

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K07746
研究課題名(和文) tRNA^{iMet}メチル化による寿命制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Functional roles of initiator methionine tRNA

研究代表者

廣田 恵子 (Hirota, Keiko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：00375370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNAに書き込まれた遺伝情報は、mRNAに転写され、その後、リボソーム上でtRNAと協働してタンパク質に翻訳されて、その機能が発揮される。近年、複数の翻訳開始タンパク質のノックダウンが長寿命を示すことが報告されており、翻訳効率の低下と寿命延長の相関が示唆されている。翻訳開始は、翻訳開始タンパク質群を含む40Sリボソームと開始メチオニンtRNAとの会合が起点となっている。本研究では線虫において、開始メチオニンtRNAがメチル化修飾を受けることを見出し、その生理機能の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAに書き込まれた遺伝情報は、mRNAに転写され、その後、リボソーム上でtRNAと協働してタンパク質に翻訳されて、その機能が発揮される。開始メチオニンtRNAは、翻訳の開始に必須であり、その機能を解明することは、遺伝情報の発現を介して、様々な生理現象に繋がる可能性がある。本研究において、開始メチオニンtRNAがメチル化修飾を受けることを見出し、その生理機能の一端を明らかにすることができた。今後、遺伝子発現制御に有用な情報となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Genetic information is transcribed into mRNA and translated into protein on ribosomes, and finally, its function is exerted. In recent years, it has been reported that knockdown of translation-initiating proteins exhibits longevity, implying a correlation between the decrease in translation efficiency and lifespan extension. Translation initiation requires association of the initiator methionine tRNA with the 40S ribosome containing the translation initiation proteins. This study revealed that the initiator methionine tRNA is methylated in *Caenorhabditis elegans* and clarified its physiological function.

研究分野：分子生物学、分子遺伝学

キーワード：線虫 分子遺伝学 tRNA

1. 研究開始当初の背景

栄養・食餌の変化は、内分泌経路や細胞内情報伝達経路を介して受容され、メチル化やリン酸化など翻訳後修飾によって細胞内タンパク質に伝達される。修飾されたヒストンなどのタンパク質や核酸などはその機能が変化し、細胞内環境をダイナミックに変化させることで、生体の恒常性を維持している。これまでに栄養・食餌がタンパク質の翻訳後修飾を通じて個体の恒常性の維持に与える影響を解析してきた (*J. Recept. Signal Transduct.*, 2013, *J. Biol. Chem.*, 2008)。また、タンパク質アルギニンメチル化酵素 (PRMT-1) が転写因子DAF-16のメチル化修飾を介して抗老化作用を発揮し、寿命延長すること (*Cell Metab.*, 2011)、さらに、LC-MS/MSを駆使して線虫個体におけるタンパク質メチル化の定量系を確立し、アルギニンメチル化酵素の多段階なメチル化反応の分子機序を明らかにしてきた (*J. Biochem.* 2016)。一方、メチル化修飾は、DNAやタンパク質が標的だけでなく、RNAも重要な基質である。そこで、rRNAの塩基メチル化を個体レベルで解析し、site-specific RT-qPCR法による詳細なメチル化塩基の同定方法を開発した (*J. Biochem.* 2018)。このように、タンパク質やRNAを基質としたメチル化修飾の機能とその検出方法の確立を行ってきたが、特にRNAのメチル化は、その量や頻度が非常に多いにも関わらず、個体機能は不明の点が多く残されていると考えられた。

DNAに書き込まれた遺伝情報は、mRNAに転写後、運搬RNA (tRNA) とともにリボソーム上でタンパク質に翻訳され、その機能が発揮される。真核生物のRNAは、100種類以上の修飾が同定されており、RNAの機能を多様に制御している。なかでも塩基修飾の一つであるN¹-メチルアデノシン (m¹A) 修飾は、tRNA、mRNAとrRNAで検出され、哺乳類では、細胞増殖の制御への関与が報告されるなど、その機能が注目されている。近年、複数の翻訳開始タンパク質のノックダウンが長寿命を示すことが報告されており、翻訳効率の低下と寿命延長の相関が強く示唆されている (*Aging cell*, 2007)。翻訳開始は、翻訳効率を決定するrate-limiting stepであり、翻訳開始タンパク質群を含む40Sリボソームと開始メチオニン tRNA (initiator methionine tRNA; tRNAⁱMet) との会合などが起点となっている。翻訳開始タンパク質については、リン酸化などの翻訳後修飾による機能制御を中心に研究が大きく進展しているが、開始メチオニン tRNAの修飾による翻訳効率制御についての研究は立ち後れている。

tRNAは、その多くが複数の遺伝子座に存在しており、線虫の開始メチオニン tRNAは9個の遺伝子座に存在している。従って、一つの遺伝子座に不具合が生じても他の遺伝子座によってその発現を補償し安定的なtRNAの供給を行うことができ、tRNAは転写レベルでは制御されにくいと考えられる。一方、tRNAは、全長約70塩基のうち約20塩基がメチル化などの修飾を受けており、最も修飾を受けるRNAである。1980年代から大腸菌や酵母を用いた研究から多くのtRNA修飾が同定され、tRNAのゆらぎや安定性を調節していることが明らかとなっていった。複数の遺伝子座から安定的に転写産物 (tRNA) が供給される一方で、メチル化などの修飾はその“質”を制御していると考えられるが、多細胞生物でのtRNA修飾の生体機能は未だ不明の点が多く残されている。過去に報告されていた酵母Trm61とのアミノ酸相同性から、開始メチオニン tRNA m¹A58 (58番目塩基の1-メチルアデニン修飾) を触媒するメチル化酵素が存在することが予想されたが、これまでに、多細胞生物の開始メチオニン tRNAのメチル化酵素は、ほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、翻訳効率の低下が長寿命をもたらすという仮説のもと、tRNA メチル化修飾に着目した。まずはじめに、酵母の研究から予想した線虫の tRNA 修飾酵素 (20 遺伝子) 様遺伝子について、線虫を用いて寿命を指標としたノックダウンスクリーニングを行った。その結果、ホモロジー検索から開始メチオニン tRNA メチル化酵素と予想される遺伝子ノックダウンによって、寿命が有意に延長することを見出した。この遺伝子は、酵母 Trm61 と高いホモロジーを有するが、線虫での機能はあまりわかっていなかった。そこで本研究では、当該遺伝子機能低下による寿命延長メカニズムの解明を目的として、当該遺伝子のメチル化修飾における機能とその生理作用を解析した。

3. 研究の方法

(1) モデル生物・線虫を用いた解析

本研究では、シンプルな多細胞モデル生物である線虫を用いた実験系を使用する。線虫は体長約 1 ミリメートルの多細胞生物である。線虫の全遺伝子約 19,000 のうちおよそ 4 割がヒトのオルソログと言われており、とりわけ転写や翻訳など生物の根幹をなす因子群は高度に保存されている。遺伝子の変異体の多くが線虫バンクから入手できること、ノックダウンライブラリーが整備されていることから、表現型 (寿命) を指標として目的遺伝子と既知の長寿遺伝子との遺伝学的解析はもちろん、関連を予想する候補遺伝子との解析も可能である。さらに線虫は「個体」であるがゆえ、絶食や栄養制限などの代謝ストレス応答を、個体レベルの生理変化として評価できるという利点ももつ。従って、線虫を用いた本研究によって、開始メチオニン tRNA のメチル化修飾の分子生物学的な解析から、寿命などの生理学的な解析まで行うことが出来る。

(2) 分析化学的手法を用いた解析

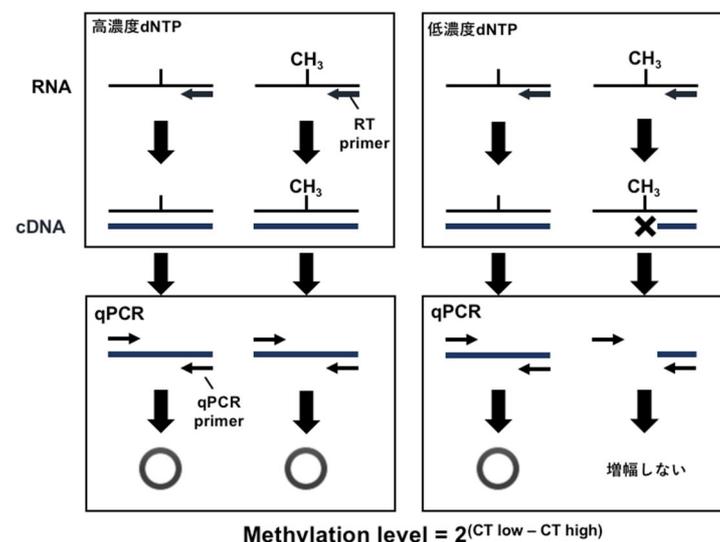
本研究の遂行には、核酸修飾の低分子の高感度・高精度分析法の確立が前提となる。現在までに LC-MS/MS による簡便かつ高感度な核酸メチル化の定量法を既に確立している。この手法を用いることで線虫個体から抽出した核酸のメチル化を検出・定量することが可能であり、実際に線虫抽出液を用いて RNA メチル化修飾の検出に成功している。こうした分析化学技術は、研究の基盤となる技術であり、研究の発展に大きな推進力を発揮できると考えた。

4. 研究成果

(1) 開始メチオニン tRNA のメチル化修飾解析

まず始めに線虫において開始メチオニン tRNA のメチル化の有無を検証した。tRNA のメチル化の検出・定量には、メチル化による塩基対の水素結合の低下を指標とし、低濃度 dNTPs 条件下では m1A 修飾塩基部位の逆転写反応が阻害されることを利用した site-specific RT-qPCR 法を利用して、m1A 修飾塩基レベルでの決定を試みた (図 1)。また、線虫より開始メチオニン tRNA を精

図1 site-specific RT-qPCR法



製し、そのメチル化修飾を LC-MS/MS を用いて解析することも同時に行った。

まず、site-specific RT-qPCR 法による解析では、開始メチオニン tRNA の 55 ~ 58 塩基内にメチル化修飾を受けていることが示された。またこのメチル化修飾に関与しているメチル化酵素様構造を持つ遺伝子を同定した。現在までに、LC-MS/MS を用いた開始メチオニン tRNA のメチル化修飾の同定には至っていない。

(2) 開始メチオニン tRNA メチル化修飾の生理機能

次に、開始メチオニン tRNA の生理機能について解析を行った。上記で示した site-specific RT-qPCR 法を用いて、生存日数による変化を解析したところ、老化に応じたメチル化修飾の変化が検出された。これらの解析から、開始メチオニン tRNA のメチル化修飾が寿命や老化に重要な機能を担っていることが示唆され、寿命制御の一端を担う可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hada K., Hirota K., Inanobe A., Kako K., Miyata M., Araoi S., Matsumoto M., Ohta R., Arisawa M., Daitoku H., Hanada T., Fukamizu A.	4. 巻 294
2. 論文標題 Tricarboxylic acid cycle activity suppresses acetylation of mitochondrial proteins during early embryonic development in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 3091-3099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.004726.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama W., Hirota K., Wan H., Sumi N., Miyata M., Araoi S., Nomura N., Kako K., Fukamizu A.	4. 巻 163
2. 論文標題 rRNA adenine methylation requires T07A9.8 gene as rram-1 in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 465-474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araoi S., Daitoku H., Yokoyama A., Kako K., Hirota K., Fukamizu A.	4. 巻 163
2. 論文標題 The GATA transcription factor ELT-2 modulates both the expression and methyltransferase activity of PRMT-1 in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 433-440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hirota K., Yokoyama W., Wan H., Sumi N., Miyata M., Araoi S., Nomura N., Kako K., and Fukamizu A.
2. 発表標題 T07A9.8 is required for the m1A modification at position 674 in 26S rRNA in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 22nd International <i>C. elegans</i> Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirota K., Yamauchi R., Kojima M., Zhao X., Miyata M., Kako K., Fukamizu A.
2. 発表標題 Dietary methionine influences the establishment of the germ stem cell pool mediated by sams-1
3. 学会等名 Asia-Pacific Worm Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 HIROTA K., KATADA E., ISHIHARA S., KOJIMA M., KAKO K., FUKAMIZU A.
2. 発表標題 The role of phosphoethanolamine methyltransferase-1 in regulating the lifespan of Caenorhabditis elegans
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会ワークショップ
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	加香 孝一郎 (Kako Koichiro) (60311594)	筑波大学・生命環境系・講師 (12102)	分析化学的手法による解析

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------