

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26702035

研究課題名(和文)希少RNA修飾はなぜ存在するのか？ヒトにおける役割から探る

研究課題名(英文)Biosynthesis and function of characteristic RNA modifications found in human

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) 17,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト/脊椎動物に特異的に存在するミトコンドリアtRNA-Metのウォブル位修飾5-ホルミルシチジン(f5C)の生合成について、f5Cはメチル化により5-メチルシチジン(m5C)を経てm5Cの酸化により生じる経路を示唆し、実際にメチル化酵素NSUN3とm5Cの酸化酵素ALKBH1を同定し、in vitroでのf5C形成に成功した。NSUN3とALKBH1の遺伝子ノックアウト(KO)細胞におけるミトコンドリア機能障害およびミトコンドリアタンパク質合成能の低下を明らかにした。f5C以外の修飾に関しても試験管内再構成や修飾遺伝子の同定を達成したが、修飾機能の理解のために、更なる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：We revealed the biogenesis and physiological function of 5-formylcytidine (f5C) modification specifically found in the wobble position of human/vertebrates mitochondrial tRNA-Met. A metabolic labeling analysis enables us to predict that f5C synthesis initiates methylation of C to 5-methylcytidine (m5C), and then oxidizes m5C to f5C. Actually, we successfully identified the methyltransferase NSUN3 and the oxygenase ALKBH1 and performed in vitro f5C reconstitution by using these enzymes. Knockout cells of each gene exhibited mitochondrial dysfunction and decreased mitochondrial translation in biochemical analyses. As for species-specific modifications other than f5C, in vitro reconstitution or modifying gene identification were achieved. To deeply understand the function of these modifications, further investigations will be required.

研究分野：分子生物学

キーワード：tRNA 修飾酵素 生合成 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

RNA分子の成熟においてRNA修飾は重要な過程である。修飾欠失および修飾遺伝子の変異が疾患と関連する例も複数知られるが、修飾遺伝子や機能が不明なものも未だ多い。

例としてヒトミトコンドリア(mt) tRNA^{Met}のウォブル位に存在する5-ホルミルシチジン(f^sC)はAUAコドンをもチオニンとして解読するために必須であることがin vitroの実験により見いだされている。しかしf^sCの生合成機構や細胞(生体)内での機能は明らかでない。

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)特異的な「希少修飾」に着目した。修飾遺伝子/酵素の同定や機能解析を進め、希少修飾ゆえの独特な役割の解明を試みる。

本研究では、主な対象としてヒト/脊椎動物に見いだされる生物種特異的なRNA修飾であるf^sC・5-タウリノメチルウリジン(tm^sU)・糖付加Q等について生合成経路および生理機能の解明を目指している。

3. 研究の方法

(1) 修飾構造基質の決定

培養細胞に安定同位体標識化合物を添加し、同位体元素が修飾構造に取り込まれたかを質量分析で評価することで修飾構造を構成する分子や代謝経路を決定する。

(2) 候補遺伝子の探索

構造の基質が判明すると、修飾酵素がどのような反応を触媒するか予測が可能となるため、候補となる遺伝子をCRISPR/Cas9によりノックアウト(KO)し、RNA修飾が消失するかを証明する。

(3) 組み換えタンパク質によるin vitro再構成
遺伝子が特定された場合、対象の遺伝子をクローニングし誘導発現系により組み換え体を取得し、想定された触媒活性があるかを検証する。

遺伝子の特定と合わせ、最終的に修飾酵素の同定と修飾形成反応の実体が判明する。

(4) 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

【f^sC】

(1) ¹³C標識されたアミノ酸を培地に添加し、培養細胞中のf^sCに同位体が入り込めるかを質量分析により評価したところ、メチオニンの¹³Cがf^sCのホルミル基炭素に導入されることを見出した。

(2) メチオニンは細胞内においてS-アデノシルメチオニン(SAM)を介してメチル基転移の

ドナーとなる。つまりf^sCは直接的なホルミル基転移によって形成されず、まず5-メチルシチジン(m^sC)にメチル化されてから酸化により生じるという生合成経路が考えられた。そこでミトコンドリア局在性の機能未知なメチル基転移酵素遺伝子群から候補NSUN3について遺伝子をKOし、ミトコンドリアtRNA^{Met}の修飾を調べたところ、f^sCが消失し、未修飾Cのままであったことを見出した。

同様に機能未知な酸化酵素遺伝子群から候補ALKBH1の遺伝子KOにより、f^sCが消失し、中間体m^sCが生じることを見出した。

(3) NSUN3とALKBH1の組み換え体で大腸菌系で大量発現精製し、in vitroの試験管内再構成を試みた。予想通りNSUN3はSAM依存的なメチル化活性を、またALKBH1はドメイン構造から推測されたFe²⁺/2-オキソグルタル酸(2OG)依存的な酸化活性を有していた。全体の反応はメチル化を起点とし、5-ヒドロキシメチルシチジン(hm^sC)を経由する、C m^sC hm^sC f^sCという段階的な形成であることを示すことができた。

ミトコンドリアDNA内mt tRNA^{Met}遺伝子への点変異が遺伝性ミトコンドリア病と関連することが知られている。そこで報告事例があるmt tRNA^{Met}の9種の変異体を作成し、f^sC再構成能を評価した。NSUN3はアンチコドンループの変異によりメチル化能が低下したが、ALKBH1の反応は変異による活性の変化は見られなかった。変異による疾患の発症にf^sC形成の特にメチル化段階の重要性が示唆された。

(4) NSUN3とALKBH1のKO細胞はミトコンドリアf^sCを失っていることから、KO細胞のミトコンドリア機能を評価した。まずどちらの細胞もO₂消費量の顕著な低下が認められ、また非発酵性の炭素源を使うガラクトース添加培地中での増殖能の低下が観察された。アンチコドン修飾欠損の直接的な影響としてタンパク質合成能の測定を³⁵Sパルスラベル実験で実施し、実際に各KO細胞でミトコンドリアタンパク質合成能が低下していることを示した。また呼吸鎖複合体Iサブユニットの定常状態量が低下した観察結果は複合体アセンブリの異常を示唆する。単離ミトコンドリアの呼吸鎖酵素複合体の粗分画物から酵素活性を測定し、複合体Iの活性が大幅に低下し、複合体IVの活性も中程度に低下していた。総じてミトコンドリア機能障害の表現型を見出した。

(5) その他: 先行研究によればALKBH1は核・細胞質での酸化反応を介した脱メチル化を行うとされる。一方、細胞質tRNA^{Leu}のウォブル位には2'-O-メチル-f^sC(f^sCm)およびhm^sCmの存在が知られていた。ALKBH1のKO細胞由来の細胞質tRNA^{Leu}を解析し、f^sCm/hm^sCmの消失とm^sCmの出現が見いだされ、またin vitro反応によりf^sCm/hm^sCmが形成された。細胞質におけるf^sC(m)はミトコンドリアf^sCと同様にデコーディング性能に

関わると推測されるが、更なる研究が必要である。

【 $\tau\text{m}^5\text{U}$ 】

(1) $\tau\text{m}^5\text{U}$ は f^{C} と並んでヒトミトコンドリアに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) $\tau\text{m}^5\text{U}$ の修飾遺伝子について、代表者らによる酵母ミトコンドリア研究との比較から、2種の酵素 GTPBP3 と MTO1 の関与が推測されていた。CRISPR/Cas9 により *GTPBP3* 遺伝子を KO した細胞では、実際に $\tau\text{m}^5\text{U}$ が消失していることを見出した。

(3) HEK293T 細胞で共過剰発現させた GTPBP3/MTO1 複合体を取得し、KO 細胞由来 $\tau\text{m}^5\text{U}$ 欠損 tRNA とタウリンとテトラヒドロ葉酸を基質に各種補因子を加え再構成反応を実施したところ、5%以下の低効率だったが $\tau\text{m}^5\text{U}$ の形成が確かめられた。

(4) f^{C} の解析のケースと同様の解析を行い、*GTPBP3* の KO 細胞でミトコンドリア機能障害の表現型を見出した。

【糖付加 Q】

(1) 糖付加キューオシン(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。基質は付加する単糖に応じた糖ヌクレオチドである。

(2) 糖転移酵素として知られるタンパク質は多数あるため本当に修飾酵素がいるのか、いたとしても予測が困難である。細胞ライセートのカラム分画物から触媒活性を追跡することで酵素の特定に成功した。酵素の遺伝子を KO することで糖付加 Q が消失することが判明した。

(3) 組み替え体を取得し、糖付加反応活性を持つことを確認した。カイネティクス測定により、基質 tRNA に対する K_m が 10^{-7} オーダーの値として得られた。基質 tRNA に Q が形成されると速やかに糖付加が起こることが示唆される。

(4) これまで KO 細胞の表現型に目立ったものは見いだされていない。今後の研究により糖付加 Q の機能的意義を明らかにする必要がある。

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 12 件)

- Asano, K.¹, Suzuki, T.^{1,*}, Saito, A., Wei, F. Y., Ikeuchi, Y., Numata, T., Tanaka, R., Yamane, Y., Yamamoto, T., Goto, T., Kishita, Y., Murayama, K., Ohtake, A., Okazaki, Y., Tomizawa, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T.* (2018) Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease. *Nucleic Acids Res.* 46, 1565-83 doi: 10.1093/nar/gky068 [**equal contribution**] [***equal corresponding**] [**NAR**

breakthrough article in 2018]

- Fakruddin, Md, Wei, F. Y., Suzuki, T., Asano, K., Kaieda, T., Omori, A., Izumi, R., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Miyata, K., Araki, K., Oike, Y., Scorrano, L., Suzuki, T., Tomizawa, K. (2018) Defective Mitochondrial tRNA Taurine Modification Activates Global Proteostress and Leads to Mitochondrial Disease. *Cell Rep.* 22, 482-96, doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.051
- Kawarada, L., Suzuki, T., Ohira, T., Hirata, S., Miyauchi, K., Suzuki, T. (2017) ALKBH1 is an RNA dioxygenase responsible for cytoplasmic and mitochondrial tRNA modifications. *Nucleic Acids Res.* 45, 7401-15, doi: 10.1093/nar/gkx354
- Kang, B. I., Miyauchi, K., Matuszewski, M., D'Almeida, G. S., Rubio, M. A., Alfonzo, J. D., Inoue, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Sochacka, E., Suzuki, T. (2017) Identification of 2-methylthio cyclic N^6 -threonylcarbamoyladenine ($\text{ms}^2\text{ct}^6\text{A}$) as a novel RNA modification at position 37 of tRNAs. *Nucleic Acids Res.* 45, 2124-36, doi: 10.1093/nar/gkw1120
- Wu, Y., Wei, F. Y., Kawarada, L., Suzuki, T., Araki, K., Komohara, Y., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Takeya, M., Oike, Y., Suzuki, T., Tomizawa, K. (2016) Mtu1-mediated thiouridine formation of mitochondrial tRNAs is required for mitochondrial translation and is involved in reversible infantile liver injury. *PLoS genetics*, 12, e1006355. doi: 10.1371/journal.pgen.1006355
- Nakano, S.¹, Suzuki, T.¹, Kawarada, L., Iwata, H., Asano, K., Suzuki, T. (2016) NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNA^{Met}. *Nat. Chem. Biol.* 12, 546-51 doi: 10.1038/nchembio.2099 [**equal contribution**]
- Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T. (2015) A single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E4707-16. doi: 10.1073/pnas.1506749112
- Wei, F. Y., 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., Tomizawa, K. (2015) Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs precise protein translation and contributes to myopathy in mice and humans. *Cell Metab.* 21, 428-42 doi: 10.1016/j.cmet.2015.01.019
- Ito, S., Horikawa, S., Suzuki, T., Kawauchi, H., Tanaka, Y., Suzuki, T., Suzuki, T. (2014) Human NAT10 is an ATP-dependent RNA acetyltransferase responsible for

- N^4 -acetylcytidine formation in 18 S ribosomal RNA (rRNA). *J. Biol. Chem.* 289, 35724-30 doi: 10.1074/jbc.C114.602698
10. 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., Akiyama, T. (2014) 5hmC plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex. *Cell Reports* 9, 48-60 doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.071
 11. Ito, S., Akamatsu, Y., Noma, A., Kimura, S., Miyauchi, K., Ikeuchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T. (2014) A single acetylation of 18S rRNA is essential for biogenesis of the small ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 289, 26201-12 doi: 10.1074/jbc.M114.593996 [Best paper published by the JBC in 2014]
 12. Suzuki, T. and Suzuki, T. (2014) A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nucleic Acids Res.* 42, 7346-57 doi: 10.1093/nar/gku390
- [学会発表](計 31件)
1. Kawarada, L., Suzuki, T. and Suzuki, T. "ALKBH1 mediates 5-formylcytidine biogenesis in mammalian tRNAs" ConBio2017 (Dec 2017 Hyogo, Japan)
 2. Takeo Suzuki, Layla Kawarada, Saori Nakano, Takayuki Ohira, Hiroyoshi Iwata, Kana Asano, Shoji Hirata, Kenjyo Miyauchi, Tsutomu Suzuki "Biogenesis and physiological role of 5-formylcytidine in mammalian mitochondrial tRNA^{Met}" 19th RNA meeting (June 2017 Toyama, Japan)
 3. Ohira, T., Chen, M., Kurihashi, T., Yamauchi, R., Ito, S., Kaneko, A., Orita, I., Fukui, T., Suzuki, T., Yao, M., Tanaka, Y., Suzuki, T. "Thermophilic archaeal tRNAs are stabilized by N^4 -acetylcytidine modification" 19th RNA meeting (June 2017 Toyama, Japan)
 4. 北川 翔、中野 沙緒里、中川 真一、荒木 喜美、荒木 正健、鈴木 健夫、鈴木 勉 「哺乳類ミトコンドリア tRNA に存在する 5-メチルシチジンの機能解析」"Functional analysis of 5-methylcytidine in mammalian mitochondrial tRNA" 第17回東京大学生命科学シンポジウム BioUT(2017年4月東京)
 5. 穠近 慎一郎、松木 美知枝、鈴木 健夫、Ho Kiong、鈴木 勉 「RNA-MSを用いたトリパノソマ mRNA および SL RNA における転写後修飾の解析」"Mass spectrometric characterization of post-transcriptional modifications in mRNAs and spliced-leader RNA from *Trypanosoma brucei*" 第 17 回東京大学生命科学シンポジウム BioUT(2017年4月東京) [優秀賞受賞]
 6. 川原田 礼以良、鈴木 健夫、大平 高之、平田 翔児、宮内 健常、鈴木 勉 「ALKBH1 はミトコンドリアおよび細胞質 tRNA 修飾のジオキシゲナーゼとしてはたらく」 第17回東京大学生命科学シンポジウム BioUT(2017年4月東京)
 7. Takeo Suzuki "Functional analysis of mitochondrial RNA modifications" Molecular Mitochondria - Joint Seminar of Young Finnish-Japanese Mitoscientists (Oct 2016 Helsinki, Finland) [二国間交流事業共同研究・セミナー]
 8. 鈴木 健夫 「希少な RNA 修飾について知る」 平成 28 年度 化学生命工学談話会 (2016年7月東京都文京区) [招待講演]
 9. Saori Nakano, Takeo Suzuki, Layla Kawarada, Hiroyoshi Iwata, Kana Asano, Tsutomu Suzuki "NSUN3 initiates formation of 5-formylcytidine, a post-transcriptional modification in human mitochondrial tRNA^{Met} required to decipher non-universal genetic code" RNA2016 (June 2016 Kyoto, Japan)
 10. Takeo Suzuki, Yuka Yashiro, Kana Asano, Huan Lin, Yohei Kirino, Yuriko Sakaguchi, Tsutomu Suzuki "A complete landscape of post-transcriptional modifications in human mitochondrial tRNAs" RNA2016 (June 2016 Kyoto, Japan)
 11. Ishigami, Y., Ohira, T., Akichika, S., Suzuki, T., Suzuki, T. "Biogenesis and function of N^6 -methyladenosine in U snRNAs" RNA2016 (June 2016 Kyoto, Japan)
 12. 鈴木 健夫 「遺伝子発現調節の隠れた管理者: RNA 修飾を(とことん)理解する」 平成 27 年度 応用化学科セミナー(2016年1月愛媛県松山市) [招待講演]
 13. 石神 宥真、大平 高之、穠近 慎一郎、鈴木 健夫、鈴木 勉 「U snRNA における N^6 -メチルアデノシン修飾の生合成と機能解析」 BMB2015 (2015年12月兵庫県神戸市)
 14. Xuewei Zhao, Takeo Suzuki, Tsutomu Suzuki "Exploration and functional analysis of queuosine- glycosyltransferases in mammals" 17th RNA meeting (July 2015 Hokkaido, Japan) [青葉賞受賞]
 15. Kana Asano, Takeo Suzuki, Fan-Yan Wei, Yoshiho Ikeuchi, Yuka Yashiro, Christin Tischner, Annette Hofer, Yoshihito Kishita, Yasushi Okazaki, Tina Wenz, Kazuhito Tomizawa, Tsutomu Suzuki "Biogenesis of 5-taurinomethyluridine in human mitochondrial tRNAs; implication for molecular pathogenesis of mitochondrial diseases" 17th RNA meeting (June 2015 Hokkaido, Japan) [優秀賞受賞]
 16. 鈴木 健夫、浅野 奏、魏 范研、富澤 一仁、池内 与志穂、鈴木 勉 「ミトコンドリア tRNA

タウリン修飾の生合成と機能」
J-MIT2014 (2014年12月 福岡市)

17. 中野 紗緒里、鈴木 健夫、荒木 喜美、荒木 正健、鈴木 勉「哺乳類ミトコンドリアにおける tRNA48 位の 5-メチルシチジン修飾酵素の同定」 J-MIT2014 (2014年12月 福岡市)
18. Takeo Suzuki and Tsutomu Suzuki “A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs” The 25th tRNA conference (Sep 2014 Kyllini, Greece)
19. Kana Asano, Takeo Suzuki, Fan-Yan Wei, Kazuhito Tomizawa, Yoshiho Ikeuchi, Tsutomu Suzuki "Biosynthetic mechanism of 5-taurinomethyluridine involved in mitochondrial disease" RNA フロンティア ミーティング 2014(2014年9月 和歌山)
20. Takeo Suzuki, Kana Asano, Fan-Yan Wei, Kazuhito Tomizawa, Tsutomu Suzuki “Mitochondrial disease as the first instance of RNA modopathy” 16th RNA meeting (July 2014 Aichi, Japan) **[Invited]**
21. Shoji Hirata, Takeshi Chujo, Takeo Suzuki, Kenryo Miyachi, Yuichi Goto, Tsutomu Suzuki “Analysis of the functional role of FTSJ1 related to non-syndromic X-linked intellectual disability” 16th RNA meeting (July 2014 Aichi, Japan) **[優秀賞受賞]**

(共同研究の共著者での発表：10件)

〔図書〕(計 2件)

1. 鈴木 健夫、中野 紗緒里、川原田 礼以良、鈴木 勉 (2016年) 「ヒトのミトコンドリアにおいて変則的な遺伝暗号の解読をつかさどる 5-ホルミルシチジン修飾は NSUN3 によるメチル化からはじまる」
ライフサイエンス 新着論文レビュー doi: 10.7875/first.author.2016.053
2. 鈴木 勉、浅野 奏、鈴木 健夫 (2015年) 「RNA の修飾欠損と疾患」 ファルマシア 51(1), pp.32-36

〔その他〕

プレスリリース

UTokyo Research (2016/06/28 掲載)

「変則的な暗号を解読するためのはじめの
一歩 ミトコンドリアゲノムの解読に必須な
メチル化酵素を同定」

<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/first-step-to-deciphering-a-non-universal-genetic-code.html>

6. 研究組織

(1)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