

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560442

研究課題名(和文) 酵素プローブを用いたRNA修飾部位網羅的探索の実践と応用

研究課題名(英文) Exploring RNA modifications using enzymatic probe and its applications

研究代表者

鈴木 健夫 (Suzuki, Takeo)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90533125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：RNA修飾酵素をプローブとし、RNA-修飾酵素の共有結合複合体の形成過程を利用したRNA修飾の網羅的探索法の構築を試みた。培地中の核酸アナログ分子を取り込んだHeLa細胞に対し、共有結合複合体を形成しうる修飾酵素を一過的に発現させたところ、アナログ分子の添加に依存して修飾酵素に結合したRNAが回収できることを見出した。また、RNAに酵素的前処理を行うことで特定の修飾構造の変換が促進されたという観察に基づき、新規のRNA修飾標識法の検討を進めた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to explore transcriptome-wide RNA modifications with new techniques using covalent complexes between RNA modification and RNA modifying enzyme. We transiently expressed a modifying enzyme of interest in HeLa cells that were cultured under supplying a nucleic acid analogue molecule and could collect bound RNA from immune-precipitated RNA-enzyme complex in the analogue molecule dependent manner. Moreover, we examined a novel RNA modification labeling method based on enzymatic conversion of specific RNA modifications followed by nucleophilic substitution reaction. The method may provide a new solution to detect those specific modifications.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA修飾 修飾酵素 特異的標識 網羅的探索

1. 研究開始当初の背景

RNA は化学修飾などの転写後プロセッシングを経て初めて機能的に成熟する。RNA 修飾は分子の特定部位に修飾酵素によって導入されるため、修飾機能の理解にはどの部位に何の修飾があるかの情報が重要となる。細胞内に多量にある rRNA や tRNA の修飾解析例は多くあるが、mRNA は末端のキャップ構造以外の分子内修飾解析はほとんど行われてこなかった。一方で局所的に様々な高次構造を取る mRNA もやはり修飾酵素の基質となり、導入された修飾も機能を持つのではないかという着想を持つに至った。既存の mRNA 修飾解析法も存在するが、原理上の短所があり、また解析可能な修飾も限られている。mRNA にどのような内部修飾が存在し、機能しうるかを示すためには新しい RNA 修飾網羅的同定法が必要である。

2. 研究の目的

RNA 修飾酵素をプローブとし、その修飾酵素が本来基質とされる既知の標的以外の RNA も幅広く基質として認識し、修飾しうるという可能性を、RNA 修飾を網羅的に探索する方法論の構築により目指し、また実 RNA サンプルでの探索を試みる。本法からの知見により得られた修飾導入に必要な条件を mRNA に導出することで、遺伝子発現制御への応用を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、細胞内で生成させた RNA-修飾酵素共有結合体から結合 RNA を得て、その結合配列を評価するまでが段階として重要であり、そのための基盤の確立を目指した。そのため RNA-修飾酵素共有結合体を細胞から回収するために必要な酵素プローブ材料の作成と、RNA を得るまでの操作の各種条件検討を行った。その後、実際に酵素プローブのプルダウンを行い酵素プローブに結合した RNA の評価を行った。

4. 研究成果

RNA-修飾酵素共有結合体を取得する前準備として培地に添加する核酸アナログ分子を HeLa 細胞 RNA 内へ取り込ませるための最適条件を、アナログ分子の培地中濃度と HeLa 細胞の培養時間を変えて検討した。幾つかの候補分子(核酸塩基のフルオロ置換体など)をそれぞれ培地に添加し培養した HeLa 細胞から RNA を調製し、ヌクレオシド分解物中に含まれるアナログ分子の含量を HPLC により測定することで取り込み効率を計算した。細

胞の生存や増殖への影響が少ない化合物を選択し、生存可能な濃度条件において取り込み効率が最大(約 15%を達成)となる最大濃度と培養時間を決定した。

次にアナログ分子導入条件下における RNA 結合能の評価を進めた。修飾酵素として、修飾部位に取り込まれたアナログ分子と共有結合を形成する可能性が考えられた、シュードウリジン合成酵素 PUS1 を選択した。PUS1 遺伝子の全長 cDNA と N 末を短縮したアイソフォームの cDNA を C 末 FLAG タグ融合型で各々クローニングした。発現ベクターのトランスフェクションと免疫染色から、全長 PUS1 はミトコンドリアに、N 末短縮 PUS1 は核局在することを確認した。アナログ分子の添加培養下にある HeLa 細胞に N 末短縮 PUS1 を一過的に発現し、細胞内で RNA-修飾酵素共有結合体を形成させた。細胞を破碎して調製したライセートから抗タグ抗体ビーズを用いて RNA-PUS1 複合体を免疫沈降した。沈降画分をプロテイナーゼ K 処理により PUS1 を分解した上清からフェノール抽出を行うことが、RNA 回収の効率と再現性を高くするために重要と判明している。

PUS1 の抗タグ抗体免疫沈降画分における RNA に既知の基質 RNA である細胞質 tRNA^{Ser} が濃縮されているか qRT-PCR によって検討したところ、アナログ分子依存的に基質の tRNA^{Ser} が数倍程度濃縮されていることが確認された。従ってこの実験系での、アナログ分子依存的な RNA-PUS1 修飾酵素共有結合体の生成が強く示唆された。今後は、タグの選択や一過性の発現系よりも適した発現系の探索、修飾探索を行う生物種や細胞種の検討など種々の観点から、この方法論の実証を進める必要がある。

更に別の方法論の確立を目指し、TrmA ヒトホモログ遺伝子を対象として C 末 FLAG タグ融合タンパクをヒト培養細胞内で発現できるようにクローニングし、同時にアミノ酸置換により RNA-修飾酵素共有結合体の形成を促進する不活性変異を導入した。作成した発現ベクターについて免疫染色での発現確認と、このタンパク質でこれまで報告がなかった細胞内局在に関する知見を得た。今後はこの不活性変異体による基質 RNA への結合能評価を行う。

また研究提案時には想定されていなかったが、全く新規の RNA 修飾同定法の確立につながる知見を得た。特定の RNA 修飾構造に対し変換作用がある酵素で処理を行うことで、変換された修飾構造に化学的にリンカーを付加できることが見出された。リンカーを選択することで、更にビオチンなどでの標

識も可能であったことから、酵素依存的に特定の RNA 修飾を標識・回収し、網羅的修飾部位探索に供せる可能性が示唆された。反応条件の最適化と大規模シーケンスに向けたライブラリ調製を進めており、今後の新規研究課題となるよう発展につなげる計画である。

本研究着想の根底にあった網羅的 RNA 修飾探索の必要性和重要性は、現在では「エピトランスクリプトミクス」として確立されつつある、新たな研究分野の隆盛から窺うことができる。事実、様々な手法が開発され、RNA 修飾の網羅的探索が行われているが、本研究で提案した方法論は未だ実施例がなく、現時点においても独自性が高い技術と言える。今後も今回提唱した 2 種の RNA 修飾部位網羅的探索法の実施可能性を追求し、細胞内 RNA 修飾の探索からその機能的意義の解明につなげ、更に遺伝子発現制御への応用に発展させていく必要があるだろう。

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 7 件)

1. 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, E4707-4716

doi:10.1073/pnas.1506749112 [査読有]

2. Wei, F. Y., Zhou, B., Suzuki, T., Miyata, K., Ujihara, Y., Takahashi, N., Xie, P., Michiue, H., Fujimur, 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, 428-442

doi:10.1016/j.cmet.2015.01.019 [査読有]

3. Ito, S., Horikawa, S., Suzuki, T., Kawauchi, H., Tanaka, Y., Suzuki, T., and Suzuki, T. (2014) Human NAT10 is an ATP-dependent RNA acetyltransferase responsible for N⁴-acetylcytidine formation in 18 S ribosomal RNA (rRNA). *J. Biol. Chem.* 289, 35724-30

doi:10.1074/jbc.C114.602698 [査読有]

4. Takai, H., Masuda, K., Sato, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T. (第 5 著者), 他 15 名 (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 [査読有]

5. Ito, S., Akamatsu, Y., Noma, A., Kimura, S., Miyauchi, K., Ikeuchi, Y., Suzuki, T., and 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 [査読有]

6. Suzuki, T. and Suzuki, T. (2014) A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nucleic Acids Research.* 42, 7346-57

doi:10.1093/nar/gku390 [査読有]

7. 鈴木 勉、浅野 奏、鈴木 健夫 (2015) 「RNA の修飾欠損と疾患」 *ファルマシア* 51(1), pp.32-36 [査読なし]

[学会発表](計 9 件)

1. 石神 宥真、大平 高之、穂近 慎一郎、鈴木 健夫、鈴木 勉 「U snRNA における N⁶-メチルアデノシン修飾の生合成と機能解析」 BMB2015 (2015 年 12 月 1-4 日、兵庫県神戸市)

2. Xuwei Zhao, Takeo Suzuki, Tsutomu Suzuki "Exploration and functional analysis of queuosine- glycosyltransferases in mammals" 17th RNA meeting (15th-17th July 2015, Lifort Sapporo, Sapporo Hokkaido, Japan)

3. 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 (15th-17th July 2015, Lifort Sapporo, Sapporo Hokkaido, Japan)

4. Fan-Yan Wei, Yu Nagayoshi, Shoji Hirata, Takeo Suzuki, Tsutomu Suzuki, Kazuhito Tomizawa "Deficiency of tRNA modification causes the development of X-linked mental

retardation” 17th RNA meeting
(15th-17th July 2015, Lifort Sapporo, Sapporo
Hokkaido, Japan)

5. Takeo Suzuki and Tsutomu Suzuki “A
complete landscape of post-transcriptional
modifications in mammalian mitochondrial
tRNAs” The 25th tRNA conference (21st-25th
Sep 2014 Kyllini, Greece)

6. 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3-5日、九大医
百年講堂 福岡市 福岡県)

7. 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
3-5日、九大医百年講堂 福岡市 福岡県)

8. Takeo Suzuki, Kana Asano, Fan-Yan Wei,
Kazuhito Tomizawa, Tsutomu Suzuki
“Mitochondrial disease as the first instance of
RNA modopathy” 16th RNA meeting
(23rd-25th July 2014, WincAichi, Nagoya, Aichi,
Japan) [招待講演]

9. Shoji Hirata, Takeshi Chujo, Takeo Suzuki,
Kenjyo Miyauchi, Yuichi Goto, Tsutomu Suzuki
“Analysis of the functional role of FTSJ1 related
to non-syndromic X-linked intellectual
disability” 16th RNA meeting (23rd-25th July
2014, WincAichi, Nagoya, Aichi, Japan)

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・講師
研究者番号：90533125

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：