

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05430

研究課題名(和文) tRNAの可逆修飾cyclic t6Aを介する代謝や環境に応じた翻訳制御機構

研究課題名(英文) Regulation of protein synthesis via reversible tRNA modification, cyclic t6A

研究代表者

宮内 健常 (Miyuchi, Kenjyo)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任研究員

研究者番号：50771292

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)：本研究では、ct6A修飾酵素TcdAの反応機構の解析を質量分析や放射性同位体を用いて行い、CsdA、CsdEによりシステインから引き抜かれた硫黄がt6A側鎖に転移してチオカルボキシ体st6Aが生成されること、st6Aは化学的に不安定で自発的にct6Aが生成すること、st6Aは細胞内にも存在する新規修飾であることがわかった。これらの結果から従来のct6A生合成モデルは大きく修正された。TcdAとtRNAの共結晶構造の取得に成功し、反応に重要な残基を特定できた。安定同位体ラベルを用いた実験により細胞内でct6Aの加水分解が実際に起こっており、ct6A修飾は真に可逆的であることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新規修飾st6Aを発見できた。st6Aはチオカルボキシル基を持った初めてのRNA修飾であり、化学的に非常に不安定である。このような不安定なRNA修飾やタンパク修飾は他にも存在するが見過されている可能性がある。不安定な修飾は真に可逆的であると考えられ、修飾率の変動による制御機構が想定される。また、E1様酵素による硫黄転移反応はいくつか知られるが反応機構には未知の部分が多く、本研究はその一部を埋めるものとなる。本研究遂行のため、質量分析を用いた可逆サイクル測定法や、異なる修飾塩基間の検出感度補正法などを考案した。これらの手法は様々な場面で応用可能である。

研究成果の概要(英文)：In this study, the reaction mechanism of the ct6A-modifying enzyme TcdA was analyzed using mass spectrometry and radioisotopes. It was found that the sulfur atom withdrawn from cysteine by CsdA and CsdE is transferred to the t6A side chain to produce the thiocarboxylic form st6A. st6A is chemically unstable and spontaneously produces ct6A. We found that st6A is a novel modification that is also present in the cells. These findings significantly modify the previous ct6A biosynthesis model. The co-crystal structure of TcdA and tRNA allowed us to identify the residues important for the reaction. Stable isotope labeling experiments proved that the hydrolysis of ct6A actually occurs in the cell, indicating that the ct6A modification is truly reversible.

研究分野：分子生物学

キーワード：ct6A tRNA RNA修飾 可逆修飾 硫黄転移 E1様酵素

1. 研究開始当初の背景

tRNA 修飾は tRNA のタンパク質合成における機能や tRNA の立体構造の安定性を高め、補助する役割があり、各修飾の欠損や修飾率の低下はタンパク質合成の正確さや効率の低下を引き起こす。正常な細胞でも培養条件等により修飾率に変動が見られることがあるが、tRNA の各部位における修飾率の変動とその影響についてはわかっていないことが多い。

tRNA の 37 位に導入される t⁶A 修飾はタンパク質合成を正しく行うために最も重要な修飾の 1 つである。我々は大腸菌、酵母、植物などでは t⁶A が修飾酵素 TcdA により脱水環化され、cyclic t⁶A (ct⁶A) に変換されることを見出した。ct⁶A はヒダントイン環を形成しており(図 1)、ヒダントイン環とアデニン環は静電的反発によりねじれ、平面構造をとらないことが判明した。t⁶A はアデニン環から延長された平面構造によりスタッキングが強化され、コドン-アンチコドン相互作用を安定化することが知られるが、ct⁶A ではこのスタッキングが不可能となり、t⁶A が持っていた安定化効果を失うと考えられる(図 2)。しかし、ct⁶A は t⁶A と比べ Lys コドンの認識が向上する結果が得られており、未知のコドン認識向上機構の存在が示唆される。

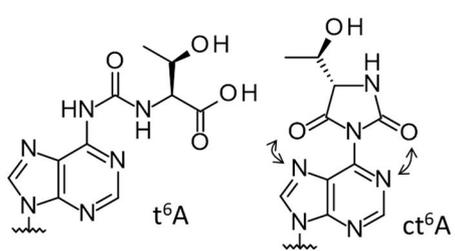


図 1. t⁶A, ct⁶A の化学構造

矢印で ct⁶A のヒダントイン環とアデニン環の静電的反発を示した

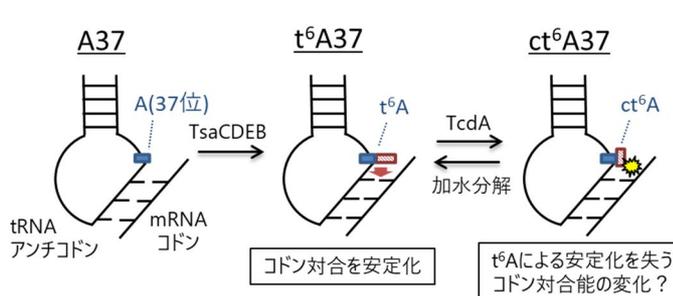


図 2. t⁶A, ct⁶A のコドン認識能への影響

ct⁶A 修飾の特徴は化学的な不安定さに起因する可逆性と、生合成における硫黄代謝とのリンクである。ct⁶A のヒダントイン環は反応性が高く、pH 7.0-8.0 程度でも徐々に加水分解され t⁶A に戻るため、細胞内でも脱水環化と加水分解のサイクルが起きていると考えられる。また、ct⁶A は生合成の過程で、システイン脱硫酵素 CsdA とその補助因子 CsdE による硫黄転移が必要であること、TcdA が t⁶A の側鎖をアデニル化することがわかっているが、その先の環化機構や硫黄の転移先は未解明であった。

2. 研究の目的

ct⁶A は自発的な脱修飾が常時起こる唯一の例であり、ct⁶A の生合成には硫黄転移系が必要であるという点も特異である。こういった特殊性から栄養源や増殖フェーズなど、代謝状態の変動が修飾酵素の量や硫黄の代謝状態などを介し ct⁶A 修飾率の変動を引き起こす可能性が考えられる。本研究ではまず ct⁶A 生合成機構の詳細、特に硫黄の関与について解明を目指した。さらに、細胞が栄養や代謝の状態を感知し、ct⁶A 修飾の率を変動させることで各遺伝子の翻訳効率を調節するという可逆 RNA 修飾を介した新たな遺伝子発現制御機構を想定し、ct⁶A 修飾が変動する条件を探索する。また、ct⁶A 修飾が各遺伝子の翻訳効率をどのように変化させているかを明らかにする。

修飾の定量には RNA 質量分析法(RNA-MS)を用いる。MS を用いた定量には、分子によって検出感度が異なるなどいくつかの課題があるが、簡便に感度を平準化する方法を確立する。また、安定同位体を用いて培養した大腸菌の RNA を MS 測定することで ct⁶A の可

逆サイクル数を算出する方法を開発する。

3. 研究の方法

硫黄転移が ct⁶A 生合成を制御する分子機構の解明

硫黄がどの部位にどのような形態で転移するか、³⁵S によるラベリングや MS 解析などで明らかにする。硫黄の転移先は酵素ではなく tRNA そのものであることが示唆されたため、その化学構造を LC/MS により同定する。詳細な分子機構を解明するため、TcdA と tRNA の共結晶構造の決定を産総研との共同研究として実施する。

LC/MS を用いた ct⁶A 修飾率の定量法の確立

ct⁶A の修飾率は RNA 試料を各種ヌクレアーゼで分解し、LC/MS により検出、定量する。安定同位体ラベルされた修飾塩基を内部標準として用意することは難しいため、ct⁶A と t⁶A のイオン化効率の違いを簡便に補正する方法を考案し、方法として確立する。

栄養源、ストレスによる ct⁶A 修飾率の変動

大腸菌や酵母を様々な炭素源やアミノ酸成分、硫黄源等で培養し、ct⁶A 修飾率の変動を測定する。増殖フェーズによる変動も調べる。生合成に硫黄を用いることから酸化ストレスに対する応答への関与も予想される。各種ストレス環境下で ct⁶A 率を測定する。

4. 研究成果

MS 解析により、硫黄は t⁶A のカルボキシル基に転移し、チオカルボキシ体を形成することがわかり、これを st⁶A と名付けた。st⁶A は非常に不安定であり、通常の手法で RNA を精製すると完全に消えてしまう。大腸菌から注意深く RNA を抽出すると、st⁶A が検出できた。st⁶A は放置しておくだけで ct⁶A や t⁶A に自発的に変換された。よって、TcdA の真の生成物は ct⁶A ではなく st⁶A であり、その後一部が自発的に ct⁶A へと変換される可能性が高くなった。他のいくつかの E1-like 酵素ではチオカルボキシル基を生成する活性が知られており、TcdA も同じ反応であることが示唆される。細胞内では主に st⁶A と ct⁶A の混合物になっていると考えられ、その割合が変化していることも伺えた。しかし、st⁶A は試料調製の過程で変化してしまうため細胞内 st⁶A 量の定量は難しく、今後の課題となる。

共同研究により TcdA と *tcdA* 株から単離した tRNA^{Leu} の共結晶構造を取得した。生化学的なアッセイを行い、重要なアミノ酸残基を特定できた。2 つの Cys 残基が CsdA, E からの硫黄転移を扱うために重要だと判明した。これらは共結晶構造では disorder 領域にあり、反応中に大きく構造が変化する部位であることが示唆された。

検量曲線を作成し、そのパラメーターを非線形回帰で推定することで、簡易的に ct⁶A, st⁶A, t⁶A の検出感度を補正する方法を確立した。また、¹⁸O ラベル Thr を用いて、ct⁶A 化のサイクル数の計測に成功した。細胞内の t⁶A は 2 回程度 TcdA の反応を受けていることがわかり、実際に細胞内で可逆反応が起こっている証拠が得られた。

炭素源によって定常期の ct⁶A 量が変化することがわかった。酸化ストレスや浸透圧ストレスによる変動は見られなかった。

以上、ct⁶A の反応機構の詳細がかなりの部分明らかとなり、真の生成物が新規修飾 st⁶A であることを発見できた。この内容は論文発表に向けて準備中である。st⁶A の果たす役割や、ct⁶A との量比の変動、ct⁶A と st⁶A それぞれの翻訳への影響などが今後の課題となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shigi Naoki, Horitani Masaki, Miyauchi Kenjyo, Suzuki Tsutomu, Kuroki Misao	4. 巻 26
2. 論文標題 An ancient type of MnmA protein is an iron-sulfur cluster-dependent sulfurtransferase for tRNA anticodons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 240 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.072066.119	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 Takakura Mayuko, Ishiguro Kensuke, Akichika Shinichiro, Miyauchi Kenjyo, Suzuki Tsutomu	4. 巻 10
2. 論文標題 Biogenesis and functions of aminocarboxypropyluridine in tRNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13525-3	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 Lin Huan, Miyauchi Kenjyo, Harada Tai, Okita Ryo, Takeshita Eri, Komaki Hirofumi, Fujioka Kaoru, Yagasaki Hideki, Goto Yu-ichi, Yanaka Kaori, Nakagawa Shinichi, Sakaguchi Yuriko, Suzuki Tsutomu	4. 巻 9
2. 論文標題 CO2-sensitive tRNA modification associated with human mitochondrial disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-04250-4	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 Taniguchi Takaaki, Miyauchi Kenjyo, Sakaguchi Yuriko, Yamashita Seisuke, Soma Akiko, Tomita Kozo, Suzuki Tsutomu	4. 巻 14
2. 論文標題 Acetate-dependent tRNA acetylation required for decoding fidelity in protein synthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1010 ~ 1020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-018-0119-z	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 Nagayoshi Y., Chujo T., Hirata S., Nakatsuka H., Chen C.-W., Takakura M., Miyauchi K., Ikeuchi Y., Carlyle B. C., Kitchen R. R., Suzuki T., Katsuoka F., Yamamoto M., Goto Y., Tanaka M., Natsume K., Nairn A. C., Suzuki T., Tomizawa K., Wei F.-Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Loss of Ftsj1 perturbs codon-specific translation efficiency in the brain and is associated with X-linked intellectual disability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabf3072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abf3072	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 Rossello-Tortella Margalida, Llinas-Arias Pere, Sakaguchi Yuriko, Miyauchi Kenjyo, Davalos Veronica, Setien Fernando, Calleja-Cervantes Maria E., Pineyro David, Martinez-Gomez Jesus, Guil Sonia, Joshi Ricky, Villanueva Alberto, Suzuki Tsutomu, Esteller Manel	4. 巻 117
2. 論文標題 Epigenetic loss of the transfer RNA-modifying enzyme TYW2 induces ribosome frameshifts in colon cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 20785 ~ 20793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2003358117	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Asuteka Nagao, Yutaro Yamaguchi, Yui Nakanishi, Kenjyo Miyauchi, Yuriko Sakaguchi, Tsutomu Suzuki
2. 発表標題 Comprehensive analysis and profiling of peptidyl-tRNAs dissociated from the ribosome by mass spectrometry
3. 学会等名 RIBOSOME 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayuko Takakura, Kensuke Ishiguro, Shinichiro Akichika, Kenjyo Miyauchi, Tsutomu Suzuki
2. 発表標題 Biogenesis and functions of aminocarboxypropyluridine in tRNA
3. 学会等名 第21回 日本RNA 学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野澤 颯志、大平 高之、宮内 健常、陳 明皓、折田 和泉、福居 俊昭、姚 閔、田中 良和、鈴木 勉
2. 発表標題 超好熱性アーキアにおけるRNA アセチル化修飾の生物学的機能の探求
3. 学会等名 第21回 日本RNA 学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮内 健常、坂下 卓矢、沼田 倫征、鈴木 勉
2. 発表標題 硫黄転移が関与するCyclic N6-threonylcarbamoyladenine (ct6A)生合成機構の解明
3. 学会等名 第21回 日本RNA 学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋 直樹, 堀谷正樹, 宮内健常, 鈴木勉, 姫野(黒木)美沙緒
2. 発表標題 新規な酸素感受性tRNA硫黄化酵素の機能解析
3. 学会等名 極限環境生物学会2019年度(第20回)年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮内健常、沖田峻、長尾翌手可、坂口裕理子、鈴木勉
2. 発表標題 ヒト細胞質tRNA の網羅的単離精製と転写後修飾の解析
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 大平高之、杉山啓1、山下征輔、袁輪恵一、宮内健常、坂口 裕理子、富田耕造、鈴木勉
2. 発表標題 超好熱性アーキアtRNAに見出された新規リン酸化修飾の機能
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 高倉 眞優子、石黒 健介、穠近 慎一郎、宮内 健常、鈴木 勉
2. 発表標題 tRNAにおける acp3U修飾の生合成と機能解明
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〕

-

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