

「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」
平成25年度採択研究代表者

H27 年度
実績報告書

磯辺 俊明

首都大学東京 大学院理工学研究科
特任教授

RNA 代謝異常症のリボヌクレオプロテオミクス解析と構造生命科学への展開

§ 1. 研究実施体制

(1)「磯辺」グループ

- ① 研究代表者: 磯辺 俊明 (首都大学東京大学院理工学研究科、特任教授)
- ② 研究項目
RNA 解析のための質量分析技術の高度化研究

(2)「高橋」グループ

- ① 主たる共同研究者: 高橋信弘 (東京農工大学大学院農学研究院、教授)
- ② 研究項目
リボヌクレオプロテオミクス研究基盤の構築

(3)「中山」グループ

- ① 主たる共同研究者: 中山 洋 (理化学研究所グローバル研究クラスター、専任研究員)
- ② 研究項目
RNA 解析ソフトウェアの高度化研究

§ 2. 研究実施の概要

本研究は、研究代表者らが開発を進めてきた我が国発の質量分析法を中心とする分析技術とゲノムデータベース検索エンジン Ariadne を組み込んだ世界で唯一の RNA 解析システムをさらに高度化し、プロテオミクスを基礎とした相互作用解析法と融合することで、RNA とタンパク質の相互作用によって形成される複合体の複雑なネットワークの実態とダイナミクスを定量的に解析できるリボヌクレオプロテオミクス研究の基盤作りを目指すものである。また、これらの技術を RNA 代謝異常症の原因遺伝子産物が形成する RNP 複合体の解析に適用することで、その細胞内での役割や病理との繋がりを解析することを目標とした。

平成 27 年度に実施したリボヌクレオプロテオミクス解析法に関する研究では、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や脊髄性筋萎縮症 (SMA) の原因遺伝子産物である TDP-43 や SMN に複数のタグを融合してそれぞれのタンパク質を含む RNP 複合体を生体試料から高純度に単離する新たな方法を適用することで、TDP-43 複合体中に今まで知られていなかった新規の ncRNA を、また SMN 複合体中に 5' 及び 3' 末端側に修飾を受けた複雑な U-snRNA 分子種を発見するとともに、その生理的意義に関する研究を開始した。また同様の研究によって、Chtop (chromatin target of PRMT1) ならびに TDP-43 が形成する RNP 複合体の機能に関する重要な知見を得て特許出願を行った。また従来から研究を進めているヒトリボソーム生合成過程のリボヌクレオプロテオミクス解析では、Nop52 タンパク質がリボソーム生合成の初期に形成される巨大な 90S 前駆体を小サブユニット前駆体である pre-40S と大サブユニット前駆体である pre-60S に分割する重要な過程に関わっていること⁶⁾、またヒト・リボソーム生合成の初期段階やマイクロ RNA の分解に関与する 5' → 3' エキソヌクレアーゼである XRN2 が細胞増殖制御因子として知られている CARF (Collaborator of ARF) により制御されていることを明らかにした⁷⁾。一方これらの課題に関連する国際共同研究として、トロント大学 J. Min 准教授との間で TDP43 ならびに SMN に関連する Gemin5 を含む RNP 複合体の結晶構造解析を、ラ・トローベ大学 R. J. Simpson 教授との間で分泌顆粒 (エクソソーム) の構成成分を大規模に解析する新たな研究を進めている。

一方、本研究の技術的基盤となる RNA 解析システムの高度化を目指す研究では、(1) 質量分析法のさらなる高性能化を目指したエレクトロスプレーイオン化補助デバイスの試作と性能評価、(2) RNA の細胞機能を調節する転写後修飾の網羅的な同定法と定量法の開発、ならびに (3) 本研究で開発した RNA 解析支援ソフトウェア (Ariadne) の高性能化を目指す研究開発を行った。この課題に関連する今年度の特筆できる成果は、上記 (2) と (3) の研究の進展によって、生体から分離した RNA 分子に存在する転写後修飾を安定同位体標識した合成 RNA を利用して網羅的に同定すると同時に定量できる革新的な方法 (Stable Isotope-labeled Ribonucleic Acid as Internal Standard: SILNAS 法と命名) を完成させたことである²⁾。本年度はこの方法によって分裂酵母のリボソームを構成する 4 種類の rRNA に存在するすべての修飾塩基を網羅した全化学構造を決定して rRNA における転写後修飾の意義を議論するとともに、特定の位置の RNA の修飾率が酵母の生育環境に依存して変化することを明らかにした。その後はさらにこの研究の延長として、有核細胞のモデルとして最も研究が進んでおり、多くの変異体を利用できる出芽酵母の rRNA、ならびに最も複雑な経路を経て合成され、多くの疾患の原因としても知られているヒトの rRNA の化学構造の全解析を進

めている。また本研究で開発中の RNA 質量分析法の有用性を示して国際的に汎用なシステムとする目的で、研究代表者らと同じ CREST 領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」(田中啓二研究統括)に所属する東京大学 清水敏之教授や英国ケンブリッジ大学 Tony Kouzarides 教授のグループなど、国内外の多くのグループと共同研究を進めている。