

【総説】

代謝疾患における RNA 修飾の分子機能および RNA 修飾を標的とするオミクス研究の最前線

魏 范研、富澤 一仁

熊本大学 大学院生命科学研究部 分子生理学分野

要約

タンパク質のリン酸化修飾や DNA のエピジェネティクス修飾に代表される生体分子の化学修飾は、様々な生命現象に関わることが以前より知られている。最近、タンパク質や DNA 以外に、RNA にも多彩な転写後修飾が存在することが明らかになってきた。さらに、RNA 修飾の破綻が様々な疾患の発症に関わり、RNA 修飾病という概念が現在打ち出されていることから、RNA に関する研究は量の研究から質の研究へと、新たな局面を迎えている。本稿は、タンパク質翻訳マシナリーを構成する tRNA に存在する修飾に焦点を絞り、tRNA 修飾の分子機能及び疾患との関連について総説するとともに、tRNA 修飾の解析に関する最新の方法についても触れたい。

キーワード：RNA、修飾、質量分析、次世代シーケンス

1. はじめに

1950 年から 1960 年にかけて、mRNA は遺伝情報を運び、rRNA と tRNA とともにタンパク質翻訳マシナリーを構成することが明らかになり、現代の生命科学の基本原則であるセントラルドグマが構築された。一方、生化学的なアプローチによる RNA 研究も核酸化学の初期から盛んに行われ、1956 年に Cohn と Volkin が uridine の修飾体である pseudouridine を世界で初めて報告し、RNA 修飾生物学の幕が開けた [1]。そして、1980 年代から質量分析器など分析技術の急速の発展により、新しい RNA 修飾が次々と同定され、これまでに原核生物や真核生物から約 100 種類以上の RNA 修飾が報告されている [2]。これらの修飾のうち、約 80 種類以上の RNA 修飾は tRNA に特異的に存在し、その他の約 20 種類の RNA 修飾は他の RNA (rRNA や mRNA) にも存在する [1]。これらの RNA 修飾の化学構造は、極めて複雑でありながら進化的に保存されるものも多い。しかし、RNA 修飾の豊富さと複雑さがゆえに、これまで細菌や酵母など比較的シンプルな生物種での研究が主流となり、哺乳動物細胞や個体など複雑な生命体にお

ける修飾の研究が遅れていた。

最近、次世代シーケンス技術などゲノム解析技術の発展により、様々な疾患に関わる遺伝子が同定されるようになった。興味深いことに、これらの疾患原因遺伝子のうち、RNA 修飾に関わる遺伝子が多数含まれていた。これらの発見がきっかけとなり、RNA 修飾の重要性が広く一般の研究者に認識されるようになり、RNA 修飾の高次機能の研究が現在大きなトレンドとなっている。本稿は、様々な疾患において RNA 修飾が果たす役割について総説するとともに、RNA 修飾を標的とするオミクス研究も紹介したい。

2. tRNA と 2 型糖尿病

1) 2 型糖尿病と CDKAL1

世界保健機構 (WHO) の推計によると、糖尿病を罹患している人は 2014 年時点で 4.2 億人以上に上り、その数が年々増加傾向になる。このような社会的な背景から、全ゲノム解析技術を駆使した研究が 2006 年頃から盛んに行われるようになり、これまでに 50 以上の原因遺伝子が同定されている [3]。これら 2 型糖尿病関連遺伝子のうち、最も再現性の高い原因遺伝子の一つは CDKAL1 である。2007 年、Nature Genetics 誌や Science 誌に同時に 4 報の論文が掲載され、CDKAL1 遺伝子に存在する特異的な一塩基多型変異 (SNPs) が 2 型糖尿病の発症と有意に相関することが明らかになった [4-7]。興味深いことに、危険型 CDKAL1 SNPs を保有

連絡先：魏 范研 〒860-8556

熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1

TEL : 096-373-5051

E-mail : fywei@kumamoto-u.ac.jp

する2型糖尿病患者はアジア圏に多く、インスリン抵抗性ではなくインスリン分泌が障害されていた [47]。

CDKAL1のフルネームであるCdk5 Associated Protein 1-like 1が示す通り、CDKAL1はリン酸化酵素であるCdk5の関連分子として同定されているタンパク質である。Cdk5は神経細胞で主に機能する酵素であるが、膵β細胞においてカルシウムチャンネルをリン酸化することでインスリン分泌を制御することが知られていた [8]。しかし、CDKAL1はCdk5のリン酸化酵素活性とは全く関連せず、tRNAと結合するドメインや、硫黄-鉄クラスターと結合するRadical SAMドメインといった細菌のtRNA修飾酵素に見られるドメイン構造を有する [9]。筆者らは、CDKAL1のユニークなドメイン構造に着目しtRNA修飾に焦点を絞って解析を行った。その結果、CDKAL1はリジンに対応するtRNAを修飾する酵素であることを突き止めた [10]。細胞質側ではリジンtRNAが2種類あり、1種類はアンチコドンの配列がUUUであるtRNA^{Lys(UUU)}、もう1種類はアンチコドンの配列がCUUであるtRNA^{Lys(CUU)}である。CDKAL1は、tRNA^{Lys(UUU)}を特異的に認識し、37位に位置するthreonylcarbonyl化されたアデノシン (t⁶A) をチオメチル化する (図1 A-B 参照) [10]。チオメチ

ル化修飾 (ms²t⁶A) を有するtRNA^{Lys(UUU)}は、多くの真核生物、さらに古細菌までも確認されていることから、tRNAのチオメチル化修飾は細胞の生命活動において普遍的な役割を有すると推察される。

2) チオメチル化修飾の分子機能

チオメチル化修飾の分子機能は、細菌tRNAのチオメチル化修飾に関する結晶解析で明らかになった (図1 C 参照) [11]。tRNA上のチオメチル基が立体的に大きく突き出ることによって、チオメチル基の硫黄原子がちょうどリジンコドンの第1字目uridineの真上に位置し、硫黄原子とuridineの間に分子間相互作用が形成される (図1 参照)。古典的な考えでは、tRNAとmRNAとの結合は3対のワトソン・クリック塩基間結合 (A:UあるいはC:G) で形成されると考えられていた。一方、チオメチル基がアンチコドンの外側からmRNA上の塩基と結合を形成することが発見されたことで、1960年代に樹立されたコドン・アンチコドンモデルに新たな1ページが加わった。

チオメチル化修飾によって形成される新しいtRNA-mRNA間結合は、コドン・アンチコドン結合を補強することでリジンコドンの正確な翻訳に重要である。ホタ

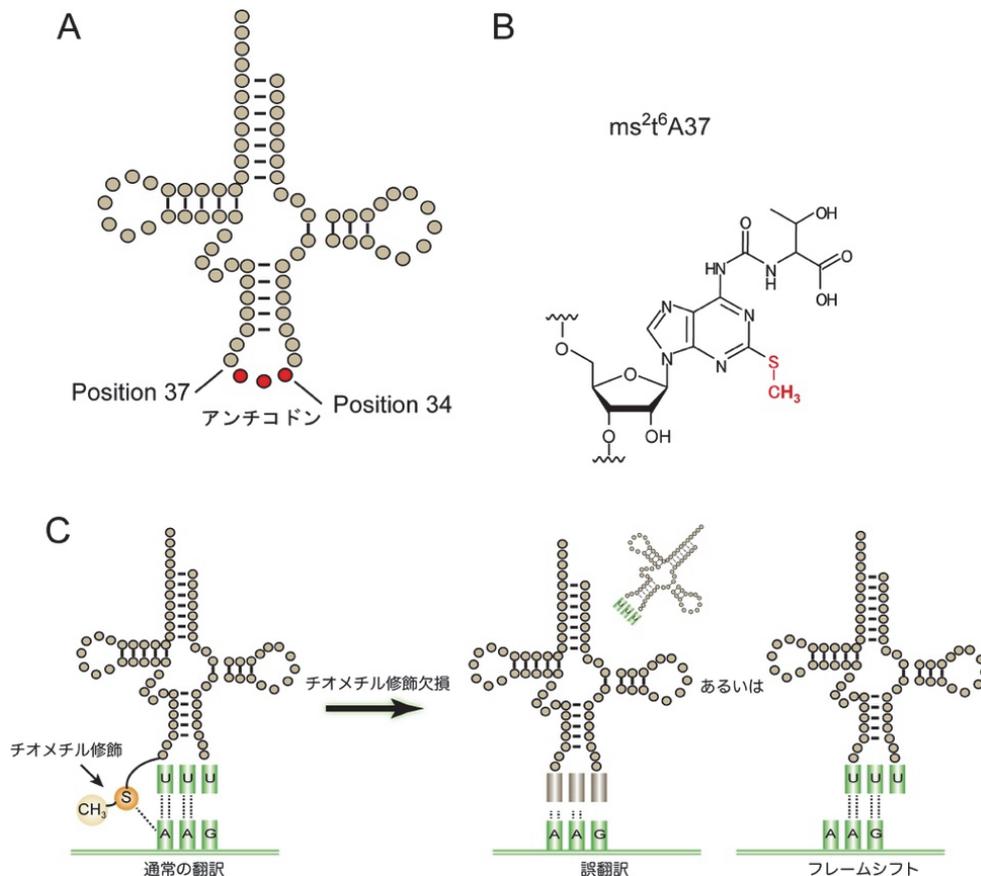


図1 tRNAチオメチル化修飾の分子機能

(A) tRNAの2次構造。赤丸はアンチコドンを表す。Position34はアンチコドンのうち、挿ざり結合を形成する場所である。(B) tRNA^{Lys(UUU)}にあるチオメチル化修飾 (ms²t⁶A) の化学構造。赤字はチオメチル化修飾の化学式を表す。(C) チオメチル化修飾の分子機能。チオメチル化基はコドンの第1字目のAと相互作用することで、リジンコドンの正確な翻訳に必要である。チオメチル化修飾が欠損すると、結合が弱まり、他のtRNAが誤って入る誤翻訳や読み枠がずれるフレームシフトが起きる。

ルシフェラーゼの活性中心にある 529 番のリジン残基はルシフェラーゼ活性に必須であるため、ホタルルシフェラーゼをリジンコドンのレポーターとして用いることができる [10]。ルシフェラーゼを野生型の細胞またはチオメチル化修飾がない細胞に導入し活性を測定すると、チオメチル化修飾欠損細胞では、ルシフェラーゼ活性が顕著に低下していた [10]。興味深いことに、同じリジンコドンでも AAG コドンでの翻訳が AAA コドンでの翻訳よりも障害されやすかった [10]。アンチコドンが UUU である tRNA^{Lys(UUU)} が AAG コドンと結合するとき、第三字目の塩基対は U と G である (図 1 参照)。この塩基対は一般的に揺らぎ結合と呼ばれ、一般的なワトソン・クリック結合より結合力が弱い。すなわち、チオメチル化修飾は分子間力の比較的弱いコドン・アンチコドンペアを補強することで、コドンによる翻訳バイアスを軽減し安定な翻訳に重要であることが推察された。さらに、野生型の細胞とチオメチル化修飾欠損細胞において、ルシフェラーゼ自体のタンパク量に変化が見られなかったことから、リジンコドンがリジン以外のアミノ酸に誤翻訳されたことでルシフェラーゼ活性が低下したと推察された (図 1 参照)。

3) チオメチル化修飾欠損による 2 型糖尿病発症の機序

リジン残基はタンパク質のアセチル化やユビキチン化などに重要であるが、タンパク質のプロセッシングにも

重要である。特にインスリンが成熟型になるために、プロインスリンのリジン残基で切断を受けなければならない。CDKAL1 遺伝子に変異を有する人は主にインスリンの分泌量が低下することで 2 型糖尿病を発症することから、CDKAL1 によるチオメチル化修飾がインスリンの翻訳に重要であると考えられた。実際、Cdkal1 ノックアウトマウスの膵 β 細胞においてリジンの取り込み量が低下し、成熟インスリンの指標である C-ペプチド量が低下していた [10]。すなわち、チオメチル化修飾がない膵 β 細胞では、プロインスリンのリジンコドンにおいて翻訳異常が生じた結果、プロインスリンのプロセッシングが障害され、成熟型インスリンの産生量が低下していた。これらモデルマウスでの結果と同様に、CDKAL1 遺伝子に変異を有する 2 型糖尿病患者においても、プロインスリンのプロセッシング異常が報告されている [12]。さらに、糖尿病の発症と関連する CDKAL1 遺伝子の変異は、チオメチル化修飾のレベル低下ならびにインスリン分泌量の低下と有意に相関することも報告されている [13,14]。これらヒトおよびモデルマウスの結果から、危険型 CDKAL1 の遺伝子変異は tRNA^{Lys(UUU)} のチオメチル化修飾レベルを低下させ、プロインスリンの誤翻訳を引き起こすことで、インスリンによる糖代謝を障害し、最終的に 2 型糖尿病の発症を誘発すると考えられた (図 2 参照)。

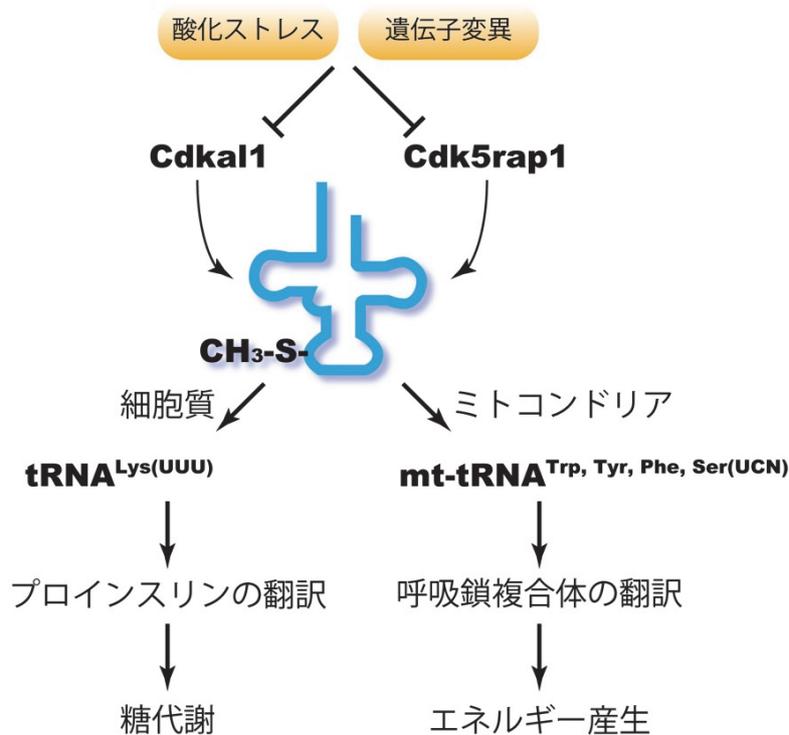


図 2 チオメチル化修飾の生理機能と制御機構

Cdkal1 と Cdk5rap1 はそれぞれ細胞質とミトコンドリアの tRNA をチオメチル化することで正確なタンパク質翻訳に重要である。遺伝的な要因や酸化ストレスなどにより tRNA 修飾酵素の活性が低下し、チオメチル化修飾レベルが低下すると、異常なタンパク質翻訳が誘発される。そのため、糖代謝やエネルギー産生が障害され、2 型糖尿病やミトコンドリア病の発症が誘発される。

3. tRNAとミトコンドリア疾患

1) ミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾

筆者らは、哺乳動物細胞において Cdk5rap1 と類似するドメイン構造を持つタンパク質として Cdk5rap1 を同定した [15]。Cdk5rap1 は N 末端にミトコンドリア局在シグナルを持ち、ミトコンドリアの内膜に局在する。質量分析法を用いて検討した結果、Cdk5rap1 はミトコンドリア tRNA のうち、mt-tRNA^{Phe}、mt-tRNA^{Trp}、mt-tRNA^{Tyr} および mt-tRNA^{Ser(UCN)} の 37 位に位置するイソペンテニル化されたアデノシン (i⁶A) を認識し、チオメチル化修飾 (ms²i⁶A) を行う [15]。ミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾の分子機能は、細胞質 tRNA^{Lys(UUU)} のチオメチル化修飾と同じく、ミトコンドリアにおける正確な翻訳に必要な。特に、mt-tRNA^{Phe}、mt-tRNA^{Tyr} および mt-tRNA^{Ser(UCN)} が対応するコドンのうち、第 3 字目の塩基対が揺らぎ結合を形成するコドンの翻訳がチオメチル化修飾の要求性が高かった。たとえば、mt-tRNA^{Phe} はアンチコドンに AAA をもち、フェニルアラニンコドン UUU と UUC を解読する。チオメチル化修飾を欠損する細胞では、UUU コドンの解読に問題が見られなかったが、UUC コドンにおいて読み枠のずれ (フレームシフト) が多発していた [15]。

筆者らは Cdk5rap1 欠損マウスを作成しその表現系を詳細に解析した [15]。ミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾が欠損すると、ミトコンドリア内のタンパク質翻訳が障害され、電子伝達系を構成するタンパク質群の量が顕著に低下した。さらに、ミトコンドリアの形態を電子顕微鏡で観察すると、ミトコンドリアが大きく膨らみ、クリステなど内膜の構造が崩れたミトコンドリアが多数観察された。哺乳動物ではミトコンドリアが骨格筋と心筋に特に豊富であるため、ミトコンドリアの機能低下がこれらの組織機能に影響しやすい。実際、Cdk5rap1 欠損マウスの骨格筋と心筋においてミトコンドリアの電子伝達系活性が低下した結果、ATP の合成量が低下し、骨格筋の持久力や心筋の収縮力が大幅に低下していた (図 2 参照)。

2) ミトコンドリア病とチオメチル化修飾

ミトコンドリア病は、ミトコンドリアに関連する遺伝子の変異に起因する遺伝疾患であり、有効な治療法及び治療薬が存在しない。ミトコンドリア病と関連する遺伝子変異のうち、ミトコンドリア DNA の 3243 番に位置する A が G に変異する点変異が多く確認されている [16]。A3243G 変異を持つミトコンドリア患者は、MELAS 症候群 (ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群) とよばれる病態を示し、非常に重篤である。3243 番の A はミトコンドリア tRNA^{Leu} に位置するが、その場所は翻訳に重要なアンチコドン領域ではないため、MELAS 症候群の詳細な分子機序は不明である。東京大学の鈴木らによって、A3243G 変異を有する mt-tRNA^{Leu} の 34 位 Uridine においてタウリン修飾が欠失していることが報告された [17,18]。34 位の塩基はコドンと揺らぎ結合を形成す

るため、タウリン修飾が欠失することで、mt-tRNA^{Leu} はロイシンコドンと結合できなくなり、翻訳異常が生じると考えられた。筆者らは MELAS 症候群を呈するミトコンドリア病患者の血球細胞由来の RNA を用いてチオメチル化修飾を検討した結果、A3243G 変異の頻度が高いほど、mt-tRNA^{Phe}、mt-tRNA^{Trp}、mt-tRNA^{Tyr} および mt-tRNA^{Ser(UCN)} の ms²i⁶A 修飾レベルが低下していた [15]。すなわち、A3243G 変異はまず mt-tRNA^{Leu} のタウリン修飾欠失を誘発し、ミトコンドリアタンパク質翻訳がまず一旦低下する [17,18]。次に、mt-tRNA^{Phe}、mt-tRNA^{Trp}、mt-tRNA^{Tyr} および mt-tRNA^{Ser(UCN)} の ms²i⁶A 修飾が二次的に低下することで、ミトコンドリアのタンパク質翻訳が大幅に障害され、ミトコンドリア病が進行すると考えられた。mt-tRNA^{Leu} の A3243G 変異によって他種の mt-tRNA に存在する ms²i⁶A 修飾が低下する機構はまだ完全に明らかではないが、次節に述べる酸化ストレスが原因の一つである可能性が高い。

4. tRNA 修飾の制御機構

tRNA の修飾はタンパク質翻訳の効率や正確性に重要であるため、一般的にタンパク質や DNA の化学修飾のように大きく変動しないとされている。ところが、Cdk5rap1 や Cdk5rap1 は、システイン残基を介して硫黄-鉄クラスターと結合するドメインが存在する。また、チオメチル基の硫黄は、非常に親電子性の高いシステインパースルフィドに由来することが最近明らかになった [19]。これら硫黄由来の生体分子が容易に酸化され失活することから、過度の酸化ストレスがチオメチル化修飾酵素の活性を阻害し、tRNA チオメチル化修飾レベルが低下することが考えられた。実際培養細胞に低濃度の過酸化水素を添加すると、修飾酵素の発現量に変化が見られなかったが、細胞質 tRNA の ms²i⁶A 修飾及びミトコンドリアの ms²i⁶A 修飾が添加後 12 時間で顕著に低下していた [15]。また、窒素酸化物を細胞に添加しても ms²i⁶A と ms²i⁶A 修飾が有意に低下していた。酸化ストレスのスカベンジャーとなる化合物が過酸化水素などによるチオメチル化修飾の低下を阻止できたため、細胞内チオメチル化修飾は酸化ストレスレベルによって大きく左右されることが考えられた (図 2 参照)。これらのことから、上節に述べた A3243G 変異を有するミトコンドリア病患者における ms²i⁶A レベルの低下という結果も、酸化ストレスに対する酵素の高い感受性に由来する可能性が高い。実際以前の研究で A3243G 変異が活性酸素種の増加を誘発することが報告されている [20]。すなわち、mt-tRNA^{Leu} の A3243G 変異によって誘発された酸化ストレスは Cdk5rap1 の活性を阻害することで、多種の mt-tRNA の ms²i⁶A 修飾が二次的に低下すると考えられた。

5. tRNA 修飾を標的とするオミクス研究

1) 質量分析による tRNA 修飾解析

tRNA の化学修飾はそれぞれ固有の質量および化学構造を示すため、質量分析法は tRNA 修飾の分析におい

もっとも信頼性の高い方法である。具体的な方法についてはこの分野の第一人者である東京大学の鈴木らの総説に譲り [21]、ここではその概念について概説する。tRNA にある修飾を分析するには、(1)単離、(2)化、(3)質量分析という3つの操作を行う必要がある (図3参照)。tRNA を単離するために、まず tRNA の3'末端あるいは5'末端に相補的な配列を有する DNA オリゴプローブを合成する (図3参照)。DNA オリゴプローブの先端にビオチンをつけることで、オリゴプローブをアビジシンビーズに固相化することができる。次に、細胞や組織由来の全 RNA を熱変性し tRNA の高次構造を解いてから、オリゴプローブと混合させて標的 tRNA を単離する。

タンパク質を質量分析計で解析する場合、一般的にトリプシンでタンパク質を短く切断してから分析する。tRNA の場合も同様で、tRNA を RNase で分解し、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) で解析する。Nuclease P のような非特異的な RNase を使用すると、tRNA が一塩基まで完全分解される。この場合、比較的流速の早い HPLC (0.1 ~ 0.5 ml/min) を使用することで、修飾塩基の混合液をカラムで高速分離することができるうえ、分離した修飾塩基を四重極質量分析計のような汎用質量分析計で高感度かつ多成分一斉分析が可能である (図3参照)。しかし、tRNA を一塩基まで

分解すると修飾の位置情報が完全に消失する。たとえば、同じ修飾が tRNA の数箇所に存在する状況では、修飾に変動が見られても、どこの塩基の修飾が変動しているかについては判断ができない。また、四重極質量分析計は質量分解能がそれほど高くないため、新規の修飾を探索するような実験は困難である。一方、RNase T1 のような特定の塩基 (RNase T1 の場合は G のみ) で限定分解する消化酵素を用いると、数個の塩基からなる tRNA の断片ができる (図3参照)。この場合、遅い流速を得意とするナノ LC を用いて断片を分離する。また、断片の正確な質量を検出するには、イオントラップ型のような高い質量分解能を有する質量分析計を使用する必要がある。単一塩基の分析に比べ、tRNA 断片の分析は高度な技術力を必要とするが、tRNA 断片の精密な質量から塩基配列を推定することが可能であるため、断片中のどの塩基にどのような修飾が存在するかを決定できる。

2) 質量分析による tRNA 修飾解析の問題点

質量分析計による tRNA 修飾の分析は修飾そのものを計測するため、定量性と信頼性が高い。しかし、質量分析計で分析するには標的の tRNA をまず Affinity 精製しなければならぬため、細胞や組織から多量の RNA サンプル (数十 μg 以上) を出発物質として準備する必

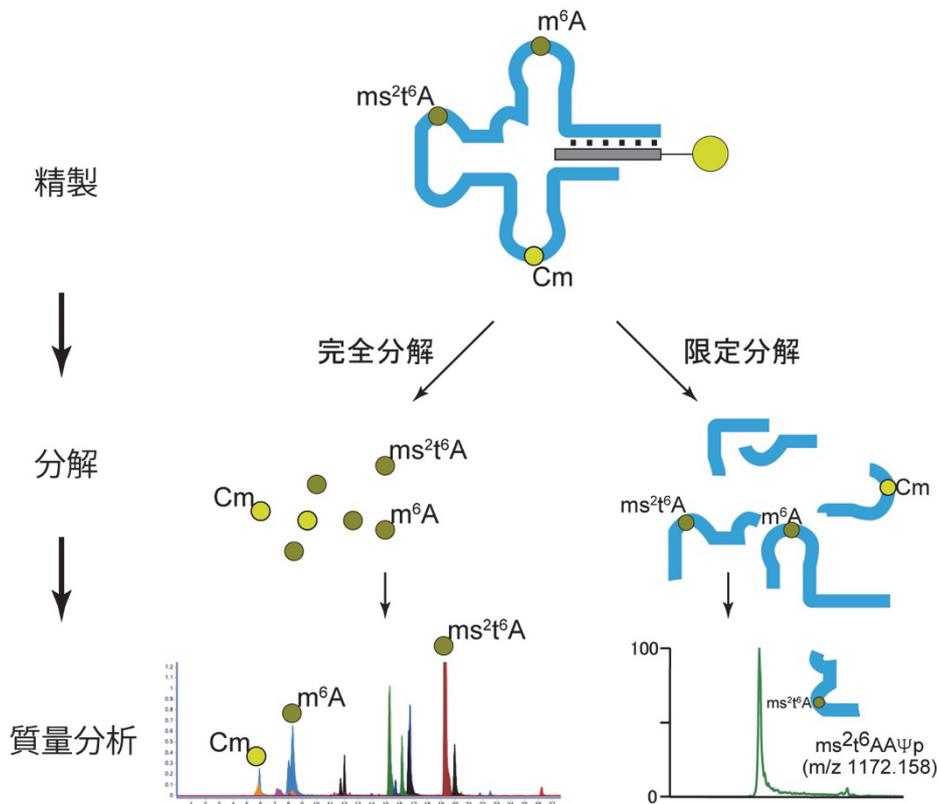


図3 質量分析法による tRNA 修飾解析

相補的な配列を有するオリゴプローブを用いて tRNA を精製した後、RNase で tRNA を一塩基まで完全分解、あるいは数個の塩基からなる tRNA 断片まで限定分解する。最後に、分解産物を液体クロマトグラフィーで分離し、質量分析計で質量を測定することで、tRNA 修飾の種類と量を測定する。

要がある。さらに、tRNA が多種多様であることも精製にとって大きな問題である。ヒトにおいて tRNA をコードする遺伝子は擬遺伝子も含め 600 個以上あるとされている。このことは、同じアンチコドンを持つ tRNA 遺伝子は核 DNA 上に多数存在することを意味する。たとえば、アンチコドンが GAA である tRNA^{Phe} をコードする遺伝子は核 DNA 上に 14 個も存在する。さらに、これら tRNA^{Phe} 遺伝子はすべて同じ配列ではなく、塩基配列にわずかな相違が存在する。このため、tRNA の Affinity 精製では、比較的的存在量の多い、またオリゴプローブと完全に相補的な tRNA 種が優先的に精製され、プローブと若干ミスマッチを有する tRNA 種が精製されない可能性がある。このような技術的な限界から、すべての tRNA をカバーする修飾解析は質量分析計ではまだ難しい。

3) 次世代シーケンサーによる tRNA 修飾解析

近年、次世代シーケンス技術の発展と普及により、tRNA 修飾を少ない量の全 RNA から網羅的に検出する方法が開発されつつある。詳細のプロトコルについては論文にあるため [22]、本稿ではその概略について紹介

する。次世代シーケンサーによる mRNA や miRNA の発現解析は以前より行われていたが、tRNA は強固な 2 次構造をとるため、ライブラリー作成時の逆転写反応が阻害されやすい。また、メチル化修飾などの tRNA 修飾はワトソン・クリック塩基間結合に対して立体障害を示すため、逆転写が阻害されやすい。これらの理由によりこれまでの方法では tRNA を標的とするシーケンシングが難しかった。最近、RNA の高次構造に強い逆転写酵素が応用されはじめ、構造的な障害がある程度解決された。また、脱メチル化酵素を応用することで、tRNA のメチル化修飾を人為的に外すことが可能となった [22]。

次世代シーケンスによる tRNA 修飾解析は基本的な RNA-seq と同様、まず cDNA ライブラリーを作成する必要がある。細胞や組織からトータル RNA を精製した後、変性ポリアクリルアミドで RNA を分離し、70-80 塩基長の tRNA を切り出して精製する。その後、tRNA を脱メチル化処理した後、次世代シーケンス用のインデックスを含むオリゴプローブと逆転写酵素を用いて逆転写を行い、cDNA ライブラリーを作成する(図 4 参照)。その後、RNA-seq と同様の手順で、cDNA ライブラリー

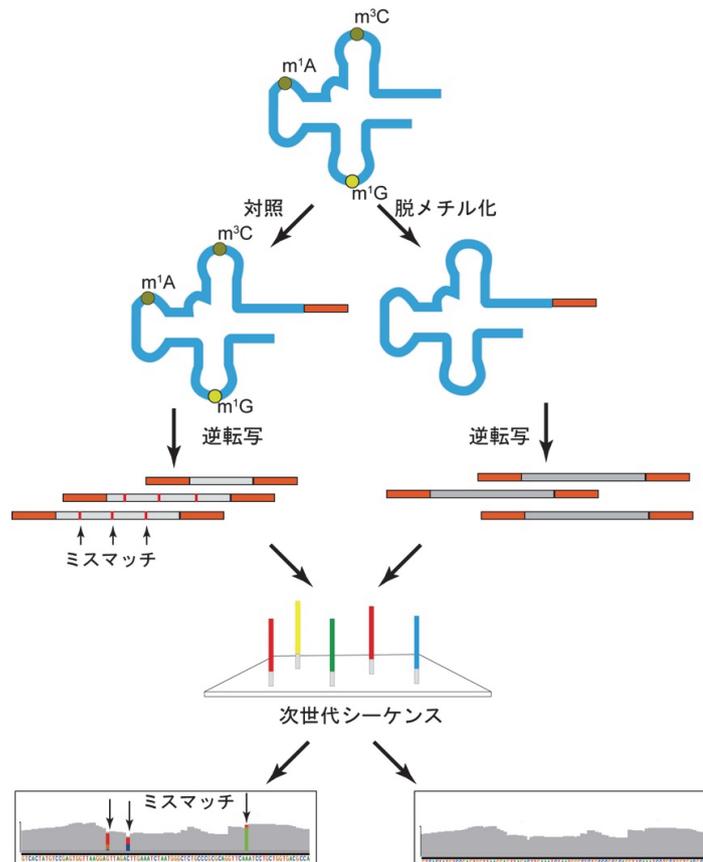


図 4 次世代シーケンスによる tRNA 修飾の同定

精製した tRNA を 2 群に分け、1 群は脱メチル化酵素で処理し、もう 1 群は処理しない。次に、次世代シーケンス用のインデックスプライマーを含むオリゴプローブで逆転写し、ライブラリーを作成する。その後、ライブラリーを次世代シーケンサーで処理し、tRNA の配列情報を得る。非処理群では修飾塩基において相補的な塩基以外の塩基を取り込むミスマッチが生じるが、脱メチル化酵素処理群ではミスマッチが生じない。ミスマッチの箇所を比較することで修飾の有無を全 tRNA で網羅的に解析することができる。

を PCR で増幅し、次世代シーケンサーで解析する。メチル化修飾などの tRNA 修飾が存在すると、逆転写時に相補的な塩基以外の塩基が誤って取り込まれることがある (ミスマッチ)。このことを利用して、脱メチル化酵素処理済みの tRNA と処理しない tRNA から得られた配列情報を比較し、ミスマッチを示す塩基が確認されれば、すなわちその塩基がメチル化修飾されていることになる (図 4 参照)。

4) 次世代シーケンスによる tRNA 修飾解析の問題点

上記の方法は少ない量の RNA から tRNA の発現量及び修飾のゲノムワイドな解析ができるため、生命活動における tRNA 修飾のダイナミクスを理解するうえで非常にパワフルなツールである。一方、シーケンス時に生じたミスマッチは tRNA 修飾以外の理由によって生じる偽陽性である可能性もあるため、シーケンス結果は常に質量分析計の結果と照合しながら慎重に解析する必要がある。また、tRNA のシーケンスは複雑な前処理を必要とするため、定量性という観点では質量分析計を用いた解析のほうがはるかに優れている。さらに、tRNA に存在するメチル化以外の化学修飾の多くが逆転写時にミスマッチを生じない。このため、上記の方法で確認できるのは限られた RNA 修飾であり、tRNA 修飾の網羅的な解析の実現にはまだ道程が遠い。

6. おわりに

tRNA 修飾を標的とするオミクス解析が開発されたことにより、tRNA 修飾が細胞内の外環境変化に応じてダイナミックに変動することや、修飾異常が様々な疾患に関わることも明らかになりつつある。さらに、tRNA のみならず、mRNA や non-coding RNA にも多彩な化学修飾が存在することが最近明らかになり、全ての RNA を対象とする Epitranscriptomics という新たな分野が創造されようとしている [23]。しかし、RNA 修飾の研究はまだ入り口に入ったばかりであり、今後様々な生命体で RNA 修飾の分子機能を詳細に解析することで、生命活動における RNA 修飾の普遍的な意義が明らかになることを期待している。

参考文献

1. Grosjean H. Modification and editing of RNA: historical overview and important facts to remember. *Topics in Current Genetics*. 12: 1-22, 2005.
2. Machnicka MA., et al., MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res*. 41(Database issue), D262-267, 2013.
3. Mohlke KL, Boehnke M. Recent advances in understanding the genetic architecture of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet*. 24: R85-92, 2015
4. Steinhorsdottir, V. et al. Variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat. Genet*. 39: 770-775, 2007

5. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316: 1331-1336, 2007.
6. Scott, L.J. et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316: 1341-1345, 2007
7. Zeggini, E. et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316: 1336-1341, 2007
8. Wei, F.Y. et al. Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nat. Med*. 11: 1104-1108, 2005.
9. Arragain, S. et al. Identification of eukaryotic and prokaryotic methylthiotransferase for biosynthesis of 2-methylthio-N6-threonylcarbamoyladenosine in tRNA. *J. Biol. Chem*. 285: 28425-28433, 2010.
10. Wei, F.Y. et al. Deficit of Lys-tRNA modification by Cdkall causes the development of type 2 diabetes in mice. *J. Clin. Invest*. 121: 3598-3608, 2011.
11. Jenner, L.B. et al. Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 17: 555-560, 2010.
12. Kirchoff, K. et al. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia* 51: 597-601, 2008.
13. Xie P., et al. Quantitative PCR measurement of tRNA 2-methylthio modification for assessing type 2 diabetes risk. *Clin. Chem*. 59: 51-59, 2013.
14. Zhou B., et al. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. *Hum. Mol. Gen*. 23: 4639-4650, 2014.
15. Wei F.Y., et al. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contribute to myopathy in mice and humans. *Cell Metab*. 21: 428-442, 2015.
16. Yatsuga S., et al. MELAS: a nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta*. 1820: 619-624, 2012.
17. Yasukawa, T., et al. Modification Defect at Anticodon Wobble Nucleotide of Mitochondrial tRNAsLeu(UUR) with Pathogenic Mutations of Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes. *J. Biol. Chem*. 275, 4251-4257, 2000.
18. Yasukawa, T., et al. Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J*. 20, 4794-4802, 2001.

19. Takahashi N, et al. Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion. *Nucleic Acids Res.* 2016. In Press.
20. Ishikawa, K., et al. Increased Reactive Oxygen Species and Anti-Oxidative Response in Mitochondrial Cardiomyopathy. *Circ. J.* 69, 617-620, 2005.
21. Suzuki T., et al. Mass spectrometric identification and characterization of RNA-modifying enzymes. *Methods Enzymol.* 425: 211-229, 2007.
22. Zheng G., et al. Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing. *Nat Methods.* 12 :835-837, 2015.
23. Frye M., et al. RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat Rev Genet.* 17: 365-372, 2016.

RNA modifications in metabolic diseases

Fan-Yan Wei, Kazuhito Tomizawa

Department of Molecular Physiology, Faculty of Life Sciences,
Kumamoto University

Abstract

Chemical modifications of bioactive molecules are critical for the biological functions. Recently, a wide variety of posttranscriptional modifications have been identified in RNA. To date, more than one hundred species of modifications have been found in tRNA, rRNA and mRNA. These modifications are crucial for the structural integrity, cellular localization and translation regulation. Moreover, dysregulation of RNA modifications has been implicated in a number of human diseases. In this review, I will discuss about the physiological functions of chemical modifications in cytoplasmic and mitochondrial tRNAs in mammalian cells, as well as the pathological relevance to metabolic diseases. I will also discuss about the new technics to identify modifications in tRNA.

Keywords : RNA, Modification, Mass spectrometry, Next generation sequencing