

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02094

研究課題名(和文)希少なRNA修飾の機能究明と動的調節機構の提唱

研究課題名(英文)Function and dynamic regulation of animal specific RNA modifications

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトのtRNAに存在する糖付加キューオシン(Q)について新規修飾遺伝子の特定に成功した。対象の遺伝子ノックアウト(KO)細胞株を作出し、表現型解析を実施したところ、KO細胞ではタンパク質の凝集体形成が亢進した。この現象は修飾異常tRNAによってtRNA本来のコードン解読能が変化してしまうことによることが示唆された。修飾の構造と機能の相関を深く理解するために、更なる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA修飾のヒトや動物個体における機能は詳細が明らかでないものが多く、今回、修飾酵素の新たな特定を通じて、修飾機能の解明に迫った。特にコードン解読という、あらゆる生命に共通するプロセスにおいて当該修飾の特徴的な役割を提唱したことは一定の意義がある。また今回特定した遺伝子の中に、遺伝子異常が神経変性疾患と相関する例を見出しているため、病態の理解や疾患の診断や治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We determined modifying genes of queuosine derivatives found in the wobble position of some animal tRNAs. Knocking out each gene in cultured cells revealed the elevation of protein aggregates in cytoplasm, suggesting that the hypomodification of the modification by gene KO altered decoding ability of corresponding tRNA. To deeply understand the molecular and physiological function of these modifications, further investigations will be required.

研究分野：分子生物学

キーワード：tRNA 生合成 デコーディング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA 分子の成熟過程において RNA 修飾は重要なステップである。RNA 修飾遺伝子の変異による修飾異常がヒト疾患と関連する例も複数知られるが、生合成遺伝子や機能が不明な修飾も未だ多い。そのため新規修飾構造の探索や、生合成経路およびその調節機構の特定、さらには修飾の分子機能の解明が必要である。

2. 研究の目的

RNA 修飾の構造や生合成関連遺伝子・酵素は生物界全体に分布し進化的に保存されるものも多いが、本研究ではヒト(脊椎動物)を中心とする一部の生物種にのみ存在する特徴を持つ「希少修飾」に着目した。希少修飾の例として、ヒトの一部の tRNA ウォブル位に存在するキューオシン(Q)への糖付加修飾がある。糖付加 Q は主に脊椎動物で見いだされるが、修飾酵素の実態や、糖付加 Q の機能的意義は明らかでない。そこでこのような修飾の生合成遺伝子/酵素の同定や機能解析を実施し、希少修飾としての独特な役割の解明を試みる。また希少修飾の細胞内形成率が基質メタボライトの量的変動に応答して制御されるかどうかを検証し、調節機構の意義を探索する。

3. 研究の方法

(1) 候補遺伝子の探索

動物組織の可溶性タンパク質ライセートから修飾再構成活性を検出する径を構築した。ライセートを各種クロマトグラフィーで分画し、酵素活性を濃縮する。最終的に液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)による画分中のタンパク質を同定し、修飾酵素の候補を絞り込む。

CRISPR/Cas9 により対象遺伝子ノックアウト(KO)し、KO 細胞で RNA 修飾が消失することにより証明する。

(2) 組み換えタンパク質を用いた in vitro 再構成による生合成反応の性質の理解

特定した遺伝子について動物培養細胞もしくは大腸菌の発現系にクローニングして組み換えタンパク質を取得し、想定された触媒活性があるかを検証する。

決定した修飾酵素を用いて反応条件の最適化やカイネティクス測定を行い、酵素反応の性質を深く理解する。

(3) 修飾遺伝子 KO による表現型への影響

修飾酵素同定のため樹立した遺伝子ノックアウト細胞を各種の環境刺激下に置き、生育速度の阻害や促進への影響を評価することで細胞レベルでの修飾の機能を評価する。

4. 研究成果

【糖付加 Q】

糖付加 Q は細胞質 tRNA のウォブル位修飾 Q に、更に単糖が付加した希少修飾である。2 種の糖付加 Q が知られ、1 種の修飾酵素も同定したが、残りの 1 種の酵素は不明であった。なお基質は付加する単糖に対応した糖ヌクレオチドである。

(1) 糖転移酵素として知られるタンパク質は多種類存在し予測が困難である。動物組織ライセートのカラム分画物から触媒活性を追跡し、濃縮画分に含まれるタンパク質を LC/MS で同定することで酵素の候補を得た。酵素の遺伝子を CRISPR/Cas9 ゲノム編集で KO することで糖付加 Q が消失することを証明した。

(2) 同定したタンパク質の組み換え体を取得し、糖付加反応活性を持つことを示した。カイネティクス測定により、基質 tRNA に対する K_m が 10^{-8} オーダーの値で得られた。基質 tRNA に Q が形成されると速やかに糖付加を受けることが示唆される。基質糖ヌクレオチドに対する K_m は 10^{-5} オーダーであり、細胞内糖ヌクレオチド濃度と同程度の値を示した。糖ヌクレオチドプールの濃度変化により修飾効率が制御される可能性が示唆された。

(3) KO 細胞における影響を探索した。まずノザンプロット法により対象 tRNA の定常状態量が変わらないことを示した。次にタンパク質の折り畳み(フォールディング)への影響に着目し、フォールディングを評価するレポーターとして、点変異により熱変性しやすい Fluc の改変体と GFP を融合させた Fluc-GFP を用いたところ、KO 細胞において Fluc-GFP の凝集体が細胞質に蓄積することを見出した。このことは KO 細胞において不完全な修飾を持つ tRNA がコドン適切な速度で解読できなくなった結果と考えられる。

(4) ノックアウト動物における影響やデコーディングへの影響については今後の適切な共同研究により明らかにする必要がある。

【 $\tau\text{m}^5\text{U}$ 】

- (1) $\tau\text{m}^5\text{U}$ はヒトミトコンドリア tRNA に見られる必須な希少修飾である。これまでメチレンテトラヒドロ葉酸($\text{CH}_2\text{-THF}$)とタウリンがタウリノメチル基の基質になることを示してきた。
- (2) $\tau\text{m}^5\text{U}$ の修飾酵素 MTO1 と GTPBP3 を用いた *in vitro* 再構成系を構築したが、反応効率が非常に低かった(5%以下)。 *in vitro* 再構成系で tRNA の変異体解析を行い、点変異による $\tau\text{m}^5\text{U}$ 反応の阻害が修飾欠損の要因となることを示すため、再構成反応の高効率化を検討した。具体的には、これまで詳しく検討されてこなかった反応の構成成分の検討を行い、 $\text{CH}_2\text{-THF}$ の最適濃度を決定した。 $\text{CH}_2\text{-THF}$ の濃度が高いと逆に反応効率が下がったため、基質阻害がかかる反応様式が示唆された。また系に加える補酵素の種類と濃度を詳細に検討し、反応に不要または阻害的に作用する補酵素を除くことで、反応系のシンプル化を進めた。細胞の総ヌクレオシドから $\tau\text{m}^5\text{U}$ を検出する LC/MS 測定により、現状では通常の細胞培養条件下における $\tau\text{m}^5\text{U}$ レベルの約 50% 程度の反応効率を達成している。
- (3) HEK293T 細胞をタウリン欠乏培地で培養すると、 $\tau\text{m}^5\text{U}$ レベルが低下し、タウリンの代わりにグリシンを用いた修飾 cmnm^5U が出現する。タウリン濃度低下に加え、グリシンを培地に添加すると cmnm^5U レベルが上昇した。ヒトミトコンドリアにおける $\tau\text{m}^5\text{U}/\text{cmnm}^5\text{U}$ 修飾形成は細胞内タウリン・グリシン濃度に依存した調節が行われていることが示唆された。ヒトミトコンドリアにおける cmnm^5U の機能や、タウリンやグリシンの代謝レベルと修飾形成率の関係についてさらに研究を進めていく。

【 f^{C} 】

- (1) f^{C} はヒトミトコンドリア tRNA^{Met} に見られる AUA コドンの解読に必須な希少修飾である。修飾遺伝子として NSUN3 と ALKBH1 をこれまでに特定してきた。各遺伝子の KO 細胞におけるミトコンドリア機能低下もこれまで証明してきた。
- (2) NSUN3 によるメチル化反応を理解するため、基質 tRNA と NSUN3 タンパク質それぞれについて変異体解析を行った。アンチコドンステムループ(ASL)をモデルに RNA 変異を導入し、アンチコドンへの変異やループのサイズにより特にメチル化反応が阻害される傾向を見出した。タンパク質への変異について、予測構造における触媒活性残基や RNA recognition motif (RRM)-like 領域内の保存残基への変異でメチル化反応が阻害された。RRM-like 領域は活性部位と距離があることから tRNA 結合への関与が示唆された。
- (3) f^{C} が持つ AUA コドン解読能は *in vitro* のタンパク質合成系やリボソーム結合アッセイで示されてきたが、細胞内においても AUA コドン解読に寄与するかは不明であった。共同研究により各遺伝子 KO 細胞を用いたリボソームプロファイリングを行い、AUA コドン解読における寄与を評価した。結果として、これまでの各種 *in vitro* 実験における観察と同様の傾向を示したが、プロファイリングの実施条件検討を含め、さらなる詳細な解析を進めている。
- (4) NSUN3 のパラログの 1 つ NSUN2 について、KO 細胞のミトコンドリア tRNA 修飾の解析や *in vitro* 再構成を通じて、ミトコンドリア tRNA の 5-メチルシチジン(m^5C)修飾酵素であることを示した。NSUN2 は従来、核質に局在し細胞質 tRNA の m^5C 修飾を担うことが知られていたが、一部がミトコンドリアにも移行することを意味する。超解像顕微鏡により内在 NSUN2 のミトコンドリア内シグナルの検出に成功した。またミトコンドリア DNA マーカータンパク質およびミトコンドリア RNA との共染色を実施し、NSUN2 がミトコンドリア RNA と共局在する傾向を見出した。ミトコンドリア RNA がプロセッシングされる場であるミトコンドリア RNA 顆粒(MRGs)の存在が提唱されており、NSUN2 が MRGs の構成因子である可能性を示した。

【関連する成果】

ヒトミトコンドリア tRNA 全 22 種の修飾を解析し、本研究で着目した希少修飾以外も含めて 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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Akichika Shinichiro, Suzuki Takeo, Suzuki Tsutomu	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 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 Shinoda Saori, Kitagawa Sho, Nakagawa Shinichi, Wei Fan-Yan, Tomizawa Kazuhito, Araki Kimi, Araki Masatake, Suzuki Takeo, Suzuki Tsutomu	4. 巻 47
2. 論文標題 Mammalian NSUN2 introduces 5-methylcytidines into mitochondrial tRNAs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8734 ~ 8745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz575	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 Hirata Akira, Suzuki Takeo, Nagano Tomoko, Fujii Daishiro, Okamoto Mizuki, Sora Manaka, Lowe Todd M., Kanai Tamotsu, Atomi Haruyuki, Suzuki Tsutomu, Hori Hiroyuki	4. 巻 201
2. 論文標題 Distinct Modified Nucleosides in tRNATrp from the Hyperthermophilic Archaeon Thermococcus kodakarensis and Requirement of tRNA m2G10/m22G10 Methyltransferase (Archaeal Trm11) for Survival at High Temperatures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	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) 10.1128/JB.00448-19	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9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takeo Suzuki
2. 発表標題 Biogenesis and Regulation of tRNA Modifications Associated with Human Diseases
3. 学会等名 4th ETH Zurich - The University of Tokyo Strategic Partnership Symposium: Innovations in Chemical Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeo Suzuki
2. 発表標題 Biogenesis and regulation of mitochondrial tRNA modifications associated with mitochondrial diseases
3. 学会等名 Joint meeting of the 16th Conference ASMRM and the 19th Conference J-mit (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinoda, S., Kitagawa, S., Nakagawa, S., Wei, F. Y., Tomizawa, K., Araki, K., Araki, M., Suzuki, T., Suzuki, T.
2. 発表標題 Mammalian NSUN2 introduces 5-methylcytidines into mitochondrial tRNAs
3. 学会等名 21st RNA meeting
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------