

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）一般
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19350087
 研究課題名（和文） 生命進化に伴うRNA修飾酵素の機能変化の構造基盤
 研究課題名（英文） Structural basis of functional changes of RNA modification enzymes through evolution of life
 研究代表者
 堀 弘幸（HORI HIROYUKI）
 愛媛大学・大学院理工学研究科・教授
 研究者番号：20256960

研究成果の概要（和文）：生命は真核生物、真正細菌、古細菌の3つに分類される。本研究では、この3つの生物界で、RNA修飾酵素の構造と機能がどう異なっているかを調べた。その結果、新たにマルチサイト特異性酵素を発見し、葉酸依存性RNAメチル化酵素のX線結晶構造解析に成功し、その触媒機構を提案し、タンパク質ノット型RNAメチル化酵素の基質RNA認識が多段階からなっていることを証明し、さらにRNA修飾ネットワークが存在することを発見した。

研究成果の概要（英文）：Living organisms can be classified to three domains, eukaryotes, archaea and eubacteria. The purpose of this study is clarification of structural and functional differences of RNA modification enzymes according to the evolution of life. Our new findings are as follows: discovery of new multisite-specificity RNA methyltransferase, structural study and hypothetical reaction mechanism of folate-dependent RNA methyltransferase, multistep recognition of substrate tRNA by protein-knot RNA methyltransferase, and discovery of RNA modification network.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：酵素化学

1. 研究開始当初の背景

研究を計画した2006年秋の時点では、RNA修飾酵素に多様性が存在することが明らかとなりつつあった。

たとえば、RNAメチル化酵素では、みな

同じ触媒ドメインを持ち、同一の反応機構でメチル基が転移されると信じられていたが、幾つかの例外が見つかりはじめていた。しかしながら、これらの新規酵素の構造や触媒機構、RNA認識機構の詳細に関して、当時は

全く不明の状態であった。

2. 研究の目的

研究代表者らは、ゲノム配列情報とタンパク質構造情報をもとに、真正細菌、古細菌、真核生物の RNA 修飾酵素、とくにメチル化酵素を系統的に分類し、生命進化とタンパク質の分子進化の観点から、RNA 修飾酵素の構造と機能を整理することを目的とし、本研究を計画した。

3. 研究の方法

本研究では、(1) ゲノム情報をもとに機能未知の RNA 修飾酵素遺伝子の候補を洗い出す (2) 上記遺伝子産物の発現系の構築を目指す (3) 遺伝子破壊株解析を併用し、遺伝子産物の機能を探る (4) X線結晶構造解析を行う (5) 生化学解析によって、触媒機構、RNA 認識機構の詳細を調べる、といった手法を用いた。

4. 研究成果

研究成果は多岐にわたり、かつ相互に関連するが、大きく5つに分類される。

(1) 新規 RNA 修飾酵素の発見

超好熱性真正細菌 *A. aeolicus* の保持する TrmI 遺伝子産物は、tRNA の G26、G27 の両方をメチル化する新規マルチサイト特異性 RNA 修飾酵素であった。

(2) 新規タンパク質構造の決定

葉酸依存性 RNA メチル化酵素 TrmFO の X 線結晶構造解析に成功した。

(3) 新規反応機構の提案

葉酸依存性 RNA メチル化酵素 TrmFO の触媒機構を提案したほか、タンパク質ノット構造をもつ RNA メチル化酵素 TrmH の RNA 認識機構が多段階からなることを発見した。

(4) タンパク質構造と機能に関する新知見

耐熱性 tRNA (m7G46) メチル化酵素 (TrmB) の C 末端領域が、タンパク質構造の安定化および正確なメチル基転移反応に寄与することを発見した。また、TrmD ではジスルフィド結合が二量体構造を安定化していることを報告した。

(5) RNA 修飾ネットワークの発見

高度好熱菌 TrmB が、RNA 修飾ネットワークの鍵因子の一つとして機能し、この酵素の欠損株では、様々な RNA 修飾に異常が起こることを明らかにした。

これら一連の研究成果のうち幾つかは、Nature publishing group のインターネット

ジャーナル A-IMBN Research 誌のハイライト記事で、「日本のグループが感染症対策のターゲットとなる重要な RNA 修飾酵素の構造機能解析に成功した」と紹介されたほか、愛媛大学学報記事、愛媛新聞平成 21 年 5 月 21 日朝刊でも紹介された。

今後は、RNA 修飾ネットワークの解明と個々のタンパク質の構造機能解析を包括する方向で、研究を進展させていきたい。

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 16 件)

(1) A. Ochi, K. Makabe, K. Kuwajima, and H. Hori, “Flexible recognition of the tRNA G18 methylation target site by TrmH methyltransferase through first binding and induced fit processes”

J. Biol. Chem. **285**, 9018-9029 (2010)

(2) C. Tomikawa, T. Yokogawa, T. Kanai, and H. Hori, “*N*⁷-Methylguanine at position 46 (m⁷G46) in tRNA from *Thermus thermophilus* is required for cell viability through a tRNA modification network.”

Nucleic Acids Res. **38**, 942-957 (2010)

(3) T. Awai, S. Kimura, C. Tomikawa, A. Ochi, Ihsanawati, Y. Bessho, S. Yokoyama, S. Ohno, K. Nishikawa, T. Yokogawa, T. Suzuki, and H. Hori, “*Aquifex aeolicus* tRNA (*N*², *N*²-guanine)-dimethyltransferase (Trm1) catalyzes transfer of methyl groups not only to guanine 26 but also to guanine 27 in tRNA.”

J. Biol. Chem. **284**, 20467-20478 (2009)

(4) H. Nishimasu, R. Ishitani, K. Yamashita, C. Iwashita, A. Hirata, H. Hori, and O. Nureki, “Atomic structure of a folate/FAD-dependent tRNA T54 methyltransferase.”

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 8180-8185 (2009)

- (5) T. Kitajima, A. Hirata, C. Iwashita, **S.-I. Yokobori**, and **H. Hori**, “Enzymatic and Crystallographic Characterization of Archaeal tRNA Splicing Endonuclease”, *Micro-NanoMechatronics and Human Science 2009*, CFP09768-CDR, P2-13 (2009)
- (6) K. Okada, Y. Muneyoshi, Y. Endo, and **H. Hori**, “Production of yeast (m²G10) methyltransferase (Trm11 and Trm112 complex) in a wheat germ cell-free translation system.” *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.53*, 303-304 (2009)
- (7) T. Toyooka, T. Awai, T. Kanai, T. Imanaka, and **H. Hori**, “Stabilization of tRNA (m¹G37) methyltransferase [TrmD] from *Aquifex aeolicus* by an intersubunit disulfide bond formation” *Genes to Cells* **13**, 807-816 (2008)
- (8) K. Matsumoto, C. Tomikawa, T. Toyooka, A. Ochi, Y. Takano, N. Takayanagi, M. Abe, Y. Endo, and **H. Hori**, “Production of Hetero Subunits RNA Modification Enzyme by Wheat Germ Cell-Free Translation System” *J. of Biotechnol.* **133**, 453-460 (2008)
- (9) C. Tomikawa, A. Ochi, and **H. Hori**, “The C-terminal region of thermophilic tRNA (m⁷G46) methyltransferase (TrmB) stabilizes the dimer structure and enhances fidelity of methylation.” *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **71**, 1400-1408 (2008)
- (10) T. Awai, and **H. Hori**, “Broad substrate RNA specificity of Trm1 [tRNA (m²₂G26) methyltransferase] from *Aquifex aeolicus*“, *Micro-NanoMechatronics and Human Science 2008*, CEP07768-CDR, P1-10 (2008)
- (11) K. Matsumoto, T. Toyooka, C. Tomikawa, A. Ochi, Y. Takano, N. Takayanagi, Y. Endo, and **H. Hori**, “RNA recognition mechanism of eukaryote tRNA (m⁷G46) methyltransferase (Trm8-Trm82 complex)” *FEBS Lett.* **581**, 1599-1604 (2007)
- (12) M. Abe, S. Ohno, T. Yokogawa, T. Nakanishi, F. Arisaka, T. Hosoya, T. Hiramatsu, M. Suzuki, T. Ogasawara, T. Sawasaki, K. Nishikawa, M. Kitamura, **H. Hori**, and Y. Endo, “Detection of structural changes in a cofactor binding protein by using a wheat germ cell-free protein synthesis system coupled with unnatural amino acid probing”, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **67**, 643-652 (2007)
- (13) A. Ochi, and **H. Hori**, “Complex Formations between Artificial RNA-DNA Chimera Nucleic Acids and RNA Modification Enzymes”, *Micro-NanoMechatronics and Human Science 2007*, 113-118 (2007)
- (14) T. Toyooka, and **H. Hori**, “Differences in substrate selectivity of the new SPOUT superfamily of methyltransferases”, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 51*, 445-446 (2007)
- (15) A. Ochi, and **H. Hori**, “Hydroxyl Radical Probing of tRNA (Gm18) methyltransferase [TrmH] -AdoMet-artificial tRNA ternary complex”, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 51*, 373-374 (2007)
- (16) Y. Muneyoshi, K. Matsumoto, C. Tomikawa, T. Toyooka, A. Ochi, T. Masaoka, Y. Endo, and **H. Hori**, “Hetero subunit interaction and RNA recognition of yeast tRNA (m⁷G46) methyltransferase synthesized in a wheat germ cell-free translation system”, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 51*, 359-360

(2007)

[学会発表] (計 41 件)

- (1) **H. Hori**, T. Awai, T. Toyooka, C. Tomikawa, H. Okamoto, H. Takeda, K. Watanabe, A. Ochi, A. Hirata, S. Kimura, Y. Ikeuchi, T. Yokogawa, and T. Suzuki, "Transfer RNA Methyltransferases from a Hyperthermophilic Eubacterium, *Aquifex aeolicus*", 23rd tRNA workshop Portugal 2010, Aveiro, Portugal, 28 Jan. 2010
- (2) T. Awai, Ihsanawati, S. Kimura, C. Tomikawa, A. Ochi, T. Yokogawa, T. Suzuki, Y. Bessho, S. Yokoyama, and **H. Hori**, "Multi-site substrate recognition mechanism of *Aquifex aeolicus* Trm1", 23rd tRNA workshop Portugal 2010, Aveiro, Portugal, 28 Jan. 2010
- (3) A. Ochi, and **H. Hori**, "Flexible recognition of methylation target site, guanosine at position 18 in tRNA by tRNA (Gm18) methyltransferase", 23rd tRNA workshop Portugal 2010, Aveiro, Portugal, 28 Jan. 2010
- (4) A. Hirata, A. Ochi, C. Tomikawa, T. Kitajima, T. Kanai, and **H. Hori**, "Characterization of TrmJ [Transfer RNA (Cm32/Um32) Methyltransferase] Ortholog (TK1970) from a Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*", 23rd tRNA workshop Portugal 2010, Aveiro, Portugal, 28 Jan. 2010
- (5) H. Nishimasu, R. Ishitani, K. Yamashita, C. Iwashita, A. Hirata, **H. Hori**, and **O. Nureki**, "Atomic structure of a folate/FAD-dependent tRNA T54 methyltransferase", 23rd tRNA workshop Portugal 2010, Aveiro, Portugal, 28 Jan. 2010
- (6) 栗井貴子、Ihsanawati, 木村 聡、富川千恵、越智杏奈、横川隆志、鈴木 勉、別所義隆、横山茂之、堀 弘幸、"超好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 Trm1 [tRNA (m²G26) methyltransferase] の tRNA 認識機構と構造の相関", 第 3 2 回日本分子生物学会、横浜、2009 年 12 月 12 日
- (7) 山下光輝、西増弘志、石谷隆一郎、岩下知香子、平田 章、**濡木 理**、**堀 弘幸**、"葉酸依存性 tRNA m⁵U54 メチル化酵素 TrmF0 の基質認識メカニズム解明に向けて", 第 3 2 回日本分子生物学会、横浜、2009 年 12 月 12 日
- (8) 岡田和樹、宗吉裕樹、遠藤弥重太、**堀 弘幸**、"無細胞翻訳系を用いた酵母由来 tRNA (m²G10) メチル基転移酵素 (Trm11-Trm112) の合成と解析", 第 3 2 回日本分子生物学会、横浜、2009 年 12 月 12 日
- (9) 石田一雄、富川千恵、岩下知香子、**堀 弘幸**、"*Thermus thermophilus*における tRNA シュードウリジン 55 合成酵素 TruB が生育および tRNA 修飾に与える影響", 第 3 2 回日本分子生物学会、横浜、2009 年 12 月 12 日
- (10) 山下光輝、西増弘志、石谷隆一郎、岩下知香子、平田 章、**濡木 理**、**堀 弘幸**、"FAD/葉酸依存性 tRNA m⁵U54 メチル化酵素 TrmF0 の基質認識メカニズムの解明に向けて" 2009 年 日本化学会西日本大会、松山、2009 年 11 月 7 日
- (11) 岡田和樹、宗吉裕樹、遠藤弥重太、**堀 弘幸**、"無細胞翻訳系を用いた酵母由来 tRNA (m²G10) methyltransferase (Trm11-Trm112) の合成と解析、2009 年日本化学会西日本大会、松山、2009 年 11 月 7 日
- (12) K. Okada, Y. Muneyoshi, Y. Endo, and **H. Hori**, "Synthesis yeast tRNA (m²G10) methyltransferase (Trm11 and Trm112) in a wheat germ cell-free translation system.", International Protein Island Matsuyama Symposium, Matsuyama, 25th Sep 2009
- (13) 吉田 剛士、岩崎 絵梨、栗井 貴子、富川 千恵、平田 章、**堀 弘幸**、"*Thermus thermophilus* 由来 dihidrouridine 合成酵素 (Dus) の機能解析" 第 8 回高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト連携会議、理研・播磨・SPring-8、2009 年 8 月 22 日
- (14) 山下 光輝、西増 弘志、岩下 知香子、石谷 隆一郎、平田 章、**濡木 理**、**堀 弘幸**、"FAD/Folate 依存 tRNA m⁵U54 メチル化酵素 TrmF0 の基質認識メカニズム解明に向けて", 第 8 回高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト連携会議・理研・播磨 SPing-8、2009 年 8 月 22 日

- (15) 富川 千恵、横川 隆志、金井 保、堀 弘幸 “*Thermus thermophilus* の tRNA 修飾酵素遺伝子破壊株の解析-tRNA m⁷G46 メチル化酵素はネットワークの鍵酵素の一つである-”, 第 8 回高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト連携会議・理研・播磨 SPring-8、[依頼講演] 2009 年 8 月 22 日
- (16) 西増 弘志、石谷 隆一郎、山下 光輝、岩下 知加子、平田 章、堀 弘幸、瀧木 理 “葉酸/FAD 依存性 tRNA U54 メチル化酵素 TrmFO の構造と機能”, 第 11 回日本 RNA 学会、新潟、2009 年 7 月 28 日
- (17) 栗井 貴子、木村 聡、富川 千恵、越智 杏奈、Ihsanawati、別所 義隆、横山 茂之、横川 隆志、鈴木 勉、堀 弘幸 “マルチサイト特異性 RNA メチル化酵素の tRNA 認識機構”, 第 11 回日本 RNA 学会、新潟、2009 年 7 月 28 日
- (18) 北嶋 翼、平田 章、岩下 知加子、横堀 伸一、堀 弘幸 “古細菌 ($\alpha\beta$) 2 型 RNA スプライシングエンドヌクレアーゼはどのように変則的部位にあるイントロンを切断できるのか”, 第 11 回日本 RNA 学会、新潟、2009 年 7 月 27 日
- (19) 越智 杏奈、堀 弘幸 “*Thermus thermophilus* HB8 tRNA (Gm18) methyltransferase [TrmH] の tRNA G18 認識メカニズム”, 第 11 回日本 RNA 学会、新潟、2009 年 7 月 27 日
- (20) 富川 千恵、金井 保、横川 隆志、堀 弘幸 “tRNA m⁷G46 修飾の有無は他 tRNA 修飾酵素活性に影響を与える”, 第 11 回日本 RNA 学会、新潟、2009 年 7 月 27 日
- (21) 中村 仁、堀 弘幸 “tRNA 修飾に対する翻訳伸長因子 EF-Tu の影響”, 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 13 日
- (22) 富川 千恵、堀 弘幸 “好熱菌由来 tRNA (m⁷G46) methyltransferase [TrmB] の触媒メカニズムの解明に向けた機能解析”, 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 13 日
- (23) 宗吉裕樹、松本啓介、高野義孝、高柳直幸、遠藤弥重太、堀 弘幸 “酵母由来 tRNA (m⁷G46) メチル基転移酵素 [Trm8-Trm82] の解析及び、ウリ類炭疽病菌 Trm8 オーソログ APH1 遺伝子の比較解析”, 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 13 日
- (24) 岡田和樹、宗吉裕樹、遠藤弥重太、堀 弘幸 “無細胞翻訳系を用いた酵母由来ヘテロサブユニット tRNA 修飾酵素の合成と解析”, 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 13 日
- (25) 栗井貴子、Ihsanawati、木村 聡、富川 千恵、越智杏奈、横川隆志、鈴木 勉、横山茂之、別所義隆、堀 弘幸 “真正細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 Trm1 [tRNA (m²G26) methyltransferase] の構造と基質認識メカニズム”, 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 13 日
- (26) 北嶋 翼、岩下 知香子、横堀 伸一、堀 弘幸 “超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* における tRNA^{Trn} 前駆体と RNA 修飾の解析”, 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 13 日
- (27) 山下 光輝、岩下 知香子、西増 弘志、瀧木 理、堀 弘幸 “葉酸依存性 tRNA (U54) メチル化酵素 [TrmFO] の試験管内アッセイ法の確立”, 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 13 日
- (28) 石田一雄、富川千恵、越智杏奈、横川隆志、岩下知香子、堀 弘幸 “*Thermus thermophilus* における tRNA シュードウリジン 55 合成酵素 TruB の重要性”, 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 13 日
- (29) 越智杏奈、堀 弘幸 “tRNA (Gm18) methyltransferase [TrmH] TypeI 型酵素と TypeII 型酵素の比較”, 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 13 日
- (30) Y. Muneyoshi, K. Matsumoto, C. Tomikawa, T. Toyooka, Anna Ochi, T. Masaoka, Y. Endo, and **H. Hori** “Yeast tRNA (m7G46) methyltransferase which contains two protein subunits (Trm8 and Trm82) synthesized in a wheat germ cell-free translation system.”, Protein Island Matsuyama International Symposium 2008, Matsuyama, September 25, 2008
- (31) 石田一雄、富川千恵、岩下知香子、堀

- 弘幸 “tRNA シュードウリジン 55 合成酵素 TruB 遺伝子破壊株及び変異株の生育について”、高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト 第7回連携研究会、理研・播磨、2008年9月13日
- (32) 山下 光輝, 岩下 知香子, 西増 弘志, 濡木 理, 堀 弘幸 “*Thermus thermophilus* 由来 tRNA U54 メチル化酵素 TrmF0 *in vitro* アッセイ法の確立”、高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト 第7回連携研究会、理研・播磨、2008年9月13日
- (33) 美濃地 真之, 牛尾 なつみ, 堀 弘幸 “*Thermus thermophilus* tRNA (m¹A58) methyltransferase [TrmI] の基質認識機構”、高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト 第7回連携研究会、理研・播磨、2008年9月13日
- (34) 栗井貴子, 木村 聡, Ihsanawati, 富川千恵, 越智杏奈, 別所義隆, 横山茂之, 横川隆志, 鈴木 勉, 堀 弘幸 “超好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* の推定上の *trmI* 遺伝子産物の性質決定”、高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト 第7回連携研究会、理研・播磨、2008年9月13日
- (35) 豊岡 峻, 栗井貴子, 金井 保, 今中忠行, 堀 弘幸 “超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来 tRNA (m¹G37) メチル化酵素 [TrmD] のサブユニット間ジスルフィド結合形成の役割”、第10回日本RNA学会年会、札幌、2008年7月25日
- (36) 富川千恵, 横川隆志, 堀 弘幸 “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* における tRNA m⁷G46 修飾の役割は一体何か?”、第10回日本RNA学会年会、札幌、2008年7月25日
- (37) 越智 杏奈, 堀 弘幸 “*Thermus thermophilus* HB8 tRNA (Gm18) methyltransferase [TrmH] C末端領域による基質認識メカニズム”、第10回日本RNA学会年会、札幌、2008年7月25日
- (38) 栗井貴子, 木村 聡, Ihsanawati, 富川千恵, 越智杏奈, 別所義隆, 横山茂之, 横川隆志, 鈴木 勉, 堀 弘幸 “真正細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 Trm1 [tRNA (m²G26) methyltransferase] は G26 のみならず G27 もメチル化する”、第10回日本RNA学会年会、札幌、2008年7月25日
- (39) 中村 仁, 堀 弘幸 “翻訳伸長因子 EF-Tu と tRNA 修飾酵素の相互作用”, 第30回日本分子生物学会年会、横浜、2007年12月14日
- (40) 富川千恵, 堀 弘幸 “好熱菌由来 tRNA (m⁷G46) methyltransferase (TrmB) のコアドメインならびにC末端領域の機能解析”, 第30回日本分子生物学会年会、横浜、2007年12月14日
- (41) 栗井貴子, 堀 弘幸 “超好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 Trm1 [tRNA (m²G26) methyltransferase] の基質 RNA 認識メカニズム”, 第30回日本分子生物学会年会、横浜、2007年12月14日
- [図書] (計1件)
- (1) **H. Hori**, “Synthesis of a Hetero Subunit RNA Modification Enzyme by the Wheat Germ Cell-Free Translation System.”, *Methods in Mol. Biol.* **607**, 173-185 (2010) Hamana Press
- [産業財産権]
なし
- [その他]
研究室ホームページ
<http://www.ehime-u.ac.jp/~achem/bchem/>
学報記事 (研究トピックス)
http://www.ehime-u.ac.jp/research/news/detail.html?new_rec=2173
- 解説記事
堀 弘幸 「葉酸依存性 RNA メチル化酵素」
生化学 81 巻 ことば p418 (2009)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
堀 弘幸 (HORI HIROYUKI)
愛媛大学・理工学研究科・教授
研究者番号：20256960
- (2) 研究分担者
濡木 理 (NUREKI OSAMU)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：10272460
平成20年度より連携研究者
- 横堀 伸一 (SHIN-ICHI YOKOBORI)
東京薬科大学・生命科学部・講師
研究者番号：40291702
平成20年度より連携研究者