

可逆的なRNAリン酸化修飾によるtRNAの構造安定化と生物の耐熱化

大平 高之, 蓑輪 恵一, 鈴木 勉

1. はじめに

リボ核酸 (ribonucleic acid: RNA) には多様な転写後修飾が含まれており, これらがRNAの発現量や機能を調節することで, さまざまな生命現象と密接に関わっている。最近, RNA修飾の研究はエピトランスクリプトミクスと呼ばれ, 生命科学のさまざまな分野から脚光を浴びている^{1,2)}。

同じ核酸であるDNAには, わずか数種類の修飾塩基が含まれているのに対して, RNAには, 現在までに約150種類にも及ぶRNA修飾がさまざまな生物種から見つかっている³⁾。これらは, 塩基やリボースのメチル化, アセチル化, 水酸化, 脱水環化, 硫化, セレノ化, 還元, 異性化, アミノ酸や糖の付加など, 化学的にバリエーションに富んでいる。RNA修飾の機能は多様であり, 未知の部分も多く残されている。物理化学的な側面において, RNA修飾は塩基やリボースの構造変化や, 局所的な疎水場や親水場の提供を行うことでRNAの高次構造の安定性や機能調節に寄与している⁴⁾。生化学的側面としては, RNA結合タンパク質との相互作用, RNA分解酵素からの保護, 遺伝暗号の解釈, 翻訳調節などに寄与している¹⁾。また, RNAの自己と非自己の識別にRNA修飾に関わることが知られ, 新型コロナウイルスのmRNAワクチンに含まれている1-メチルシュドウリジンは, 自然免疫応答を軽減することで抗原タンパク質の合成効率を高めている⁵⁾。図1に生物三界に分布するRNA修飾を示す。全生物界に共通しているRNA修飾よりも, 生物界固有のRNA修飾の方が多いことがわかる。多様なRNA修飾は, 生物が進化の過程で

獲得したRNAの機能と遺伝子発現制御機構の存在を示している。近年においても新規のRNA修飾が次々と発見され, RNA修飾のケミカルスペースは拡大し続けている¹⁾。

RNA修飾の欠損はヒトの疾患の原因になることが知られている。筆者らのグループは, ミトコンドリア病の原因がtRNAの修飾欠損を原因としていることを世界で初めて突き止め, RNA修飾病 (RNA modopathy) という疾患の新しい概念を提唱している^{1,6,7)}。その後, 多くの疾患がRNA修飾の欠失や異常によって生じることが明らかとなり, RNA修飾は新しい創薬や治療の標的として注目されている。

2. 好熱性生物とtRNA修飾

生物は, 地球上のさまざまな環境に適応し, 独自の生態系を築いている。熱水噴出孔や温泉の源泉といった高温環境にも生物は生息している。これら好熱性生物のうち, 最適生育温度が80°Cを超える生物は超好熱性生物と呼ばれる。超好熱性生物の多くは古細菌 (アーキア) という生物界に属しており, 進化系統樹の根本に位置することから, 原始生命体に近いと考えられている。これら好熱性生物では, タンパク質, ゲノムDNA, RNA, 膜脂質などの分子は熱によって変性しないようさまざまな方法により熱耐性を獲得している⁸⁻¹⁰⁾。

転移RNA (transfer RNA: tRNA) は, タンパク質合成の場であるリボソームにアミノ酸を選び込み, 自身の持つアンチコドンを通して伝令RNA (messenger RNA: mRNA) 上のコドンの特異的に認識し, アミノ酸に対応づけるアダプター分子である。tRNAのアンチコドン領域やコア領域にはRNA修飾が集中しており, コドン解釈の正確性やtRNA構造の安定性に寄与している。高温環境下でtRNAは容易に変性しうるのだが, 好熱性生物のtRNAは, グアノシンとシチジンの含量が多く, さまざまなRNA修飾によって高い耐熱性を獲得している^{8,11)}。興味深いことに, 環境温度に応じて修飾率がダイナミックに変動するRNA修飾が知られており, tRNA構造の柔軟性を調節することで, その環境温度におけるタンパク質の合成効率を最適化している¹²⁾。このようにRNA修飾は, 好熱性生物の生存戦略に大きく関わっている。本稿では, 筆者らが好熱性生物から見いだした可逆的なリン酸化修飾によるtRNAの

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1 工学部3号館7階7A08 鈴木研究室)

Reversible RNA phosphorylation stabilizes tRNA and contributes to cellular thermotolerance

Takayuki Ohira, Keiichi Minowa and Tsutomu Suzuki (Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, Suzuki Laboratory, Room 7A08 at 7th floor, Faculty of Engineering Building 3, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950238

© 2023 公益社団法人日本生化学会

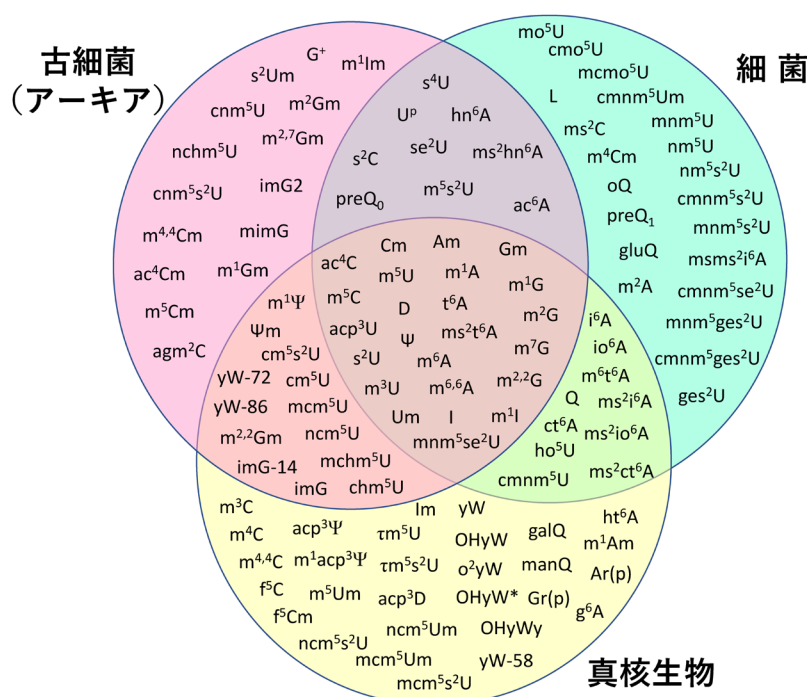


図1 生物三界におけるRNA修飾の分布

各修飾の記号はMODOMICSデータベース³⁾に従った。文献¹⁵⁾をもとに、本稿で紹介する2'-リン酸化ウリジン(U^p)を加えて作成した。

構造安定化機構と、生物の耐熱性との関連について紹介する¹³⁾。

3. 2'-リン酸化ウリジン (U^p) 修飾の機能と生物学的意義

1) U^p修飾の発見

*Sulfurisphaera tokodaii*は、大島泰郎博士らによって大分県別府温泉から単離された生育至適温度が75~80°C、生育至適pHを2.5~3とする好熱好酸性アーキアである¹⁴⁾。筆者らは、*S. tokodaii*から単離精製したtRNAについて高精度質量分析(RNA mass spectrometry: RNA-MS)による構造解析を行った結果、可変ループの47位に新規ウリジン修飾体を見つけ、生化学的な解析により、2'位がリン酸化された2'-リン酸化ウリジン(U^p)であることを明らかにした(図2A, B)。U^p修飾は、可変ループの長さが5塩基長のすべてのtRNAにみられ、82~100%と高い修飾率で導入されていた。意外なことにRNA内部領域におけるリン酸化修飾の報告はなく、驚くべき新発見であった。

2) U^p修飾はtRNAの立体構造を安定化する

U^p修飾の機能を調べるため、U^p修飾を酵素的に脱リン酸化したtRNAを調製し、融解温度を調べた。その結果、U^p修飾を持つtRNAは持たないtRNAと比較して、6.6°Cも融解温度が高いことが判明した(図2C)。また、U^p修飾を

持たないtRNAは高温条件下でRNA分解酵素に対する感受性が上がることが判明した(図2D)。これらの結果は、U^p修飾がtRNA構造を安定化していることを示している。さらに、U^p修飾によるtRNAの安定化機構をより詳細に解析するため、単離したtRNAを結晶化し、X線結晶構造解析を行い、1.9Åの高分解能の立体構造を得た。興味深いことに、一つの結晶格子中にコア構造の異なる二つのtRNA分子(Molecule A: Mol. AとMolecule B: Mol. B)がみられた。どちらの構造においてもU^p修飾の2'-リン酸基は溶媒側に突出し、反対にウラシル塩基はtRNAのコア領域側を向いていた(図2E)。また、Mol. Aが標準的なコア構造を持っていたのに対し、Mol. BではコアからG46が離脱しU^p47のウリジン塩基とスタッキングしていた。さらに、抜けたG46の代わりに下層からC9が持ち上がり、準安定なコア構造が形成されていた。これら二つの構造から、U^p47は主鎖の回転を防ぐことで、G46を受け止め、準安定なコア構造を安定化しtRNAの熱変性を防いでいることが示唆された。すなわち、U^p修飾は、tRNA構造を頑強に固めるのではなく、準安定な構造をとれるようにすることでtRNAの熱変性を食い止め、再び標準的なコア構造に戻る機会を増やす、いわば南京錠のように働いていると考えられる(図2E, F)。

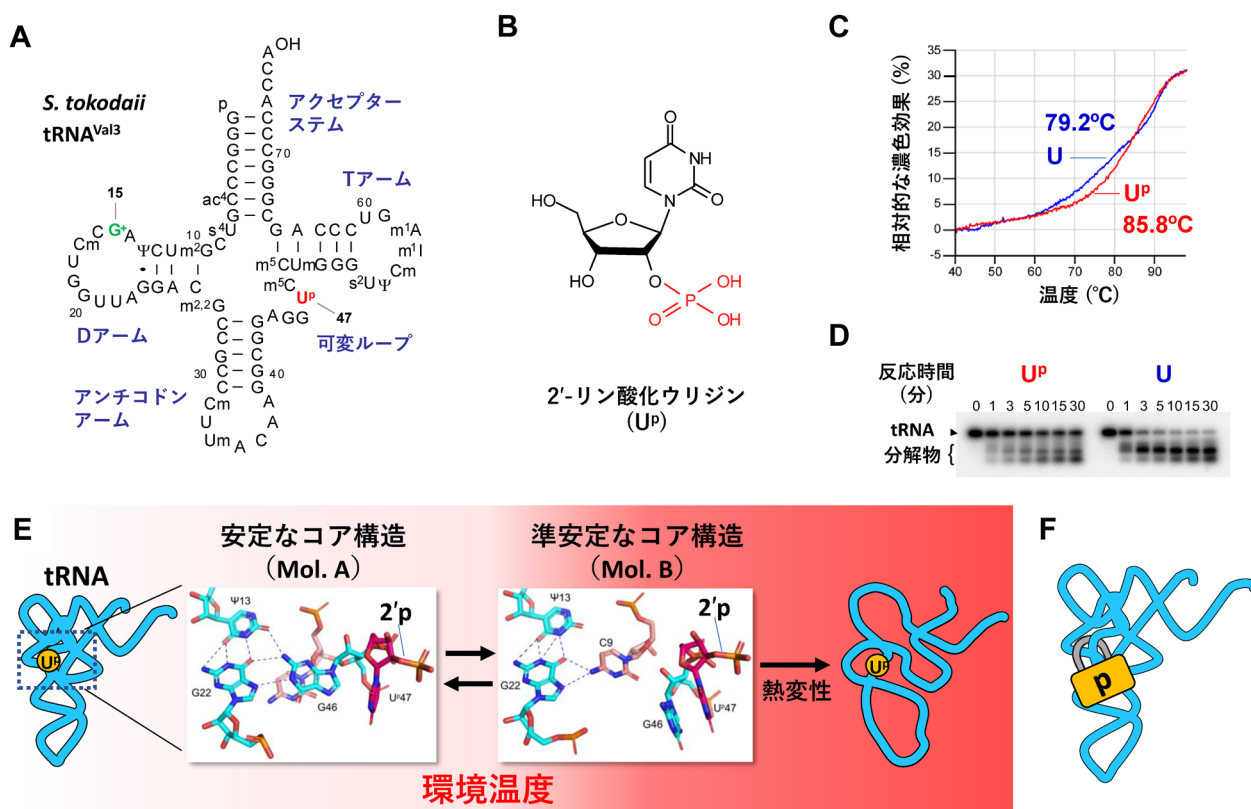


図2 U^p修飾はtRNAに熱安定性とRNA分解酵素に対する耐性を付与する

(A) *S. tokodaii* tRNA^{Val3}の二次構造. 47位のU^p修飾を赤字, 15位のアーケオシン (G⁺) 修飾を緑字で示す. (B) U^p修飾の化学構造. 2'-リン酸基を赤字で示す. (C) *S. tokodaii* tRNA^{Val3}の融解曲線. U^p修飾を持つものを赤線, 持たないものを青線で示す. (D) *S. tokodaii* tRNA^{Val3}のRNA分解酵素に対する感受性. (E) U^p修飾によるtRNAコア領域の安定化モデル. tRNAの熱変性はコア領域の崩壊から始まることから, Ψ13-G22-G46からなるベーストリプルからのG46の離脱は, 熱変性の中間状態とみなすことができる. U^p修飾が主鎖の回転を制限することでコア構造の安定化に寄与するだけでなく, コアから解離したG46をスタッキングによって受け止め, Ψ13-G22-C9からなる準安定なコア構造を安定化することで熱変性によるtRNAの崩壊を防ぐとともに, 再び標準的なコア構造に戻る機会を増やすと考えられる. (F) U^p修飾はtRNAにある程度の柔軟性を担保しながら主鎖の回転範囲を制限し, tRNAの崩壊を防ぐ南京錠のように働く.

3) U^p修飾酵素 ArkI は ATP 依存的に tRNA をリン酸化する

U^p修飾の生理学的な機能を明らかにするためには, U^p修飾酵素の特定が不可欠である. 筆者らは, さまざまな生物種におけるU^p修飾の有無を調べ, 比較ゲノム解析を行った. その結果, 機能未知のタンパク質リン酸化酵素が候補遺伝子として絞り込まれた. そこで, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるこの候補遺伝子の破壊株を作製し, LC/MS解析によりU^p修飾の有無を調べたところ, U^p修飾が消失していることが確認され, この遺伝子がU^p修飾酵素であることが判明した. 筆者らは, この遺伝子がアーキアに広く分布するRNAリン酸化酵素であったことから *arkI* (Archaeal RNA kinase) と命名した.

次に, ArkIによるtRNAリン酸化機構を解明するため, *T. kodakarensis*由来のArkI (TkArkI)を精製し, U^p修飾の試験管内再構成を行った. その結果, TkArkIはアデノシン5'-三リン酸 (adenosine 5'-triphosphate: ATP) をリン酸

基供与体としてtRNAをリン酸化することが判明した. 反応速度論的解析から, TkArkIはtRNAに対して高い親和性 (K_m 値 97 nM) を持つのに対し, ATPに対する親和性が特に低い (K_m 値 1.2 mM) ことが明らかとなった. この結果は, TkArkIが細胞内のATP濃度を感知してtRNAをリン酸化することを示唆する. さらに, TkArkIを結晶化し, そのX線結晶構造を1.8 Åの解像度で取得した. TkArkIは二つのローブからなり, 真核生物のタンパク質リン酸化酵素に類似していた. TkArkIの活性中心には, ATP結合モチーフやリン酸基転移に関与するモチーフが観察された. また, 活性中心の周りは正電荷の表面で覆われており, これらの正電荷はtRNAとの結合に必要であることが示唆された.

4) U^p修飾は好熱性アーキアの高温適応に寄与する

好熱性生物の生存におけるU^p修飾の重要性を調べるた

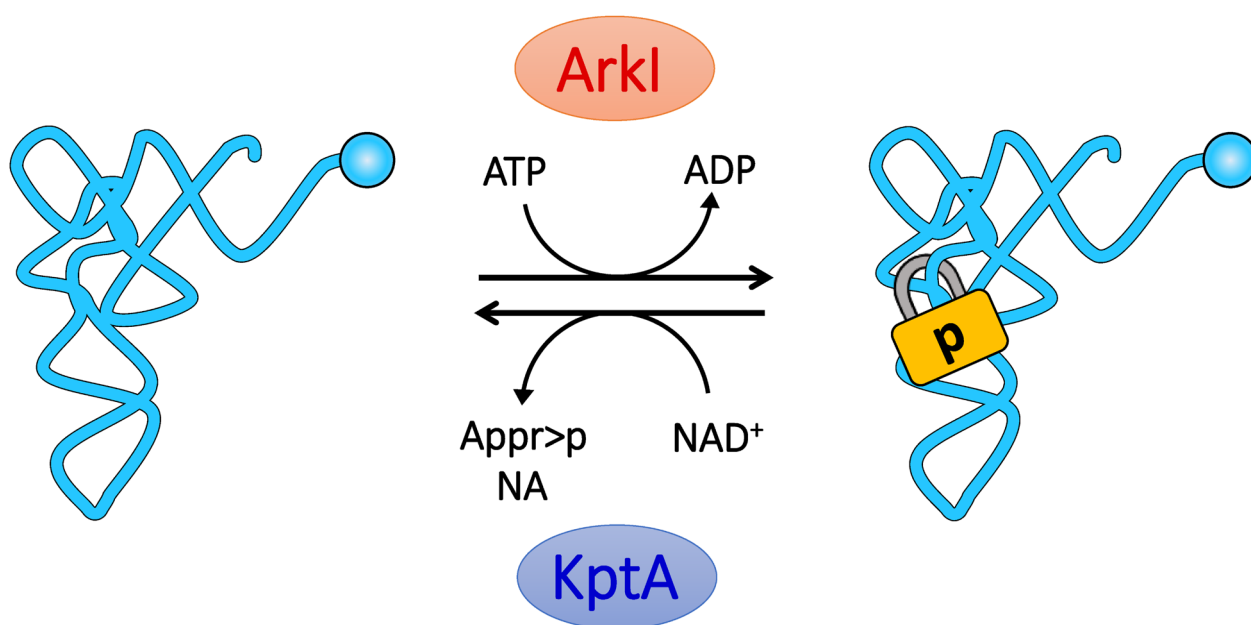


図3 ArkIとKptAによる可逆的なtRNAのリン酸化

tRNAはArkIによりU^p修飾（南京錠のマーク）を導入されることでコア構造がロックされ安定となる。一方、KptAがU^p修飾を外すことでコア構造が柔軟になる。ArkIはATPをリン酸基ドナーとして用い、tRNAをリン酸化する。その際、ADPが副産物として生じる。KptAはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（nicotinamide adenine dinucleotide : NAD⁺）をリン酸基アクセプターとして用いる。NAD⁺はU^p修飾から脱離したリン酸基と反応するとADP-ribose 1'',2''-cyclic phosphate (Appr>p) とニコチンアミド (nicotinamide : NA) を生じる。

め、野生株と *arkI* 遺伝子欠損 ($\Delta arkI$) 株の生育速度を比較した。その結果、野生株と比較して $\Delta arkI$ 株は87°Cと91°Cでは生育速度が低下しており、弱い高温感受性を示した。さらに、tRNA コア領域に剛直性を与えるアーケオシン修飾 (archaeosine : G⁺) を担う *queE* 遺伝子の欠損と *arkI* 遺伝子の欠損を掛け合わせた二重遺伝子欠損株では、87°Cにおいて $\Delta arkI$ 株よりも顕著な高温感受性を示し、U^p修飾がG⁺修飾と協調して超高温環境下での生育に必須の役割を担うことが示された。“南京錠”のように働くU^p修飾に対して、G⁺修飾はtRNAを剛直に固定するいわば“ネジ”のような働きがある。この結果は、tRNAが作用機序の異なる二つのtRNA修飾によって協調的に安定化されていることを示している。

5) U^p修飾は可逆的なRNA修飾である

ArkIを持つ生物には、2'-リン酸転移酵素であるKptAを同時に持つものが存在する。これは、これらの生物においてU^p修飾は可逆的である可能性を示唆する。そこで筆者らは、*T. kodakarensis* 由来のKptAを取得し、生化学的および反応速度論的解析を行った。その結果、KptAはU^p修飾を脱リン酸化する高い活性を持ち、tRNAに対するK_m値がTkArkIと同程度であることが判明した。次に、KptAが細胞内でU^p修飾を脱リン酸化するかどうかを調べるため、大腸菌内でArkIを発現しtRNAにU^p修飾を導入した状態

で、*T. kodakarensis* 由来のKptAの発現を誘導したところ、期待どおり、U^p修飾はKptAの発現に応じて減少し、KptAが細胞内でイレーサーとして機能することが示された。この結果は、タンパク質が可逆的なリン酸化による制御を受けているように、tRNAも可逆的なリン酸化による機能調節を受けているというエピトランスクリプトミクな遺伝子発現調節機構の存在を示唆する（図3）。超好熱性アーキアのような極限環境生物において、U^p修飾の可逆性は、tRNA構造の柔軟性をすばやく変化させることができるため、急激な環境温度の変化などに応じた遺伝子発現の調節に貢献していると考えられる。

4. おわりに

RNAは医薬開発における新しいモダリティとして注目されており、特にmRNAワクチンをはじめsiRNAやアプタマーなどに代表される核酸医薬が次々と実用化されている。RNA修飾は、細胞内におけるRNA医薬の安定性や自然免疫の回避などの重要な機能が知られている。本研究で報告したU^p修飾は、RNAの立体構造を局所的に安定化することができるため、将来的なRNA創薬への展開が期待される。

謝辞

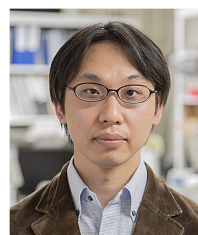
本研究で行われた構造解析の成果は、東京大学メディカル情報生命専攻の富田耕造教授のグループと、遺伝学解析の成果は、東京工業大学生命理工学院の福居俊昭教授らとの精力的な共同研究によってなしとげられたものである。この場を借りて感謝を申し上げたい。

文 献

- 1) Suzuki, T. (2021) The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 375–392.
- 2) Wiener, D. & Schwartz, S. (2021) The epitranscriptome beyond m⁶A. *Nat. Rev. Genet.*, **22**, 119–131.
- 3) Boccaletto, P., Machnicka, M.A., Purta, E., Piatkowski, P., Baginski, B., Wirecki, T.K., de Crécy-Lagard, V., Ross, R., Limbach, P.A., Kotter, A., et al. (2018) MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.*, **46**(D1), D303–D307.
- 4) Yokoyama, S. & Nishimura, S. (1995) in Modified Nucleosides and Codon Recognition in tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function (Söll, D. & Rajbandary, U.L. eds), pp.207–223, Wiley.
- 5) Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005) Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, **23**, 165–175.
- 6) Asano, K., Suzuki, T., Saito, A., Wei, F.Y., Ikeuchi, Y., Numata, T., Tanaka, R., Yamane, Y., Yamamoto, T., Goto, T., et al. (2018) Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease. *Nucleic Acids Res.*, **46**, 1565–1583.
- 7) Chujo, T. & Tomizawa, K. (2021) Human transfer RNA modopathies: diseases caused by aberrations in transfer RNA modifications. *FEBS J.*, **288**, 7096–7122.
- 8) Hori, H., Kawamura, T., Awai, T., Ochi, A., Yamagami, R., Tomikawa, C., & Hirata, A. (2018) Transfer RNA modification enzymes from thermophiles and their modified nucleosides in tRNA. *Microorganisms*, **6**, 110.
- 9) Kohli, I., Joshi, N.C., Mohapatra, S., & Varma, A. (2020) Extremophile: An adaptive strategy for extreme conditions and applications. *Curr. Genomics*, **21**, 96–110.
- 10) Trivedi, S., Gehlot, H.S., & Rao, S.R. (2006) Protein thermostability in Archaea and Eubacteria. *Genet. Mol. Res.*, **5**, 816–827.
- 11) Lorenz, C., Lunse, C.E., & Morl, M. (2017) tRNA modifications: Impact on structure and thermal adaptation. *Biomolecules*, **7**, 35.
- 12) Watanabe, K., Shinma, M., Oshima, T., & Nishimura, S. (1976) Heat-induced stability of tRNA from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 1137–1144.
- 13) Ohira, T., Minowa, K., Sugiyama, K., Yamashita, S., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Noguchi, R., Kaneko, A., Orita, I., Fukui, T., et al. (2022) Reversible RNA phosphorylation stabilizes tRNA for cellular thermotolerance. *Nature*, **605**, 372–379.
- 14) Suzuki, T., Iwasaki, T., Uzawa, T., Hara, K., Nemoto, N., Kon, T., Ueki, T., Yamagishi, A., & Oshima, T. (2002) *Sulfolobus tokodaii* sp. nov. (f. *Sulfolobus* sp. strain 7), a new member of the genus *Sulfolobus* isolated from Beppu Hot Springs, Japan. *Extremophiles*, **6**, 39–44.
- 15) McCown, P.J., Ruzkowska, A., Kunkler, C.N., Breger, K., Hulewicz, J.P., Wang, M.C., Springer, N.A., & Brown, J.A. (2020) Naturally occurring modified ribonucleosides. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **11**, e1595.

著者寸描

●大平 高之（おおひら たかゆき）



東京大学大学院工学系研究科 助教。博士（工学）

■略歴 1980年東京都に生る。2003年東洋大学生命科学学部卒業。05年東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻修士課程修了。10年東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻博士課程単位取得退学。13年学位取得。13年より現職。

■研究テーマと抱負 RNA修飾の機能や真核生物におけるtRNAの成熟化機構に関する研究を行う。多様な生命現象に貢献するエピトランスクリプトミクスの分子メカニズムを紐解き、遺伝子発現制御機構と生命進化の理解に繋げたい。

■ウェブサイト <http://rna.chem.t.u-tokyo.ac.jp/>

■趣味 散歩、コーヒー。

●養輪 恵一（みのわ けいいち）

会社員。博士（工学）。

■略歴 1994年神奈川県に生まれる。2017年東京大学工学部化学生命工学科卒業。19～22年日本学術振興会特別研究員DC1。22年東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻修了。同年より現職。