

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：RNA代謝解析のための質量分析プラットフォームの開発
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

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)

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)

中山 洋 ((独)理化学研究所バイオ解析チーム 専任研究員)

3. 研究実施概要

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、現在その確認と同時に、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準備中である。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、今後これらの疾病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 の生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。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

中間評価時点までに、当初目的の低分子RNAおよびRNA/タンパク質複合体解析のための質量分析プラットフォームに関する基盤技術をほぼ確立した上で、中間評価以降では、検出感度向上とRNAショットガン解析が可能な全自動解析システムの開発、検索同定用ソフトウェアの改良高性能化を行った。さらにこれらの技術を応用により、RNA代謝異常に起因するヒトの遺伝性疾患の原因遺伝子産物の1つとされるRNA結合タンパク質の標的RNAを同定するなど、極めてインパクトの高い重要な成果が得られつつあり、今後疾病の発症機序の解析や治療法の開発に貢献することが期待できる。

従来のRNAの解析は、相補性を利用したDNA アレイ法や特定の塩基配列を増幅するRT-PCR 法等間接的な方法であり、本研究で得られた成果は従来の方法では困難であった転写後修飾を含むRNAの化学構造を詳細かつ非予見的に解析できる新規の優れた方法である。RNA を対象とした質量分析方法の開発という全く新規かつ将来の有効性が大きいに期待できる方法がかくも短期間に開発されたことは、当初の目標・計画以上の大きな進捗であり、わが国発の極めて有望な研究技術開発の達成として、また本CREST の戦略目標に合致した代表的な業績として高く評価できる。

研究成果は着実に論文発表されており、CREST終了後もインパクトの高い論文が発表される見通しである。

論文発表に加え、関連する課題の特集号の編集やシンポジウムの企画などにより、本技術の広報や普及にも力を入れてきている。また、検索エンジンAriadneに関し、PCT出願や商品化に向けた交渉も開始されており、これら知財関連でも高く評価できる。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

質量分析器を用いたRNA 構造解析の独創的なプラットフォームの構築は、国内外に類のない、全く新規でオリジナルな技術開発であり、またこの技術は、今後、RNAを中心とする生命科学研究の広い分野で活用されることが期待できるものであり、国内のみならず、国際的にもインパクトは極めて大きい。RNA解析のための改良型Ariadne 検索エンジンを一般公開することにより、技術の普及にも努めており、インパクトをさらに増す取り組みである。本CREST の戦略目標への貢献が大であることは明らかである。

4-3. 総合的評価

研究代表者の首都大学磯辺グループ(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)、理研中山グループ(RNA 質量分析データ処理と解析技術、Ariadne の開発)、東京農工大高橋グループ(RNA とプロテオームの試料調製、機能解析)の3グループが明確な役割分担をし、理想的な連携を組んで研究を遂行し、低分子RNAおよびRNA/タンパク質複合体解析のための質量分析プラットフォームの構築、更にはRNA代謝異常に起因するヒトの遺伝性疾患の原因遺伝子産物の1つとされるRNA結合タンパク質の標的RNAの同定など、独創的な研究成果を5年間の内に成し遂げたことは高く評価される。今後、低分子RNAやRNA/タンパク質複合体の解析は、生物学や医学の分野で極めて重要な領域となることが予想され、この分野で本技術が大きな貢献をすることが期待できる。