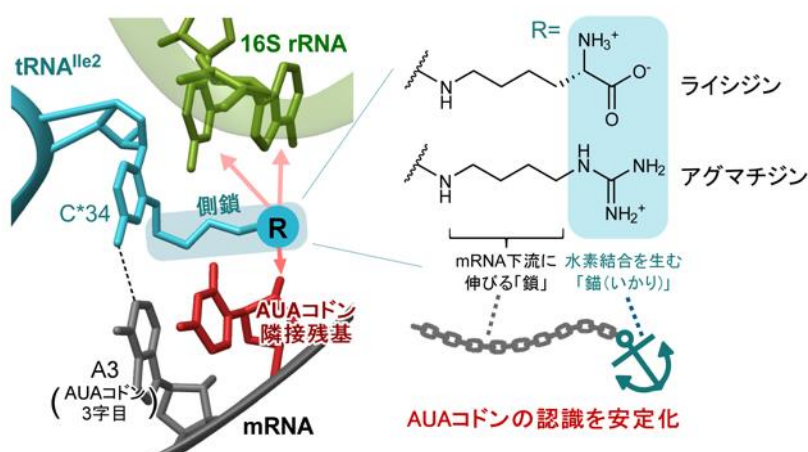


2024年3月27日
 東京大学
 理化学研究所
 科学技術振興機構（JST）

RNAの触手が遺伝暗号を読み解く！ ——tRNA修飾の新機能——

発表のポイント

- ◆ リボソーム上でタンパク質が合成される際に、tRNAの塩基修飾がmRNAの遺伝暗号を解読する様子を、クライオ電子顕微鏡を用いて可視化することに成功しました。
- ◆ tRNAに特徴的なシチジン修飾がリボソーム上でmRNAを正しく認識し、効率的にタンパク質を合成するしくみが明らかとなりました。
- ◆ 遺伝暗号の解読機構という生命の基本原理を解き明かした点で画期的な成果です。また将来的に合成生物学やtRNA創薬にも応用が期待されます。



長い側鎖を持つ tRNA のシチジン修飾がリボソーム上で mRNA を認識する

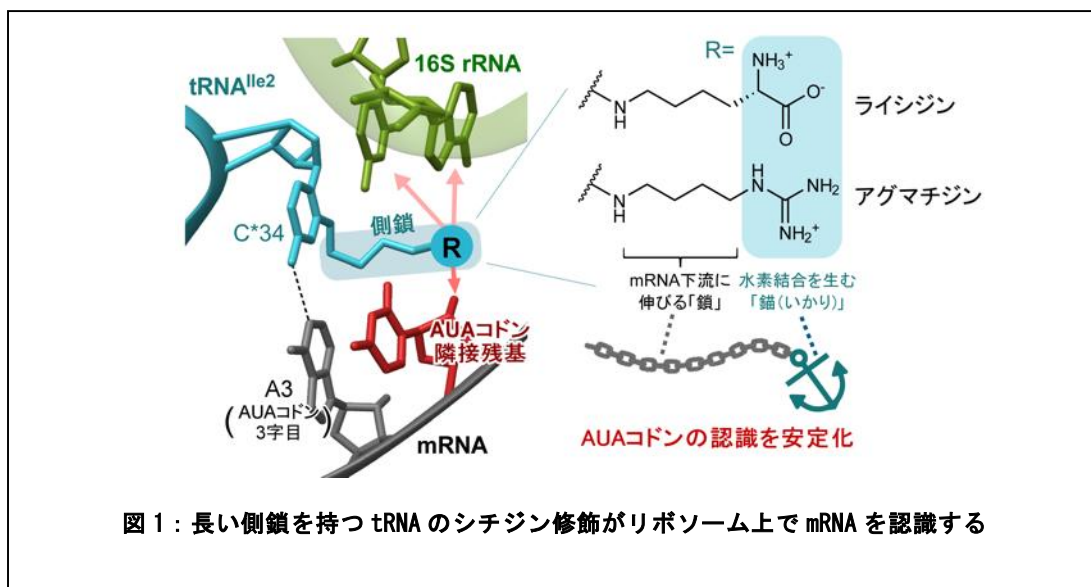
発表概要

東京大学大学院工学系研究科の秋山奈穂大学院生、鈴木勉教授の研究グループは、理化学研究所生命機能科学研究センターの石黒健介訪問研究員（研究当時、現：客員研究員／東京大学特任助教）、横山武司研究員（研究当時、現：東北大学助教）、白水美香子チームリーダーらとの共同で、クライオ電子顕微鏡（注1）を用いた構造解析により、リボソーム（注2）上で tRNA（注3）修飾が AUA コドン（注4）を解読するしくみを明らかにしました。

tRNAにはさまざまな化学修飾が含まれており、これらはタンパク質合成を行うために重要な役割を担っています。特に、アンチコドン領域に見られる修飾は、tRNAがmRNA上のコドンを読み取る能力を付与することで、正確かつ効率的なタンパク質合成を可能にしています。

細菌やアーキア（古細菌）では、AUA コドンをイソロイシン（Ile）に解読する tRNA（tRNA^{Ile2}）のアンチコドン1字目（34位）に特徴的なシチジン修飾（注5）を持っています。細菌の tRNA^{Ile2}

はライシジン (L) (図 1、2)、アーキアの tRNA^{Ile2} にはアグマチジン (agm²C) (図 1、2) と呼ばれるシチジン修飾を用いています。L と agm²C はいずれも長い側鎖の末端に塩基性の官能基を持つ特徴的な化学構造を持ちますが、AUA コドンを読解する際にこれらがどのような役割を担うかは明らかになっていませんでした。



本研究では、リボソーム上で細菌およびアーキアの tRNA^{Ile2} が AUA コドンを読解する様子を、クライオ電子顕微鏡を用い、高分解能な構造解析で明らかにしました。L と agm²C のシチジン環は、同一の配向で AUA コドンの 3 字目のアデニン塩基と 1 本の水素結合を形成することがわかりました (図 1)。また、L と agm²C の長い修飾側鎖が mRNA の下流に向かって伸び、末端の塩基性官能基が、AUA コドンの隣の残基と水素結合する様子が観察されました (図 1)。実際に、mRNA の変異体を用いた実験で、この水素結合が形成されないと、AUA コドンの認識効率が低下することが判明しました。

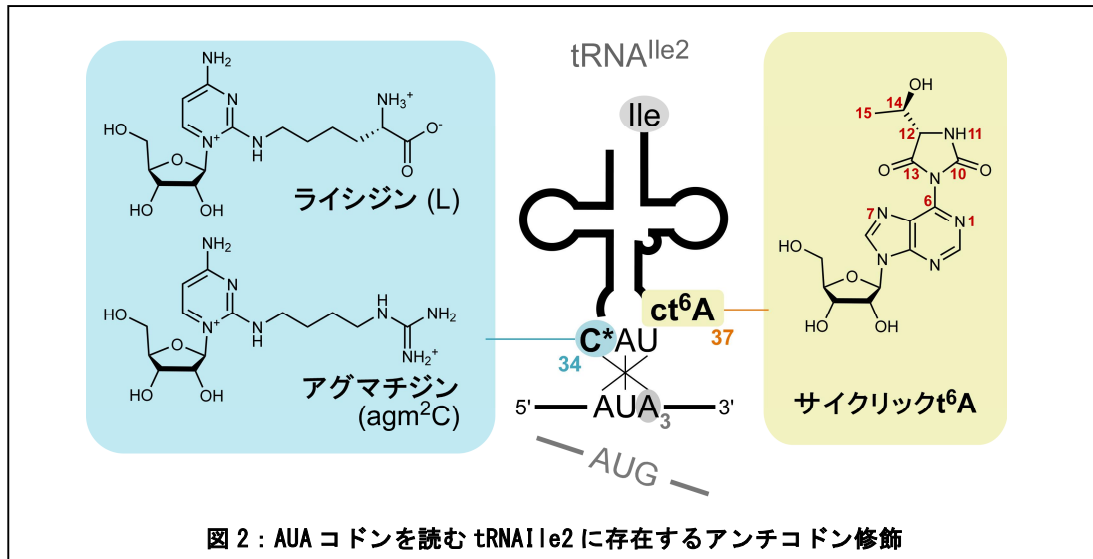
さまざまな tRNA 修飾がタンパク質合成の精度や効率に重要であることは知られていますが、具体的にどのようなしくみでその機能が発揮されるかは、よくわかっていませんでした。本研究は、細胞の生育に必須なシチジン修飾が、どのようにコドン解読を行うかを、分子レベルで解き明かしました。特に、tRNA 修飾の側鎖が、mRNA のコドン以外の残基と相互作用するという発見は、tRNA 修飾の全く新しい機能であり、生命科学の基本原則を解き明かした成果であると言えます。

発表内容

〈研究の背景〉

mRNA の塩基配列をタンパク質のアミノ酸配列に変換する「翻訳」は、すべての生物に必須の過程です。翻訳の精度は、リボソームにおいて tRNA が mRNA 上のコドンを如何に正しく認識するかに大きく依存しています。tRNA においてコドンの読み取りを行う 3 文字の塩基配列はアンチコドンと呼ばれ、さまざまな化学修飾を受けています。特にアンチコドン 1 字目 (34 位) の tRNA 修飾は、コドンとアンチコドンの相互作用を制御することにより、tRNA のコドン認識能を決定づけています (図 2)。さらに、アンチコドンの 3' 側の隣接部位である 37 位にも複雑な修飾が見られ、コドン-アンチコドン対合を安定化する働きが知られています (図 2)。これまで

に、さまざまな生物から多種多様な tRNA 修飾が見つっていますが、それらがいったいどのようにコドンとアンチコドンの相互作用に関与するかについては、理解が進んでいないのが現状です。



遺伝暗号の基本的なルールとして、3 字目がアデニンまたはグアニンのコドン (NNA または NNG) は 34 位にウリジン修飾を持つ tRNA によってまとめて解読され、同じアミノ酸に翻訳されます。しかし例外的に、AUA と AUG コドンは異なる tRNA によって別々に解読され、それぞれ Ile とメチオニン (Met) に翻訳されるため、これら 2 つのコドンは遺伝暗号の中でも最も読み分けが難しいことが知られています。そこで、生物は tRNA 修飾を用いて、AUA と AUG を正確に読み分けるシステムを築いています。

細菌およびアーキアなど原核生物は、AUA コドンを専属で読む tRNA^{Ile2} を持ち、その 34 位にはシチジン修飾 (C*) が存在します (図 2)。細菌の tRNA^{Ile2} は、リジンがシトシン 2 位に結合した L を持ち、アーキア tRNA^{Ile2} はアルギニン代謝物であるアグマチンがシトシン 2 位に結合した agm²C を持ちます (図 2)。L と agm²C は、いずれもシトシン環から長い側鎖が伸び、その末端に極性官能基があるという点で化学的性質が類似しています。ところが、これらは全く異なる種類の tRNA 修飾酵素によって導入されることが知られ、生命の共通祖先から細菌とアーキアが分岐した後で、^{しゅうれん}収斂進化 (注 6) によって獲得された tRNA 修飾であると考えられています。未修飾の tRNA^{Ile2} 前駆体はメチオニンを受容し、かつ CAU アンチコドンを持つため、AUG コドンを認識してメチオニンに翻訳し、あたかもメチオニン tRNA のように振舞います。tRNA^{Ile2} は修飾されたのちに、イソロイシンを受容するようになり、はじめて AUA コドンを認識できるようになります。したがって、L または agm²C 修飾は、tRNA^{Ile2} のアミノ酸受容能とコドン解読能の 2 つの性質を一度にスイッチさせる重要な働きがあります。L や agm²C の修飾酵素はいずれも必須遺伝子にコードされていることから、これらの tRNA 修飾は AUA コドンの解読に必須であり、生命の維持に不可欠であることが知られています。非常に重要な tRNA 修飾であるにも関わらず、L や agm²C がどのようなしくみで AUA コドンを解読するかについては、きちんと理解されていませんでした。

また、細菌や真菌、植物などの tRNA^{Ile2} には、アンチコドンに隣接する 37 位にサイクリック t⁶A (ct⁶A; cyclic N⁶-threonylcarbamoyladenosine) という、別の tRNA 修飾が見られます (図

2)。ct⁶Aは化学的に不安定ではあるものの、細胞内では高い割合でtRNAに導入されています。これまでに、ct⁶Aはコドン認識効率を向上させるという報告がありますが、そのしくみについては不明のままです。また、ct⁶Aは高高度なヒダントイン環（注7）を含んでおり、この特徴的な化学構造がどのようにコドン解読に関わるのか、という興味深い課題がありました。

〈研究の内容〉

本研究では、大腸菌およびアーキア的一种である *Haloarcula marismortui* から tRNA^{Ile2} を単離精製し、AUA コドンを含む mRNA およびリボソームと複合体を形成させ、クライオ電子顕微鏡 (300kV) により 2.3~2.7 Å (オングストローム、1Åは0.1ナノメートル) の高分解能で構造解析を行いました。リボソームのA部位 (注8) において、Lと agm²C のシトシン環はいずれも、AUA コドン 3 字目のアデニン (A3) と 1 本の水素結合を介した C-A 塩基対を形成することがわかりました (図 3A)。この対合様式においては、L または agm²C の修飾側鎖が、AUG コドン 3 字目のグアニン (G3) と空間的にぶつかるため、AUG コドンの誤認識を妨げていると考えられます。さらに、L および agm²C の修飾側鎖は mRNA の下流 (3' 側) に向かって伸び、その末端の極性官能基が AUA コドンに隣接する残基のリボース 2' -ヒドロキシ基と追加的に水素結合を形成する様子が観察できました (図 3A)。さらに agm²C は末端のグアニジノ基を介して A 部位

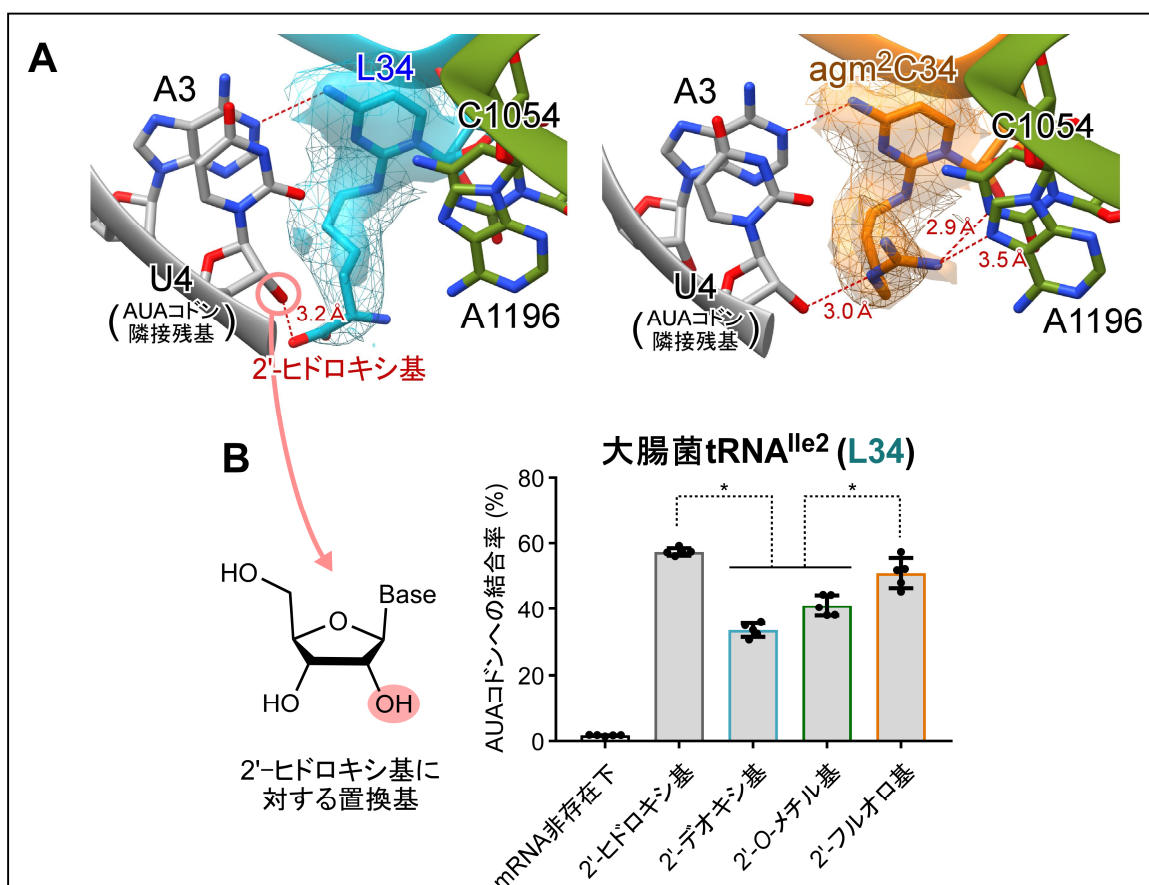


図 3: シチジン修飾による効率的な AUA コドン認識のしくみ

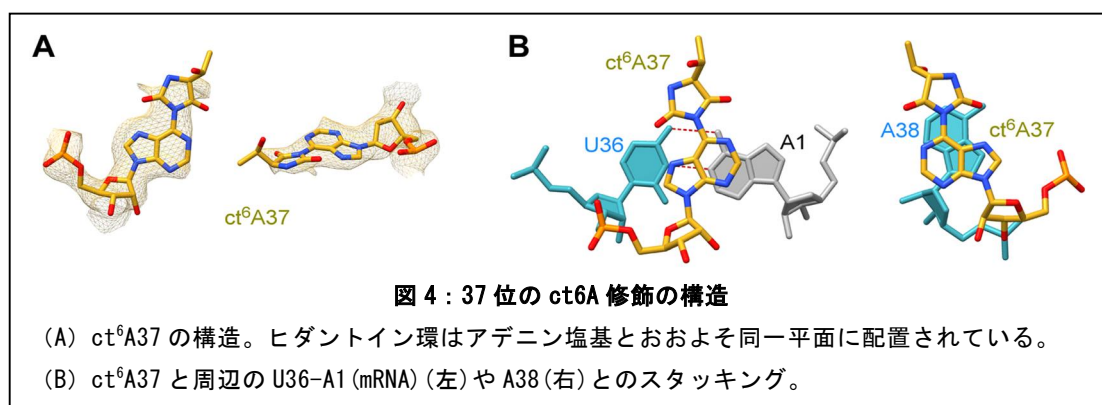
(A) AUA コドン を認識するライシジン (L34; 左)、アグマチジン (agm²C34; 右) の構造。

(B) 大腸菌 tRNA^{Ile2} の AUA コドン結合効率。AUA コドンに隣接する mRNA 4 字目の 2' -ヒドロキシ基に対し置換を加えている。データは平均値 ± 標準偏差で示した (n=5)。*p<0.01 (two-tailed Student's t-test)

周辺のリボソーム RNA (rRNA) と水素結合をつくり、コドン-アンチコドン対合をさらに安定化していることが示唆されました (図 3A)。これらの相互作用は、C-A 塩基対には 1 本しか水素結合がないため、この弱い対合を補強する役割があると考えられます。また、細菌とアーキアで AUA コドンの認識機構が保存されていることも明らかとなりました。

L および agm^2C の修飾側鎖と mRNA の相互作用が、実際に AUA コドン認識に影響を与えるかを調べるため、AUA コドンの 3' 隣接残基を置換した化学合成 mRNA を用いて、リボソーム上における $tRNA^{Leu2}$ の AUA コドン結合効率を評価しました (図 3B)。3' 隣接残基のリボースに 2' -デオキシ基および 2' -O-メチル基への置換を加えると、 $tRNA^{Leu2}$ の AUA コドンへの結合率が顕著に低下しました (図 3B)。一方で、同じ位置を 2' -フルオロ基に置換すると天然の mRNA 同様に、AUA コドンによく結合することがわかりました (図 3B)。2' -デオキシ基や 2' -O-メチル基は極性側鎖との水素結合を阻害し、2' -フルオロ基は水素結合のアクセプターとして働くので、極性側鎖との水素結合が可能になると考えられます。これらの結果は、シチジン修飾の極性側鎖とコドンに隣接する mRNA 残基との相互作用によって、tRNA による AUA コドンの解読が効率よく行われることを強く示唆します。シチジン修飾は生命に必須の tRNA 修飾でありながら、AUA コドンの解読に関してどのような役割を果たしているかわかっていませんでした。L や agm^2C のシチジン修飾において、mRNA の下流に手を伸ばす炭素鎖部分を「鎖」、周囲の mRNA や rRNA と水素結合を作る末端の極性基を「錨 (いかり)」に例えると、tRNA がリボソームに錨を下ろして、AUA コドンを認識しているように捉えることができます (図 1)。このような tRNA 修飾の機能は前例がなく、従来の概念を覆す発見です。

さらに、今回の構造解析によって大腸菌 $tRNA^{Leu2}$ の 37 位に存在する ct^6A 修飾を可視化することにも成功しました。 ct^6A のヒダントイン環がアデニン塩基部分とおおよそ同一平面に配置された構造をとることがわかりました (図 4A)。この結果から、 ct^6A は、嵩高いヒダントイン環をうまくアンチコドンループ内に収め周辺の塩基 (A38 など) とスタッキング効果 (注 9) を生むことにより (図 4B)、コドン-アンチコドン相互作用を安定化させる効果があると考えられます。



〈今後の展望〉

本研究の成果は、遺伝暗号の中でも読みわけが難しい AUA コドンの解読機構の謎に迫ったものであり、タンパク質合成の基本的なしくみや tRNA 修飾の機能を分子レベルで明らかにした成果と言えます。今後は、ヒトや他の生物種に見られる tRNA 修飾についても、同様の解析を行うことで、遺伝暗号解読機構の全体像を理解することが重要です。

発表者

東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻

秋山 奈穂 博士課程／日本学術振興会特別研究員

鈴木 勉 教授

理化学研究所 生命機能科学研究センター タンパク質機能・構造研究チーム

白水 美香子 チームリーダー

論文情報

〈雑誌〉 Nature Structural & Molecular Biology

〈題名〉 Structural insights into the decoding capability of isoleucine tRNAs with lysidine and agmatidine

〈著者〉 Naho Akiyama, Kensuke Ishiguro, Takeshi Yokoyama, Kenjyo Miyauchi, Asuteka Nagao, Mikako Shirouzu, *Tsutomu Suzuki

〈DOI〉 10.1038/s41594-024-01238-1

研究助成

本研究は、日本学術振興会 JSPS の特別研究員奨励費「原核生物における AUA コドン解読の分子基盤」(代表：秋山奈穂、23KJ0409)、基盤研究 (S)「RNA エピジェネティクスと高次生命現象」(代表：鈴木勉、26220205)、基盤研究 (S)「RNA 修飾の変動と生命現象」(代表：鈴木勉、18H05272)、新学術領域研究 研究領域提案型「ncRNA のケミカルタクソノミ」(代表：鈴木勉、26113003)、および科学技術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業 (ERATO)「鈴木 RNA 修飾生命機能プロジェクト」(研究総括：鈴木勉、JPMJER2002) などの支援を受けて実施されました。

用語解説

(注1) クライオ電子顕微鏡

生体分子の試料に低温下 (約-200°C) で電子線を照射し、その構造を観察できる電子顕微鏡。試料を水溶液中で瞬間凍結することで、生体内に近い環境で目的分子の構造解析を行うことができる。

(注2) リボソーム

RNA とタンパク質からなる複合体でタンパク質合成の場である。大小2つのサブユニットからなり、大サブユニットはペプチジル転移反応を、小サブユニットは mRNA と tRNA 間のコドン-アンチコドン対合を監視するといった重要な役割をもつ。

(注3) tRNA

Transfer RNA (転移 RNA)。タンパク質合成において、コドンとアミノ酸を対応させるアダプター分子として働く。70~90塩基長の短い一本鎖 RNA で、二次構造としては特徴的なクローバー葉様構造をとり、それが折りたたまれて L 字型の立体構造を取る。tRNA は 3' 末端に対応するアミノ酸を受容し、20種類のアミノ酸に対応して異なる tRNA 種が存在する。tRNA はコドンと対合するアンチコドンを持ち、リボソーム上で mRNA (伝令 RNA) 上のコドンと結合することで、対応するアミノ酸を伸長中のタンパク質へと導入する。

(注4) AUA コドン

コドンとは RNA の 4 種類の塩基 (A, U, G, C) が三つ組みになって構成される遺伝暗号の単位であり、 $4 \times 4 \times 4 = 64$ 通りのコドンが存在する。各コドンはタンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸およびタンパク質合成の終結を指定している。AUA コドンはイソロイシンを指定し、後出する AUG コドンはメチオニンを指定する。

(注5) シチジン修飾

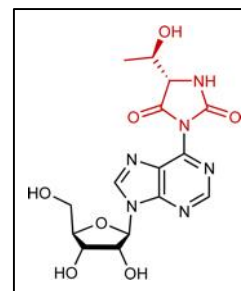
シチジンとは RNA を構成する 4 種類のヌクレオシドの 1 つであり、修飾されたシチジンのことを指す。

(注6) 収斂進化

異なる系統の生物や生体分子が、類似した形態に進化する現象。例えば、哺乳類のイルカと魚類のサメは、水中での生活に適応するために似通った形の尾ひれを獲得している。

(注7) ヒダントイン環

複素環式構造の一種。 ct^6A 修飾に含まれている分子骨格である。



(注8) A 部位

リボソームにおいて tRNA が結合する 3 つの部位の 1 つ。A 部位にはアミノアシル tRNA が結合し、ここで tRNA のアンチコドンがコドンを認識し、遺伝暗号の解読が行われる。

(注9) スタッキング効果

2 つの芳香環が積み重なるように配置するとき生じる相互作用。芳香環の π 電子同士が重なり合うことで分子間力を生じ、その配置を安定化する効果がある。

問合せ先

〈研究に関する問合せ〉

東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻

教授 鈴木 勉 (すずき つとむ)

E-mail : ts[at]chembio.t.u-tokyo.ac.jp

〈報道に関する問合せ〉

東京大学大学院工学系研究科 広報室

Tel : 03-5841-0235 E-mail : kouhou[at]pr.t.u-tokyo.ac.jp

理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 050-3495-0247 E-mail : ex-press[at]ml.riken.jp

科学技術振興機構 広報課

Tel : 03-5214-8404 E-mail : jstkoho[at]jst. go. jp

〈JST 事業に関する問合せ〉

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部 グリーンイノベーショングループ

古川 雅士（ふるかわ まさし）

Tel : 03-3512-3528 E-mail : eratowww[at]jst. go. jp