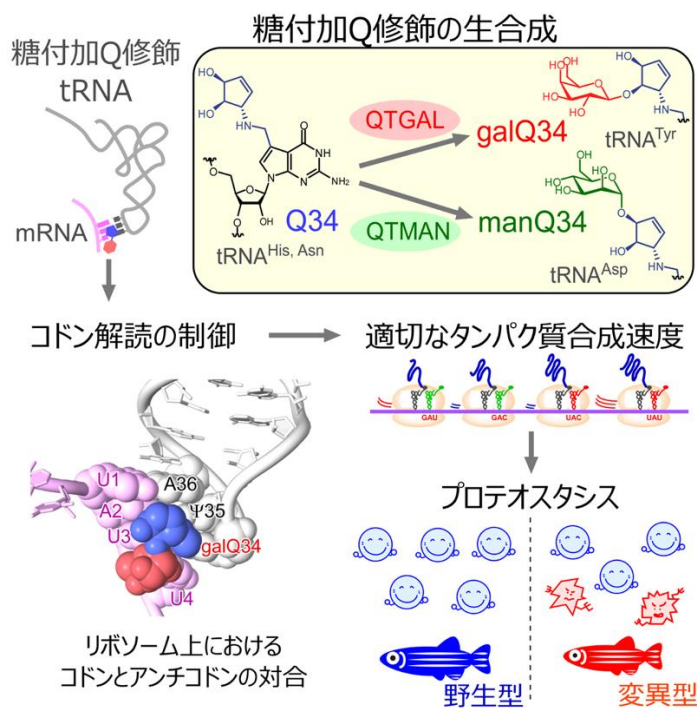


東京大学
科学技術振興機構 (JST)
理化学研究所
京都産業大学

tRNA の糖修飾がタンパク質合成速度を調節する

発表のポイント

- ◆ タンパク質合成に重要な役割を担う tRNA に糖（ガラクトースおよびマンノース）を付加する酵素を 2 種類同定しました。
- ◆ tRNA の糖付加修飾は適切な翻訳速度の調節を担うこと、またその分子基盤を明らかにしました。
- ◆ これらの tRNA 修飾の欠損はタンパク質の恒常性（プロテオスタシス）の異常を引き起こし、脊椎動物の正常な生育を妨げることが明らかとなりました。



tRNA の糖付加キューオシン (Q) 修飾が適切な翻訳速度を調節し正常なプロテオスタシスを保つ

概要

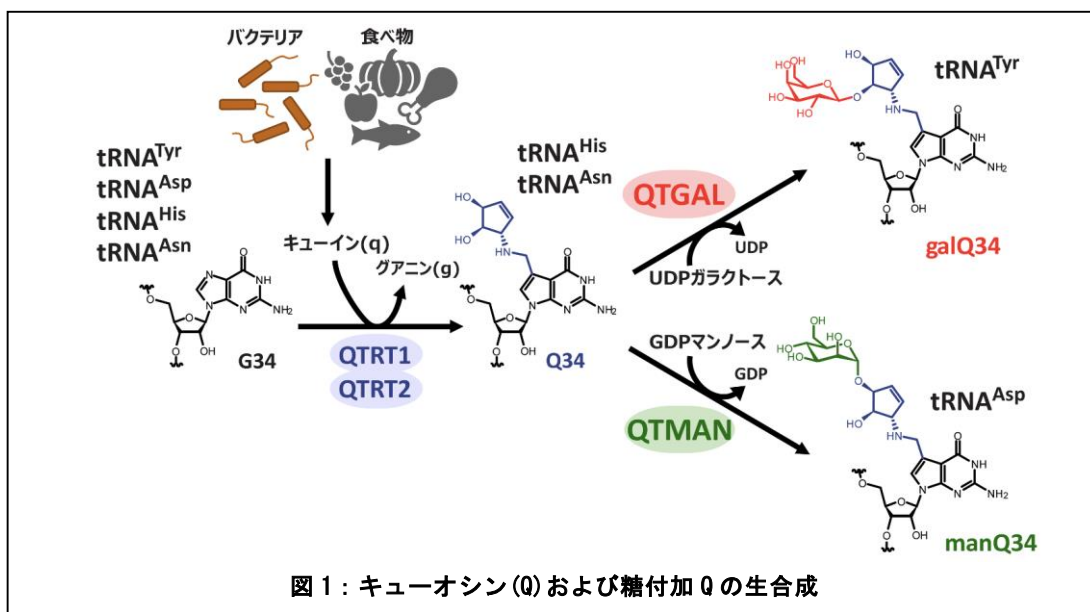
東京大学大学院工学系研究科の鈴木勉教授と鈴木健夫講師（研究当時、現：琉球大学医学部教授）の研究グループは、哺乳動物 tRNA（注 1）のキューオシン（Q）修飾（注 2）に糖（ガラクトースおよびマンノース）を付加する 2 種類の酵素、QTGAL および QTMAN を同定しました。研究グループは QTGAL および QTMAN の組換えタンパク質を取得し、生化学的な解析から、糖又

クレオチド（注3）を基質とする tRNA の糖付加 Q 修飾反応を再構成しました。また酵素の特徴から立体化学選択的な糖転移のしくみを明らかにしました。さらに速度論的な解析から、糖付加 Q 修飾が細胞内の糖ヌクレオチドの濃度によって制御される可能性を見出しました。次に、理化学研究所の岩崎信太郎主任研究員らと共同で、*QTGAL* および *QTMAN* の遺伝子破壊株のリボソームプロファイリング（注4）を行い、糖付加 Q 修飾は適切なコドン（注5）解読速度を調節する役割があることを見出しました。糖付加 Q 修飾による適切な翻訳速度の調節はプロテオスタシス（注6）の維持に重要な役割を担っていることも明らかになりました。理化学研究所の白水美香子チームリーダーらと共同で、クライオ電子顕微鏡（注7）を用いてヒトリボソームと tRNA の複合体の立体構造を解明し、糖付加 Q 修飾がコドン解読を制御する分子基盤を明らかにしました。さらに、京都産業大学生命科学部先端生命科学科の三嶋雄一郎准教授らとの共同研究により、*QTGAL* および *QTMAN* の欠損したゼブラフィッシュの変異体を作成し、その表現型の解析から、糖付加 Q 修飾が欠損すると生後の生育が遅れるという興味深い知見を得ました。また、糖付加 Q 修飾の欠損は統合的ストレス応答（Integrated Stress Response）（注8）を引き起こすこともわかりました。以上の結果から、tRNA の糖付加 Q 修飾は適切な翻訳速度を調節することでプロテオスタシスを維持し、個体の正常な生育に寄与することがわかりました。本成果は、ユニークな tRNA 修飾の生合成と機能の研究から、遺伝暗号の解読機構を明らかにした重要な研究成果です。また本成果を利用することで、将来的に、tRNA の機能を調節することにより、創薬にも応用できる可能性があります。

発表内容

〈研究の背景〉

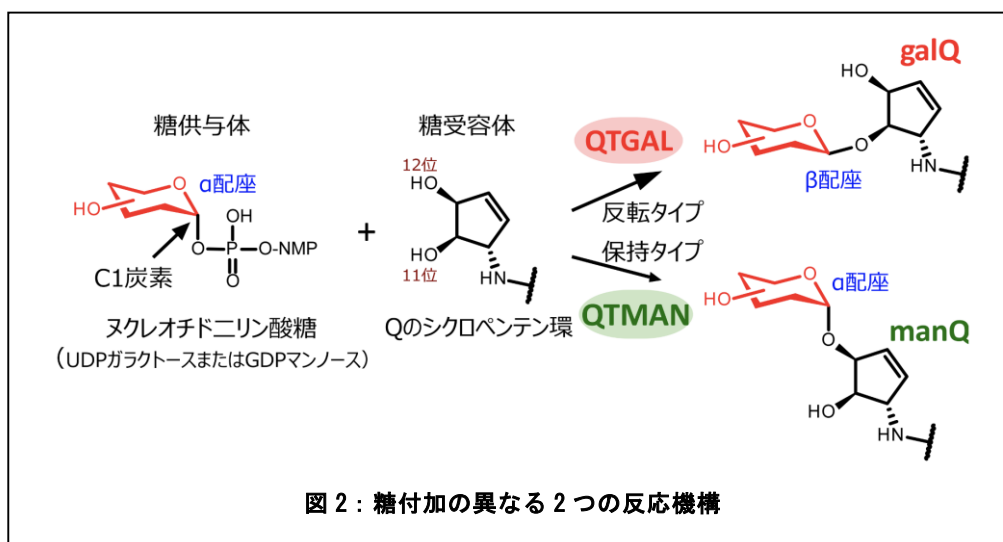
tRNA にはさまざまな化学修飾が含まれており、これらはタンパク質合成を行うために重要な役割を担っています。tRNA 修飾の欠損はさまざまなヒトの疾患の原因となることから、tRNA 修飾の生理的機能が注目されています。特に、tRNA のアンチコドン領域（34-36 位）に見られる修飾は、tRNA が mRNA 上のコドンを読み取る能力を付与することで、正確かつ効率的なタンパク質合成を可能にしています。Q は 7 デアザプリン骨格およびシクロペンテン環（注9）を持ったグアノシンの誘導體でバクテリアからヒトに至る多くの生物に見られる tRNA 修飾です（図1）。



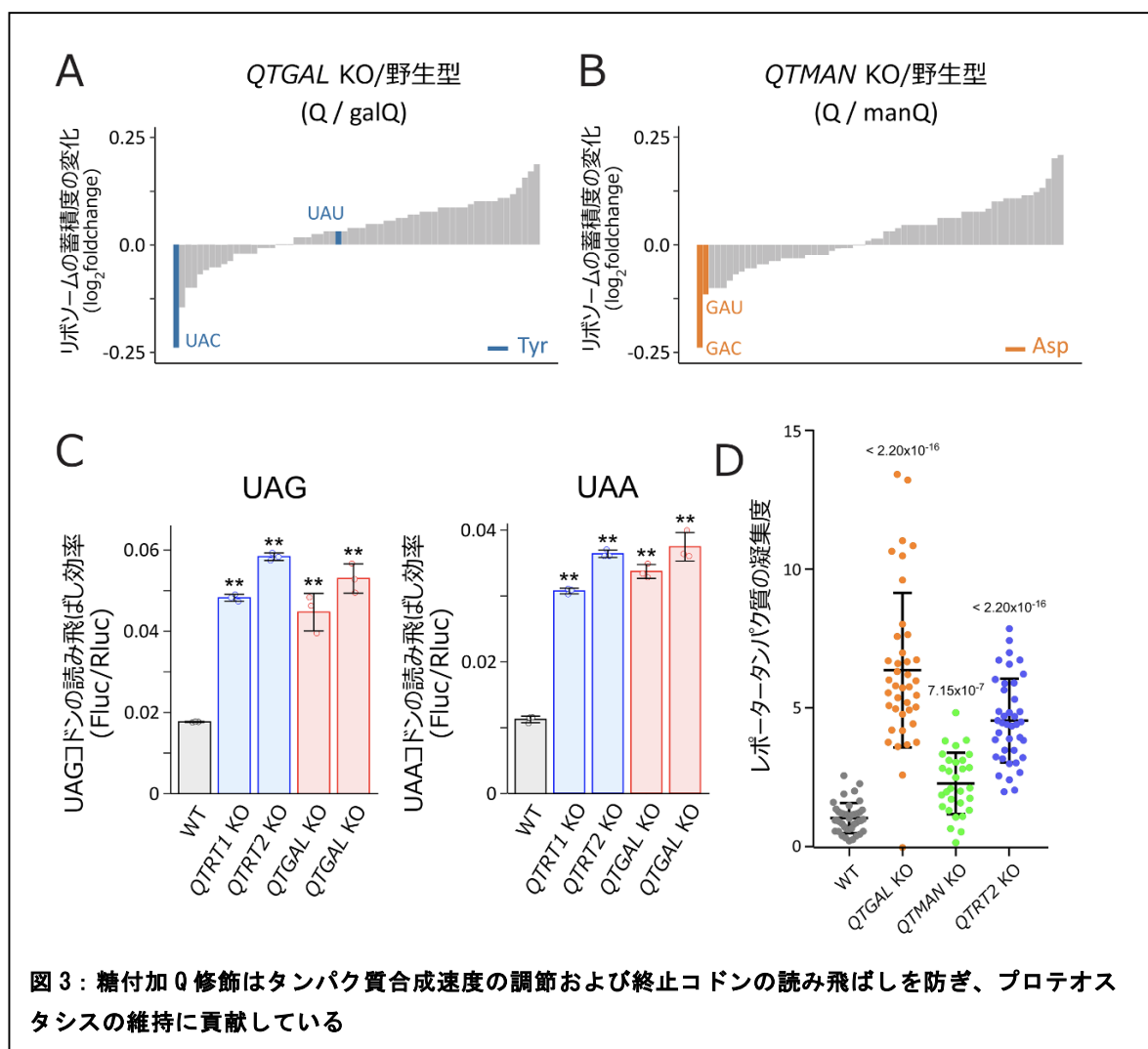
ヒトや脊椎動物はQの塩基部分であるキューイン (q) (注 10) を生合成することができませんが、バクテリアはqを生合成するため、ヒトは腸内細菌が合成したqや食物から栄養素として摂取したqを体内に取り込み、tRNAのQ修飾に利用しています(図1)。この反応は塩基の付け替えを触媒する酵素 QTRT1 と QTRT2 によって触媒されます。ヒトや脊椎動物は、4種類の細胞質 tRNA がQ修飾を持っていますが、このうち、チロシン (Tyr) に対応する $tRNA^{Tyr}$ ではQにガラクトースが付加されたガラクトシルキューオシン (galQ) に変換され、一方でアスパラギン酸 (Asp) に対応する $tRNA^{Asp}$ ではQにマンノースが付加されたマンノシルキューオシン (manQ) に変換されることが知られています(図1)。galQ や manQ は 1976 年に西村 暹 博士らの研究グループによって発見され、tRNA 修飾の中で糖が付与された稀有な修飾体として興味深い研究対象として知られてきましたが、その生合成や機能は約半世紀もの間、謎に包まれていました。

〈研究の内容〉

趙雪薇 (Xuewei Zhao) 大学院生 (研究当時) はラット肝臓の抽出液から、複数のカラムクロマトグラフィー (注 11) を用いた生化学的手法により、 $tRNA^{Tyr}$ のQ修飾にガラクトースを転移する酵素を同定し、キューオシン tRNA ガラクトース転移酵素 (QTGAL) と命名しました(図1)。また、馬丁 (Ding Ma) 大学院生 (研究当時) はブタ肝臓の抽出液を分画し、 $tRNA^{Asp}$ のQ修飾にマンノースを転移する酵素を同定し、キューオシン tRNA マンノース転移酵素 (QTMAN) と命名しました(図1)。QTGAL と QTMAN は、それぞれ UDP ガラクトースおよび GDP マンノースを基質として、galQ と manQ を生合成することがわかりました(図1)。糖転移反応は糖のC1炭素の立体配座が α 配座から β 配座へと反転する場合と、 α 配座のまま保持される場合があります(図2)。QTGAL は糖転移酵素のGT-Aフォールドを持つGT2ファミリー(注12)に属し、Qのシクロペンテン環の11位の水酸基にUDPガラクトースのC1炭素をSN2型の求核置換攻撃(注13)させることで、C1炭素の立体配座が β 配座へと反転しgalQが生成します(図2)。一方で、QTMAN はGT-Bフォールドを持つGT4ファミリーに属し、保持型の糖転移反応を触媒することで、Qのシクロペンテン環の12位の水酸基に α 配座のままマンノースが転移し、manQを生成します(図2)。QTMANによる酵素反応の速度論的な解析から、GDPマンノースに対するミカエリスメンテン定数(Km値)(注14)が $69\mu\text{M}$ と比較的高く、細胞内のGDPマンノース濃度($0.9\text{--}11\mu\text{M}$)を考慮すると、QTMANによるmanQ生成反応は細胞内のGDPマンノースの濃度で調節させている可能性が示唆されました。



また、研究グループは *QTGAL* と *QTMAN* それぞれの遺伝子を破壊したヒトの培養細胞 (*QTGAL* KO および *QTMAN* KO) を作成し、これらの KO 細胞から精製した tRNA には galQ および manQ がそれぞれ完全に消失することを確認しました。次に、研究グループは理化学研究所の岩崎信太郎主任研究員らと共同で、リボソームプロファイリングを行ったところ、*QTGAL* KO 細胞では、tRNA^{Tyr} が読むコドンのうち UAC コドンの翻訳速度が速くなり(図 3A)、*QTMAN* KO 細胞では tRNA^{Asp} が読む GAC と GAU コドンの翻訳速度が速くなることが判明しました(図 3B)。Q 修飾はリボソームの翻訳速度を速めることから、Q の糖付加修飾は早すぎる翻訳速度を制御する役割があることがわかりました。また、tRNA^{Tyr} は稀に UAG と UAA の終止コドンを読み飛ばす働きがあることから、KO 細胞にレポーター遺伝子を導入し、読み飛ばしの効率を測定したところ、galQ のガラクトース付加修飾に終止コドンの読み飛ばしを防ぐ役割があることがわかりました(図 3C)。次に、レポータータンパク質の凝集度を計測したところ、いずれの KO 細胞においても凝集したタンパク質が蓄積したことから(図 3D)、糖付加 Q 修飾はプロテオスタシスの維持に重要な役割を担っていることがわかりました。一般に、適切な翻訳速度の調節は新生タンパク質の正しい折りたたみ(フォールディング)と健全なプロテオスタシスに必要であることが知られています。したがって、糖付加 Q 修飾は適切な翻訳速度を調節することで、プロテオスタシスの維持に重要な役割を担っていると考えられます。



次に、理化学研究所の白水美香子チームリーダーらと共同で、リボソームと tRNA 複合体の構造解析を行いました。石黒健介訪問研究員（研究当時、現：東京大学特任助教）はヒト細胞から精製したリボソームに修飾状態の異なる tRNA を結合させて、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を行いました（図 4AB）。その結果、Q 修飾のシクロペンテン環は水素結合を介してコドン-アンチコドン対合が形成する二重らせんの主溝に結合し、主溝結合基（major groove binder）（注 15）として機能することで、コドン認識の効率を上げていることが明らかになりました（図 4C）。特にこの効果はコドン 3 字目が U を持つ、UAU や GAU コドンの際に効果が高いこともわかりました。一方で、Q の糖付加は、シクロペンテン環を回転させることでこの効果を弱めることが判明しました（図 4D）。以上の構造生物学的な知見は、糖付加 Q 修飾が適切な翻訳速度を調節するという機能を、分子レベルでわかりやすく説明しています。

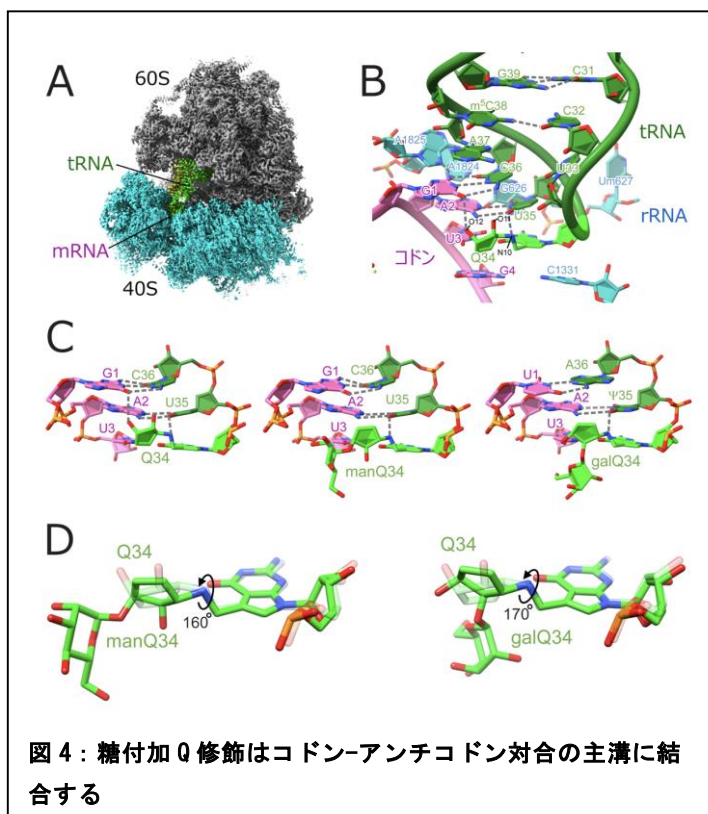


図 4：糖付加 Q 修飾はコドン-アンチコドン対合の主溝に結合する

さらに京都産業大学の三嶋雄一郎准教授らは、ゼブラフィッシュを用いて、*qtgal* および *qtman* のノックアウト系統を作成しました。これらの変異体は正常に胚発生しますが、野生型と比較して生後の成長速度が顕著に遅く、体長が短いという表現型を示しました（図 5A）。さらに *qtgal*/K0 系統では、eIF2 α のリン酸化（注 16）が顕著に亢進していることが判明しました（図 5B）。これは、適切な翻訳速度が乱れたことにより、タンパク質のフォールディング異常を検知し、統合的ストレス応答が作動していることを示唆しています。

以上の結果から、糖付加 Q 修飾はゼブラフィッシュの健全な生育に必要であることが判明しました。

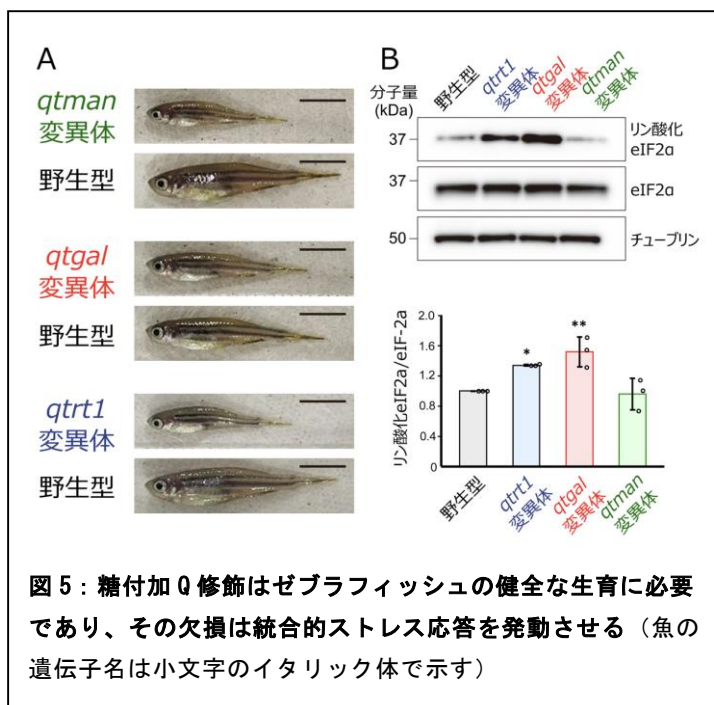


図 5：糖付加 Q 修飾はゼブラフィッシュの健全な生育に必要であり、その欠損は統合的ストレス応答を発動させる（魚の遺伝子名は小文字のイタリック体で示す）

〈今後の展望〉

本研究により、糖付加 Q 修飾が適切な翻訳速度を調節することで、プロテオスタシスを維持し、健全な生理機能の発現に貢献することが明らかになりました。この成果は、遺伝暗号の解読という生命の根源に関わる古典的な命題を解き明かしたという点で画期的であると言えます。UDP ガラクトースや GDP マンノースなどの糖ヌクレオチドは細胞の栄養状態やストレス環境下で変動することが知られています。特に、速度論的解析から、QTMAN による manQ 修飾反応は細胞内の GDP マンノースの濃度変化に影響を受ける可能性が示唆されました。また、糖代謝の異常に起因する各種疾患においても、糖付加 Q 修飾が影響を受けることが発症のひとつの原因となっている可能性もあります。今後は糖付加 Q 修飾が担う、より詳細な生理機能を明らかにするために、ノックアウトマウスの解析を進める予定です。また、tRNA は創薬における新しいモダリティとして注目されています。本研究成果は将来的に、tRNA の機能を調節するためのツールとしても利用できる可能性を秘めています。

発表者・研究者等情報

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻

鈴木 勉 教授

鈴木 健夫 研究当時：講師

現：琉球大学医学部 教授

石黒 健介 特任助教

研究当時：理化学研究所 訪問研究員

理化学研究所

岩崎 信太郎 主任研究員

白水 美香子 チームリーダー

京都産業大学生命科学部先端生命科学科

三嶋 雄一郎 准教授

論文情報

雑誌名：Cell

題名：Glycosylated queuosines in tRNAs optimize translational rate and post-embryonic growth

著者名：Xuewei Zhao⁺, Ding Ma⁺, Kensuke Ishiguro⁺, Hironori Saito, Shinichiro Akichika, Ikuya Matsuzawa, Mari Mito, Toru Irie, Kota Ishibashi, Kimi Wakabayashi, Yuriko Sakaguchi, Takeshi Yokoyama, Yuichiro Mishima, Mikako Shirouzu, Shintaro Iwasaki, *Takeo Suzuki, and *Tsutomu Suzuki
(+These authors contributed equally)

DOI：10.1016/j.cell.2023.10.026

研究助成

本研究は、基盤研究(S)「RNA エピジェネティッ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 のケミカルタクソミ」(代表:鈴木勉、26113003)、若手研究(A)「希少 RNA 修飾はなぜ存在するのか? ヒトにおける役割から探る」(代表:鈴木健夫、26702035)、基盤研究(B) 希少な RNA 修飾の機能究明と動的調節機構の提唱(代表:鈴木健夫、18H02094)、基盤研究(B) ヒトに特有な希少 RNA 修飾の分子・生理機能の探求(代表:鈴木健夫、22H02208)、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) 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2) キューオシン (Q) 修飾

tRNA のアンチコドン 1 字目に存在する転写後修飾の一種で、1970 年代に西村 暹^{すずむ}博士らの研究グループによって発見され、化学構造(注9 図参照)が決定された。

(注3) 糖ヌクレオチド

細胞内のメタボライトであり、さまざまな糖転移反応における糖の供与体として用いられる。UDP ガラクトースおよび GDP マンノースはそれぞれガラクトースとマンノースの転移に使用される。

(注4) リボソームおよびリボソームプロファイリング

リボソームは 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持つ。リボソームプロファイリングは細胞や組織から翻訳途中のリボソームを抽出し、リボソームと結合している mRNA の配列を同定することにより、どの遺伝子がどの程度の効率で翻訳されているかを知る解析法。コドンごとに翻訳の速度を見積もることが可能である。

(注5) コドン

遺伝暗号の基本単位。RNA の 4 種類の塩基が 3 つ組になり、64 通りのコドンが定義される。このうち 61 個のコドンはタンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸に対応し、3 個のコドンがタンパク質合成の終結を指定する。この記事で登場する UAU と UAC コドンは Tyr を指定し、GAU と GAC コドンは Asp を指定している。

(注 6) プロテオスタシス

タンパク質が翻訳されてフォールディングをして、機能してから、最終的に分解される過程におけるタンパク質の恒常性。タンパク質合成の適切な翻訳速度の調節が新生タンパク質の正しいフォールディングと健全なプロテオスタシスに必要であることが知られている。

(注 7) クライオ電子顕微鏡

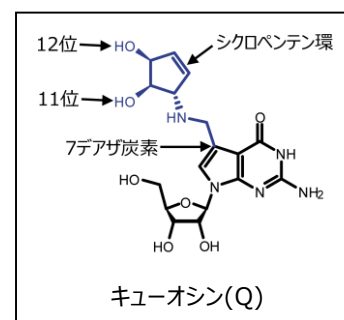
生体分子の試料に低温下（約-200°C）で電子線を照射し、その構造を観察できる電子顕微鏡。試料を水溶液中で瞬間凍結することで、生体内に近い環境で目的分子の構造解析を行うことができる。

(注 8) 統合的ストレス応答 (integrated stress response)

細胞が、ウイルス感染、小胞体ストレス、栄養飢餓、ヘム欠乏などのストレスにさらされた際に、リン酸化酵素が活性化され、翻訳開始因子の1つである eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α) をリン酸化することにより、キャップ依存的な翻訳開始反応が阻害されるという進化的に保存された細胞内シグナル伝達経路。

(注 9) 7 デアザプリン骨格およびシクロペンテン環

Q の塩基 (キューイン) はグアノシンの誘導体であるが、グアノシンの 7 位の窒素が炭素に置換された 7 デアザプリンになっている (右図参照)。さらに 7 位の炭素から側鎖が伸び、シクロペンテン環と呼ばれる 5 員環が特徴的な側鎖として結合している (右図参照)。



(注 10) キューイン (q)

Q の塩基部分 (右図参照) の名称。

(注 11) カラムクロマトグラフィー

筒状の容器にさまざまな性質の充填剤をつめ、そこに適切な溶媒と共に細胞抽出液を流し、タンパク質ごとに充填剤との親和性や分子量の差異などを利用して分離を行う精製法のひとつ。

(注 12) GT-A フォールド、GT2 ファミリー

ヒトのゲノムには 230 種類の糖転移酵素がコードされており、これらは 45 種類のファミリーに分類される。GT2 や GT4 ファミリーはこの中に含まれる。タンパク質の構造から糖転移酵素は GT-A、GT-B、GT-C と呼ばれる 3 種類に分類され、このうち GT-A および GT-B フォールドを持つ糖転移酵素は糖ヌクレオチドを用いることが知られている。

(注 13) SN2 型の求核置換攻撃

有機化学における反応の一種で、求核剤が反応の中心となる求電子剤に対して求核攻撃し、脱離基が脱離する反応。この際に求核剤が炭素原子に対して、脱離基の背面から攻撃するため、生成物の立体化学が反転する。本研究では、Q のシクロペンテン環の水酸基が求核剤であり、糖ヌクレオチドの C1 炭素に求核攻撃することで、糖がシクロペンテン環に転移し、ヌクレオチドニリン酸が脱離する。したがって、C1 炭素の立体が α 配座から β 配座に反転する。

(注 14) ミカエリスーメンテン定数 (K_m 値)

酵素反応速度論において、基質濃度と反応速度を記述する関数で使用する定数。一般に K_m 値といい、最大反応速度の半分の値を与える基質濃度である。便宜的には酵素と基質の親和性の指標として使用され、 K_m 値が小さいほど、酵素と基質の親和性が高い。

(注 15) 主溝結合基 (major groove binder)

コドン-アンチコドン対合で形成される RNA の二重らせんの主溝 (メジャーグループ) に結合する部位 (シクロペンテン環) をこのように表現している。

(注 16) eIF2 α のリン酸化

統合的ストレス応答によって活性化されたリン酸化酵素が翻訳開始因子である eIF2 α をリン酸化することでキャップ依存的な翻訳開始反応が阻害される。

問合せ先

(研究内容については発表者にお問合せください)

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)

東京大学大学院工学系研究科 広報室

科学技術振興機構 広報課

理化学研究所 広報室 報道担当

京都産業大学 広報部

〈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)