

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03211

研究課題名(和文) 複合tRNA修飾酵素の各サブユニットの役割と基質tRNA認識機構の解明

研究課題名(英文) Study on substrate tRNA recognition mechanisms of multiple subunit tRNA modification enzymes

研究代表者

堀 弘幸 (Hori, Hiroyuki)

愛媛大学・理工学研究科(工学系)・教授

研究者番号：20256960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、複数のサブユニットからなる複合tRNA修飾酵素の基質tRNA認識機構の解明を目的とした。酵母tRNA10位を2-メチルグアノシンに修飾するTrm11-Trm112複合体は、細胞内に存在する43種のtRNAのうち、20種類しかメチル化しない。研究代表者らは、Trm11-Trm112が、G10-C25塩基対、CCA末端、5ヌクレオチドパリアブル領域、38位周辺の糖リン酸骨格を認識することを発見した。その他、4-チオウリジンの新たな検出法や次世代DNAシーケンサを併用したRNA修飾酵素解析法を考案し、それらのプロトコールを公開し、THUMPドメインに関する総説をまとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

21世紀に入り、tRNAの修飾ヌクレオシドと修飾酵素の欠損が50種類以上のヒト遺伝病と関係することが判ってきた。したがって、当該領域は、遺伝病の病態の理解、新たな遺伝子診断法や遺伝子治療法の開発に直結する分野となっている。また、tRNA中の修飾ヌクレオシドや修飾酵素は、コレラ菌、チフス菌、レトロウイルスなどの感染必須因子である。ゆえに、tRNAの修飾ヌクレオシドと修飾酵素の研究は感染性微生物防除の観点からも重要である。複合tRNA修飾酵素は精製酵素による解析が難しく、未解明な問題が多い分野であったが、本研究では複合tRNAメチル化酵素の基質tRNA認識機構を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is the clarification of tRNA recognition mechanisms of multiple subunit tRNA modification enzymes. Eukaryotic tRNA methyltransferase complex (Trm11-Trm112 complex) methylates only 20 tRNA molecular species among 43 tRNA species. We have clarified the recognition sites in tRNA of Trm11-Trm112 complex, namely the G10-C25 base pair, CCA terminus, regular size (5 nt) variable region, and phosphate-ribose backbone around position 38 in tRNA. Furthermore, we have developed a new 4-thiouridine detection system and a new analysis method for tRNA modification enzymes using a next generation DNA sequencer. Moreover, the protocols for the later method have been described in Methods in Enzymology. In addition, the knowledges concerning THUMP domain has been summarized in a review.

研究分野：機能生物化学

キーワード：酵素 核酸 タンパク質 RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

tRNA の各所には様々な修飾ヌクレオシドが存在する。これら修飾ヌクレオシドの第一義的な機能は、タンパク質合成系を制御することであるが、プロセッシング、スプライシング、RNA の細胞内輸送、RNA 干渉などともリンクし、ストレス応答、発生・分化、感染・免疫、発がん等の高次生命現象にも影響を与える。

tRNA 中の修飾ヌクレオシドの合成酵素を tRNA 修飾酵素と総称するが、これらは作用する tRNA の種類や作用部位が異なれば、別の酵素が作用することが大原則である。

21 世紀に入り、複数のサブユニットからなる複合 tRNA 修飾酵素が真核生物およびアーキアから多数発見されている。これらの中には、結合するサブユニットによって、修飾する tRNA の種類や修飾部位、合成される修飾ヌクレオシド自体が変化するものさえある。しかしながら、複合 tRNA 修飾酵素は精製が難しく、その分子メカニズムの解析が困難な分野となっている。

酵母の tRNA の 10 位の 2-メチルグアノシンは、複合 tRNA メチル化酵素 (Trm11-Trm112 複合体) により合成される。Trm11-Trm112 複合体は、酵母 tRNA₄₃ 種類のうち、20 種類にしか作用しない。これまで、研究代表者および欧州の複数の研究グループが、Trm11-Trm112 複合体の基質 tRNA 認識機構の解明に挑んできたが、*trm11* や *trm112* 遺伝子破壊株の解析だけでは限界があり、精製タンパク質標品による解析が必要であった。

また、複合 tRNA 修飾酵素の性質を既存の手法だけで解析するのは限界があり、新規な RNA 分析法の開発が待ち望まれていた。

2. 研究の目的

本研究は、Trm11-Trm112 複合体をはじめとする複合 tRNA 修飾酵素の基質認識機構を明らかにすることを目標とした。また、その過程で、新たな修飾ヌクレオシド検出法や次世代 DNA シーケンサを併用した tRNA 修飾酵素解析手法の開発にも着手した。

3. 研究の方法

酵母 Trm11-Trm112 複合体は、大腸菌で大量発現させ、精製した。60 種類以上の変異 tRNA 転写産物のメチル基受容活性を測定し、Trm11-Trm112 複合体の認識部位を探索した。また、酵母野生株および *trm11* 遺伝子破壊株から tRNA^{Val}_{AAC1} を精製し、これらを解析することによって、10 位のメチル化頻度を調べた。最終的に得られた Trm11-Trm112 複合体の tRNA 上の認識部位を tRNA の L 字型立体構造上にマップし、欧州のグループが構築した Trm11-Trm112 複合体の構造モデルと合わせ、分子モデルを提案した。

また、タンパク質のシステイン残基の化学修飾試薬・MTSEA biotin-XX が RNA 中の 4-チオウリジンと特異的に反応することを見出した。有機化学合成した 4-チオウリジンを含む RNA を用い、MTSEA biotin-XX 検出システムの定量性と検出限界を検討した。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の野生株および 4-チオウリジン合成酵素遺伝子 (*thiI*) 破壊株から tRNA 画分を調製し、その修飾ヌクレオシド特異性について調べた。さらに、大腸菌 ThiI およびシステイン脱硫フラゼ (IscS) を精製し、これらを合わせて、MTSEA biotin-XX が tRNA 内で 4-チオウリジンが合成される経時変化を追跡できるか検討した。加えて、MTSEA biotin-XX が真核生物細胞で新規合成 tRNA の検出に利用できるか検討した。

さらに、修飾ヌクレオシドが存在すると逆転写酵素反応が阻害 (もしくは遅滞) することを利用して、次世代 DNA シーケンサを併用した tRNA 修飾酵素の解析システムの開発を検討した。モデル酵素として、好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* の tRNA メチル化酵素・TrmK を用いた。TrmK は、tRNA の 22 位のアデノシンを 1-メチルアデノシンに変換する酵素である。1-メチルアデノシンは、ウリジン (もしくはチミジン) とワトソン・クリック型塩基対を形成せず、逆転写酵素の反応が阻害される。ここで、人工的に改変されたヌクレオチド認識の緩い逆転写酵素を作用させると、相補鎖の 1-メチルアデノシンとの対合部位に、チミジン以外のヌクレオシドが挿入され、これを次世代 DNA シーケンサで読み込めば、修飾頻度を明らかにすることができると考えた。

4. 研究成果

酵母 Trm11-Trm112 複合体の基質 tRNA 認識部位は、G10-C25 塩基対、5'ヌクレオチドからなるバリアブル領域、CCA 末端、アンチコドン・ループの 38 位周辺のリボース・リン酸骨格の 4 か所であり、これらのうち、どれか 1 つが欠けても Trm11-Trm112 複合体は基質 tRNA として認識しなくなることを明らかにした。また、酵母野生株および *trm11* 遺伝子破壊株から精製した tRNA^{Val}_{AAC1} を解析し、従来、この tRNA は Trm11-Trm112 複合体によってメチル化されていないと報告されていたが、実際はその 10~15% が細胞内で Trm11-Trm112 複合体によってメチル化されていることも発見した。すなわち、国内外の研究者が、Trm11-Trm112 の基質 tRNA 認識機構の解明に挑んできたが、誰も成功しなかった理由の一つに、tRNA^{Val}_{AAC1} は細胞内でメチル化されていない（実際、85% 以上の tRNA^{Val}_{AAC1} はメチル化されていない）という先行研究があり、これが解析を困難にしていた。また、研究代表者らが明らかにした Trm11-Trm112 複合体の tRNA 上の認識部位を tRNA の L 字型立体構造上にマップし、欧州の研究グループが提案した Trm11-Trm112 複合体モデルに重ね合わせると、Trm11 の THUMP ドメインが tRNA の CCA 末端を捕まえ、ロスマンフォールド型メチル化酵素ドメインがスイングすれば、Trm112 が tRNA のアンチコドン・ループの 38 位近傍に接触することが判り、Trm112 は RNA のループ領域に結合するサブユニットであるという分子モデルを提案できた。これらの研究成果は、Nishida *et al. Int. J. Mol. Sci.* (2022) に報告した。また、Trm11 を含む THUMP ドメインを持つ tRNA 修飾酵素に関する総説を発表した Hori *Genes* (2023)。

MTSEA biotin-XX を使用する 4-チオウリジン検出システムは、2-チオウリジン誘導体には全く反応せず、極めて特異性が高く、定量性もあることが判った。したがって、このシステムを用いれば、真核生物細胞内で新規合成された tRNA を特異的に検出できる。これらの研究成果は、Sugio *et al. RNA* (2023) に報告した。

次世代 DNA シーケンサを併用した tRNA 修飾の基質 tRNA 特異性解析システムを開発した。実際に、このシステムを利用して tRNA メチル化酵素・TrmK の基質認識機構を明らかにした (Yamagami and Hori, *J. Biol. Chem.* (2023))。これまで次世代 DNA シーケンサを利用した tRNA の解析システムが幾つか発表されているが、それらは tRNA の種類、修飾部位を特定できただけで、修飾頻度まで解析できるのは、現時点で、研究代表者らのシステムのみである。また、このシステムでは新たなコンピュータープログラムも開発したので、それらを合わせて、詳細な解析プロトコールを Yamagami and Hori, *Methods Enzymol.* (2023) として公開した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yu Nishida, Shiho Ohmori, Risa Kakizono, Kunpei Kawai, Miyu Mamba, Kazuki Okada, Ryota Yamagami, Akira Hirata, Hiroyuki Hori	4. 巻 23
2. 論文標題 Required Elements in tRNA for Methylation by the Eukaryotic tRNA (Guanine- N2-) Methyltransferase (Trm11-Trm112 Complex)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23074046.	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 Sugio Yuzuru, Yamagami Ryota, Shigi Naoki, Hori Hiroyuki	4. 巻 29
2. 論文標題 A selective and sensitive detection system for 4-thiouridine modification in RNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 241 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.079445.122	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 Yamagami Ryota, Hori Hiroyuki	4. 巻 299
2. 論文標題 Application of mutational profiling: New functional analyses reveal the tRNA recognition mechanism of tRNA m1A22 methyltransferase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102759 ~ 102759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102759	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 Hori Hiroyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Transfer RNA Modification Enzymes with a Thiouridine Synthetase, Methyltransferase and Pseudouridine Synthase (THUMP) Domain and the Nucleosides They Produce in tRNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 382 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14020382	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 Yamagami Ryota, Hori Hiroyuki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Functional analysis of tRNA modification enzymes using mutational profiling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	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) 10.1016/bs.mie.2023.02.021	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yoh Kohno, Asako Ito, Aya Okamoto, Ryota Yamagami, Akira Hirata, Hiroyuki Hori
2. 発表標題 Escherichia coli tRNA (Gm18) methyltransferase (TrmH) recognizes the location of methylation site (G18) in the D-loop for the selection of substrate tRNA.
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野利本 剛, 空 磨奈伽, 平田 章, 堀 弘幸
2. 発表標題 超好熱性アーキアThermococcus kodakarensis由来tRNA メチル化酵素Trm14の機能解明について
3. 学会等名 第33回日本Archaea研究会講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野利本 剛, 空 磨奈伽, 平田 章, 堀 弘幸
2. 発表標題 超好熱性アーキアThermococcus kodakarensis由来tRNA m2G6 メチル化酵素Trm14の 幅広い基質特異性
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kumpei Kawai, Yu Nishida, Shiho Ohmori, Risa Kakizono, Miyu Namba, Kazuki Okada, Ryota Yamagami, Akira Hirata, Hiroyuki Hori
2. 発表標題 Required Elements in tRNA for Methylation by the Eukaryotic tRNA (Guanine-N2-) Methyltransferase (Trm11-Trm112 Complex)
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyuki Hori, Shyuhei Fukumoto, Takahiro Hasegawa, Mami Ototake, Shizuka Moriguchi, Miyu Namba, Ryota Yamagami, Takuya Kawamura, Akira Hirata
2. 発表標題 Enzymatic properties of Thermoplasma acidophilum Trm56, which has the longest C-terminal region in the SPOUT RNA methyltransferase superfamily
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuzuru Sugio, Ryota Yamagami, Hiroyuki Hori
2. 発表標題 Detection of 4-thiouridine-containing RNAs using chemiluminescence
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉尾 謙, 山上龍太, 堀 弘幸
2. 発表標題 化学発光を利用したs4U含有RNAの検出法の応用例
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

応用生物化学研究室 ホームページ
http://www.ach.ehime-u.ac.jp/bchem/
愛媛大学応用化学科応用生物化学研究室ホームページ
http://www.ach.ehime-u.ac.jp/bchem/

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
研究分担者	平田 章 (Hirata Akira) (60527381)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・准教授 (16101)	
研究分担者	横川 隆志 (Yokogawa Takashi) (90242304)	岐阜大学・工学部・教授 (13701)	

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