

ヒトRNAエディティング部位の探索とRNA修飾関連遺伝子群の網羅的同定

●鈴木 勉

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻

〈研究の目的と進め方〉

細胞内にはタンパク質をコードしないnon-coding (nc) RNAが大量に存在し、これらが機能性高分子として振る舞い、遺伝子発現や細胞の営みに深く関わっていることが次第に明らかになりつつある。機能性RNAは、転写後にスプライシングやRNA修飾あるいはエディティングなどのプロセッシングを経て成熟し本来の機能を発揮する。機能性RNAの修飾異常は疾患の原因となることが知られ、修飾はRNAに質的な機能を付加するものであると考えられる。また、脳mRNA中に大量に見出されるイノシンは、トランスクリプトームの複雑性の増大に寄与し、脳がもつ高次元レベルでの情報ネットワークの構築に関与している可能性がある。本研究はRNAの機能発現に必要な修飾構造の全体像の解明をめざすために、以下の2つのプロジェクトから構成されている。(1)逆遺伝学的な手法と高感度質量分析法を用い、ゲノムワイドにRNA修飾遺伝子を同定するリボヌクレオーム解析を用い、機能未知遺伝子群から新規なRNA修飾遺伝子を網羅的に探索する。取得した遺伝子の組換えタンパク質を用いin vitroでのRNA修飾反応の再構成を行い、RNA修飾反応の分子機構を解明する。また、これらのヒトホモログの同定を行い、RNA修飾異常に起因する疾患の探索を目指し、RNA修飾が関与する高次生命現象を理解する。(2) ESTデータベースとゲノム配列の比較から、ヒトおよびマウスmRNAにおけるA→Iエディティング部位の絞込みを行い、我々が開発した微量RNA中に含まれるイノシン化部位を明確に同定する方法(ICE;inosine chemical erasing)(特許出願済)を駆使して網羅的に新規RNAエディティング部位の探索を行う。また、RNAエディティングのデータベース化を目指し、最終的には組織の違いや疾患により変動するイノシン化部位を探索し、疾患の性格付けや細胞の分化の指標とRNAエディティングの関係を明らかにしていきたい。

〈研究開始時の研究計画〉

大腸菌と酵母におけるリボヌクレオーム解析を継続して行い、新規RNA修飾遺伝子の探索を行う。また取得した遺伝子のヒトホモログの探索を行い、疾患との関連性を追及する。さらにこれまでに得られた、Lysidine(L), ac4C(4-acetylcytidine), m3C(3-methylcytidine), m2G(2-methylguanosine), yW(Wybtosine), mnm5s2U(5-methylaminomethyl-2-thiouridine), mcm5s2U(5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine)などの生合成に関わる遺伝子について機能解析を行い、in vitroでの再構成系の構築とRNA修飾反応の分子機構の解析を行う。また、修飾酵素とRNAの相互作用の解析を行う。RNA修飾異常に起因する疾患としては、感音性難聴と糖尿病を併発するMIDDや先天性代謝異常症の解析を行い、発症の分子メカニズムの解明を目指す。

RNAエディティングに関しては、ICE法の改良によるイノシン化部位の同定精度の向上とICE法とマイクロアレイを組み合わせたイノシン化部位の網羅的探索を行う。

in silicoで絞り込まれたA→Iエディティング候補部位を継続して行い、新規イノシン化部位500箇所以上の同定を目指す。また新規に見つかった各エディティング部位が、霊長類を含めた種々の哺乳動物の脳で保存されているかの解析を行い、高次元脳機能とエディティングの関係を追及する予定である。

〈研究期間の成果〉

我々は、逆遺伝学的な手法と高感度質量分析法を用い、ゲノムワイドにRNA修飾遺伝子を同定するリボヌクレオーム解析[Suzuki, T. (2005) In Fine-tuning of RNA functions by modification and editing. Topics in Current Genetics, vol 12, Springer-Verlag, NY pg 24-69]を開発し、大腸菌および酵母の機能未知遺伝子よりRNA修飾遺伝子を網羅的に探索する解析を行っている。これまでに大腸菌においては17個、酵母においても12個の新規RNA修飾関連遺伝子を発見した。特にLysidine合成酵素遺伝子(tilS)の同定[Mol Cell, 12, 689-698 (2003)]とその機能解析に成功した[Mol Cell, 19, 235-246 (2005)]ことは、リボヌクレオーム解析の有効性を証明する大きな成果の一つである。LysidineはtRNAIleのアンチコドン1字目に位置するCの修飾塩基であり、修飾によってコドン認識がAUG→AUAと変化し、さらにはtRNAのアミノ酸受容能がMet→Ileへとスイッチすることが知られている。tilSはすべてのバクテリアに共通に存在する必須遺伝子であり、抗生物質の新規ターゲットとして阻害剤の探索が期待されている。更に、最近では2チオウリジンの生合成に関与する5つの新規遺伝子の同定に成功し、これらの役割を解明した[Mol Cell, 21, 97-108 (2006)]。

また、RNAエディティングの探索に関しても、公開されている約500万のESTデータベースとヒトゲノム配列の比較から絞り込まれたA/G置換部位から、ESTの由来臓器や組織の情報を加味することで、A→Iエディティング候補部位の絞込みを行った。また、mRNA中のイノシンの同定に関しては、イノシン特異的な化学修飾とRT-PCR法を組み合わせたICE法(特許出願済)を確立した。この手法の利点は、微量なtotal RNA(約10ng)で解析が可能である、SNPとの判別が確実にできる、部分的なイノシン修飾の解析が可能、偽遺伝子やマルチコピーに由来する偽シグナルとの判別が容易である、などの数々の利点を有している。ICE法は微量RNA中に含まれるイノシンを迅速かつ確実に同定する方法として他の手法の追随を許さない。実際にこの方法を駆使し、これまでにヒト脳mRNA中に含まれる200箇所以上の新規イノシン化部位の同定に成功している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

RNA修飾遺伝子は機能未知遺伝子の中で、大きなカテゴリーの一つであり、世界的にも我々の研究グループ以外にいくつかの下ループで同定競争が激化している。Crecy-Lagardらは比較ゲノムとRNA修飾の保存性から遺伝子を同定するアプローチをとっている。Phizickyらは

酵母のORFをすべてGST融合タンパク質として発現させ、RNA修飾の酵素活性を指標に直接同定するアプローチをとっている。また、BjorkとBystromらはtRNAの機能を指標に変異体の解析から修飾遺伝子を同定している。しかし、比較ゲノムだけでは、保存性の低いRNA修飾遺伝子を同定することは困難であるし、組換えタンパク質からのアプローチでは生合成が多段階である場合やRNA修飾の基質が不明な場合は同定することはほぼ不可能である。また変異体の解析はRNA修飾の機能を指標とした優れたスクリーニングではあるものの、網羅性を欠いている。我々のリボヌクレオーム解析は、破壊株の入手が律速ではあるものの、原理的には全ての非必須なRNA修飾遺伝子を同定できるという点が優れている。また、必須遺伝子に関しても、発現制御株や温度感受性変異株を利用することで同定が可能である。日本の優秀なゲノム資源を大いに活用できるという点でも有効な手段であると考えている。いずれの研究グループもアプローチに一長一短が、必須遺伝子の中で多くのグループが同定を試みてきたライシジン合成酵素を同定できたことは、我々のアプローチの有効性が証明された大きな成果である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

プロジェクトの開始当初は、大腸菌の遺伝子破壊株の入手が予想以上に苦戦したが、最終的には三木健良先生、森浩禎先生、加藤潤一先生のご協力により、ほぼ完全な破壊株のライブラリーを収集することができた。また、発現プラスミドに関しても、西村昭子先生のご協力により利用することが可能になった。本プロジェクトの成果はこれらの日本独自の大腸菌リソースに支えられたものであり、この場をお借りして感謝の意を表したい。

〈今後の課題〉

大腸菌においては、引き続き、RNA修飾遺伝子の探索と機能解析を行う。また、酵母に関しては、更に多くの遺伝子がRNA修飾の生合成に関与することが予想されることから、既知遺伝子も含めて網羅的に探索する予定である。本プロジェクトは新ゲノム特定で継続し、RNA修飾が関与する生命現象の全貌を解明していきたい。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文/プロシーディング
1. 601301128 Kirino, Y., Yasukawa, T., Marjavaara, S.K., Jacobs, H.T., Holt, I.J., Watanabe, K. and Suzuki, T.* (2006) Acquisition of the wobble modification in mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) bearing the G12300A mutation suppresses the MELAS molecular defect *Hum Mol Genet.*, in press
2. 601301119 Takano, Y., Takayanagi, N., Hori, H., Ikeuchi, Y., Suzuki, T., Kimura, A. and Okuno, T. A gene involved in modification of transfer RNA is required for fungal pathogenicity and stress tolerance of *Colletotrichum lagenarium*. *Mol Microbiol.*, in press
3. 601301110 Shigi, N., Suzuki, T., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S. and Watanabe, K. Temperature-dependent biosynthesis of 2-thioribothymidine of *Thermus thermophilus* tRNA *J. Biol. Chem.*, 281, 2104-2113 (2006)
4. 601301103 Numata, T., Fukai, S., Ikeuchi, Y., Suzuki, T.* and Nureki*, O. Structural basis for sulfur relay to RNA mediated by heterohexameric TusBCD complex *Structure* in press
5. 601301046 Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A. and Suzuki, T.* Mechanistic insights into sulfur-relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions *Mol Cell.*, 21, 97-108. (2006)
6. 601301134 Ikeuchi, Y., Soma, A., Ote, T., Kato, J., Sekine, Y. and Suzuki, T.* Molecular mechanism of lysidine synthesis that determines tRNA identity and codon recognition *Mol Cell.*, 19, 235-246. (2005)
7. 601301130 Ote, T., Hashimoto, M., Ikeuchi, Y., Suetsugu, M., Suzuki, T., Katayama, T. and Kato, J. Involvement of the *Escherichia coli* folate-binding protein YgfZ in RNA modification and regulation of chromosomal replication initiation *Mol Microbiol.*, 59, 265-275. (2005)
8. 601301135 Chinnaronk, S., Jeppesen, M.G., Suzuki, T., Nyborg, J. and Watanabe, K. Dual Mode Recognition of Noncanonical tRNAs^{Ser} by Seryl-tRNA Synthetase in Mammalian Mitochondria *EMBO J.*, 24, 3369-3379. (2005)
9. 601301136 Kirino, Y., Goto, Y., Campos, Y., Arenas, J. and Suzuki, T.* Specific correlation between tRNA taurine-modification deficiency and clinical features of human mitochondrial disease *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 7127-7132. (2005)
10. 601301137 Nakanishi, K., Fukai, S., Ikeuchi, Y., Soma, A., Sekine, Y., Suzuki, T. and Nureki, O. Structural basis for lysidine formation by ATP pyrophosphatase accompanied with a lysine-specific loop and a tRNA-recognition domain *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 7487-7492. (2005)
11. 601301133 Zhang, L., Ching Ging, N., Komoda, T., Hanada, T., Suzuki, T.* and Watanabe, K*. Antibiotic susceptibility of mammalian mitochondrial translation *FEBS Lett.*, 579, 6423-6427. (2005)
12. 601301139 Yasukawa, T., Kirino, Y., Ishii, N., Holt, I.J., Jacobs, H.T., Makifuchi, T., Fukuhara, N., Ohta, S., Suzuki, T.* and Watanabe, K*. Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases *FEBS Lett.*, 579, 2948-2952. (2005)
13. 601301140 Sakurai, M., Ohtsuki, T., Suzuki, T. and Watanabe, K. Unusual usage of wobble modification in mitochondrial tRNAs of the nematode *Ascaris suum*. *FEBS Lett.*, 579, 2767-2772. (2005)
14. 601301142 Nagaike, T., Suzuki, T.*, Katoh, T. and Ueda, T. Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, 280, 19721-19727. (2005)
15. 601301149 Umeda, N., Suzuki, T., Yukawa, M., Ohya, Y., Shindo, H., Watanabe, K. and Suzuki, T*. Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs: Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *J. Biol. Chem.*, 280, 1613-1624. (2005)
16. 601301147 Suzuki, T. Biosynthesis and function of tRNA wobble modifications. In *Fine-tuning of RNA functions*

by modification and editing

Topics in Curr Genetics, vol 12, Springer-Verlag, pg 24-69. (2005)

17. 601301328 Kirino, Y. and Suzuki, T*. Human Mitochondrial Diseases Associated with tRNA Wobble Modification Deficiency.
RNA Biol., 1, 145-148. (2004)
18. 601301329 Okamoto, H., Watanabe, K., Ikeuchi, Y., Suzuki, T., Endo, Y. and Hori, H. Substrate tRNA recognition mechanism of tRNA (m7G46) methyltransferase from Aquifex aeolicus.
J. Biol. Chem., 279, 49151-49159. (2004)
19. 601301330 Kirino, Y., Yasukawa, T., Ohta, S., Akira, S., Ishihara, K., Watanabe, K. and Suzuki, T.* Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101, 15070-15075. (2004)
20. 601301331 Sato, N. S., Suzuki, T., Ueda, T., Watanabe, K., Hirata, R. D. and Hirata, M. H. Recombinant antigen-based immuno-slot blot method for serodiagnosis of syphilis.
Braz J Med Biol Res. 37(7), 949-955. (2004)
21. 601301332 Chimnaronk, S., Jeppesen, M.G., Shimada, N., Suzuki, T., Nyborg, J. and Watanabe, K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of mammalian mitochondrial Seryl-tRNA synthetase.
Acta Crystallographica Section D 60, 1319-1322. (2004)
22. 601301334 Nakai, Y., Umeda, N., Suzuki, T., Nakai, M., Hayashi, H., Watanabe, K. and Kagamiyama, H. Yeast Nfs1p is involved in thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs.
J. Biol. Chem. 279, 12363-12368. (2004)
23. 601301335 Hino, N., Suzuki, T., Yasukawa, T., Seio, K., Watanabe, K. and Ueda, T. The pathogenic A4269G mutation in human mitochondrial tRNA^{Ala} alters the T-stem structure and decreases the binding affinity of elongation factor Tu
Genes Cells, 9, 243-252. (2004)
24. 601301336 Terasaki, M., Suzuki, T.*, Hanada, T. and Watanabe, K. Functional compatibility of elongation factors between mammalian mitochondrial and bacterial ribosomes: Characterization of GTPase activity and translation elongation by hybrid ribosomes bearing heterologous L7/12 proteins
J. Mol. Biol, 336, 331-342. (2004)
25. 601301337 Limongelli, A., Schaefer J., Jackson, S., Invernizzi, F., Kirino, Y., Suzuki, T., Reichmann, H. and Zeviani, M. Variable penetrance of a familial progressive necrotizing encephalopathy due to a novel tRNA^{Ala} homoplasmic mutation in the mitochondrial genome
J Med Genet, 41, 342-349. (2004)
26. 601301348 Suzuki, T., Ohtsuki, T. and Watanabe, K. Glimpses of transitions from the RNA world to the RNP world in protein compensation for RNA deficit in animal mitochondrial translation systems.
Endocytobiosis Cell Res 15, 110-122. (2004)

3) 特許など

出願番号：特願2005-XXXXXX

出願日：平成17年8月8日

名称：RNA中のイノシン化部位を特定する方法

発明者：鈴木 勉、櫻井雅之

出願番号：特願2005-XXXXXX

出願日：平成17年8月3日

名称：往復循環クロマトグラフィー

発明者：鈴木 勉、宮内健常

出願番号：特願2004-339033

出願日：平成16年11月24日

名称：生体高分子の解析方法

発明者：鈴木 勉、坂口裕理子

出願番号：特願2004-055924

出願日：平成15年11月20日

名称：siRNAの設計方法(国内優先)

発明者：鈴木 勉、加藤敬行