

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23710265
 研究課題名（和文） 遺伝暗号解読の正確性を担う tRNA ウォブル位修飾ウリジン
 生合成機構の解明
 研究課題名（英文） Biosynthetic mechanism of the wobble modified uridines in tRNA

 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

研究成果の概要（和文）：

ヒトミトコンドリア tRNA ウォブル位修飾ウリジンの修飾遺伝子である hGTPBP3 と hMTO1 の機能解析を行った。2 遺伝子産物は共にミトコンドリア局在性を示し、細胞内で複合体を形成していた。酵母の相同遺伝子欠損株を用いた相補実験の結果から、2 遺伝子はヒト-酵母の組み合わせで修飾活性を発現しないこと、また hGTPBP3 の C 末端が修飾の形成に必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated two human gene products, hGTPBP3 and hMTO1, which modify the wobble uridine of human mitochondrial tRNAs. They localized in mitochondria and interacted each other. Replacement of each of these genes from yeast homologues to human genes did not complement modification activity, and the C-terminal region of hGTPBP3 was suggested to be required for the wobble modification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：細胞内化学反応、tRNA、転写後修飾、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

tRNA の転写後修飾は tRNA の機能成熟に関わるプロセッシング過程の 1 つで、特に tRNA のウォブル位への修飾は、タンパク質合成において tRNA がコドンを正確に認識するために重要な機能構造である。5-メチル型ウォブル位修飾ウリジン(xm⁵U)は 3 字目が A または G であるコドンの認識に関わることが知られている。ヒトのミトコンドリア tRNA の xm⁵U(mt-xm⁵U)である 5-タウリノメチルウリジンはミトコンドリア tRNA の点変異により 5-タウリノメチル修飾が欠損し、ある種のヒトミトコンドリア病の発症要因として知

られる。また、5-タウリノメチルウリジン修飾遺伝子とされる hGTPBP3 と hMTO1 についても遺伝子変異と心筋肥大症などのミトコンドリア異常を呈する遺伝病との関連が見つかっている。進化的に保存されている xm⁵U はバクテリアや酵母ミトコンドリアにおいてもカウンターパート構造やヒト修飾遺伝子のホモログが見出されており、これらモデル生物を用いた研究の進捗も見られるが、ヒト疾患における発症機構を正しく理解するには、ヒトの遺伝子・酵素・ミトコンドリア tRNA を直接の解析対象にした 5-タウリノメチルウリジンの生合成メカニズムやミ

トコンドリア tRNA 認識機構に対する知見が必要である。しかしヒト因子を用いた研究の進展は遅れているのが現状である。

2. 研究の目的

5-タウリノメチルウリジン生合成におけるヒトの修飾酵素の性質を明らかにする。そしてヒト因子のみによる 5-タウリノメチルウリジン再構成系の構築を目指す。ヒト因子のみによる再構成系を用いた種々の解析結果は、モデル生物系で得られた xm⁵U に対する知見よりもヒトでの性質を直接的にあらわすモデルとなる。

3. 研究の方法

ヒトの 5-タウリノメチルウリジン修飾遺伝子とされる hGTPBP3 と hMTO1 の組換え体発現系を構築し精製する。そのための発現コンストラクトの構成や発現ホストの検討を並行して行う。2 つの因子用いた修飾再構成反応を試みる。また 5-タウリノメチルウリジン構造の試験管内反応による再現が可能かを検証するため、大腸菌酵素を用いた xm⁵U の試験管内再構成系や酵母を用いた遺伝子相補系を用いた解析を行う。

4. 研究成果

hGTPBP3 と hMTO1 をそれぞれ単独で大腸菌で発現するベクターを構築した。C 末側に His6 タグを融合し、N 末端はミトコンドリア移行シグナル配列(推測)をあらかじめ除去するように設計した。除去シグナル配列は Mitoprot により推測された切断部位を暫定的に用いた。pET ベクター - BL21(DE3) の系で IPTG 誘導発現させたところ、hGTPBP3 は高発現を示し、大部分が可溶化した。一方、hMTO1 は発現量が低く大部分が不溶化した。検討により低温培養下でのラクトース誘導発現で hMTO1 の可溶化率がある程度改善された。大腸菌組換え体の hGTPBP3 と hMTO1、転写合成したヒトミトコンドリア tRNA を基質にした再構成反応を行ったが、5-タウリノメチルウリジンは形成されなかった。N 末除去配列が適切でなかったことや、hMTO1 量が十分でなかった、翻訳後修飾が再現されなかったなどの可能性が考えられたため、大腸菌発現系を適切に設計するためには hGTPBP3 と hMTO1 のより詳細な知見が必要と考えられた。

酵母ミトコンドリア tRNA の mt-xm⁵U は同

じ真核生物であるにもかかわらずヒトの 5-タウリノメチルウリジンとは異なる構造を持つが、mt-xm⁵U 修飾酵素とされる yMSS1 と yMTO1 はヒトの hGTPBP3 と hMTO1 のホモログである。酵母の yMSS1 および yMTO1 の欠損株に、yMSS1 または yMTO1、hGTPBP3 または hMTO1 を相補し、mt-xm⁵U が再構成されるかを観察するため、酵母 ADH プロモーター恒常発現ベクターに計 4 遺伝子をクローニングした。yMSS1 と yMTO1 は完全長 CDS ならびに、ベクターによる発現を検証できるよう C 末端に FLAG タグを融合させた 4 種類の配列を構築し、hGTPBP3 と hMTO1 は完全長 CDS の C 末端に FLAG タグを融合させた 2 種類の配列を構築した。完全長 yMSS1 および yMTO1 の相補により、欠損株で失われた mt-xm⁵U 形成能が復活したが、C 末タグ融合型 yMSS1 および yMTO1 の相補では yMSS1 のみ形成能を失ったままであった。C 末タグ融合により付加された配列が yMSS1 の機能を喪失させると解釈された。C 末タグ融合型 hGTPBP3 および hMTO1 の相補では、どちらの場合も mt-xm⁵U または 5-タウリノメチルウリジンの形成能は復活しなかった。C 末タグ融合 hGTPBP3 は yMSS1 と同じく C 末タグの影響による可能性が考えられ、yMTO1 は hMTO1 に置き換えられても機能的相補が不可能であることを示唆している。大腸菌発現系の検討と並行し、ヒト培養細胞を用いた発現系の構築を行った。高コストで発現精製スケールが小さい欠点はあるが、ミトコンドリア移行に伴う N 末シグナル配列の除去や翻訳後修飾などのプロセッシングが正しく行われることが期待される。CMV プロモータの下流に hGTPBP3 または hMTO1 完全長 CDS に C 末端 FLAG タグまたは V5 タグを融合させた 2 種類の配列を構築した。HeLa 細胞に発現ベクターをコトランスフェクションし一過的に共発現させ、免疫染色により細胞内局在がミトコンドリアにあることを確認した。共発現させた細胞ライセートと抗 FLAG タグ抗体ビーズを用いて免疫沈降を行い、抗 V5 抗体によりウエスタンブロッティングで共沈降タンパクを検出したところ、hGTPBP3 の共沈降物に hMTO1 が、hMTO1 の共沈降物に hGTPBP3 が含まれていた。従って hGTPBP3 と hMTO1 はミトコンドリア内で複合体を形成していることが

判明した。xm⁵U 修飾酵素間の相互作用の検出はヒト因子では初めてであり、酵母において hMTO1 のみでの機能相補ができなかったのは、異種生物間では複合体形成が起きにくく、5-タウリノメチルウリジン形成にはタンパク間相互作用が重要であることが示唆された。

抗 FLAG タグ免疫沈降物に hGTPBP3 と hMTO1 が共に濃縮されていることから、免疫沈降物と転写合成したヒトミトコンドリア tRNA を用い再構成反応を行ったがこの場合も 5-タウリノメチルウリジン形成は確認できなかった。

酵母の結果で示唆されたように hGTPBP3 の C 末タグを除去し、hMTO1 により免疫沈降することで hGTPBP3 を共精製するという方針が有効であることが示唆された。

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 10 件)

1. 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 [査読有] 10.1074/jbc.M112.439554
2. Crystal structure of a putative methyltransferase SAV1081 from *Staphylococcus aureus*
Kita S, Tanaka Y, .., Suzuki T (第 5 著者), 他 5 名 (2013) *Protein & Peptide Letters.* 20, 530-537
10.2174/0929866511320050006 [査読有]
3. 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]
4. 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]
5. 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]
6. 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]
7. 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]
8. 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]
9. 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]

10. 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]

[学会発表] (計 1 件)

1. Characterization of Human
Homologues of MnmE and GidA,
Required for an xm⁵U-type Uridine
Modification at the Wobble Position of
Mitochondrial tRNAs, Takeo Suzuki
et al. RNA2011Kyoto (14th-19th,
June 2011 Kyoto, Japan)

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 :