

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成25年10月～平成31年3月

研究代表者：磯辺 俊明
(首都大学東京理工学研究科、特任教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究では、研究代表者らが開発し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が織りなす複雑な細胞機能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スクレオプロテオミクス研究の基盤作りを目指した。また、この技術を RNA 代謝異常症の原因遺伝子産物が形成する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。

磯辺グループと中山グループが協同で行ったシステム開発に関する研究では、システムを安定的に維持して再現性を高めるためのスプレー補助装置の開発、試料の前処理法や RNA 分離条件の最適化、Ariadne の改良などによって分析の信頼性を向上すると同時に検出感度をこれまでの約10倍に高感度化することに成功し、細胞内での含量が約 1,000 分子とされる miRNA や mRNA を質量分析法で直接同定して構造を解析することに成功した。また、「pseudo-MS³ 法」と呼ばれる質量分析技術を応用することで、従来は不可能とされた質量分析法による擬ウリジンやヌクレオシドの構造異性体の識別法を開発した。これらの研究はいずれも世界初となる成果であり、将来は mRNA のメチル化修飾などに依存した遺伝子発現の調節機構として現在国際的に注目される領域である「Epitranscriptomics」研究に繋がる技術として期待される。一方、RNA の転写後修飾の解析法に関する研究では、生体から分離した RNA 分子を安定同位体で標識した合成 RNA を利用して網羅的に同定して定量できる革新的な「SILNAS 法」を開発し、モデル細胞としての酵母さらには最も複雑で多くのヒトの疾病の原因ともなるヒト細胞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 の転写後修飾の全貌を明らかにすることに成功した。この研究は、RNA の転写後修飾を生物進化の観点から俯瞰する新たな領域の端緒を拓くものである。また、この技術を利用した国際共同研究では、亜熱帯地方を中心に 1,200 万人の患者が存在するとされる重篤な感染症である「リーシュマニア症」の治療薬として期待される抗生物質パロモマイシンの標的が感染源である寄生虫 *Leishmania* rRNA の活性中心に存在する修飾塩基を含む領域であることを明らかにした。さらにこうした研究の過程では、特定の RNA 修飾が細胞をとりまく環境要因によって調節されていることを示すとともに、ヒト rRNA の特定の位置に存在する擬ウリジンの定量が、ヒトの難治性疾患である先天性角化異常症の早期診断に繋がる可能性を示した。

一方、高橋グループは、磯辺・中山グループが実施するシステム開発に必要な各種の RNA や RNA/タンパク質複合体を生体試料から純度良く分離する技術を開発し提供すること、開発の各段階でシステムの性能を従来法などと比較しながら検証して評価すること、さらには開発過程の技術を利用して細胞から新たな RNA/タンパク質複合体、とりわけ RNA 代謝異常症に関連する複合体を分離同定してその構造と機能を解析する「リボスクレオプロテオミクス研究」の基礎を確立することを目標とした。その結果、研究期間内に 20 種類を超える新規の RNA/タンパク質複合体を同定してその構造と生体内機能に関する基礎研究で多くの成果をあげ、磯辺グループと共同でリボソームの構造と転写後修飾、生合成調節機構に関わる顕著な成果も得た。特に RNA の代謝異常症に関する研究では、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子産物である TDP-43 が標的とする細胞質さらには核内の RNA を同定し、その結合の細胞内での役割を解明するとともに ALS 病理とミトコンドリア機能との繋がりを示唆した。また脊髄性筋萎縮症 (SMA) に関連する複合体の研究では、遺伝子のスプライシング反応などに重要な U-snRNA 複合体の生合成を調節する新たな品質管理機構を見出した。さらに、この技術を利用した国際共同研究では、悪性脳腫瘍グリオーマやサラセミアなどの遺伝的貧血の発症に関わるタンパク質「CHTOP」の細胞内含量が mRNA レベルでの自己発現調節機構によ

って厳密に調節されており、その破綻が上記の疾病の発症に繋がること、また皮膚の悪性腫瘍であるメラノーマの発症が特定の long non-coding RNA によるリボソーム生合成の亢進に起因する可能性を示した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 世界で唯一のゲノム情報を利用した RNA の質量分析システム

概要:本研究で開発した RNA の質量分析システムは、ゲノム情報を利用して生体由来の RNA を同定し、その構造と機能の調節に重要な化学修飾の実態と細胞内でのダイナミクスを直接、一塩基解像度で定量的に解析できる世界で唯一のシステムである。このシステムは、RNA の修飾に依存した遺伝子発現調節や RNA が関与する生命活動の分子基盤の理解、さらにはその異常に起因するヒトの疾病の原因の解明を目指すリボヌクレオプロテオミクス研究に不可欠な基幹技術として今後の構造生命科学研究に大きく貢献することが期待できる。

2. RNA 代謝異常症に関わる RNA-タンパク質複合体の解析

概要:本研究では、現在開発を進めている質量分析システムを利用して、RNA 代謝異常症の原因とされる10種類以上のタンパク質が標的とする RNA を新たに同定した。特にヒトの難治性神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因である TDP-43 と標的 RNA との結合については細胞生物学的な解析が進展し、その生理的意義や病理との繋がりを示唆することに成功した。また脊髄性筋萎縮症(SMA)に関連する SMN 複合体の研究では、遺伝子のスプライシング反応などに重要な U-snRNA の生合成過程での新たな品質管理機構を見出した。

3. リボソーム RNA の全化学構造ならびにリボソームの生合成制御機構の解明

概要:本研究では、RNA とタンパク質の相互作用に起因するネットワークを解析するリボヌクレオプロテオミクス技術を開発し、すべての細胞がもつ極めて複雑な RNA-タンパク質複合体であるリボソームを構成する rRNA の全化学構造を明らかにするとともに、その生合成に関わる新規タンパク質を数多く同定した。この研究は、RNA の転写後修飾を進化の観点から俯瞰する新たな領域の端緒を拓くと同時に、重篤なヒトの疾患である先天性角化不全症の早期診断や難治性の悪性腫瘍であるメラノーマの発症機序の解明、さらには全世界に 1,200 万人の患者が存在するとされる感染症であるリーシュマニア症の治療薬の開発に繋がる成果となった。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. RNA の質量分析システムとソフトウェア Ariadne の開発

概要:本研究で開発した RNA の質量分析システムは現在世界最高の性能と感度を誇り、将来は RNA の代謝異常に起因する多くのヒトの疾病の原因の解明から早期診断のためのバイオマーカーの開発、さらには治療を目指す創薬研究のための強力なツールとなることが期待される。またこのシステムの一部を構成する RNA 解析ソフトウェア Ariadne は、現在国際的な開発が進んでいる RNA 創薬を指向した複雑な官能基をもつ合成 RNA の化学構造の確認やヒト体内での動態や代謝過程の解析に貢献することが期待できる。実際に現在このシステムは、ライセンス契約を締結して事業化を目指す国内の情報関連企業との共同研究計画が進んでいる。

2. リボヌクレオプロテオミクス研究の基盤の確立

概要:本研究では、微量 RNA-タンパク質(RNP)複合体の精密単離技術と質量分析法を組合せた方法を駆使することで、多数の新規RNP複合体を同定し、それらの機能解析からALSやグリオーマ(神経膠腫)など、現在治療法がないヒトの難治性疾患の診断と治療法の開発が期待できる成果を得た。RNP複合体の機能異常が疾病の原因となる難治性疾患の多くがRNAの代謝異常に起因することから、本研究の手法は今後さまざまなRNA代謝異常症の発症機序の解明と診断さらには治療法の開発に繋がる新たな方法となることが期待される。

3. non-coding RNA の発現や化学修飾を起点にした医科学領域の創成

概要:最近の「Epitranscriptomics」研究は、mRNA のメチル化などの修飾が遺伝子発現の調節を通じて生命活動に深く関与していることを明らかにしている。これに加えて本研究では、特定の long non-coding RNA がリボソームの活性を制御し、その破綻がメラノーマなどの悪性腫瘍の形成に関与すること、さらには rRNA の転写後修飾の変化が先天性角化異常症の発症や寄生虫により媒介されるリーシュマニア症などの感染症に関わる可能性を示した。これらの結果は現状ではまだ予備的な研究段階にあるが、今後さらに研究を進めることで、特定の RNA の発現やその修飾反応の観点から生体機能を解析し、疾病の発症機構の解明から早期診断さらには創薬に向かう新しい医科学領域の創成が期待できる。

<代表的な論文>

1. Nakayama H, Yamauchi Y, Taoka M, Isobe T. “Direct identification of human cellular microRNAs by nanoflow liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry and database searching” *Analytical Chemistry* 2015 Mar 3; 87(5):2884-91. doi: 10.1021/ac504378s. Epub 2015 Feb 18.
2. Izumikawa K, Nobe Y, Yoshikawa H, Ishikawa H, Miura Y, Nakayama H, Nonaka T, Hasegawa M, Egawa N, Inoue H, Nishikawa K, Yamano K, Simpson RJ, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe T, Takahashi N. “TDP43 stabilizes the processing intermediates of mitochondrial transcripts” *Scientific Reports* 2017 Aug 9; 7(1):7709. doi: 10.1038/s41598-017-06953-y.
3. Taoka M, Nobe Y, Yamaki Y, Sato K, Ishikawa H, Izumikawa K, Yamauchi Y, Hirota K, Nakayama H, Takahashi N, Isobe T. “Landscape of the complete RNA chemical modifications in the human 80S ribosome” *Nucleic Acids Research* 2018, 1-10, doi: 10.1093/nar/gky811.

§ 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

①「磯辺」グループ

研究代表者:磯辺 俊明(首都大学東京大学院理学研究科 特任教授)

研究項目

II-A) RNA 解析のための質量分析システムの高度化

II-A-1) ナノ LC-MS/MS システムの高感度化

II-A-2) RNA 転写後修飾解析法の開発

II-A-3) 転写後修飾を含む RNA の絶対・相対定量法の開発

II-A-4) 架橋反応を利用した RNA-タンパク質相互作用部位の特定法の開発

II-A-5) 超微量 RNA の転写後修飾解析法の開発

②「高橋」グループ

主たる共同研究者:高橋信弘(東京農工大学農学研究院 教授)

研究項目 I)リボヌクレオプロテオミクスの研究基盤の構築

I-1)RNA-タンパク質複合体のリボヌクレオプロテオミクス解析法の高度化

a) 高純度 RNA-タンパク質複合体調製法の開発

b) RNA-タンパク質複合体の調製及びシステムの評価

I-2)新規 RNA-タンパク質複合体の探索と機能解析

③「中山」グループ

主たる共同研究者:中山 洋(理化学研究所 専任研究員)

研究項目

II-B) RNA 解析ソフトウェアの高度化研究

II-B-1) データベース検索ソフトの高度化

II-B-2) RNA 定量支援ソフトの開発

II-B-3) RNA-タンパク質作用部位解析支援ソフトウェアの開発

II-B-4) 低分子領域断片シグナルを利用した転写後修飾の同定法の開発

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

1.大学等

- (1) 東京大学大学院 薬学研究科 清水 敏之 教授 (CREST 構造生命領域チーム)
「TLR7/8 の構造と機能に関する研究」
- (2) 東京大学 医化学研究所 三宅 健介 教授
「TLR による病原体認識機構に関する研究」
- (3) 長崎大学 熱帯医学研究所 金子 修 教授
「マラリア原虫 tRNA の化学構造の解析」
- (4) 英国ケンブリッジ大学 Tony Kouzarides 教授
「mouse SRA-1 RNA の転写後修飾の解析」
- (5) イスラエル Weizmann 研究所 Ada Yonath 教授
「Leishmania リボソームの高次構造解析ならびにリーシュマニア症治療薬の開発」
- (6) 東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野 長谷川成人 分野長
生体分子先端研究分野 ユビキチンプロジェクト 山野晃史 博士
「TDP-43 のミトコンドリアでの機能と ALS との関連性の解析」
- (7) 京都大学 iPS 研究所 井上治久 教授
「ALS ならびに SMA における RNA 代謝異常の解明」
- (8) 名古屋大学 細胞生理学研究所 藤吉好則 教授
「免疫電子顕微鏡による TDP-43 のミトコンドリア局在解析」
- (9) Erasmus MC 研究所 Sjaak Philipsen 博士
「Chtop の発現制御機構の解析」
- (10) テキサス A & M 大学 Hisashi Koiwa 教授
「miRNA/ncRNA の生合成・代謝機構の解析」
- (11) 豪州ラ・トローベ大学 Richard J. Simpson 教授
「新規バイオマーカー探索に向けた分泌顆粒(エクソソーム)構成成分の大規模解析」
- (12) カナダ トロント大学 Jinron Min 准教授
「Gemin5 に依存した snRNP 生合成の調節機構に関する研究」
「TDP-43/mt-tRNA 複合体の構造と機能に関する研究」
- (13) オランダ VIB Laboratory for Molecular Cancer Biology Jean-Christophe Martine 博士
「メラノーマ発症機構における CARF-ncRNA 複合体の役割に関する研究」
- (14) カナダ Dalhousie 大学 Michael W. Gray 教授
「Euglena リボソームの高次構造と rRNA の転写後修飾の解析」
- (15) イスラエル Weizmann 研究所 Schraga Schwartz 教授
「超好熱始原菌 Thermococcus kodakaraensis リボソームの高次構造と rRNA の転写後修飾の解析」

2.企業

- (1) サーモフィシャーサイエンティフィック(株)
「質量分析法による RNA 分子中の擬ウリジンの解析法」