

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「代謝調節機構解析に基づく細胞機能
制御基盤技術」
研究課題「RNA 代謝解析のための質量分析プラットフォームの開発」

研究終了報告書

研究期間 平成18年10月～平成24年3月

研究代表者: 礒辺俊明
((公)首都大学東京 大学院理工学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、最新の質量分析法を基礎にした 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/タンパク質 (RNP) 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した。RNA 解析プラットフォームの開発は主に首都大学 (ハードウェア) と理化学研究所 (ソフトウェア) のグループが担当し、一方、東京農工大学のグループは、開発過程で試作したシステムを随時、実際の RNP 複合体の実体の解明や機能解析に適用してシステムの評価を行い、その結果をフィードバックすることでシステム全体の改良を進めた。これら 3 つのグループが相互に緊密に連携することにより、プロジェクト開始 3 年目にあたる平成 21 年度の段階で、1) LC からの独自のスプレー方式を開発しフェムトモルレベルの RNA 量での LC-MS 解析を可能とし、2) LC-MS 用の RNA 試料調製法としてゲル内酵素消化法を確立するとともに、3) ゲノムワイドな RNA 検索ソフト (Ariadne) を開発することで、生体から分離した RNA/タンパク質複合体などに含まれる RNA を非予見的に同定し、その転写後修飾も解析できる世界でも初めての RNA 解析のための質量分析システムの構築に成功した。この段階での RNA 解析の感度は、プロテオミクスの分野で現在汎用的に使われているシステムの感度とほぼ同等の実用的なレベルで、平成 21 年度に実施された中間評価では、システム開発としては当初の目的をほぼ達成したとする高い評価を得た。

中間評価後は、より一層の感度向上と RNA のショットガン解析を可能にする全自動 RNA 質量分析システムの構築を目指し、RNP 複合体などに含まれる複数の RNA を、混合物のまま直接解析できる LC-LC-MS/MS システム開発を行った。同時に、ここで得られた RNA のタンデム質量分析データからゲノム情報を検索して特定の RNA を同定するソフトウェア (Ariadne) の改良と高性能化、ならびに同定結果の確認と転写後修飾の検出を容易にするための周辺ソフトウェアの整備も行った。現在のシステムは、例えば酵母細胞から精製した snoRNP 複合体に含まれる 29 種類の既知 snoRNA の大部分 (27 種類) を、今まで知られていなかった新規の成分とともに自動的に同定できるほどの性能に至っている。以上の研究で開発したシステムは、生体に存在する機能性 RNP 複合体に含まれる RNA をタンパク質と同等の感度で、予測や予備的な知識なしにゲノムワイドな検索により同定し、同時にメチル化などの転写後修飾を含む化学構造を精密に解析できる革新的な生命科学の方法を提供することとなった。また、この研究の過程で開発した LC-MS インターフェースである「ナノエレクトロスプレーイオン化方法及び装置」ならびに世界で唯一の RNA 検索エンジン Ariadne に関する「リボ核酸同定装置、リボ核酸同定方法、プログラムおよびリボ核酸同定システム」は特許出願し、前者は既に米国の Intellectual Ventures 社と独占ライセンス契約を締結し、同社を通じて米国へ PCT 出願している。また後者については、JST を通じて PCT 出願を行っており、現在、国内の IT 関連企業との間で、商品化に向けた交渉が進んでいる。

一方、以上の方法を生命科学研究に適用する実際の RNP 複合体解析では、酵母などのモデル生物だけでなく、膨大なゲノム情報をもつヒトなどの高等生物細胞から親和性タグなどを利用して分離精製したスプライセオソームやリボソーム先駆体などの RNP 複合体に含まれる U-snRNA や snoRNA などの主要な低分子 RNA を直接 LC-MS 解析してゲノム情報に帰属して同定し、その塩基配列やメチル化などの転写後修飾を解析することが可能になっている。その結果、スプライセオソームやリボソームなどの RNP 複合体の構築過程や作用機構などについて新たな知見が得られている。こうした研究の中で最も特筆できる成果の 1 つは、このシステムを利用することで、ヒトの難病である神経変性疾患の原因遺伝子産物の 1 つとされている RNA 結合タンパク質が標的とする RNA を非予見的に同定できたことがあげられる。この結果は従来の知見からは極めて意外性の高いものであり、この難治性疾患の診断や治療薬開発のためのモニター法として特許出願を行った。現在知られているヒトの遺伝性神経疾患の多くが RNA の代謝異常に起因することを考慮すると、本研究で開発したシステムが、今後これらの疾患の発症機序の解析や治療法

の開発に寄与することが期待される。すなわち本研究で開発したRNAの質量分析法は、RNAの合成と代謝ならびにその調節機構、あるいはRNAとタンパク質の相互作用に起因する生命現象とその異常を解析するリボヌクレオプロテオミクス研究のための新しいプラットフォームと考えられる。

本研究の学術的な活動としては、LC-MS法を基盤としたRNA/タンパク質複合体の動態解析について、米国Wiley社からの依頼により、単行本(Proteomic Biology using LC-MS/高橋・磯辺著)を出版した。また分担者の高橋は、質量分析法を含む分光学分野で最も権威のある(Impact Factor 10)「Mass Spectrometry Reviews」誌から、RNAとタンパク質のLC-MS法に関する特集「The study of ribonucleoproteomics with mass spectrometry-based technology」をシリーズで編纂するGuest Editorとして招待され、既に2回の特集を組んでいる。また国内では、実験医学(羊土社)で「RNAの時空間的動態をみる:リボヌクレオプロテオミクスによる細胞機能の解明からRNA医薬まで」と称する特集号を発刊した(磯辺・高橋)。これらの事実は、日本発のRNAの質量分析法が国内外で広く通用する技術として認知されつつあることの証左と考えられる。また、本研究の成果は、原著論文としての発表とともに、理化学研究所のサーバーを通じてAriadneを公開し(中山)、あるいは磯辺を会頭として開催された2007年度日本プロテオーム学会(磯辺・高橋)、2010年度農芸化学会年会(高橋)、2011年度日本プロテオーム学会(磯辺・高橋)などで、RNAとプロテオームの相互作用が織りなす細胞機能に焦点を当てたシンポジウムなどを通じて広報し、その技術の普及を図った。

(2) 顕著な成果

1. Nakayama, H. Akiyama, M. Taoka, M. Yamauchi, Y. Nobe, Y. Ishikawa, H. Takahashi, N. and Isobe, T. “Ariadne: a database search engine for identification and chemical analysis of RNA using tandem mass spectrometry data.” *Nucleic Acids Res.* **37**, e47 (2009) DOI: 10.1093/nar/gkp099)

概要: リボヌクレアーゼで断片化したRNAのタンデム質量分析データからゲノム情報を利用して試料中のRNAを同定し、同時に転写後修飾やプロセッシングなどの代謝過程の実態を解析できる世界で初めてのゲノム検索エンジンに関する論文。プロジェクト全体の基礎となった。

2. Taoka, M. Ikumi, M. Nakayama, H. Masaki, S. Matsuda, R. Nobe, Y. Yamauchi, Y. Takeda, J. Takahashi, N. and Isobe, T. “In gel digestion for mass spectrometric identification of RNA from fluorescently stained polyacrylamide gels.” *Anal. Chem.* **82**, 7795-7803 (2010) DOI. 10.1021/ac101623j

概要: 生体から親和性タグなどを利用して調製したフェムトモル量のRNA試料を電気泳動法で分離し、蛍光染色法で検出した後に質量分析法で解析するための前処理法に関する論文。プロジェクトの技術基盤となっただけでなく、微量のRNAを化学物質として取り扱うことができることを示すことができた。

3. Taoka, M. Yamauchi, Y. Nobe, Y. Masaki, S. Nakayama, H. Ishikawa, H. Takahashi, N. and Isobe, T. “An analytical platform for mass spectrometry-based identification and chemical analysis of RNA in ribonucleoprotein complexes.” *Nucleic Acids Res.* **37**, e140 (2009) DOI: 10.1093/nar/gkp732

概要: 最新の液体クロマトグラフィー/質量分析法とゲノム検索エンジン「Ariadne」を利用して生体から分離したRNAをゲノムワイドに同定し、同時に転写後修飾などの代謝過程の実態を解析できることを実証することで、プロジェクトの基本的な概念を実現した論文。プロジェクト後期に進展したRNAの代謝異常に起因するヒトの神経変性疾患の発症機構に関する研究(高橋信弘ら、特許出願済み)の基礎となった。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

本研究が開始された当初は、いわゆる非コード RNA(ncRNA)がゲノムの大部分の領域から転写されることが見いだされ、イントロン RNA やリボザイムなどの RNA プロセッシングに関わる RNA、タンパク質輸送に関わる signal recognition particle (SRP) などの僅かな ncRNA の機能が明らかになりつつある時代であり、その意味では ncRNA の研究が緒に着いたばかりであった。その後新たな機能性 RNA の分離と同定、機能解析が生命科学研究の重要な課題となり、ncRNA 研究は急激な展開を迎えることとなったが、RNA 研究者の多くは RNA だけを研究の対象とし、しかも技術的には逆転写酵素によって変換した DNA の解析によって間接的に RNA の塩基配列を決定するなどの方法論が世界の RNA 研究の主流であった。本研究の構想は、ncRNA はタンパク質との複合体あるいは相互作用を通じて機能し、さらには生合成後のプロセッシングや化学的な転写後修飾によって、その機能を発現あるいは調節されているとの認識のもとで、生体内で形成されるタンパク質と RNA の複合体を直接単離し、タンパク質と同等のレベルで RNA を直接同定して転写後修飾を同時に解析できる技術確立することを目指して企画された。この技術を開発することで、生体内で RNA とタンパク質が織りなすネットワークを介した新たな次元の細胞機能解析が可能となり、従来の細胞生物学あるいは分子生物学の方法と相まって新たな生命科学研究の発展が期待できると考えた。その後、本研究の過程では、いわゆる次世代ゲノムシーケンサーが実用化され、さらには RNA の直接解析を可能とする装置が開発されて超高速、高感度で RNA の塩基配列を決定することができるようになったが、これらの進歩はプロセッシングや転写後修飾を含む複雑な RNA の代謝解析の重要性を一層際立たせることとなり、本研究が目指す RNA の直接解析法の開発の重要性をより鮮明にしたと言える。すなわち本研究は、従来の分子生物学的な方法の欠点を補い、ある場面では従来の方法を凌駕する技術となることが期待されることとなった。

本研究では、大きく分けて二つの狙いをもって研究開発を進めることとした。第一の狙いは、ヒトを始めとする高等生物の細胞に存在する低分子量 RNA (およそ 300nt 以下を目安とした) を網羅的に同定して精密な化学構造を解析するために、急速な技術革新によってプロテオミクスをはじめとする生命科学研究に不可欠な方法となった質量分析法を中心とした RNA 解析プラットフォームを開発することであった。具体的には、主に高感度のナノフロー高速液体クロマトグラフィー (LC) と最新の高性能質量分析計 (MS) を連結した汎用型のシステムを構築してタンデム質量分析法 (MS/MS 法) による RNA の構造解析を可能とし、その情報からゲノム情報を利用して試料中に含まれる RNA を同定すると同時に転写後修飾などによって生じる化学修飾基を高速かつ高感度で解析するためのハードならびにソフト技術を開発することであった。第二の狙いは、本研究で開発する RNA 解析システムの性能を開発段階に応じて評価するとともに、この方法をプロテオミクスの技術を組み合わせることで、RNP 複合体の構成と機能の関連を明らかにする「リボヌクレオプロテオミクス」の新技术を確立することであった。具体的には、低分子 RNA を結合することが知られているタンパク質、例えばリボソーム合成や RNA スプライシングに関わるタンパク質をベイトとして回収した RNA 試料をシステムの開発段階に応じて安定的に供給し、同時にリバースタギングなどの最新のプロテオミクス技術を適用することで RNA/タンパク質相互作用を連続的に解析し、最終的には高等生物の細胞に存在する RNA とタンパク質の機能ネットワークの構築を行う方法論と技術を開発することとした。

本研究では、以上の課題をそれぞれ 3 つのチームが役割を分担して研究を進めることとした。すなわち、首都大学グループは主として LC-MS システムのハードウェア開発、理化学研究所グループはソフトウェア開発を担当し、東京農工大学グループは主として上記の第二の狙いに相当する「リボヌクレオプロテオミクス」技術の開発を担当することとした。また、研究を進める内容は、システム開発に関しては「RNA の LC 分離技術の開発」、「質量分析技術の開発」、「RNA カタログの作成」、「データ処理技術の開発」の各項目、リボヌクレ

オプロテオミクス技術開発に関しては「RNA 試料調製法の開発」、「RNA/タンパク質複合体の解析」、「RNA/タンパク質ネットワークマップの作成」の項目に分けて進めることとした。それぞれのグループの研究進捗状況を全員が共有し合うことを目的として 3 グループは 2 ヶ月ごとに一堂に会して研究会議を開催すること、また電子メールなどを利用して 3 つのグループ全員が最新のデータを常に共有し合うことで、研究項目の優先順位を適宜調整するなど、緊密な連携の下で研究推進の効率化を踏むことで研究開発の速度を最速にする努力を行った。その結果、当初目標とした RNA 解析のための LC-MS システムはハードとソフトを含めて研究開始から中間評価までの約 3 年間でほぼ完成し、その後の約 2 年間はシステムの高性能化と自動化、ゲノム検索エンジン (Ariadne) の高性能化と周辺ソフトウェアの整備、ならびにこのシステムを利用した「リボヌクレオプロテオミクス」研究に集中することで、ヒトの難病である神経変性疾患の病因に関する研究成果 (後述) などをあげることができた。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

上記(1)でも述べたように、当初の研究構想では、最終年度の段階で生体試料から調製した RNA/タンパク質複合体中の RNA 成分を LC-MS 分析によって同定し転写後修飾を解析できるシステムの完成を目指していたが、LC-MS システム開発に関する 3 グループの過去の経験や緊密な連携によって、この目標は中間評価の段階でほぼ達成することができた。これに伴って、計画を前倒しにするとともに、以下のような計画あるいは目標の修正および追加を行った。まず、当初の計画では、ncRNA のデータベースが整備されていなかったことから、既存の ncRNA のデータベースを統合し、さらに文献的に報告された ncRNA 情報を収集して追加することで、MS 及び MS/MS データの検索対象となる独自の ncRNA データベースを構築する予定であった。これについては「RNA カタログの作成」の研究項目で実施したが、中間評価の行われた平成 21 年度の段階でヒトのゲノムを含むゲノム情報の全体を検索対象とすることができるソフトウェア Ariadne の開発に成功したために以降の研究を中止した。その一方、このソフトをより汎用的にするため計算機の増強とアルゴリズムの改良を行い、また一般に普及させるため、「ユーザーフレンドリー」なインターフェースを持つ使いやすいソフトへと改良し、その企業化に向けた開発を行うための研究を「データ処理技術の開発」項目に追加した。また、LC 部分の精密化や RNA 断片のエレクトロスプレーイオン化を補助する LC-MS インターフェースの設計などにより、中間評価の段階で RNP 複合体を構成する RNA をタンパク質とほぼ同等のフェムトモルレベルの感度で解析できるようになったが、中間評価で本解析法のブラッシュアップ、更なる高感度化、自動化と高精度化を強力に進めることを助言されたため、LC-MS による RNA の解析についても、汎用性を高め企業化に向けた稼働条件のマニュアル化を進めると同時に RNA の分離、酵素消化、LC-MS 解析の一連の操作の自動化のために、「RNA の LC 分離技術の開発」の研究項目の延長を踏んだ。さらに中間評価の場では、今後の研究の進め方として、1) 必ずしも事前の研究計画にとらわれず、本研究によって構築した解析システムを応用して RNA のサイエンスを進めること、2) 面白い解析系を持つ多数の内外の研究者と共同研究を行って、インパクトのある文脈での技術の検証を進めることを助言されたため、「RNA/タンパク質複合体解析」の研究項目についても研究期間を延長し、共同研究を積極的に進めることで解析例を増加させることとした。そこで、特に RNA の代謝異常を起こす遺伝性の神経疾患の原因遺伝子産物が形成する RNA/タンパク質複合体の解析への研究の展開を踏んだ。その中で、ヒトの難病として知られている疾病の一つの原因遺伝子産物とされる RNA 結合タンパク質が標的とする RNA 成分を同定することに成功したので、この結果を分子生物学的な方法などで確認するとともに、この RNA-タンパク質相互作用の生理的な意味や病態との関わりに関する研究を新たな目標とした。すなわち、最終年度は実際の生命科学研究で大きなインパクトのある研究成果を得ることで、本研究で開発した RNA 解析システムの有効性を示し、より多くの研究者や技術者への普及の弾みとなると考えて、この研究に注力することとした。

§3 研究実施体制

(1)「磯辺」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
磯辺 俊明	首都大学東京	教授	H18. 10～
梶 裕之	首都大学東京	客員准教授	H18. 10～
岡田 聖裕	首都大学東京	准教授	H21. 4～
田岡 万悟	首都大学東京	助教	H18. 10～
山内 芳雄	首都大学東京	客員研究員	H18. 10～
延 優子	首都大学東京	特任研究員	H19. 5～
中庭 真基子	首都大学東京	特任研究員	H19. 7～H20. 2
正木 正平	首都大学東京	特任研究員	H20. 4～H22. 8
竹田 純	首都大学東京	特任研究員	H20. 4～H22. 6
垣内 一恵	首都大学東京	大学院博士後期課程	H19. 4～H20. 3
谷 知美	首都大学東京	大学院博士前期課程	H19. 4～H20. 3
井汲 真希	首都大学東京	大学院博士前期課程	H20. 4～H21. 3
松久 雄広	首都大学東京	大学院博士前期課程	H20. 4～H21. 3
松田 亮蔵	首都大学東京	大学院博士前期課程	H20. 4～H21. 3
浅川 陽平	首都大学東京	大学院博士前期課程	H22. 4～H23. 3
安達 公祐	首都大学東京	大学院博士前期課程	H22. 4～H23. 3
田中 誠	首都大学東京	大学院博士前期課程	H22. 4～H23. 3
恋川 拓己	首都大学東京	大学院博士前期課程	H23. 4～
志村 崇史	首都大学東京	大学院博士前期課程	H23. 4～
斎藤裕一朗	首都大学東京	大学院博士前期課程	H23. 4～

② 研究項目

質量分析を基礎にした RNA 同定技術ならびに RNA 解析のための MS 技術の開発

(2)「中山」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
中山 洋	(独) 理化学研究所	専任研究員	H18. 10～
小池 仁美	(独) 理化学研究所	テクニカルスタッフ II	H19. 12～
秋山 美沙紀	(独) 理化学研究所	テクニカルスタッフ I	H20. 4～

② 研究項目

RNA 質量分析データの処理と解析技術の開発

(3)「高橋」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
高橋 信弘	東京農工大学	教授	H18. 10～

千葉 一裕	東京農工大学	教授	H18. 10～
三浦 豊	東京農工大学	助教授	H18. 10～
辻村 輝子	東京農工大学	研究補助員	H19. 3
石川 英明	東京農工大学	特任助教	H23. 7～
石川 英明	東京農工大学	博士研究員	H19. 5～H23. 6
石川 英明	東京農工大学	博士後期学生	H19. 4
泉川 桂一	東京農工大学	特任助教	H23. 7～
泉川 桂一	東京農工大学	博士研究員	H20. 10～H23. 6
泉川 桂一	東京農工大学	博士後期学生	H20. 9
逸見 巖	東京農工大学	博士後期学生	H19. 3
吉川 治孝	東京農工大学	特別研究員	H23. 10～
吉川 治孝	東京農工大学	博士後期学生	H18. 11～H23. 9
照喜名 悟朗	東京農工大学	博士後期学生	H19. 2～H23. 3
佐藤 慈子	東京農工大学	博士後期学生/RA	H20. 4～H23. 3
宮澤 直樹	東京農工大学	博士後期学生/RA	H20. 4～

②研究項目

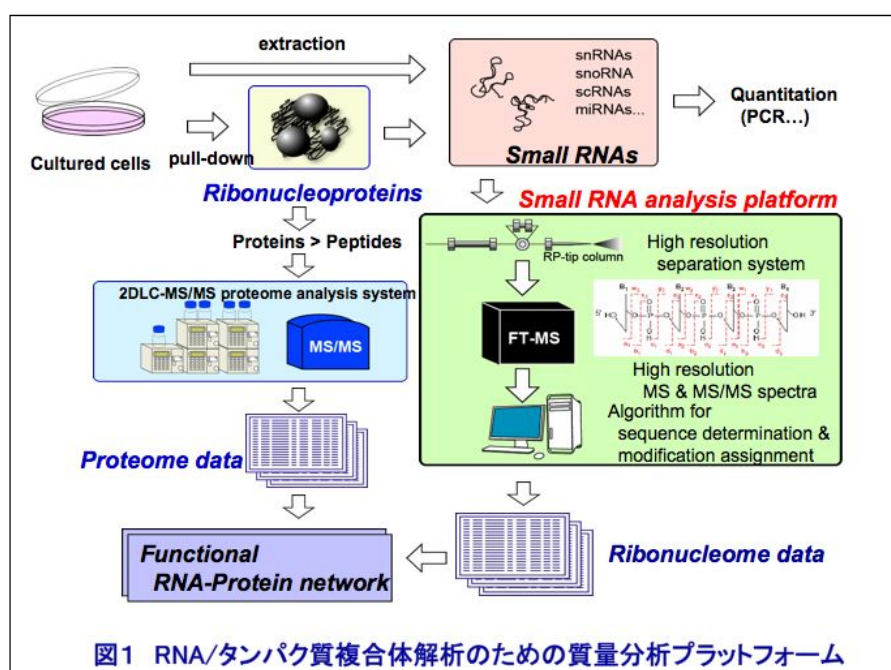
RNA とプロテオームの機能的相関解析

§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 質量分析を基礎にした RNA 同定技術ならびに RNA 解析のための MS 技術の開発(首都大学東京 磯辺グループ)

(1)研究実施内容及び成果

本研究の目標は、生体試料に含まれる低分子 RNA とその代謝物を直接 LC-MS 法で分析することで、それぞれの RNA をゲノム情報に帰属して同定し、転写後修飾も含めた化学構造を明らかにするための RNA 解析のためのプラットフォームを開発することである。首都大学東京・磯辺グループは、JST などからの外部資金を活用して長年にわたって蓄積してきたナノ LC-MS ショットガン法を中心としたプロテオミクスの技術開発の経験を基盤として、(1) 生体から分離した RNA の RNase 消化物を高感度で効率的に分離して高精度で質量分析できる汎用の LC-MS システムを構築し、(2) 共同研究機関である理化学研究所(中山グループ)が開発するゲノムデータベース検索ソフトウェアを含む RNA の質量分析情報処理技術を組み込むことで、生体試料に含まれる RNA を同定し、同時に転写後修飾を含む化学構造の解析ができる革新的な LC-MS システムの構築を目指した。また(3) 東京農工大学(高橋グループ)が開発する RNA/タンパク質複合体の精製法や、RNA の分離・前処理法などの技術を統合することで、最終的には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標として研究を行った(図1)。



[LC-MS システムの構築]

本研究では、上記の目的を達成するための基本的な戦略として、プロテオミクス研究のために開発した高性能ショットガン解析システムをRNA 分析のために最適化することで、国際的にも例のない先駆的な「RNA ショットガン解析システム」を構築することとした(図2)。

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った。タンパク質やペプチドでは、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^+ などが高濃度で存在するが、これらのイオンは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、合成あるいは生体から分離した複数の低分子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検討した。すなわち各種の逆相カラムと分離条件の組み合わせについて検討し、リン酸基に富む親水性化合物であるRNAに対して比較的保持能力が高いシリカ系C-30逆相系充填剤と塩基性条件下でRNAとイオンペアを形成する揮発性の高い分離媒体の共存イオンを選定することで分離を最適化し、数百塩基からなる低分子RNAや、そのRNase消化物を効率よく分離できるナノLC法を開発した。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 μm 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(トリエチルアミン酢酸/メタノール緩衝液)を使用してクロマトグラフィーを行い、オンラインでOrbitrap高性能質量分析計で分析することで、RNase T1消化などで得られたRNA断片をフェムトモルレベルの感度で効率よく分離して質量分析することができるようになった(図3)。

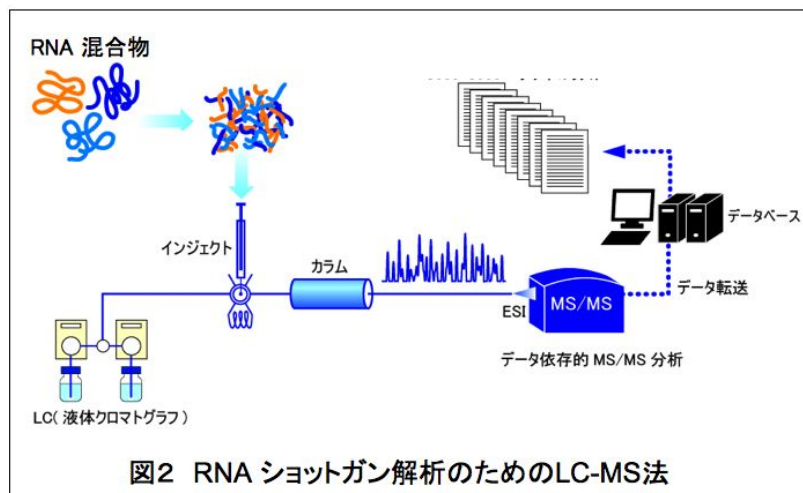


図2 RNA ショットガン解析のためのLC-MS法

一方、この開発段階での問題点の1つは、RNAがリン酸基に富む親水性の高い高分子であり、逆相クロマトグラフィーで溶出する低濃度の有機溶媒条件では、H₂Oに由来する表面張力などの影響でエレクトロスプレーイオン化が極めて不安定であることであった。そこで、RNase 消化で生じる RNA 断片の分離に使用する 内径 125 μm のエレクトロスプレー (ESI) カラムを装着したナノ LC から 100 nL/分の超微流速で送液されてくる微量の RNA 溶出液にオンラインで連続的にアセトニトリルを添加することで有機溶媒濃度を増加し、LC から溶出した RNA 成分を「ネガティブモード」で安定的にイオン化するための補助スプレー装置を設計、試作した。

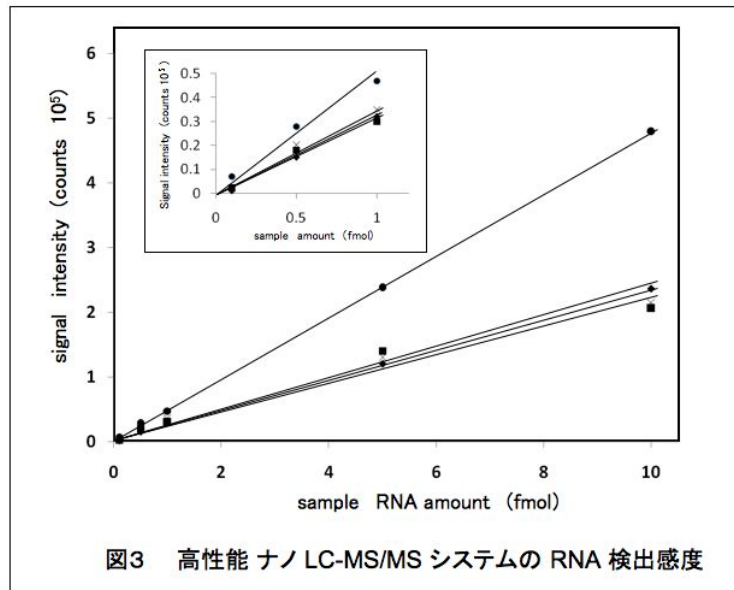


図3 高性能 ナノ LC-MS/MS システムの RNA 検出感度

これらの研究で開発した LC システムを質量精度が極めて高い最新の高性能質量分析計 (Orbitrap-MS, Thermo Fisher Scientific 社製) と連結することで、RNase T1 消化などで得られた RNA 断片をフェモトモルレベルの感度で効率よく分離し、その精密質量やタンデム質量分析法 (MS/MS 法) で得られた情報から転写後修飾を含む化学構造を詳細に解析できるようになった。さらに、この LC-MS システムに、理化学研究所で開発したゲノムデータベース検索エンジン (Ariadne と命名: 後述) を組み込んだデータ解析システムを装着することで、数百塩基程度の RNA やその RNase 消化物を効率良く分離して質量分析 (MS) およびタンデム質量分析 (MS/MS 分析) し、さらにはゲノム情報を検索して試料中に含まれる RNA 成分を同定できる国際的にも極めて独自性の高いナノ LC-MS プロトタイプ装置を試作することができた。

次に、この装置の評価と実用化に向けた検討を行った。試作したシステムは、化学合成した siRNA や無細胞合成系で合成した mRNA など RNase T1 で消化して得られたオリゴリボヌクレオチド混合物の精密質量分析や塩基組成の分析に有効であった。また、このシステムを利用することで、酵母細胞から調製した tRNA や、東京農工大学から供給されたヒト培養細胞由来のリボソーム先駆体などに含まれる rRNA や snoRNA などの主要な RNA 成分を RNase T1 で断片化し、それらの LC-MS/MS 解析で得られた MS スペクトルを RNA データベースに対して検索することで、個々の RNA が同定できることがわかった。ただし、このシステムによる RNA の分析感度は、同様のシ

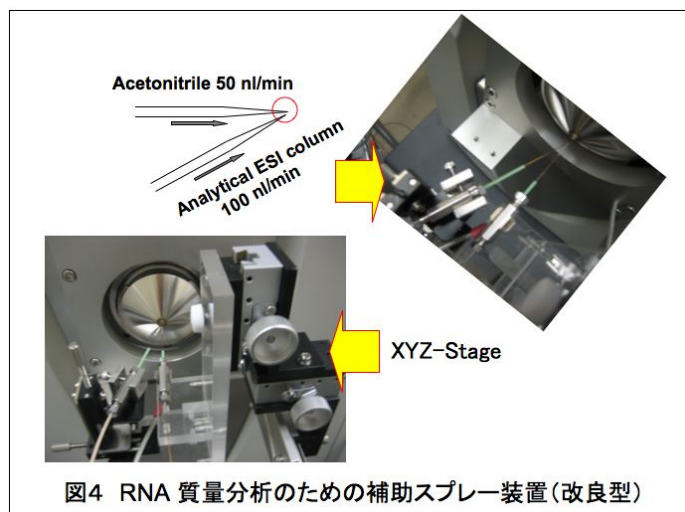


図4 RNA 質量分析のための補助スプレー装置(改良型)

テムによってタンパク質を分析した時の感度に比べて約 1/10 程度であった。そこで、このシステムを高感度化するための改良を行った。すなわち RNA 試料の RNase 消化物を ESI カラムに導入するために使用する「トラップカラム」を微小化、精密化し、さらにナノ LC から溶出したオリゴヌクレオチド断片を効率よくイオン化するための補助スプレー装置をより精密に改良してシステムに装着した (図 4, 特願 2009-137085)。

[RNA のゲル内酵素消化法の検討]

生体あるいは培養細胞から分離した複雑な RNA 試料に含まれる RNA 成分を効率よく LC-MS システムで同定し、その化学構造を解析する目的で、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を利用した RNA 成分の分離と、分離した RNA のゲル内消化法の条件などを詳細に検討した (文献 18、図 5)。

この方法では、RNA 混合物をゲル電気泳動して SYBR Gold を用いる蛍光染色法で検出後 (Step 1)、目的とするゲルバンドを切り抜いて、バンドに含まれる RNA を RNase T1 などの RNase で切断し (Step 2)、ゲルから RNA 断片を抽出 (Step 3)、RNA を含む溶液からゲルマトリックスを完全に除去した後に (Step 4) LC-MS で解析する。この操作の「Step 1」についてはゲルバンドから無機塩を取り除く洗浄方法と抽出するゲルの形状を、「Step 2」については消化酵素の濃度と反応時間を、「Step 3」については抽出溶媒と時間を、「Step 4」についてはゲルマトリックスを取り除く濾過膜を、それぞれ検討して最適化した。その結果、フェムトモルレベルの RNA 標品を含んだゲルバンドから、フラグメント化した RNA を 30%~100% の回収率で回収して LC-MS 法で同定することに成功した。また、標品に含まれる RNA 分子に存在するメチル化や水素付加などの修飾や、tRNA 分子に付加したワイプトシンなどの複雑な修飾基を比較的容易に検出して解析できるようになった。

この方法を実際にマウス ES 細胞の低分子 RNA 画分の解析に適用したところ、この標品に含まれる 11 種類の RNA を同定するとともに、これらの RNA 分子を構成する全 1938 ヌクレオチドの 66.0% にあたる 1279 ヌクレオチド (30 の修飾ヌクレオチド (12 の部分修飾) と 1261 の非修飾ヌクレオチド) の配列を決定することができた。この方法で決定した修飾ヌクレオチドには RNaseP RNA や U6 snRNA、7SL RNA の新規なメチル化サイトが含まれていた。また、これとは別の実験では、親和性タグを付加した Brr2 タンパク質をベイトとして酵母細胞から分離精製したスプライセオソーム先駆体の構成 RNA 成分として U4 や U5S、U5L、U6 snRNA (40~300fmol) などを同定するとともに、これらの UsnRNA の 3' 末端が構造的に不均一であることを見出すことができた (投稿準備中)。

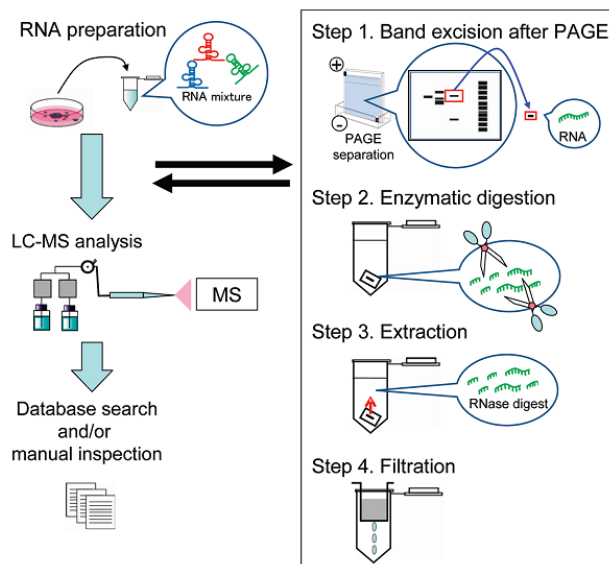


図 5. RNA のゲル内酵素消化法

以上で述べたハードウェアならびに前処理法を含むソフト技術の改良あるいは最適化によって、最終的には従来に比べて RNA の分析感度が約 10 倍向上し、培養細胞など

[RNA LC-MS システムの耐久性の改良]

本研究では、RNA の質量分析法を一般的な技術として確立するため、試作した LC-MS システムを常時稼働させて耐久性試験を行った。親水性の RNA 断片を安定してエレクトロスプレーイオン化できる補助スプレー装置(特願 2009-137085)の開発などにより、システムを構成するナノ LC-Orbitrap 質量分析装置は極めて安定に使用できるようになったが、試料の濃縮・脱塩のための「トラップカラム」と oligonucleotide 分離用の「ESI カラム」は定期的な交換が必要である。長期間の試験によって、超微量 RNA の LC-MS 分析では、LC 装置に組み込まれた送液系のステンレス部品から溶出する微量の鉄イオンが RNA のリン酸基と結合して分析を妨害し、カラムの耐久性にも悪影響を与えていることがわかった。そこで、システムに組み込んだ送液ポンプを従来型から金属部品を使用していない特殊なポンプ(ステンレス部品を PEEK に置換したポンプ)に置換した。また「トラップカラム」には、ステンレス製の焼結フィルターを使用しないモノリス型カラム(MonoCap-GL, 0,2 mmID x 40 mL)を採用することとした。これらの改良によって、システムをより長期間安定して使用できるようになった。現在のシステムは、分離に使用する ESI チップカラムを定期的(約 1 か月)に交換するだけで、数か月～半年程度は安定して連続的に使用できる。

[自動化 LC-LC-MS/MS システムの構築]

本研究と同様の装置類から構成されたプロテオミクス研究のための LC-MS ショットガンシステムでは、タンパク質混合物のプロテアーゼ消化で生じた複雑なペプチド混合物を直接解析することで、組織や細胞の粗抽出液に存在する数千種類ものタンパク質や、細胞から分離したタンパク質複合体を構成する数百種類のタンパク質を容易に同定できる。また、これらの複合体に含まれるタンパク質間の相互作用を詳細に解析することで、細胞機能を調節する機構に関する新たな発見が期待できる。プロテオミクスでは一般的なこうした技術に比べて RNA の LC-MS 法の開発が困難である理由の 1 つは、RNA を構成するヌクレオチドが 4 種類のみで、その物理化学的性質も類似しているため RNase 消化で生じるオリゴヌクレオチド分子の化学的多様性が乏しく、タンパク質の消化で生じるペプチドに比べて複雑で精密な LC 分離が困難なことである。そこで、試料中の RNA をまずそのままの状態 LC 分離し、一度分画したのちに RNase で断片化、生成したオリゴヌクレチドをさらに LC で分離しながらオンラインで MS/MS 分析して同定する多次元 LC-MS/MS 法開発を行った。これらの技術開発は、RNA のショットガン解析のための一歩であるだけでなく、試料の分離から LC-MS による分析までの行程を自動化することで、マニュアル操作による試料の損失や環境からの汚染を排除し、細胞などから調製した微量 RNA 成分をさらに高感度で効率よく分析するための汎用的なシステムの構築のためにも重要と考えた。

最初の試みとしては、1 段目の RNA 分離用 LC と 2 段目のオリゴヌクレオチド分離用 LC のインターフェースとして簡易型の溶液操作ロボットを介在させることで RNA の分取と RNase 消化、2 段目 LC への試料の注入を行うためのシステムを設計して試作した(図 8)。このシステムでは、試料に含まれる RNA を Develosil-C30 カラム(2mmID x 100mmL)を装着した 1 段目の LC で分離して一定時間ごとに冷却した試験管に分取し、自動的に RNase T1 を加えて 37°C で 60 分間保温して消化したのち、分画ごとに繰り返し 2 段目の LC に注入して試料中の RNA 断片を MS/MS 分析するよう設計した。この自動化 LC-LC-MS/MS システムを培養細胞から調製した低分子 RNA 混合物に適用したところ、この試料に含まれる U snRNA や 7SL RNA などの主要な RNA 成分が自動的に分離、同定できることがわかった。

そこで、この自動化システムを実用化するための技術開発を行った。具体的には、プロトタイプシステムで使用していた RNA 分離用カラム(Develosil-C30;2mmID x 100mmL)

を多孔性ポリスチレンカラム (RLRP-300 ; 2mmID x 100mmL) に交換し、RNase 消化で生じたオリゴヌクレオチドを ESI カラムに導入するための前処理用「トラップカラム」に、従来型のステンレス製焼結フィルターを使用しないモノリス型カラム (MonoCap-GL, 0,2 mmID x 40 mmL) を採用した。またシステム全体の動作を制御するタイムプログラムと LC の溶離条件を再検討することで、従来は難しかった比較的高分子の RNA (-500 nts) も分析できるようになり、システムの耐久性も大幅に改善することができた。現在稼働しているシステムは、半年間にわたる数百回の耐久性試験を兼ねた分析に対しても安定した性能を保持している。また試料の分離から LC-MS による分析までの行程を自動化したことで、マニュアル操作による試料の損失や環境からの汚染を排除し、細胞などから調製した微量 RNA 成分をさらに高感度で効率よく分析できるようになった。実際に、この自動化 LC-LC-MS/MS システムを出芽酵母細胞から精製した boxH/ACA 型 snoRNP 複合体の RNA 成分の解析に適用したところ、この試料に含まれる 29 種類の既知 boxH/ACA 型 snoRNA の 27 種類とともに、新規 box H/ACA 型 snoRNA を 1 種類同定することができた (図 9)。また、この分析で得られたスペクトルの解析から、snoRNA の 5' 末端構造に対する新たな修飾を 17 種類、3' 末端構造に対する新たな修飾を 21 種類発見することができた (発表準備中)。また、この自動化システムの有効性を検証する目的で、この方法を非コード低分子 RNA に存在が予想される新たなキャップ構造の検索に適用して新規の修飾を数種類検出することができた (理研 P. Carninci 博士との共同研究)。

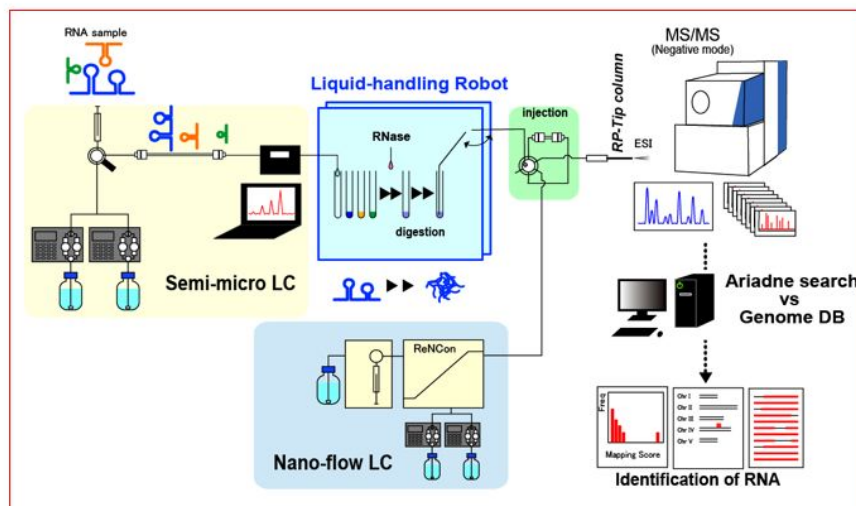


図 8 RNA 解析のための全自動 LC-LC-MS/MS システム

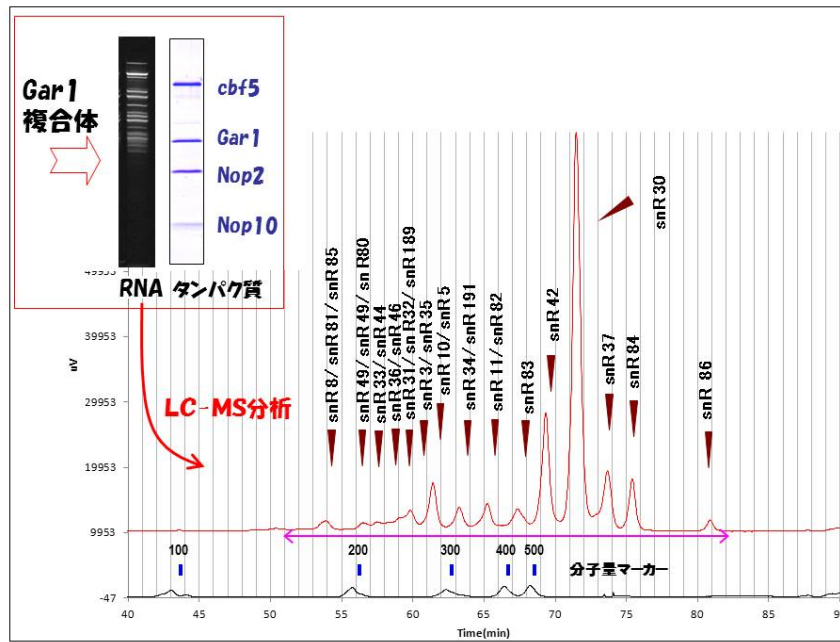


図 9. LC-LC-MS/MS システムによる出芽酵母 Gar-1 結合 snoRNA の解析

[LC-LC-MS/MS 法の適用：分裂酵母 Box H/ACA 型 snoRNP 構成 RNA の解析]

核小体に含まれる Box H/ACA 型核小体低分子 (sno) RNA はリボソーム RNA の成熟に関与する RNA であり、リボソーム RNA 前駆体の成熟の過程でウリジン残基の擬ウリジン化をガイドする役割を持っている。この snoRNA は酵母から動植物に至るすべての真核生物と古細菌に見出されており、分裂酵母の場合には、Gar1 と呼ばれる擬ウリジン化を触媒する酵素を含む 4 種類のタンパク質と 1 種類の snoRNA を含むヘテロ 5 量体分子である BoxH/ACA 型 snoRNP を形成する。その snoRNA サブユニットは RNA の擬ウリジン化サイトに応じて 20 種類以上の異なる分子種があることが知られているが、リボソーム RNA の擬ウリジン残基は少なくとも 30 あることから、より多くの BoxH/ACA 型 snoRNA が存在するものと推定されていた。そこで、本研究では、分裂酵母の Box H/ACA 型 snoRNP に含まれる低分子 RNA をゲル内消化法と LC-MS を組み合わせた方法、ならびに全自動 LC-LC-MS/MS システムを利用した方法によって網羅的に同定し、一部の snoRNA については 5' および 3' 末端の構造を決定した。

分裂酵母の Box H/ACA 型 snoRNP は、複合体の構成因子 Gar1 に親和性タグを付加した細胞株を栄養培地 YES で培養し、回収した菌体を破砕して親和性タグを利用して粗精製した後に、リボソームを含まない画分を超速心法で調製した。得られた複合体をフェノール・クロロホルム抽出法でタンパク質と RNA に分離し、タンパク質は既存のプロテオミクスの方法で同定した。RNA については、PAGE による分離とゲル内消化法、LC-MS を組み合わせた方法、あるいは全自動 LC-LC-MS/MS システムを利用した方法で分析し、生成した RNA の MS/MS データは Ariadne によって分裂酵母ゲノムと照合して同定した。

上記の方法によって、分裂酵母の Box H/ACA 型 snoRNP 複合体から、既知の 4 種類のタンパク質成分 (Gar1 と Cbf5、Nop10、Nhp2) と 18 種類 (全 21 種類中) の snoRNA に加えて、新規の snoRNA を 20 種類同定することができた (図 10)。新規の snoRNA は RT-PCR 法によっても Box H/ACA 型 snoRNP 複体内にその存在が確かめられ、LC-MS 法の誤同定などによるものではないことが確認された。

そこで、同定された snoRNA の構造を詳しく解析すると、3 種の RNA の 3' 末端の構造にはこれまで知られていなかった不均一性があること、また少なくとも 17 種の RNA の 5' 末端にはトリメチルグアノシンキャップが付加されていることが明らかになった。このトリメチルグアノシンキャップが付加されている RNA のうち、2 種類はイントロンから生成されており、未知の代謝経路によってキャップ修飾が行われていることが予想された。

一方、この研究で見出された新規 snoRNA については、それぞれの snoRNA が認識する r RNA の擬ウリジル化部位を予測するとともに、それぞれを欠損させた酵母変異株を作成して表現型の解析を進めている。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究で開発した LC-MS システムは、その感度や分離能、あるいは結果として得られる質量情報の量や精度の点で国際的に最高水準にある。また、ゲノム検索エンジン Ariadne を搭載した全体のシステムは、生体から分離した RNA を予測や予備的な知識なくゲノム情報に帰属して同定し、同時に転写後修飾や生体内での代謝過程を精密に解析できる現状では世界で唯一の RNA 解析プラットフォームである。最近の研究から、ゲノムのほぼ全域から転写された ncRNA が生体機能の調節

にきわめて重要な役割を果たしていること、また現在知られているほとんどの ncRNA がタンパク質との複合体すなわち RNP 複合体として機能していることが明らかにされている。本研究で開発したシステムは、今後ますます重要になることが予想されるタンパク質と RNA の相互作用が関与する生命現象の解析や、細胞の RNA・タンパク質相互作用ネットワークの解析に広く利用されることが期待される。

次世代シーケンサーなどの最新の方法と比較して特筆できる本システムの特徴は、RNA の同定とともに精密な化学構造の解析ができる点である。tRNA や rRNA などのよく研究が進んでいる RNA では、メチル化や擬ウリジル化などを含む 100 種類以上の複雑な化学修飾が機能の発現や調節に必須であることが知られている。この事実を考慮すると、質量分析法を基礎として本システムは、最近の研究で次々に見いだされてきた

H/ACA snoRNA	Number of bases
snoU17	326
snR101	273
snR90	225
snR95	222
snR96*	211
snR98	211
snR94	210
snR42	208
sno12/snR99	190
snR100	187
snR35	172
snR46	168
snR3	167
snR10	167
snR36	164
snR97*	148
snR33	145
snR91	144
snR92	144
snR93	143
snR5	142
snRX1	225
snRX2	236-237
snRX3	174
snRX4	142
snRX5	132
snRX6	138
snRX7	151-152
snRX8	156
snRX9	117
snRX10	167
snRX11	149
snRX12	136-137
snRX13	152-154
snRX14	171
snRX15	155
snRX16	150
snRX17	172
snRX18	143
snRX19	156
snRX20	208

18/21
Previously reported
in Torchet et al. RNA, 11,
928-938 (2005)

Novel

- , identified by LC-MS; strategy and by RT-PCR
- , identified by RT-PCR;
- *, unidentified by neither methods.

図 10. LC-MS 法によって同定された *S. pombe* の H/ACA 型 snoRNA

microRNA や piwiRNA あるいは今後見つかるであろう各種の ncRNA の構造と機能あるいは生合成や代謝調節などの研究に広く活用されることが期待される。

一方、この研究で開発したシステムは、高度医療開発とりわけ現在注目されている RNA などを本体とする創薬研究への応用が期待できる。現在主に開発が進められている siRNA などは一般に不安定で、体内に投与すると速やかに代謝されて分解される。このシステムは、さまざまな修飾を施した RNA 医薬候補化合物の安定性や代謝過程の解析、体内動態の解析などに広く活用されることが期待できる。但し、そのためには、体内に投与した RNA に由来する微量の代謝物を濃縮してその動態を解析するための前処理技術の開発や LC-MS システムの更なる高感度化、質量分析シグナルを利用した RNA の定量法の開発など、この研究で開発した基盤的な方法の改良や周辺技術の整備が必要である。

4.2 RNA 質量分析データの処理と解析技術の開発(理化学研究所 中山グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

実施内容

本研究の目標は、質量分析データから RNA の配列を同定し、同時に転写後修飾を検出して同定するための基盤技術確立である。そのために重要な要素技術は、プロテオミクス研究では既に一般的なデータベース検索エンジンソフトウェアと考えられる。そこで本グループでは、検索エンジンを中心とした RNA 質量分析データ解析方法およびソフトウェアの開発を目標とした。具体的には、実験で得られた RNA のヌクレオチド消化断片のタンデム質量分析データを塩基配列データベース上の特定の塩基配列へと照合し、同定する「データベース検索エンジン」とその周辺ソフトウェアの開発を進めた。

このようなソフトウェアはプロテオミクスでは既に一般的となっており、それを流用・改変することで効率的に開発が可能と予想できるが、以下に述べる RNA とタンパク質の性質の違いから、ほぼ 0 から開発を行う必要があった。(1) MS/MS での挙動の違い。RNA とタンパク質はいずれも直鎖状ポリマーであるが、その物理化学的性質は大きく異なっている。RNA は主鎖に解離基（リン酸基）を持つがタンパク質は両末端と特定の側鎖のみに解離基を持つ（陽イオンモードの場合には塩基性アミノ酸アルギニン、ヒスチジン、リジン）。このため RNA の MS/MS 分析での断片化規則はタンパク質とは大きく異なっていることが予想され、またいくつかの実験例も報告されていた。(2) 化学的多様性が小さいことによる特異性の欠如。生体から分離した RNA 分子をそのまま質量分析し、構造情報を得ることはタンパク質と同様に困難である。したがって、RNA を RNase で消化して生じたヌクレオチド混合物を質量分析する必要がある。しかし、RNA は 4 種類のモノマーから構成されており、ヌクレオチドの多様性が少ない。したがって、もし RNase で消化した RNA 断片を同定できたとしても、一般にそれだけでは元の RNA を特定することはできない。(3) 検索対象とするデータベースの不備。タンパク質はコード領域の大部分が特定されており、配列データベースもよく整備されているのに対して、非コード RNA に対する鋳型 DNA の特定は研究が進められている段階で、現時点では予測が困難である。このため RNA を同定するためには独自の非コード RNA データベースを構築するか、あるいはゲノム配列全体をデータベースとして検索する必要がある。

また、ソフトウェアの開発法として、プロトタイピングをもちいることとした。LC-MS/MS システムの開発・評価のためにはデータ解析が容易に出来ることが必要である。このため、出来るだけ早く限定的な性能であっても実際のデータ解析を支援するプロトタイプソフトウェアを分析系開発現場に導入することを重視した。導入したプ

ロトタイプは、共同研究者の評価意見を取り入れ、継続的に改良することで汎用的な検索エンジンとすることにした。

以上の理由から、次のように RNA 解析のための検索エンジンの開発を進めた。

1. 合成 RNA・DNA や生体から分離した RNA のタンデム質量分析で得られた断片化スペクトルデータを収集し、衝突解離法での RNA の断片化ルールを詳細に解析した。[RNA 断片化の規則性の検討]
2. 公開データベースから非コード RNA を抽出し独自の RNA カタログを作成した。[低分子 RNA のカタログ化とデータベースの構築]
3. 1 の結果をもとにして、RNA のタンデム質量分析データから 2 で作成した RNA カタログを検索して特定の RNA を同定できるプロトタイプの配列データベース検索エンジンソフトウェアを開発した。[RNA 検索エンジンプロトタイプの開発]
4. 既知の RNA など 3 のプロトタイプの性能を、特に上記 (2) の問題に留意して十分な特異性が得られるかどうか注目して、評価し、不十分な点を改良することで、汎用的な RNA 検索エンジンソフトウェアを開発した。
5. 実際に生体から分離した RNA 試料によりさらに性能評価を行い、検索エンジンのアルゴリズムを継続的に改良すると共に、[検索エンジンを中心としたデータ解析システムを活用するための周辺ソフトウェア整備] を行った。

成果

以下、研究成果を実施内容の 1~5 と対応させて説明した後に、開発した検索エンジン Ariadne を中心としたデータ解析システム (図 11) の現在の性能と限界についてまとめた。

Schematic diagram of Ariadne DB search system

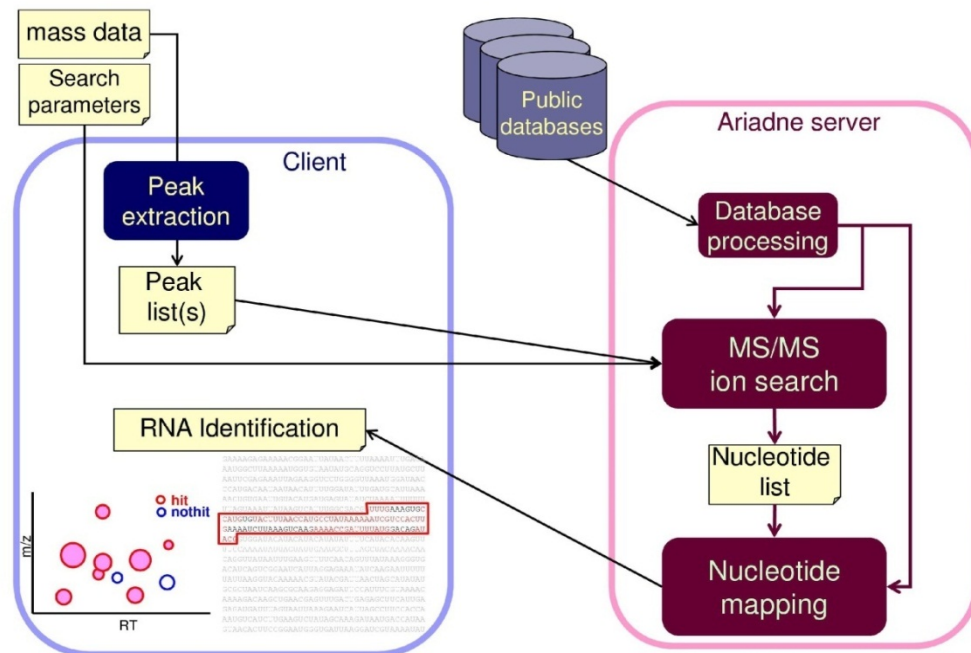


図 11. RNA 検索エンジン Ariadne を中心としたデータ解析システム

[RNA断片化の規則性の検討]

MS/MS スペクトルに基づき RNA の同定を行うためには、RNA の開裂パターンから塩基配列情報を得ることが必要である。しかし、RNA の MS/MS による開裂はあまり研究されておらず、DNA と同様だとする報告や異なるとする報告が混在する状況であったため、実験的に確認する必要がある。そこで合成 RNA や生体から分離した既知 RNA のタンデム質量分析で得られた断片化スペクトルデータを収集することで、衝突解離法での RNA の断片化ルールを詳細に解析した。その結果、開裂しうる主鎖リン酸部分のうち 2 箇所が選択的に開裂することがわかった。また、RNA ではタンパク質と異なり主鎖に荷電部位があるため、内部イオンが強く検出されることがあった。さらに、DNA では塩基の脱離が高い頻度で生じるのに対し、RNA ではほとんど塩基脱離が生じないなど核酸同士でも開裂様式に違いがあった。

[低分子 RNA のカタログ化とデータベースの構築]

公開されている低分子 RNA データベース (DB) を調査、収集し、収録データの重複を除去することで DB を整理した。これに一般的な公開配列 DB である NCBI nr などからキーワード抽出・配列相同性検索して得た低分子 RNA 配列を追加して独自の RNA カタログからなる DB を作成した。公開 DB は定期・不定期にアップデートするので、これらの追加情報を定期的に取り込むため、バッチ処理プログラムを作成し、DB のダウンロード、エントリーの抽出を自動化した。この DB を用いることで検索エンジンプロトタイプの評価を効率的に行い、実際に生体試料から調製した未知 RNA を同定することができた。しかし、開発した RNA 検索プログラムが予想より早くヒトなどの哺乳類ゲノムに対しても直接検索可能となってきたこと、および NCBI refseq で非コード RNA のエントリーが増加してきたことから、質量分析用 RNA データベースの構築は H21 年度で終了した。

[RNA 検索エンジンプロトタイプの開発]

実験的に検証した RNA の断片化ルールに基づき、RNA のタンデム質量分析データから RNA データ・リソースを検索して特定の RNA を同定できるプロトタイプの配列データベース検索エンジンを開発した (Ariadne と命名)。データベースとしては上述のように整備したものを使用した。この検索エンジン Ariadne は、データベース中の配列と MS/MS スペクトルの一致度を以下の二段階のアルゴリズムにより確率的に評価し、RNA を同定することが可能である。(図 12)

二段階検索アルゴリズムの概要

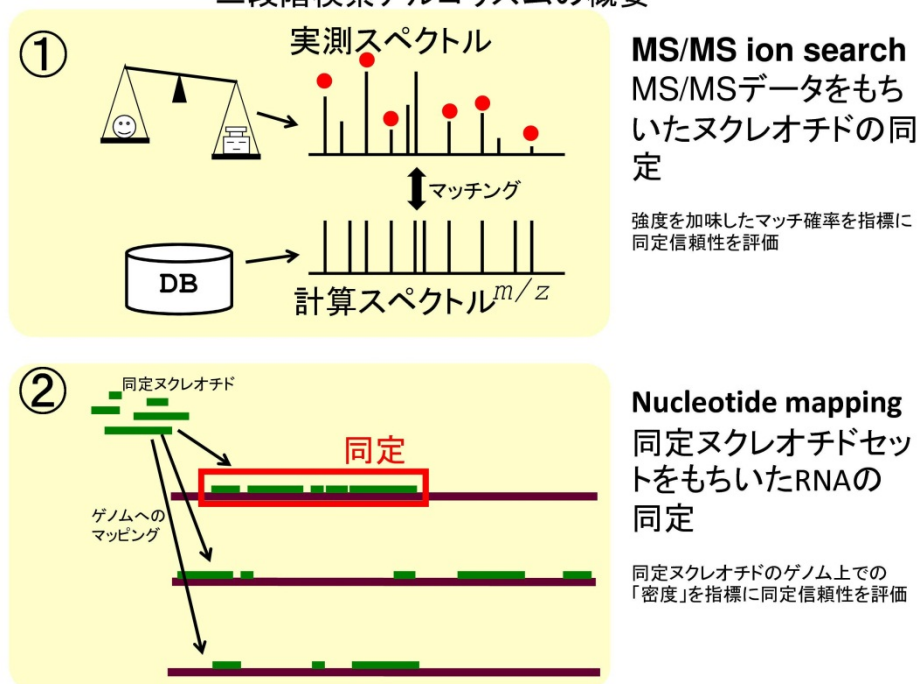


図 12. RNA 検索エンジン Ariadne の二段階検索アルゴリズムの概要

第一段階では実験的に得られた MS/MS スペクトルと配列データベース中の RNA 配列をヌクレアーゼなどで消化して生じるヌクレオチドの仮想的な MS/MS スペクトルとの一致度を確率的に評価し、ヌクレオチド同定の確度を客観的な基準で数値化することに成功した (MS/MS イオン検索)。

しかし、上述したように単一のヌクレオチドを同定できたとしても、一般には元の RNA を同定することはできない。そこで、MS/MS イオン検索で同定したヌクレオチドのセットをもちいて、配列データベースとの一致を調べる第二段階の検索アルゴリズムを考案し、プログラムとして実装した (ヌクレオチドマッピング)。このアルゴリズムは同定した複数の同定ヌクレオチドが特定の RNA (鋳型 DNA 領域) にどの程度集中して存在するかを確率的に評価するものである。

次に、開発したプロトタイプ検索エンジンを、東京農工大学で調製した無細胞合成 mRNA の LC-MS/MS データに適用することで、300-500 塩基からなる RNA を 70-80 % の配列カバー率で同定することができた。また、転写後修飾を含む試料として tRNA-Phe 標準品の RNaseT₁ 消化物の LC-MS/MS データを、tRNA をコードする遺伝子 DB (genomic tRNA db : この DB は DNA 配列なので、計算機中で仮想的に RNA に転写し、さらに修飾を派生させたものとした) に対して検索したところ、試料とした RNA を正しく同定するとともに、tRNA-Phe に含まれる既知の転写後修飾の半分以上を修飾部位も含めて正確に同定することができた。さらに、東京農工大学から供給された培養細胞由来の RNP 複合体から調製した RNA 試料を分析することでプロトタイプの有効性を確認できた[9]。

[汎用的な RNA 検索エンジンソフトウェアの開発]

実際に細胞から調製した RNA の質量分析データをもちいた評価によりプロトタイプ

には以下の問題点が明らかとなった。

1. MS/MS イオン検索

(a) 誤同定 通常のシーケンスイオンとそれ以外の内部イオンが同じ質量を与える場合には、誤同定が生じやすかった。

(b) 検索速度 小規模な RNA カタログに対しては実用的な速度で検索可能だが、ゲノムなど大規模 DB に対しては実用的な時間で検索出来なかった。特に修飾を考慮した場合には、検索空間が爆発的に増えるため、現実的な時間では検索出来なかった。

2. ヌクレオチドマッピング

(a) 長さ指定 ヌクレオチドマッピングのために検索時にゲノムなど配列 DB を試料 RNA の長さに合わせたサブセットに分割する方式を採用したため、試料 RNA の長さを電気泳動、クロマトグラフィーなどで知っておく必要があった。また、大きさの異なる RNA が含まれる試料に対しては原理的に適用不可能だった。

(b) 検索速度 MS/MS イオン検索同様に小規模な RNA カタログに対しては実用的な速度で検索可能だが、ゲノムなど大規模 DB に対しては実用的な時間で検索出来なかった。

これらの問題点を解決するために、アルゴリズムの改良を継続的に行った。具体的には MS/MS イオン検索でシーケンスイオンの種類によりスコア付の重みを変えることで同定信頼性を高めることに成功した。同時に、プログラムの内部処理を見直し、効率化することにより高速化し、小規模な RNA カタログだけでなく酵母やヒトゲノムに対して LC-MS/MS データを修飾を考慮して検索することが可能となった。Ariadne では、既知の全ての RNA の中で最も修飾含有率が高い tRNA の修飾頻度および種類の統計から、A,C,G,U に対するメチル化および U の還元を考慮して検索することとした。この修飾設定で全ての RNA を同定可能と考えており、実際に修飾が原因で同定困難であった例は今のところ無い。また、首都大学、東京農工大学で行った新規 RNase の検索と特異性の解析を支援するため、全ての可能な部位で断片化したヌクレオチドを考慮した検索モードも提供した。

ヌクレオチドマッピングでもスコアリングアルゴリズムを改良し、一定の長さ以内の RNA (データベース加工時のパラメータとして指定可能、通常 1200nt) であれば長さを特定しなくても自動的に鋳型領域を推測しスコアリングするように改変した。この改変により、RNA 同定の特異性が飛躍的に向上し、ヒトなど哺乳類ゲノムに対して検索した場合でも試料 RNA の鋳型 DNA を特定出来るようになった。しかし、この改変に伴い計算量が従来比で 2 倍程度増大したので、プログラム内部処理の見直し関係型データベースシステムを一部導入することで処理を高速化した。

上記の問題点に加え、ヒトゲノムは非常に繰り返し配列が多く検索結果の解釈がそのままでは困難だったので、検索結果の統計的評価方法を見直した。RNA 同定の信頼性を示すマッピングスコアが統計的に有意であるかを判定するために、検索シミュレーションをもちいる閾値および個々の検索におけるスコア分布に基づいた期待値から算出する閾値の 2 種類の評価法を導入した。

1. シミュレーションによる閾値 ゲノムからランダムにヌクレオチドを一定数抽出してマッピングすることを繰り返し試行し傾向を調査したところ、ある検索の最高マッピングスコアは、DB の大きさとマッピングするヌクレオチドの種類数に相関することがわかった。この結果を各 DB について予め得ておけば、マッピングにもちいるヌクレオチド数に応じて偶然あるスコアが生じる確率を求めることが出来る。この確率が例えば 5%となるスコアを危険率 5%としたときの閾値としてもちいることにした。

2. スコア分布に基づく閾値 信頼性の高い検索結果のスコア分布は、一つあるいは少数のゲノム領域あるいは DB エントリーが与えるスコアが、それ以外の大多数のスコア分布から飛び抜けている。逆に、この飛び抜け具合を定量化することで、同定の信頼性を評価可能と考えた。ある検索結果から、最上位（同定されるべきもの）を除いた外れのスコア分布を考え、対数変換した積算分布曲線を補外することで、あるスコアが得られる期待値を算出する。実際には、自動化のため攪乱の少ない中位のスコアを統計的に有意な数抽出して期待値を算出するために Fenyo and Beavis の方法 (Fenyo D and Beavis RC., Anal Chem. 2003;75(4):768-74.) を適用した。どの位置のスコアをもちいるかは DB ごとに安定して使える順位を予め求め、指定することにした。例えば、危険率 5%の閾値は、期待値が 0.05 となるスコアを対数変換した分布曲線から算出出来る。

試験的なプログラムで既知 RNA 試料やノーザンブロットにより確認した RNA のスコアの統計有意性を検討したところ、両閾値は多くの場合比較的似た傾向を与え、これらの閾値をもちいることで正しく同定の判別が可能であることがわかった。特に、ゲノムなど比較的大きな DB について良好な結果が得られた。

アルゴリズムの開発・改良と併せて、理研に設置するサーバコンピュータに対して首都大学から DB 検索可能なようにプロトタイププログラムを web アプリケーションとして統合した。当初、試験的に首都大学のコンピュータのみに対して検索サービスを行っていたが、現在では一般向けに公開している (<http://ariadne.riken.jp/>)。これらの改良により、首都大学、東京農工大学で調製したスプライセオソーム先駆体などの RNP 複合体試料から RNA を抽出し電気泳動あるいはクロマトグラフィーで分離した後にリボヌクレアーゼ消化した試料を首都大学の LC-MS/MS で分析して得られた質量分析データをもちいてヒトゲノムなどの配列 DB に対して Ariadne 検索することで RNA 同定がルーチンワークとして行えるようになった。

[検索エンジンを中心としたデータ解析システムを活用するための周辺ソフトウェア整備]

Ariadne の性能を最大限発揮するための周辺ソフトウェアを整備した。Ariadne の MS/MS イオン検索では MS/MS スペクトルのシグナル/ノイズ比が結果に影響するため、質量分析データからのピーク抽出は重要である。また、RNA 検索結果は比較的複雑なので、結果を容易に判断出来るような可視化が重要である。さらに、RNA でしばしば見られ機能的に重要な役割を担っていると考えられる転写後修飾の検出を支援する方法も重要である。これらの機能を持つ周辺ソフトウェアを開発した。

1. 単同位体抽出プログラム

RNA の質量スペクトルデータから単同位体ピークおよびその価数を抽出するプログラムの開発を行った。RNA の質量スペクトルデータから配列から計算できる質量情報を持つ単一同位体ピークを抽出することはデータ解析の鍵となる過程である。Thermo Fisher Scientific 社および Waters 社の装置から得られるデータから同一の分子に由来する同位体ピーク群を認識し単同位体ピークおよびその価数を抽出するプログラムを開発した。このプログラムを、検索エンジン Ariadne と組み合わせて用いることで、同定感度と精度が同時に向上することを確認した。

2. 検索結果可視化プログラム

RNA 検索結果は比較的複雑であり、単なるリスト表示だけでは全体を理解することが難しかったので、結果評価を効率化するために検索結果をバブルチャートやデンドログラムとして可視化するプログラムを開発した。さらに首都大学で開発している

LC-LC-MS/MSにより得られるシリーズデータを扱うため、ユーザーが選択した検索後の複数データをシリーズとみなしてデータ解析・可視化可能な解析ソフトウェアを開発した。

3. 転写後修飾検出プログラム

Ariadne では、上述のように **A,C,G,U** に対するメチル化および **U** の還元という限られた頻度の多い修飾のみを考慮して検索する。しかし、頻度が低くても機能的に重要な修飾は当然存在するので、それらの検出・同定を支援するソフトウェアを開発した。基本的な考え方は **RNA** 同定後に同定配列（ゲノムであれば前後の近傍領域も含む）についてより多種類の修飾の可能性を考慮して再検索を行うこととした。これにより、多種類の修飾可能性を考慮しても（ゲノム全体を検索する場合と比べ、）検索空間が比較的小さいため、実用的な時間で再検索可能である。酵母 **Gar1** 結合 **RNA** の解析では 5'のトリメチルキャップ構造などを実際に検出可能だった。

さらに上記 3 つの周辺プログラムを統合した **Ariadne** のフロントエンドプログラムを開発した。このフロントエンドプログラムでは質量分析から得られた生データとデータ処理・データベース検索パラメータを指定することにより自動的にデータ処理・データベース検索を行い、結果を可視化することができる。

データ解析システムの到達点と限界

上述のように開発した **Ariadne** を中心としたデータ解析システムをもちいることで、本プロジェクト開始時点では不可能であった、質量分析により **RNA** 混合物中の **RNA** 成分を同定し、転写後修飾を解析するアプローチがルーチンワークとして可能となった。

当初、ヒトゲノム配列に対して質量分析データを検索して **RNA** を同定するのは極めて困難あるいは不可能と予想していた。なぜなら、実際にタンパク質をヒトゲノム配列に対して検索する試みもなされているが、擬陽性が多く現在でも一般的には用いられていないこと、タンパク質の検索対象はゲノム配列全体の 2%程度を占めるに過ぎない **ORF** 領域であるのに対し、**RNA** はゲノム全体を対象に検索を行う必要があること、**RNA** は 4 種類のモノマーから構成されておりヌクレオチドの多様性がペプチドと比較して低いことから、測定で得られるデータから十分な配列特異性を確保できないと考えられたからである。しかし、考案した **MS/MS** イオン検索、ヌクレオチドマッピングの二段階検索アルゴリズムおよび **RNA** の長さを指定しないでも自動的に鑄型領域を検出するアルゴリズムにより、ヒト・マウスなどの巨大な哺乳類ゲノムに対して検索を行っても特定の鑄型 **DNA** を選択的に同定することが可能となった。継続した検索アルゴリズム改良により、現在では数十種類程度の **RNA** 成分を含む **RNP** 複合体に含まれる **RNA** を混合物のまま直接分析し、酵母やヒトなど真核細胞ゲノム **DB** に対して検索することで同時に複数 **RNA** 成分とその修飾を同定することが可能となった。

酵母 **Gar1** 複合体をもちいた検討では、この複合体を電気泳動や **LC** などの分離手段をもちいず直接 **RNase** で消化したヌクレオチド混合物を **LC-MS/MS** で分析したデータを酵母ゲノムに対して検索したところ、この複合体に含まれる約 30 種類の **RNA** 中から 20 種類以上の **RNA** を同定可能だった。既知 **Gar1** 結合 **RNA** 配列から仮想的に作成した理想的なデータセットをもちいた検索シミュレーションでは、全ての **RNA** を 5%閾値以上のスコアで同定可能なことから、**Ariadne** のアルゴリズムは 30 種類程度の **RNA** 混合物には十分適用出来ると考えられる。実際のデータで 20 種類しか同定出来ない理由は、**RNA** 成分の存在量がそれぞれの **RNA** によって異なること、それに起因して **LC-MS/MS** で全てのヌクレオチドの **MS/MS** を得られないこと、および調製した **RNP** 複合体には巨大なリボゾーム **RNA** が混入しておりその影響によりマッピング時のノ

イズが増えて統計的閾値が上がってしまうことと考えている。このデータ解析システムを首都大学で開発した LC-LC-MS/MS と合わせてもちいることで、原理的には数百種類程度の RNA 混合物から個々の RNA 成分を同定可能と考えられる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

上述のように、開発したデータ解析システムは現時点のままでも実際の smallRNA 研究に十分対応可能である。したがって、今後は利用者を増やすことで、生物学的に重要な発見を支援することが期待できる。

開発した **Ariadne** は、共同研究者の首都大学、東京農工大学だけでなく、現在までに日本、インド、アメリカ、ドイツ、イギリスなど 10 か国以上、約 70 機関の大学、研究機関、製薬企業などからアクセスがあった。**Ariadne** 公開サービスのゲスト利用および登録ユーザーも徐々にではあるが増え始めている。

4.3 RNA とプロテオームの機能的相関解析(東京農工大学 高橋グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

当グループは、首都大グループおよび理研グループが担当する質量分析法を基礎とし RNA 解析プラットフォーム開発の各段階で必要とされる RNA 試料を適宜提供し、その分析から得られた結果を適切に評価することで、RNA 解析技術としての完成度を高めることを狙いとしている。また、質量分析法による RNA 解析に適した試料調製法を確立し、RNA/タンパク質複合体を構成する RNA とタンパク質成分のトータル解析を実施することで、RNA-タンパク質相互作用に基づく機能ネットワークマップ作成のための方法論と解析技術を確立することを目標とした。この目標を達成するために、本研究では、「RNA 試料調製法」、「RNA/タンパク質複合体の解析」、そして、「RNA/タンパク質ネットワークマップの作成」の 3 つの項目について研究を実施した。「RNA 試料調製法」として、塩基数 300 以下の低分子 RNA の調製法の開発および質量分析のための RNA 断片化法の開発に関する実験を実施した。「RNA/タンパク質複合体の解析」では、RNA 結合タンパク質を釣り餌(ベイト)とした RNA の回収法および RNA をベイトとした RNA 結合タンパク質の回収法に関する実験を実施し、同時に、RNA 解析プラットフォームを用いた RNA の同定とプロテオミクスによるタンパク質の同定を行った。そして、新規に同定された RNA とタンパク質の機能解析を行い、RNA 解析プラットフォームを用いた「RNA/タンパク質複合体の解析」法の有効性を評価した。「RNA/タンパク質ネットワークマップの作成」に関しては、「RNA/タンパク質複合体の解析」により得られた結果と既知の RNA-タンパク質相互作用のデータベース・文献情報を収集した。解析の各研究項目の具体的実施内容及び成果は以下の通りである。

[RNA 試料調製法]

低分子 RNA の調製法の開発:

本研究項目の目的は、質量分析に供することができる RNA を生体から天然の化学構造を保ったまま効率良く分離して濃縮する方法を確立することである。そのために、まず市販の各種キットを用いる方法(有機溶媒による分別法、カラムへの吸着法、電気泳動分離法)を比較検討することから開始した。また、首都大チームとともに生体試料の前処理装置や微小カラムを用いる多次元 LC 法を組み合わせたロボット技術などによって外部環境から遮断された密閉系で実施できる RNA 調製法や、その回収率や純度を評価する技術について検討した。そして、より生体内での存在状態を反映した RNA の調製法として、細胞抽出液から RNA-タンパク質複合体として免疫沈降法あるいはプルダウン法で回収し、そこから RNA を調製する方法を各種検討した。同時に *in vitro* RNA 合成システムを構築し、標準 RNA を安定的に供給する方法も検討した。さらに、クロマチンや核マトリックスなどに結合し、従来法では抽出が困難な低分子 RNA を効率よく回収する方

法を検討した。回収した RNA を首都大および理研の開発した RNA 解析システムで解析し、得られた結果について、ノーザンブロット法やリアルタイム PCR 法、その他分子生物学・細胞生物学的手法など適切な方法で評価し、試料調製法の適用範囲や有効性を検証した。

始めに RNA を回収するための市販キットを可能な限り全て入手し、これらの塩基数 300 以下の RNA の回収法としての有効性を検討した。これらの方法のほとんどは、細胞抽出液などの生体試料から総 RNA を回収し、サイズの大きい RNA と目的のサイズの RNA を分別抽出法や電気泳動法によって分離、回収する方法である。市販のキットを改良するなどの各種の検討に加え独自の手法についても検討した結果、エタノール濃度と pH を調製することで miRNA を含むサイズの異なる RNA を効果的に分画するより簡便かつ迅速な方法を開発した。しかし、開発の初期段階において、細胞から抽出した総 RNA から調製した低分子 RNA を首都大・理研グループが構築した LC-MS 分析の試料として供給したが、このような試料の場合、極めて多数の RNA を含む点および感度の点から開発段階の LC-MS の試料として不適であった。そこで、その後の研究の進め方を検討した結果、分子生物学・遺伝子工学で使われているような細胞・組織などの生体試料から低分子量の RNA を総体として回収する方法の検討ではなく、RNA 解析プラットフォームの開発を促進するために必要な特定の RNA 種に絞って回収する試料調製法の検討に注力することが重要であるとの結論に至った。そこで、この方針に沿って、生体内での存在量が比較的多い特定の RNA から、順次存在量の少ない特定の RNA、そしてより複雑な RNA を含む試料へとステップアップ方式で供給する方針で本研究項目を進めることとした。即ち、RNA 解析プラットフォームの開発当初は、まず LC-MS 法の開発のための標準品として、*in vitro* 合成系で合成した RNA を調製・供給した [22]。そして、開発が進むにつれ、その感度及びパフォーマンスが向上してきたので、生体試料から回収した比較的細胞内含量の多いスプライセオソームやリボソーム合成系の RNA 結合タンパク質を各種のタグを融合したものとして安定的に、あるいは薬剤誘導で発現する細胞株を構築し、これらの細胞を原料として免疫沈降法あるいはプルダウン法で分離した複合体から snRNA、snoRNA、5S/5.8S-rRNA などを調製して安定的に供給した。その後は、これらの RNA の中で順次存在量の少ない RNA、あるいはより複雑な RNA 混合物となる試料を供給するための細胞株を作製し、最終的には転写や miRNA 代謝などに関わる微量 RNA 成分を回収できるタンパク質発現細胞株も樹立した。また、細胞質、核、核小体、核マトリックスなどの画分に分画してから、RNA-タンパク質複合体を回収することも検討し、これによって、回収しようとする RNA の種類に応じて、回収効率が改善できることも判明した。作製した細胞株は、RNA 解析プラットフォームの開発に必要な RNA を適宜供給するためだけでなく、同定された RNA 種の機能解析に使われるなど、得られた結果の評価にも役立てられた。このようにして行われた適宜必要な RNA 試料の安定的供給は、迅速な RNA 解析プラットフォームの開発に多いに貢献した。この過程で作製した各種タンパク質発現安定株・誘導株は、RNA 結合能の異なる変異体を含め 100 種類以上になる。

以上の研究の過程で、特にクロマチンや細胞の不溶性画分に存在するタンパク質をベイトとして RNA を回収することは困難を極めた。例えば、クロマチンに結合したものを回収する場合には、DNA 分解酵素を用いる必要があるがそれによって生じた DNA 断片が混入し LC-MS 分析を乱してしまう原因になった。また、同時に不溶性画分にも大量に存在する rRNA や tRNA が混入してしまい、これらも微量 RNA 成分の LC-MS 分析を妨害する原因となった。しかし、最も困難であった点は、このような不溶性画分を可溶化し、そこから免疫沈降やプルダウン法で特定のタンパク質をベイトとしてそれに結合する RNA を回収することであった。このような不溶性画分を可溶化するためには、高濃度の塩や強い界面活性剤を必要とするが、そのような条件下では、免疫沈降やプルダウン法で用いる抗体とベイトとなる特定のタンパク質との結合が阻害されてしまうからである。そ

ここで、まず、混入する RNA や DNA 断片の除去に関して詳細に検討したところ、高塩濃度での抽出に希釈操作を加えることで大量に混入してくる 28S や 18S rRNA などの高分子量 RNA を選択的に除去できること、そして、希釈した低塩濃度のある条件を用いると DNA 断片を混在させないで低分子 RNA を効率的に回収できることを見いだした。さらに、このような条件下で利用できるタグを探索したところ、ビオチン化タグが最も有効であることが判明した。このタグを用いることで、高濃度の塩や界面活性剤の存在下でも特定のタンパク質をベイトとした RNA-タンパク質複合体の回収が可能になった。これらの方法を用い、クロマチンや核マトリックスあるいは核小体などから、rRNA や tRNA の混入を抑え、RNA-タンパク質複合体を効果的に回収できる方法を確立できた。

RNA 解析法の現状を全体として見てみると、本研究プロジェクトが進めた RNA 解析プラットフォームの最大の優位点は、生体内に存在する RNA-タンパク質複合体を構成する RNA を同定するとともに定量し、そして転写後の化学修飾を含めた構造を直接解析できるという点である。RNA 分子は、生体内では、少なくとも 100 種以上知られている異なる転写後修飾反応や、さらにはエンドヌクレアーゼやエクソヌクレアーゼによるプロセッシングなどの様々な反応を受けることで、多種多様で複雑な分子種を形成する。RNA の機能はこれらのプロセッシングや修飾により厳密に制御されていると考えられているが、その実体はほとんど解明されていない。特に、プロセッシングを受けた RNA については、試料調製の段階で artifact として生じたものか、あるいは本来の生体内に存在するプロセッシングを反映したものかを判別することが非常に困難である。しかし、今回の研究では RNA をそのタンパク質複合体として回収し、RNA とタンパク質を同時に解析する手法を用いたが、これによって RNA の代謝産物がタンパク質との相互作用によって安定化されていたり、プロセッシングによってタンパク質複合体の構成成分が変化したりすることを知ることができ、得られた RNA が artifact で生じたものか否かの判別が可能であることが示された。その例を「RNA/タンパク質複合体解析」の研究項目の項で記載するが、解析し尽くされていると思われていた U1 snRNA のような RNA においてさえ、今まで知られていないプロセッシングと転写後修飾を受けている RNA 種が存在することが今回の解析で示された。このことは、逆に言うと、RNA をタンパク質複合体として回収するという、この研究項目で検討した RNA の試料調製法は生体内に存在する状態のプロセッシングや転写後修飾を反映した RNA の調製を可能とし、RNA 解析プラットフォームを用いた解析法は今まで知られていない RNA の代謝あるいは生合成経路を明らかにする有効かつ汎用的な手段に成り得ることを示している。この研究項目で検討された試料調製法は、RNA 解析プラットフォームで直接分析するために最適化されたものである。

質量分析のための RNA 断片化法の開発

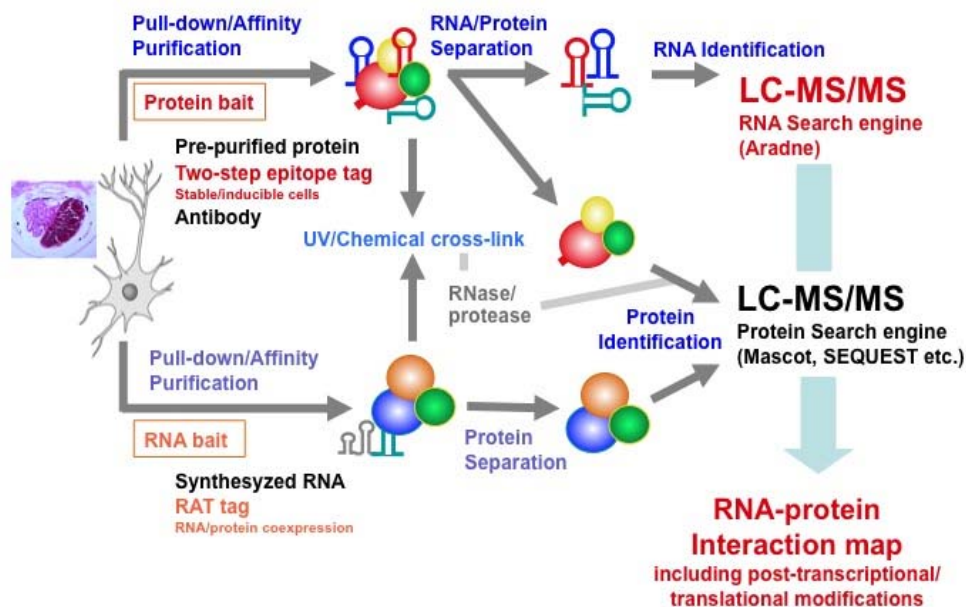
現在の質量分析装置で RNA の MS/MS スペクトルを測定するためには、大凡 20 nt 以下の長さへと RNA を断片化する必要がある。そこで、本研究項目では、上記の質量分析法に適合した RNA 試料の分離、調製法の開発だけでなく、調製した RNA を質量分析法で分析できるサイズに断片化する方法を開発することも目的とした。RNA の断片化法として、グアニン (G) 塩基の 3' 末端側で切断する RNase T1 を用いる方法は、首都大グループの研究項目で記載されているので、ここでは RNase T1 と基質特異性が異なる colicin E5 を用いた RNA の断片化法を検討したことについて述べる。また、二本鎖 RNA を分解する RNase H を利用することで、目的の RNA だけを任意の場所で選択的に切断して修飾基などを含む特定の断片を回収する方法も検討したことにも触れる。この方法を検討した理由は、このような方法が、特定の RNA を回収する際に、存在頻度の高い塩基配列を持ちかつ細胞内含量が多い高分子 RNA の影響を排除する手段に成り得ると考えたからである。

RNase T1 は全ての G の 3' 末端側を切断する酵素であり、それによって生じる RNA 断片の平均長は 4 となる。本研究では、より大きな断片を得る目的で、「GU」の 2 塩基認識との報告がある colicin E5 の利用を検討した。すなわち colicin E5 を内在性の阻害タンパク質とともに大腸菌で発現し、分離精製後に逆相 LC によって阻害タンパク質を分離して活性酵素を精製した。首都大と共同して行った LC-MS 法による検討によると、精製した酵素は確かに「GU」配列に特異的であり、RNase T1 を相補する RNA の切断法として有効であることがわかった。一方、これらの方法とはまったく異なる切断法として、RNase H を用いる方法について検討した。この酵素は、DNA-RNA ハイブリッドの最低 4 塩基対を認識して RNA を切断するが、転写後修飾が存在すると切断は起らなくなるという基質特異性を持つことから、転写後修飾の検出に用いられている酵素である。この酵素の DNA-RNA 塩基対を切断するという特性を利用して、まずモデル RNA の塩基配列に相補的な合成 DNA 断片を用いた目的の箇所を選択的に切断できることを確認した後に、細胞から抽出した総 RNA 混合物に含まれるリボソーム RNA をターゲットとして、任意の箇所での切断が可能かどうかを調べた。各種条件を検討した結果、細胞抽出液から調製した総 RNA 混合物を用いた場合でも、目的の箇所を切断し目的の RNA 断片を生じさせることが可能であることが判明した。また、複数箇所での同時切断が可能かどうかを検討し、これも可能であることを示した。この手法を、栄養不足状態のときや nonsense codon decay などの際に、mRNA の分解に関わる酵素として知られている PARN に相互作用するリボソーム小サブユニットに含まれる 18S rRNA の 3' 末端側の解析に適用し、得られた RNA 断片を RNA 解析プラットフォームで解析したところ、成熟 18S rRNA より 10 塩基および 20 塩基程度長い 18S rRNA の前駆体由来のものであることが明らかになった。この結果は DNA プローブを用いた northern blot 法で確認され、RNase H を用いた方法は、RNA 解析プラットフォームとの組み合わせで、このような RNA-タンパク質複合体の生合成の過程で形成される中間産物の解析にも利用できることが判明した。この実験では、得られた断片に転写後修飾は含まれていなかったが、転写後修飾が含まれると考えられる領域だけを RNase H を用いた方法で切り出して、転写後修飾の有無や違いを知ることが可能と考えられ、RNA 解析プラットフォームと組み合わせると、この方法は応用範囲の非常に広いものになると考えられる。ちなみに、PARN が 18S サブユニットのリボソーム生合成に関わることは、この研究によって新たに発見された知見である(石川ら、原著論文投稿準備中)。

[RNA/タンパク質複合体の解析]

低分子 RNA のほとんどはタンパク質との複合体 (RNA-タンパク質複合体) として機能しているが、今まではタンパク質成分のみがプロテオミクスの手法で網羅的に解析され、RNA 成分はタンパク質から切り離された分子生物学的な方法で解析されてきた。本研究項目では、RNA-タンパク質複合体を構成する RNA とタンパク質成分を同時に直接解析する方法論を確立することを目的として、タンパク質を起点として RNA を回収する方法と RNA を起点としてタンパク質を回収する両面からの検討を行った。

RNA-蛋白質複合体解析の手順



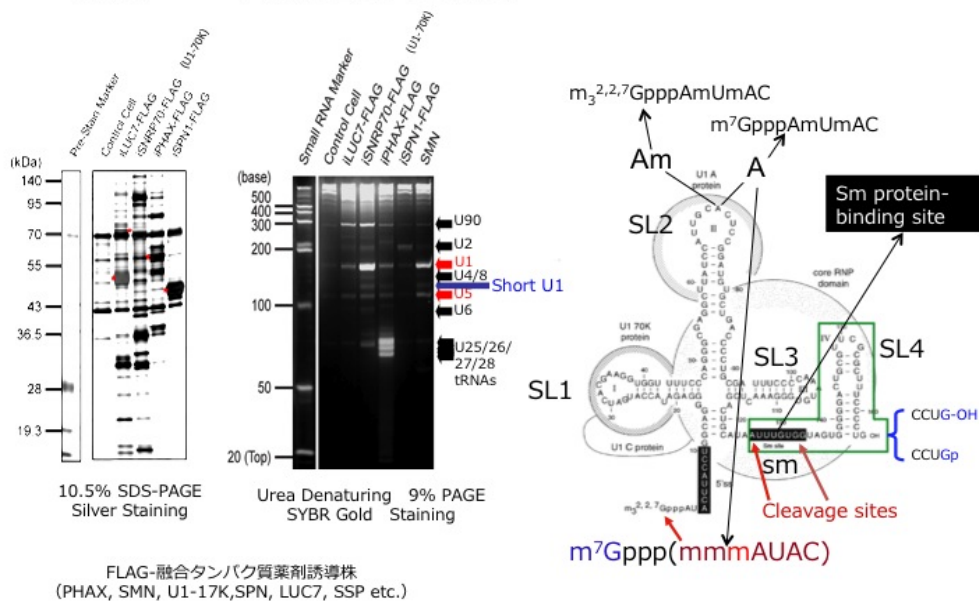
RNA 結合タンパク質を用いた RNA の回収と同定

酵母の snRNA/snoRNA 結合タンパク質をベイトとしてそれぞれのタンパク質に結合する RNA を回収して質量分析法で同定する研究から、それぞれに相同なほ乳類のホモログタンパク質をベイトとして RNA/タンパク質複合体を回収して構成成分を同定する研究に展開した。開発段階の LC-MS システムの性能に合せ、上記の「RNA 試料調製法」の研究項目に述べたように細胞内での存在量が異なるさまざまな RNA/タンパク質複合体を回収できる細胞株を構築し、分離した複合体を開発過程の RNA 解析プラットフォームで解析した。また、こうして得られた解析結果を、従来の電気泳動法、放射性ラベル法、リアルタイム PCR 法などの方法で得られた結果と比較検討した。回収できた RNA/タンパク質複合体についてはプロテオミクス技術によって構成成分を同定し、新規の成分については機能解析も試みた。機能的 RNA-タンパク質複合体の生合成と代謝過程での RNA のプロセッシングと転写後修飾の変化を解析する目的では、特にスプライセオソームやリボソームの生合成や代謝に関わる一連のタンパク質をベイトとして得られた様々な RNA の転写後修飾を含めた化学構造を主に解析した。新規に同定された RNA・タンパク質、転写後・翻訳後修飾・プロセッシングについては、開発した RNA 解析プラットフォームの有効性を示すために、生化学的手法、分子生物学的手法、細胞生物学的手法などの手法を適宜適用し、それらの生体内での役割の解析を行い、新たに同定されたものの生理的意味づけも試みた。

タンパク質を起点とした RNA/タンパク質複合体の回収には、既に担当グループが確立した「アッセムブリースナップショット」解析法を適用し、各種のエピトープタグ融合 RNA 結合タンパク質の安定発現株/誘導発現株から抗エピトープ抗体を用いたアフィニティー精製法によって目的の RNA-タンパク質複合体を単離した。この方法により、RNA polymerase I, II, III を含む転写関連タンパク質、RecQ などの DNA 修復に関わるタンパク質、Drosha, Dicer, DGCR8, AGOs などの miRNA の生成に関わるタンパク質、FBL, SMN1 などの snRNA/snoRNA の生合成と代謝に関わる様々なタンパク質、nucleolin、

nucleophosmin、Nop56、Nop52 などのリボソーム生合成に関わるタンパク質及びこれらの変異体をベイトとし、少なくとも 100 種類以上の RNA-タンパク質複合体を単離した。これらの RNA-タンパク質複合体を構成するタンパク質成分は従来のゲル内酵素消化法と組み合わせたショットガン法を主としたプロテオミクスの手法で同定するとともに、RNA 成分を首都大・理研グループが開発したゲル内 RNaseT1 消化法を組み合わせた RNA 解析プラットフォームで解析した。その結果、この解析法でタンパク質成分とほぼ等量含まれる RNA 成分を同定できることが判明した。また、同じ試料を northern blot 法や RT-PCR 法などの従来法で分析した結果から、LC-MS 法によって今まで相互作用が知られていない RNA を非予見的に同定できることも明らかになった。開発の途中で、RNA 解析プラットフォームを用いた一連の解析の始めの段階において、電気泳動ゲル上で Cyber gold のような高感度な RNA 検出法で検出できるものは同定することが可能であったが、LC-MS 分析では十分な MS および MS/MS スペクトルが観察できるが、Ariadne 検索ではヒットしないという問題点に遭遇した。様々な検討の結果、LC-MS 法や Ariadne の性能に起因する問題ではなく、検索エンジンが対象とする RNA データベースの不備によるものであったことが判明し、対象とする生物種のゲノム全体に対して検索できるソフトウェアの開発を行うこととした。これによって、実際に理研による Ariadne の改良が行われ、ゲノムワイドな検索エンジンの開発に結びつけることができた。現在では、十分な MS 及び MS/MS スペクトルが得られれば、Ariadne によって分析した RNA をゲノム上に帰属できるようになっている。

脊髄性筋萎縮症(SMA)原因タンパク質SMN1が関わる新規RNA代謝経路の同定



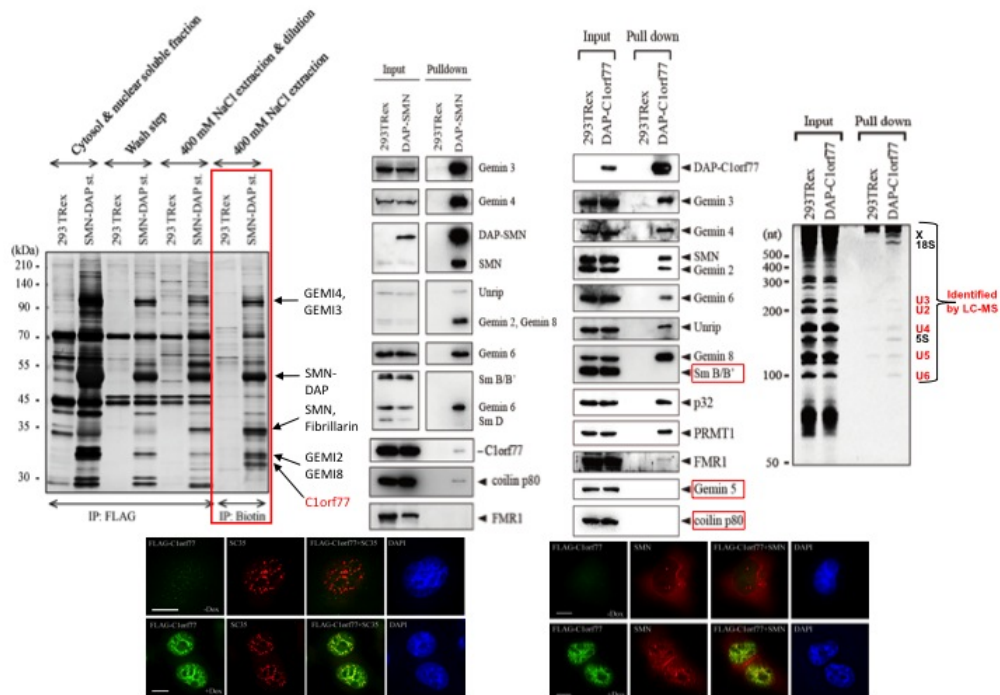
本研究では、単なる RNA 同定法としてではなく、RNA の直接解析を可能とする RNA 解析プラットフォームの優位点を検証するために、特に、転写後修飾を受けた様々な RNA の回収と同定により注力し、首都大と理研グループが開発した RNA 解析プラットフォームによる転写後修飾の解析能力と RNA-プロテオームの機能相関解析における有効性を評価した。具体的には、例えば、mRNA 前駆体のスプライシングに関わる U1 snRNA をモデルケースとし、その生合成・代謝経路における転写後修飾の変化を RNA 解析プラットフォームで検出できるかどうかを検討した。そのために、U1 snRNA に結合しその生合成・代謝に関わる一連のタンパク質 (PHAX、U1-70K、LUC7、SMN など) をベイトとして、

生合成・代謝の異なる段階で形成されるタンパク質複合体を調製し、転写後修飾も含めた RNA 解析と含まれるタンパク質の同定解析を行った。その結果、U1 snRNA の成熟段階に応じたタンパク質の結合と成熟初期の 5' 末端側のモノメチルキャップ化と成熟後期のトリメチルキャップ化など既知の全ての U1 snRNA の転写後修飾がまず確認された。しかし、この解析の過程で、U1 snRNA 分子種は、極僅かな割合で 3' 末端側 30~35 塩基からなるループ領域が切断された Short U1 を細胞質内で形成していること、その Short U1 は 5' 末端側でモノメチル化されたキャップ構造を持ち 5' 末端側 4 塩基内に 3 つのメチル基を持つ m⁷G(mmmAUAC)構造を含んでいることが見いだされた。また、RNA とタンパク質の同時解析によって、成熟型のトリメチル化キャップ構造 (m₃^{2,2,7}GAmUm) を持つ U1 snRNA と m⁷G(mmmAUAC)構造を持つ Short U1 には、それぞれ結合するタンパク質の種類に違いがあり、Short U1 は U1 snRNA より分子量の大きい複合体として存在していることも明らかになった。加えて、U1 snRNA は 5 種類の遺伝子として 47 loci にコードされているが、これらの内、発現制御領域を持つ 4 種類の遺伝子を単離し、それぞれについて発現系を構築して、これらの遺伝子と short U1 形成との関係を調べたところ、3' 末端側の 3' box と呼ばれる非転写領域が存在しない遺伝子から転写される場合に short U1 が生じやすいことが判明した。さらに、転写される U1 snRNA の 3' 末端側の SL4 と呼ばれるステムループ領域に欠損が入ると支配的に short U1 へと変換されることも明らかにした。これらの結果と他の結果から、short U1 は U1 snRNA 遺伝子の 3' box 領域あるいは SL4 領域に何らかの変異や欠損が生じた場合に生成され、それが未知の大きな複合体を形成することが明らかになった (石川ら、原著論文準備中)。この結果は、U1 snRNA を含むスプライセオソーム複合体の生合成において、異常な U1 snRNA が生じたときに、これを排除する今まで知られていない新たな代謝経路が存在する可能性を示している。U1 snRNA を含む複合体の解析は非常に良く研究されていたが、今回の結果は、まさしく、開発した RNA 解析プラットフォームによる転写後修飾も含めた優れた直接解析能力による結果であると考えられる。この RNA 解析プラットフォームは、他の snRNA、snoRNA だけでなく、他の様々な ncRNA についても同様の解析を可能とし、RNA の代謝経路の解明に新たな次元を開くポテンシャルを持つと思われる。

また、この一連の解析の中で、U1 snRNA など様々な U snRNAs からなるスプライセオソーム複合体の生合成に関わる SMN1 タンパク質複合体の単離も行った。その際に、「RNA 試料調製法の開発」の中で述べた高濃度の塩の存在下で複合体を回収する方法を適用した。その結果、SMN1 と相互作用する新規のタンパク質 (C1orf77) を同定した。これをベイトとして回収した RNA-タンパク質複合体 (C1orf77 複合体) は、U1 snRNA を含まず SMN1 複合体に存在するタンパク質成分と U5 snRNA および未同定の RNAs など低分子量の RNA 成分を含み、他に SMN 複合体では検出されていない 800~1000 b 程度の比較的高分子量の RNAs、そしてこれらより高分子量の RNAs を含んでいることが明らかになった。さらに、C1orf77 は、1) 主として不溶性のクロマチン/核マトリックス画分から回収され、核スペckルに局在する、2) 細胞増殖に関与し SMN1 の Cajal bodies/Gem への局在を決めている、3) FMR1 (Fragile X mental retardation 1 protein; 特定の mRNAs の核から細胞質への輸送や翻訳制御に関わる)、coilin (snRNAs/snoRNAs の生合成を行う Cajal bodies の構成成分) などの mRNA の存在量を調節している、4) クロマチン/核マトリックス画分中でスプライシングされた FMR1 や coilin の mRNAs と相互作用していることなども明らかになった。核内でスプライシングされた状態で存在している RNA としては、CTN RNA が知られている (Prasanth et al. Cell 2005) が、これらの結果は、C1orf77 が核スペckル内でスプライシングされた mRNA に結合し、CTN RNA などと同様に、それらの安定性に関わっている可能性を示唆している (泉川ら、原著論文投稿準備中)。C1orf77 が局在する核スペckルにはまた、MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) など poly(A) 様構造を持つ

つ ncRNAs も存在する (Wilusz et al. Cell 2008)。MALAT1 ncRNA の場合、RNase による切断で核スペックルから放出される。この場合には tRNA 様の約 60 b の非コード RNA を生成する。核スペックルは nrRNAs や ncRNAs など遺伝子発現制御を行う多くの RNAs を含み、関連する複数の遺伝子を集結させて協調した発現調節するための鍵となるハブ領域であると考えられている (Kumaran et al. Cell 2008)。Clorf77 はこの核スペックルに局在していることから、Clorf77 に結合して回収されてきた RNA が CTN RNA や MALAT1 などの nrRNAs や ncRNAs を含んでいる可能性がある。これらの結果は、通常の方法では回収しにくく、高い濃度の塩や界面活性剤等の存在下で RNA-タンパク質複合体を回収できる手法の重要性を示していると思われる。このように、今回の研究開発では、不溶性である画分から特定のタンパク質と相互作用する RNA を回収する手法も提供できた。

新規SMN1-複合体の単離と構成成分の同定



以上に加えて、SMN1-U1 snRNA 複合体中のタンパク質成分として同定した splicing factor 2-associated protein p32(SF2p32)についての機能解析から、このタンパク質がスプライシングの制御だけでなくリボソーム生合成において rDNA から転写された最も初期の rRNA 前駆体 47S pre-rRNA の中央部の切断で重要な役割を担っていることを明らかにした [23]。同時に、この解析によって、このタンパク質はリボソーム生合成の初期段階で役割を持つ FBL と後期段階で役割を持つ Nop52 を入れ替えることで、リボソーム生合成の初期段階に形成される 90S 前駆体を 60S 前駆体と 40S 前駆体に分割する役割を持つ、とする証拠も提示した。これらの結果は、細胞は如何なる分子機構で 40S と 60S のサブユニットを分割しているかという、分子生物学における根本的な命題に対する解答を与えている可能性がある。この SF2p32 にも 300 nt 以下の RNAs が結合しており、その解析も行った (吉川ら、原著論文投稿準備中)。同様の RNA/タンパク質複合体解析によって、今まで機能が知られていないタンパク質であるプロリン異性化酵素 par14 がリボソーム生合成過程の p32 とは異なる段階で機能していること [10]、DNA 修復酵素であると考えられていた RecQ5β が転写の障害に働いていること [7] などを明らかにした。また、リボソーム生合成の様々な段階に形成されるリボソーム前駆体複合体に含まれ、癌遺伝子産物としての働きがある LYAR が細胞内でリボソーム RNA の転写と

プロセッシングを制御していることも明らかにした（宮澤ら、原著論文投稿中）。LYARは様々なガン組織において発現が向上しており、これによってガン細胞の異常な増殖を支えるために必要なリボソーム合成が担保されている可能性がある。さらに、RNA代謝の際に5'末端あるいは3'末端側から塩基を切り出すエキソヌクレアーゼについてのRNA-タンパク質複合体解析から、その酵素活性を制御する新規の生体内因子の同定にも成功している（佐藤ら、原著論文投稿準備中）。これらの他に、共同研究として、FANCAがHsp90に相互作用しFanconi anemia DNA damage response pathwayを制御していることを明らかにし[3]、そして、P5やPDIなどの小胞体局在するタンパク質構造修飾酵素あるいはガン細胞表面に存在する癌抗原のタンパク質複合体解析によって、それぞれの新たな相互作用タンパク質も明らかにしている[4, 5]。

RNAを用いたRNA結合タンパク質の回収と同定

低分子RNAの塩基配列にタグとなるRNA配列を融合させた発現ベクターを細胞に導入し、タグ配列と相補的な配列を持つ合成オリゴヌクレオチドを固定化した担体で結合タンパク質を回収する方法の開発を試みた。目的とするRNAに結合するタンパク質とRNAを、予めそのRNAに結合することが知られている既知のタンパク質を固定化したカラムで回収する方法はRNA in tandem (RAT)法として知られている。本研究では、この方法を改良し、ベイトとするRNAだけでなく、それに結合するタンパク質にもタグを付加して共発現させることで目的のRNA-タンパク質複合体を分離する細胞発現系を構築した。この方法では、ベイトとなるRNAにPP7配列とタブロマイシン結合アプター配列を付加してU6プロモーター下で発現する。PP7結合タンパク質にはTEVプロテアーゼ切断部位を介してProtein Aドメインを融合した。7SK RNAをベイトとした実験で目的のRNA-タンパク質複合体を効率よく回収できることを確認した。この方法は細胞内でRNAをベイトとしてタンパク質複合体を回収する初めての手法である。この方法については、今後適用例を多くして行く必要がある。

[RNA/タンパク質ネットワークマップの作成]

本研究項目は、RNAとタンパク質の相互作用ネットワークマップの作成を可能とする方法論と技術を構築することを目指したものである。上記の研究項目で例を示したように、開発したRNA解析プラットフォームとプロテオミクスの手法との組み合わせは、新たなRNA-タンパク質相互作用を同定するための技術と方法論を提供している。今後は、RNA解析プラットフォームとプロテオミクスの手法を組み合わせた方法論を、より多くのタンパク質あるいはRNAに対して適用することで、今まで知られていないRNA-タンパク質相互作用を同定し、その結果を蓄積する必要があると思われる。既に、RNA/タンパク質複合体の解析で得られた結果を整理し、文献から収集した既知データとあわせてRNA-タンパク質相互作用ネットワークマップの作成を試み、酵母菌とヒトについて約800種類のRNA-タンパク質相互作用を、文献・遺伝子・タンパク質データベースとのリンクを張った形でリストアップした。また、RNA-タンパク質複合体のタンパク質の同定解析を自動化させるために、ビオチン化タグとFLAGタグを融合させたDAPタグを用い、表面プラズモン共鳴装置のマイクロチップ上でマイクロ送液システムを制御することで細胞抽出液からタンパク質複合体を二段階精製し、そのタンパク質成分のプロテアーゼ消化とLC-MS/MS分析を自動的に実現できるSPR-LC-MS/MSシステムの利用も検討した[6]。このような技術と、RNA解析プラットフォームの利用が可能になり、本格的なRNA-タンパク質の相互作用マップの作成の方法論が整えられたと言える。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究テーマでは、開発したRNA解析プラットフォームの応用例を示すことで、このプラットフォームの有効性を示した。特に、神経性疾患ではRNAの代謝異常を伴うものが多く、RNA解析プラットフォームの利用は、これらの発症機序の解明に寄与し、治療

法開発の新しい展開を加速すると考えられる。

また、RNA-タンパク質複合体をRNAとタンパク質の両面から解析する手法は、RNAとタンパク質が織りなす相互作用ネットワークを明らかにし、生命科学の新たな展開をもたらすことに大きく貢献することが考えられる。

本研究によって得られた研究成果は、神経疾患やガンの早期診断法や治療薬の開発に結びつく可能性あり、生命科学だけでなく、保険医療の分野にも大きな波及効果をもたらすと期待できる。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 23 件)

[1] Kakiuchi, K., Yamauchi, Y., Taoka, M., Iwago, M., Fujita, T., Ito, T., Song, S.Y., Sakai, A., Ichimura, T. and Isobe, T. "Proteomic analysis of in vivo 14-3-3 interactions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." **Biochemistry** **46**, 7781-7792 (2007). DOI: 10.1021/bi700501t

[2] Kaji, H., Kamiie, J., Kawakami, H., Kido, K., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Takahashi, N. and Isobe, T. "Proteomics reveals N-linked glycoprotein diversity in *Caenorhabditis elegans* and suggests an atypical translation mechanism of integral membrane proteins." **Mol. Cell. Proteomics** **6**, 2100-2109 (2007) DOI: 10.1074/mcp.M600392-MCP200

[3] Oda, T., Hayano, T., Miyaso, H., Takahashi, N., and Yamashita, T. (2007) Hsp90 regulates the Fanconi anemia DNA damage response pathway. **Blood**, **109**:5016-5026 (2007). DOI: 10.1182/blood-2006-08-038638

[4] Kurosawa, G., Akahori, Y., Morita, M., Sumitomo, M., Sato, N., Muramatsu, C., Eguchi, K., Matsuda, K., Takasaki, A., Tanaka, M., Iba, Y., Hamada-Tsutsumi, S., Ukai, Y., Shiraishi, M., Suzuki, K., Kurosawa, M., Fujiyama, S., Takahashi, N., Kato, R., Mizoguchi, Y., Shamoto, M., Tsuda, H., Sugiura, M., Hattori, Y., Miyakawa, S., Shiroki, R., Hoshinaga, K., Hayashi, N., Sugioka, A., and Kurosawa, Y. Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinomas via isolation of human monoclonal antibodies that may be therapeutic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. **105**:7287-7292 (2008). DOI: 10.1073/pnas.0712202105

[5] Kimura, T., Horibe, T., Sakamoto, C., Shitara, Y., Fujiwara, F., Komiya, T., Yamamoto, A., Hayano, T., Takahashi, N., and Kikuchi, M. (2008) Evidence for Mitochondrial Localization of P5, a Member of the Protein Disulfide Isomerase Family. **J. Biochem.** **144**:187-196. DOI: 10.1093/jb/mvn057

[6] Hayano, T., Yamauchi, Y., Asano, K., Tsujimura, T., Hashimoto, S., Isobe, T., and Takahashi, N. "Automated SPR-LC-MS/MS System for Protein Interaction Analysis." **J. Proteome Res.** **7**, 4183-4190 (2008). DOI: 10.1021/pr700834n

[7] Izumikawa, K., Yanagida, M., Hayano, T., Tachikawa, H., Komatsu, W., Shimamoto, A., Futami, K., Furuichi, Y., Shinkawa, T., Yamauchi, Y., Isobe, T., and Takahashi, N. "Association of human DNA helicase RecQ5b with RNA polymerase II and its possible role in transcription." **Biochem. J.** **413**, 505-516 (2008). DOI:10.1042/BJ20071392

[8] Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., Akira, S., Noda, T., Yoshimori, T. "Two

beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages." **Nature Cell Biol.**, **11**, 385-396 (2009) DOI: 10.1038/ncb1846.

[9] Nakayama, H., Akiyama, M., Taoka, M., Yamauchi, Y., Nobe, Y., Ishikawa, H., Takahashi, N. and Isobe, T. "Ariadne: a database search engine for identification and chemical analysis of RNA using tandem mass spectrometry data." **Nucleic Acids Res.** **37**, e47 (2009) DOI: 10.1093/nar/gkp099.

[10] Fujiyama-Nakamura, S., Yoshikawa, H., Homma, K., Hayano, T., Tsujimura-Takahashi, T., Izumikawa, K., Ishikawa, H., Miyazawa, N., Yanagida, M., Miura, Y., Shinkawa, T., Yamauchi, Y., Isobe, T., and Takahashi, N. "Parvulin (Par14), a peptidyl prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA-processing factor evolved in the metazoan lineage." **Mol. Cell. Proteomics** **8**; 1552-1565 (2009) DOI 10.1074/mcp.M900147-MCP200

[11] Aoki T, Ichimura S, Itoh A, Kuramoto M, Shinkawa T, Isobe T, and Tagaya M. "Identification of the neuroblastome-amplified gene product as a component of the syntaxin 18 complex implicated in Golgi-to-endoplasmic reticulum retrograde transport" **Mol. Biol. Cell.** **20**, 2639-49 (2009) DOI: 10.1091/mbc.E08-11-1104.

[12] Tomari T, Koshikawa N, Uematsu T, Shinkawa T, Hoshino D, Egawa N, Isobe T, and Seiki M. "High throughput analysis of proteins associating with a proinvasive MT1-MMP in human malignant melanoma A375 cells" **Cancer Sci.** **100**, 1284-90 (2009) DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01173.x

[13] Fujiyama-Nakamura S, Ito S, Sawatsubashi S, Yamauchi Y, Suzuki E, Tanabe M, Kimura S, Murata T, Isobe T, Takeyama K, Kato S. "BTB protein, dKLHL18/CG3571, serves as an adaptor subunit for a dCul3 ubiquitin ligase complex" **Genes Cells.** **14**, 965-73 (2009). DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01323.x

[14] Okada M, Okawa K, Isobe T, and Fukagawa T. "CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-a in cooperation with FACT and CHD1" **Mol. Biol. Cell.** **20**, 3986-95 (2009) DOI: 10.1091/mbc.E09-01-0065.

[15] Niiya D, Egawa N, Sakamoto T, Kikkawa Y, Shinkawa T, Isobe T, Koshikawa N, and Seiki M. "Identification and characterization of Lutheran blood group glycoprotein as a new substrate of MT1-MMP: a systematic whole-cell analysis of MT1-MMP-associating proteins in A431 cells" **J. Biol. Chem.**, **284**, 27360-9 (2009) DOI: 10.1074/jbc.M109.029124.

[16] Taoka, M., Yamauchi, Y., Nobe, Y., Masaki, S., Nakayama, H., Ishikawa, H., Takahashi, N. and Isobe, T. "An analytical platform for mass spectrometry-based identification and chemical analysis of RNA in ribonucleoprotein complexes." **Nucleic Acids Res.** **37**, e140 (2009) DOI: 10.1093/nar/gkp732

[17] Nozumi M, Togano T, Takahashi-Niki K, Lu J, Honda A, Taoka M, Shinkawa T, Koga H, Takeuchi K, Isobe T, Igarashi M. "Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone." **Proc Natl Acad Sci U S A.** **106**, 17211-6. (2009) DOI: 10.1073/pnas.0904092106.

[18] Taoka M, Ikumi M, Nakayama H, Masaki S, Matsuda R, Nobe Y, Yamauchi Y, Takeda J, Takahashi N. and Isobe T. "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of RNA from fluorescently stained polyacrylamide gels." **Anal. Chem.**

82, 7795-7803 (2010) DOI: 10.1021/ac101623j.

[19] Asaoka Y, Kanai F, Ichimura T, Tateishi K, Tanaka Y, Ohta M, Seto M, Tada M, Ijichi H, Ikenoue T, Kawabe T, Isobe T, Yaffe MB, Omata M. "Identification of a suppressive mechanism for Hedgehog signaling through a novel interaction of Gli with 14-3-3." *J. Biol. Chem.* **285**, 4185-4194 (2010). DOI: 10.1074/jbc.M109.038232.

[20] Tando T, Ishizaka A, Watanabe H, Ito T, Iida S, Haraguchi T, Mizutani T, Izumi T, Isobe T, Akiyama T, Inoue J, Iba H. "Requiem protein links RelB/p52 and the Brm-type SWI/SNF complex in a noncanonical NF-kappaB pathway." *J Biol. Chem.*, **285**, 21951-21960 (2010). DOI: 10.1074/jbc.M109.087783.

[21] Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Ohno H, Tsuchiya Y, Kamata H, Tahara H, Isobe T, Nishimura F, Katagiri H, Oka Y, Fukushima T, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. "Pin1 associates with and induces translocation of CRTC2 to the cytosol, thereby suppressing camp-responsive element transcriptional activity" *J. Biol. Chem.*, **285**; 33018--33027 (2010). DOI: 10.1074/jbc.M110.137836.

[22] Terukina, G., Yoshida, Y., and Takahashi, N., The peptidyl-prolyl cis-trans isomerase xFKBP1B induces an ectopic secondary axis and is involved in eye formation during *Xenopus* embryogenesis, *Dev Growth Differ.* **53**(1):55-68 (2011). DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01227.x.

[23] Yoshikawa H, Komatsu W, Hayano T, Miura Y, Homma K, Izumikawa K, Ishikawa H, Miyazawa N, Tachikawa H, Yamauchi Y, Isobe T, and Takahashi N. Splicing Factor 2-associated Protein p32 Participates in Ribosome Biogenesis by Regulating the Binding of Nop52 and Fibrillarin to Pre-ribosome Particles *Mol. Cell. Proteomics* **10**;1-23 (2011). DOI:10.1074/mcp.M110.006148

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

① 書籍

[1] Takahashi N. & Isobe T. "Proteomic Biology using LC/MS: Large Scale Analysis of Cellular Dynamics and Function" John Wiley & Sons Inc. 2007/09, pp1-250.

② 総説

[1] Nagano, K., Yoshida, Y. and Isobe, T. "Cell surface Biomarkers of Embryonic Stem Cells." *Proteomics* **8**, 4025-4035 (2008). DOI: 10.1002/pmic.200800073

[2] Kaji, H. and Isobe, T. "Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS)-based Glycoproteomics Technologies for Cancer Biomarker Discovery." *Clinical Proteomics* DOI 10.1007/s12014-008-9004-1 (2008).

[3] Takahashi, N. The study of ribonucleoproteomics with mass spectrometry (MS)-based technology (Editorial as Guest Editor), Special issue, *Mass Spectrometry Reviews* Nov. 4, 2009 early online DOI 10.1002/mas.20274

[4] Nakayama, H., Takahashi, N., and Isobe, T., Informatics for mass spectrometry-based RNA analysis, *Mass Spectrometry Reviews*, 2011 Feb 16. DOI: 10.1002/mas.20325.

[5] Takahashi, N. The study of ribonucleoproteomics using mass spectrometry

(MS)-based technologies; Forming the firm basis of genome wide-RNA analysis, (Editorial as Guest Editor), Special issue, *Mass Spectrometry Reviews*, 2010 Dec 22 DOI: 10.1002/mas.20321

[6] 田岡万悟、中山洋、高橋信弘、磯辺俊明「リボスクレオプロテオミクス研究に向けた LC-MS システムの開発」明日を拓く新次元プロテオミクス(細胞工学別冊) 学研メディカル秀潤社 2009/12, pp91-101.

[7] 中山洋「高感度質量分析のための液体クロマトグラフィー」明日を拓く新次元プロテオミクス(細胞工学別冊) 学研メディカル秀潤社 2009/12, pp26-31.

[8] 高橋信弘、磯辺俊明、RNA ワールドとタンパク質ワールドの遭遇 (特集:RNA の時空間的動態をみる:リボスクレオプロテオミクスによる細胞機能の解明から RNA 医薬まで/企画 磯辺俊明, 高橋信弘)、実験医学 28: 2564-2570、2010.

[9] 中山 洋・田岡万悟・磯辺俊明、質量分析法による RNA の直接解析 (特集:RNA の時空間的動態をみる:リボスクレオプロテオミクスによる細胞機能の解明から RNA 医薬まで/企画 磯辺俊明, 高橋信弘)、実験医学 28: 2581-2587、2010

[10] 宮澤直樹・泉川圭一・石川英明・高橋信弘、RNA-タンパク質相互作用(複合体)ネットワーク解析 (特集:RNA の時空間的動態をみる:リボスクレオプロテオミクスによる細胞機能の解明から RNA 医薬まで/企画 磯辺俊明, 高橋信弘)、実験医学 28: 2594-2603、2010

[11] 長野光司、田岡万悟「質量分析法による RNA 医薬品の代謝解析」(特集:RNA の時空間的動態をみる、リボスクレオプロテオミクスによる細胞機能の解明から RNA 医薬まで/企画 磯辺俊明, 高橋信弘) 実験医学 28, 2588-2593、(2010)

[12] 石川英明、技術解説:RNA とタンパク質の抽出 (特集:RNA の時空間的動態をみる、リボスクレオプロテオミクスによる細胞機能の解明から RNA 医薬まで/企画 磯辺俊明, 高橋信弘)、実験医学 28, 2571、2010

[13] 泉川圭一、技術解説:次世代シーケンサー (特集:RNA の時空間的動態をみる、リボスクレオプロテオミクスによる細胞機能の解明から RNA 医薬まで/企画 磯辺俊明, 高橋信弘)、実験医学 28: 2571-2572、2010

[14] 田岡万悟、「技術解説:質量分析」(特集:RNA の時空間的動態をみる、リボスクレオプロテオミクスによる細胞機能の解明から RNA 医薬まで/企画 磯辺俊明, 高橋信弘)、実験医学 28: 2572、2010

[15] 中山 洋、「技術解説:質量分析データ解析ソフトウェア」(特集:RNA の時空間的動態をみる、リボスクレオプロテオミクスによる細胞機能の解明から RNA 医薬まで/企画 磯辺俊明, 高橋信弘)、実験医学 28: 2573、2010

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 17 件、国際会議 2 件)

[1] 磯辺俊明「リボスクレオプロテオミクス:大規模解析からのアプローチ」電気泳動シンポジウム、横浜、2007/6/22

[2] 田岡万悟「リボスクレオプロテオミクス:LC-MS を基盤とした低分子 RNA 同定法の開発」平成 20 年度新潟生化学懇話会、新潟、2008/6/21

[3] Isobe T. "Development of RNA Mass Spectrometry for Ribonucleoproteomic Analysis." MPSA 2008 (17th International Meeting of Methods in Protein Structure) Preconference Symposium, Sapporo, Japan, 2008/8/26-29

[4] Takahashi N. "Proteomic characterization of human pre-ribosome particles." MPSA 2008 (17th International Meeting of Methods in Protein Structure), Sapporo, Japan, 2008/8/26-29

[5] 田岡万悟「リボヌクレオプロテオミクス研究のためのプラットフォーム開発」日本ヒトプロテオーム機構第6回大会、大阪、2008.7/29-30

[6] 高橋信弘「プロテオミクスの最近の進歩と展開」日本アミノ酸学会第2回学術大会、東京、2008/10/2-3

[7] 高橋信弘「PPlase に関する総論、および、その天然の基質について(シンポジウム)」第8回タンパク質科学学会、東京、2008/6/10-11

[8] 梶 裕之、磯辺 俊明、成松 久「腫瘍バイオマーカー探索のためのグライコプロテオーム解析法」日本ヒトプロテオーム機構第6回大会、大阪、2008/7/29-30

[9] 磯辺 俊明「プロテオミクス研究の最近の進歩」日本ヒトプロテオーム機構第7回大会、東京、2009/7/27-28

[10] 磯辺俊明「RNA 代謝解析のための質量分析プラットフォームの開発」CREST “代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術”研究領域 第2回公開シンポジウム、東京、2009/10/16

[11] 高橋信弘「最近のプロテオミクス研究技術の進歩:信頼性の向上と定量化」、総合脳プロテオミクス講演会、東京、2009/11/2-3

[12] 高橋信弘「プロテオミクス:蛋白およびその修飾の 同定における最新の分析法の進展」骨・軟骨フロンティア(BCF)、東京、2009/11/28

[13] 田岡万悟「リボヌクレオプロテオミクス:液体クロマトグラフィーと質量分析を基盤とした低分子 RNA 同定法の開発」日本分光学会平成21年度生細胞分光部会シンポジウム、東京、2009/12/4

[14] 磯辺俊明「RNA 代謝解析のための質量分析プラットフォームの開発」さきがけシンポジウム第1回“RNAと生体機能”領域研究報告会、東京、2009/12/15

[15] 高橋 信弘「最近のプロテオミクス分析技術の進展と応用:- リボヌクレオプロテオミクス研究に向けて」東京都精神医学総合研究所セミナー、東京、2010/6/16

[16] 磯辺俊明「リボヌクレオプロテオミクス研究のための質量分析システムの開発」サーモ質量分析フォーラム、東京、2010/7/16

[17] 中山 洋、リボヌクレオプロテオミクス: RNA タンパク質複合体の直接分析、BMAS2010、宮城県松島市、2010/7/22-23

[18] 磯辺俊明「プロテオミクス研究のための LC-MS 法」日本ヒトプロテオーム機構第8回大会、東京、2010/7/26-27

[19] 中山 洋「LC-MS/MS の基礎と新展開」日本プロテオーム学会、新潟、2011/7/28-29

② 口頭発表 (国内会議 4 件、国際会議 0 件)

[1] 高橋信弘「RNA/タンパク質複合体のトータル解析」日本ヒトプロテオーム機構 第 5 回大会シンポジウム、東京、2007/7/30-31

[2] 石川英明、泉川 桂一、吉川 治孝、宮澤 直樹、照喜名 悟朗、磯辺 俊明、高橋 信弘「ヒト細胞におけるリボソーム生合成制御機構:40S サブユニット成熟の最終段階に関わる新規因子の同定」、2010 農芸化学会シンポジウム、東京、2010/3/28-30

[3] 竹田純、延優子、安達公祐、斎藤裕一朗、山内芳雄、田岡万悟、磯辺俊明、分裂酵母 RNase MRP のエンドヌクレアーゼ活性は進化的に高度に保存されたリボヌクレオタンパク質コアに存在する、BMB2010、神戸 2010 年 12 月 7~10 日

[4] 高橋 信弘、石川 英明、泉川 桂一、中山 洋、磯辺 俊明「神経疾患の病因解明に向けたリボヌクレオプロテオミクス解析」日本ヒトプロテオーム機構第 9 回大会シンポジウム、新潟 2011 年 7 月 29 日

③ ポスター発表 (国内会議 36 件、国際会議 11 件)

[1] Ishikawa, H., Tachikawa, H., and Takahashi, N. "TRIM11 regulates transcription through degradation of a key component of the transcription mediator complex (ARC105) with ubiquitin-proteasome system." 第 40 回発生生物学会-第 59 回細胞生物学会合同大会、博多、2007/5/28-30

[2] Isobe, T., Yamauchi, Y., Taoka, M., Kaji, H., Takahashi, N. "Development of mass spectrometry-based analytical platform for small RNAs and ribonucleoprotein complexes", FEBS 2007, Austria, Vienna, 2007/7/8-12.

[3] Takahashi, N., Tsujimura, T., Yoshikawa, H., Ishikawa, H., Hayano, T., Yanagida, M., Fujiyama, S., Kawasaki, M., Shinkawa, T., Yamauchi, Y., and Isobe, T. "Dynamic analysis of complex ribonucleoprotein assembly using quantitative LC-MS methods" FEBS 2007, Austria, Vienna, 2007/7/8-12.

[4] Ishikawa, H., Tachikawa, H., Miura, Y., and Takahashi, N. "Regulation of the ARC105-mediated transcription by TRIM11", FEBS 2007, Austria, Vienna, 2007/7/8-12.

[5] 山内芳雄、中山 洋、延 優子、垣内一恵、田岡万悟、高橋信弘、磯辺俊明 「リボヌクレオプロテオミクス：低分子 RNA 質量分析法の開発に向けた基礎検討」日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会、東京、2007/7/30-31

[6] 早野俊哉、高橋信弘「Treacher Collines 症候群原因遺伝子産物 Treacle の機能解析」日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会、東京、2007/7/30-31

[7] 葛西秀俊、早野俊哉、高橋信弘、饗場篤「mGluR1 の複合体分析による小脳機能の解析」日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会、東京、2007/7/30-31

[8] 田岡万悟、山内芳雄、中山 洋、延 優子、石川英明、高橋信弘、磯辺俊明、リボヌクレオプロテオミクスのための低分子 RNA 質量分析法の開発、第 8 回タンパク質科学会、東京、2008, 6/10-11

[9] 井汲真希、田岡万悟、山内芳雄、延 優子、中山 洋、磯辺俊明「リボヌクレオプロテオミクス：低分子 RNA 質量分析法のためのゲル内消化法の検討」第 8 回タンパク質科学会、東京、2008, 6/10-11

[10] 吉田陽子、鷺田元久、新川高志、谷 知美、山内芳雄、磯辺俊明「代謝標識法を用いたマウス ES 細胞クロマチン結合タンパク質の大規模プロテオーム解析」第 8 回タンパク質科学会、東京、2008, 6/10-11

[11] Terukina G., Yoshida Y., Yoshikawa H., and Takahashi N., "Proteomic analysis of XFKBP-associated protein complex formed during secondary axis formation in *Xenopus laevis* embryo." 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science (PRICPS) and 5th Asian Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO), Cairns, Australia, 2008. 6/22-26.

[12] Yoshikawa H., Kawasaki M., Komatsu W., Yanagida M., Hayano T., Izumikawa K., Ishikawa H., Shinkawa T., Yamauchi Y., Isobe T., and Takahashi N., "Proteomic analysis of proteins associated with splicing factor-2 associated protein p32 revealed its possible involvement in human ribosome biogenesis." 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science (PRICPS) and 5th Asian Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO), Cairns, Australia, 2008, 6/22-26.

[13] Nakayama H., Taoka M., Yamauchi Y., Akiyama M., Ishikawa H., Takahashi N., Isobe T., "A computational method for RNA identification using tandem mass spectrometry data." RNA 2008 (13th Annual Meeting of the RNA Society), Berlin, Germany, 2008 7/28-8/3

[14] 黒川奈月、泉川桂一、高橋信弘「Cdc-like kinase 1 (CLK1)はスプライシング因子を pre-mRNA 上でリン酸化している？(CLK1 probably phosphorylates splicing factors on pre-mRNA during RNA polymerase II transcription)」BMB 2008, 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会、神戸、2008/12/9-12

[15] 照喜名悟朗、吉田陽子、吉川治孝、高橋信弘「アフリカツメカエル初期発生時における二次軸誘導因子 XFKBP のプロテオミクスの手法を用いた機能解析 (Proteomic analysis of XFKBP-associated protein complex formed during secondary axis formation in *Xenopus laevis* embryo)」BMB 2008, 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会、神戸、2008/12/9-12

[16] 吉川治孝、川崎実由希、小松 渉、柳田光昭、早野俊哉、高橋信弘、「核小体タンパク質 fibrillarin と NNP1 は SF2p32 へ競合的に相互作用する」BMB 2008, 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会、神戸、2008/12/9-12

[17] 石川英明、吉川治孝、照喜名悟朗、泉川桂一、磯辺俊明、高橋信弘「40S リボソームサブユニット核外輸送に関する解析」BMB 2008, 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会、神戸、2008/12/9-12

[18] 正木俊平、田岡万悟、松田亮蔵、山内芳雄、中山洋、延優子、高橋信弘、磯辺俊明「出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) から精製した snRNA/タンパク質複合体のリボヌクレオプロテオミクス解析」日本ヒトプロテオーム機構第7回大会、東京、2009/7/27-28.

[19] 高橋信弘、石川英明、泉川圭一、吉川治孝、照喜名悟朗、中山洋、秋山美沙紀、

延優子、正木俊平、山内芳雄、田岡万悟、磯辺俊明「質量分析プラットフォームによる RNA とプロテオームの機能相関解析」CREST “代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術”研究領域 第 2 回公開シンポジウム、東京、2009/10/16

[20] 中山洋、秋山美沙紀、石川英明、高橋信弘、延優子、正木俊平、山内芳雄、田岡万悟、磯辺俊明「Ariadne: RNA の質量分析を支援する DB 検索エンジン」CREST “代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術”研究領域 第 2 回公開シンポジウム、東京、2009/10/16

[21] Takeda J., Nobe Y., Adachi K., Saito Y., Yamauchi Y., Taoka M. and Isobe T. "Ribonucleo-Proteomics of Essential Ribonucleases RNase P and MRP" Pombe2009 (The 5th International Fission Yeast Meeting), Tokyo, Japan 2009/10/26-31

[22] Takeda J., Nobe Y., Yamauchi Y., Taoka M. and Isobe T. "Holoenzyme Constitution of Ribonuclease P/MRP requires Non-Coding RNA subunits" 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009/12/9-12.

[23] Ito Masako, Hirano Syoko, Izumikawa Keiichi, Hayano Tosiya, Tsujimura Teruko, Yoshikawa Harunori, Ishikawa Hideaki, Taoka Masato, Ichimura Toru, Isobe Toshiaki, and Takahashi Nobuhiro, Roles of treacle in ribosome biogenesis: Isolation and characterization of the treacle-associated UBF/Pol I-transcription complex, BMB 2009, 第 32 回分子生物学会、横浜、2009/12/9-12

[24] Harunori Yoshikawa, Wataru Komatsu, Toshiya Hayano, Yutaka Miura, Keiichi Izumikawa, Hideaki Ishikawa, Keiichi Honma, Hiroyuki Tachikawa, Yoshio Yamauchi, Toshiaki Isobe, and Nobuhiro Takahashi, Involvement of splicing factor 2-associated protein p32 (C1QBP/ HABP1) in human ribosome biogenesis, BMB 2009, 第 32 回分子生物学会、横浜、2009/12/9-12

[25] Naoki Miyazawa, Ai Suzuki, Toshiya Hayano, Harunori Yoshikawa, Keiichi Izumikawa, Hideaki Ishikawa, Mitsuki Yanagida, Sally Fujiyama-Nakamura, Akira Watanabe, Hiroyuki Aburatani, Toshiaki Isobe, and Nobuhiro Takahashi, Involvement of hLysr in cell growth and ribosome biogenesis., BMB 2009, 第 32 回分子生物学会、横浜、2009/12/9-12

[26] Shigeko Sato, Hideaki Ishikawa, Izumikawa Keiichi, and Nobuhiro Takahashi, Cellular function of CARF that binds to a tumor suppressor ARF, BMB 2009, 第 32 回分子生物学会、横浜、2009/12/9-12

[27] Goro Terukina, Yoko Yishida, and Nobuhiro Takahashi, Xenopus FKBP1B induces ectopic secondary axis and is involved in eye formation, BMB 2009, 第 32 回分子生物学会、横浜、2009/12/9-12

[28] Daisuke Uehara, Maiko Sakamoto, Harunori Yoshikawa, Keiichi Izumikawa, Toshiya Hayano, Jun Komano, and Nobuhiro Takahashi, Proteomic search for the function of HIV-1 Rev protein in human cells, BMB 2009, 第 32 回分子生物学会、横浜、2009/12/9-12

[29] Hideaki Ishikawa, Harunori Yoshikawa, Naoki Miyazawa, Goro Terukina, Keiichi Izumikawa, Toshiaki Isobe, and Nobuhiro Takahashi, Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) regulates the final maturation of human 40S ribosomal subunit, BMB 2009, 第 32 回分子生物学会、横浜、2009/12/9-12

[30] Keiichi Izumikawa, Toshiya Hayano, Teruko Tsujimura, Shoko Hirano, Hideaki Ishikawa, Harunori Yoshikawa, Naoki Miyazawa, Masako Ito, Masato Taoka, Toru Ichimura, Toshiaki Isobe, and Nobuhiro Takahashi, Roles of nucleolar protein Treacle in rRNA transcription, BMB 2009, 第 32 回分子生物学会、横浜、2009/12/9-12

[31] H. Ooshima, Y. Hayashi, H. Yoshikawa, T. Hayano, Ben C. Valdez, and N. Takahashi, Roles of RNA helicase II/Gu in molecular mechanism underlining ribosome biogenesis, BMB 2009, 第 32 回分子生物学会、横浜、2009/12/9-12

[32] Sally Fujiyama-Nakamura, Harunori Yoshikawa, Keiichi Homma, Toshiya Hayano, Teruko Tsujimura-Takahashi, Keiich, Izumikawa, Hideaki Ishikawa, Naoki Miyazawa, Mitsuaki Yanagida, Yutaka Miura, Takashi Shinkawa, Yoshio Yamauchi, Toshiaki Isobe, and Nobuhiro Takahashi, A peptidyl-prolyl cis-trans isomerase parvulin (Par14) is involved in mammalian ribosome biogenesis, BMB 2009, 第 32 回分子生物学会、横浜、2009/12/9-12

[33] 竹田純、延優子、安達公祐、斎藤裕一郎、山内芳雄、田岡万悟、磯辺俊明、分裂酵母 RNase MRP のエンドヌクレアーゼ活性は進化的に高度に保存されたリボヌクレオタンパク質コアに存在する、BMB2010、神戸 2010 年 12 月 7～10 日

[34] 中山 友珂、坂井 祐介、秋山 真澄、高橋 信弘、早野 俊哉、ヒト hnRNP U の細胞質およびミトコンドリアリボソーム生合成過程への関与、BMB2010、神戸 2010 年 12 月 7～10 日

[35] 小川 琢史、小野 祐嗣、緒方 祐也、平澤 明、辻本 豪三、高橋 信弘、早野 俊哉、Casein Kinase 2 基質タンパク質の網羅的探索、BMB2010、神戸 2010 年 12 月 7～10 日

[36] 小林 雅幸、貞島 祥平、三河 周平、葛西 秀俊、饗場 篤、高橋 信弘、早野 俊哉、低分子量 G タンパク質 Rac1 および Rac3 の新規エフェクターの探索、BMB2010、神戸 2010 年 12 月 7～10 日

[37] Abdelhamid RF, Yamauchi Y, Isobe T, Hayashizaki Y, Carninci P. Characterization of 5'-cap structure of small RNAs. BMB2010、神戸 2010 年 12 月 7～10 日

[38] Nakayama H, "Mass spectrometry-based identification and characterization of RNA for ribonucleoproteomics", 2010 RIKEN Chemical Biology International Symposium, Saitama, Japan, 2010 10/26-27.

[39] Taoka M., Masaki S., Nakayama, H., Yamauchi Y., Isobe T., Mass spectrometry-based characterization of RNAs and proteins in functional cellular ribonucleoprotein complexes. ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, CO, USA, 2011 6/4-10.

[40] Nakayama H. Yamauchi Y., Taoka M., Nobe Y., Takahashi N., Isobe T., Mass spectrometry-based shotgun identification of multiple RNAs in functional ribonucleoprotein complexes. ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, CO, USA, 2011 6/4-10.

[41] Yoshikawa H, Komatsu W, Hayano T, Miura Y, Homma K, Izumikawa K, Ishikawa H, Miyazawa N, Tachikawa H, Yamauchi Y, Isobe T, Takahashi N. Involvement of p32, fibrillarin, and Nop52 in pre-40S/pre-60S particle separation during human ribosome

biogenesis. The 2011 ASCB Annual Meeting in Denver, CO, USA 2011 12/3-7

[42] 石川英明、泉川桂一、吉川治孝、佐藤慈子、宮澤直樹、三浦豊、千葉一裕、高橋信弘、中山洋、延優子、山内芳雄、田岡万悟、磯辺俊明、RNA解析プラットフォームによる神経疾患発症機構の解析、CREST シンポジウム 2011 11/1、東京

[43] 吉川治孝、小松渡、早野俊哉、三浦豊、宮澤直樹、泉川桂一、石川英明、宮澤直樹、舘川宏之、山内芳雄、磯辺俊明、高橋信弘、ヒトリボソーム 90S 前駆体の 60S・40S 前駆体への分割機構、第 34 回分子生物学会、横浜、2011 12/13-16

[44] 安村大樹、吉川治孝、大嶋一史、Ben C. Valdez、高橋信弘、ヒトリボソーム合成における RNA helicase II/Guα の作用機序の解析、第 34 回分子生物学会、横浜、2011 12/13-16

[45] 泉川桂一、石川英明、延優子、中山洋、吉川治孝、宮澤直樹、田岡万悟、磯辺俊明、高橋信弘、新規核内 SMN 複合体結合因子の機能解析、第 34 回分子生物学会、横浜、2011 12/13-16

[46] 石川英明、泉川桂一、延優子、山内芳雄、田岡万悟、中山洋、磯辺俊明、高橋信弘、U1 snRNA 代謝中間体に結合する新規 SMN1 複合体の同定、第 34 回分子生物学会、横浜、2011 12/13-16

[47] Miyazawa, N., Yosikawa, H., Magae, S., Ishikawa, H., Izumikawa, H., Terukina, G., Suzuki, A., Nakamura-Fujiyama, S., Miura, Y., Hayano, T., Isobe, T., Watanabe, A., Aburatani, H., Takahashi, N., Human cell growth regulator LYAR accelerates ribosome biogenesis, 第 34 回分子生物学会、横浜、2011 12/13-16

(4)知財出願

①国内出願 (2 件)

1. 発明の名称：リボ核酸同定装置、リボ核酸同定方法、プログラムおよびリボ核酸同定システム

発明者：中山 洋、秋山美沙紀、田岡万悟、山内芳雄、石川英明、高橋信弘、磯辺俊明

出願人：理化学研究所、首都大学東京、東京農工大学

出願日：2008 4/17

出願番号：特願 2008-108369

2. 発明の名称：微量流量 LC-MS 分析用スプレー安定化の補助溶媒導入方法および導入装置

発明者：山内芳雄、磯辺俊明

出願人：首都大学東京

出願日：2009 6/8

出願番号：特願 2009-137085

②海外出願 (2 件)

1. (各国移行段階)

件名：Apparatus for the identification of ribonucleic acid, method for the identification of ribonucleic acid and program and system for the identification of ribonucleic acid

出願国：米国
出願番号：12/988,037

件名：リボ核酸同定装置、リボ核酸同定方法、プログラムおよびリボ核酸同定システム
出願国：日本
特願 2010-508258

2. 発明の名称：リボ核酸同定装置、リボ核酸同定方法、プログラムおよびリボ核酸同定システム
発明者：中山 洋、秋山美沙紀、田岡万悟、山内芳雄、石川英明、高橋信弘、磯辺俊明
出願人：理化学研究所、首都大学東京、東京農工大
出願日：2009 4/17
出願番号：PCT/JP2009/057739
出願国：PCT ルート全指定

- ③その他の知的財産権
特になし

(5)受賞・報道等

①受賞

磯辺 俊明：クロマトグラフィー科学会 学術貢献賞
平成 21. 11. 12

受賞理由：クロマトグラフィー科学に対する長年にわたる学術的な貢献

磯辺 俊明：第1回日本プロテオーム学会賞
平成 22.07.27

受賞理由：液体クロマトグラフィー・質量分析法を中心とするプロテオーム解析技術の開発とその応用

② マスコミ(新聞・TV等)報道

「RNA 判別精度高める：微小構造の差検出」日経産業新聞 2008. 6. 12

- ③その他
なし

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

1. 本研究の成果として出てきた特願 2008-108369 (PCT/JP2009/057739) ならびに特願 2009-137085 を含む RNA 解析技術の企業化について、民間企業 1 社と協議中

2. CREST の研究成果 (特願 2009-137085) 「ナノエレクトロスプレーイオン化方法及び装置」(2009. 6. 8 出願) が特許出願公開された (公開日 2010/12/16; 特開 2010-281777)。また同特許を、独占ライセンス契約を締結している Intellectual Ventures 社を通じて米国へ PCT 出願した。

3. RNA 検索ソフトウェア「Ariadne」に関して国内の情報関連企業と商業化について協議中。

4. 開発したプログラム「Ariadne」をインターネットで公開中
(URL: www.ariadne.riken.jp/)

②社会還元的な展開活動

1. 中山 洋 「質量分析をもちいた RNA 同定法」JST 新技術説明会、東京、2008/6/26
2. 磯辺俊明、中山 洋、山内芳雄、延 優子、田岡万悟、石川英明、高橋信弘 「先端医療開発のための RNA 質量分析法の開発」東京都研究シーズ発表会 2008、東京、2008/11/10
3. 井汲真希、磯辺俊明、中山 洋、山内芳雄、延 優子、田岡万悟、石川英明、高橋信弘 「RNA 創薬を目指す質量分析法」東京都研究シーズ発表会 2008、東京、2008/11/10

§ 6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2007/7/30-31	JHUPO 第 5 回大会	日本科学 未来館 (東京)	約 1,000 名	プロテオミクス研究の現状と動向 (大会会頭・磯辺)
2008/11/7	「代謝」研究領域第1回 公開シンポジウム	コクヨホール	251 名	CREST 研究課題の 成果について口頭 およびポスターに て発表
2009/10/16	「代謝」研究領域第2回 公開シンポジウム	日本科学 未来館・み らいCAN ホール	155 名	CREST 研究課題の 成果について口頭 およびポスターに て発表
2010/3/30	日本農芸化学会年会	東京大学 本郷キャン パス	約 80 名	シンポジウム・リ ボソーム生合成研 究の新展開 (世話 人・高橋)
2011/07/29	JHUPO 第 9 回大会	新潟朱鷺 メッセ	約 300 名	シンポジウム・プ ロテオミクス生物 学から疾病発症機 序へ (世話人・磯 辺/高橋)
2011/11/1	「代謝」研究領域第4回 公開シンポジウム	東京大学・ 弥生講堂	139名	CREST 研究課題の 成果について口頭 およびポスターに て発表

§ 7 結び

本研究では生体試料から分離した RNA を直接解析できる質量分析システムの開発を目指した。本研究の分担者はいずれもタンパク質科学を専門としており、LC-MS ショットガン法をはじめとするプロテオミクスの解析システムの開発と応用に関する経験は豊

富なもの、RNA の取り扱いについての経験は少なかった。研究を開始した当初、RNA は、プロテオミクスが対象とするタンパク質などに比べて不安定かつ環境中に混在する RNase などによる分解を受けやすく、LC-MS のための前処理などが困難であることが危惧された。しかし実際に研究を開始してみると、試料の操作を実験室に設置した簡易型のクリーンベンチ内で行うなどの注意をするだけで、特別な問題なく取り扱って LC-MS 分析ができることがわかった。このことは、RNA を従来のように「情報」としてだけでなく、「物質」として化学的に取り扱うことが可能であることが明らかになった点で本研究の出発点となった。

本研究で開発した RNA 解析のための LC-MS システムは、国際的にも極めて独自性が高い方法であり、とりわけ RNase 消化物の MS/MS 情報からゲノムを検索して RNA を同定し、同時に化学構造を解析できるシステムとしては世界で唯一のものである。この LC-MS システムは、現状でも感度と分離能の点で世界の最高水準にあり、またゲノム検索ソフトウェアである Ariadne は世界で初めて開発された RNA 解析のためのゲノム検索エンジンである。RNA 研究は、予てから我が国が先導的な役割を果たしている分野の 1 つで、その基礎と応用に関する多くの優れた研究がある。また RNA の質量分析法では、この分野の先駆者である鈴木 勉教授（東大・工）が tRNA や piRNA の転写後修飾などに関する国際的な業績を挙げている。国外においても、欧米を中心に合成 DNA や RNA (siRNA など)、あるいは低分子 RNA の構造解析を目的とした MALDI-TOFMS や LC-MS 法、あるいは MS 情報を処理するためのデータ解析ソフトウェアの開発が進められおり、例えばプロテオミクス分野で多くの業績があるデンマーク University of Southern Denmark 大学の Kirpekar らのグループが MALDI-TOFMS データから原核生物ゲノムを検索して特定の RNA を同定できるソフトウェアを開発している。しかしながら、この方法は原理的にゲノムサイズの大きい真核生物への適用が困難であるほか、RNA 直接分析の大きな利点である転写後修飾の解析ができないなどの欠点がある。したがって現状では、生体試料に含まれる RNA を質量分析することで、ヒトを含むすべての生物に由来する RNA をゲノム上に帰属して同定できる方法は本法をおいて他にない。プロテオミクスを代表する研究室の 1 つであり、この分野のトップジャーナルである Molecular & Cellular Proteomics の Chief Editor である UCSF の Al Burlingame の研究室などから Ariadne のアクセスが増加していることは、このシステムが RNA とタンパク質を繋ぐ有力な方法の 1 つとして国際的に認知されてきたことの証と考えられる。

近年の研究から、いわゆる非コード RNA とタンパク質の複合体 (RNP 複合体) が転写や翻訳の調節だけでなく、染色体の安定性やタンパク質輸送などの細胞機能に重要な役割を担っていることが明らかになっている。RNA の代謝異常は、ガンや形態形成異常をとともなうさまざまなヒトの疾病の原因となることが知られており、特定の RNA を標的とした創薬や、RNA を本体とする医薬品の開発も進められている。実際に本研究では、農工大の高橋グループが、ここで開発したシステムを利用して、従来から多くの研究が行われている U1 snRNA の新しい代謝産物を見出して、その新規機能を示唆しただけでなく、ヒトの難治性神経変性疾患の病因やガンの発症にかかわる重要な発見に繋がる研究に成功しつつある。非コード RNA や RNP 複合体の研究はまだ始まったばかりであり、その構造と機能、生合成と細胞内での調節機構に関する研究や、その基礎となる RNA-タンパク質相互作用の研究は今後の生命科学研究の中心的な課題と考えられる。さらに本研究でも明らかにされた RNA-タンパク質相互作用の異常の解析は、ヒトの疾病の発症機構の解析や創薬研究に多くの新しい発見をもたらすものと考えられる。

これらの研究を支える従来の RNA 分析は、主として逆転写酵素によって変換した cDNA を解析する分子生物学的な方法やアレイを利用した方法などによって行われ、さらに最近開発された次世代ゲノムアナライザーは RNA の解析にも革新的な進歩をもたらす

つつある。これらの方法は、いずれも極めて高速かつ高感度で、生体試料に含まれる RNA の微量分析や網羅的な解析に適しているが、依然として多くの RNA の機能発現や機能調節に重要な転写後修飾や生体内でのプロセッシングなどの解析が難しい欠点がある。本研究で開発した RNA の質量分析法は、生体から分離した RNP 複合体などに含まれる RNA 成分をタンパク質と同一のプラットフォームで同定と同時に定量し、その転写後修飾を直接高感度で解析できる優れた特徴を持っている。この点で RNA の質量分析法は、従来法と相補的な RNA の分析法、とりわけ RNA の代謝や体内動態、ならびに化学修飾の実態を解明する手段として、今後ますますその重要性を増すものと考えられる。

以上、本研究の成果や意義について述べた。本研究は、RNA の質量分析法に関する日本発の技術を、実際の生命科学研究に寄与できるレベルで開発できた点で高く評価できる。その意味では、本研究は当初の目標を十分に達成できたと自己評価している。しかし分析法としては、miRNA などの超微量 RNA 成分の解析をも可能とする感度の向上や、より高速で多くの RNA の修飾の実態を網羅的に解析できる分離能、あるいは RNA 創薬研究により特化した技術の開発など、今後の課題の解決に向けた出発点を築いた研究ということもできる。本研究の成果が、我が国が先導してきた RNA 研究とタンパク質研究を繋ぐ技術の 1 つとして今後の生命科学研究に寄与することを願いたい。

[プロジェクト運営について]

本研究では、開発中のシステムを実際の生体試料分析に適用し、その結果の検証と評価を繰り返しながら開発を進めた。首都大学では、RNA/RNP 試料調製の材料としてモデル生物の酵母 (*S. cerevisiae*) を使用して開発過程のシステムの基本的な性能を評価し、農工大では RNA や RNP を取り扱うための技術開発とヒトを含む高等動物からの RNA 試料の供給、さらにプロジェクト後期からは本研究で開発したシステムを利用して RNP 複合体の機能と RNA 代謝に関する研究を行った。理化学研究所は本研究を可能とする最も重要な研究要素である RNA 解析のためのゲノム検索エンジンの開発と周辺ソフトウェアの整備を担当した。3つのチームはそれぞれの担当分野でプロジェクトの進行に必要な十分な成果をあげるとともに、定期的な研究会などを通じて相互に緊密に連携して研究を進められたことが、一定の期間内に目標を達成できた大きな要因と考えられる。研究の責任者としては、こうした短期間の研究課題の解決に協力してくれた農工大と理研の研究分担者をはじめ、ポスドクや技術支援者などの研究協力者、首都大や農工大の多くの学生諸君に感謝したい。また、本来は専門外の RNA 解析の機会を提供していただいた故鈴木紘一統括をはじめとする評価委員の先生方、進行中のプロジェクトを支援し、2回のサイトビジットなどを通じて貴重なアドバイスをいただいた西島正弘統括、プロジェクトの運営にフレキシブルに対応して研究の進行に協力していただいた五十嵐孝司氏はじめ JST の職員各位に深謝したい。

[若手研究者の育成]

本研究では、5年間の研究期間を通じてほぼ8名のポスドクや研究支援者を雇用して研究を行った。プロジェクトの最終年度を迎えた現在、その2名は東京農工大学の特任助教、別の2名は首都大学の研究員、1名は理化学研究所の研究員として引き続き関連する研究開発プロジェクトを推進することとなっている。また他の2名はいずれも本プロジェクトに関連する大手分析機器企業あるいは製薬企業の研究員として活躍を続けている。特に東京農工大学では、今回の CREST 研究に参加した研究員が、この研究の過程で培った知識と技術を評価され、農工大で実施される文部科学省特別経費による人材育成プロジェクトを推進する主要メンバーである特任助教として採用されている。東京農工大学では、文部科学省の特別経費による「農学系ゲノム科学領域における実践的先端研究人材育成」プロジェクトを本年度より5年間の計画で開始しているが、このプロジェクトはプロテオミクスとメタボロミクスと共にゲノミクスやバイオ

インフォマティクスを含む総合的なゲノム科学領域を担う人材育成を分野横断的に行う教育研究体制の構築を目指したものである。これによって、国内的には医学系に比べてその普及が遅れ、対外的には中国などアジア地域に比しても見劣する農学系においても、総合的ゲノム科学の分野を普及発展させるために、農学の幅広い分野で大規模なデータ取得とその情報処理に長け農学系が扱う広範な生物資源の有効利用を推進する人材を育てようというものである。このように、一つの大学が人材育成プログラムを全学として推進する上で、CREST 研究での経験が生かされ、プロテオミクス・メタボロミクスの普及に貢献すると同時に、今回の CREST 研究で得られた RNA の解析技術やその方法論を若手研究者や大学院生に伝えることで、今後の生命科学研究を担う人材の育成に繋がることを願っている。

[CREST への要望]

一般的な要望：

CREST は年度を超えた研究費の執行が認められるなど、他の公的な研究支援プログラムに比べて研究費執行の自由度が大きく、研究の進行状況に応じて当初の計画を修正あるいは変更して研究を進められる点で良い制度であると感じた。特に、この研究で RNA の質量分析法を実用的なレベルにまで開発できたのは、CREST 制度の基礎研究に対する理解と援助のおかげである。RNA の質量分析法は国際的にも未開拓の分野であり挑戦的な課題ということができたが、こうした技術開発の将来性を見据えて援助して頂いたことに感謝の意を表したい。基礎研究を支えるこのような制度を今後とも是非続けて頂きたいが、最近の CREST の領域を見てみると比較的すぐに成果が望める分野に傾きつつあるのではとの印象がある点に若干の危惧を感じている。科学技術立国として我が国の将来を考えると、CREST あるいは関連する制度は、世界に通用する日本発の技術を発掘するだけでなく、実用化に至るまで育成することが望ましい。JST には、CREST の成果を継続的に発展させることができる制度や、企業などへの橋渡しを円滑にする制度の一層の充実を期待したい。特に、数年程度で大きな研究成果や実用化が期待できるプロジェクトについては、成果の評価に基づいて 1～3 年の延長ができる制度を考えていただきたい。

本研究で開発した技術の継続的な発展についてのお願い：

中間評価の段階で評価していただいたように、本研究はシステム開発という点で当初の目標を達成しただけでなく、その技術がヒトの難治性神経変性疾患の発症機序の解析に適用されて新たな展開をもたらすなど、生命科学研究への有効性も実証しつつある。ただし現時点では、特許出願と研究の完成度をあげるまで発表を控えているなどの事情もあって、その有効性が一般には十分に伝わらず、技術の普及が進んでいないことも事実として認識している。しかし最近になって、RNA の質量分析の分野で今まで先駆的な研究を行ってきた Cincinnati 大学や UCSF の研究者が継続的に Ariadne 検索ソフトを使い始めるなど、この技術の認知度が着実に高まりつつある。RNA の質量分析技術は、イオン化の難しさや化学的性質の均質性に由来する分離の難しさなど、タンパク質の解析に比べ遥かに困難で、RNA を質量分析法で解析できる研究室は世界的にも数少ない。これをプロテオミクス分野において質量分析法が普及した経緯と比較してみると、現在の RNA の質量分析法の状況は、ゲノム情報からタンパク質を同定する検索エンジンが開発されてプロテオミクスの概念が提案された 1995 年当時の状況に対応するように思われる。その当時に発表されたプロテオミクス解析の論文は僅か 3 報だけで、その後数年間は年間 10 報に満たなかった。これは質量分析法を利用したタンパク質の解析技術が非常に高度な技術であり、従来から経験を積んだごく僅かな研究室だけで行うことができる技術であったことに一因がある。この技術の有効性が認知されて普及され始めたのは、数年間の地道な技術の継続と育成を経た 2000 年代に入ってからで、その後飛躍的に論文数が増加したことは周知の事実である。この例が示すよ

うに新しい技術の普及には時間が必要であり、その意味では、本研究で開発した技術を死蔵技術とすることなく、継続的に発展させる機会を模索したい。具体的な継続方法としては、例えば RNA の代謝異常を伴う各種の疾患の発症機序を網羅的に解析するプロジェクトや、創薬研究などに特化したシステム開発あるいは製品化に向けたプロジェクトなどが考えられる。いずれにしても、この研究の成果を世界に通用する日本発の技術として定着するための方策について、JST や NEDO などを実施するプロジェクトとの組み合わせなども含めて検討あるいは相談させて頂くようお願いしたい。

このプロジェクトで開発した RNA 解析のための全自動 LC-LC-MS/MS システム

