

令和元年6月22日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04763

研究課題名(和文) RNA修飾酵素によるRNA分子種特異的・部位特異的作用の基本原理の理解

研究課題名(英文) The basic principles of RNA recognition mechanisms of RNA modification enzymes

研究代表者

堀 弘幸 (HORI, HIROYUKI)

愛媛大学・理工学研究科(工学系)・教授

研究者番号：20256960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、どのような構造を持ったRNA修飾酵素が、どのようなRNAを基質として認識し、修飾するのが解明することを目標とし、以下の研究成果を報告した。(1) RNA結合ドメインとして知られるTHUMPドメインは、RNAの一本鎖領域に結合性を有し、tRNA修飾酵素では、しばしばCCA末端を認識する。(2) 好熱菌tRNAメチル化酵素TrmBの特殊なC末ドメインは、メチル基供与体のS-アデノシル-L-メチオニンの結合ポケットを形成し、その一部は基質tRNA結合部位ともなる。(3) 好熱菌のtRNA修飾ネットワークにおいて、葉酸依存性tRNAメチル化酵素TrmFOは低温適応のサポーター因子として働く。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA修飾の基本的役割はタンパク質合成系の制御です。ヒトの場合、その制御が乱れると遺伝病や発がんに関与することが知られています。また、コレラ菌、チフス菌、ヒト免疫不全ウイルスなどにとって、RNA修飾は感染必須因子です。さらに、RNA修飾が環境(ストレス)応答因子であることも明らかとなりつつあります。したがって、どのようなRNA修飾酵素がどのようなRNAに作用するのか、また、いかに制御されているのかを理解することは、タンパク質合成系の基本制御の仕組みを解明し、遺伝病の病態の理解、遺伝子診断・遺伝子治療法の開発、感染性微生物対策、生物多様性の理解、環境応答の仕組みの解明などにつながります。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is the clarifications of substrate RNA recognition mechanisms of RNA modification enzymes. The findings have been reported as follows. (1) THUMP domain, a RNA binding domain, binds to a single-stranded region of substrate RNA. In the cases of tRNA modification enzymes, it often recognizes the CCA-terminus of tRNA. (2) The C-terminal domain of thermostable TrmB, a tRNA methyltransferase, forms an S-adenosyl-L-methionine binding pocket and a part of the domain contact with the substrate tRNA. (3) In the network between modified nucleosides in tRNA and tRNA modification enzymes from extremetermophilic bacterium, TrmFO, a folate-and FAD-dependent tRNA methyltransferase supports the adaptation for low-temperatures.

研究分野：生物化学

キーワード：タンパク質 酵素 核酸 RNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

RNA 修飾は、タンパク質合成系を制御するという第一義的な機能を有します。これまで、様々な生物のいろいろな RNA から 150 種類以上の修飾ヌクレオシドが発見されています。これらの修飾ヌクレオシドの生産に関わるのが、RNA 修飾酵素です。一般的に、RNA 修飾酵素は基質 RNA の分子種特異的・部位特異的に作用するのが大原則です。しかしながら、どのようなタンパク質構造を持った RNA 修飾酵素が、どのような構造を持った基質 RNA に作用するのか不明なものも数多く残されています。また、RNA 修飾の種類や量は、環境(あるいはストレス)に応答して変化することが、次々と発見されています。さらに、tRNA 修飾の場合、修飾ヌクレオシドと修飾酵素はネットワークを形成し、ある修飾ヌクレオシドの存在が、他の修飾を引き起こす目印となったり、抑制因子として働く例も知られています。これらの解明は、研究開始当初から現在に至るまで、当該分野の大きな課題となっています。

### 2. 研究の目的

本研究では、基質 RNA 認識機構が不明な幾つかの RNA 修飾酵素に焦点を絞り、その構造を元に、基質 RNA 選択性を明らかにし、それらが細胞内でどのような制御を受け、環境変化に応答するのか調べることを目的としました。

### 3. 研究の方法

研究手法は、標的とする RNA 修飾酵素に応じて異なります。幾つかの tRNA メチル化酵素では、X 線結晶構造解析の結果を元に、精製酵素を用いて試験管内での基質認識機構を探りました。また、結晶が得られなかった酵素の場合は、既知の酵素とのアミノ酸配列の比較に基づき、tRNA 結合部位や触媒ポケットなどを調べました。さらに、細胞内での動態や基質認識機構を調べるため、遺伝子破壊株を準備し、場合によっては変異酵素を発現させ、その制御機構について検討しました。

### 4. 研究成果

主な研究成果は以下のようになります。

- (1) RNA 結合ドメインとして知られていた THUMP ドメインは、一本鎖 RNA への親和性が高く、tRNA 修飾酵素の場合、しばしば、CCA 末端への結合領域となる。これは、どのような RNA に結合するのか未解明だった THUMP ドメインの機能を一般化する成果と言えます(発表論文 3)。
- (2) 耐熱性 tRNA メチル化酵素(TrmB)の C 末ドメインは、高温環境下で本酵素の安定化に寄与することが知られていたが、この C 末ドメインを介して、メチル基供与体の S-アデノシル-L-メチオニンの結合ポケットが形成され、かつ基質 RNA の一部も C 末ドメインに接触することを見出した。また、従来、活性に重要であることが指摘されていたアスパラギン酸残基は、活性中心というよりメチル化部位のグアニン塩基の結合に重要であることも発見した。この結果は、活性中心は、むしろグアニン塩基の 7 位窒素原子自身であり、一種のリボザイム反応とも解釈できることを示唆している。10 年来、議論のあった本酵素の触媒機構に新しいモデルを提案しました(発表論文 6)。
- (3) 葉酸依存性 tRNA メチル化酵素は、高度好熱菌が低温適応する上で補助因子として働く。これは、すべての生物で機能が未知だった m<sup>5</sup>U54 修飾が、高度好熱菌では tRNA 修飾ネットワーク上で機能することを示した研究成果です(発表論文 2)。また、葉酸依存性 tRNA メチル化酵素遺伝子の破壊株は、貧栄養条件下ではなぜか野生株より早く生育するという現象が、偶然、発見された。そこで、葉酸代謝経路を軸に、細胞内のメチル基代謝経路を調べたところ、テストした貧栄養条件下では、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸の大部分はメチオニン合成に消費され、その一部は DNA 合成と tRNA 修飾で消費されることが判った。また、このような貧栄養の環境でも、主な tRNA の修飾は、ほぼ正常に導入されており、好熱菌にとって tRNA 修飾が重要で優先的に導入されていることが示された(発表論文 7)。
- (4) RNA 修飾の制御因子として、ポリアミンが考えられた。そこで、種々のポリアミン存在下で、tRNA メチル化酵素(TrmH)の温度依存性について調べた。その結果、80℃では、長鎖ポリアミンもしくは分岐鎖ポリアミン存在下のみで、TrmH は未修飾 tRNA 転写産物をメチル化できることを見出した。この研究成果は、高温環境下で未修飾転写産物がどのように安定化され、RNA 修飾酵素に認識される構造を取りうるのかを示した最初の例だと思います(発表論文 1)。そこで、長鎖・分岐鎖ポリアミンの合成経路を破壊した好熱菌遺伝子破壊株を作成し解析したところ、RNA 修飾以前に、これらのポリアミンはリボソームや tRNA の一部を維持することに必要で、遺伝子破壊株は高温では生存できないことを見出した(発表論文 5)。
- (5) tRNA メチル化酵素の触媒ドメインの構造と生産される修飾ヌクレオシドについて総説を発表した(発表論文 4)。また、好熱菌の tRNA 修飾と修飾酵素に関する総説(発表論文 8)と *Thermus thermophilus* の RNA 修飾の制御因子に関する総説(発表論文 9)を発表した。
- (6) これら以外にも、幾つかの酵素について学会発表を行いました。論文投稿には至っ

ていません。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- (1) Regulatory Factors for tRNA Modifications in Extreme- Thermophilic Bacterium *Thermus thermophilus*.  
Hori, H.  
*Frontiers in Genetics* **10**, 204 [Review] (2019) 査読あり
- (2) Transfer RNA modification enzymes from thermophiles and their modified nucleosides in tRNA  
Hori, H., Kawamura, T., Awai, T., Ochi, A., Yamagami, R., Tomikawa, C., and Hirata, A.  
*Microorganisms* **6**(4), 110-155 [Review] (2018) 査読あり
- (3) Consumption of N5, N10-methylenetetrahydrofolate in *Thermus thermophilus* under nutrient-poor condition.  
Yamagami, R., Miyake, R., Fukumoto, A., Nakashima, M., and Hori, H.  
*Journal of Biochemistry* **164**(2), 141-152 (2018) 査読あり
- (4) Kinetic characterization of substrate binding sites of thermostable tRNA methyltransferase (TrmB).  
Tomikawa, C., Takai, K., and Hori, H.  
*Journal of Biochemistry* **163**(2), 133-142 (2018) 査読あり
- (5) Long and branched polyamines are required for maintenance of the ribosome, tRNA<sup>His</sup> and tRNA<sup>Tyr</sup> in *Thermus thermophilus* cells at high temperatures.  
Nakashima, M., Yamagami, R., Tomikawa, C., Ochi, Y., Moriya, T., Asahara, H., Fourmy, D., Yoshizawa, S., Oshima, T., and Hori, H.  
*Genes to Cells* **22**(7), 628-645 (2017) 査読あり
- (6) Transfer RNA methyltransferases with a SpoU-TrmD (SPOUT) fold and their modified nucleosides in tRNA.  
Hori, H.  
*Biomolecules* **7**(1), 27 [Review] (2017) 査読あり
- (7) Structural and functional analyses of the archaeal tRNA m<sup>2</sup>G/m<sup>2</sup>G10 methyltransferase aTrm11 provide mechanistic insights into site specificity of a tRNA methyltransferase that contains common RNA-binding modules.  
Hirata, A., Nishiyama, S., Tamura, T., Yamauchi, A., and Hori, H.  
*Nucleic Acids Research* **44**(13) 6377-6390 (2016) 査読あり
- (8) Effects of polyamines from *Thermus thermophilus*, an extreme-thermophilic eubacterium, on tRNA methylation by tRNA (Gm18) methyltransferase (TrmH).  
Hori, H., Terui, Y., Nakamoto, C., Iwashita, C., Ochi, A., Watanabe, K., and Oshima, T.  
*Journal of Biochemistry* **59**(5), 509-517 (2016) 査読あり
- (9) Folate-/FAD-dependent tRNA methyltransferase from *Thermus thermophilus* regulates other modifications in tRNA at low temperatures.  
Yamagami, R., Tomikawa, C., Shigi, N., Kazayama, A., Asai, S.I., Takuma, H., Hirata, A., Fourmy, D., Asahara, H., Watanabe, K., Yoshizawa, S., and Hori, H.  
*Genes to Cells* **21**(7), 740-754 (2016) 査読あり

〔学会発表〕(計23件)

下記学会発表は本研究の成果によるものですが、学会発表の出張旅費は、愛媛大学・基盤研究

経費など、他の予算で支出したものを含まず。

- (1) DNA ギャップ切断、固相化 DNA プローブ法を併用した *Thermus thermophilus* rRNA 中のシュードウリジンの分析  
上崎晃輔、荒川静花、白水美香子、竹本千重、堀 弘幸  
第 41 回日本分子生物学会年会 (2018)
- (2) アーキア tRNA メチル化酵素・Trm56 の基質 tRNA 特異性の解明  
福本修平、長谷川貴洋、河村卓哉、堀 弘幸  
第 41 回日本分子生物学会年会 (2018)
- (3) Structure of yeast tRNA Nm34 methyltransferase Trm7-Trm734 complex reveals its novel bipartite interaction essential for 2'-O-methylation of N34 in the wobble position of three specific tRNA species  
Hirata, A., Okada, K., Yoshii, K., Shiraishi, H., Saijo, S., Yonezawa, K., Shimizu, N., and Hori, H.  
27th tRNA Conference (2018)
- (4) Long and branched polyamines are required for maintenance of 70S ribosome, tRNA<sup>His</sup>, and tRNA<sup>Tyr</sup> in *Thermus thermophilus*  
Nakashima, M., Yamagami, R., Tomikawa, C., Ochi, Y., Moriya, T., Asahara, H., Fourmy, D., Yoshizawa, S., Oshima, T. and Hori, H.  
27th tRNA Conference (2018)
- (5) 大腸菌 tRNA (Gm18) メチル化酵素 (TrmH) の基質 tRNA 選択システム  
河野 陽、伊藤亜沙子、山上龍太、平田 章、堀 弘幸  
第 20 回日本 RNA 学会年会 (2018)
- (6) 高度好熱菌の長鎖・分岐鎖ポリアミンは、高温環境下でのリボソーム、tRNA<sup>His</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup> の維持に必要である  
中嶋美沙、山上龍太、富川千恵、越智裕貴、森屋利幸、朝原治一、Dominique Fourmy、吉澤聡子、大島泰郎、堀 弘幸  
第 20 回日本 RNA 学会年会 (2018)
- (7) *Thermus thermophilus* の長鎖・分岐鎖ポリアミンは、高温環境下でのリボソーム、tRNA<sup>His</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup> の維持に必要である  
中嶋美沙、山上龍太、富川千恵、越智裕貴、森屋利幸、朝原治一、Fourmy D、吉澤聡子、大島泰郎、堀 弘幸  
日本ポリアミン学会第 9 回年会 (2018)
- (8) 古細菌 *Thermoplasma acidophilum* tRNA<sup>Leu</sup> のアンチコドン 1 文字目修飾に関わるタンパク質複合体調製法の検討  
玉井 章悟、東口 実結、河村 卓哉、坂口 裕理子、安楽 遼、鈴木 勉、堀 弘幸  
ConBio2017 (2017)
- (9) 真核生物 tRNA メチル化酵素 Trm7-Trm734 複合体の活性発現メカニズムの構造基盤  
平田 章、岡田圭祐、吉井一晃、白石裕之、西條慎也、清水伸隆、堀 弘幸  
ConBio2017 (2017)
- (10) *Thermoplasma acidophilum* tRNA における 4-チオウリジンの生合成経路  
上田隼也、松本奈津実、河村卓哉、堀 弘幸  
ConBio2017 (2017)
- (11) 大腸菌 tRNA(Gm18)メチル化酵素(TrmH)の X 線結晶構造とその基質 tRNA 選択システム

- 伊藤亜沙子、山上龍太、河野 陽、平田 章、堀 弘幸  
第 19 回日本 RNA 学会年会 (2017)
- (12) 好熱好酸性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* Trm56 の分析  
長谷川貴洋、福本修平、河村卓哉、堀 弘幸  
第 19 回日本 RNA 学会年会 (2017)
- (13) 好熱好酸性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* のアーケオシン tRNA グアニントランスグリコシラーゼは、tRNA の 13 位、15 位のグアニンに作用するマルチサイト特異性酵素である  
河村卓哉、平田 章、大野 敏、能村友一朗、長野倫子、行木信一、横川隆志、堀 弘幸  
第 19 回日本 RNA 学会年会 (2017)
- (14) 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の長鎖・分岐鎖ポリアミンは主に高温環境下でのリボソームの維持に必要である  
Misa Nakashima, Ryota Yamagami, Yuki Ochi, Chie Tomikawa, Toshiyuki Moriya, Dominique Fourmy, Satoko Yoshizawa, Tairo Oshima, and Hiroyuki Hori  
第 39 回日本分子生物学会年会 (2017)
- (15) tRNA(Gm18)メチル化酵素(TrmH)の X 線結晶構造とその基質 tRNA 認識機構  
伊藤亜沙子、山上龍太、平田 章、堀 弘幸  
第 39 回日本分子生物学会年会 (2016)
- (16) 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来 RNA m<sup>5</sup>C 修飾酵素の構造機能解析  
山内 綾乃、平田 章、前田 雄太、堀 弘幸  
極限環境生物学会 2016 年度 (第 17 回) 年会 (2016)
- (17) Structural and functional analyses reveal mechanistic insight into a site specificity of the archaeal tRNA m<sup>2</sup>G/m<sup>2</sup>G<sub>10</sub> methyltransferase (aTrm11)  
Akira Hirata, Seiji Nishiyama, Toshihiro Tamura, Ayano Yamauchi and Hiroyuki Hori  
Extremophiles 2016 (2016)
- (18) The long and branched polyamines of *Thermus thermophilus*, an extremely thermophilic eubacterium, are required for maintenance of ribosome at high temperatures  
Misa Nakashima, Ryota Yamagami, Yuki Ochi, Chie Tomikawa, Toshiyuki Moriya, Dominique Fourmy, Satoko Yoshizawa, Tairo Oshima, and Hiroyuki Hori  
Extremophiles 2016 (2016)
- (19) Multisite-specific archaeosine tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) from *Thermoplasma acidophilum*, a thermo-acidophilic archaeon  
Takuya Kawamura, Akira Hirata, Satoshi Ohno, Yuichiro Nomura, Tomoko Nagano, Nobukazu Nameki, Takashi Yokogawa, and Hiroyuki Hori  
tRNA 26th Conference (2016)
- (20) *Thermoplasma acidophilum* 細胞抽出液中には、tRNA の 4-チオウリジン合成に関わる新たな因子が存在する  
上田隼也、松本奈津実、河村卓哉、堀 弘幸  
第 29 回日本 Archaea 研究会 (2016)
- (21) アーキア tRNA (m<sup>2</sup>G<sub>10</sub>/m<sup>2</sup>G<sub>10</sub>) メチル基転移酵素 arcTrm11 の基質認識機構に関する研究  
平田 章、西山 聖示、田村 俊浩、山内 綾乃、堀 弘幸  
第 29 回日本 Archaea 研究会 (2016)
- (22) Substrate tRNA recognition mechanism of eubacterial tRNA (m<sup>1</sup>A58) methyltransferase (TrmI)

Hiroyuki Takuma, Natsumi Ushio, Masayuki Minoji, Ai Kazayama, Naoki Shigi, Akira Hirata, Chie Tomikawa, Anna Ochi, and Hiroyuki Hori

RNA 2016 (2016)

(23) Structural and functional analyses reveal mechanistic insight into a site specificity of the archaeal tRNA methyltransferase

Akira Hirata, Seiji Nishiyama, Toshihiro Tamura, Ayano Yamauchi and Hiroyuki Hori

RNA 2016 (2016)

〔図書〕(計 2件)

(1) Methylated Nucleosides in tRNA and tRNA methyltransferases

Hori, H.

Frontiers Research Topics: Molecular Biology of Transfer RNA Revisited, pp91-116

Frontiers e-book (2018)

(2) Modified Nucleic Acids in Biology and Medicine

Hori, H., Yamagami, R., and Tomikawa, C. (担当範囲: Regulation of protein synthesis via the network between modified nucleotides in tRNA and tRNA modification enzymes in *Thermus thermophilus*, a thermophilic eubacterium.), pp73-90

Springer (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ach.ehime-u.ac.jp/bchem/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：竹本 千重

ローマ字氏名：Takemoto Chie

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：副チームリーダー

研究者番号(8桁)：40306527

(2)研究協力者

研究協力者氏名：平田 章

ローマ字氏名：Hirata Akira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。