

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21115003

研究課題名(和文)高分子非コードRNA作用マシナリー構成要素の探索と解析

研究課題名(英文)Structural and functional analysis of non-coding RNA machineries

研究代表者

鈴木 健夫(Suzuki, Takeo)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90533125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 45,500,000円、(間接経費) 13,650,000円

研究成果の概要(和文)：Xistの5'末構造解析によりmRNAのcapとは異なる修飾の状態が見出された。Malat1の3'末保存エレメント由来RNAの解析から1ヶ所のAがメチル化されていた。メチル化レベルをに影響する遺伝子の探索からメチル化酵素の同定とメチル化構造の実体を特定した。メチル化Aの検出手法とqRT-PCR法の組み合わせにより、微量サンプルからのRNA修飾定量法を開発した。2型糖尿病リスクとなるCDKAL1によるメチルチオ化修飾に適応し、リスクアレル保持者末梢血RNAサンプルでメチルチオ化修飾率が低下傾向にあることを示した。特徴的なRNA構造変化および修飾因子の発見への寄与があった。

研究成果の概要(英文)：The 5' terminal of Xist RNA, a nuclear retained non-coding RNA which inactivates one of the pair of X chromosomes, was found to be characteristically modified unlike ordinary mRNAs. Also, the conserved element in 3' terminal of Malat1 RNA, the component of a functional nuclear compartment "nuclear speckles", was found to be methylated at an adenosine site. Identification of a gene diminishing the methylated adenosine revealed the most plausible structure and modifying enzymes of the methyladenosine. We developed methylthio-modification measurement method by using small-quantity clinical samples. Taken together, we contributed the findings of RNA structural alterations, including determination of a novel chemical structure, and their modifying factors.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：RNA 転写後修飾 プロセッシング 修飾酵素

1. 研究開始当初の背景

タンパク質をコードしない RNA は複雑な生命現象に関わる制御因子としてはたらくという考え方は lincRNA と呼ばれる分子種の発見と機能解析の進展により確立が進んでいるが、これら非コード RNA の転写後プロセッシングとしての化学構造変化に着目した RNA 分子の解析はほとんど行われていない。非コード RNA の化学構造変化の特定や変化をもたらす相互作用因子の特定を進め、非コード RNA 機能との相関を明らかにする研究に一定の意義が認められる状況であった。

2. 研究の目的

非コード RNA 作用マシナリーの全容を明らかにするためには、非コード RNA を構成因子とする複合体の相互作用因子や RNA の構造を詳細に知ることが重要となる。RNA の転写後プロセッシングによる化学構造変化に着目し、RNA の分子レベルでの構造的特徴を解析を足がかりに、構造変化をもたらす因子の特定や RNA 化学構造変化の機能的意義の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)(2) マウス組織、培養サンプル、末梢血など生体組織から RNA を調製し、塩基相補性に基づいた合成 DNA をプローブとしたアフィニティー精製により目的 RNA を単離した。RNA を塩基特異的ヌクレアーゼで分解し、生じたフラグメントを質量分析により詳細に解析し、配列から想定される分子量の計算値と実測値との差から修飾構造の部位と種類を特定した。得られた構造に関連する修飾酵素を絞り込み、RNA 干渉によるノックダウンにより対象の修飾レベルの変動を同様に解析する。構造が逆転写の伸長反応を阻害する性質を持つ場合は、プライマー伸長法や、修飾部位近傍に設計した配列特異的プライマーを逆転写反応に用いる qRT-PCR により修飾レベルの変動を測定した。

(3) 対象生物種から新規構造ヌクレオシドを RNA 加水分解物から精製し、質量分析の結果から妥当な構造を特定した。候補化

合物を化学合成し、各種分析データが天然物と合成物で完全に一致しているかにより構造を確定させた。

4. 研究成果

(1) 核係留型非コード RNA の構造解析

核係留型非コード RNA Xist の 5'末端構造解析に関し、マウス RNA から Xist の 5'末端領域断片を特異的に生成させ、アフィニティー精製によりこの断片の濃縮に成功した。5'末端断片の LC/MS 解析から Xist は通常の mRNA に見られる cap とは異なる状態の構造(cap*)を持つ事を見出している。cap*に至る経路に含まれる修飾酵素には同定されていないものがあり、この新たな因子を同定する研究を展開している。核係留型非コード RNA Malat1 の 3'末端プロセッシング産物の構造解析を行った。Malat1 の 3'末端近傍に保存されたエレメント mascRNA が酵素活性により Malat1 前駆体から切り出されると共に polyA 付加が起こるプロセッシング過程が知られている。アフィニティー精製したマウス mascRNA の LC/MS 解析により 1ヶ所のアデノシンがメチル化されていることを見出した。1-メチルアデノシン(m¹A)メチル化酵素複合体の構成要素である TRMT6 のノックダウンにより mascRNA のメチル化レベルが低下したことから mascRNA のメチル化修飾の実体は m¹A であり、tRNA メチル化酵素 TRMT61A/TRMT6 複合体により修飾を受けることが示された。核係留型非コード RNA を直接精製し、分子として解析した少ない例であり、各分子から特徴的な化学構造を新たに見出したものである tRNA メチル化酵素が mascRNA を修飾しうる観察は RNA 修飾因子が従来考えていた以上に様々な RNA を標的にして分子機能を発揮する制御機構の存在を示唆している。

(2) tRNA 修飾と糖尿病の関係性、臨床サンプルからの修飾率評価法の開発

上記 mascRNA のメチル化 A を検出した原理の派生として、修飾構造による逆転写伸長の阻害性を元にした qRT-PCR による修飾定量法を開発した。一例として CDKAL1

により修飾される細胞質 tRNA-Lys(UUU)₃₇ 位の ms²t⁶A におけるメチルチオ化修飾に適應され、修飾の下流または修飾を跨ぐ領域に設計した逆転写プライマーを用いた 2 通りの qRT-PCR の Ct 値の比較から相対的な修飾率が得られることを示した。CDKAL1 の SNPs は 2 型糖尿病のリスクファクターとして知られ、CDKAL1 ノックアウトマウスはインシュリン分泌能低下の表現型を示す。この方法により、CDKAL1 リスクアレルを持つ末梢血 RNA サンプルでは ms²t⁶A のメチルチオ化修飾率低下傾向が示された。本手法により微量臨床サンプルを用いた新しいタイプの糖尿病リスク評価法につながる可能性がある。

(3) rRNA 新規修飾構造の決定

典型的非コード RNA の一種 rRNA はリボソームの構成成分として遺伝暗号解読とタンパク質合成反応に寄与している。アーキア 16S rRNA の新規修飾構造の決定に成功した。in vivo 安定同位体標識培養を適宜用いて精製した化合物の質量分析法を行った。分析から得られた候補化合物を 7 段階の反応から有機合成し、天然物と合成物の挙動が各種分析で一致したことから構造の妥当性が確認された。更に比較ゲノム解析と遺伝子破壊株を作製したことで新規修飾が欠失する遺伝子を見出した。この遺伝子は種間で保存された Cys 残基があり、野性型遺伝子のトランス相補は修飾を復活させたが Cys 変異型遺伝子相補では修飾欠損が復活できなかったことから、Cys が修飾の形成に重要な役割を持つことが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 16 件)

1. A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. Suzuki T. and Suzuki T. (2014) *Nucleic*

Acids Research. in press

10.1093/nar/gku390 [査読有]

2. Biochemical and mass spectrometric analysis of 3'-end methylation of piRNAs. Suzuki T., Miyauchi K, Sakaguchi Y, Suzuki T. (2014) *Methods Mol. Biol.* 1093, 59-72
10.1007/978-1-62703-694-8_6
3. Quantitative PCR measurement of tRNA 2-methylthio modification for assessing type 2 diabetes risk. Xie, P., Wei, H.-Y., Hirata, S., Kaitsuka, T., Suzuki, T., Suzuki, T.* and Tomizawa, K.* (2013) *Clin. Chem.* 59, 1604-1612
10.1373/clinchem.2013.210401 [査読有]
4. Decoding mechanism of non-universal genetic codes in *Loligo bleekeri* mitochondria. Ohira T, Suzuki T (第 2 著者), 他 5 名 (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 7645-7652
10.1074/jbc.M112.439554 [査読有]
5. Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity. Kimura S, Ikeuchi Y, Kitahara K, Sakaguchi Y, Suzuki T and Suzuki T (2012) *Nucleic Acids Research.* 40, 4071-4085
10.1093/nar/gkr1287 [査読有]
6. Molecular basis of dihydrouridine formation on tRNA. Yu F, Tanaka Y, Yamashita K, Suzuki T (第 4 著者), 他 4 名 (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 19593-19598
10.1073/pnas.1112352108 [査読有]
7. Taurine-containing uridine modifications in tRNA anticodons are required to decipher

- non-universal genetic codes in ascidian mitochondria.
Suzuki T (第1著者), 他 8 名 (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 35494-8
 10.1074/jbc.M111.279810 [査読有]
8. Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish.
 Higa-Nakamine S, Suzuki T (第2著者) 他 7 名 (2011) *Nucleic Acids Research.* 40, 391-398
 10.1093/nar/gkr700 [査読有]
9. Human Mitochondrial tRNAs: Biogenesis, Function, Structural Aspects, and Diseases.
 Suzuki T, Nagao A and Suzuki T (2011) *Annu. Rev. Genet.* 45, 299-329
 10.1146/annurev-genet-110410-132531 [査読有, review]
10. Deficit of Lys-tRNA Modification by Cdkal1 Causes the Development of Type 2 Diabetes in Mice.
 Wei FY, Suzuki T (第2著者), 他 11 名 (2011) *J. Clin. Invest.* 121, 3598-608
 10.1172/JCI58056 [査読有]
11. Actin-binding protein ABP140 is a methyltransferase for 3-methylcytidine at position 32 of tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*.
 Noma A, Yi S, Katoh T, Takai Y, Suzuki T and Suzuki T (2011) *RNA.* 17, 1111-1119
 10.1261/rna.2653411 [査読有]
12. Human mitochondrial diseases caused by lack of taurine-modification in mitochondrial tRNAs.
 Suzuki T, Nagao A and Suzuki T (2011) *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2, 376-386
 10.1002/wrna.65 [査読有, review]
13. Agmatine-conjugated cytidine in tRNA anticodon essential for AUA decoding in archaea.
 Ikeuchi Y, Kimura S, Numata T, Nakamura D, Yokogawa T, Ogata T, Wada T, Suzuki T and Suzuki T (2010) *Nat. Chem. Biol.* 6, 277-282
 10.1038/nchembio.323 [査読有]
- 3 報省略
- [学会発表] (計 23 件)
1. Novel modified nucleoside found in 16S rRNA from halophilic archaea.
Takeo Suzuki, Hajime Takeda, Tomoyuki Watanabe, Naoki Uchiyama, Takeshi Wada, Tsutomu Suzuki MBSJ2013 (Dec 2013 Kobe, Japan)
 口頭 3 件、ポスター 19 件省略
- [産業財産権]
 出願状況 (計 1 件)
- 名称: RNA 修飾の簡易検出法、及び該検出法を用いた 2 型糖尿病の検査方法
 発明者: 富澤 一仁、魏 范研、鈴木 健夫、鈴木 勉
 権利者:
 種類: 特許
 番号: 特願 2013-047278
 出願年月日: 平成 25 年 3 月 8 日
 国内外の別: 国内
- 6 . 研究組織
 (1) 研究代表者
 鈴木 健夫 (SUZUKI, Takeo)
 東京大学・大学院工学系研究科・講師
 研究者番号: 90533125
- (2) 研究分担者
 ()
 研究者番号:
- (3) 連携研究者
 ()
 研究者番号: