

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、脳がもつ高次な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を明らかにしていきたい。

＜2008 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。tRNA 修飾酵素としては、*m*^cC (3-methylcytidine), *y*W (Wybtosine), *mcm*^sU (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、リボソーム RNA に関しては、*ac*^cC (4-acetylcytidine), *m*^cC (5-methylcytidine), *m*^cM (4-methyl-2' O-methylcytidine), *D* (dihydrouridine), *m*^gG (2-methylguanosine), *m*^gG (7-methylguanosine) などの生合成に関与する新規 RNA 修飾遺伝子の機能解析を行う。RNA エディティングに関しては、ICE 法を用いた新規イノシン化部位の網羅的同定を継続して行い、今年度中に、15,000 箇所同定を目指す。mRNA の 3' UTR 中に見つかったイノシンの機能解析を行う。特に miRNA による翻訳抑制効果との関連性について探求する。また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の解析を行う。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。

＜2008 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、TUM1、UBA4、URM1、NCS2、NCS6 を発見している。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、ロダネースドメインを有する TUM1 がシステインデスルフェレースである NFS1 を活性化し、Cys の硫黄原子を引き抜き、persulfied として、TUM1 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、TUM1 の硫黄原子を転移する反応を見出した。また UBA4 もロダネースドメインを持つことから、UBA4 は TUM1 を介さずに直接 NFS1 から硫黄原子を受け取る活性を有することが判明した。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 の二量体による2チオウリジン化反応に用いられることを明らかにした。実際にこれらの組換えタンパク質を用いた試験管内2チオウリジン形成の再構成に成功した (NAR, 2008)。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。

大腸菌 tRNA^{Met} のアンチコドン1字目には *N*⁶-アセチルシチジン (*ac*^cC) が存在し、この修飾は AUG コドンの厳密な認識に寄与している。我々はリボヌクレオーム解析により tRNA^{Met} cytidine acetyltransferase (TmcA) を同定した (EMBO J, 2008)。TmcA は N 末端に RNA ヘリケース様のドメインがあり、C 末端にアセチルトランスフェラーゼを有している。試験管内のアセチル化実験を行ったところ、TmcA はアセチル CoA を基質とし、ATP 依存的に *ac*^cC を形成することを見出した。TmcA はタンパク質のアセチル化酵素とは異なり、エネルギー要求性の RNA アセチル化酵素である。tRNA^{Met} と tRNA^{Leu} は配列的に高い相同性があるにも関わらず、それぞれの wobble 位は、tRNA^{Met} が *ac*^cC に修飾され、tRNA^{Leu} は Lysidine に修飾される。tRNA 変異体を用いた解析により、それぞれの tRNA には TmcA と TiiS に対する決定因子が備わっており、wobble 位の厳密な修飾により、それぞれの tRNA の identity が確立し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つの新規遺伝子について、遺伝学のおよび生化学的な機能解析を行っている。また、我々は、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) が、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。昨年度より、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 塩基のフレームとし、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・閲覧を半自動的に実行するソフトウェア (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、約80%の解析が終了し、すでに18,000箇所を超えるイノシン化部位を特定している。解析した領域内には情報科学的に予測されたイノシン化部位が約6,300箇所含まれているが、実験的に確認された部位は約半数の3,600箇所程度であり、残りはシーケンスのエラーかSNPである可能性が考えられる。したがって、我々が同定した約8割(14,600箇所)の部位が完全に新規部位であることが判明した。最終的にはヒト脳のmRNAには30,000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。同定されたイノシン化部位の多くはmRNAの長鎖3' UTR上に見出されていることから、現在miRNAによる翻訳抑制効果との関わりやpoly A付加との関連性について解析を行っている。

<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グループ間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、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あるが、必須遺伝子として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、また多段階の反応によって生合成される2チオウリジンやワイプトシンの生合成経路を明らかにできたことは、我々のアプローチの優位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、今年度我々が同定した18,000箇所の8割が完全に新規部位であり、情報科学で予測された部位はわずか2割に過ぎないことが判明した。さらに予測部位の約半分からはエディティングが観測できず、これらはSNPやシーケンスのエラーである可能性が高いことが示された。これらの結果から、実験科学的に修飾部位を特定することの優位性を証明することができたと考えている。

<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、イノシン化部位の同定に関しては、目標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、今年度は探索作業に集中した。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継続する。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、新規な化学構造を有するRNA修飾の探索と構造決定を行う予定である。

RNAエディティングに関しては、今年度中に予定された全領域についての解析が終了するが、ICE法と次世代シーケンサーを積極的に活用した新たな探索手法を計画中であり、更なる網羅性を向上させる予定である(支援班との共同研究が進行中である)。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。RNAエディティングデータベースに関しては、論文発表とともに次年度中の公開を目指していきたい。また、3' UTR中に存在するイノシン化修飾の機能解析を継続し、miRNAによる翻訳抑制効果との関わりについて、基盤の概念の確立を目指す。

<成果公表リスト> 論文 (2008-) (査読付きのものに限る)

- 0901151156 Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., Baba, T. and Suzuki, T. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3'-adenylation mediated by the cytoplasmic poly (A) polymerase GLD-2
Genes Dev., in press
- 0901151153 Noma, A., Sakaguchi, Y. and Suzuki, T. Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions
NuCLEic Acids Res., in press
- 0901151155 Noma, A., Shigi, N. and Suzuki, T. Biogenesis and functions of thio-compounds in transfer RNA: comparison of bacterial and eukaryotic thiolation machineries
DNA and RNA modification enzymes (Book LANDES), in press
- 0901151222 Ogata, T., Shimazaki, T., Umamoto, T., Kurata, S., Ohtsuki, T., Suzuki, T. and Wada, T. Chemical synthesis and properties of 5-taurinomethyluridine and 5-taurinomethyl-2-thiouridine
J. Org. Chem., in press
- 0901151148 Nagao, A., Shigi-Hino, N. and Suzuki, T. Measuring mRNA decay in human mitochondria
Methods in Enzymol., in press
- 0901151151 Ikeuchi, Y., Kitahara, K. and Suzuki, T. The RNA acetyltransferase driven by ATP hydrolysis synthesizes N⁴-acetylcytidine of tRNA anticodon
EMBO J., 27, 2194-2203 (2008)
- 0901151152 Shigi, N., Sakaguchi, Y., Asai, S., Suzuki, T. and Watanabe, K. Common Sulfur Transfer System for the Biosyntheses of Sulfur-containing tRNA and Cofactors
EMBO J., 27, 3267-3278 (2008)
- 0806271645 Kurata, S., Weixlbaumer, A., Ohtsuki, T., Shimazaki, T., Wada, T., Kirino, Y., Takai, K., Watanabe, K. Ramakrishnan, V. and Suzuki, T. Modified uridines with C5-methylene substituents at the first position of the tRNA anticodon stabilize U · G wobble pairing during decoding.
J. Biol. Chem. 283, 18801-18811 (2008)