

RNA の機能発現に必要な修飾構造の全体像解明

●鈴木 勉

東京大学大学院工学系研究科

＜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、RNA 修飾は RNA が機能するために重要な質的な情報である。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駆使したリボヌクレオーム解析により、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 mRNA における A-to-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)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性を明らかにしていきたい。

＜2007 年度の研究の当初計画＞

大腸菌と酵母におけるリボヌクレオーム解析を行い、新規 RNA 修飾遺伝子の探索を継続する。さらにこれまでに得られた、Lysidine(L), ac⁴C(4-acetylcytidine), m³C (3-methylcytidine), yW (Wybutosine), mcm⁵s²U(5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine), 7-methylguanosine (m⁷G), N²-methylguanosine (m²G) 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、基質 RNA の認識部位の特定や修飾酵素の反応速度論的な解析を行う。特に、リボソーム RNA を基質とする修飾酵素の解析を行い、塩基修飾がリボソームの生合成や機能発現にどのような役割を果たしているかを理解する。RNA エディティングに関しては、ICE 法によるイノシン化部位の同定精度の向上とシーケンスの波形データから、自動的にイノシンを判別し、ゲノム上に直接的に登録するソフトウェアの開発を行う。最終目標として一万箇所以上あると予測されている全イノシン化部位を特定しデータベース化するための基盤を整備する。また、各イノシン化部位についての修飾度の割合を数値化する方法を開発する。また、mRNA のみならず、アンチセンス RNA などの non-coding RNA にも探索の対象を拡大し、イノシン化部位を探索する。新規に見つかった各エディティング部位が、臓器や組織ごとに違いがあるか、あるいは個人間での差異などを解析する予定である。さらに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、高次脳機能とエディティングの関係性を追及する予定である。

＜2007 年度の成果＞

酵母遺伝子破壊株のリボヌクレオーム解析により、2チオウリジンの生合成に関わる5つの遺伝子、YOR251c、UBA4、URM1、NCS2、NCS6を発見している。今年度は、これら遺伝子の機能解析を行い、修飾反応の詳細な生合成機構を生化学的、遺伝学的なアプローチにより解析を行った。その結果、YOR251cが NFS1 を活性化し、Cys のチオール基を引き抜き、persulfied

として、YOR251c に受け渡すことを明らかにした。さらに、UBA4 が、ATP を用い URM1 の C 末をアデニル化することで活性化し、YOR251c の persulfied を転移する反応を見出した。URM1 の C 末は thiocarboxylate の形態で活性化され、この硫黄原子が NCS2 と NCS6 が関与する 2チオウリジンの形成反応に用いられると考えられる。この硫黄原子の運搬機構は、我々が以前、大腸菌で見出している Tus タンパク群による硫黄リレー機構 (Mol Cell, 2006) とは明確に区別されるものであり、2チオウリジンの生合成が生物種によって全く異なるメカニズムによって担われていることが明らかとなった。また、大腸菌リボソーム RNA の修飾に関与する5つの新規遺伝子を発見した。我々は昨年、精子形成に関わるマウス由来 piwi-interacting RNA(piRNA) の 3' 末端がほぼ完全に 2' -O-メチル化修飾されていることを見出している (NSMB, 2007)。今年度は精巣における piRNA メチル化酵素の発現解析、および *in vitro* メチル化反応を用いた機能解析を行った。

イノシン化部位の同定に関しては、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 置換部位を A-to-I エディティング候補部位とし、ICE 法を用いたゲノムワイドな解析を行っている。昨年度は、112 遺伝子に対し、パイロット的な解析を行った結果、約1770箇所の新規イノシン化部位の同定に成功した。今年度はエディティングデータベースの本格的な構築を目指し、ゲノム全体におけるイノシン化部位の網羅的同定に着手した。エディティング候補部位を3147箇所抽出し、この部位を含む周辺領域を250-400塩基のプレームとし、各領域を増幅するためのプライマーを設計した。これらプライマーの設計条件および RT-PCR 反応条件の検討により、設計領域のおよそ7割について増幅および配列解析可能なクオリティでデータを得ることが可能となった。さらに配列解析及び同定部位登録作業の効率化を図るため、各配列データのアライメント、イノシン化部位の正誤判定、イノシン化率の測定、データベースへの登録・閲覧を半自動的に行えるソフトウェア (ICE-CAFÉ) を開発した。以上のような網羅的解析システムを駆使して解析を進め、これまでに、1344領域について配列データを得ている。その内501領域についてイノシン化部位4401箇所を同定し、その登録作業を完了している。この中で EST の比較から A/G 置換部位として観測された1578箇所のうち、実際にイノシン化部位であることが判明したものが、わずかにその約半数の805箇所であった。このことは、EST 上で見られる A/G 置換部位の半分は SNP やシーケンスの間違いであることを示唆している。さらに EST の比較から A/G の置換が認められない完全に新規のイノシン化部位は3596箇所同定することができた。最終的にはヒト脳の mRNA には35000箇所以上のイノシン化部位が同定できるものと見込まれる。この見積りから、ヒト脳の mRNA には従来予測された12000箇所よりも圧倒的に多くのイノシン化部位が存在することが明らかとなった。また今回同定された部位の多くは mRNA の長鎖 3' UTR 内に存在する Alu 反復配列上に存在した。EST データベースや各 mRNA についての報告から、これら mRNA にはバリエーションが存在し、イノシン化部位領域を全く含まない短鎖 3' UTR を持つものとイノシン化部位領域を含む長鎖 3' UTR をもつものが共存することが考えられる。これらイノシン化部位について複数の細胞株やヒト組織間の比較解析を行った結果、正常ヒト組織由来の RNA では、イノシン化率に大きな差はなかったものの、比較的結果においてはイノシン化率が低い傾向が見られた。一方、癌化した細胞株においてはイノシン化率に顕著な低下が見られたが、その中では神経膠腫細胞株においては比較的高いイノシン化が見受けられた。さらにヒト以外の霊長類の癌化細胞株においても効率や保存性は劣るものの、イノシン化部位が検出された。これらイノシン化部位のほとんどの機能が未だ不明であるが、癌化細胞株においてイノシン化酵素 (ADAR) をノック

クダウンすると細胞の死や増殖速度の低下が見られることをこれまでに明らかにしており、現在その詳細について解析を進めている。

<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グ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、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で優れている。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、また多段階な修飾反応に関与する多くの修飾遺伝子を同定できていることは、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。

また、イノシン化部位に関しては、イスラエルのCompugenのグループがESTの比較およびRNAの二次構造予測から、情報科学的にイノシン化部位を推定している。しかし、これらの予測にはシーケンスエラーやアリの SNP、偽遺伝子由来の偽シグナルなど、多くの間違いを含み、またイノシン修飾の割合などの情報は欠落している。実際に、今年度の解析から、情報科学で予測された部位の半分からはエディティングが観測できず、これらは SNP やエラーの可能性が高いことが示された。また、4401 箇所中、3596 箇所が情報科学では予測不可能な完全に新規なエディティング部位であることが判明し、我々のアプローチの優位性を示すことができた。ヒト脳の mRNA には従来予測されていた 12000 箇所の約 3 倍に相当するイノシン化部位が存在すると考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ほぼ、目標どおりに研究を進展させることができた。また、サブテーマによっては、予想以上の成果が得られた。新規に見つかったイノシン化部位について、個人間での差異解析や、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う予定であったが、世界的な研究情勢を考慮して、今年度は探索作業を優先して行った。次年度はこれらの解析を並行して行う予定である。RNA修飾酵素の機能解析に関しては、組換えタンパクの発現と精製に予想以上の苦戦を強いられた。今後は、大腸菌を用いた発現系や可溶性条件の更なる検討や小麦胚芽無細胞系など様々な発現系を試していきたい。

<今後の課題>

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。さらにこれまでに得られた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、基質 RNA の認識部位の特定や修飾酵素の反応速度論的な解析を行う。特に、酵母における 2 チオウリジンの生合成に関しては、早急に投稿論文としてまとめる予定である。

RNA エディティングに関しては、網羅的な同定作業を進め、次年度中に全領域についての解析終了を目指す。また各イノシン化部位についての修飾度の割合を数値化し、登録作業を行う。RNA エディティングデータベースを用いて、精神神経疾患を対象とした RNA エディティングの変動解析を行う予定である。また、mRNA のみならず、アンチセンス RNA などの non-coding RNA にも探索の対象を拡大し、イノシン化部位を探索する。新規に見つかった各エディティング部位が、臓器や組織ごとに違いがあるか、あるいは個人間での差異などを解析する予定である。さらに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、高次脳機能とエディティングの関係を追及する予定である。更には、イノシン化酵素である ADAR をノックダウンした細胞での表現形の解析や、マイクロアレイ解析による mRNA の変動解析を行う。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

- 0801291002 Funakoshi, Y., Doi, Y., Hosoda, N., Uchida, N., Osawa, M., Shimada, I., Tsujimoto, M., Suzuki, T., Katada, T. and Hoshino, S. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev.*, 21, 3135-3148 (2007)
- 0801291006 Tsutsumi, S., Sugiura, R., Ma, Y., Tokuoka, H., Ohta, K., Ohte, R., Noma, A., Suzuki, T. and Kuno, T. (2007) Wobble inosine tRNA modification is essential for cell cycle progression in G1/S and G2/M transitions in fission yeast. *J. Biol. Chem.*, 282, 33459-33465 (2007).
- 0707172132 Kitahara, K., Kajiura, A., Sato, N.S. and Suzuki, T.: Functional genetic selection of Helix 66 in Escherichia coli 23S rRNA identified the eukaryotic class of binding sequences for ribosomal protein L2. *Nucleic Acids Res.*, 35: 4018-4029 (2007)
- 0707172136 Suzuki, Y., Noma, A., Suzuki, T., Senda, M., Senda, T., Ishitani, R. and Nureki, O.: Crystal structure of the radical SAM enzyme catalyzing tricyclic modified base formation in tRNA. *J. Mol. Biol.* 372, 1204-1214.
- 0707172134 Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H. and Siomi, M.C.: Pimet, the Drosophila homolog of HEN1, mediates 2' -O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.*, 21, 1603-1608 (2007).
- 0707172128 Suzuki, T., Sakaguchi, Y. and Suzuki, T.: Mass spectrometric analysis of 3' -terminal nucleosides in non-coding RNAs. *Nat Protoc.*, DOI: 10.1038/nprot.2007.185 (2007)
- 0707172126 Dunham, C.M., Selmer, M., Phelps, S.S., Suzuki, T., Joseph, S. and Ramakrishnan, V.: Structures of tRNAs with an expanded anticodon loop in the decoding center of the 30S Ribosomal Subunit. *RNA*, 13: 817-823 (2007)
- 0702111017 Ohara, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Ueda, H., Miyauchi, K. and Suzuki, T.: The 3' -termini of mouse piRNAs are 2' -O-methylated. *Nat Struct Mol Biol.*, 14, 349-350 (2007)
- 0702111020 Nakai, Y., Nakai, M., Lill, R., Suzuki, T. and Hayashi, H.: Thio modification of yeast cytosolic tRNA is an iron-sulfur protein-dependent pathway. *Mol Cell Biol.*, 27, 2841-2847 (2007)
- 0702111022 Suzuki, T. and Suzuki, T.: Chaplet column chromatography: isolation of a large set of individual RNAs in a single step. *Methods in Enzymol.*, 425, 213-220 (2007)
- 0702111024 Suzuki, T., Ikeuchi, Y., Noma, A., Suzuki, T. and Sakaguchi, Y.: Mass spectrometric identification and characterization of RNA-modifying enzymes. *Methods in Enzymol.*, 425, 195-211 (2007)
- 0702111026 Miyauchi, K., Tomoya, O. and Suzuki, T.: Automated parallel isolation of multiple species of non-coding RNAs by the reciprocal circulating chromatography method. *Nucleic Acids Res.*, 35, e24 (2007).
- 0702111028 Katoh, T. and Suzuki, T.: Specific residues at every third position of siRNA shape its efficient RNAi activity. *Nucleic Acids Res.*, 35, e27 (2007)
- 0801291310 Yokoyama, T. and Suzuki, T. Ligand-induced translation by the allosteric ribosome bearing an aptamer-fused rRNA. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 51, 383-384 (2007)
- 0801291312 Nagao, A., Suzuki, T. and Suzuki, T. Aminoacyl-tRNA surveillance by EF-Tu in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 51, 41-42 (2007)
- 0801291315 Tomita, K., Numata, T., Fukai, T., Suzuki, T., Ishitani, R. and Nureki, O. Animated Crystallography of Genetic Code Translation. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 51, 101-102 (2007)

2) データベース/ソフトウェア

- 0702111256 Katoh, T. and Suzuki, T.: siExplorer: effective siRNA design algorithm. <http://rna.chem.t.u-tokyo.ac.jp/cgi/siexplorer.htm>