

「代謝調節機構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

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/蛋白質 (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ている。平成 21 年度の研究では、昨年度までに試作した RNA の LC-MS システムを「RNA のショットガン解析システム」に発展させるための技術開発を行った。すなわち (1) RNA のショットガン解析を可能にする全自動 RNA 質量分析システムを構築することを目標として、RNP 複合体などに含まれる複数の RNA を、あらかじめ電気泳動などで分離することなく、混合物のまま直接解析できる LC-LC-MS/MS システムを設計し試作した。(2) 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を行った。また、(3) これらの方法を RNA とタンパク質の相互作用が関与する生命科学研究に適用するための RNA/蛋白質複合体の精製法や、RNA の分離・前処理法、あるいは多様な基質特異性をもつ各種 RNase の探索や RNase H を利用した RNA の断片化法などについて検討した。以上の研究によって、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-snrRNA 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できるようになった。特筆できる成果の 1 つは、ヒトを対象とした研究でも、RNP 複合体を構成する主要な RNA を直接染色体上にマップして同定することが可能になったことである。この方法の開発によって、原理的には生体から分離した RNP 複合体を構成する RNA とタンパク質成分の種類や化学構造を、LC-MS 法を基盤とする共通のプラットフォームで解析することができるようになった。今後はこの方法をより大規模な RNA 解析に適用できる汎用的なショットガン解析法に発展させるための技術開

発を進めると同時に、国内外での共同研究を推進することで RNA/RNP 研究の進歩に貢献する成果をあげて行きたい。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「磯辺」グループ

① 研究分担グループ長:磯辺 俊明 (首都大学東京大学院、教授)

#### ② 研究項目

RNA 質量分析システムの高性能化に関する研究

### (2)「高橋」グループ

① 研究分担グループ長:高橋 信弘 (東京農工大学大学院、教授)

#### ② 研究項目

RNA とプロテオームの機能的相関解析

### (3)「中山」グループ

① 研究分担グループ長:中山 洋 ((独)理化学研究所、専任研究員)

#### 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. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

### 1) RNA 質量分析システムの高性能化に関する研究

本年度の研究では、1-1) 生体から調製した低分子 RNA や RNP 複合体を構成する RNA 成分を混合物のまま直接 RNase で消化して同定し、化学構造を解析できる RNA ショットガン法のための自動化多次元 LC-MS 法の設計と試作、ならびに 1-2) 検索エンジン Ariadne の改良と高性能化によって(文献1)、生体試料に含まれる低分子 RNA とその代謝物を直接、自動的に解析できる LC-LC-MS/MS ショットガン解析システムの開発に向けた検討を行った。その結果、ヒトを含む細胞の主要な RNP 複合体を構成する RNA をタンパク質とほぼ同様の感度で解析できる、実用的なレベルの性能をもつプロトタイプシステムを構築できた。

#### 1-1) RNA の LC-MS 解析技術の高度化と自動化に関する研究

本技術開発の目標は、生体に存在する低分子 RNA を直接分析することで、それぞれの RNA をゲノム情報に帰属し、転写後修飾も含めた構造と機能の関係を明らかにすることである。本研究では、

RNA や RNA の消化で生じたオリゴヌクレオチドを分離するための LC 条件やエレクトロスプレーイオン化法などを最適化することで、親和性タグなどを利用して培養細胞などから分離したスプライセオソームやリボソーム先駆体に含まれる RNA をタンパク質成分とほぼ同程度の感度(数フェモトモル領域)で同定し、メチル化などの転写後修飾を解析できる基本的なナノ LC-MS/MS 法を開発した(文献 1, 5)。この方法は、化学合成された siRNA や無細胞合成系で調製した mRNA などの純粋な RNA や、電気泳動法などで予備的に分離した比較的純粋な RNA 試料に適用した場合には、RNA を特定する従来法に較べて極めて効率的で有効な方法であったが、より複雑な混合物に適用した場合、試料に含まれる複数の RNA 成分を一義的に同定するためには依然としていくつかの問題点があった。したがって昨年度までに開発した方法では、RNP 複合体などの構成 RNA をまず電気泳動で分離し、蛍光色素などで染色したバンドを切り出した後にゲル内 RNase 消化して1つ1つ個別に LC-MS/MS 分析することが必要であった。本年度の研究では、この方法をプロテオミクスでは既に一般的なショットガン法が適用できるシステムに発展させるための研究開発を行った。

#### 1-1-1) 自動化 LC-LC-MS/MS システムの試作

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(文献 7, 8)。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(文献 2-4, 6)。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オチドをさらに 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 法開発のための基礎検討を行った。現在の段階では、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。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 分析するよう設計されている。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。現在、この自動化システムによって、さらに効率よく目的の RNA を解析する目的で、基質特異性の高い RNase(1-1-2

項)による消化で生じる比較的大きなヌクレオチド断片を LC で分離してタンデム質量分析するための条件検討を進めている。

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られる。

#### 1-1-2) 新規 RNase の探索

質量分析法による RNA の解析には、RNase による試料 RNA の断片化が不可欠である。従来の研究では、試料 RNA を断片化する RNA 分解酵素としてグアニン(G)塩基の 3'末端側で切断する RNase T1 を採用している。この方法は、化学合成した純粋な RNA や、比較的単純な RNA 混合物の同定には効率的で有効な方法であるが、より複雑な混合物の直接的な解析を目指すショットガン解析では、多くの RNA に重複して存在する短い RNA 断片を生じる傾向があり、1つ1つの RNA を一義的に特定できるユニークな配列をもつ断片が生じにくい問題点があった。また、特定の RNA の塩基配列や転写後修飾を詳細に解析するためには、RNase T1 とは異なる基質特異性をもつ酵素によって、RNase T1 断片に対する「overlapping oligonucleotides」を生じさせる必要があった。そこで、これらの問題を解決する手段として、農工大チームと協力して RNA をより限定的に切断できる RNA 分解酵素の探索を行った。首都大学チームでは、文献に現れたさまざまな RNase を大腸菌細胞などで発現、精製し、その基質特異性を調査した。その結果、現在までに GU の2塩基配列を認識して G の 3'末端を切断する基質特異性をもつ酵素 (ColicinE5 CTD) や YA (Y は C か U) の2塩基を認識して Y の 3'末端を切断する酵素 (ColicinE3)、あるいは AC の2塩基配列を認識してその 5'末端を切断する酵素 (MazF) など、3種類の酵素を分離精製できた。また大腸菌から精製した2種類の酵素 (PemK と ChpB) についても基質特異性の検討を開始した。これらの酵素標品は現状では比活性が低い欠点があるが、いずれも従来にはない基質特異性をもつ本研究にとって有用な RNase であり、実際に MRP RNA や U6 snRNA などに適用した検討では、RNase T1 との併用によって、これらの低分子 RNA の全構造の決定に有用であることが明らかになっている。今後、引き続き酵素活性の発現に必要な要素や環境条件などについて検討することで、将来は試料中に存在する複数の RNA を1回の分析で同時に同定して解析できるショットガン解析法への応用が期待される。

#### 1-1-3) RNA LC-MS システムの耐久性の改良

本研究では、RNA の質量分析法を国際的に一般的な方法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ている。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 mmL)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ことがわかった。

## 1-2) RNA 質量分析データの処理と解析技術の開発

本研究が目標とする RNA 質量分析のためのデータ解析法の重要な要素技術の1つは、質量分析データを利用して試料中の RNA 分子種を同定するデータベース(DB)検索エンジンである。昨年度までの研究で、RNP 複合体試料から RNA を抽出、分離した後に RNase 消化した試料を LC-MS/MS で分析して得られたデータをもちいて公開 DB から独自に構築した small RNA データベースまたは酵母 (*S. cerevisiae* および *S. pombe*) ゲノムに対して開発した DB 検索エンジン Ariadne で検索することで RNA 同定が行えるようになった(文献 1)。しかし、ゲノム検索の場合、染色体の配列が長大なため検索時にゲノム DNA 配列を試料 RNA の長さに合わせた短い配列断片(サブセット)に分断し、それらのサブセットごとにスコア付けを行っているため、試料 RNA の概算長さを予め実験的に知っておく必要があった。本年度の研究では、この問題点を解決すると共に、ヒト・マウスなど哺乳類ゲノムに対して検索し RNA を同定することを目標として以下の 3 項目について実施した。

### 1-2-1) 配列 DB 検索システム開発

検索エンジン Ariadne の検索アルゴリズムの改良を試みた。具体的には Ariadne のヌクレオチドマッピングのアルゴリズムを見直し、染色体を検索時ではなく DB 登録時に一定の長さでサブセット化(DB 登録時のパラメータとして指定可能、通常 1200nt)することとした。そして、この一定の長さ以内の RNA であれば、あらかじめ長さを特定しなくても自動的に鋳型領域を推測するようにアルゴリズムを改変した。この改変により、RNA の大まかな長さ情報を事前に得なくても RNA 同定が可能となっただけでなく、RNA 同定の特異性が飛躍的に向上し、ヒトなどの巨大な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。また数種類程度の RNA 混合物であれば、その構成成分を1回の検索によって同時に同定することができるようになった。しかし、この改変に伴い検索に要する計算量が増大したので、プログラム内部処理の見直しを引き続き行い処理を効率化した。この結果、ヒトゲノムに対する検索であっても LC-MS/MS の分析時間と同程度の実用的な時間で検索結果を得ることが可能となった。すなわち、RNA を質量分析法で解析するための一連の流れの中で、DB 検索が律速段階とはならなくなった。但し、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困難となる場合があることから、現在、検索結果の統計的評価方法を改良し、新たなスコア閾値の実装を開始している。

## 1-2-2) 配列データベース検索システム周辺プログラムの開発

本年度の研究によって、これまでに開発、改良を加えてきたピーク抽出プログラム (SpiceCmd PMG; 単一同位体ピークおよびその価数を抽出するプログラム) を検索エンジン Ariadne と組み合わせることで、RNA 同定の感度、精度ともに向上することを確認できた。現在、このプログラムは首都大学で運用中であるが、プログラムの内容そのものは一定の完成度を得たと判断し、今年度で開発を終了することとした。一方、本年度の研究では、同定結果を確認し、転写後修飾などの検出を容易にする目的で、LC-MS/MS 結果を重みつき散布図により可視化するプログラムを開発した。この可視化プログラムでは、Ariadne 検索により同定できたピーク、できなかったピークを直接、視覚的に把握して確認できることに加えて、特に Ariadne が対応していない修飾塩基を含むヌクレオチドや 5'、3' 両末端などの検出に有効である。また本年度は、抽出プログラムと Ariadne および可視化プログラムを統合して自動実行するフロントエンドプログラムを新たに開発した。現在、プロトタイプを試作し、実際に首都大学の共同研究チームに使用してもらいフィードバックを得ながら本設計を進めている。

## 1-2-3) 質量分析用低分子 RNA DB の構築

本研究の当初計画では、目的の RNA を同定し解析するための資源として、低分子 RNA のデータベースを構築することとした。しかし検索エンジン Ariadne の開発が進んで当初の計画を上回る性能を発揮し、ヒトなどの哺乳類ゲノムに対して直接検索しても目的の RNA を同定できるようになったことから、RNA DB の整備計画は本年度で終了することにした。

## 2) RNA とプロテオームの機能的相関解析

本研究では、物理的相互作用解析に基づく低分子 RNA とタンパク質の対応づけを行うと同時に、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 技術の開発の研究項目で開発された技術を適宜細胞試料から得られる RNA や RNP 複合体の機能相関解析に適用し、その有効性を評価、検証することを目標としている。本年度も、低分子 RNA-タンパク質複合体の解析及び 1) の研究項目で必要とされる RNA 試料の安定的供給と RNA の効率的回収法の開発を実施した。特に従来法で回収しにくい RNA、存在量のより少ない RNA 及び転写後修飾を持つ RNA の調製、および同定効率・精度、RNA 断片の回収効率を向上させるために RNase H を用いた RNA 分子の限定的断片化法の検討に注力し、質量分析のための試料調製法としての評価を試みた。さらに、RNA の生合成・代謝経路の解析、新規機能を持つ RNA・タンパク質の探索解析も実施し、1) の研究項目で開発された質量分析による RNA 解析プラットフォームの RNA とプロテオームの機能的相関解析における有効性評価も試みた。これらの研究実施状況は以下の通りである。

### 2-1) 低分子 RNA の調製法の開発

本研究項目の目的は、質量分析装置を基礎とした RNA 解析プラットフォームでの分析に適した RNA 試料調製法を確立することである。本研究課題が開始されてから、他機関による RNA 分析に

関する研究が進み、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、細胞内に存在する RNAs は当初の予想を超えて遥かに複雑な分子集団であることが判明してきた。また、昨年度までに示したように、細胞から抽出した総 RNA から調製した低分子 RNA を首都大・理研グループが開発する 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ると判断した。すなわち、RNA 解析プラットフォームの開発段階では、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、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 を供給する方針で本研究項目を進めることとした。この方針に沿って、昨年度は主にリボソーム合成やスプライシングにかかわる存在量の比較的多い RNA を供給した結果、主要な snRNA 及び snoRNA 種については、開発した RNA 解析プラットフォームで非予見的に同定できることが判明したので、本年度は、特に、転写、マイクロ RNA 代謝など、より存在量の少ない RNA を回収するためのタンパク質発現細胞株を作製し、RNA 解析プラットフォームの高感度分析に必要な RNA 種を供給する体制を整えた。なお、スタンダードとしての各種 RNA は、昨年同様、in vitro の RNA 合成系を用い安定的に供給した。比較的存在量の多い snRNA や snoRNA の RNAs 試料は、また、低分子 RNA の回収率や純度を評価する LC 法の試料としても供給した。転写に関わる各種 RNA 回収においては、RNase free の環境を整備し、クロマチンや細胞内の不溶性画分に存在するタンパク質を bait とした RNA 回収及び抽出効率向上の条件検討を行った結果、より回収が困難な RNA を調製することが可能になった。また、マイクロ RNA の前駆体と考えられる試料の調製も可能になった。しかし、これらの RNA を RNA 解析プラットフォームで解析するためには、試料調製のスケールアップと回収率の向上が必要であり、それと平衡して解析プラットフォームの分析感度のより一層の向上が必要であることが判明した。また、酵母菌とヒト細胞からエピトープタグ法で回収した snRNAs と snoRNAs の RNA 解析プラットフォームによる比較分析から、現時点では、明らかに酵母菌から回収した RNAs の同定効率が高いという結果が得られた。ヒト細胞の場合、酵母菌に比べ細胞量を確保するための培養時間・労力及びコストの面からより困難であることから、より少ない細胞量から調製された RNA 解析にも対応できるための高感度化が今後の RNA 解析プラットフォームの汎用性を高めるために必要であると思われる。また、ヒト細胞の場合、そのゲノムサイズは酵母菌に比べ約 270 倍で、ほぼ全ての領域から RNA が合成される。したがって、ヒト細胞は、酵母菌に比べ、含まれる RNA の種類が遥かに多く、しかも個々の RNA 種について見れば遥かに少ない量を含むだけであると考えられる。さらに、ヒト細胞に含まれる RNA 量はタンパク質量の 20~30 分の 1 程度であるが、その中にはタンパク質をコードする領域の 60 倍のゲノム領域から合成される RNA が含まれる計算になる。分子数換算では、細胞内には大雑把に見ても個々の RNA 種は個々のタンパク質種の 1200 分の 1~1800 分の 1 程度しか存在しない計算になる。現状の RNA 解析プラットフォームは、プロテオミクスで用いられている LC-MS/MS システムとほぼ同等の感度であるが、平均

的存在量の RNA を分析するためには、RNA 解析プラットフォームのより一層の感度向上をはかるだけでなく、微量に存在する特定の RNA 種を高純度で濃縮・回収するためのより洗練された試料調製法を開発することも必要と思われる。

## 2-2) RNA 結合タンパク質を用いた RNA の回収と同定

この研究項目では、本年度は、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／誘導発現株の作製、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-タンパク質複合体の回収を行い、RNA polymerase I, II を含む転写関連タンパク質、Drosha, Dicer, DGCR8, AGOs などマイクロ RNA の生成に関わるタンパク質、mRNA 前駆体のスプライシングやリボソーム生合成に関わる SMN1, FBL など snRNA/snoRNA の生合成及び代謝に関わる様々なタンパク質(文献 3)、および HIV1 ウイルスタンパク質を釣り餌(bait)として、これらに相互作用する RNA-タンパク質複合体を回収することを昨年度同様継続して行った。これらのタンパク質成分の同定をプロテオミクス的手法であるゲル内酵素消化法およびショットガン法で行うとともに、RNA 成分を首都大グループが開発したゲル内 RNase T1 消化法と LC-MS 分析法、および理研グループが開発した-Ariadne データベース検索の方法で解析した。本年度は、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、1) で開発した RNA 解析プラットフォームによる転写後修飾とプロテオームの機能相関解析における有効性を検討した。即ち、mRNA 前駆体のスプライシングに関わる U snRNA の生合成・代謝経路における転写後修飾の変化を 1) で開発した手法で解析するために、U 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) を釣り餌として、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解析を行った。その結果、U1 snRNA は、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 m<sup>7</sup>G(mmmAUAC)構造を多く含んでいることが判明した。さらに、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 (m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>GAmUm) を持つ U1 snRNA と Short U1 には、それぞれ優先的に結合するタンパク質の種類に違いがあることを示した。優先的に結合するタンパク質の種類と 5' 末端側のキャップ構造から、Short U1 は細胞質で選択に形成されている可能性が高い。昨年度見いだした SMN1 と相互作用する新規のタンパク質(このタンパク質を NSMRP;nuclear speckle-associated mRNA-binding protein と仮に命名)を bait として回収した RNA-タンパク質複合体(NSMRP 複合体)は、SMN1 複合体に存在するタンパク質成分と U1, U3, U6 snRNAs 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少なくとも 2 種類の RNAs、そしてこれらより高分子量の RNAs も含んでいることを示した。NSMRP に関しては、今回さらに以下の点も明らかにした: NSMRP 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、(5)少なくとも FMR1 遺伝子のプロモーター領域には結合していない。これらの結果は、NSMRP が核スペックル内でスプライシングされた mRNA に結合し、それらの安定性に関わっている可能性を示唆している。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, 21;123:249-263)。CTN RNA はスプライシングされた状態の mCAT2mRNA を含み 3' 末端側に長い非コード領域を持つ。この非コード領域で核スペックルに局在し、細胞にストレスがあった時のみ mCAT2mRNA の本来の poly(A) tail 領域付近で RNase による切断を受け、mCAT2mRNA として核スペックルから細胞質へと放出される。このような事実から、CTN RNA は mRNA 領域を含むが非コード RNA (nrRNAs; nuclear regulatory RNAs) として分類されている。これらの報告と NSMRP に関して今までに得られた結果の間には類似点が多いため、NSMRP が FMR1 や coilin の mRNA を含む nrRNAs と結合している可能性がある。また、CTN RNA の場合、これが核スペックルに局在するためには、3' 末端側での A から I への修飾とスプライシングを受けた全長の転写物が必要とされる。今回、NSMRP は SMN1-U1 snRNA 複合体と相互作用していることを示したが、この結果が、NSMRP がスプライシング装置の形成にも関与しているのか、その行程が RNA の核スペックルへの局在に必要なのか等を示しているのかどうか今のところ全く不明である。NSMRP が局在する核スペックルにはまた、MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) など poly(A)様構造を持つ ncRNAs も存在する (Wilusz et al. Cell 2008, 135, 919-932)。MALAT1 ncRNA の場合も 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, 135; 919-932)。NSMRP はこの核スペックルに局在していることから、NSMRP に結合して回収されてきた RNA が CTN RNA や MALAT1 などの nrRNAs や ncRNAs を含んでいるか否かを明らかにすることは極めて重要であると思われる。今のところ、NSMRP に結合している RNA は質量分析により同定できてはいないが、これらの RNAs が結合していることが明らかになれば、NSMRP は核スペックルから RNA を回収する有効な手法の一つに成り得ると考えられる。今年度の研究では、さらに、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)についての解析の結果、このタンパク質は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も重要な役割を担っている可能性が見いだされた。この SF2p32 にも 300 b 以下の RNAs が結合しているが、その同定にはまだ成功していない。今後は、Short U1 の生理的役割や NSMRP などのタンパク質とそれらに結合する RNA の細胞内での機能を明らかにすることによって、本システムが、転写後修飾を含めた RNA の生合成経路や代謝経路の解析、生合成中間体として存在する転写後修飾やタンパク質の種類との相関解析に有効であることを示していきたい。一方、転写、翻訳、RNA 代謝、クロマチン機能、そしてウイルス感染・増殖などに関わる RNA-タンパク質複合体に関しては、現時点では、

タンパク質成分の同定が先行している。この中で、機能未知のプロリン異性化酵素 Par14 が翻訳を担うリボソーム合成において初期から中期にかけての rRNA 前駆体のプロセッシングに関与していることを証明した(文献 3)。また、本研究の過程で既に見いだした新規タンパク質については、その機能解析を進め、その機能との関連性を明らかにし、生命科学における本方法論の有効性についての検証を行う必要がある。本年度はまた、タンパク質と RNA との間の物理的相互作用が確認出来たものについては、昨年度に続き、適宜、RNA-タンパク質相互作用ネットワークマップのデータとして蓄積し、同時に RNA-タンパク質相互作用ネットワークの文献情報の蓄積も行った。RNA 解析プラットフォームはまだ開発段階にあるが、比較的存在量の多い RNA に関しては、非予見的な同定や転写後修飾の同定において既に実践的な手法となりつつあると考えられる。

### 2-3) 質量分析のための RNA 断片化法の開発

本年度は、異なる基質特異性をもった RNA の断片化法を検討していく中で、二本鎖 RNA を分解する RNase H を利用する方法の検討を行った。RNase H は、RNA と相補性を持つ DNA 断片の間で二重鎖 RNA-DNA を形成するとその部分を分解する。この性質を利用することで、如何なる塩基配列を持つ RNA をも分解することができる。昨年度までに、モデル RNA の塩基配列に相補的な合成 DNA 断片を用いることで目的の箇所を切断できることを示した。本年度は、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できるようになった。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。この手法を用い、予想外の新たな知見を得ることができた。それは、リボソーム小サブユニットの核から細胞質の移行に関わるタンパク質 LTV1 に相互作用する小サブユニットを解析したところ、その成分の一つに mRNA のポリ A テイルを 3' 末端から削除するエクソヌクレアーゼ PARN が含まれていることを見いだしたことである。PARN は、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。単離した小サブユニットに含まれる 18S rRNA の 3' 末端側を RNase H を用いて調製しその RNA 解析によって、成熟 18S rRNA より 10 塩基および 20 塩基程度長い pre-18S rRNA 種が含まれることを明らかにした。そして、PARN を knockdown させるとこれらの pre-18S rRNA が蓄積し成熟した 18S rRNA の合成が減少したことから、PARN はリボソーム小サブユニットの生合成の最終段階を制御していると考えられる。この発見は、小サブユニットの生合成には、今まで知られていない新たな pre-18S rRNA 中間体が存在していること、PARN が、mRNA の代謝とリボソーム小サブユニットの生合成を繋ぎ合わせることで、あるいは、新たな 18S rRNA の品質管理機構が存在することなどの細胞機能にける新たな制御機構の解明につながる可能性がある。

以上のように、RNA-タンパク質機能相関の解明を目指した RNA とタンパク質の両面から非予見的に同定する手法の開発は、今までに知られていない新たな知見を得るための有効な手段になり得ることが示された。来年度は、リボソーム生合成においてだけでなく、転写やマイクロ RNA の機

能など様々な細胞機能や生理的機能の解明のために RNA 解析プラットフォームのメリットを十分に活用し、本プロジェクトで開発されてきた手法が、科学的に重要な新たな発見に結びつけられるように発展させていきたいと考えている。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

[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.

[2] 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.

[3] 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

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

(4-2) 知財出願

① 平成 20 年度特許出願件数 (国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数 (国内 2 件)