

磯辺 俊明

首都大学東京
特任教授

RNA 代謝異常症のリボヌクレオプロテオミクス解析と構造生命科学への展開

§1. 研究実施体制

(1)「磯辺」グループ

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

(2)「高橋」グループ

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

(3)「中山」グループ

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

§2. 研究実施の概要

本研究は、研究代表者らが開発を進めてきた我が国発の質量分析法を中心とする分析技術とゲノムデータベース検索エンジン Ariadne を組み込んだ世界で唯一の RNA 解析システムをさらに高度化し、プロテオミクスを基礎とした相互作用解析法と融合することで、RNA とタンパク質の相互作用によって形成される複合体の複雑なネットワークの実態とダイナミクスを定量的に解析できるリボヌクレオプロテオミクス研究の基盤作りを目指すものである。また、これらの技術を RNA 代謝異常症の原因遺伝子産物が形成する RNP 複合体の解析に適用することで、その細胞内での役割や病理との繋がりを解析することを目標とした。平成 26 年度は以下の研究を実施した。

リボヌクレオプロテオミクス解析法の高度化を目指す研究では、脊髄性筋萎縮症 (SMA) の原因である SMN タンパク質を構成成分の1つとする UsnRNP 複合体の生合成過程の初期段階に関与する”Gemin5”を釣り餌 (bait) としたプルダウン法によって UsnRNP を分離精製することで、従来は知られていないモノメチル化された 5' キャップ構造を持つ U1、U2、U4、U5 などの U snRNA を発見した。また、これらの試料を本研究で開発を進めている質量分析法で分析することで、従来は識別できなかった UsnRNA の 5' 末端に位置する最初の2つのヌクレオチドが受ける塩基メチル化とリボースメチル化を識別できることがわかった。そこで、この方法を利用して、UsnRNA のキャップ構造ならびにリボースメチル化に関わる因子の解析を進めたところ、昨年度までの研究で明らかになった UsnRNP 生合成の品質管理機構を調節する新たなタンパク質因子の絞り込みに成功し、さらには UsnRNP 生合成過程における Gemin5 の構造と機能に関する新たな知見が得られた。一方、新規 RNP 複合体の細胞機能に関する研究では、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子産物の一つである TDP-43 とミトコンドリア tRNA の複合体の機能解析を進めるとともに (投稿準備中)、当該分野を専門とする米国の研究者との共同研究によって TDP-43 を原因とする ALS 発症機序の一部を解明した (日本経済新聞に掲載)。

一方、本研究の技術的基盤となる RNA 解析システムの高度化を目指す研究では、(1) 質量分析法のさらなる高性能化を目指したエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 補助デバイスの開発¹⁾ならびに ESI インターフェース加圧デバイスの試作と性能評価、(2) RNA の細胞機能を調節する転写後修飾の網羅的な同定法と定量法の開発、ならびに (3) 本研究で開発した RNA 解析支援ソフトウェア (Ariadne) の高性能化と質量分析法を利用した RNA 定量法の開発を行った。研究項目 (1) では、ESI 補助デバイスの開発と miRNA データベースの整備ならびに Ariadne の改良によって、従来は不可能であった細胞の microRNA の直接分析に世界で初めて成功した¹⁾。また質量分析法のさらなる高感度化の試みとして、LC から溶出する RNA 試料を加圧環境下でイオン化できるデバイスを試作し、最新の質量分析計に装着して性能を評価したところ、RNA のイオン化効率が向上して検出感度を少なくとも約 2 倍向上できた。研究項目 (2) では、RNA 分子が生体内で受ける擬ウリジル化やメチル化、プロセシングなどの転写後修飾を効率よく迅速に決定する方法を開発し、後述する「SILNAS 法」と組み合わせることで、現在構造機能研究が最も進んでいる RNA の一つである酵母細胞の 18S-rRNA の転写後修飾をすべて網羅した全化学構造を決定できた (論文投稿中)。また、その中で30年以上にわたって未知であった 18S-rRNA のアセチル化部位を決定するとともに、この反応を担うアセチル化酵素を同定し、この修飾の生理的意義について考察した²⁾。研究項目

(3)では、安定同位体標識した合成RNAを利用して転写後修飾を同定と同時に定量できる新たな方法(Stable Isotope-labeled Ribonucleic Acid as Internal Standard: SILNAS 法と命名)を考案した。この方法を分裂酵母の18S-rRNA解析に適用したところ、ほぼすべてのRNA残基の修飾率を精度良く定量できること、さらには特定の位置のRNAの修飾率が酵母の生育環境に依存して変化することがわかった(論文投稿中)。また、こうした解析を支援する目的で、Ariadneの高性能化を目指したアルゴリズムの改良と安定同位体標識したRNAを内部標準とする定量分析自動化のための開発を行った。なお本年度は、本研究で開発を進めているRNA質量分析法の有用性を示して汎用性を高める目的で、国内外の多くのグループと共同研究を行った。その成果の1つとして、研究代表者らと同じCREST領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」(田中啓二研究統括)に所属する東京大学 清水敏之教授のグループとの共同研究では、RNAの質量分析法を利用することで、清水教授らが構造機能研究を推進しているToll様受容体(TLR)の1つであるTLR8が、従来推定されていたssRNAそのものではなく、その分解で生じるウリジンと短鎖のRNAを認識して自然免疫に関わるシグナルを下流に伝達していることが明らかになった³⁾。