

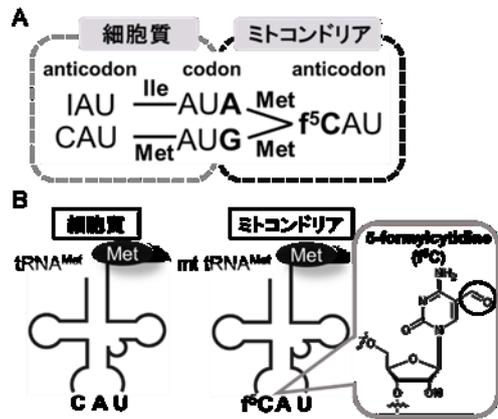
ミトコンドリア機能を保つヒト特異的 RNA 修飾の研究

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻

鈴木 健夫

1. はじめに

ヒトミトコンドリア tRNA (mt tRNA) に起こる転写後修飾はミトコンドリアゲノム(mtDNA) にコードされた呼吸鎖酵素複合体のサブユニットタンパク質が遺伝子から正常に翻訳されるために不可欠な要素である。ヒトミトコンドリアの遺伝暗号では、通常は Ile を指定する AUA コドンが Met に変化している(図1A)。mt tRNA^{Met} が AUA コドンを変則的に解読するには、アンチコドン1字目(ウォブル位)に 5-ホルミルシチジン修飾(f⁵C, 図1B)が必要であることが *in vitro* 翻訳アッセイにより報告されていた。f⁵C は NSUN3 による C から 5-メチルシチジン(m⁵C) へのメチル化、さらに ALKBH1 により m⁵C を水酸化した 5-ヒドロキシメチルシチジン(hm⁵C) を経る酸化による多段階反応によって生合成されること、また NSUN3 および ALKBH1 の遺伝子ノックアウト (KO) でミトコンドリアの機能が低下することが見出されている。



NSUN3やmt tRNA^{Met}の遺伝子変異はミトコンドリア病との関連が知られるが、f⁵Cが欠損しているか不明なケースが多い。またmt tRNA^{Met}は1種類のtRNAで翻訳の開始・伸長のどちらにも用いられる特徴を持つが、f⁵C欠損が翻訳の各過程におよぼす影響は不明であった。本研究課題では(1) mt tRNA^{Met}遺伝子に点変異を持つ患者細胞由来のmt tRNA^{Met}の解析や、修飾酵素・基質tRNAの変異体アッセイ等を通じ基質認識機構や酵素の特質を明らかにすることでf⁵C欠損と疾患との関わりを探究し、(2) 遺伝子KOでf⁵Cを欠いたmt tRNA^{Met}がミトコンドリアの翻訳プロファイルをどう変動させるか *in vivo* レベルで示すことで、細胞内におけるf⁵Cの役割の解明を目指す。

2. 結果

NSUN3による基質認識メカニズム

NSUN3メチル化における変異体アッセイのための材料を調製した。メチル化アッセイに十分な純度のHisタグ融合型組換えNSUN3を大腸菌で大量発現し、Ni-NTAクロマトグラフィーおよび、それ以降、ヘパリンクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムの順序で高純度に精製できる条件を決定した。立体構造未知なNSUN3によるmt tRNA^{Met}認識機構を理解するため、NSUN3のパラログNSUN6と基質tRNAとの共結晶構造(Liu, 2017, NAR)を参考に、NSUN3に存在するRRMモチーフ中の残基について1アミノ酸置換変異体を20種類作成した。これらの変異体について転写mt-tRNA^{Met}を基質にメチル化アッセイを進めており、途中経過であるがメチル化効率が低下する変異体を複数特定した(図2)。T7 RNAポリメラーゼを用いた転写合成で作成したmt-tRNA^{Met}変異体を作成し、メチル化効率への影響に

ついて評価した。現在のところ、tRNAのDアームやTアームなどの、修飾部位から遠位の構造的特徴を必要とせず、アンチコドンループの点変異に影響を受けやすいといった結果が得られており、引き続き評価を続けている。

疾患関連変異mt-tRNA^{Met}の修飾解析

mt-tRNA^{Met}遺伝子上の点変異A4435G(tRNAの37位がAからGへの置換)は母系遺伝性高血圧症と関連があることが報告されている(Zhou, 2018, JBC)。この変異tRNAの修飾状態を調べるため、A4435G患者細胞から作成したcybrid cellを樹立した上記グループと共同研究を展開し、cybridの分与を受けた。cybrid cellから変異mt-tRNA^{Met}を単離し、LC/MS

により修飾解析をおこなったところ、変異部位にあたるtRNAの37位に1-methylguanosine (m¹G)の修飾導入が新たに観測された。一般にm¹G37は翻訳におけるコドン解読過程の精度や効率を高く維持するために必要である。今回見いだされたような疾患関連点変異に伴い出現した、翻訳に正に寄与する修飾が変異tRNAのコドン解読に与える影響について、リボソーム結合アッセイを行うなど詳細な機能解析を進めている。

細胞ミトコンドリア内におけるfC修飾のコドン解読能の評価

fC欠損によるミトコンドリア翻訳への影響を解析するため、これまでに作成していたNSUN3及びALKBH1のKO細胞におけるミトコンドリアリボソームプロファイル(mito-RP、図3)の実施を、共同研究者との連携の元で試みた。mito-RPは、リボソームによって保護されたmRNA領域(フットプリント)を大規模シーケンスによって解析することで、各遺伝子の翻訳状態をコドンレベルの解像度で評価することができる。得られる結果は、fCが細胞内で実際にAUAコドンの解読を可能にしていることを示す初めての知見となることが期待される。実際にフットプリントのリードからリボソームAサイトに帰属されるコドンの種類と数を集計したところ、fCを欠損したKO細胞

においてミトコンドリアmRNA中のAUAコドンにおけるリード数カウントの蓄積が見られたことから、AUAコドン依存的な伸長過程の停滞が示唆された。

3. 今後の展望

NSUN3の機能喪失変異やmt-tRNA^{Met}の点変異における疾患が報告されている(Van Haute, 2016, Nat commun)。NSUN3および基質tRNAの変異体解析による基質認識機構の解明はfC欠損に基づく疾患に対する対処法の開発につながる可能性が考えられる。NSUN3と基質tRNAとの共結晶構造解析への挑戦によりNSUN3の基質認識機構の詳細な洞察につながると期待される。

mito-RPの実施から、fC欠損状態でのミトコンドリアタンパク質合成の伸長過程におけるAUAコドン解読能の抑制効果が見いだされた。開始過程に対する影響については更に詳細かつ多角的な解析を通じて影響を評価する必要がある。

A4435G患者細胞株から見いだされたm¹G37修飾について、機能評価のための更なる解析が必要である。患者cybrid由来もしくは転写合成tRNAにm¹G37修飾を酵素的に導入した変異型mt-tRNA^{Met}を用い

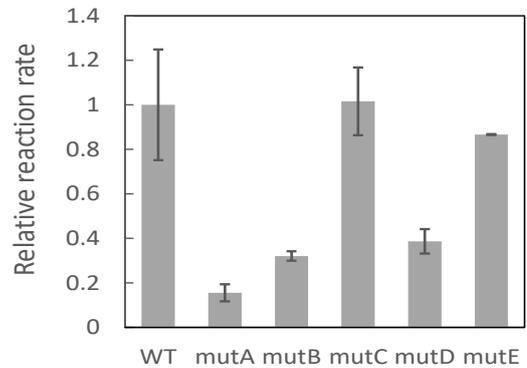


図2 NSUN3 変異体によるメチル化効率への影響

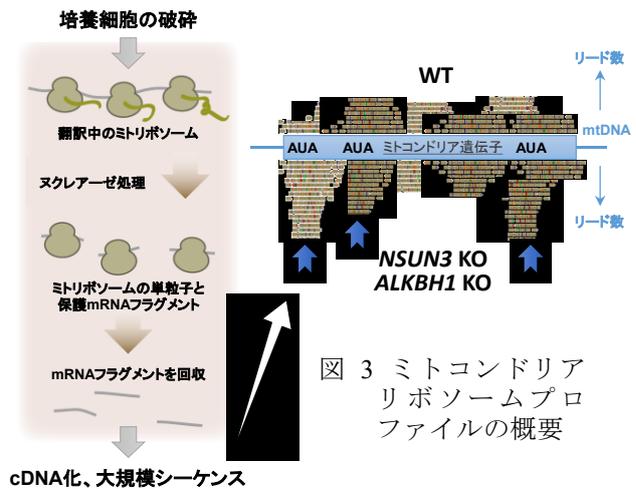


図3 ミトコンドリアリボソームプロファイルの概要

た、*in vitro* Aサイトバイディングアッセイ等を通じて分子機能の理解を進めている。更にFC欠損細胞で実施したケースと同様にmito-RPのデータを取得し、細胞内ミトコンドリアタンパク質合成におけるコドン認識能をtranslatomeレベルで解明し、修飾構造の機能と疾患の発症機序の解明に迫りたい。

4. 参考文献

1. Kawarada, L., Suzuki, T., Ohira, T., Hirata, S., Miyauchi, K. and Suzuki, T. (2017) ALKBH1 is an RNA dioxygenase responsible for cytoplasmic and mitochondrial tRNA modifications. *Nucleic Acids Res*, **45**, 7401-7415.
2. Nakano, S., Suzuki, T., Kawarada, L., Iwata, H., Asano, K. and Suzuki, T. (2016) NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNA(Met). *Nat Chem Biol*, **12**, 546-551.