

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20638

研究課題名（和文）変異プロファイリング法を用いたRNA-タンパク質相互作用解析法の開発

研究課題名（英文）Development of a new functional analysis using mutational profiling that reveals RNA-protein interaction

研究代表者

山上 龍太（Yamagami, Ryota）

愛媛大学・理工学研究科（工学系）・助教

研究者番号：70767227

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本課題は、RNAとRNAを修飾する酵素の相互作用をハイスループットに分析する方法を開発し、RNA修飾酵素の機能解析を行うことを研究目標とし、以下の研究成果を報告した。（1）5000種類以上の変異tRNAの中から基質tRNAと非基質tRNAを一挙に区別する手法（tRNA-MaP法）を開発した。（2）tRNA-MaP法を使い、*Geobacillus stearothermophilus*由来tRNA m1A22メチル化酵素（TrmK）の基質認識機構を明らかにした。（3）tRNA-MaP法とタンパク質オーソロジー解析を行い、*G. stearothermophilus*のtRNA修飾酵素遺伝子を予測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、RNAとRNA修飾酵素の相互作用機構とその機能の理解を深めることを目的としています。本研究によって開発されたtRNA-MaP法は、本目的の達成を加速させるものであり、幅広い分野での応用が期待できます。This project aims to enhance our understanding of RNA modification enzymes and their functions, and the developed tRNA-MaP technique has potential implications for further studies in this field.

研究成果の概要（英文）：The objective of this project is to develop a new high-throughput technique for conducting functional analyses of RNA modification enzymes. The findings have been reported as follows: (1) We have developed tRNA-MaP, a technique that selectively detects substrate tRNAs from a mixture of substrate and non-substrate tRNAs. (2) By using tRNA-MaP, we were able to reveal the substrate tRNA recognition mechanism of tRNA m1A22 methyltransferase (TrmK) from *Geobacillus stearothermophilus*, a thermophilic bacteria. (3) In combination with protein orthology analysis, tRNA-MaP was used to predict the tRNA modification enzyme genes encoded in the *G. stearothermophilus* genome.

研究分野：生化学

キーワード：RNA tRNA tRNA修飾 tRNA修飾酵素 網羅解析 変異プロファイリング法

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、RNA は、単なるタンパク質の設計図ではなく、様々な機能を持つことが明らかになってきました。RNA は、その構造を細胞内環境や状況に合わせて柔軟に変化させ、その機能を発揮します。よって、RNA とその構造は、生命現象を司る最も重要な原動力の一つとなっています。その一方で、RNA の構造による遺伝子発現機構の全貌は明らかではありません。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いた RNA の網羅解析法を開発し、RNA の配列と構造と RNA 成熟化酵素の相互作用を詳細に解析することで、RNA による遺伝子発現制御メカニズムの一端を明らかにしようと考えました。

2. 研究の目的

RNA は、転写後にプロセシングや RNA 修飾などの様々な成熟過程を経て、その機能性を獲得します。しかしながら、RNA の配列と構造がどのようにして RNA 成熟化酵素と相互作用し、どのように RNA 成熟化機構の制御に関わるのか、そのメカニズムは、未解明です。そこで、本研究では、RNA 修飾酵素やプロセシング酵素と基質 RNA との相互作用をハイスループットに解析する技術を開発することを目的としました。

3. 研究の方法

研究手法は、次世代シーケンサーを用いた網羅的変異プロファイリング法を tRNA 修飾酵素の機能解析に応用した tRNA-MaP 法と従来の生化学的手法を用いました。本手法を好熱菌の一種である *Geobacillus stearothermophilus* の tRNA m1A22 メチル化酵素 (TrmK) に応用し、TrmK の基質認識機構を探りました。

4. 研究成果

主な研究成果は以下のようになります。

- (1) tRNA-MaP 法を開発した。tRNA-MaP 法は理論上、5000 種以上の tRNA を一挙に解析することができる手法で、従来法では不可能であったサンプル数を一度の実験で取り扱うことができる。
- (2) tRNA-MaP 法は、従来法と同程度の測定感度と定量性があることがわかった。
- (3) tRNA-MaP 法を用いて、TrmK の基質認識機構を明らかにした。TrmK は、tRNA のアンチコドンループを除く、全体構造を認識し、A22 に接近することで、基質 tRNA と非基質 tRNA を区別することがわかった。
- (4) tRNA-MaP 法とタンパク質オーソロジー解析を組み合わせることで、*Geobacillus stearothermophilus* のゲノム中に存在する tRNA 修飾酵素遺伝子を予測した。

これらの成果を、以下の論文として、報告しました。

1. R. Yamagami, and H. Hori, Functional analysis of tRNA modification enzymes using mutational profiling
Methods in Enzymol., in press
2. R. Yamagami, and H. Hori, Application of mutational profiling: New functional analyses reveal the

tRNA recognition mechanism of tRNA m¹A₂₂ methyltransferase
J. Biol. Chem., 299(1), 102759, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ryota Yamagami, Hiroyuki Hori	4. 巻 -
2. 論文標題 Functional analysis of tRNA modification enzymes using mutational profiling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2023.02.021	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 Ryota Yamagami, Hiroyuki Hori	4. 巻 299
2. 論文標題 Application of mutational profiling: New functional analyses reveal the tRNA recognition mechanism of tRNA m1A22 methyltransferase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102759-102776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102759	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------