

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620125

研究課題名(和文) 出芽酵母の胞子形成時におけるRNAエピジェネティクス

研究課題名(英文) Epitranscriptome analysis of sporulating budding yeast

研究代表者

鈴木 勉 (Suzuki, Tsutomu)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20292782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物のmRNAには、いくつかの転写後修飾が含まれており、これらの修飾が転写後の遺伝子発現調節において重要な役割を演じている。我々は、出芽酵母の胞子形成時に出現するmRNA上のN6メチルアデノシン(m6A)修飾の役割を明らかにすることを目的とし、m6A部位の探索を行った。抗m6A抗体を用いた免疫沈降と次世代シーケンズ解析を組み合わせたm6A-seqにより、約3,000遺伝子中に8,000か所以上のm6A候補領域を見出した。また、RNAの高感度質量分析法(RNA-MS)により、IME1 mRNA中にm6A修飾部位を特定した。しかしこの位置はm6A-seqでは確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic mRNAs and non-coding RNAs contain various post-transcriptional modifications including 5' cap structure, inosine (I), 5-methylcytidine (m5C), and N6-methyladenosine (m6A). To investigate functional roles of m6A, we screened m6A sites on mRNAs in sporulating budding yeast. More than 8,000 candidate regions were mapped in about 3,000 genes in *Saccharomyces cerevisiae* by m6A-seq which is a biochemical method to identify m6A regions by immunoprecipitation of m6A-containing RNA fragment by anti-m6A antibody combined with deep sequencing. In addition, we identified a single m6A site in IME1 mRNA by RNA mass spectrometric analysis. However, this m6A site was not confirmed by m6A-seq, exposing a problem of anti-m6A antibody with poor specificity.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA修飾 N6メチルアデノシン

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物の mRNA や non-coding RNA には、5' 末端のキャップ構造とその近傍の 2' O メチル修飾以外に、イノシン(I)、5' メチルシチジン(m<sup>5</sup>C)、N<sup>6</sup>メチルアデノシン(m<sup>6</sup>A)が見つかっている。これらの修飾は組織ごとの違いや、発生時期依存的に変動することが知られ、転写後の遺伝子発現調節において重要な役割を担っていると考えられている。

m<sup>6</sup>A 修飾は、酵母から動植物に至る真核生物の mRNA と一部のウイルス RNA に含まれていることが知られていた。最近、複数のグループにより、抗 m<sup>6</sup>A 抗体と deep sequencing を組み合わせた手法(m<sup>6</sup>A-seq)を用いて、ヒトおよびマウスの m<sup>6</sup>A 部位がゲノムワイドに探索され、低い分解能であるものの、数万か所を超える m<sup>6</sup>A 部位が同定された。さらに、mRNA 中の m<sup>6</sup>A を認識するリーダータンパク質や、脱メチル化する酵素が同定され、エピトランスクリプトームという概念が生まれつつある。しかし、具体的に m<sup>6</sup>A 修飾がどのようなメカニズムで生命現象へ関与するかは不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

出芽酵母(*S. cerevisiae*)において、m<sup>6</sup>A 修飾酵素の触媒サブユニットである IME4 が、孢子形成に必須であることが知られている。また、孢子形成時に mRNA の m<sup>6</sup>A 含量が特異的に増加することが知られており、m<sup>6</sup>A 修飾が酵母における減数分裂や孢子形成に重要な役割を担っていることが示唆されている。

本研究では、出芽酵母の減数分裂期に mRNA 上で特異的に増加する m<sup>6</sup>A の修飾部位を特定し、孢子形成における m<sup>6</sup>A 修飾の役割を明らかにすることを目指す。

### 3. 研究の方法

出芽酵母の孢子形成時の mRNA に特異的に出現する m<sup>6</sup>A 修飾部位を特定するために、*S. cerevisiae* の孢子形成モデル株である SK1 株を用いる。孢子形成誘導度に RNA を抽出し、poly(A)+ RNA 画分を取得する。RNA 鎖を断片化した後に、抗 m<sup>6</sup>A 修飾抗体を用いた免疫沈降を行うことで、m<sup>6</sup>A 修飾を含んだ RNA 断片を濃縮し、cDNA に変換後に次世代シーケンサーを用いて配列解析を行う。*S. cerevisiae* のゲノム配列をレファレンスとして、m<sup>6</sup>A 修飾領域の特定を行う(遺伝研の藤山教授、豊田准教授、野口博士、および、産総研の光山博士との共同研究)。また、poly(A)+ RNA を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、メジャーなバンドを切り出し溶出する。また、標的とする mRNA を、往復循環クロマトグラフィー(RCC)を用いて、単離精製する。精製した mRNA を RNase T<sub>1</sub> により G 特異的に断片化し、各断片の質量を RNA の高感度質量分析法(RNA-MS)で測定後、RNA マスフィンガープリント(RMF)法で解析を行い、m<sup>6</sup>A 修飾部位を直接的に同定する。

### 4. 研究成果

孢子形成誘導後、3 時間後の細胞から、poly(A)+ RNA を調製し、約 300 塩基長に断片化した後に、m<sup>6</sup>A-seq 解析を行った。その結果、3,425 遺伝子中に 8,309 か所以上の m<sup>6</sup>A 候補領域を見出した。そのうちの約 94%が ORF 内部にあることも判明した。孢子形成時に変動する遺伝子発現プロファイルとの比較から、いくつかの mRNA は m<sup>6</sup>A 修飾によって安定化される傾向があることが示唆された。しかし、分解能の低さから、m<sup>6</sup>A 修飾部位の特定には至らなかった。また、RNA の高感度質量分析法(RNA-MS)により、IME1 mRNA 中に m<sup>6</sup>A 修飾部位を特定したが、この位置は m<sup>6</sup>A-seq では濃縮されなかったことから、抗 m<sup>6</sup>A 抗体の特異性にも問題があることが発覚した。現在、一般的に行われている m<sup>6</sup>A-seq はすべて同一の抗体を用いているため、同様の問題があると考えられる。今後は、より特異性の高い抗 m<sup>6</sup>A 抗体の取得と、m<sup>6</sup>A-seq の解析精度を向上させる必要がある。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](全て査読有)

Iwasaki, S., Sasaki, H. M., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Tadakuma, H. and Tomari, Y. Defining fundamental steps in the assembly of Drosophila RNAi enzyme complex *Nature*, 521, 533-536 (2015)

Wei, F., Zhou, B., Suzuki, T., Miyata, K., Ujihara, Y., Takahashi, N., Xie, P., Michiue, H., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Matsui, H., Koga, Y., Mohri, S., Suzuki, T., Oike, Y. and Tomizawa, K. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs precise mitochondrial protein translation and contributes to myopathy in mice and humans *Cell Metab.*, 21, 428-442 (2015)

Yoshida, M., Kataoka, N., Miyauchi, K., Ohe, K., Iida, K., Yoshida, S., Nojima, T., Okuno, Y., Onogi, H., Usui, T., Takeuchi, A., Hosoya, T., Suzuki, T. and Hagiwara, M. Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112, 2764-2769 (2015)

Iron-sulfur proteins responsible for RNA modifications  
Kimura, S. and Suzuki, T.\* *Biochim Biophys Acta.*, 1853, 1272-1283 (2015)

Suzuki, T.\* and Numata, T. Convergent evolution of AUA decoding in bacteria and archaea *RNA Biol.*, 11, 1586-1596 (2014)

Ito, S., Horikawa, S., Suzuki, T., Kawauchi, H., Tanaka, Y., Suzuki, T. and Suzuki, T.\*  
Human NAT10 is an ATP-dependent RNA acetyltransferase responsible for  $N^4$ -acetylcytidine formation in 18S rRNA  
*J. Biol. Chem.*, 289, 35724-35730 (2014)

Takai, H., Masuda, K., Sato, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Koyama-Nasu, R., Nasu-Nishimura, Y., Katou, Y., Ogawa, H., Morishita, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Todo, T., Ino, Y., Mukasa, A., Saito, N., Toyoshima, C., Shirahige, K. and Akiyama, T.  
5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis by Recruiting the CHTOP-Methylosome Complex  
*Cell Reports*, 9, 48-60 (2014)

Ito, S., Akamatsu, Y., Noma, A., Kimura, S., Miyauchi, K., Ikeuchi, Y., Suzuki, T. and Suzuki, T.\*  
A single acetylation of 18S rRNA is essential for biogenesis of the small ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*  
*J. Biol. Chem.*, 289, 26201-26212 (2014)

Kimura, S., Miyauchi, K., Ikeuchi, Y., Thiaville, P.C., de Crécy-Lagard, V. and Suzuki, T.\*  
Discovery of the  $\beta$ -barrel-type RNA methyltransferase responsible for  $N^6$ -methylation of  $N^6$ -threonylcarbamoyladenosine in tRNAs  
*Nucleic Acids Res.* 42, 9350-9365 (2014)

Suzuki, T. and Suzuki, T.\*  
A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs  
*Nucleic Acids Res.* 42, 7346-7357 (2014)

Bhaskaran, H., Taniguchi, T., Suzuki, T., Suzuki, T. and Perona, J. J.  
Structural dynamics of a mitochondrial tRNA possessing weak thermodynamic stability  
*Biochemistry*, 53, 1456-1465 (2014)

Sakurai, M., Ueda, H., Yano, T., Okada, S., Terajima, H., Mitsuyama, T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Kawabata, H. and Suzuki, T.\*  
A biochemical landscape of A-to-I RNA editing in the human brain transcriptome  
*Genome Res*, 24, 522-534 (2014)

Suzuki, T., Miyauchi, K., Sakaguchi, Y. and Suzuki, T.\*

Biochemical and mass spectrometric analysis of 3'-end methylation of piRNAs  
*Methods in Mol Biol*, 1093, 59-72 (2014)

Yoda, M., Cifuentes, D., Izumi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Giraldez, A.J. and Tomari, Y.  
PARN mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs  
*Cell Reports*, 14, 715-726 (2013)

Tomikawa, C., Ohira, T., Inoue, Y., Kawamura, T., Yamagishi, A., Suzuki, T. and Hori, H.  
Distinct tRNA modifications in the thermo-acidophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*  
*FEBS Lett.* 587, 3575-3580 (2013)

Xie, P., Wei, F.-Y., Hirata, S., Kaitsuka, T., Suzuki, T., Suzuki, T. and Tomizawa, K.  
Measurement of tRNA 2-methylthio modification by quantitative PCR for assessing type 2 diabetes risk  
*Clinical Chemistry*, 59, 1604-1612 (2013)

Kita, S., Tanaka, Y., Hirano, N., Kimura, S., Suzuki, T., Suzuki, T., Yao, M. and Tanaka, I.  
Crystal structure of a putative methyltransferase SAV1081 from *Staphylococcus aureus*  
*Protein & Peptide Letters*, 20, 530-537 (2013)

〔学会発表〕(招待講演のみ)

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター学術集会(埼玉県日高市)RNA修飾の多彩な機能と疾患 鈴木 勉 (2015/1/27)

AussieMit2014 (Perth, Australia)  
Mitochondrial diseases caused by deficient tRNA modifications Tsutomu Suzuki (2014/12/1)

Joint Australia and Japan RNA meeting (JAJRNA2014) (Sydney, Australia) A single acetylation of 18S rRNA regulates ribosome biogenesis by sensing cellular energy status  
Tsutomu Suzuki (2014/11/5)

25th tRNA conference (Kyllini, Greece)  
Biogenesis and function of cyclic  $t^6A$  and derivatives Tsutomu Suzuki (2014/9/22)

高校生のためのオープンキャンパス  
2014(本郷、東京) ヒトはなぜ病気になるのでしょうか? ~病気の原因を分子レベルで探る~ 鈴木 勉 (2014/8/6)

第16回生命化学研究会(熱海)RNAエピソード エネティクスと生命現象 鈴木 勉 (2014/1/10)

RIKEN symposium RNA Sciences in Cell and Developmental Biology III (神戸) RNA modifications as naturally-selected chemical diversity involved in various biological processes Tsutomu Suzuki (2013/12/7)

Peking Unvi School of Life Sciences Lecture (Beijing) RNA modifications as naturally-selected chemical diversity involved in various biological processes Tsutomu Suzuki (2013/11/15)

Riboclub2013 (Quebec) RNA modifications as naturally-selected chemical diversity involved in various biological processes Tsutomu Suzuki (2013/9/25)

Symposium on Frontier Science and Technology (高知) RNA エピジェネティクスと生命現象鈴木 勉 (2013/7/19)

The 18th annual meeting of the RNA society (Davos) Biogenesis and function of cyclic  $N^6$ -threonylcarbamoyladenine as a widely distributed tRNA hypermodification Tsutomu Suzuki (2013/6/12)

〔その他〕  
ホームページ  
<http://rna.chem.t.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
鈴木 勉 (SUZUKI, Tsutomu )  
東京大学・大学院工学系研究科・教授  
研究者番号 : 20292782