

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06088

研究課題名(和文) 高温環境の生命活動に必須であるRNA耐熱化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of thermotolerant mechanism of the RNA essential for life activity under high-temperature environment

研究代表者

平田 章 (HIRATA, Akira)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・准教授

研究者番号：60527381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* (Tko) tRNATrpの配列を決定したところ、21個の修飾ヌクレオシドが存在していた。そのうち、m2G10修飾の責任酵素遺伝子である trm11が、Tkoの95以上の生育に必須であることが示唆された。また、既知の trm14が、m2G67修飾の責任酵素遺伝子であることも判明した。一方、tRNATrpの15位に存在するアーケオシンの合成は、既知のアーケオシン合成酵素 ArcS とラジカルSAM酵素 RaSEA が協調して行うことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原始地球に生息した初期生命体は、高温環境下で生命活動を維持するために、修飾ヌクレオシドによりRNAを耐熱化する必要があったと考えられる。また、RNAの耐熱化に関わる修飾ヌクレオシドの合成経路を世界で初めて決定することができた。さらに、RNAを安定化する修飾ヌクレオシドも判明し、部位特異的にRNAを標識する技術開発やRNA創薬開発に新たな方向性を示すこととなった。今後、これらの研究成果を基盤に研究を継続することで、より発展的にRNAを安定化する革新的アイデアが生まれると期待している。

研究成果の概要(英文)：We determined the complete sequence of tRNATrp, one of the substrate tRNAs for archaeal Trm11 essential for m2G10 formation from *Thermococcus kodakarensis* (Tko), a hyperthermophilic archaeon. In Tko tRNATrp, we identified 15 types of modified nucleoside at 21 positions. Our genetic analysis suggests that trm11 gene is required for Tko survival at high temperatures over 95 °C. We also demonstrated that trm14 gene is responsible for m2G67 formation. On the other hands, we suggest that Archaeosine synthase ArcS requires a racial SAM enzyme RaSEA for archaeosine synthesis at 15 position in the Tko tRNA.

研究分野：構造生物化学

キーワード：tRNA modification thermotolerant RNA tRNA modification enzyme Archaea

1. 研究開始当初の背景

成熟 tRNA 中の塩基や 2'-O-リボース原子には、tRNA 修飾酵素によってメチル基等が付加され、修飾ヌクレオシドが形成される。tRNA の修飾ヌクレオシドは、tRNA 自身の高次構造の安定化、遺伝暗号解読の安定性や正確性を付与する役割などが判明しており、タンパク質合成系を正確にかつ円滑に進めることに直結している。3つの生物ドメイン(真正細菌、アーキア(古細菌)、真核生物)のうち、アーキアと真核生物の tRNA 修飾酵素は構造・機能的に酷似していることが多く、両生物が共通祖先から分岐したと関連している。したがって、両生物で共通した多数の修飾ヌクレオシドが tRNA 中の同じ部位に見られる。しかしながら、それらの修飾ヌクレオシドの機能は未だに不明なものも多く、「RNA ワールド」の観点からすると(by Thomas, CR)、「なぜ、生命誕生の初期段階に存在していた tRNA に修飾ヌクレオシドが必要であったのか？」という tRNA 修飾がタンパク質合成系に寄与するすべての役割を解明したわけではない。

2. 研究の目的

本研究では、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis*(Tko)をモデル微生物とし、修飾ヌクレオシドによる tRNA 耐熱化機構を分子レベルで解明する (1)。また、tRNA の耐熱化に関わるアーケオシン合成経路の解明も目指した (2)。

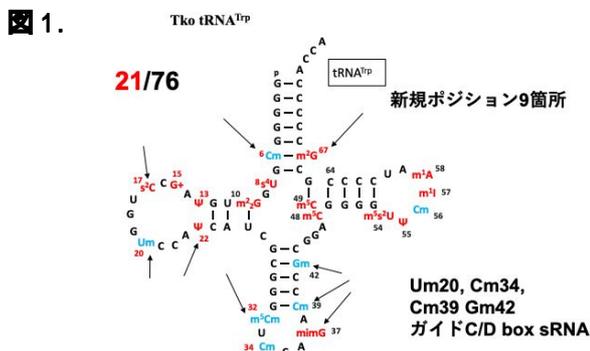
3. 研究の方法

(1) Tko を大量に嫌気培養し、10g 程度の湿菌体を得た。AGPC 法によりトータル RNA を抽出後、固相化 DNA プローブ法により、0.2 OD260 unit の Tko tRNA^{Tp} を単離した。次に LC/MS 解析と衝突活性化分解法(CID)解析を組み合わせ、Tko tRNA^{Tp} 配列を決定した。また、各修飾ヌクレオシド形成に関わる責任酵素遺伝子を欠損させた Tko 株も構築した。各遺伝子欠損株から、固相化 DNA プローブ法により、tRNA^{Tp} を単離し、LC/MS および CID 解析を行った。

(2) アーケオシンは、アーキア tRNA の 15 位に存在し、Tko の高温環境下の生育に重要であることが知られている。アーケオシン tRNA グアニトランスグリコシラーゼ(ArcTGT)は、tRNA 15 位グアニル酸残基のグアニンと、アーケオシン前駆体 preQ0 塩基を入れ替える反応を触媒する。また、アーケオシン合成酵素(ArcS)は、tRNA 中のアーケオシン前駆体 preQ₀ からアーケオシン合成を触媒する。Tko の *arcS* 遺伝子を欠損させ、好熱性アーキア *Thermoplasma acidophilum* (Tac)*arcS* 遺伝子を導入後、Tko+Tac *arcS* 変異株からトータル tRNA を抽出した。抽出したトータル tRNA から逆相クロマトグラフィーにより、preQ₀ 反応中間体を単離し、LC/MS 解析を行った。アーキアの比較ゲノム解析から、アーケオシン合成に必要な第三の酵素 RaSEA を見出し、ArcTGT、ArcS および RaSEA の各組換え体タンパク質を作成した。嫌気条件下において、ArcTGT、ArcS、RaSEA、tRNA、S-アデノシルメチオニン(SAM)、preQ₀ およびリジンを混合し試験管内で反応させた。Tko をベースに RaSEA 遺伝子破壊株を作成し、トータル tRNA を抽出し、LC/MS 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 修飾ヌクレオシドを含む Tko tRNA^{Tp} の塩基配列を決定した(図 1)。興味深いことに、21 個の修飾ヌクレオシドが存在し、既知の修飾ヌクレオシドが新規ポジションの 9 箇所に見られた。7 個の 2'-O-メチル化修飾が見られ、おそらく、tRNA の熱安定化に寄与しており、Tko の高温生育に重要であると考えられた。また、10 位の m²G 形成の責任酵素である Trm11 は、Tko が 95 °C 以上で生育するのに必須であることが分かった。新規ポジションに存在する m²G67 修飾の責任酵素は不明であったが、既知の Trm14 であることが判明した。Trm14 は、6 位の G をメチル化酵素であるが、6 位と相補する 67 位が G の場合にメチル化するマルチ特異性を有することが示唆された。今回の研究

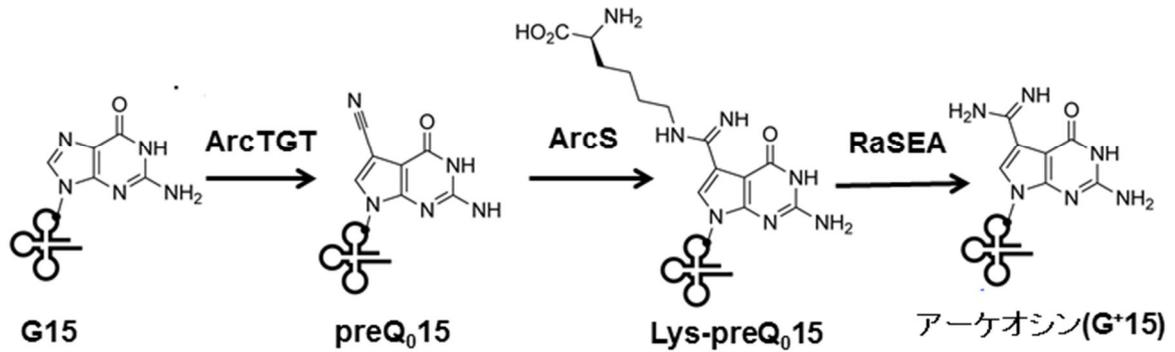


2'-O-メチル化修飾が高温環境下の生育に重要?

結果と既知の報告から、超好熱性アーキア tRNA は m⁵s²U54+2'-O-メチル化修飾+硫黄修飾+アセチル化修飾のコンビネーションによって、耐熱化されていることが予想される (Hirata, A *et al. Journal of Bacteriology.* (2019))。

(2) 図2のように、岐阜大学横川教授らとともに、世界で初めてアーケオシン合成経路を解明した (Yokogawa, T *et al. Nature Chemical Biol.* (2019))。まず、ArcTGT により、tRNA の 15 位のグアノシンが preQ₀ に置換され、ArcS がリジンを preQ₀ に付加し、最後に、RaSEA がラジカル SAM 作用によって、アーケオシンを合成することが判明した。RaSEA は、ArcS と複合体を形成し、鉄硫黄クラスターを含むことから、一連の合成反応は、無酸素下であることが必須だった。

図2. アーケオシン合成経路



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

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 1-17
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 該当する
1. 著者名 Hirata Akira, Okada Keisuke, Yoshii Kazuaki, Shiraiishi Hiroyuki, Saijo Shinya, Yonezawa Kento, Shimizu Nobutaka, Hori Hiroyuki	4. 巻 47
2. 論文標題 Structure of tRNA methyltransferase complex of Trm7 and Trm734 reveals a novel binding interface for tRNA recognition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 10942 ~ 10955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz856	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 Yokogawa Takashi, Nomura Yuichiro, Yasuda Akihiro, Ogino Hiromi, Hiura Keita, Nakada Saori, Oka Natsuhisa, Ando Kaori, Kawamura Takuya, Hirata Akira, Hori Hiroyuki, Ohno Satoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Identification of a radical SAM enzyme involved in the synthesis of archaeosine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1148 ~ 1155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-019-0390-7	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 Hirata Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Recent Insights Into the Structure, Function, and Evolution of the RNA-Splicing Endonucleases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2019.00103	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 平田 章
2. 発表標題 超好熱菌由来タンパク質の構造と機能に関する研究 ~ 遺伝情報を伝達する仕組みから生命進化の痕跡を探る ~
3. 学会等名 第144回徳島生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野利本剛、平田 章、空 まかな、堀 弘幸
2. 発表標題 超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> 由来tRNAメチル化酵素Trm14の研究
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀 弘幸、福本修平、長谷川貴宏、難波美優、平田 章、河村卓哉
2. 発表標題 SpoU-TrmD RNAメチル化酵素スーパーファミリーの中で、最も長いIC未領域を持つ <i>Thermoplasma acidophilum</i> Trm56の新しい精製法
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横川隆志，能村友一朗，安田旭宏，尾木野弘実，日浦恵太，仲田沙織，岡 夏央，安藤香織，河村卓哉，平田 章，堀弘幸，大野 敏
2. 発表標題 アーキア特異的修飾ヌクレオシド、アーケオシンの合成に関わる新奇ラジカルSAM酵素
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 福岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirata, A , Suzuki, T , Nagano, T , Fuji, D , Okamoto, M , Sora, M , Lowe, M. T , Kanai, T , Atomi, H , Suzuki, T , Hori H
2. 発表標題 Analysis of distinct modified nucleosides in tRNA from the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis provides insight into the requirement of specific tRNA modifications and their responsible genes for survival at high temperatures
3. 学会等名 Thermophiles2019 福岡 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田 章
2. 発表標題 (超)好熱性アーキアのRNA修飾の研究
3. 学会等名 微生物ウィーク2019 東京大学農学部弥生講堂 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirata, A , Okada, K , Yoshi, K , Shiraishi, H , Saijo, S , Yonezawa, K , Shimizu, N , Hori, H
2. 発表標題 Structure of tRNA methyltransferase complex of Trm7 and Trm734 provides insight into its novel bipartite interaction essential for tRNA recognition and 2'-O-methylation at the first position of anticodon in specific tRNAs
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会 東京大学伊藤国際学術研究センター
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 陽、伊藤亜沙子、山上龍太、平田 章、堀 弘幸
2. 発表標題 大腸菌tRNA (Gm18) メチル化酵素 (TrmH)の基質tRNA選択システム
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaneta, A., Fujishima, K., Morikazu, W., Hori, H., and Hirata, A.
2. 発表標題 The RNA-splicing endonuclease from the Euryarchaea Methanopyrus kandleri uniquely represents a heterodimer with constraint range of substrate specificity: Supporting the coevolutionary scenario of protein function and tRNA gene diversity
3. 学会等名 extremophiles 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirata, A., Okada, K., Yoshii, K., Shiraishi, H., Saijo, S., Yonezawa, K., Shimizu, N., and Hori, H.
2. 発表標題 Structure of yeast tRNA Nm34 methyltransferase Trm7-Trm734 complex reveals its novel bipartite interaction essential for 2'-O-methylation of N34 in the wobble position of three specific tRNA species
3. 学会等名 27th tRNA Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日浦惠太、能村友一朗、安田旭宏、大野 敏、尾木野弘実、河村卓哉、平田 章、堀 弘幸、横川隆志
2. 発表標題 Methanosarcina acetivoransにおける修飾ヌクレオシドアーケオシン生合成経路の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新しいtRNA修飾酵素を発見 - 無酸素環境下で鉄と硫黄を含む酵素が関わる反応機構を解明 -
https://www.ehime-u.ac.jp/data_release/data_release-106715/
 遺伝情報の読み取りを強化するtRNAのメチル化の仕組みを構造解析と生化学解析により解明
https://www.ehime-u.ac.jp/data_release/data_release-105529/

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