

「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

H22 年度 実績報告

礪辺俊明

(公)首都大学東京 大学院理工学研究科・教授

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」

§ 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 22 年度の研究では、昨年度に試作した「RNA のショットガン解析」を実現するための全自動 RNA 質量分析システム(LC-LC-MS/MS システム)を高性能化し、実用的な装置とするための研究開発を行った。また、このシステムで得られた 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を整備した。さらに、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/蛋白質複合体の分離精製法や前処理法、あるいは多様な基質特異性をもつ各種 RNase の探索や、LC-MS 法で得られたスペクトル情報から同定した RNA を定量するための基礎検討を行った。以上の研究によって、ヒトを含む各種生物の細胞から親和性タグなどを利用して分離精製した RNP 複合体に含まれる U-snRNA や snoRNA などを構成する数十種類の主要な低分子 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 LC-MS 解析して染色体上にマップして同定し、その塩基配列やメチル化などの転写後修飾を解析できるようになった。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を得ることができた。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して、ヒトの難病として知られている筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子産物とされている 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。現在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、この研究で見出した RNA-タンパク質相互作用の生理的な意味や ALS の病態との関わりについて研究を進めている。以上の結果は、本研究の成果が生命科学の新たな発見を導く可能性を示しているが、最終年度となる平成23年度の研究では、このことを実証するための研究に注力することで RNA/RNP 研究の進歩に貢献する成果をあげるとともに、RNA の質量分析法を生命科学の一般的な技術として完成するための研究開発を推進したい。

§ 2. 研究実施体制

(1)「首都大学東京 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理工学研究科、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)「東京農工大学 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共生科学技術研究院、教授)
- ② 研究項目
RNA とプロテオームの機能的相関解析

(1)「理化学研究所 中山」グループ

①研究分担グループ長:中山 洋(独立行政法人理化学研究所基幹研究所、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

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 成分とその代謝物を、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 ショットガン解析法のための多次元 LC-MS/MS システムの実用化に向けた研究、1-2) 質量分析法を利用した RNA の定量法に関する研究、1-3) 検索エンジン Ariadne の改良と高性能化のための研究開発を行った。その結果、ヒトを含む細胞の主要な RNP 複合体を構成する数十種類程度の RNA 成分をタンパク質とほぼ同様の感度で自動的に同定し、転写後修飾を含む化学構造を解析できる、実用的なレベルの性能をもつ全自動多次元 LC-MS/MS システムを構築できた。

1-1) RNA 質量分析法の高度化に関する研究

本技術開発の目標は、生体に存在する低分子 RNA やその代謝物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、RNP 複合体などを構成する 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 分析して同定し、その化学構造を解析できる方法を確立した(文献1)。また、昨年度の研究では、RNA 分子をそのままの状態でも分子全体として分離し、一度分画したのちに溶液操作ロボットを利用して RNase で断片化し、生成したオリゴヌクレチドを自動的に LC に注入して分離しながらオンラインで MS/MS 分析して同定できる自動化システムのプロトタイプを試作した。本年度の研究では、このシステムをさらに精密化し、性能ならびに耐久性を向上させることで、生命科学研究に実用的な装置とすることを目標とした。

1-1-1) 多次元 LC-MS/MS システムの実用化に関する研究

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(文献 2-5)。本研究では、プロテオミクスでは一般的なこうした技術を RNA 解析にも適用することを目指している。昨年度の研究では、生体試料に含まれる複数の RNA 成分をまずそのま

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 分析して同定する自動化多次元 LC-MS/MS 法のプロトタイプシステムを試作した。このシステムは、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よう設計されている。本年度の研究では、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。現在稼働中のシステムは、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。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た (理研 P. Carninci 博士との共同研究)。

一方、本研究では、この自動化システムによって、さらに効率よく目的の RNA を同定し、その化学構造を解析する目的で、従来使用している RNase T1 とは異なる基質特異性をもつ RNase の探索を進めている。昨年度の研究では、文献に現れたさまざまな RNase の中から、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 種類の酵素を大腸菌細胞から分離精製した。本年度の研究では、大腸菌から更に 2 種類の酵素 (PemK と ChpB) を精製し、基質特異性を含む酵素化学的な性質を検討した。すなわち、これら 2 種類の酵素を大腸菌に内在する阻害タンパク質との複合体として発現し、尿素変性条件下で阻害タンパク質と解離させて精製した RNase を透析法で再活性化して酵素標品とした。精製した PemK および ChpBK は、いずれも UA の 2 塩基配列を認識して U の 3' 末端を切断する基質特異性を持ち、その切断末端は上記 3 種類の新規 RNase と同様に 5' は水酸基、3' は 2', 3' サイクリックリン酸であった。これら 5 種類の新規 RNase のうち、MazF を U6 snRNA の化学構造の解析に適用したところ、RNase T1 消化物からは分離が困難な 5' 末端ヌ

クレオチドを得ることができ、その解析から従来考えられていたメチルリン酸とは異なる新規 5'末端修飾を検出することができた。さらに、この酵素を分裂酵母から精製した RNase MRP の RNA サブユニットの一次構造解析に適用することで、5'キャップ構造を含む全塩基配列を確認することができた(発表準備中)。これらの酵素標品は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 であるが、現状ではいずれも比活性が著しく低い欠点があり、今後引き続き酵素活性の発現に必要な要素や消化条件などについての検討が必要である。

1-1-2) 質量分析法を利用した RNA の定量法に関する研究

RNP 複合体が関与する細胞機能の解析には、細胞の環境変化に依存した RNP 複合体や RNA-タンパク質相互作用のダイナミクスを定量的に解析する方法の開発が不可欠である。転写後修飾を含む RNA の定量は、現在 RNA の解析に汎用される逆転写反応と PCR 法を併用した分子生物学的な方法では困難であることから、本研究で開発を進めている質量分析法などの直接的な RNA 分析法に求められる技術の1つになっている。今年度の本研究では、RNP 複合体などに含まれる RNA 成分を質量分析法によって同定するだけでなく、同時にその量的な変動を定量的に解析するための基礎検討を行った。RNA 分子は構成する塩基が4種類で化学的な多様性も小さいため、質量分析におけるシグナル強度は分子を構成する塩基数との相関が高いと推定される。実際に合成したオリゴヌクレオチドを利用して検討したところ、添加した試料の量とシグナル強度の間には実用的なダイナミックレンジの範囲(1 fmol-1 pmol)で直線的な正の相関があり、イオン化効率に及ぼす試料の塩基組成の影響も比較的小さいことがわかった。このことは、例えば目的とする RNP 複合体に含まれる複数の RNA 分子の相対的な含量やその変動を、質量分析における RNA 断片の相対的なイオン強度から直接定量できる可能性を示唆している。また内部標準物質を利用することで、絶対的な定量も可能であることを示唆している。一方、本年度の基礎的な検討から、LC-MS 法による RNA の直接定量法を実用化するためには次の問題を解決する必要があることがわかった。(1) RNase 消化で生じる RNA 断片の LC での回収率は RNA 断片の鎖長や塩基組成の影響を受けるため、LC-MS 分析で得られた特定の RNA 断片のシグナル強度が直ちに量を反映しているとは限らない。すなわち、シグナル強度を LC での回収率で補正するか、あらかじめ回収率が同等であることがわかっている RNA 断片で相対量を算出することが必要である。(2) 10 塩基程度以上の鎖長をもつ RNA 断片をエレクトロスプレーイオン化すると複雑な多価イオンを生じる。したがって、シグナル強度から特定の RNA 断片を定量するためには、その断片に由来する多価イオンをすべて検出して加算することが必要である。したがって複雑な試料の解析には多価イオンを処理して定量するソフトウェアを新たに開発することが必要である。

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、DB 検索エンジン Ariadne を開発してきた。この Ariadne を用いることで、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持ちいて small RNA DB や酵母 (*S. cerevisiae*, *S. pombe*) ゲノムだけでなくヒト・マウスなど哺乳類ゲノムに対して DB 検索することで RNA 同定が行えるようになった。さらに、昨年度のアプローチ改良により、解析対象 RNA の長さを電気泳動などの手段であらかじめ知らなくても自動的にゲノム上の RNA 鋳型領域を推定して同定することが可能となった。また、数種類程度の RNA 混合物であれば構成成分を同時に同定可能となった。しかし、多コピー RNA が存在する場合には、スコア分布が偏り同定有意性の判定がうまく働かないことがあった。これらの改変により計算量が増加したため、哺乳類ゲノムに対して切れ残り、修飾を考慮した検索を行うと検索に数日掛かる場合があった。本年度の研究では、これらの問題点を解決するために以下の 3 項目について実施した。

1-2-1) 統計的な検索結果評価法の改変

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。

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。実際のデータを持ちいてこの閾値を評価したところ、ゲノムなど比較的大きな DB については良好な結果が得られた。

スコア分布に基づく閾値 量的に余裕のある既知 RNA の分析など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。そこで、これらの閾値計算機能を現在サービス中の Ariadne に組み込んだ。これに伴い、従来の DB の大きさに依存したスコア閾値は廃止した。

1-2-2) 検索高性能化のための検討

まず、ピーク抽出ソフトウェアの改良を行い、質量測定や価数判断の精度を向上した。この改良により Ariadne 検索信頼性の向上が認められた。昨年度のアルゴリズム改変、今年度の閾値算出などにより検索時の計算量が当初より増加したため、高速化を目指してプログラム・ハードウェアの見直しを行った。Ariadne 検索プログラムは昨年度に引き続きアルゴリズムの見直しを行った。修飾を考慮した「MS/MS イオン検索」工程に非常に時間が掛かる場合のほとんどで 99%以上の時間を最終的に同定されないスペクトルの検索に費やしていることがわかった。そこで MS/MS イオン検索時に見込みの低い MS/MS スペクトルを検索途中で判断し、以後の計算を行わずに棄却するように改変した。これにより大幅な高速化が見込めるが、同定の信頼性が低下する可能性がわずかながらあるため、現在実試料をもちいて評価を行っている。また、検索にもちいるデータ構造を見直し、「MS/MS イオン検索」・「ヌクレオチドマッピング」両工程の高速化を図った。現在、これらの改良を施したプログラムを新設したコンピュータに導入し、性能を確認中である。

アフィニティー精製した RNA-タンパク質複合体から抽出した RNA 試料の多くには rRNA やその分解物が混入しており、これらが Ariadne による RNA 同定の感度・精度双方を低下させている。この混入の影響は本来試料調製で取り除くべきであるが、目的 RNA の収量低下など副作用があるため、情報处理的に排除する方法を検討した。具体的には、DB ごとに rRNA 由来のヌクレオチドのリストを作成しておき、これに該当する同定ヌクレオチドは除いてヌクレオチドマッピングを行う。rRNA 混入が電気泳動で確認できている RNA 混合物試料をもちいたところ、通常の実験では rRNA 以外は有意に同定出来なかった試料からでも、rRNA を情報処理で取り除くと 3-5 種類程度の RNA 成分は同定出来ることがわかった。しかし、この方法を用いても 30 種類程度の RNA 成分が存在している試料から最大 10 種類程度しか同定出来なかった。これは、LC-MS/MS 測定時に rRNA 由来のヌクレオチドを MS/MS することによりそれ以外の RNA 成分由来のヌクレオチドを MS/MS 出来ないことが原因であった。したがって、情報处理的な rRNA 由来ヌクレオチド除去法により一定の効果を認められたが、より複雑な RNA 混合物中から RNA 成分を同定するためには試料調製方法および MS/MS 測定パラメータの改善が今後必要である。

1-2-3) LC-LC-MS/MS データ解析システムの開発

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、前年度までに開発した Ariadne フロントエンドプログラムを再設計し実装した。修飾解析を容易にするため修飾およびその位置候補を示唆する機能を追加し、検索後の複数のデータを選択し、これらをシリーズとしてデータ解析・可視化可能な解析ソフトウェアを開発した。現在、実試料をもちいてプログラムの有効性を評価中である。

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)の研究項目で実施される研究の過程で開発された RNA 解析プラットフォーム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。そのために、本年度も昨年度に引き続き、本解析プラットフォーム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ために必要な RNA 試料の供給を優先的に実施した。また、転写、翻訳、RNA 代謝、リボソーム生合成、クロマチン機能などへ関与するタンパク質も含めた様々なタンパク質と相互作用する RNA-タンパク質複合体のエピトープタグ法による単離と、それらの RNA 成分及びタンパク質成分の同定を継続し、文献情報も含めた RNA-タンパク質相互作用ネットワークマップの作成と新規 RNA-タンパク質複合体の探索を行った。特に、これらに関し、前項(1)で述べたように、平成21年度に実施された中間評価での指摘に沿った形で研究を進めることに注力した。即ち、本年度は、生物学、医学領域でインパクトのある形での成果を目指して、今まで結果が得られてきた独自の研究に留まらず、他の研究機関の研究者との共同研究をも強力に押し進めた。その結果、開発した RNA 解析プラットフォームが、基礎生物学や疾病の発症機序解析の中で、非予見的に新たな RNA-タンパク質相互作用を検出・同定できる実践的手法になりつつあることを示すことが出来た。

2-1) RNA 試料調製法(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)本プロジェクトが開発している RNA 解析プラットフォームを実践的な RNA 解析手法としてブラッシュアップするためには、ほ乳類細胞・組織由来の RNA 試料の解析に有効であるようにする必要がある。平成 21 年度の研究報告書に記載したように、ヒト細胞からエピトープタグ法で回収した RNA-タンパク質複合体に含まれる RNA の RNA 解析プラットフォームによる解析では、snRNA や snoRNA などの比較的存在量の多い RNA は非予見的に同定することができ、さらに、それらの化学修飾や切断などの転写後修飾の同定も可能になった。しかし、転写に関わる各種 RNA やマイクロ RNA の前駆体と考えられる試料に関しては RNA 解析プラットフォームでの同定にはまだ至っていなかった。そこで、本年度は、首都大のグループが RNA 解析プラットフォームの更なる高感度化、自動化と高精度化を進める一方で、農工大のグループはほ乳類由来の存在量の少ない RNA が何故同定できないのかの原因を試料調製法の観点から検討した。そのために、昨年度同定できなかった RNA 試料について、LC-MS 段階、Ariadne の検索法の改善段階に合わせて、調製量のスケールアップや二段階精製法・超遠心分離法の適用などにより高純度の RNA-タンパク質複合体の調製を行うなど、分析試料の量および質の観点から問題解決に向けた検討を行った。その結果、LC 分離および Ariadne の改良と相まって、従来の northern blot 法の検出感度の検出限界あるいはそれ以下の高感度での日常的な RNA 同定が可能になった。昨年度までは、酵母菌など比較的容易に細胞量を確保しやすい細胞については、回収した RNA のほぼ全てについて非予見的に同定できたのに対しヒトなどのほ乳類細胞由来の RNA 解析では、電気泳動後のサイバーゴールド等で検出できた RNA の多くとも 2~3 割の RNA が同定できる程度であったが、本年度は、その 9 割以上の RNA について同定ができることが示され、ほ乳類細胞から調製した RNA についても、RNA 解析プラットフォームが汎用的に利用できるまでに改善されたことが判明した。

本年度は、また、RNA 断片化法として異なる基質特異性を持つ RNase の探索も継続して実施する予定であったが、上記のように RNA 解析プラットフォームでの RNA 同定の網羅率及び同定精度が向上したこと、および以下に記載するように共同研究において進展があったことのために、これに関しては必要性が低いと判断し本年度は実施しなかった。

2-2) RNA-タンパク質複合体の機能解析

本年度も、転写、翻訳、RNA 代謝、リボソーム生合成、クロマチン機能などへ関与するタンパク質と相互作用する RNA-タンパク質複合体の単離とそれらの RNA 成分及びタンパク質成分の同定を継続した。これらの他に、生体内には 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が多く存在することから、この活性測定に RNA 解析プラットフォームを利用するための基礎的検討、および、エキソヌクレアーゼを制御する生体内因子を同定することも試みた。文献情報にこれらの解析結果も含め、RNA-タンパク質相互作用ネットワークマップの作成を実施し、今までに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。本年度は、また、平成 21 年度の研究によって既に得られている、転写後修飾あるいは代謝修飾を受けた様々な RNA 及び新規に同定されたタンパク質の機能解明、特に、U snRNA の生合成・代謝経路に関わる RNAs 及びタンパク質、RNA polymerase I の転写に関わる RNAs 及びタンパク質、及びリボソームの生合成 RNA 中間体とタンパク質の機能相関解析を進めた。その結果、以下の点が明らかになった；1) 他のタンパク質との複合体として U1 snRNA などの生合成に関わる脊髄性筋萎縮症(SMA)の原因遺伝子産物 SMN1 が、少なくとも U1 snRNA を結合しない新規のタンパク質を含む SMN1 複合体として核スペckルに存在すること、2) U1 snRNA の 3' 末端側が欠失した分子種 (short U1) と特異的に複合体を形成するタンパク質成分のいくつかを特定したこと、そして short U1 が生じる原因が U1 遺伝子の 3' box 領域の異常によって生じる可能性があること、3) 18S rRNA 前駆体の 3' 末端側 4～30 塩基のプロセッシングにポリ A 特異的エキソヌクレアーゼが関与していること、そして、このプロセッシングは今までに同様なプロセッシングに関与していることが報告されている Rio2 キナーゼとは異なる段階で作用するが Rio2 キナーゼはポリ A 特異的エキソヌクレアーゼの働きを解除することで 18S rRNA 前駆体の 3' 末端側 4～30 塩基のプロセッシングを促進している可能性があること、4) ミトコンドリアに主に存在する p32 が 47S pre-rRNA の初期のプロセッシングを制御し、この際に、fibrillarin から Nop52 への結合を入れ替えることで、リボソーム生合成の初期に形成される 90S 前駆体から 60S 前駆体及び 40S 前駆体への分離を引き起こしていると考えられること、5) この際に、RNA ヘリカーゼと RNA ホルダーゼ活性を持つタンパク質が U3 snoRNA の 47S pre-rRNA の 5' 末端側への相補鎖の形成と解離を担うことでプロセッシングの進行と抑制を行っている可能性があること、などである。さらに、本年度は、共同研究として RNA の代謝異常が原因と考えられている脳・神経系の疾患の原因遺伝子産物と相互作用する RNA の解析やウィルス感染・増殖などへ関与する RNA-タンパク質相互作用解析なども実施した。本年度の最も特筆すべき結果としては、筋肉の萎縮を起こす疾患の原因遺伝子産物と相互作用する RNA を RNA 解析プラットフォームにより

非予見的に同定できたことがあげられる。この結果を northern blot 法により確認し、さらに、UV クロスリンク法によりこれらの RNA-タンパク質間の相互作用が直接起っていることも明らかにした。この疾患の別の原因遺伝子産物についても相互作用する RNA を解析した結果、一つは全く異なるが、別の一つが共通である可能性も明らかになった。さらに、開発した RNA 解析プラットフォームを用いると、この疾患の原因遺伝子産物の各種変異体を用いて回収した RNA の転写後修飾状態の半定量的比較解析も可能であることが示された。これらの結果を受け、現在は、新たに見いだした RNA-タンパク質相互作用の生理的役割の解明に向けた解析に注力している段階である。これらの結果は、開発した RNA 解析プラットフォームが、今まで未知であった生命科学領域の研究における新たな発見を導くための実践的手法になり得ることを示している。以上、この研究項目においては、RNA 解析プラットフォームを牽引役としたこれらの RNA-タンパク質相互作用解析の結果をより質の高い成果として発信して行くことが今後の課題である。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- [1] 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.

- [2] 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.

- [3] 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.

- [4] Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiya 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.

[5] 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. Probable Participation of Splicing Factor 2-associated Protein p32 in Ribosome Biogenesis by Regulating Competitive Binding of Nop52 and Fibrillarin to Pre-ribosome Particles, *Mol. Cell. Proteomics* (in press)

(4-2) 知財出願

① 平成 22 年度特許出願内訳 (国内 1 件)

出願済: 磯辺俊明、山内芳雄「Nano-Electrospray Ionization Technique and Device (ナノエレクトロスプレーイオン化方法及び装置)」(PCT/JP2010/059732)

(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 CREST 研究期間累積件数 (国内 2 件)

出願済(国内外): 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 (2009. 4. 17): 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 (PCT/JP2009/057739)

出願済: 山内芳雄、磯辺俊明 (2009. 6. 8): 微量 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 (特願 2009-137085)