Letter to the Editor

第21回国際質量分析学会 (IMSC2016) 参加報告

Participation Report of the 21st International Mass Spectrometry
Conference (IMSC 2016)

寶田 徹

Toru TAKARADA

神戸薬科大学

21st International Mass Spectrometry Conference; 21st IMSC (第21回国際質量分析会議) が2016年8月20日から26日までの7日間、カナダ、オンタリオ州のトロントで開催された。会場はトロントの主要駅である Union station からほど近い The Metro Toronto Convention Centre (MTCC) であった (写真1)。1976年の建立から2007年までの32年間、自立式建築物として世界で最も高かった CN (Canadian National) タワーが南にそびえていた。Major League Baseball (MLB) のアメリカンリーグ東地区に所属するトロント・ブルージェイズの本拠地、Rogers Centre に近接していたこともあり、夕刻の会場付近は試合観戦に向かう青色のユニフォームをまとったサポーターの姿を多く見ることができた。筆者が宿泊したホテルから会議場に向かう道中にはアイスホッケーの歴史を保存、顕彰するために建てられた「Hockey Hall of Fame (ホッケーの殿堂)」があり、カナダの国技であるアイスホッケー人気の根強さが感じられた。五大湖の一つオンタリオ湖畔にあるトロント最大の特徴は多くの人種が住むことから「人種のモザイク」とも呼ばれ、移民がもたらしたさまざまな国籍の文化が地域ごとに独立した個性を作り出している。街は数ブロックごとにさまざまな表情をもち、ギリシャタウン、リトルイタリー、チャイナタウン、コリアタウンなど、筆者がもっていた小さな地図の上でも至る場所で多様な文化を垣間見ることができた。

写真1. 学会会場となったMTCCと南にそびえるCNタワー (高さ553.33 m)。

1. RNA スプライシングと質量分析

筆者は日本質量分析学会より2016年度トラベルアワードを賜り、今回のカンファレンスに参加することができた。研究内容はポスターセッションにて報告した。セッション会場には大きなホールが利用され、北側に位置するガラス窓からは外の光も入り、明るく開放的な空間での発表であった。

筆者はこれまで生体内機構のRNA スプライシング反応にかかわるタンパク質に着目した研究を行ってきた。生体内においてRNAはさまざまなタンパク質と相互作用し、制御を受ける。「RNA-タンパク質複合体」の解析は複雑なRNA代謝を理解するうえで重要な課題とされている。RNA スプライシングは遺伝情報を含まないイントロン配列を除去し、アミノ酸をコードするエクソン配列を連結するRNA成熟過程の一つである。スプライシング反応は主にRNAとタンパク質の

巨大複合体であるスプライソソームの触媒反応によって進行する。スプライソソームは数種類の small nuclear ribonucleoproteins: snRNPs, および100種類以上の補助タンパク質で構成される。これらのスプライソソーム構成因子が適切なエクソンとイントロンの境界部位を認識し、イントロンの除去とエクソンの連結が完了する。エクソンとイントロンの境界を決定する因子として、イントロンの5'スプライス部位（スプライシングドナー部位）および3'スプライス部位（スプライシングアクセプター部位）が知られている。これらのコンセンサス配列はそれぞれGUおよびAGの2塩基配列が保存されている。選択的スプライシングを受けるエクソン前後のコンセンサス配列の保存性は低く、複数のスプライシングバリエーションの産生を可能にしている。それ以外のスプライス部位を決定する因子として「スプライシング制御因子」が知られている。スプライシング制御因子はスプライソソームの機能を補助し、精巧なスプライシング反応を実現するうえで極めて重要な役割を担う。これらの制御因子は主にSRタンパク質とhnRNPsの2群に大別され、前者がスプライソソームのエクソン認識を促進させるのに対し、後者は抑制作用を有する。これらの因子がpre-mRNA上に存在する特定の配列に結合することで複雑なエクソン認識機構を実現している。

最近ではこの精巧な制御機構の破綻が重篤な疾患を引き起こすことが報告されている。スプライシング異常を修正するための治療アプローチとして核酸医薬品である「アンチセンスオリゴヌクレオチド（antisense oligonucleotide: AO）」を用いた方法がある。AOによるスプライシング異常修正はいくつかの疾患を対象とする臨床試験が行われており、世界標準の治療法となりつつある。最も臨床応用に近づいている対象疾患はDuchenne型筋ジストロフィー（DMD）と脊髄性筋萎縮症（SMA）である。両者はともに難治性疾患に分類され、治療法開発が待望されている。DMDを対象としたAOである「Eteplirsen」は2016年9月にFDAの承認を受けたが、いまだデータに関する疑問点が残し、さまざまな議論が続いている。SMA治療薬となる「Nusinersen」は2016年12月12日に本国においても製造販売承認申請が行われており、日本初のアンチセンス核酸医薬品になると考えられる。しかしながら、AOは合成費用が高額となるため、患者への経済的負担が大きくなることが問題視されている。もう一つのスプライシング異常修正法として「低分子化合物」を用いる方法がある。AOと比較した場合の特異性の低さが課題とされているが、利便性やドラッグデリバリーの優位性などから、現在、その実用化が期待されている。

スプライシング異常を修正する低分子化合物はこれまでにいくつか報告されているが、その標的分子は不明なことが多い。スプライシング反応は多様なタンパク質がかかわるため、新規治療薬の開発には汎用性の高い標的タンパク質同定法およびその解析法が必要となる。そこで筆者は質量分析法を用いたスプライシング制御因子同定法の構築を目指した。質量分析法は生体成分の網羅的解析を可能にする反面、一度の測定により膨大なデータが取得されるため、目的とした情報を得るための適切な前処理や分離法が必要となる。核酸分子とタンパク質の相互作用解析には古くから electrophoretic mobility shift assay（EMSA）が利用されてきた。EMSA法はタンパク質と相互作用した核酸分子の分子量が増大し、電気泳動時に移動度が低下することを利用した方法である。本研究では *in vitro* でRNA-タンパク質複合体を形成させ、RNA-EMSA法により、複合体分離を行った。RNAに結合した候補タンパク質の酵素消化物を液体クロマトグラフィーでカラム分離し、MS/MSにより結合タンパク質の同定を行った。同定された候補標的因子のRNAへの結合を阻害する低分子化合物を見出すことに成功した。この化合物は細胞内の特定のスプライシング反応を変更することが確認できたことからスプライシング異常を修正する新たな治療薬候補になると考えられた。

2. 意見交換と英語コミュニケーション能力体得の重要性

Goethe University, Medical SchoolのDr. Florian Richerは筆者の一通りの説明を聞いた後、実験に関するアドバイスを提供してくれた（写真2）。彼らは特定のスプライシング制御因子がRNA配列内のどのアミノ酸を介してどの塩基と相互作用しているのかを同定するため、ペプチド断片と塩基が架橋形成した複合体の同定を行い、ポスターセッションでその結果を報告していた。RNA-タンパク質複合体を測定するための複合体形成方法、カラムを用いた前処理の流れ、質量分析装置の測定条件や複合体を解析し同定するためのソフトなど、筆者の研究に応用できる多くの情報を教えていただいた。リスニング能力不足の筆者のために、図と簡単な単語で実験の流れについて筆者のノートに何ページにもわたり書き綴ってくれた。帰国後も彼は実験に関して行き詰まったらいつでも連絡していいからと筆者にメールを送ってくれた。人とのつながりの大切さを改めて感じ、この経験は今後忘れることのない貴重な思い出となった。

前述のとおり、これまで筆者はエクソン認識にかかわるスプライシング制御因子の同定法を構築し、この結合を阻害することでスプライシングを操作する低分子化合物の簡易的探索法の確立を目標としてきた。彼らのような質量分

写真2. ポスターセッションでの意見交換。

析法を用いた複合体の直接分析はこの研究をさらに発展させることができ、スプライシング制御因子の詳細な機能を理解するために有用となるだけでなく、RNAへの結合を阻害する低分子化合物の効果の確認や特異性評価にも応用することが可能と考える。

3. 生体分子が形成する複合体と Native-mass spectrometry

筆者が興味をもつ手法の一つに Native-mass spectrometry (Native-MS) がある。Native-MSはより自然な複合体解析を可能とするため、筆者のRNAスプライシングに関する研究分野でも応用できる点が数多くあると感じていた。今回のカンファレンスにおいても Native-MSは非共有結合に関する報告を集めたセッションに限定されず、多様な領域のユーザーに幅広く応用されており、この手法の有用性と発展性を改めて感じる事ができた。ARNA laboratory (ARN: Regulations Naturelle et Artificielle, University of Bordeaux) の Clemence Rabin らはヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus; HIV) がもつヘアピン構造 Trans-activation response element (TAR) とそのアプタマー医薬である R06 が形成する RNA-RNA 複合体には二つのマグネシウムイオンがかかわり、複合体形成の安定化に寄与する可能性を報告していた。また Griffith University の Lilliana Pedro らはマラリアに対する治療標的の一つと考えられているタンパク質 (Plasmodium vivax guanylate kinase) に結合する 26 種の低分子化合物を Native-MS を利用した薬物スクリーニングによって発見したことを報告していた。このように Native-MS は医薬品と生体分子の詳細な相互作用解析を可能にするため、疾患治療などのより臨床に近い領域においても重要な役割をもつと考える。現在の Native-MS は大腸菌や CHO 細胞を用いて作製した組換えタンパク質を用いた実験が主流である。しかしながら、他分子と相互作用するタンパク質の機能は翻訳後修飾なども複雑にかかわることが報告されているため、細胞内在性の複合体を解析するための前処理、実験手法の試行錯誤が行われている。今後、複合体の構造情報に関する分野はさらなるステップへと加速的に進んでいくと感じた。現在のオミックス解析では各階層が独立した研究分野として扱われることが多い。しかしながら、生体内では RNA とタンパク質の相互作用のような階層を超えた強いかかわりが存在する。これらの階層をつなぐ研究分野の発展は複雑な生体機能の解明や新規治療薬開発に極めて重要となる。質量分析法はこの課題を克服するための有用な手段の一つであり、これからも広範な分野に新知見をもたらすものとする。

7 日間のカンファレンスに参加し、多くのことを学ぶことができました。現在の質量分析分野の世界における流れや注目されていることなどの学問的なことだけでなく、英語でコミュニケーションをとることの重要性などさまざまなことを経験しました。このような貴重な機会を与えてくださいました日本質量分析学会に深く感謝申し上げます。