

# RNA修飾と生命現象

鈴木 勉

RNAは転写後に多様な修飾を受けることが知られている。現在までに、約150種類程度のRNA修飾がさまざまな生物種から見つかっている。最近ではRNA修飾の研究をエピトランスクリプトミクスと呼び、転写後段階における新しい遺伝子発現調節機構として、生命科学に大きな潮流を生み出している。

RNA修飾がタンパク質のリン酸化のようにダイナミックに変動し、RNAの機能を調節するかについては、多くの研究や議論があるが、きちんとした結論が得られていない。我々は、細胞がRNA修飾の基質であるメタボライトの濃度を感知することで、修飾率がダイナミックに変動する現象を捉えた。また、RNA修飾の欠損が疾患の原因になることも明らかになり、RNA修飾病という概念が生まれつつある。本稿では、筆者らの最近の研究成果を中心に、RNA修飾が遺伝子発現や生命現象にどのように関わっているかについて解説する。

## 1. はじめに

遺伝子発現の調節はあらゆる生命現象の源である。実際に、この調節機構の乱れはさまざまな疾患の原因になることが知られている。したがって、生命現象を理解するためには、細胞の中で遺伝子発現がどのように制御されているかを明らかにする必要がある。また、この知見は医療や創薬などへの応用研究にも貢献することが期待される。RNAは、長らくDNAにコードされた遺伝情報をタンパク質へと変換する過程を仲立ちする分子として、その役割が知られてきたが、近年の研究で、RNAは遺伝子発現を転写や翻訳の各段階で調節することでさまざまな生命現象に関わることが明らかになりつつある。

ゲノム配列が整備されたことに加え、次世代シーケンス技術(NGS)の登場により、RNAを配列情報や遺伝子の発現情報として捉えるトランスクリプトーム研究が盛んに行われている。しかし、RNAには転写後に付与される塩基の修飾やエディティング、末端構造といった質的な情報が含まれている。現在までに、約150種類のRNA修飾がさまざまな生物種から見つかっている<sup>1)</sup>。これらの修飾は

あらゆるRNAに普遍的に存在し、RNAが機能する上で欠くことのできない重要な質的情報である。塩基やリボースのメチル化に始まり、アセチル化、水酸化、硫化、セレノ化、還元、異性化、脱水環化、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ださまざまな修飾体が見つかっている。ここ数年でも、我々を含むいくつかのグループから新規のRNA修飾(図1)が報告されており、解析方法の発展とともにRNA修飾のケミカルスペースはさらに拡大することが期待されている。わずかに数種類のDNA修飾と比較して、RNA修飾ははるかに多様であり、進化の過程において、RNAが新たな機能を担うためにRNA修飾を獲得したと捉えることもできる。

物理化学的な側面において、RNA修飾は、塩基やリボースのコンホメーションの固定や、局所的な疎水場や親水場を提供する。また、RNAの高次構造の形成や安定化に関与することも知られている。生化学的な側面においては、RNA結合タンパク質との相互作用、RNAプロセシングの制御、遺伝暗号の解読、遺伝情報の変化、翻訳調節などに関与する。また、RNA修飾は、RNAの細胞内局在を決定する目印としても働いている。自然免疫の受容体は、RNA修飾を識別することで自己と非自己を認識することが知られている。しかし、RNA修飾の機能は多様であり、未解明な部分が多く残されている。

RNA修飾の研究は歴史が古く、日本が大きな貢献を果たしてきた分野でもある。tRNAやrRNAなどの比較的存在量の多いRNAを対象に研究が行われてきたが、最近では、NGSを利用したエピトランスクリプトームシーケンス技術の発展により、真核生物mRNAにも5'末端の

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

**RNA modification and biological phenomenon**

**Tsutomu Suzuki** (Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, the University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920431

© 2020 公益社団法人日本生化学会

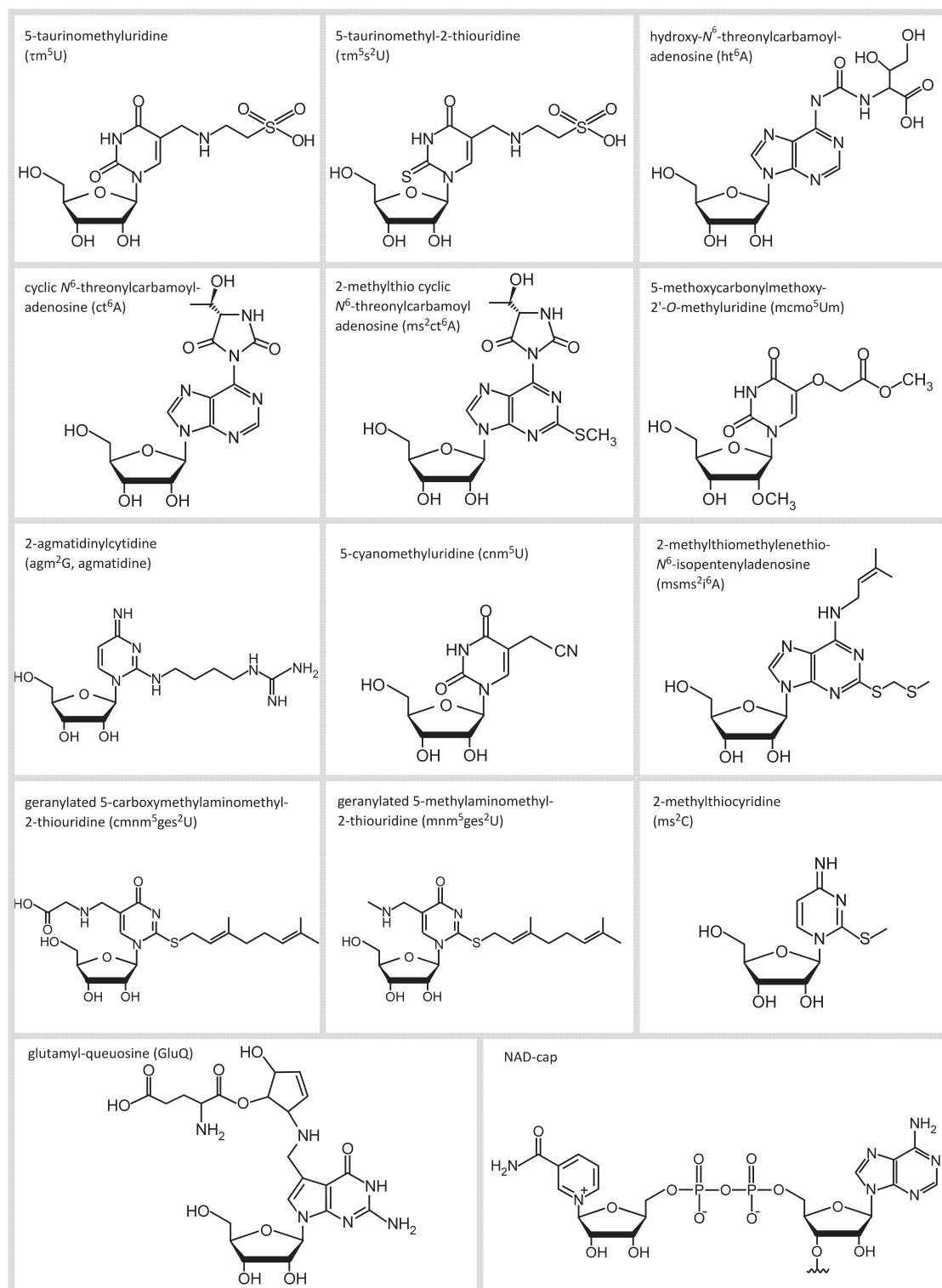


図1 今世紀に入ってから発見されたRNA修飾

キャップ構造以外に、イノシン(I), N<sup>6</sup>-メチルアデノシン(m<sup>6</sup>A), 5-メチルシチジン(m<sup>5</sup>C), シュードウリジン(Ψ), 1-メチルアデノシン(m<sup>1</sup>A)などが大量に見いだされており, もはやゲノム配列から知りうる情報だけでRNAの機能は語れない状況にある<sup>2,3)</sup>。

RNA修飾の機能を明らかにするためには, RNA修飾を導入する修飾酵素(writer), いったん書き込んだ修飾を消

去する脱メチル化酵素(eraser), RNA修飾を認識するタンパク質(reader)を同定する必要がある。m<sup>6</sup>Aに代表されるRNA修飾は, writerとeraserの働きによりダイナミックに変化し, その修飾情報をreaderが読み取ることで, RNAの分解やスプライシング制御, 細胞内輸送や翻訳制御など, RNA修飾には, RNAのプロセッシングやその後の働きを調節する役割があることが明らかになりつつある。

実際に、 $m^6A$ 修飾の分布やプロファイルが組織や細胞が生育する環境によってダイナミックに変動する事例が相次いで報告されている<sup>4)</sup>。しかし、その一方で、転写後に書き込まれた $m^6A$ 修飾は静的で安定に存在し、ダイナミックには変動しないという報告<sup>5)</sup>もあり、RNA修飾が可逆的に変動するか?という、根本的な問題が提起され、現在、世界的に論争が巻き起こっている。

## 2. 新規RNA修飾とケミカルスペースの拡大

1970~80年代に数多くのRNA修飾が発見され、その化学構造が明らかにされた<sup>1)</sup>。図1には今世紀に入ってから発見されたRNA修飾を示した。このうちの7種類は我々のグループによって報告されたものである。

5-taurinomethyluridine( $\tau m^5U$ ) およびその2-チオウリジン誘導体( $\tau m^5s^2U$ )は哺乳動物のミトコンドリアtRNAから発見されたRNA修飾である<sup>6)</sup>。その後、この修飾の欠損がミトコンドリア病の原因であることが明らかになり、RNA修飾病(RNA modopathy)という新しい疾患の概念構築に貢献した<sup>7,8)</sup>。RNA精製技術の進歩<sup>9,10)</sup>により、存在量の少ないミトコンドリアtRNAの単離が可能になったことと、RNAの高感度質量分析法(RNA-MS)の開発<sup>11)</sup>が、これらのRNA修飾の発見に貢献している。同様の理由で、hydroxy- $N^6$ -threonylcarbamoyladenine( $ht^6A$ )は棘皮動物であるウニのミトコンドリアtRNAから発見された<sup>12)</sup>。

cyclic  $N^6$ -threonylcarbamoyladenine( $ct^6A$ )<sup>13,14)</sup> および 2-methylthio cyclic  $N^6$ -threonylcarbamoyladenine( $ms^2ct^6A$ )<sup>15)</sup>は大腸菌tRNAから発見された修飾体であるが、この修飾は $t^6A$ が脱水環化したものである。1970年代に $t^6A$ が発見され、40年以上にわたり、大腸菌をはじめとする多くの細菌tRNAには $t^6A$ が存在すると考えられてきた。しかし、 $t^6A$ は細胞からtRNAを抽出し、ヌクレオシドを解析する過程において、 $ct^6A$ が加水分解したアーティファクトであることが判明した<sup>14)</sup>。加水分解しないような条件で解析を行った結果、細胞内には $ct^6A$ の状態が存在することが判明している。このように、細胞内には化学的に不安定な天然物が存在し、抽出や分析のための前処理の過程で分解したアーティファクトをみている例が他にもある可能性を示唆している。実際、大腸菌においてtRNA<sup>Asp</sup>のアンチコドンに存在するqueuosine(Q)は細胞内においてグルタミル化されたglutamyl-queuosine(GluQ)<sup>16)</sup>の形で存在していると考えられている。

2-azaguanidylcytidine( $azm^2C$ )<sup>17,18)</sup>と5-cyanomethyluridine( $cnm^5U$ )<sup>19)</sup>はともにアーキアtRNAの解析から見つかったものである。アーキアのRNA修飾は十分に調べられていないため、今後も多くの新規修飾がさまざまなアーキア由来のRNAから見つかることが期待される。アーキアには、細菌や真核生物とはまったく異なる特徴的な代謝経路を持つ生物が存在することが知られており、アーキアはまさにRNA修飾の宝庫かもしれない。geranylated

5-methylaminomethyl-2-thiouridine( $mn m^5ges^2U$ )や geranylated 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine( $cm m m^5ges^2U$ )<sup>20,21)</sup>と、2-methylthiomethylenethio- $N^6$ -isopentenyladenosine( $ms m s^2t^6A$ )<sup>22)</sup>はクロマトグラフィーを用いて、疎水性の高い修飾ヌクレオシドの解析の中から見つかったものであり、その存在量は非常に少ないが、RNA修飾反応の中間体<sup>23,24)</sup>や過修飾体と考えられている。2-methylthiocytidine( $ms^2C$ )は最近報告された新規修飾である<sup>25)</sup>。メチル化試薬の添加により増加することから、tRNAの $s^2C$ 修飾のアルキル化損傷塩基の類である可能性が考えられているが、細胞内でも少量存在するようである。 $NAD^+$ -capは細菌で見つかった新規のキャップ構造<sup>26,27)</sup>であるが、その後真核生物にも見つかった<sup>28)</sup>。この修飾はRNAポリメラーゼが $NAD^+$ を転写のプライマーとして用いて転写を開始することで、RNA鎖に導入されると考えられている。存在量は少ないが、eraserとしてdecapping酵素が見つかったことから、この修飾が担う機能に注目が集まっている<sup>29)</sup>。

## 3. RNA修飾遺伝子の同定

RNA修飾の生合成と機能を探るためには、RNA修飾を導入する修飾酵素やそのパートナータンパク質、基質を供給するための酵素などの同定が不可欠である。我々は、RNA修飾酵素に限らず、RNA修飾を形成するために必要な遺伝子をまとめてRNA修飾遺伝子と呼んでいる。RNA修飾遺伝子が同定できれば、組換えタンパク質を発現させて、試験管内でRNA修飾の再構成が可能になり、修飾反応の詳細な解析が可能になる。また、RNA修飾酵素と基質RNA複合体の結晶構造解析に道が開け、RNA修飾反応の分子基盤の理解など、構造生物学的な解析が可能になる。さらに、RNA修飾遺伝子をノックアウトした際の細胞やマウスの表現型解析から、RNA修飾が担う生理学的な機能や疾患との関連について初めて探求することができるようになる。我々は、RNA修飾遺伝子を網羅的に探索するための方法論であるリボヌクレオーム解析法を開発した<sup>11)</sup>。この手法は、大腸菌や酵母の遺伝子破壊株ライブラリーからRNAを抽出し、質量分析法(LC/MS)により、RNA修飾の有無を網羅的にスクリーニングする方法である。標的となるRNA修飾の欠損がある機能未知遺伝子の欠損株で見つかれば、RNA修飾遺伝子を逆遺伝学的に同定することが可能になる。この手法の利点は、RNA修飾酵素のみならず、そのパートナータンパク質や、基質を供給するためのキャリアタンパク質など、RNA修飾の形成に必要な因子を網羅的に同定できる点にある。実際にこの手法を用いて、筆者らは大腸菌の2000以上の遺伝子、およびパン酵母においては400以上の遺伝子についてスクリーニングを行った結果、30個以上の新規RNA修飾遺伝子を同定することに成功した<sup>30-42)</sup>。

さらに、新規なRNA修飾遺伝子を同定するためには、

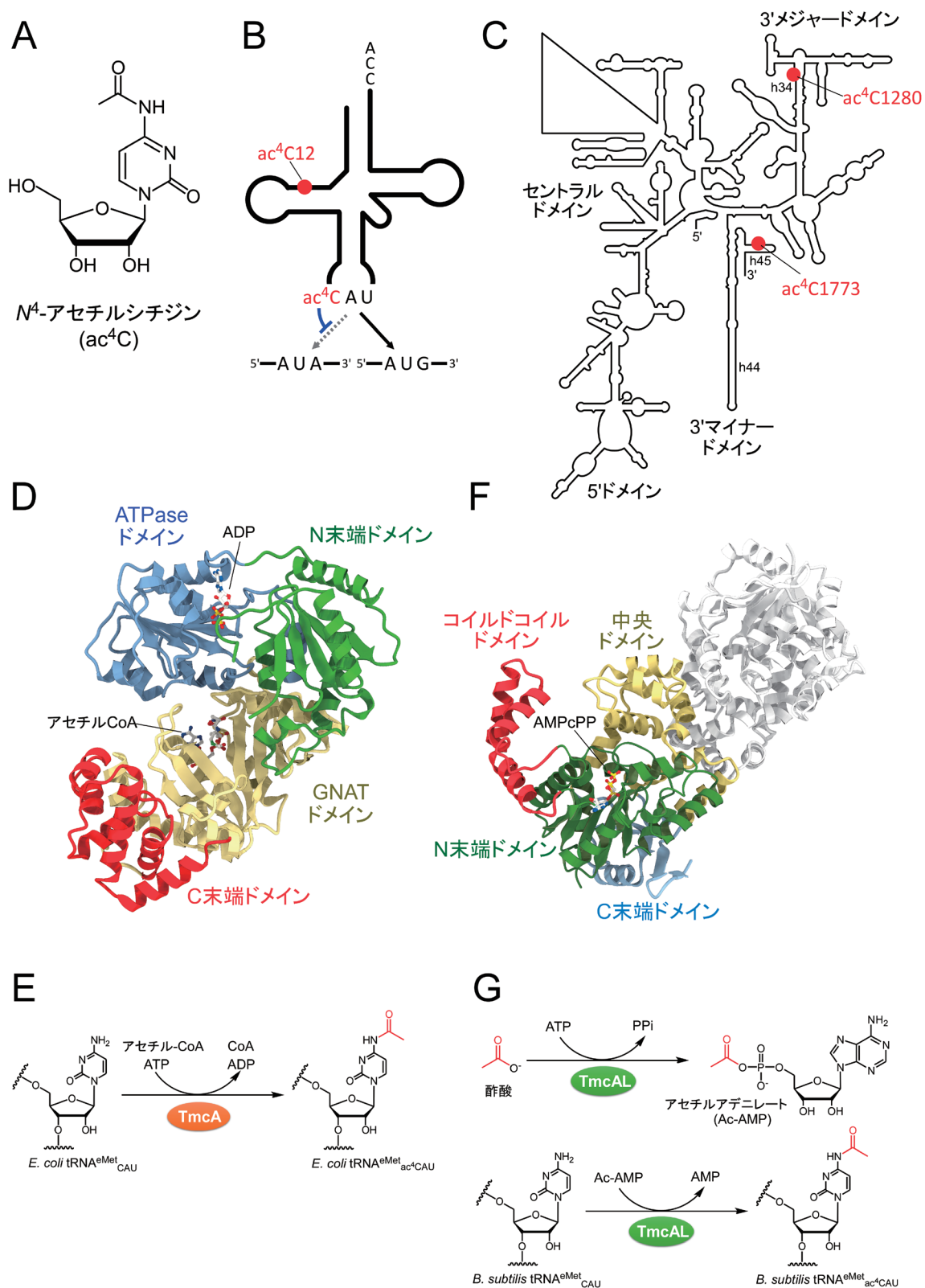


図2 RNA アセチル化修飾

(A)  $N^4$ -アセチルシチジン ( $ac^4C$ ) の化学構造. (B) tRNA における  $ac^4C$  修飾の位置. アンチコドンの  $ac^4C$  修飾は AUA コドンの誤翻訳を防ぐ役割を担う. (C) 酵母 18S rRNA における  $ac^4C$  修飾の位置. (D) TmcA の立体構造 (2ZPA). (E) TmcA による RNA のアセチル化反応, 基質としてアセチル CoA と ATP を用いる. (F) TmcAL の立体構造 (5Y0Q). (G) TmcAL による RNA のアセチル化反応, 基質として酢酸と ATP を用いる.



比較ゲノム解析が有効である。標的となるRNA修飾を持つ生物は対応するRNA修飾遺伝子を持つはずであり、その修飾を持たない生物には対応する修飾遺伝子は存在しないはずである。この仮定に基づき、複数の生物種において、標的となるRNA修飾の有無をLC/MSによって解析し、そのRNA修飾を持つ生物間で共通の遺伝子群を選出し、その中から、そのRNA修飾を持たない生物が有する遺伝子を排除することで、候補遺伝子の絞り込みを行う。この過程を生物種の組み合わせを変えながら、試行錯誤することで、候補遺伝子を数個から数十個まで絞り込むことが可能である。ここから機能が明らかに異なる遺伝子を排除したり、予測される機能ドメインの有無を判別することで、さらに絞り込むことができる。最終的には遺伝子破壊株を取得して、LC/MSで標的となるRNA修飾の有無を判別することでRNA修飾遺伝子の同定を行う。本稿では、我々のグループが最近発見したRNA修飾遺伝子について紹介する。

#### 4. 二つのRNAアセチル化酵素と収斂進化

タンパク質が翻訳後にアセチル化されるように、RNAも転写後にアセチル化されることが知られている。RNAにおけるメジャーなアセチル化修飾スクレオシドとして $N^4$ -アセチルシチジン ( $ac^4C$ ) (図2A) が知られている。 $ac^4C$ はtRNAやrRNAに存在する。大腸菌など細菌では $ac^4C$ 修飾がtRNA<sup>Met</sup>のアンチコドンの1字目に存在し、真核生物においてはtRNAの12位に存在する(図2B)。さらに、真核生物の18S rRNAには、2か所に $ac^4C$ 修飾が存在する(図2C)。我々は前述したリボヌクレオーム解析により、大腸菌の機能未知遺伝子群を網羅的にスクリーニングし、RNAアセチル化酵素TmcAを世界に先駆けて発見した<sup>30)</sup>。TmcAにはアセチル化に必要なGNATドメインとRNAヘリカーゼドメイン(図2D)<sup>43)</sup>を持ち、アセチルCoAとATPを基質として、tRNAに $ac^4C$ 修飾を導入することが明らかとなった(図2E)<sup>30)</sup>。一般的なアセチル化酵素によるタンパク質のアセチル化はアセチルCoAのみを基質として用いるが、TmcAはアセチルCoAに加えてATPを基質として用いていることが特徴である。ATPはRNAヘリカーゼの活性に必要であると考えられており、この活性を用いたRNAの構造変化が $ac^4C$ 修飾に必要であると解釈できる。

さらに、我々はTmcAの酵母ホモログであるKRE33/RRR1<sup>44)</sup>やヒトホモログであるNAT10<sup>45)</sup>が、アセチルCoAとATPを基質として、18S rRNAに $ac^4C$ 修飾を導入することを明らかにした。酵母KRE33/RRR1は必須遺伝子であり、温度感受性変異株の解析から、KRE33/RRR1はrRNA前駆体のプロセッシングおよび40Sサブユニットの成熟に必須であることを明らかにした<sup>44)</sup>。さらに、KRE33/RRR1は核内アセチルCoAの濃度を感知することで18S rRNAのプロセッシングを制御する可能性を示した<sup>44)</sup>。また、NAT10

もヒト細胞の生育に必要で、実際にNAT10をノックダウンするとアポトーシスが生じることが明らかとなった<sup>45)</sup>。最近の研究で、抗 $ac^4C$ 抗体を用いた免疫沈降とNGS解析が行われ、ヒト細胞中のmRNA上に大量に $ac^4C$ 修飾が見つかったという報告がなされた<sup>46)</sup>。さらに、これらの $ac^4C$ 修飾はNAT10によるものであると報告された。しかし、この論文では抗体の偽陽性をきちんと評価できていない点が問題である。さらに、NAT10は配列特異性が高くCCG配列の真ん中のCに $ac^4C$ 修飾を導入する<sup>44, 45)</sup>が、mRNA上で見つかった修飾部位にはこうした配列モチーフが見つかっておらず、我々はmRNAの $ac^4C$ 修飾については慎重に再検証する必要があると考えている。

TmcAとそのホモログは唯一見つかったRNAアセチル化酵素であったが、我々は、さらに、TmcAホモログを持たない枯草菌においてもtRNA<sup>Met</sup>に $ac^4C$ 修飾が存在することを見いだした<sup>47)</sup>。この事実は、枯草菌にはTmcA以外のアセチル化酵素が存在することを示唆している。比較ゲノムを用いた遺伝子探索の結果、枯草菌をはじめとする一群の細菌には、酢酸イオンを基質として $ac^4C$ 修飾を導入するユニークなアセチル化酵素TmcALが存在することが明らかとなった(図2F)<sup>47)</sup>。生化学および構造生物学的な解析の結果、TmcALはアミノアシルtRNA合成酵素と同じファミリーに属し、tRNAのアミノアシル化と同様な機構でアセチル化を行うことが判明した(図2G)。TmcALは、まず酢酸イオンとATPからアセチルアデニレート形成し、次に、アセチルアデニレートに対し、tRNAアンチコドン1字目シチジンの $N^4$ -アミノ基に求核置換攻撃させることで、 $ac^4C$ が形成される。さらなる解析により、TmcALが、AUAコドンの解読に必要なtRNA<sup>Ile</sup>のアンチコドン修飾であるライシジン(L)の修飾酵素TilSとの間に、遺伝学的な相互作用があることが判明した。TmcALがない状態でTilSの働きを抑制すると、AUAコドンが、tRNA<sup>Met</sup>によって間違えてメチオニンとして解読されてしまうことを見だし、 $ac^4C$ 修飾がAUAコドンの誤認識を妨げる役割を担っていることを明らかにした(図2B)。これは $ac^4C$ 修飾の生物学的な役割を解明した最初の報告である。

$ac^4C$ は細菌のtRNAに広くみられる修飾であるが、大腸菌および $\gamma$ -プロテオバクテリアではTmcAが $ac^4C$ 修飾を形成するのに対し、枯草菌、マイコプラズマを含む一群の細菌では、TmcALが $ac^4C$ を形成することが判明した。TmcAはGNATドメインを持ち(図2D)、アセチルCoAを基質としてアセチル化する(図2E)のに対し、TmcALはRossmann foldを有し(図2F)、酢酸イオンを基質にTmcAとはまったく異なる反応機構で $ac^4C$ を形成していた(図2G)。細菌が進化の過程で、まったく異なる機構で同一のtRNA修飾を獲得したことはとても興味深い。魚とイルカが水中を速く泳ぐために類似の体形を獲得したように、遺伝暗号を正確に解読するために、異なる細菌の系統間で同じtRNA修飾を選択した、まさに分子レベルでの収斂進化といえよう。

## 5. 脊椎動物 mRNA のキャップ構造における m<sup>6</sup>A 修飾酵素の同定

脊椎動物の mRNA や長鎖非コード RNA に N<sup>6</sup>-メチルアデノシン (m<sup>6</sup>A) が大量に見いだされ、m<sup>6</sup>A は RNA の代謝や正常な機能に重要であることが明らかになってきた<sup>4, 48)</sup>。一般に m<sup>6</sup>A は mRNA の内部に存在しているが、脊椎動物では、mRNA の 5' 末端構造である 7-メチルグアノシン (m<sup>7</sup>G) キャップ構造に続く 1 塩基目にも N<sup>6</sup>, 2'-O-ジメチルアデノシン (m<sup>6</sup>Am) として存在する (図 3A)<sup>49)</sup>。この m<sup>6</sup>Am 修飾の生合成や機能はほとんどわかっておらず、その解明のためには m<sup>6</sup>Am 修飾の N<sup>6</sup>-メチル基を導入する酵素の発見が必要であった。我々は、脊椎動物に保存された機能未知なメチル化酵素遺伝子の中から、酵母に存在するものを除いた結果、最終的に 15 種類の候補遺伝子を絞り込んだ。この中で、PCIF1 遺伝子に着目した。PCIF1 は RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) のリン酸化された C 末端ドメイン (CTD) に結合する因子として同定された<sup>50)</sup>。また、DNA m<sup>6</sup>A メチル化酵素に類似したドメインを有している<sup>51)</sup>ことから、PCIF1 は転写装置に結合して新生 RNA 鎖に m<sup>6</sup>A 修飾を導入する可能性が浮上した。そこで、我々は HEK293T 細胞で CRISPR/Cas9 システムを用いて PCIF1 のノックアウト (KO) 株を作製した。この細胞から RNA を抽出し、抗キャップ抗体を用いて mRNA の 5' 末

端断片を濃縮し、キャピラリー液体クロマトグラフィーナノエレクトロスプレーイオン化質量分析法を用いた RNA 断片の直接的解析 (RNA-MS) を行った。野生株由来の RNA からは、5' 末端に m<sup>7</sup>Gpppm<sup>6</sup>Am を有する複数の断片が観測され、m<sup>7</sup>Gpppm<sup>6</sup>Am 断片との比率から、m<sup>6</sup>Am の修飾率は 92% であると見積もられた。一方で PCIF1 KO 細胞由来の RNA を解析したところ、m<sup>7</sup>Gpppm<sup>6</sup>Am 断片は完全に消失し、m<sup>7</sup>Gpppm<sup>6</sup>Am 断片のみが観測された。この結果から、PCIF1 は m<sup>6</sup>Am 修飾の N<sup>6</sup>-メチル基を導入する修飾酵素であることが判明し、我々は PCIF1 を Cap-specific adenosine N<sup>6</sup>-methyltransferase (CAPAM) と命名した (図 3B)<sup>52)</sup>。CAPAM を欠損した細胞は酸化ストレスに対する感受性が増しており、m<sup>6</sup>Am 修飾が生理学的に重要な意義を持つことが示唆された。生化学的な解析から、CAPAM は S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体として用い、m<sup>7</sup>G キャップ構造および m<sup>6</sup>Am 修飾の 2'-O-メチル基を特異的に認識することが明らかとなった。CAPAM の N 末端に存在する WW ドメインは、セリン 5 番がリン酸化された RNAPII の CTD に特異的に結合したことから、CAPAM は転写伸長の初期段階に RNAPII へとリクルートされ、転写と共役しながら m<sup>6</sup>Am 修飾を導入することが示唆された (図 3B)。東京大学理学部の濡木理研究室との共同研究により、結晶構造解析を行ったところ、CAPAM のコア部分は、メチル化ドメインと  $\alpha$ ヘリックスに富むヘリカルドメインの二つから構成されていることが判明した (図 3B)。m<sup>7</sup>G キャップ構造はこれら二つのドメインの間のポケットで認識され、SAM はメチル化ドメインに特徴的な NPPF モチーフ配列からなる活性中心で認識されていた。これらの結晶構造は CAPAM によるキャップ構造特異的な N<sup>6</sup>-メチル基転移反応を理解するための分子基盤となる。他のグループによる先行研究では脱メチル化酵素である FTO (fat mass and obesity associated gene) の過剰発現によって m<sup>6</sup>Am 修飾率が低下し mRNA が不安定化されることが報告されている<sup>53)</sup>。しかし m<sup>6</sup>Am 修飾を完全に失った CAPAM 欠損細胞の mRNA 量を網羅的に解析した結果、mRNA 量に大きな変動はみられなかったことから、m<sup>6</sup>Am 修飾は mRNA の安定性には寄与していないことが示された。一方で mRNA の翻訳効率を網羅的に解析したところ、m<sup>6</sup>Am 修飾は mRNA の翻訳効率を向上する機能を持つことが示された。今後は m<sup>6</sup>Am 修飾が変動することで調節される遺伝子発現機構の探求と、酸化ストレス応答との関係を明らかにすることを目指す。また、網羅的なスクリーニングから CAPAM は膀胱がんの抑制遺伝子としての働きが報告<sup>54)</sup>されているが、生理機能に関しては不明な点が多く残されている。CAPAM のモデルマウスの作出と表現型解析が、今後の研究に大きな展開をもたらすであろう。

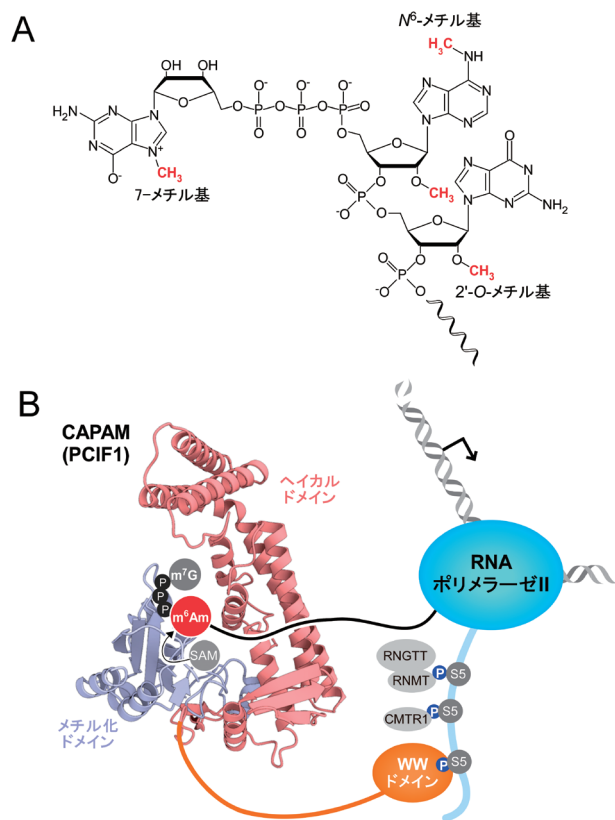


図3 mRNAのキャップ構造依存的なm<sup>6</sup>A修飾 (A) mRNAの5'末端キャップ構造. (B) mRNAの転写と共役したCAPAMによるm<sup>7</sup>Gキャップ依存的なm<sup>6</sup>Am修飾形成.

## 6. 炭酸ガスに敏感な tRNA 修飾とワールブルク効果

N<sup>6</sup>-threonylcarbamoyladenine (t<sup>6</sup>A) (図 4A, B) はすべて



の生物界で共通に用いられている修飾塩基であり、ANNコドンを読解するtRNAの37位（アンチコドン3'隣接塩基）に存在する（図4A）。tRNAとmRNAが結合したリボソームの構造解析から、 $t^6A$ はコドン1字目のアデニンとスタッキング相互作用することでコドン-アンチコドン対合を安定化することが示されている<sup>55</sup>。実際に $t^6A$ は、コドンの正確な認識や読み枠の維持、効率的なアミノアシル化や転座反応など、タンパク質合成のさまざまな過程に関わることが知られている。細菌において $t^6A$ 修飾に関わる酵素は必須遺伝子であり、この修飾の生理学的な重要性が示されている<sup>56</sup>。我々は、ヒトや哺乳動物のミトコンドリアにおいて、 $t^6A37$ の修飾酵素としてYRDCとOSGEPL1を同定した<sup>57</sup>。ヒトミトコンドリアにおいて、 $t^6A$ は4種類

のtRNAに存在する。 $t^6A$ はアデニンの $N^6$ 位にカルボニル基を介してThr残基が結合した修飾であるが、生合成においてカルボニル基は二酸化炭素（ $CO_2$ ）あるいは重炭酸イオン（または炭酸水素イオン、 $HCO_3^-$ ）に由来し、Thr残基はL-Thrに由来することが知られている（図4B）。はじめにL-Thrが $CO_2$ と非酵素的に反応し、カルバメート中間体を形成する（図4C）。YRDCがATPを用いてこの中間体を活性化し、Threonylcarbamoyl-AMP（TC-AMP）を形成する（図4C）。続いて、OSGEPL1がTC-AMPのThreonylcarbamoyl基をtRNAのA37位へと転移し、 $t^6A$ が形成される（図4B, C）。YRDCは主に細胞質tRNAの $t^6A$ 形成に関わる一方、弱いミトコンドリア移行シグナルを有し、一部はミトコンドリアtRNAの $t^6A$ 形成にも関わることが明らかとなった。OSGEPL1はミトコンドリアのみに局在し、ミトコンドリアtRNAの $t^6A37$ 形成を担っていることが判明した。実際に、OSGEPL1をノックアウトするとミトコンドリアtRNAの $t^6A$ が完全に欠失し、タンパク質合成能は低下し、呼吸不全を引き起こすことを見いだした。

次に、YRDCとOSGEPL1の組換えタンパク質を取得し、L-Thr、ATP、 $HCO_3^-$ を基質に、試験管内で修飾の再構成を試みたところ、tRNA上に効率よく $t^6A$ 修飾を導入することに成功した。各基質に対して、酵素反応速度論的な解析を行った。四つの基質のうち、ミトコンドリアtRNA、L-Thr、ATPに対する $K_m$ 値は十分に低い値を示したが、驚いたことに、 $HCO_3^-$ に対する $K_m$ 値は異常に高く、31 mMであった。したがって、 $t^6A$ 修飾反応の律速段階は $HCO_3^-$ 濃度であるという結果を得た。前述したように $t^6A$ 修飾の第一段階はL-Thrが $CO_2$ と非酵素的に反応しカルバメート中間体を形成する（図4C）。この過程は平衡状態であると考えられることから、 $HCO_3^-$ に対する高い $K_m$ 値は非酵素的なカルバメート形成によって説明できる。ミトコンドリア内の $HCO_3^-$ 濃度は10~40 mMである<sup>58</sup>ことから、生理的な条件下で $t^6A$ 修飾は変動しうると考えた。実際に、ヒト細胞株を低い $HCO_3^-$ 濃度の培地で培養したところ、複数のtRNAで $t^6A$ 修飾率が顕著に減少する結果を得た。一般的に、tRNA修飾は静的で安定であると考えられてきたが、この結果から、 $t^6A37$ 修飾は $HCO_3^-$ 濃度を感知してダイナミックに変化することが判明した。 $t^6A37$ 修飾の変動は直接的にtRNAの暗号解読能に影響するため、呼吸の状態や細胞が置かれた環境によって、ミトコンドリアの翻訳が制御されると考えられる。ミトコンドリア内の $CO_2$ は主に、好気的条件下において、ピルビン酸がアセチルCoAに変換される過程とTCA回路から生じることが知られている。 $CO_2$ はカルボニクアンヒドラーゼ（CA）の作用により、水と反応して重炭酸イオン（ $HCO_3^-$ ）に変換される。低酸素下では、CA9が細胞膜上に高発現し、細胞外で大量の $HCO_3^-$ を生成する。 $HCO_3^-$ は嫌氣的解糖系で生じた乳酸を中和し、アシドーシスを防ぐ役割がある。今回の研究で新たに $HCO_3^-$ は $t^6A$ 修飾の基質となり、tRNAの機能に必須の役割が明らかとなった。低酸素環境下では、ミ

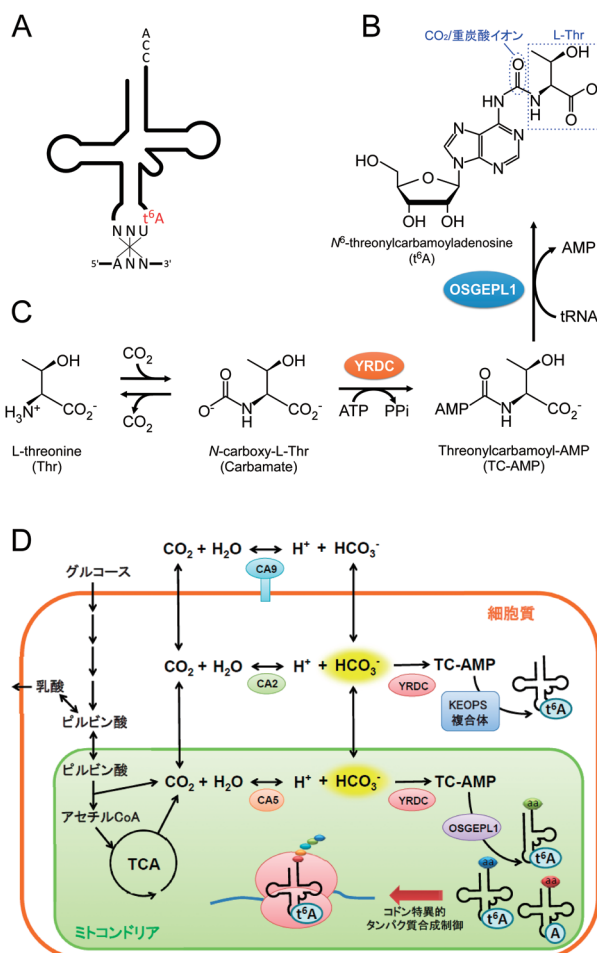


図4  $CO_2$ の代謝とミトコンドリアにおける $t^6A$ 修飾の制御 (A) tRNAにおける $t^6A$ 修飾の位置. (B)  $t^6A$ の化学構造. (C)  $t^6A$ 修飾の反応機構. (D)呼吸により $CO_2$ はミトコンドリア内で発生する。 $CO_2$ はガス状態で細胞内外を行き来する。 $CO_2$ はカルボニクアンヒドラーゼ（CA）の作用により、水と反応して重炭酸イオン（ $HCO_3^-$ ）を生じる。低酸素下では、CA9が細胞膜上に高発現し、細胞外で大量の $HCO_3^-$ を生成する。 $HCO_3^-$ は嫌氣的解糖系で生じた乳酸を中和し、アシドーシスを防ぐ役割がある。今回の研究で新たに $HCO_3^-$ は $t^6A$ 修飾の基質となり、tRNAの機能に必須の役割を持つことが明らかとなった。細胞内の $CO_2/HCO_3^-$ 濃度が低下するとミトコンドリアtRNAの $t^6A$ 修飾率が低下し、ミトコンドリアのタンパク質合成がコドン特異的に制御される。

トコンドリア内部からのCO<sub>2</sub>の供給量が低下し、t<sup>6</sup>A修飾率が減少すると考えられる(図4D)。t<sup>6</sup>A修飾の低下はミトコンドリアタンパク質合成能を直接的に低下させることから、この現象は、低酸素下で細胞がミトコンドリアの機能を制限するワールブルク効果を説明するメカニズムの一つであると考えられる。

## 7. リボソーム50Sサブユニットの後期アッセムブリを促進するSAM濃度依存的なrRNAメチル化修飾

リボソームの生合成過程において、RNAヘリカーゼやrRNA修飾酵素などのアッセムブリ因子が重要な役割を担っているが、個々のアッセムブリ因子がどのような分子機構でリボソームの生合成に関与するかについては、不明な点が多く残されている。大腸菌において、RlmEはSAMをメチル基供与体として、23S rRNAのHelix 92 (H92)に存在する2552位のウリジンを2'-O-メチル化(Um2552)する修飾酵素である(図5A)。我々は、50Sサブユニットの後期アッセムブリ過程において、RlmEによるUm2552のたった1か所のメチル化が、45S前駆体から50Sサブユニットへの成熟を促進する役割があることを示した<sup>59)</sup>。Um2552のメチル化は、リボースのパッキングをC3'endo型に固定することでC2556およびU1955からなるbase triple(図5B)を安定化させ、ドメインIVとVの会合を促すと考えられる。その結果、L36や他のリボソームタンパク質の組込みを促進することで、45S前駆体から50Sへの生合成が進行することが判明した(図5C)。この成果は、rRNA修飾の作用メカニズムを示したことのみならず、アッセムブリ因子の酵素活性によるリボソーム生合成の一部を再現した初めての知見である。

SAMは細胞内の主要なメチル基供与体であり、DNA、RNA、タンパク質などのメチル化や低分子代謝物の生合成を通じてさまざまな細胞内プロセスに関与する。SAMの欠乏はこれらメチル化の低下を招き、細胞の増殖や分化、脳の機能などに影響を与え、さまざまな疾患の原因になっていることが知られている。細胞内のSAM濃度が約1/3程度まで減少する大腸菌株( $\Delta mtm$ )は増殖速度が低下することが知られているが、我々はこの $\Delta mtm$ 株でリボソームを解析したところ、45S前駆体が顕著に蓄積することを見いだした。また、 $\Delta mtm$ 株にRlmEを過剰発現すると蓄積した45S前駆体が減少するとともに、生育速度が優位に回復することを見いだした。SAMは、生体高分子のメチル化修飾のみならず、生体内のさまざまな代謝に関わる。しかし、この観測結果から、Um2552はSAM濃度に敏感なメチル化修飾であり、細胞がSAM濃度の低下を感知し、リボソームの生合成を止めることで生育速度を調節する機構が明らかになった(図5D)<sup>60)</sup>。

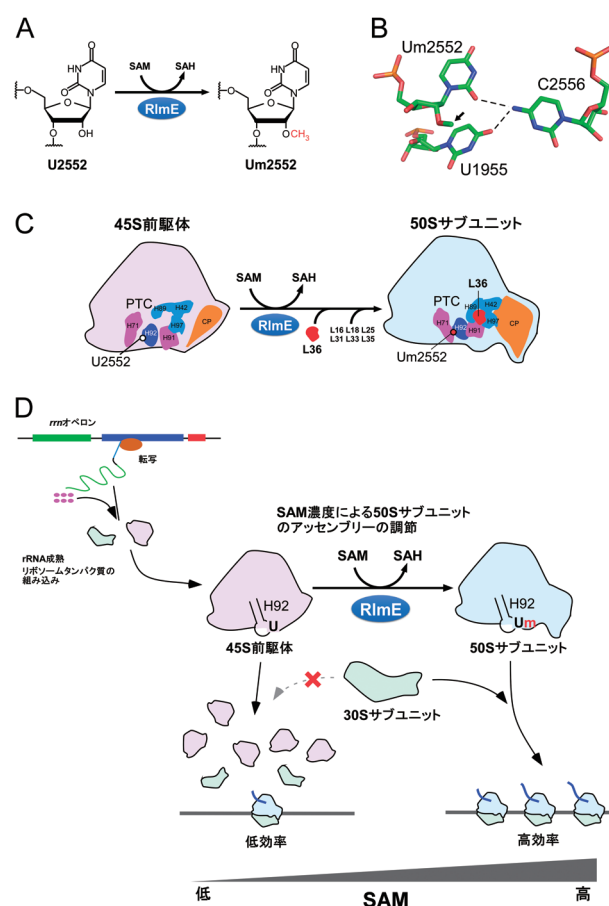


図5 RlmEによるSAM濃度依存的rRNAの2'-O-メチル化修飾とリボソームの生合成制御機構

(A) RlmEはSAM依存的にU2552を2'-O-メチル化修飾する。(B) Um2552はC2556およびU1955とbase tripleを形成することでドメインVとIVの会合を促進する。矢印は2'-O-メチル基を示す。(C) RlmEによるUm2552形成は45S前駆体から50Sサブユニットへのアッセムブリを促進させる。この過程で、23S rRNAの構造変化およびL36をはじめとするいくつかのリボソームタンパク質の組込みが起こる。(D)細胞内SAM濃度を感知したUm2552修飾によって制御される50Sサブユニットのアッセムブリ。SAMが少ない場合、50Sの後期アッセムブリが阻害され、45S前駆体が蓄積し、翻訳効率が低下する。SAM濃度が高い場合、RlmEが45S前駆体にUm2552を導入し、50Sのアッセムブリが促進され、翻訳の効率が上昇する。蓄積した45S前駆体は細胞内に安定して存在するため、細胞内のSAMレベルが回復すると、50Sが速やかに生成される。

## 8. tRNA修飾の欠損と疾患

前述したように、我々はヒトミトコンドリアtRNAからタウリンを含む修飾塩基5-taurinomethyluridine ( $\tau m^5U$ )とその2-チオウリジン誘導体( $\tau m^5s^2U$ )を発見した(図1)<sup>6)</sup>。これらの修飾はtRNA<sup>Leu</sup>(UUR)やtRNA<sup>Lys</sup>を含む5種類のtRNAのアンチコドン1字目に存在し、コドン解読に重要な役割を担っている<sup>8)</sup>。

ミトコンドリア脳筋症は、ミトコンドリアの機能異常が原因で生じる重篤な疾患であり、エネルギー消費の高い脳や骨格筋など臓器を中心に障害が生じる。ミトコンドリア脳筋症の代表病型のうち、脳卒中を特徴とするMELAS



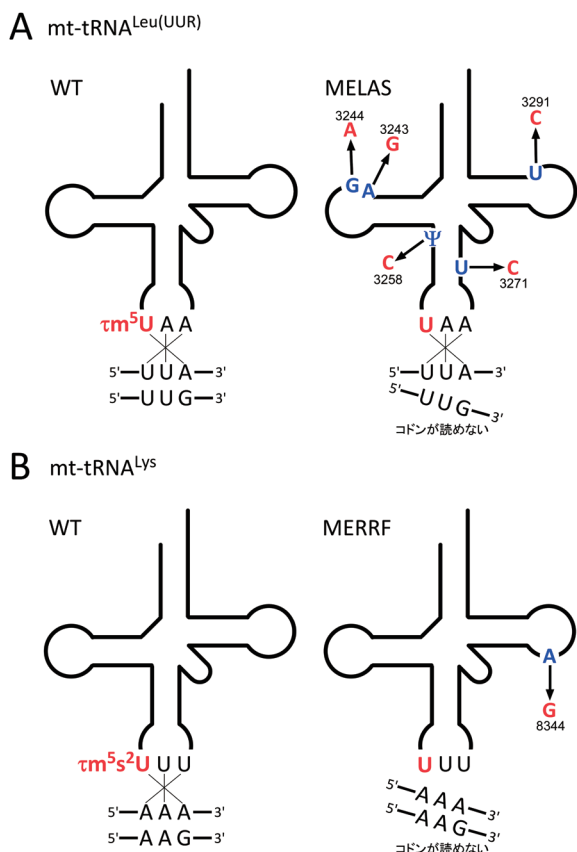


図6 ミトコンドリア脳筋症におけるtRNAのタウリン修飾の欠損

(A) MELASの原因点変異はmt-tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)の $\tau\text{m}^5\text{U}$ 修飾の形成を阻害し、UUGコドンの解読能が低下する。(B) MERRFの原因点変異はmt-tRNA<sup>Lys</sup>の $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ 修飾の形成を阻害し、AAA、AAGコドンの解読能が低下する。

(mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) や、てんかんを特徴とするMERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers) は、それぞれミトコンドリアDNAにコードされたtRNA<sup>Leu</sup>(UUR) 遺伝子およびtRNA<sup>Lys</sup> 遺伝子上の点変異が原因で発症することが知られていた。我々は、MELASおよびMERRF患者由来の細胞から変異tRNAを単離し、質量分析法を用いた詳細な解析を行ったところ、タウリン修飾( $\tau\text{m}^5\text{U}$ や $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ )がこれらの変異tRNAでは著しく減少し、未修飾Uのままになっていることが判明した(図6A, B)<sup>7)</sup>。MELASやMERRFの原因点変異は、 $\tau\text{m}^5\text{U}$ 修飾酵素の認識を妨げることで、タウリン修飾の欠損をもたらすと考えられた。これらの変異tRNAはコドンの認識能が低下し、タンパク質合成能とミトコンドリアの活性が低下することが明らかとなっている。タウリン修飾を欠損したMELAS由来の変異tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)は、対応する二つのコドンUUAとUUGのうち、UUGコドンのみを特異的に翻訳できないことが明らかとなった(図6A)<sup>61)</sup>。また、同じくタウリン修飾を欠損したMERRF由来の変異tRNA<sup>Lys</sup>は、対応するコドンであるAAAとAAGをとともに認識できなくなる(図6B)ことで、結果としてミトコンドリアタンパク質合

成能が全体的に低下することが判明した<sup>62)</sup>。リボソームのA部位におけるtRNAとコドンの対合実験によって、タウリン修飾を欠損したtRNA<sup>Leu</sup>(UUR)は、正常tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)と同様にUUAコドンとは対合できるものの、UUGコドンとは対合できなかったことから、タウリン修飾はU-Gのwobble対合を安定化させる役割があることが示された<sup>61, 63)</sup>。また実際に、MELAS細胞でリボソームプロファイリングが行われた結果、UUGコドンにリボソームが蓄積しやすい<sup>64)</sup>という結果が示され、タウリン修飾の欠損によりUUGコドンの翻訳能が低下する、という我々が提唱したモデルが裏づけられた結果となった。先行研究により、MELASの変異率が上がると、ミトコンドリアにおける呼吸鎖酵素複合体IのサブユニットであるND6のタンパク質合成量が顕著に低下するという現象が報告されている<sup>65)</sup>。ND6はmtDNAにコードされる13種類の遺伝子の中でもUUGコドンの使用頻度が顕著に高く、タウリン修飾の欠損がUUGコドンリッチなタンパク質の発現を特異的に低下させていると考えられる。この仕組みは、長年分子レベルでの原因が不明であった、呼吸鎖酵素複合体Iの活性低下というMELAS患者の生化学的症候をうまく説明することができる<sup>7)</sup>。

## 9. タウリンや葉酸の欠乏とtRNA修飾の変動

我々は酵母を用いた研究でMTO1とGTPBP3(MSS1)がミトコンドリアtRNAのタウリン修飾酵素であることを報告している(図7A)<sup>66)</sup>。さらに、タウリン修飾の基質としてタウリンとメチレンテトラヒドロ葉酸を同定した<sup>67)</sup>。実際に、MTO1とGTPBP3の組換えタンパク質を取得し、タウリン、メチレンテトラヒドロ葉酸、GTP、各種補酵素の存在下で、試験管内で修飾の再構成を試みたところ、低効率ながらtRNA上に $\tau\text{m}^5\text{U}$ 修飾を導入することに成功した(図7A)<sup>67)</sup>。

主に食事から摂取するタウリンがRNA修飾の基質でもあるという知見は医療関係者や食品業界からも注目されている。ネコやキツネなどの肉食系の動物はタウリンを生合成できないため、タウリンは必須の栄養素である。実際に、タウリンの欠乏により失明や心筋症を発症することが知られている。また、ヒラメの養殖においてタウリンは正常な生育に必須であることも知られている。一般にタウリンは、システインから生合成されるが、これらの動物ではこの生合成活性が低下していることから、タウリンを食餌から摂取する必要がある。ヒトを含む霊長類は、タウリンを生合成することができるが、新生児はタウリン合成能が低い。母乳からタウリンを摂取することが正常な発育に必須である<sup>68)</sup>。我々は、タウリンの欠乏が $\tau\text{m}^5\text{U}$ 修飾に影響を与える関係を調べるために、タウリンの欠乏により心筋症を発症したネコの肝臓からミトコンドリアtRNAを単離し、修飾の状態を調べたところ、予想どおり、 $\tau\text{m}^5\text{U}$ の修飾率が有意に低下していた。同様に、タウリン欠乏

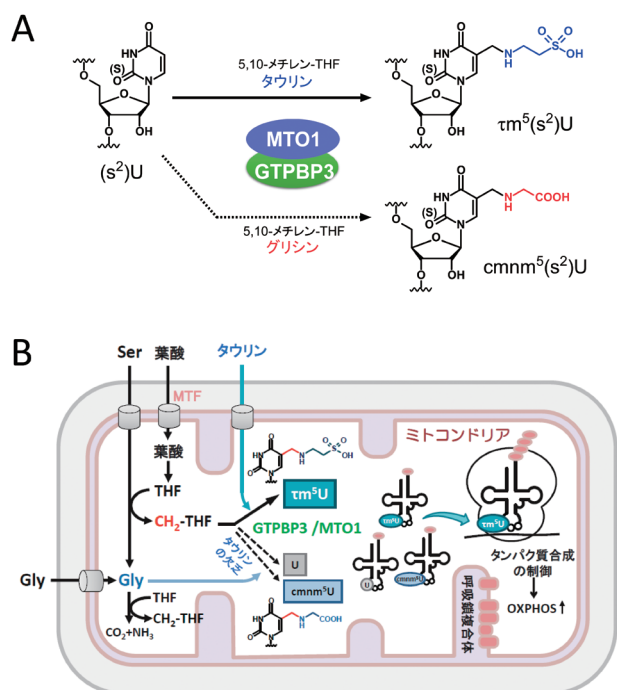


図7 タウリン修飾の生合成と制御

(A) タウリン修飾はタウリンとメチレンTHFを基質として、MTO1とGTPBP3の酵素複合体により導入される。タウリン欠乏時にはグリシンを取り込みcmnm<sup>5</sup>Uが合成される。(B) タウリン欠乏時にタウリン修飾率が減少し、ミトコンドリアのタンパク質合成を制御する。また、一部のtRNAにcmnm<sup>5</sup>U修飾が生じ、この異常なtRNAがコドン特異的な翻訳制御に関与する可能性がある。

食を与え飼育したヒラメからミトコンドリアtRNAを単離し、修飾を調べたところ、同様にτm<sup>5</sup>U修飾の低下を観測した。さらに、HeLa細胞をタウリンを欠乏した培地で培養したところ、ミトコンドリアtRNAのτm<sup>5</sup>Uの修飾率が顕著に低下した(図7B)<sup>67)</sup>。ヒト細胞ではタウリンの*de novo*合成経路が働いていると考えられるが、外界からのタウリンの供給が高い修飾率の維持に必須であることを示した。さらに興味深いことに、タウリン修飾の低下とともに、tRNAの同じ位置に5-carboxymethylaminomethyluridine (cmnm<sup>5</sup>U)修飾が生じることを見いだした(図7AB)<sup>67)</sup>。cmnm<sup>5</sup>Uは細菌、酵母や線虫のミトコンドリアtRNAにみられる修飾であり、τm<sup>5</sup>Uのタウリンの代わりにグリシンが取り込まれた構造をしている(図7A)。タウリンとグリシンは化学構造的に類似していることから、タウリンが欠乏した状態でグリシンが取り込まれたものと考えられる。培地にタウリンを添加するとcmnm<sup>5</sup>Uは完全に消失し、τm<sup>5</sup>Uの修飾率が上昇することを確認している。この知見は、生理的な条件において、メタボライトの濃度変化により、RNA修飾の化学構造が変化することを示した初めての例である。cmnm<sup>5</sup>Uが取り込まれたtRNAがどのように振る舞い、タンパク質合成に影響を与えるかについては今後の研究が必要であるが、τm<sup>5</sup>Uとcmnm<sup>5</sup>Uは化学的な性質が大きく異なることから、修飾構造の違いによるコドン解読能へ与える影響が考えられる。今後は、タウリン

欠乏症や高グリシン血症においてtRNA修飾が変化することで、翻訳に影響を与え、最終的な表現型や症状につながる可能性について探求していきたい。

また、τm<sup>5</sup>U修飾のウラシル5位に結合しているメチル基は、メチレンテトラヒドロキシ葉酸(メチレンTHF)を由来とすることが判明した。葉酸誘導体はC1炭素を運搬し、さまざまな代謝物に転移する役割を担う。ミトコンドリアにおいて、メチレンTHFは、SHMT2の作用により、Serのβ炭素がTHFに転移されることで形成される。実際に、ミトコンドリア葉酸トランスポーター(MTF)やSHMT2に変異の入ったCHO細胞では、τm<sup>5</sup>U修飾率が顕著に低下することを見いだしている<sup>67)</sup>。また、興味深いことに、SHMT2をノックアウトした細胞ではミトコンドリアの活性が顕著に低下すること、またこの原因として、tRNAのタウリン修飾の低下が主な原因であることが判明している<sup>64)</sup>。SHMT2はさまざまながんで高発現していることが知られており、肝臓がんでは、SHMT2の抑制で腫瘍形成能が低下することが知られている<sup>69, 70)</sup>。また、ヒトの老化とともに、ミトコンドリアの活性が低下することが知られているが、原因として、SHMT2発現量の低下が示唆されている<sup>71)</sup>。老化に伴い、τm<sup>5</sup>Uの修飾率が低下する可能性が考えられる。また、受胎前後における葉酸の欠乏は、胎児の神経管閉鎖障害(neural tube defects: NTDs)を引き起こし、二分脊椎症の原因となることが知られている<sup>72)</sup>。τm<sup>5</sup>U修飾の減少によるミトコンドリアの活性低下がこの疾患の原因である可能性が考えられる。

さらに、我々の研究成果を基に、川崎医科大学神経内科学講座においてMELAS患者にタウリンを経口投与する医師主導臨床治験が行われ、MELASの脳卒中様発作の再発抑制効果が証明された<sup>73, 74)</sup>。実際に、2019年2月にタウリンを主成分とする薬が、保険適応薬として正式に認可された。

## 10. 拡大するRNA修飾病の世界

これらの研究は、RNA修飾の異常が疾患の一義的な要因であることを示した世界で最初の例であり、我々は疾患の新しいカテゴリーとしてRNA修飾病(RNA modopathy)を提唱している<sup>67)</sup>。実際に、ヒトRNA修飾酵素の異常が原因の疾患が続々と報告されている(表1)<sup>75, 76)</sup>。前述したタウリン修飾酵素であるMTO1の変異は、肥大型心筋症や乳酸アシドーシスを引き起こすことが報告されている<sup>77, 78)</sup>。患者細胞は、酸素消費量の減少と呼吸鎖複合体の活性低下がみられ、ミトコンドリアの機能異常を示している。Mto1のノックアウトマウスはタウリン修飾の欠損を引き起こし、ミトコンドリアタンパク質合成の異常をもたらした。また、細胞質にタンパク質の凝集体が蓄積するという興味深い表現型を示した<sup>79)</sup>。一方で、GTPBP3の変異も呼吸鎖不全症を引き起こすが、MTO1変異と異なり、Leigh脳症様の脳疾患を伴うという特徴がある<sup>80)</sup>。ま

表1 RNA修飾の異常が原因と考えられる疾患

疾患	遺伝子	RNA修飾	RNA種
ミトコンドリア脳筋症 (MELAS)	mt-tRNA <sup>Leu</sup> (UUR)	$\tau m^5U$	mt-tRNA
ミトコンドリア脳筋症 (MERRF)	mt-tRNA <sup>Lys</sup>	$\tau m^5s^2U$	mt-tRNA
拡張型心筋症	MTO1	$\tau m^5U$	mt-tRNA
拡張型心筋症	GTPBP3	$\tau m^5U$	mt-tRNA
小児性急性肝不全	MTU1	$\tau m^5s^2U$	mt-tRNA
複合型呼吸鎖異常症	NSUN3	f <sup>5</sup> C	mt-tRNA
HSD10 ミトコンドリア病	TRMT10A (MRPP1)	m <sup>1</sup> A, m <sup>1</sup> G	mt-tRNA
HSD10 ミトコンドリア病	SDR5C1 (MRPP2)	m <sup>1</sup> A, m <sup>1</sup> G	mt-tRNA
小児肥満 (predicted)	METTL15	m <sup>4</sup> C	mt-12S rRNA
MELAS 様症候群	MRM2/FTSJ2	2'-O-methylation	mt-16S rRNA
鉄芽球形貧血 (MLASA)	PUS1	$\Psi$	cyto-tRNA, mt-tRNA
複合型酸化的リン酸化異常	TRIT1	i <sup>6</sup> A	cyto-tRNA, mt-tRNA
複合型酸化的リン酸化異常	TRMT5	m <sup>1</sup> G	cyto-tRNA, mt-tRNA
知的障害, Dubowitz 様症候群	NSUN2	m <sup>5</sup> C	cyto-tRNA, mt-tRNA
知的障害	TRMT1	m <sup>2,2</sup> G	cyto-tRNA, mt-tRNA
重度の神経発達障害	PUS3	$\Psi$	cyto-tRNA, mt-tRNA
2型糖尿病	Cdkal1	ms <sup>2</sup> t <sup>6</sup> A	cyto-tRNA
家族性自律神経失調症	IKBKAP/ELP1	mcm <sup>5</sup> U	cyto-tRNA
知的障害	ELP2	mcm <sup>5</sup> U	cyto-tRNA
筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	ELP3	mcm <sup>5</sup> U	cyto-tRNA
知的障害 (DREAM-PL)	CTU2	mcm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	cyto-tRNA
知的障害	FTSJ1	2'-O-methylation	cyto-tRNA
小頭症, 小人症	METTL1	m <sup>7</sup> G	cyto-tRNA
膀胱がん	ALKBH8	mchm <sup>5</sup> U	cyto-tRNA
知的障害, 斜視, 小頭症, 成長遅延	ADAT3	I	cyto-tRNA
乳がん	TRMT12/TYW2	yW	cyto-tRNA
乳がん	TRMT2A	m <sup>5</sup> U	cyto-tRNA
Galloway-Mowat 症候群 (奇形, 脳の発達障害)	KEOPS	t <sup>6</sup> A	cyto-tRNA
知的障害, 小頭症	METTL5	m <sup>6</sup> A	18S rRNA
結腸直腸がん	NAT10	ac <sup>4</sup> C	18S rRNA, cyto-tRNA
乳がん	FTSJ3	2'-O-methylation	28S rRNA
先天性角化不全症	DKC1 (dyskerin)	$\Psi$	28S and 18S rRNAs
Bowen-Conradi 症候群	EMG1 (Nep1)	m <sup>1</sup> acp <sup>3</sup> $\Psi$	18S rRNA
遺伝性対側性色素異常症 (DSH), Aicardi-Goutières 症候群 (AGS)	ADAR1	I	mRNA
肥満, アルツハイマー病	FTO	demethylation of m <sup>6</sup> A	mRNA, UsnRNA
神経膠芽腫, 乳がん	ALKBH5	demethylation of m <sup>6</sup> A	mRNA
膀胱がん	CAPAM	m <sup>6</sup> A (cap-specific)	mRNA, lncRNA
神経膠芽腫, 肝臓がん, 乳がん, 急性骨髄性白血病	METTL3	m <sup>6</sup> A	mRNA, lncRNA
神経膠芽腫, 肝臓がん, 急性骨髄性白血病	METTL14	m <sup>6</sup> A	mRNA, lncRNA
知的障害, 頭蓋顔面形態異常 (マウス)	METTL4	m <sup>6</sup> A	U2 snRNA

た我々はMTU1が $\tau m^5s^2U$ のチオ化修飾酵素であることを報告した<sup>66)</sup>。MTU1が欠損すると、ミトコンドリアタンパク質合成能が顕著に低下するとともに、ミトコンドリアの活性が著しく低下することが明らかとなっている。また、小児性急性肝不全患者でMTU1 (TRMU) 遺伝子の変異が見つかっており、患者の肝臓においてミトコンドリアtRNAのチオ化修飾の著しい減少と、呼吸鎖複合体の活性

低下が報告されている<sup>81)</sup>。Mtu1のノックアウトマウスは胚性致死 (E7.5~8) を示し、ミトコンドリアtRNAのチオ化修飾が発生と分化に必須の役割を担っていることが判明した<sup>82)</sup>。さらに、Mtu1の肝臓特異的なコンディショナルノックアウトマウスでは、血清乳酸値、GOT、GPTの増加とアルブミン濃度の低下、すなわち肝臓の炎症や傷害が確認された<sup>82)</sup>。この表現型から、MTU1の欠損が小児性急性



肝不全の直接的な原因であることが証明された。これらタウリン修飾酵素の変異がミトコンドリアの機能異常を示すという知見は、MELASやMERRFの主な原因がタウリン修飾欠損で生じることを裏づけている。

ヒトミトコンドリアtRNA<sup>Met</sup>のアンチコドン1字目には5-formylcytidine (f<sup>5</sup>C) 修飾が存在する<sup>83)</sup>。この修飾が、AUGコドンに加えてAUAコドンをMetに解釈するために必須であることは知られていた<sup>84)</sup>が、f<sup>5</sup>C修飾の生合成や、細胞および個体レベルにおける生理機能については未解明であった。我々はf<sup>5</sup>C修飾が、NSUN3によるシトシン5位をメチル化することで5-メチルシチジン (m<sup>5</sup>C) を形成し<sup>85)</sup>、それに続いてALKBH1がm<sup>5</sup>Cをヒドロキシル化と酸化を行う<sup>86)</sup>ことで、f<sup>5</sup>C修飾を生合成する機構を明らかにした。NSUN3やALKBH1をノックアウトした細胞においては、ミトコンドリアtRNA<sup>Met</sup>においてf<sup>5</sup>C修飾が形成されず、ミトコンドリアタンパク質の合成能およびミトコンドリアの活性が顕著に低下した。実際、複合型呼吸鎖異常症の患者からNSUN3の機能欠損型変異が見つかっており、f<sup>5</sup>C修飾の欠損がミトコンドリア病の原因となることも示されている<sup>87)</sup>。

ミトコンドリア筋症を併発する鉄芽球性貧血 (mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia : MLASA) ではPUS1 (pseudouridine synthase 1) のミスセンス変異が報告されている<sup>88)</sup>。PUS1はtRNA、U2 snRNA、mRNAなどさまざまなRNAにΨを導入する酵素である。実際、患者細胞から抽出したtRNAにはΨの減少がみられたことから、PUS1の基質であるtRNAや他の機能性RNAの機能不全が疾患の原因であると考えられる。PUS1はミトコンドリアtRNAのみならず、細胞質のtRNAやmRNAにもΨを導入することが知られており、MLASAは複合的な要因で発症する可能性がある。

先天性角化不全症 (dyskeratosis congenita : DC) は早期老化、間質性肺線維症を伴いがんを発症しやすい疾患である。原因遺伝子DKC1はH/ACA snoRNPのシュードウリジン(Ψ)合成酵素ジスケリン (dyskerin) をコードしている。DKC1変異マウスは骨髄形成不全を引き起こし肺と乳腺に発がんが観測され、ヒトDCの表現型を示した<sup>89)</sup>。実際に、rRNA中に含まれるΨの減少が観測されており、RNA修飾欠損に起因するリボソームの機能低下が疾患の原因と考えられている。実際、Ψを欠いたリボソームはtRNAやIRESとの結合能が低下していることから、DCの患者の細胞では翻訳開始に異常が生じている可能性が提唱されている<sup>90)</sup>。

Cdkal1は人種を超えて2型糖尿病との関連が報告されていた<sup>91)</sup>。Cdkal1は細胞質tRNA<sup>Lys</sup>の37位に存在する2-methylthio-N<sup>6</sup>-threonylcarbamoyladenosine(ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A) の2-メチルチオ基を導入する修飾酵素の遺伝子である。Cdkal1のβ細胞特異的なノックアウトマウスは、膵臓においてms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A修飾が大きく減少するとともに、インスリンの分泌が低下し、血糖値がコントロールできなくなった<sup>92)</sup>。2-メ

チルチオ修飾の欠損は、tRNA<sup>Lys</sup>の翻訳能を減弱させ、結果的にプロインスリンの発現低下につながるのではないかと考えられている。

家族性自律神経失調症 (familial dysautonomia : FD) は、神経の発達異常により、感覚神経と自律神経に障害をもたらす先天性の遺伝病である。ELP1 (IKBKAP) 遺伝子の異常スプライシングが原因であることが知られている<sup>93)</sup>。ELP1は細胞質tRNAのアンチコドン1字目に存在するウリジン修飾である5-methoxycarbonylmethyluridine (mcm<sup>5</sup>U) とその誘導体の生合成に不可欠な因子の遺伝子である。実際に、FD患者細胞ではtRNAのmcm<sup>5</sup>U修飾が顕著に低下していることが判明している<sup>94, 95)</sup>。この修飾はコドンの精確な解釈に重要な役割を担っていることから、修飾欠損はタンパク質合成の異常を引き起こし、最終的に神経の発達異常や変性につながっていると考えられるが、その詳細なメカニズムは未解明である。興味深いことに、mcm<sup>5</sup>U修飾の生合成に関わるELP2の変異が知的障害<sup>96)</sup>、ELP3の変異が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症と関連があることが報告されている<sup>97)</sup>。

他にも知的障害に関係するRNA修飾遺伝子として、NSUN2<sup>98)</sup>、TRMT1<sup>99)</sup>、FTSJ1<sup>100)</sup>、CTU2<sup>101)</sup>、ADAT3<sup>102)</sup>、METTL4<sup>103)</sup>、METTL5<sup>104)</sup> などがみついている。いずれもtRNA、rRNA、U snRNAの修飾酵素の遺伝子であり、なぜユビキタスに発現している遺伝子の異常が脳特異的な症状を引き起こすのか、非常に興味深い。

## 11. おわりに

RNA修飾の研究は今後も拡大し続けるであろう。しかし、RNA修飾を解析するための手法には限界があり、この分野のさらなる発展には、革新的な解析技術の開発が不可欠である。新規のRNA修飾の探索には、天然物化学や分析化学のパワフルな解析技術を積極的に導入することが必要であろう。NGSを用いたエピトランスクリプトームシーケンス技術は、RNA修飾の大規模かつハイスループットな探索を可能にしているが、一方で偽陽性の問題があり、マッピング精度の低さが大きな問題になっている。より精度の高いシーケンス技術の開発が不可欠である。RNA修飾の変動により、遺伝子発現が制御されるという概念を確立するためには、個々のRNA修飾部位の修飾率を簡便かつ精度よく解析する手法が必要である。また、本稿ではふれなかったが、RNA修飾酵素をエンジニアリングすることで、さまざまなRNA修飾を狙った位置に導入することができれば、遺伝子発現や生命機能の制御を可能にするRNA修飾編集技術が誕生するであろう。また人為的なRNA修飾の導入技術は、RNAセンサーによる認識を妨げることにより、自然免疫から回避させることが可能になるなど、求める機能を自由自在にデザインすることが可能になるであろう<sup>105)</sup>。実際、デアミナーゼをエンジニアリングすることで、DNA編集やRNA編集が可能になって

いる<sup>106)</sup>。企業も含めた異分野からの参入や、若い研究者の活躍に期待したい。

この原稿を書いている最中に、新型コロナウイルスの感染拡大で人類は、これまでに経験したことのないような危機に直面しています。コロナウイルスはプラス鎖RNAウイルスなので、私も含め多くのRNA研究者たちが、今できることを探しています。SARS-CoV-2は、2つのRNAメチル化酵素をコードしています。いずれも自身のRNAゲノムのキャップ構造を修飾することで、宿主の翻訳マシナリーに認識されるようになります。また、宿主の自然免疫系から逃れる機能を獲得しています。これらのRNAメチル化酵素に対する阻害剤が開発できれば、将来的にユニークな作用機序を持つ抗ウイルス薬が作れるかもしれません。私たちは自分たちの専門性を生かして少しでもこの危機に立ち向かう努力を続けていきたいと考えています。ぜひ、日本RNA学会からの情報発信にご注目いただければと思います。 <https://www.rnaj.org/>

## 謝辞

本稿で紹介した研究は、研究室のスタッフと学生によって行われた。また、多くの共同研究者に支えられた。この場を借りて感謝申しあげたい。

## 文 献

- 1) Boccaletto, P., Machnicka, M.A., Purta, E., Piątkowski, P., Bagiński, 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.
- 2) Frye, M., Jaffrey, S.R., Pan, T., Rechavi, G., & Suzuki, T. (2016) RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat. Rev. Genet.*, **17**, 365–372.
- 3) Harcourt, E.M., Kietrys, A.M., & Kool, E.T. (2017) Chemical and structural effects of base modifications in messenger RNA. *Nature*, **541**, 339–346.
- 4) Roundtree, I.A., Evans, M.E., Pan, T., & He, C. (2017) Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell*, **169**, 1187–1200.
- 5) Ke, S., Pandya-Jones, A., Saito, Y., Fak, J.J., Vagbo, C.B., Geula, S., Hanna, J.H., Black, D.L., Darnell, J.E. Jr., & Darnell, R.B. (2017) m(6A) mRNA modifications are deposited in nascent pre-mRNA and are not required for splicing but do specify cytoplasmic turnover. *Genes Dev.*, **31**, 990–1006.
- 6) Suzuki, T., Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K., & Watanabe, K. (2002) Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.*, **21**, 6581–6589.
- 7) Suzuki, T., Nagano, T., & Suzuki, T. (2011a) Human mitochondrial diseases caused by lack of taurine modification in mitochondrial tRNAs. *WIREs RNA*, **2**, 376–386.
- 8) Suzuki, T., Nagao, A., & Suzuki, T. (2011b) Human Mitochondrial tRNAs: Biogenesis, Function, Structural Aspects, and Diseases. *Annu. Rev. Genet.*, **45**, 299–329.
- 9) Miyauchi, K., Ohara, T., & Suzuki, T. (2007) Automated parallel isolation of multiple species of non-coding RNAs by the reciprocal circulating chromatography method. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e24.
- 10) Suzuki, T. & Suzuki, T. (2007) Chaplet column chromatography: isolation of a large set of individual RNAs in a single step. *Methods Enzymol.*, **425**, 231–239.
- 11) Suzuki, T., Ikeuchi, Y., Noma, A., Suzuki, T., & Sakaguchi, Y. (2007) Mass spectrometric identification and characterization of RNA-modifying enzymes. *Methods Enzymol.*, **425**, 211–229.
- 12) Nagao, A., Ohara, M., Miyauchi, K., Yokobori, S.I., Yamagishi, A., Watanabe, K., & Suzuki, T. (2017) Hydroxylation of a conserved tRNA modification establishes non-universal genetic code in echinoderm mitochondria. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 778–782.
- 13) Matuszewski, M., Wojciechowski, J., Miyauchi, K., Gdaniec, Z., Wolf, W.M., Suzuki, T., & Sochacka, E. (2017) A hydantoin isoform of cyclic N6-threonylcarbamoyladenine (ct6A) is present in tRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 2137–2149.
- 14) Miyauchi, K., Kimura, S., & Suzuki, T. (2013) A cyclic form of N6-threonylcarbamoyladenine as a widely distributed tRNA hypermodification. *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 105–111.
- 15) Kang, B.I., Miyauchi, K., Matuszewski, M., D'Almeida, G.S., Rubio, M.A.T., Alfonzo, J.D., Inoue, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Sochacka, E., et al. (2017) Identification of 2-methylthio cyclic N6-threonylcarbamoyladenine (ms2ct6A) as a novel RNA modification at position 37 of tRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 2124–2136.
- 16) Salazar, J.C., Ambrogelly, A., Crain, P.F., McCloskey, J.A., & Soll, D. (2004) A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7536–7541.
- 17) Ikeuchi, Y., Kimura, S., Numata, T., Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., Wada, T., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2010) Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea. *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 277–282.
- 18) Mandal, D., Kohrer, C., Su, D., Russell, S.P., Krivos, K., Castleberry, C.M., Blum, P., Limbach, P.A., Soll, D., & RajBhandary, U.L. (2010) Agmatidine, a modified cytidine in the anticodon of archaeal tRNA(Ile), base pairs with adenosine but not with guanosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2872–2877.
- 19) Mandal, D., Kohrer, C., Su, D., Babu, I.R., Chan, C.T., Liu, Y., Soll, D., Blum, P., Kuwahara, M., Dedon, P.C., et al. (2014) Identification and codon reading properties of 5-cyanomethyl uridine, a new modified nucleoside found in the anticodon wobble position of mutant haloarchaeal isoleucine tRNAs. *RNA*, **20**, 177–188.
- 20) Chen, P., Crain, P.F., Nasvall, S.J., Pomerantz, S.C., & Bjork, G.R. (2005) A “gain of function” mutation in a protein mediates production of novel modified nucleosides. *EMBO J.*, **24**, 1842–1851.
- 21) Dumelin, C.E., Chen, Y., Leconte, A.M., Chen, Y.G., & Liu, D.R. (2012) Discovery and biological characterization of geranylated RNA in bacteria. *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 913–919.
- 22) Dal Magro, C., Keller, P., Kotter, A., Werner, S., Duarte, V., Marchand, V., Ignarski, M., Freiwald, A., Muller, R.U., Dieterich, C., et al. (2018) A Vastly Increased Chemical Variety of RNA Modifications Containing a Thioacetal Structure. *Angew. Chem.*, **57**, 7893–7897.
- 23) Jager, G., Chen, P., & Bjork, G.R. (2016) Transfer RNA Bound to MnmH Protein Is Enriched with Geranylated tRNA—A Possible Intermediate in Its Selenation? *PLoS One*, **11**, e0153488.
- 24) Sierant, M., Leszczynska, G., Sadowska, K., Komar, P., Radzikowska-Cieciura, E., Sochacka, E., & Nawrot, B. (2018) Escherichia coli tRNA 2-selenouridine synthase (SelU) converts S2U-RNA to Se2U-RNA via S-geranylated-intermediate. *FEBS Lett.*, **592**, 2248–2258.
- 25) Reichle, V.F., Petrov, D.P., Weber, V., Jung, K., & Kellner, S.

- (2019) NAIL-MS reveals the repair of 2-methylthiocytidine by AlkB in *E. coli*. *Nat. Commun.*, **10**, 5600.
- 26) Cahova, H., Winz, M.L., Hofer, K., Nubel, G., & Jaschke, A. (2015) NAD captureSeq indicates NAD as a bacterial cap for a subset of regulatory RNAs. *Nature*, **519**, 374–377.
  - 27) Chen, Y.G., Kowtoniuk, W.E., Agarwal, I., Shen, Y., & Liu, D.R. (2009) LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 879–881.
  - 28) Walters, R.W., Matheny, T., Mizoue, L.S., Rao, B.S., Muhrad, D., & Parker, R. (2017) Identification of NAD<sup>+</sup>-capped mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 480–485.
  - 29) Jiao, X., Doamekpor, S.K., Bird, J.G., Nickels, B.E., Tong, L., Hart, R.P., & Kiledjian, M. (2017) 5' End Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cap in Human Cells Promotes RNA Decay through DXO-Mediated deNADding. *Cell*, **168**, 1015–1027.e10.
  - 30) Ikeuchi, Y., Kitahara, K., & Suzuki, T. (2008) The RNA acetyltransferase driven by ATP hydrolysis synthesizes N4-acetylcytidine of tRNA anticodon. *EMBO J.*, **27**, 2194–2203.
  - 31) Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., & Suzuki, T. (2006) Mechanistic Insights into Sulfur Relay by Multiple Sulfur Mediators Involved in Thiouridine Biosynthesis at tRNA Wobble Positions. *Mol. Cell*, **21**, 97–108.
  - 32) Kimura, S., Ikeuchi, Y., Kitahara, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2012) Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4071–4085.
  - 33) Kimura, S., Miyauchi, K., Ikeuchi, Y., Thiaville, P.C., Crecy-Lagard, V., & Suzuki, T. (2014) Discovery of the beta-barrel-type RNA methyltransferase responsible for N6-methylation of N6-threonylcarbamoyladenosine in tRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 9350–9365.
  - 34) Kimura, S., Sakai, Y., Ishiguro, K., & Suzuki, T. (2017) Biogenesis and iron-dependency of ribosomal RNA hydroxylation. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 12974–12986.
  - 35) Kimura, S. & Suzuki, T. (2010) Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1341–1352.
  - 36) Noma, A., Kirino, Y., Ikeuchi, Y., & Suzuki, T. (2006) Biosynthesis of wybutosine, a hyper-modified nucleoside in eukaryotic phenylalanine tRNA. *EMBO J.*, **25**, 2142–2154.
  - 37) Noma, A., Sakaguchi, Y., & Suzuki, T. (2009) Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1335–1352.
  - 38) Noma, A., Yi, S., Katoh, T., Takai, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2011) Actin-binding protein ABP140 is a methyltransferase for 3-methylcytidine at position 32 of tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, **17**, 1111–1119.
  - 39) Sakai, Y., Kimura, S., & Suzuki, T. (2019) Dual pathways of tRNA hydroxylation ensure efficient translation by expanding decoding capability. *Nat. Commun.*, **10**, 2858.
  - 40) Sakai, Y., Miyauchi, K., Kimura, S., & Suzuki, T. (2016) Biogenesis and growth phase-dependent alteration of 5-methoxycarbonylmethoxyuridine in tRNA anticodons. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 509–523.
  - 41) Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., Kato, J., Watanabe, K., Sekine, Y., & Suzuki, T. (2003) An RNA-modifying enzyme that governs both the codon and amino acid specificities of isoleucine tRNA. *Mol. Cell*, **12**, 689–698.
  - 42) Takakura, M., Ishiguro, K., Akichika, S., Miyauchi, K., & Suzuki, T. (2019) Biogenesis and functions of aminocarboxypropyluridine in tRNA. *Nat. Commun.*, **10**, 5542.
  - 43) Chimnaronk, S., Suzuki, T., Manita, T., Ikeuchi, Y., Yao, M., Suzuki, T., & Tanaka, I. (2009) RNA helicase module in an acetyltransferase that modifies a specific tRNA anticodon. *EMBO J.*, **28**, 1362–1373.
  - 44) Ito, S., Akamatsu, Y., Noma, A., Kimura, S., Miyauchi, K., Ikeuchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2014a) A Single Acetylation of 18 S rRNA Is Essential for Biogenesis of the Small Ribosomal Subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **289**, 26201–26212.
  - 45) Ito, S., Horikawa, S., Suzuki, T., Kawauchi, H., Tanaka, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2014b) Human NAT10 is an ATP-dependent RNA acetyltransferase responsible for N4-acetylcytidine formation in 18 S ribosomal RNA (rRNA). *J. Biol. Chem.*, **289**, 35724–35730.
  - 46) Arango, D., Sturgill, D., Alhusaini, N., Dillman, A.A., Sweet, T.J., Hanson, G., Hosogane, M., Sinclair, W.R., Nanan, K.K., Mandler, M.D., et al. (2018) Acetylation of Cytidine in mRNA Promotes Translation Efficiency. *Cell*, **175**, 1872–1886.e24.
  - 47) Taniguchi, T., Miyauchi, K., Sakaguchi, Y., Yamashita, S., Soma, A., Tomita, K., & Suzuki, T. (2018) Acetate-dependent tRNA acetylation required for decoding fidelity in protein synthesis. *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 1010–1020.
  - 48) Frye, M., Harada, B.T., Behm, M., & He, C. (2018) RNA modifications modulate gene expression during development. *Science*, **361**, 1346–1349.
  - 49) Banerjee, A.K. (1980) 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.*, **44**, 175–205.
  - 50) Fan, H., Sakuraba, K., Komuro, A., Kato, S., Harada, F., & Hirose, Y. (2003) PCIF1, a novel human WW domain-containing protein, interacts with the phosphorylated RNA polymerase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 378–385.
  - 51) Iyer, L.M., Zhang, D., & Aravind, L. (2016) Adenine methylation in eukaryotes: Apprehending the complex evolutionary history and functional potential of an epigenetic modification. *BioEssays*, **38**, 27–40.
  - 52) Akichika, S., Hirano, S., Shichino, Y., Suzuki, T., Nishimasu, H., Ishitani, R., Sugita, A., Hirose, Y., Iwasaki, S., Nureki, O., et al. (2019) Cap-specific terminal N (6)-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science*, **363**, 363.
  - 53) Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., Jiao, X., Grozhik, A.V., Patil, D.P., Linder, B., Pickering, B.F., Vasseur, J.J., Chen, Q., et al. (2017) Reversible methylation of m(6)Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, **541**, 371–375.
  - 54) Hensel, J., Duex, J.E., Owens, C., Dancik, G.M., Edwards, M.G., Frierson, H.F., & Theodorescu, D. (2015) Patient Mutation Directed shRNA Screen Uncovers Novel Bladder Tumor Growth Suppressors. *Molecular cancer research. MCR*, **13**, 1306–1315.
  - 55) Rozov, A., Demeshkina, N., Westhof, E., Yusupov, M., & Yusupova, G. (2015) Structural insights into the translational infidelity mechanism. *Nat. Commun.*, **6**, 7251.
  - 56) Thiaville, P.C., Iwata-Reuyl, D., & de Crecy-Lagard, V. (2014) Diversity of the biosynthesis pathway for threonylcarbamoyladenosine (t(6)A), a universal modification of tRNA. *RNA Biol.*, **11**, 1529–1539.
  - 57) Lin, H., Miyauchi, K., Harada, T., Okita, R., Takeshita, E., Komaki, H., Fujioka, K., Yagasaki, H., Goto, Y.I., Yanaka, K., et al. (2018) CO2-sensitive tRNA modification associated with human mitochondrial disease. *Nat. Commun.*, **9**, 1875.
  - 58) Smith, D.G., Pal, R., & Parker, D. (2012) Measuring equilibri-



- um bicarbonate concentrations directly in cellular mitochondria and in human serum using europium/terbium emission intensity ratios. *Chemistry*, **18**, 11604–11613.
- 59) Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2015) Single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E4707–E4716.
  - 60) Ishiguro, K., Arai, T., & Suzuki, T. (2019) Depletion of S-adenosylmethionine impacts on ribosome biogenesis through hypomodification of a single rRNA methylation. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 4226–4239.
  - 61) Kirino, Y., Yasukawa, T., Ohta, S., Akira, S., Ishihara, K., Watanabe, K., & Suzuki, T. (2004) Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15070–15075.
  - 62) Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S., & Watanabe, K. (2001) Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J.*, **20**, 4794–4802.
  - 63) Kurata, S., Weixlbaumer, A., Ohtsuki, T., Shimazaki, T., Wada, T., Kirino, Y., Takai, K., Watanabe, K., Ramakrishnan, V., & Suzuki, T. (2008) 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.
  - 64) Morscher, R.J., Ducker, G.S., Li, S.H., Mayer, J.A., Gitai, Z., Sperl, W., & Rabinowitz, J.D. (2018) Mitochondrial translation requires folate-dependent tRNA methylation. *Nature*, **554**, 128–132.
  - 65) Dunbar, D.R., Moonie, P.A., Zeviani, M., & Holt, I.J. (1996) Complex I deficiency is associated with 3243G:C mitochondrial DNA in osteosarcoma cell hybrids. *Hum. Mol. Genet.*, **5**, 123–129.
  - 66) Umeda, N., Suzuki, T., Yukawa, M., Ohya, Y., Shindo, H., Watanabe, K., & Suzuki, T. (2005) Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *J. Biol. Chem.*, **280**, 1613–1624.
  - 67) 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.
  - 68) Sturman, J.A. (1993) Taurine in development. *Physiol. Rev.*, **73**, 119–147.
  - 69) Woo, C.C., Chen, W.C., Teo, X.Q., Radda, G.K., & Lee, P.T. (2016) Downregulating serine hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2) suppresses tumorigenesis in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, **7**, 53005–53017.
  - 70) Ye, J., Fan, J., Venneti, S., Wan, Y.W., Pawel, B.R., Zhang, J., Finley, L.W., Lu, C., Lindsten, T., Cross, J.R., et al. (2014) Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia. *Cancer Discov.*, **4**, 1406–1417.
  - 71) Hashizume, O., Ohnishi, S., Mito, T., Shimizu, A., Ishikawa, K., Nakada, K., Soda, M., Mano, H., Togayachi, S., Miyoshi, H., et al. (2015) Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects. *Sci. Rep.*, **5**, 10434.
  - 72) Molloy, A.M. (2002) Folate bioavailability and health. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **72**, 46–52.
  - 73) Ohsawa, Y., Hagiwara, H., Nishimatsu, S.I., Hirakawa, A., Kamimura, N., Ohtsubo, H., Fukai, Y., Murakami, T., Koga, Y., Goto, Y.I., et al.; KN01 Study Group. (2019) Taurine supplementation for prevention of stroke-like episodes in MELAS: a multicentre, open-label, 52-week phase III trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **90**, 529–536.
  - 74) Rikimaru, M., Ohsawa, Y., Wolf, A.M., Nishimaki, K., Ichimiya, H., Kamimura, N., Nishimatsu, S., Ohta, S., & Sunada, Y. (2012) Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern. Med.*, **51**, 3351–3357.
  - 75) Ramos, J. & Fu, D. (2019) The emerging impact of tRNA modifications in the brain and nervous system. *Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech.*, **1862**, 412–428.
  - 76) Torres, A.G., Batlle, E., & Ribas de Pouplana, L. (2014) Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends Mol. Med.*, **20**, 306–314.
  - 77) Baruffini, E., Dallabona, C., Invernizzi, F., Yarham, J.W., Melchionda, L., Blakely, E.L., Lamantea, E., Donnini, C., Santra, S., Vijayaraghavan, S., et al. (2013) MTO1 mutations are associated with hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis and cause respiratory chain deficiency in humans and yeast. *Hum. Mutat.*, **34**, 1501–1509.
  - 78) Ghezzi, D., Baruffini, E., Haack, T.B., Invernizzi, F., Melchionda, L., Dallabona, C., Strom, T.M., Parini, R., Burlina, A.B., Meitinger, T., et al. (2012) Mutations of the Mitochondrial-tRNA Modifier MTO1 Cause Hypertrophic Cardiomyopathy and Lactic Acidosis. *Am. J. Hum. Genet.*, **90**, 1079–1087.
  - 79) Fakruddin, M., Wei, F.Y., Suzuki, T., Asano, K., Kaieda, T., Omori, A., Izumi, R., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Miyata, K., et al. (2018) Defective Mitochondrial tRNA Taurine Modification Activates Global Proteostress and Leads to Mitochondrial Disease. *Cell Rep.*, **22**, 482–496.
  - 80) Kopajtich, R., Nicholls, T.J., Rorbach, J., Metodiev, M.D., Freisinger, P., Mandel, H., Vanlander, A., Ghezzi, D., Carrozzo, R., Taylor, R.W., et al. (2014) Mutations in GTPBP3 cause a mitochondrial translation defect associated with hypertrophic cardiomyopathy, lactic acidosis, and encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, **95**, 708–720.
  - 81) Zeharia, A., Shaag, A., Pappo, O., Mager-Heckel, A.M., Saada, A., Beinat, M., Karicheva, O., Mandel, H., Ofek, N., Segel, R., et al. (2009) Acute infantile liver failure due to mutations in the TRMU gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **85**, 401–407.
  - 82) Wu, Y., Wei, F.Y., Kwarada, L., Suzuki, T., Araki, K., Komohara, Y., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Takeya, M., Oike, Y., et al. (2016) Mtu1-Mediated Thiouridine Formation of Mitochondrial tRNAs Is Required for Mitochondrial Translation and Is Involved in Reversible Infantile Liver Injury. *PLoS Genet.*, **12**, e1006355.
  - 83) Moriya, J., Yokogawa, T., Wakita, K., Ueda, T., Nishikawa, K., Crain, P.F., Hashizume, T., Pomerantz, S.C., McCloskey, J.A., Kawai, G., et al. (1994) A novel modified nucleoside found at the first position of the anticodon of methionine tRNA from bovine liver mitochondria. *Biochemistry*, **33**, 2234–2239.
  - 84) Takemoto, C., Spremulli, L.L., Benkowski, L.A., Ueda, T., Yokogawa, T., & Watanabe, K. (2009) Unconventional decoding of the AUA codon as methionine by mitochondrial tRNA<sup>Met</sup> with the anticodon f5CAU as revealed with a mitochondrial in vitro translation system. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1616–1627.
  - 85) Nakano, S., Suzuki, T., Kwarada, L., Iwata, H., Asano, K., & Suzuki, T. (2016) NSUN3 methylase initiates 5-formyleytidine biogenesis in human mitochondrial tRNA(Met). *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 546–551.
  - 86) Kwarada, L., Suzuki, T., Ohira, T., Hirata, S., Miyauchi, K.,

- & Suzuki, T. (2017) ALKBH1 is an RNA dioxygenase responsible for cytoplasmic and mitochondrial tRNA modifications. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 7401–7415.
- 87) Van Haute, L., Dietmann, S., Kremer, L., Hussain, S., Pearce, S.F., Powell, C.A., Rorbach, J., Lantaff, R., Blanco, S., Sauer, S., et al. (2016) Deficient methylation and formylation of mt-tRNA(Met) wobble cytosine in a patient carrying mutations in NSUN3. *Nat. Commun.*, **7**, 12039.
  - 88) Patton, J.R., Bykhovskaya, Y., Mengesha, E., Bertolotto, C., & Fischel-Ghodsian, N. (2005) Mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA): missense mutation in the pseudouridine synthase 1 (PUS1) gene is associated with the loss of tRNA pseudouridylation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 19823–19828.
  - 89) Ruggero, D., Grisendi, S., Piazza, F., Rego, E., Mari, F., Rao, P.H., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P.P. (2003) Dyskeratosis Congenita and Cancer in Mice Deficient in Ribosomal RNA Modification. *Science*, **299**, 259–262.
  - 90) Jack, K., Bellodi, C., Landry, D.M., Niederer, R.O., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Kopmar, N., Krasnykh, O., Dean, A.M., Thompson, S.R., et al. (2011) rRNA Pseudouridylation Defects Affect Ribosomal Ligand Binding and Translational Fidelity From Yeast to Human Cells. *Mol. Cell*, **44**, 660–666.
  - 91) Steinthorsdottir, V., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Jonsdottir, T., Walters, G.B., Styrkarsdottir, U., Gretarsdottir, S., Emilsson, V., Ghosh, S., et al. (2007) A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat. Genet.*, **39**, 770–775.
  - 92) Wei, F.Y., Suzuki, T., Watanabe, S., Kimura, S., Kaitsuka, T., Fujimura, A., Matsui, H., Atta, M., Michiue, H., Fontecave, M., et al. (2011) Deficit of tRNA<sup>Lys</sup> modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. *J. Clin. Invest.*, **121**, 3598–3608.
  - 93) Anderson, S.L., Coli, R., Daly, I.W., Kichula, E.A., Rork, M.J., Volpi, S.A., Ekstein, J., & Rubin, B.Y. (2001) Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 753–758.
  - 94) Karlsborn, T., Tukenmez, H., Chen, C., & Bystrom, A.S. (2014) Familial dysautonomia (FD) patients have reduced levels of the modified wobble nucleoside mcm(5)s(2)U in tRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **454**, 441–445.
  - 95) Yoshida, M., Kataoka, N., Miyauchi, K., Ohe, K., Iida, K., Yoshida, S., Nojima, T., Okuno, Y., Onogi, H., Usui, T., et al. (2015) Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 2764–2769.
  - 96) Cohen, J.S., Srivastava, S., Farwell, K.D., Lu, H.M., Zeng, W., Lu, H., Chao, E.C., & Fatemi, A. (2015) ELP2 is a novel gene implicated in neurodevelopmental disabilities. *Am. J. Med. Genet. A.*, **167**, 1391–1395.
  - 97) Simpson, C.L., Lemmens, R., Miskiewicz, K., Broom, W.J., Hansen, V.K., van Vught, P.W., Landers, J.E., Sapp, P., Van Den Bosch, L., Knight, J., et al. (2009) Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 472–481.
  - 98) Abbasi-Moheb, L., Mertel, S., Gonsior, M., Nouri-Vahid, L., Kahrizi, K., Cirak, S., Wieczorek, D., Motazacker, M.M., Esmaeeli-Nieh, S., Cremer, K., et al. (2012) Mutations in NSUN2 cause autosomal-recessive intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.*, **90**, 847–855.
  - 99) Davarniya, B., Hu, H., Kahrizi, K., Musante, L., Fattahi, Z., Hosseini, M., Maqsoud, F., Farajollahi, R., Wienker, T.F., Ropers, H.H., et al. (2015) The Role of a Novel TRMT1 Gene Mutation and Rare GRM1 Gene Defect in Intellectual Disability in Two Azeri Families. *PLoS One*, **10**, e0129631.
  - 100) Freude, K., Hoffmann, K., Jensen, L.R., Delatycki, M.B., des Portes, V., Moser, B., Hamel, B., van Bokhoven, H., Moraine, C., Fryns, J.P., et al. (2004) Mutations in the FTSJ1 gene coding for a novel S-adenosylmethionine-binding protein cause non-syndromic X-linked mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.*, **75**, 305–309.
  - 101) Shaheen, R., Al-Salam, Z., El-Hattab, A.W., & Alkuraya, F.S. (2016) The syndrome dysmorphic facies, renal agenesis, ambiguous genitalia, microcephaly, polydactyly and lissencephaly (DREAM-PL): Report of two additional patients. *Am. J. Med. Genet. A.*, **170**, 3222–3226.
  - 102) Alazami, A.M., Hijazi, H., Al-Dosari, M.S., Shaheen, R., Hashem, A., Aldahmesh, M.A., Mohamed, J.Y., Kentab, A., Salih, M.A., Awaji, A., et al. (2013) Mutation in ADAT3, encoding adenosine deaminase acting on transfer RNA, causes intellectual disability and strabismus. *J. Med. Genet.*, **50**, 425–430.
  - 103) Riazuddin, S., Hussain, M., Razzaq, A., Iqbal, Z., Shahzad, M., Polla, D.L., Song, Y., van Beusekom, E., Khan, A.A., Tomas-Roca, L., et al.; UK10K. (2017) Exome sequencing of Pakistani consanguineous families identifies 30 novel candidate genes for recessive intellectual disability. *Mol. Psychiatry*, **22**, 1604–1614.
  - 104) Richard, E.M., Polla, D.L., Assir, M.Z., Contreras, M., Shahzad, M., Khan, A.A., Razzaq, A., Akram, J., Tarar, M.N., Blanpied, T.A., et al. (2019) Bi-allelic Variants in METTL5 Cause Autosomal-Recessive Intellectual Disability and Microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.*, **105**, 869–878.
  - 105) Freund, I., Eigenbrod, T., Helm, M., & Dalpke, A.H. (2019) RNA Modifications Modulate Activation of Innate Toll-Like Receptors. *Genes (Basel)*, **10**, 92.
  - 106) Vogel, P. & Stafforst, T. (2019) Critical Review on Engineering Deaminases for Site-Directed RNA Editing. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **55**, 74–80.

## 著者寸描

### ●鈴木 勉 (すずき つとむ)



東京大学大学院工学系研究科教授。博士(理学)。

■略歴 1996年東京工業大学にて博士取得。2008年より現職。

■研究テーマと抱負 タンパク質合成のメカニズムとRNA修飾の機能に興味があります。RNAが持つ分子的な側面をあぶりだすことで生命現象の本質に迫るような研究を意識しています。

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

■趣味 プールで泳ぐこと。