

論文内容の要旨

論文題目 往復循環クロマトグラフィー法の開発と機能性 RNA の自動単離精製

氏名 宮内 健常

生命の複雑さとゲノムのタンパク質をコードしない領域(non-coding 領域)の増加には明確な相関が見られ、ヒトゲノムに至ってはタンパク質をコードする領域はわずか 2%にも満たず、98%が non-coding 領域で占められている。近年の網羅的なトランスクリプトーム解析の結果、これらの領域の約 7 割が転写されていることが判明した。これらの non-coding RNA (ncRNA)は、タンパク質に翻訳されることなく存在し、機能性 RNA として振舞い、RNA 干渉による翻訳調節や、転写調節、エピジェネティックな制御など、遺伝子発現の様々な局面において、重要な役割を演じていることが次第に明らかになりつつある。複雑な生命活動を分子レベルで理解するためには、これら新規な機能性 RNA の探索とその解析が重要な鍵を握っていると考えられる。

RNA は、転写後に様々なプロセッシングや修飾を受けることで成熟する。そのため、RNA を単なる配列情報としてのみ捉える従来のアプローチでは、RNA が有する質的な情報を解析することは不可能である。転写後に生じる塩基修飾や末端構造など、機能に影響を与えるような質的な情報を解析するためには、生体内に存在する RNA を直接単離して解析を行う必要がある。しかし、微量な RNA の単離精製は難易度が高く一般的な手法ではない。今後、膨大な数の機能性 RNA の機能、構造を明らかにしていくためには、より効率的な精製技術の開発が求められている。

そこで、本研究では往復循環クロマトグラフィーという新しい概念に基づいた生体高分子の精製法を考案し、全自動 RNA 精製装置の試作を行い、RNA 精製への応用を試みた。本方法は、多種類の生体高分子を同一試料から同時に同条件で単離するための手法であり、自動化が容易、全てのアフィニティー精製に適用可能などの特長を持つ。これにより、少ない試料から複数の目的物を効率よく得ることが出来る。また、自動化によって、精製工程が煩雑で条件設定の難しいような場合でも、少ない労力で再現性良く精製を行うことが可能となる。

1. 往復循環の概念と装置の試作

まず、往復循環クロマトグラフィー法の概念を考案した。マルチチャンネルのピペッターに別々のターゲット用のチップを装着し、吸引、吐出、攪拌を繰り返していくことで、全ての溶液を全てのチップに均一に循環させることを基本原理としている(図 1)。十分な循環後、各チップを別々に洗浄、溶出し、各目的物を得る。原理的にチップの容量の数十倍の試料溶液を扱えるので、微量な物質の精製に向く。また、チップ数やプログラムも必要に応じて変更できる。

次に、このような概念に基づき、自動分注機を

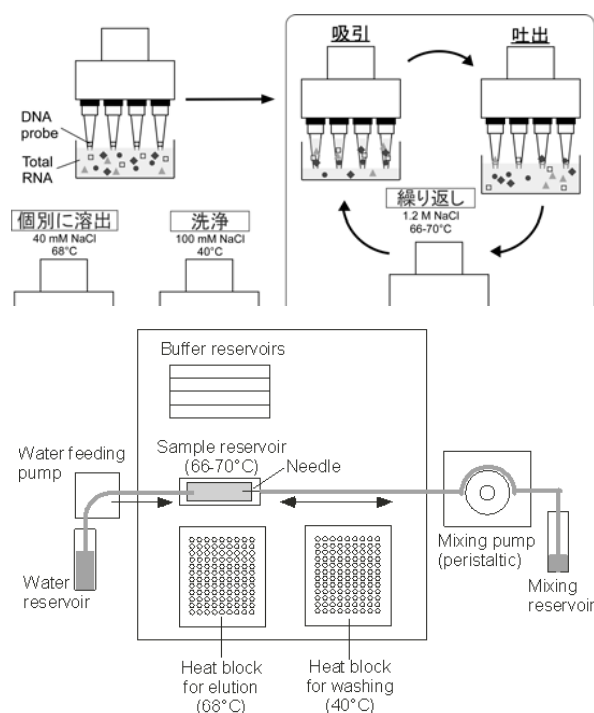


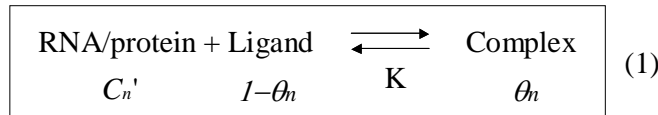
図2 往復循環装置の模式図

ベースとした RNA の自動精製装置を試作した。分注機に、96 穴のヒートブロック 2 個、8 チップを同時に差し込める試料溶液用リザーバー(往復循環槽)、溶液攪拌用のペリスタポンプ、蒸発した水分を補給するポンプ、パソコンを組み合わせた(図 2)。ペリスタポンプは分注機本体と連動するようにした。全ての動作がパソコンから制御でき、様々な動作をプログラムすることが可能である。

RNA の精製法としては固相化プローブ法を用いた。チップにストレプトアビジン樹脂を詰め、目的 RNA に相補的な 30 塩基のビオチン化オリゴ DNA プローブを結合させて使用した。

2. 理論式の導出と検証

次に、ピペッティング回数などを見積もるため、簡易なモデルを構築し理論式を導出した。まず、チップ内での平衡を仮定した式(式1)を考える。



ここから得られる質量作用式と他の収支関係の式から、最終的に次の漸化式を得た。

$$\theta_n = \frac{(B_n + N_{\max} + \frac{\ell}{K}) - \sqrt{(B_n + N_{\max} + \frac{\ell}{K})^2 - 4N_{\max} B_n}}{2N_{\max}} \quad (2)$$

(L: 試料の液量, ℓ : チップが吸う液量, n: ピペッティング回数, N_{\max} : チップの最大結合量, C_n : n 回後の試料溶液濃度, θ_n : n 回後の被覆率, K : 平衡定数, $B_n = \ell C_{n-1} + N_{\max} \theta_{n-1} = \ell C_0 + (1 - \frac{\ell}{L}) N_{\max} \theta_{n-1}$)

次に、理論式の検証のため、実際に大腸菌 tRNA^{Pro2} の自動精製を行った。ピペッティングごとに試料溶液からサンプリングし、tRNA^{Pro2} についてドットプロットで定量し、理論式へのフィッティングを行った(図 3)。見かけの平衡定数 $K=1.1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ が、 $R^2=0.888$ で得られ、理論式の妥当性が確認できた。さらに、得られた平衡定数値を用いて、試料の初期濃度を変えた場合の収量を予測し、実験値と比較した(図 4)。その結果、値が比較的良く一致していることが分かり、平衡定数値が分かれば回数や収量の予測が可能であることが確認できた。

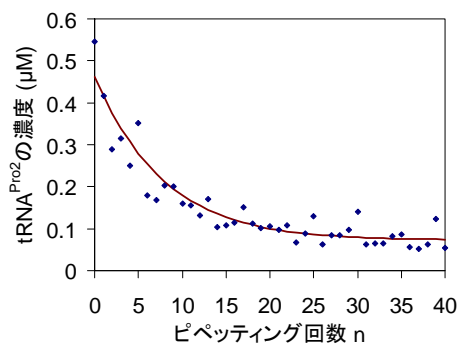


図3 理論式へのフィッティング

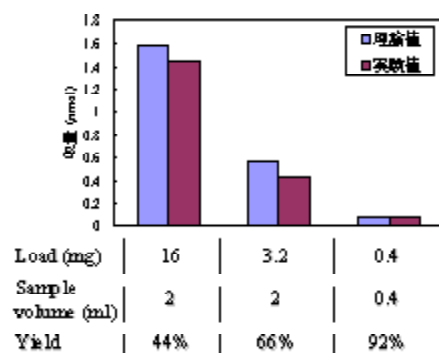


図4 収量の予測値と実測値

3. 大腸菌の全tRNA及びsRNA数種の自動精製

往復循環クロマトグラフィー法のパフォーマンスと安定性を検証するため、大腸菌の全 tRNA と 4 種の sRNA の自動精製を試みた。大腸菌の tRNA は 48 種類存在するが、そのうち 4 組 8 種の tRNA は配列が酷似しているため各組共通のプロープを用いた。合計 48 種を 8 つずつ 6 組に分けて単離精製を行った。チップへのプロープ結合も往復循環装置で行い、それぞれ 50 μ g 程度のプロープが結合できた。次に、大腸菌 tRNA 画分 16 mg を用いて、66 $^{\circ}$ C でピペッティングを 40 回行い、RNA をチップに行き渡らせた。チップを 40 $^{\circ}$ C で洗浄した後、68 $^{\circ}$ C で目的 RNA を溶出させた。溶出物を電気泳動したところ、十分な精製度 (50-95%) で各 tRNA が精製できていた (図 5A)。収量は平均 50 μ g 程度であった。従来、全 tRNA の単離は非常に手間がかかり事実上不可能であったが、本装置を用いれば労力や時間が大幅に削減され、多種類の RNA の精製が比較的容易に実行できた。sRNA のうち、DsrA と SraH は非常に存在量が少なかったが、ノーザンハイブリダイゼーションで精製自体はできていることを確認した (図 5B)。素通り画分からは検出されないことから、非常に微量な RNA でも収率良く精製可能なことが証明できた。

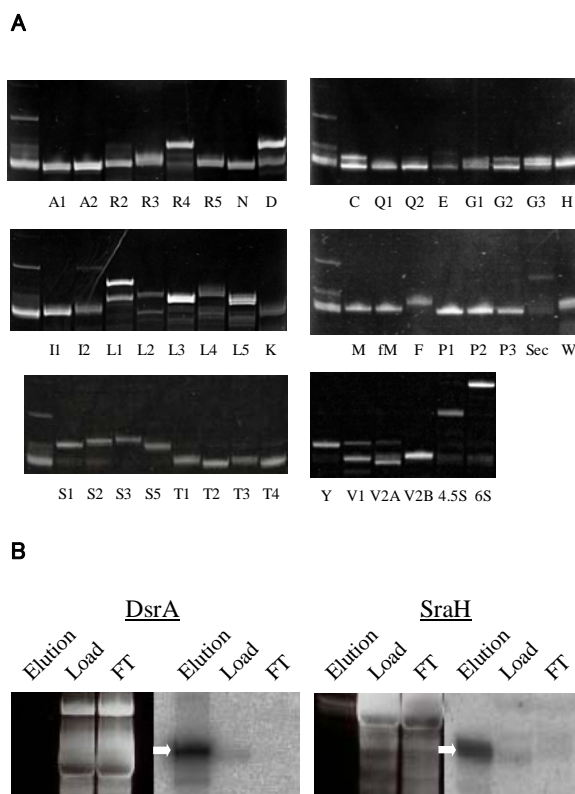


図5 自動精製された大腸菌RNA

(A) 全tRNAと4.5S、6S RNA。

(B) DsrAとSraH。それぞれ、左側がエチジウムブロマイド染色、右側がノーザンハイブリダイゼーション。

4. LC/MSによるRNAの同定と修飾が未知であるtRNAの修飾塩基決定

得られた RNA の同定は LC/MS で行った。泳動の各バンドを切り出し精製し、RNase T1 で断片化した後、LC/MS で解析した (T1 マッピング)。95%以上の断片が同定され、全ての目的 RNA が得られていることが確認された。

大腸菌の tRNA のうち、Leu3、Thr2、Thr4、Pro2、Pro3 の 5 種類は修飾塩基が未報告であったため、修飾塩基を含めた一次構造解析を LC/MS で行った。まず、tRNA のゲノム配列情報と T1 マッピングの結果を合わせることで、ほとんどの修飾を推定することができた。次に、シュードウリジンはウリジンと同質量で区別できないため、シュードウリジン特異的な化学修飾を施して T1 マッピングを行い、位置を決定した。T1 断片中に修飾位置候補が複数あるものについては、当該断片を MS/MS で解析し、位置を決定した (図 6)。バクテリアでの新規修飾塩基として Am が見出された。修飾が一部不明であった tRNA の修飾も決定した。また、今回のデータ、これまでの文献、データベース、ゲノム配列を整理し、最も確からしい大腸菌 tRNA の修飾を含む全配列を決定した。

5. 真核生物ncRNAの自動精製

次に真核生物の ncRNA の複数同時自動精製を試みた。出芽酵母 8 種、マウス 6 種(図 7)の様々なクラスの ncRNA の精製に成功した。様々な生物種の様々な ncRNA が往復循環クロマトグラフィーで単離精製可能であることが示唆された。報告が急増している真核生物 ncRNA の解析に非常に有用であると考えられる。

結論

単一の試料から、複数の目的物を同時に同条件で自動精製できる往復循環クロマトグラフィー法及びその自動化装置を開発した。本装置で RNA の単離精製を試み、理論式が妥当であることを確認した。さらに、大腸菌の全 tRNA、4 種の sRNA、8 種の酵母 ncRNA、6 種のマウス ncRNA の自動単離に成功した。本手法の開発により RNA の単離精製を飛躍的に簡易化することができた。また、本手法が様々な生物種の様々な RNA で有効であることを確認した。大腸菌 tRNA については網羅的な一次構造解析を LC/MS で行い、未報告であった修飾塩基を全て決定した。

当研究室では、LC/MS のデータから自動的に RNA の同定、修飾解析を行う RNA マスフィンガープリント法の開発も進めており、これらの手法の開発により、RNA の精製から同定、修飾解析までが自動化され、ハイスループットな RNA の質的解析のための基盤技術がほぼ確立されたと考えている。

現在は更なる装置の改良を進めており、将来的には汎用的な自動精製装置として製品化を目指したい。また、全てのアフィニティー精製に応用可能であるため、RNA 精製以外への応用、特に抗体カラムを用いた免疫沈降への応用を図っていく予定である

発表論文

Miyauchi K, Ohara T, Suzuki T. (2007) Automated parallel isolation of multiple species of non-coding RNAs by the reciprocal circulating chromatography method. *Nucleic Acids Res.* **35**, e24.

Ohara T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Ueda H, Miyauchi K, Suzuki T. (2007) The 3' termini of mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 349-50.

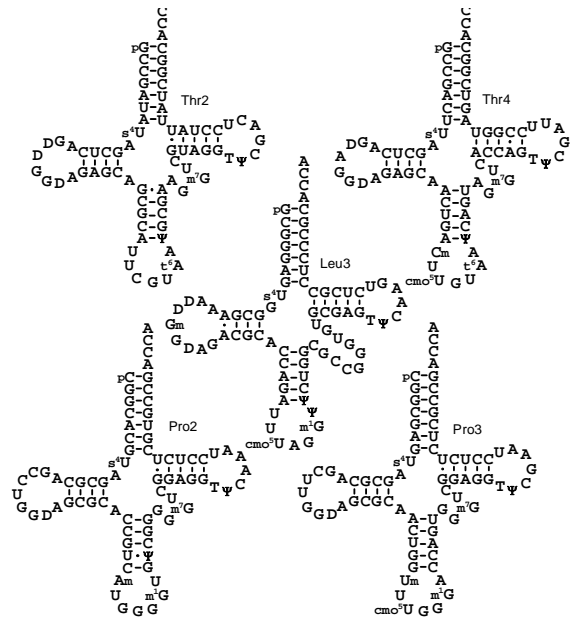


図6 新規に修飾を決定したtRNAの二次構造

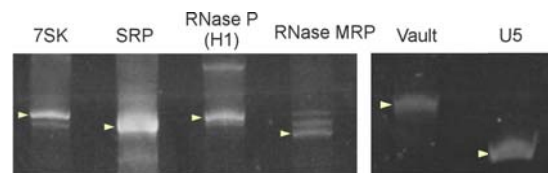


図7 マウスncRNAの精製