

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21243

研究課題名（和文）疾患変異により異所的に獲得される新規RNA修飾の生合成および機能の解明

研究課題名（英文）Biosynthesis and function of a novel tRNA modification ectopically acquired by a disease associated mutation

研究代表者

鈴木 健夫（Suzuki, Takeo）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・講師

研究者番号：90533125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：疾患変異を持つヒトミトコンドリアtRNA-Metにおける当該新規修飾について、構造解析の結果推測された化学構造に基づき、関連する修飾酵素の過剰発現や組み換え体を用い、tRNA点変異に依存して細胞内の修飾生合成レベルに影響する結果と、試験管内での再構成反応が進行する結果を得た。新規修飾構造によるコドン解読能を解析するためのリボソーム結合実験をアンチコドンステムループ(ASL)で実施したところ、結合能が根本的に低い問題があった。最終的に反応条件の最適化を進め、今後の結合実験を行う基盤が整った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患点変異に伴い変異部位と異なる位置に新たに獲得されたRNA修飾は、新規な化学構造を持っていた。このことはヒトにおけるRNA修飾の構造や機能の多様性を表していると言える。当該修飾は疾患を亢進する役割を持つと考えられることから、今回特定された生合成経路を阻害することが、点変異に起因する疾患の治療や予防につながるという応用が機体される。

研究成果の概要（英文）：Structural analyses enabled us to predict a chemical structure of the novel modification found in human mitochondrial tRNA-Met with a pathogenic point mutation. We also predict a modifying enzyme based on the structure and demonstrated that the enzyme can reconstitute the modification in cells by over expression and in vitro by using recombinant protein. To perform ribosome binding assay for measurement of the modification's decoding ability, we optimized the reaction condition of the assay by using anticodon stem-loop (ASL) as a model tRNA substrate. Although the binding efficiency still did not increase much, the assay condition was finally determined.

研究分野：分子生物学

キーワード：tRNA ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア(mt) tRNA は、mt DNA にコードされた、ATP 生産に必要な呼吸鎖複合体のサブユニットタンパク質を合成(翻訳)する際、コドンを読解する役割があるため、mt tRNA の機能異常はミトコンドリア病の要因となる。変則 Met コドンを読解するヒト mt tRNA^{Met} の 34 位修飾 5-ホルミルシチジン(f⁵C)の修飾酵素 NSUN3 と ALKBH1 を特定してきた。その過程で mt tRNA^{Met} の A37G 変異は NSUN3 による *in vitro* メチル化を阻害したことから、A37G 変異を持つ 143B 細胞から変異型 mt tRNA^{Met} を解析したところ、f⁵C の前駆体や未修飾 C は蓄積しておらず、一方で新規修飾(以降 X と表記)を見出した。

2. 研究の目的

本研究では新規修飾 X の構造決定、生合成および機能の解明を目指す。A37G 変異とは異なる部位で修飾生合成が影響される現象はほとんど例が知られておらず、生合成メカニズムや機能の詳細な解明が必要である。

3. 研究の方法

- (1) X の構造から予測される修飾遺伝子を A37G 変異細胞においてノックダウン・ノックアウトまたは過剰発現し、X の消失や増加の観察により X 生合成に関わる遺伝子を特定する。
- (2) 前項(1)による候補遺伝子の組み換えタンパクを取得し、*in vitro* 反応で再構成を試み、X の形成反応活性からも修飾酵素を特定する。
- (3) X を持つ変異アンチコドンステムループ(ASL)を化学合成し、リボソーム A サイトにおける Met コドンに対するバインディングアッセイにより、コドン読解能を評価する。
- (4) 大規模シーケンスによる翻訳プロファイル変動の網羅的解析法であるリボソームプロファイリングを行い、変異細胞内のミトコンドリアにおける X のコドン読解能を解析する。

4. 研究成果

- (1) X の構造は液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)による精密質量で決定された元素組成から推測した。予測構造に基づき関連する修飾遺伝子をピックアップし、レンチウイルス発現系を用いて A37G 変異細胞に過剰発現させたところ X の量が増加したことから当該の修飾遺伝子が X の生合成に関わることが示された。
- (2) 候補遺伝子の組み換えタンパクを取得し、*in vitro* 反応で X の再構成を試みた。T7 ファージの RNA ポリメラーゼによる試験管内転写反応で基質となる野生型と A37G 変異の tRNA を作成し、また変異 tRNA の G37 位にはアーキア由来のリコンビナント Trm5 タンパク質を取得し用いることで、1-メチルグアニシン(m¹G)を導入した。34 位はこれまで同定したリコンビナント NSUN3 と ALKBH1 を用いて 5-メチルシチジン(m⁵C)や f⁵C も導入した。当該の目的タンパク質を作用させることで m¹G を持つ変異 tRNA で 34 位に X が出現することが判明した。
- (3) X を持つ変異アンチコドンステムループ(ASL)の化学合成を共同研究により実現した。リボソーム A サイトにおける Met コドン(AUA、AUG)に対するバインディングアッセイにより、コドン読解能の評価を試みた。ASL による A サイトの結合効率が 10%前後と非常に低く、非特異なりボソーム結合によるバックグラウンドの高さと合わせ、解析が非常に困難であることが判明した。結合アッセイ反応中の塩濃度やマグネシウム濃度、また ASL や P サイト tRNA の濃度を詳細に検討することでバックグラウンドを安定に低減させる条件を見出した。引き続き、各種 ASL を用いた結合アッセイを進める予定である。
- (4) 大規模シーケンスによる翻訳プロファイル変動の網羅的解析法であるリボソームプロファイリングを共同研究で行うため、変異型と健常型の 143B 細胞を用いて、ライブラリ調製条件の検討を進めている。

なお、本課題を含む複数のプロジェクトでヒトミトコンドリア tRNA を解析する過程で、ヒトミトコンドリア tRNA 全 22 種の修飾を解析し、18 種の構造が 137 か所に分布していることを見出した。さらにミトコンドリア tRNA の Q 修飾について、細胞質の Q 修飾酵素である QTRT1 と QTRT2 の関与を示した。共同研究によるリボソームプロファイリングを実施し、QTRT2 の KO

細胞でミトコンドリアにおける UAU コドンの解読速度が変化する影響を見出した。

今後の展望

X の機能解析において、リボソーム結合アッセイとそれに矛盾しないリボソームプロファイリングの結果が得られることが期待される。ミトコンドリア tRNA を対象にしたこれらの実験の条件検討は非常にシビアなものであった、最適な条件の決定に目途が経ち始めているため、引き続き解析を実施し、成果について論文化を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akichika, S., Suzuki, T., Suzuki, T.	4. 巻 658
2. 論文標題 Mass spectrometric analysis of mRNA 5' terminal modifications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Enzymol	6. 最初と最後の頁 407-418
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2021.06.012	査読の有無 無
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 鈴木 健夫、鈴木 勉	4. 巻 53
2. 論文標題 RNA修飾と疾患	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 880-883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Suzuki Takeo, Yashiro Yuka, Kikuchi Ittoku, Ishigami Yuma, Saito Hironori, Matsuzawa Ikuya, Okada Shunpei, Mito Mari, Iwasaki Shintaro, Ma Ding, Zhao Xuewei, Asano Kana, Lin Huan, Kirino Yohei, Sakaguchi Yuriko, Suzuki Tsutomu	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete chemical structures of human mitochondrial tRNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18068-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishigami Yuma, Suzuki Tsutomu, Suzuki Takeo	4. 巻 2192
2. 論文標題 Mass Spectrometric Analysis of Mitochondrial RNA Modifications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 89~101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0834-0_8	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 鈴木健夫	4. 巻 35
2. 論文標題 ミトコンドリアtRNA修飾とミトコンドリア病	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 遺伝子医学MOOK 35号 ミトコンドリアと病気	6. 最初と最後の頁 268 ~ 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ヒトミトコンドリアtRNA修飾の全体像を解明 RNA修飾異常疾患の究明へ大きな前進
https://www.t.u-tokyo.ac.jp/foe/press/setnws_202008311155455788959888.html

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

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