動的な質量分析システムの開発を目指している。低分子 RNA の質量分析をエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法と組み合わせてオンラインで行う場合、複雑な組成と構造をもつ RNA 標品を効率よく LC で分離し、溶出した RNA を希釈することなく効率的にイオン化するための技術開発が必要である。蛋白質やペプチドでは、逆相クロマトグラフィーをはじめとする高分解能の LC 分離法が開発され、また分離した試料溶液をそのまま効率よくオンラインで質量分析できるギ酸-アセトニトリル系などの溶媒条件が確立されている。一方、RNA は構築単位が 4 種類のヌクレオチドに限定されていることで化学的な多様性が小さく、しかもリン酸基を多く含む親水性化合物という意味でも化学的には比較的均一な分子集団である。また RNA を分離する従来法では一般に不揮発性の緩衝液を用いるイオン交換クロマトグラフィーが利用されるので、溶出液には Na⁺ や K⁺ などの塩

が高濃度で存在するが、これらの塩は RNA と付加イオンを形成しやすく、質量分析の効率を極端に低下させる。本研究では、まず塩基数が 3-21 の合成 RNA あるいは DNA を効率よく分離できる逆相系担体や分離条件の設定と ESI 法による質量分析法について検討した。逆相系では、従来からプロテオミクスでよく使用される C-18 を含むさまざまなアルキル鎖長のシリカ系およびポリマー系担体や新開発のスフェリカルカーボン充填剤の分離特性や溶媒条件について検討した。また近年のソフトイオン化法の開発によって生体高分子の質量分析が可能になったが、その対象とされているのは殆どの場合プロトンが付加して (+) 荷電をもつ粒子である。一方、プロトンの除去あるいは電子の付加によって (-) 荷電をもつ粒子を解析する「ネガティブモード」での質量分析は一般に感度が悪く、生体高分子に適用した解析例は少ない。本研究が対象とする RNA はリン酸基に富み、LC-MS システムで使用する ESI 法では (-) 荷電をもつ多価イオンを生成する典型的な化合物である。そこで本研究では、合成した複数の低分子 RNA を使用し、ESI 法で効率よくイオン化できる溶媒条件などについても検討した。その結果、試料とした低分子 RNA/DNA の分離には比較的疎水性の高い C-30 のシリカ系充填剤を、中性-塩基性条件下で RNA/DNA とイオンペアを形成する揮発性のトリエチルアミン酢酸/アセトニトリル緩衝液中で使用した時に比較的良好な分離が得られることがわかった。実際に C-30 シリカ担体をフューズドシリカで成型したスプレーチップカラム (100 μ m x 50 mm) に充填して 100 nl/min の超微流速で上記の分離溶媒系を使用してクロマトグラフィーを行い、オンラインで Q-TOF 複合型高性能質量分析計で分析することで、21 塩基から構成される RNA のセンスおよびアンチセンス鎖を分離と同時に、それぞれのヌクレオチドの質量値を求めることができるようになった。しかしその感度はプロテオミクス研究で得られるペプチドなどの検出感度に比べて 100 倍以上低く、今後その原因と考えられる多様な多価イオンやアダクトの抑制などによる高感度化が重要な課題と考えられた。

1-2) RNA 構造解析のための MS 技術の開発

本研究ではプロテオミクス解析のための LC-MS システムを RNA 研究に向けて高度化する目的で、フーリエ変換型超高分解能質量分析計 (FT/ITMS) を導入した。この装置を上記のナノフロー LC システムと連結することで、従来の分析では天然に存在する安定同位体の平均として得られていた RNA (21 塩基) の分子量が、単一同位体質量として精密に測定できるようになった。今後このナノ LC-FT/ITMS システムを基礎にして、RNA の塩基組成分析や MS/MS 法を利用した配列分析および転写後修飾によって導入された官能基の同定に向けた方法の開発が可能と考えられる。

1-3) 質量分析法による RNA 解析に関する基本的な考察

質量分析データからゲノムの配列情報を利用して特定の RNA を同定するための条件について考察した。大腸菌のゲノム配列を計算機上で仮想的に RNA に転写し、これを RNaseT1 で消化した断片を RNA セットとしてモデルを使用して特定の RNA を同定するための質量および部分配列データの必要条件を検討した。RNaseT1 消化物の中で、例えば計算分子量

4,000-5,000 の範囲には 38,629 種類の T1 消化断片 RNA が含まれた。このうち 2,432 種類は重複配列であり特定の RNA としては同定不能であった。残りの 36,197 種類の中で、ユニークな質量を持つ RNA は 14 種類だけであり、したがって高精度で質量を測定したとしても単一分子の質量だけでは同定は困難であった。一方、分子の質量に加えて、塩基配列を 2, 4, 6, 8, 10, 12 塩基決定した場合を想定すると、それぞれ 55,720, 6,820, 23,316, 33,318, 36,007 種の RNA 分子が同定可能であった。他の分子量範囲でも同様の結果が得られた。したがって、全ゲノム情報から特定の RNA を同定するためには分子の質量情報に加えて比較的多くの塩基配列情報を得ることが不可欠と考えられた。この問題を解決する 1 つの方向としては、生体に実在する RNA 分子をデータベース化し、これを第一次検索のためのソースとして利用することが考えられる。

2) RNA とプロテオームの機能的相関解析

低分子 RNA の多くは蛋白質との複合体として機能していることが知られている。東京農工大のグループが担当する本研究では、RNA-蛋白質複合体を構成する蛋白質成分のプロテオミクス技術での解析と、首都大グループが開発する RNA 解析技術を用いた RNA 成分の解析とを組み合わせることで、最終的には RNA/蛋白質複合体の全体像と機能との関連性を明らかにすることを目的としている。本年度は、既に当グループが確立した「アッセンブリースナップショット」解析法を基盤とし、各種のエピトープタグ融合 RNA 結合蛋白質をコードする発現プラスミドのヒト細胞への導入、発現後、抗エピトープ抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー法により相互作用する RNA-蛋白質複合体の回収を行った。この実験に際し、細胞観察のために顕微鏡及びデジタルカメラを導入した。本年度の研究では、まず首都大グループが開発する技術を評価するための標準品の調製も兼ねて、生体内での存在量が比較的多い RNA のスプライシングや移行、リボソーム合成などに関わる RNA 結合蛋白質を bait とし、snRNAs、snoRNAs、5S/5.8SrRNAs を含む蛋白質複合体の単離を試みた。RNA の存在についてはまず RNase 処理で解離する蛋白質の有無を指標にし、次に RNA を電気泳動後の各種染色法、アイソトープラベル法などで検出して調査した。一連の実験で RNA や蛋白質の量を微量体積で見積もるためナノドロップ吸光度計を導入し、単離した複合体の構成蛋白質の同定には極微量 nanoLC-MS/MS-ショットガン法を適用した。その結果、現在までに約 10 種類の RNA-蛋白質複合体を単離し、その蛋白質構成成分を 100 種以上同定した。また、RNA についてもその存在を確認すると共に、いくつかについてはその種類を特定した。しかし、単離した複合体には明らかに未知の RNA が含まれていると考えられるにもかかわらず、これらの同定はできなかった。そこで、特定の RNA を検出するために RT-PCR 法、Northern blot 法を導入し、また定量のための RT-リアルタイム PCR 法を実施する装置も導入した。今後、未知の RNA についてはランダムプライマーを用いた方法を適用し、それらの種類の特定と含量の見積もりを行う必要がある。また次年度以降は、開発を

進める質量分析技術の評価のため、既存の RNA 解析法との比較も必要である。一方、RNA 分析に関する文献調査などから、生体内に存在する低分子 RNA は、組織や細胞の種類や分化段階によって存在状態が大きく異なり、しかも単独の蛋白質ファミリーに結合する低分子 RNA だけでも 5 万種類以上存在するなど、当初の予想を超えて複雑な分子集団であることが判明してきた。一方、現状の LC-MS システムの性能を生体試料から調製した超微量の低分子 RNA の分析に適用するためには分離能や感度の大幅な改善が必要である。その検討を支援するためには、まず比較的大量に存在する既知の低分子 RNA を安定的に供給する体制を整え、次に存在量が少ない snRNA や snoRNAなどを供給する体制を構築することが必要である。以上、本年度の研究によって RNA とプロテオームの機能的相関解析を行うための課題が抽出され、今後の研究の方向性が明確になった。

3. 研究実施体制

(1) 「首都大学東京 磯辺」グループ

研究項目

- ・質量分析法を基礎とした RNA 同定技術の開発

(2) 「東京農工大学 高橋」グループ

研究項目

- ・RNA とプロテオームの機能的相関解析