

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655153

研究課題名（和文） 新規 DNA 修飾の探索とエピジェネティックスのパラダイムシフト

研究課題名（英文） Exploring novel DNA modification toward paradigm shift of epigenetics

研究代表者

鈴木 勉 (SUZUKI TSUTOMU)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：20292782

研究成果の概要（和文）：DNA のメチル化やヒストン修飾に代表されるクロマチンの構造変化は、エピジェネティックスに遺伝子発現を調節し、発生や分化、疾患などの高次生命現象と密接に関わっている。本研究において我々は、高感度な質量分析法を駆使することでヒトおよびマウスのゲノム中からいくつかの新規 DNA 修飾体を見出した。そのうちの一つについて、化学構造を決定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Alteration of chromatin structure caused by DNA methylation and histone modifications is closely associated with higher-ordered biological processes including development, differentiation and diseases by regulating gene expression epigenetically. In this study, we employed a high-sensitive analytical method using mass spectrometry to identify some novel DNA modified bases in mammalian genomes. The chemical structure of one of them was determined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：核酸・蛋白質・糖化学

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化やヒストン修飾に代表されるクロマチンの構造変化は、エピジェネティックスに遺伝子発現を調節し、発生や分化、疾患などの高次生命現象と密接に関わっている。癌に代表される疾患でエピゲノム情報が大きく変動することが知られており、診断や創薬のターゲットとしても注目されている。哺乳動物における DNA 修飾は、主に CpG 配列中の 5-メチルシトシン (m^5C) のみが知られてきたが、近年、5-ヒドロキシメチルシトシン (hm^5C)、5-ホルミルシトシン (f^5C)、5-カルボキシシトシン (ca^5C) などが発見され、他にも未知の DNA 修飾が存在する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、高感度な質量分析法を駆使することでヒトおよびマウスのゲノム中から新規な DNA 修飾を探索し、構造を決定することで、エピジェネティックスのパラダイムシフトを目指す。

3. 研究の方法

私たちは、高感度質量分析法を用い、細胞内に存在する微量な RNA 分子を直接解析する手法 (RNA マススペクトロメトリー, RNA-MS) を確立している。RNA-MS を用いることで、サブフェムトモルオーダーでの超高感度な RNA の測定に成功している。実際に、新規 RNA 修飾の発見と修飾遺伝子の同定、RNA 修飾異常

に起因する疾患の研究、マイクロ RNA の直接解析などで多くの成果が挙げられている。本研究では RNA-MS を DNA の分析に適応することで、新規修飾の発見と同定を目指す。

まずはじめに、マウス臓器およびヒト培養細胞からゲノム DNA を抽出し、デオキシヌクレオシドまで完全消化したものを LC/MS 解析により分析する。ゲノムを調製する過程で生じる酸化やアルキル化などによる傷害が生じる可能性があるため DNA 調製には細心の注意を払う。実際に、マウス臓器由来のゲノムから、既知の DNA 修飾である m⁵C と hm⁵C に加え、6 種類の未同定修飾体を見出した。これらは既知の傷害塩基の分子量とも合致しないことから、新規 DNA 修飾候補であると考えた。これらの化学構造を決定するために、精密質量の測定、重水素置換、衝突活性化分解離 (CID) などの解析を行い、候補となる化学構造を割り出す。候補化合物は実際に有機合成を行い、LC/MS による coinjection 解析や CID の解裂パターンなどから化学構造を推定する。

4. 研究成果

マウス臓器から見出された新規 DNA 修飾体の一つ (C*) について、精密質量の測定から元素組成の決定や衝突活性化分解離法による化学構造の解析を行い、候補となる修飾構造を推定した。実際に、有機化学的に合成した標品と比較することにより、化学構造を決定することに成功した。今後は、この新規 DNA 修飾に対する抗体を作成し、免疫沈降したゲノム断片の Deep seq 解析により、ゲノム上の修飾部位を解析する予定である。

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 18 件)

①Miyachi, K., Kimura, S. and Suzuki, T.*

A cyclic form of N6-threonylcarbamoyladenine as a widely distributed tRNA hypermodification
Nature Chem Biol., 9, 105-111 (2013)

②aniguchi, T., Miyachi, K., Nakane, D., Miyata, M., Muto, A., Nishimura, S. and Suzuki, T.*

Decoding system for the AUA codon by tRNA^{Ile} with the UAU anticodon in *Mycoplasma mobile*
Nucleic Acids Res., 41, 2621-2631 (2013)

③Ohira, T., Suzuki, T., Miyachi, K., Suzuki, T.*,

Yokobori, S., Yamagishi, A. and Watanabe, K.*
Decoding mechanism of non-universal genetic codes in *Loligo bleekeri* mitochondria
J. Biol. Chem., 288, 7645-7652 (2013)

④Kita, S., Tanaka, Y., Hirano, N., Kimura, S., Suzuki, T., Suzuki, T., Yao, M. and Tanaka, I.
Crystal structure of a putative methyltransferase SAV1081 from *Staphylococcus aureus*
Protein & Peptide Letters, 20, 530-537 (2013)

⑤Chujo, T. and Suzuki, T.*

Trmt61B is a methyltransferase responsible for 1-methyladenosine at position 58 of human mitochondrial tRNAs
RNA, 22, 2269-2276 (2012)

⑥Rodriguez, V., Vasudevan, S., Noma, A., Carlson, B.A., Green, J.E., Suzuki, T. and Chandrasekharappa, SC.

Structure-function analysis of human TYW2 enzyme required for the biosynthesis of a highly modified wybutosine (yW) base in phenylalanine-tRNA
PLoS ONE, 7(6):e39297 (2012)

⑦Chujo, T., Ohira, T., Sakaguchi, Y., Goshima, N., Nomura, N., Nagao, A. and Suzuki, T.*

LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria.
Nucleic Acids Res., 40, 8033-8047 (2012)

⑧Higa-Nakamine, S., Suzuki, T., Uechi, T., Chakraborty, A., Nakajima, Y., Nakamura, M., Hirano, N., Suzuki, T. and Kenmochi, N.

Loss of snoRNA impairs ribosomal RNA modification and causes developmental defects in zebrafish
Nucleic Acids Res., 40, 391-398 (2012)

⑨Kimura, S., Ikeuchi, Y., Kitahara, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T. and Suzuki, T.*

Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity
Nucleic Acids Res., 40, 4071-4085 (2012)

⑩Yu, F., Tanaka, Y., Yamashita, K., Suzuki, T., Nakamura, A., Hirano, N., Suzuki, T., Yao, M. and Tanaka, I.

Molecular basis of dihydrouridine formation on tRNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 108, 19593-19598 (2011)

⑪Osawa, T., Inanaga, H., Kimura, S., Terasaka, N., Suzuki, T. and Numata, T.

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an archaeal tRNA modification

enzyme TiaS complexed with tRNA^{Ala}2 and ATP
Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun. 67, 1414-1416 (2011)

⑫Osawa, T., Kimura, S., Terasaka, N., Inanaga, H., Suzuki, T. and Numata, T.
Structural basis of tRNA agmatinylation essential for AUA codon decoding
Nature Struct Mol Biol., 18, 1275-1280 (2011)

⑬Terasaka, N., Kimura, S., Osawa, T., Numata, T. and Suzuki, T.*
Biogenesis of 2-agmatinylcytidine catalyzed by the dual protein and RNA kinase TiaS
Nature Struct Mol Biol., 18, 1268-1274 (2011)

⑭Suzuki, T., Miyauchi, K., Suzuki, T.*, Yokobori, S., Shigi, N., Kondow, A., Takeuchi, N., Yamagishi, A. and Watanabe, K.*
Taurine-containing uridine modifications in tRNA anticodons are required to decipher non-universal genetic codes in ascidian mitochondria
J. Biol. Chem., 286, 35494-35498 (2011)

⑮Suzuki, T.*, Nagao, A. and Suzuki, T.
Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects and diseases
Annu Rev Genet., 45, 299-329 (2011)

⑯Wei, F., Suzuki, T., Watanabe, S., Kimura, S., Kaistuka, T., Fujimura, A., Matsui, H., Atta, M., Fontecave, M., Yamagata, K., Suzuki, T. and Tomizawa, K.
Deficit of Lys-tRNA Modification by Cdkal1 Causes the Development of Type 2 Diabetes in Mice
J. Clin. Invest., 121, 3598-608 (2011)

⑰Ohira, T. and Suzuki, T.*
Retrograde nuclear import of tRNA precursors is required for modified base biogenesis in yeast
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 108, 10502-10507 (2011)

⑱Noma, A., Yi, S., Katoh, T., Takai, Y., Suzuki, T. and Suzuki, T.*
Actin-binding protein ABP140 is a methyltransferase responsible for 3-methylcytidine at position 32 of tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*
RNA, 17, 1111-1119 (2011)

〔学会発表〕 (計 15 件)

①2013 年 3 月 22 日 日本化学会第 93 春季年会(滋賀)RNA エピジェネティクスと生命現象

②2013 年 3 月 13 日 武田薬品湘南研究所セミナー(藤沢)RNA 修飾の多彩な機能と生命現象

③2012 年 12 月 13 日 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡) Molecular pathogenesis of human diseases associated with RNA modification disorder

④2012 年 12 月 4 日 XXIV tRNA Conference (Olmue, Chile) A cyclic form of N⁶-threonylcarbamoyladenine as a widely distributed tRNA hypermodification

⑤2012 年 10 月 15 日 Invited Seminar in Beijing Institute of Genetics (北京) Discovery and functional analysis of novel RNA modifications

⑥2012 年 10 月 10 日 Cold Spring Harbor Asia Conference RNA biology (中国、蘇州) The cyclic form of N⁶-threonylcarbamoyladenine (ct⁶A) as a bona fide hyper-modification of tRNAs in bacteria, lower eukaryotes and plants

⑦2012 年 10 月 5 日 酵素工学研究会第 68 回講演会 (東京) RNA とタンパク質をリン酸化する酵素の発見—RNA 修飾の生合成と遺伝暗号の解読機構—

⑧2012 年 9 月 2 日 FEBS International Workshop: New Developments in RNA Biology (ポルトガル、タビラ) The cyclic form of N⁶-threonylcarbamoyladenine (ct⁶A) as a bona fide hyper-modification of tRNAs in bacteria, lower eukaryotes and plants

⑨2011 年 12 月 13 日 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜) RNA modifications as naturally-selected chemical diversity involved in various biological processes

⑩2011 年 11 月 29 日 第 223 回川崎医学会講演会 (倉敷) ミトコンドリア脳筋症と tRNA のタウリン修飾欠損

⑪2011 年 11 月 24 日 宮崎大学医学部講演会(宮崎) RNA 修飾の多彩な機能と生命現象

⑫2011 年 11 月 11 日 ISNAC2011 第 38 回国際核酸化学シンポジウム (札幌) Biogenesis and function of 2-agmatinylcytidine found at the wobble position of archaeal tRNA^{Ile}

⑬2011 年 10 月 6 日 ヒューマンサイエンス財団セミナー (東京) RNA マススペクトロメトリー

⑭2011 年 9 月 11 日 生体機能関連化学部会「若

手フォーラム」(つくば) RNA 修飾の生合成から
細胞内の化学反応を学ぶ

⑮2011 年 7 月 11 日 バイオロジカルマスペクト
ロメトリー2011 (箱根) マイクロ RNA と核酸医薬
のマスペクトロメトリー

〔その他〕

ホームページ等

タンパク質合成に必須な tRNA の修飾構造を解
明 -40 年前に決定された化学構造は分解物で
あった-

<http://www.t.u-tokyo.ac.jp/epage/release/2012/12122001.html>

東大、タンパク質合成に必須な tRNA の新規修
飾構造を発見・解明

<http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=326829&lindID=5>

タンパク質合成に必須な tRNA 修飾の化学構造
が決定された

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/6418>

Essential tRNA modification stands in the spot
light

<http://59.106.161.11/en/todai-research/research-news/essential-trna-modification-stands-in-the-spotlight/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 勉 (SUZUKI TSUTOMU)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：20292782