

特集：リボソームの機能調節と疾患

II. リボソーム RNA の転写後修飾とアSEMBリー

II-5 リボソーム RNA 転写後修飾の生合成と機能

荒井 大河, 伊藤 理, 鈴木 勉

RNAは転写後にさまざまな修飾を受けることが知られている。リボソーム RNA (rRNA)にも転写後修飾が見いだされており、これらが、リボソームの生合成や機能に密接に関わっていることが明らかになりつつある。近年、リボソームの立体構造が明らかになったことに加え、rRNA修飾酵素が同定され、rRNA修飾の生合成や機能の理解が急速に進展している。本稿では、リボソームの生合成や機能におけるrRNA修飾の役割について解説する。また修飾遺伝子の変異はヒトの疾患の原因になることが知られており、rRNA修飾が高次生命現象に与えるインパクトについて概観する。

1. はじめに

rRNAは、リボソームの中心骨格およびその機能の主要な役割を担うことが知られている。rRNAは転写後にさまざまな修飾を受けて成熟する。細菌のモデル生物である大腸菌 (*Escherichia coli*) のrRNAには17種類の修飾ヌクレオシドが合計36か所に存在する (表1)。真核生物においても、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のrRNAには約100か所、ヒトrRNAには約200か所の修飾部位が存在する (表2)。rRNA修飾の多くは塩基やリボースのメチル化やシュードウリジン (Ψ) 化などが占めている (図1)。一般的に、メチル基は局所的な疎水環境を提供したり、水素結合を弱めたりする効果がある。リボースの2'-O-メチル化は、リボースのねじれ構造をC3'-endo型に固定する役割があり、rRNAの局所的な構造形成に寄与することが知られている。 Ψ はリボースの1'炭素とウラシル環5位の炭素が結合した構造 (図1)を有しており、Uと

同様にAと塩基対合できる以外に、1位にもイミノプロトンを生じることから、分岐的な塩基対合により、しばしばRNAの構造を安定化する役割が知られている。このようなrRNA修飾の化学的な性質がリボソームの生合成や機能においてさまざまな役割を担うと考えられている。

2. リボソーム RNA の転写後修飾

大腸菌のrRNAには、合計17種類の転写後修飾が含まれ、23S rRNAには25か所、16S rRNAには11か所に存在している (表1)。これらは塩基やリボースのメチル化や Ψ 化などからなる。これらの修飾はrRNAが転写された後にそれぞれの修飾酵素 (表1)によって導入される。rRNA修飾の種類や部位は、生物種間で大きく異なっているが、種を超えて高度に保存されている修飾も存在する。rRNA修飾の大半は、小サブユニットの暗号解読中心 (decoding center)、大サブユニットのペプチド転移反応活性中心 (peptidyl transferase center) やサブユニット間の会合面 (intersubunit bridge) といった、リボソームの機能に重要な領域に集中して存在する (図2)。

真核生物のrRNA修飾の特徴として、2'-O-メチル化修飾および Ψ が多く含まれていることがあげられる (表2, 表3)。2'-O-メチル化修飾は、出芽酵母rRNAには54か所存在し、ヒトrRNAには約100か所存在すると見積もられている。一方 Ψ は、出芽酵母には45か所、ヒトでは約

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

Biogenesis and function of posttranscriptional modification of ribosomal RNA

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

表1 大腸菌の rRNA 修飾と修飾酵素

16S rRNA		
修飾	部位	修飾酵素
Ψ	516	RsuA (YejD)
m ⁷ G	527	RsmG (GidB)
m ² G	966	RsmD (YhhF)
m ⁵ C	967	RsmB (YhdB)
m ² G	1207	RsmC (YjjT)
m ⁴ Cm	1402	RsmH (YraL), RsmI (MraW)
m ⁵ C	1407	RsmF (YebU)
m ³ U	1498	RsmE (YggJ)
m ² G	1516	RsmJ (YhiQ)
m ⁶ ₂ A	1518	RsmA (KsgA)
m ⁶ ₂ A	1519	RsmA (KsgA)
23S rRNA		
修飾	部位	修飾酵素
m ¹ G	745	RlmAI (RrmA, YebH)
Ψ	746	RluA (YabO)
m ⁵ U	747	RlmC (YbjF, RumB)
Ψ	955	RluC (YceC)
m ⁶ A	1618	RlmF (YbiN)
m ² G	1835	RlmG (YgiO)
Ψ	1911	RluD (YfiI)
m ³ Ψ	1915	RluD (YfiI), RlmH (YbeA)
Ψ	1917	RluD (YfiI)
m ⁵ U	1939	RlmD (YgcA, RumA)
m ⁵ C	1962	RlmI (YccW)
m ⁶ A	2030	RlmJ (YhiR)
m ⁷ G	2069	RlmKL (YcbY)
Gm	2251	RlmB (YjfH)
m ² G	2445	RlmKL (YcbY)
D	2449	RldA
Ψ	2457	RluE (YmfC)
Cm	2498	RlmM (YgdE)
ho ⁵ C	2501	RlhA
m ² A	2503	RlmN (YfgB)
Ψ	2504	RluC (YceC)
Um	2552	RlmE (FtsJ, RrmJ)
Ψ	2580	RluC (YceC)
Ψ	2604	RluF (YjbC)
Ψ	2605	RluB (YciL)

文献⁵⁹より改変。修飾酵素の命名法は Ofengand の提唱した方法に基づく⁶⁰。I-3章の表1, II-1章の表1~3, II-6章の表1も参照。

90か所存在する。残りは塩基の修飾であり、出芽酵母とヒトの rRNA いずれも、10か所程度の塩基修飾が同定されている (表3)。塩基修飾にはメチル化が多いが、中には18S rRNA に含まれる m¹acp³Ψ [1-methyl-3-(3-amino-3-carboxypropyl) pseudouridine] (図1) のような特殊な修飾も存在する。

3. rRNA 修飾の生合成

細菌の場合、基本的には、それぞれの修飾部位を担当する rRNA 修飾酵素が存在し、rRNA やアッセムリー後のサブユニットを認識して、修飾を導入することが知られている。しかし、RsmA, RluC, RluD のように幅広い基質認識能を持ち、複数の部位を認識して修飾を導入する酵素も存在する (表1)。RlmKL も2か所をメチル化するが、この酵素は m⁷G2069 を修飾する RlmK と m²G2445 を修飾する RlmL の融合タンパク質であることがわかっている¹⁾。

rRNA のメチル化酵素は、メチル基供与体として、S-アデノシルメチオニン (Ado-Met, SAM) を用いるメチルトランスフェラーゼのスーパーファミリーに属している。しかし RlmN が触媒する A2503 のメチル化は、2分子の Ado-Met を用い、ラジカル反応を必要とする特殊なメチル化反応であることが知られている²⁾。Ψ化は、Ψシターゼによるエネルギーを消費しない修飾反応である。Ψシターゼの活性残基である Asp のカルボン酸が、マイケル付加によりウラシル環6位の炭素と共有結合するか、あるいはアシラール機構によりリボース1'炭素と共有結合することで、N-グリコシド結合が開裂し、ウラシル環が120度回転し、ウラシル環5位の炭素がリボース1'炭素と結合し、Asp が外れることでΨが生成するメカニズムが提唱されている^{3,4)}。

rRNA 修飾の *in vitro* 修飾再構成実験により、それぞれの修飾がリボソーム生合成のどの段階で導入されるかを推察することができる。RsmB と RsmD は16S rRNA の G967 と C966 をそれぞれメチル化する (表1)。*in vitro* メチル化実験によると、RsmB はリボソームタンパク質 S7 と S19 が結合する前の16S rRNA を基質とするのに対し、RsmD は両リボソームタンパク質が結合した後の16S rRNA を基質とすることが明らかになっている⁵⁾。このことは、30S サブユニットのアッセムリー過程において、それぞれの修飾がリボソームタンパク質の組み込みを感知しながら、序的に行われることを示唆している。また RsmH と RsmI は、16S rRNA の m⁴Cm1402 のメチル化酵素である⁶⁾。RsmH は N⁴-メチル化、RsmI は 2'-O-メチル化を触媒する。*in vitro* 修飾再構成によると、これらのメチル化酵素は、16S rRNA を基質とせず、30S サブユニットを基質とすることが判明した。このことは、m⁴Cm1402 が完成直前の30S に導入されることを示唆している。RlmH は

表2 出芽酵母 rRNA における snoRNA 依存的修飾

修飾	部位	snoRNA 遺伝子	Cm	650	U18 (snR18)	Am	2280	snR13
18S rRNA			Cm	663	snR58	Am	2281	snR13
Am	28	snR74	Ψ	776	snR80	Gm	2288	snR75
Am	100	snR51	Gm	805	snR39B	Ψ	2314	snR86
Ψ	106	snR44	Am	807	snR39, snR59	Cm	2337	snR64
Ψ	120	snR49	Am	817	snR60	Ψ	2340	snR9
Ψ	211	snR49	Gm	867	snR50	Um	2347	snR65
Ψ	302	snR49	Am	876	snR72	Ψ	2349	snR82
Cm	414	U14 (snR128)	Um	898	snR40	Ψ	2351	snR82
Am	420	snR52	Gm	908	snR60	Ψ	2416	snR11
Am	436	snR87	Ψ	960	snR8	Um	2417	snR66
Ψ	466	snR189	Ψ	966	snR43	Um	2421	snR78
Am	541	snR41	Ψ	986	snR8	Gm	2619	snR67
Um	578	snR77	Ψ	990	snR49	Am	2640	snR68
Am	619	snR47	Ψ	1004	snR5	Um	2724	snR67
Ψ	632	snR161	Ψ	1042	snR33	Um	2729	snR51
Ψ	759	snR80	Ψ	1052	snR81	Ψ	2735	snR189
Ψ	766	snR161	Ψ	1056	snR44	Gm	2791	snR48
Am	796	snR53	Ψ	1110	snR82	Gm	2793	snR48
Am	974	snR54	Ψ	1124	snR5	Gm	2815	snR38
Ψ	999	snR31	Am	1133	snR61	Ψ	2826	snR34
Cm	1007	snR79	Cm	1447	U24 (snR24)	Ψ	2865	snR46
Gm	1126	snR41	Am	1449	U24 (snR24)	Ψ	2870	snR34
Ψ	1181	snR85	Gm	1450	U24 (snR24)	Um	2921	snR52
Ψ	1187	snR36	Um	1888	snR62	Ψ	2923	snR10
m ¹ acp ³ Ψ	1191	snR35 ※	Ψ	2129	snR3	Ψ	2944	snR37
Um	1269	snR55	Ψ	2133	snR3	Am	2946	snR71
Gm	1271	snR40	Ψ	2191	snR32	Cm	2948	snR69
Ψ	1290	snR83	Cm	2197	snR76	Cm	2959	snR73
Ψ	1415	snR83	Am	2220	snR47	Ψ	2975	snR42
Am	1428	snR56	Am	2256	snR63	5.8S rRNA		
Gm	1572	snR57	Ψ	2258	snR191	Ψ	73	snR43
Cm	1639	snR70	Ψ	2260	snR191			
25S rRNA			Ψ	2264	snR3			
Am	649	U18 (snR18)	Ψ	2266	snR84			

※Ψ化のみが snR35 によって行われる。3D rRNA modification maps database⁶¹⁾を参考に作成。

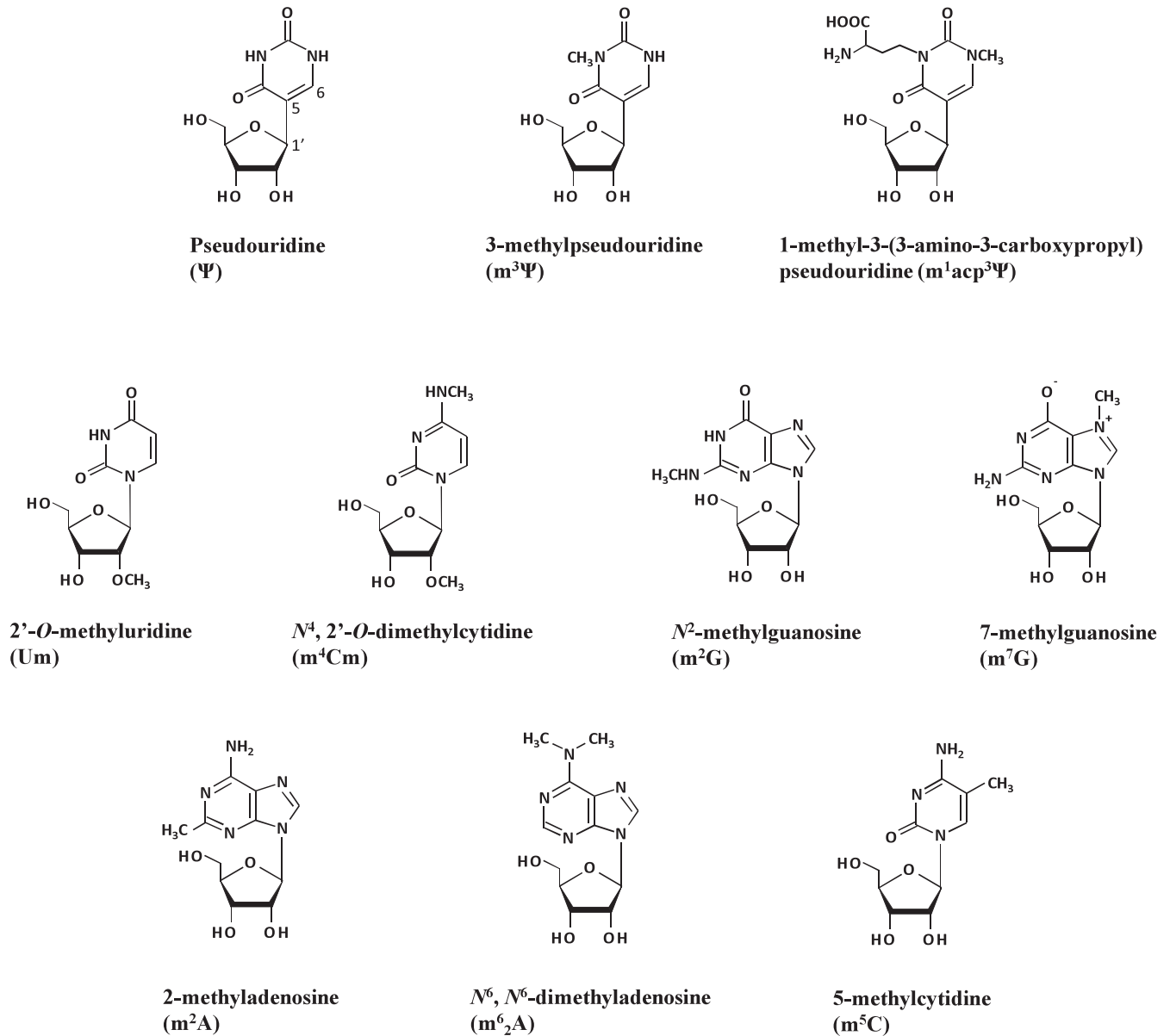


図1 rRNA にみられる転写後修飾の化学構造
本稿に登場する代表的なものを示した。Ψには炭素の番号をつけた。

23S rRNA の m³Ψ1915 のメチル化酵素であるが, RlmH は 23S rRNA も 50S サブユニットも基質とせず, 70S リボソームを基質とすることが知られている。このことは, m³Ψ1915 のメチル化がリボソームの生合成が完了した後に導入されることを示している。

真核生物リボソームの場合, 2'-O-メチル化およびΨ化は, 核小体に存在する低分子 RNA-タンパク質複合体 (snoRNP: small nucleolar ribonucleoprotein) が行っていることが知られている⁷⁾。snoRNA にはその構造から Box C/D タイプ (図 3A) と Box H/ACA タイプ (図 3B) の 2 種類が知られ, それぞれが rRNA のリボースの 2'-O-メチル化と Ψ化のガイド RNA として働くことが知られてい

る。Box C/D という名前は, 5'側から順に, Box C (RUGAUGA), D'(CUGA), C'(UGAUGA), D (CUGA) という共通配列を持つことに由来する。rRNA 上の修飾部位と相補的な 10~22 塩基長の配列が C-D'間または C'-D 間にあり, メチル化の導入位置を決定するガイド配列として機能している (図 3A)。一方で, Box H/ACA は, 二つのヘアピン構造をつなぐヒンジ領域に H box (ANANNA), 3'末端近傍に ACA (ANA) 配列を持つことに由来する。それぞれのヘアピン内の内部ループに rRNA の修飾部位と相補的な配列 (9~13 塩基) があり, Ψ化部位を決めるガイド配列になっている (図 3B)。Box C/D snoRNA にはメチル化酵素である Nop1p (ヒトでは fibrillarin) を主成分とし,

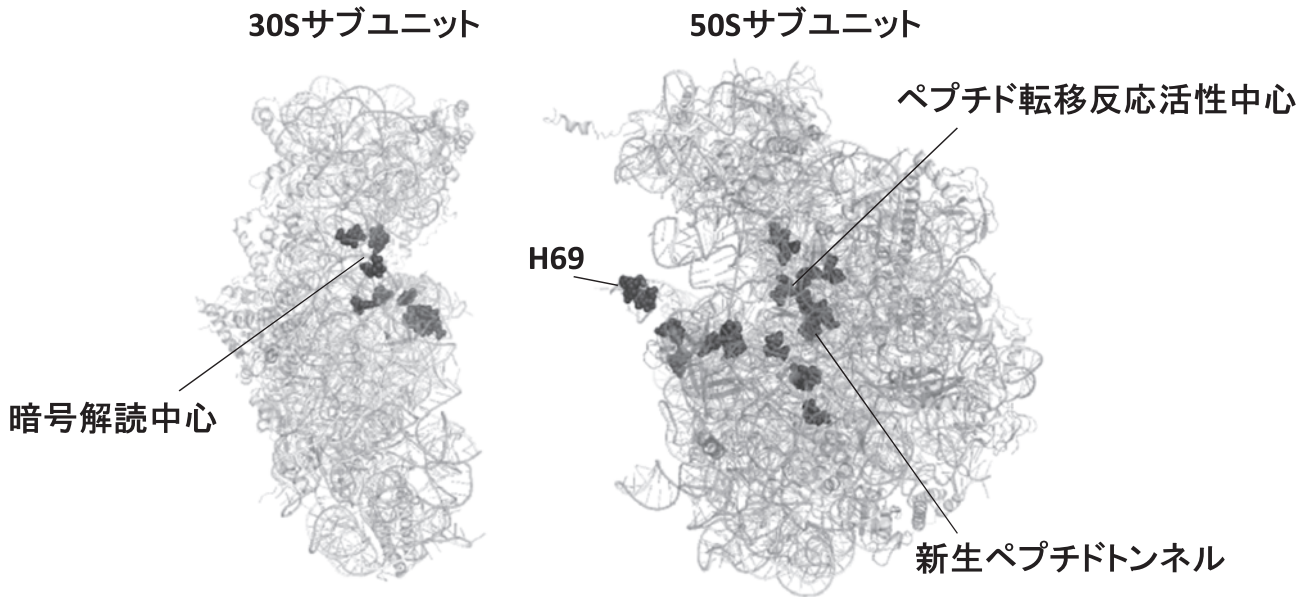


図2 大腸菌リボソーム上における rRNA 修飾の位置
修飾部位は最密充填表示で示した。立体構造の座標は PDB ID 3I8G と 3I8F を使用した⁵⁸⁾。

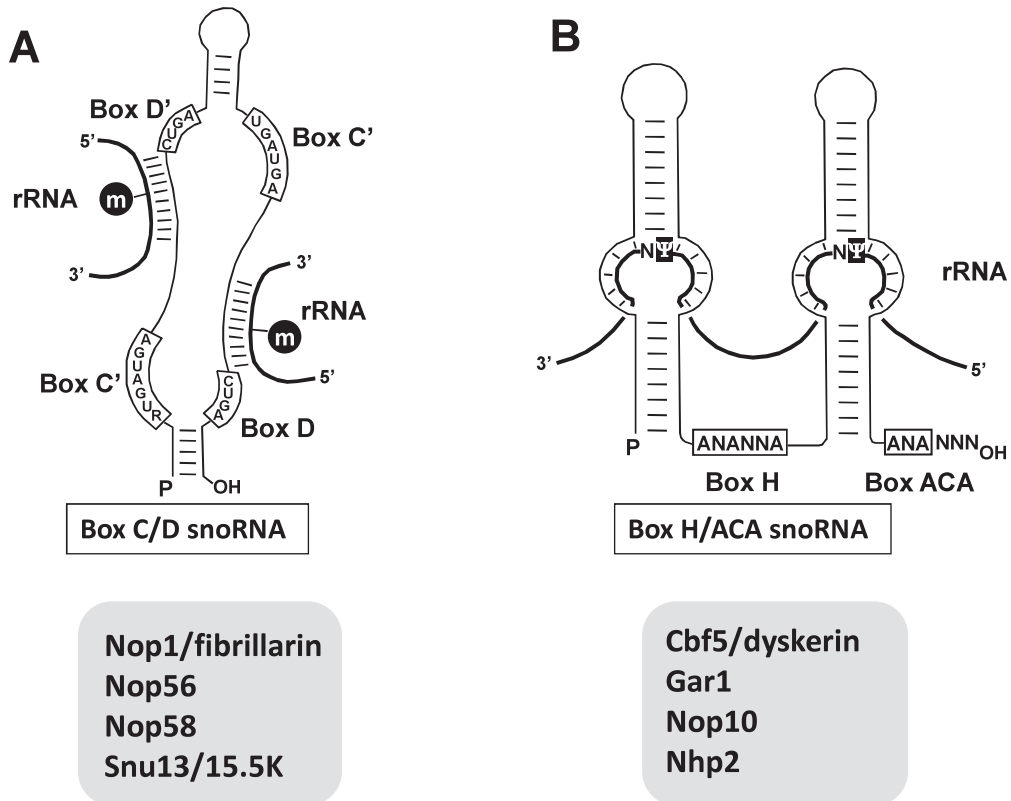


図3 snoRNA は rRNA 修飾のガイド RNA である
(A) Box C/D snoRNA の二次構造と rRNA との相互作用様式。メチル化部位を示した。枠内には snoRNP の構成タンパク質を示した。(B) Box H/ACA snoRNA の二次構造と rRNA との相互作用様式。Ψ化部位を示した。枠内には snoRNP の構成タンパク質を示した。

表3 出芽酵母における snoRNA 非依存的な rRNA 修飾と修飾酵素

修飾	部位	修飾酵素遺伝子
18S rRNA		
m ¹ acp ³ Ψ	1191	<i>EMG1</i> ※
m ⁷ G	1575	<i>BUD23</i>
m ⁶ ₂ A	1791	<i>DIMI</i>
m ⁶ ₂ A	1792	<i>DIMI</i>
25S rRNA		
m ¹ A	645	<i>RRP8</i>
m ⁵ U	956	Unknown
m ¹ A	2142	<i>BMT2</i>
m ⁵ C	2278	<i>RCM1</i>
m ³ U	2634	Unknown
m ³ U	2843	Unknown
m ⁵ C	2870	<i>NOP2</i>
Gm	2922	<i>SPB1</i>
m ⁵ U	2924	Unknown
5S rRNA		
Ψ	50	<i>PUS7</i>

※Ψは snR35 (表2) によって導入される。Emg1p はΨの1位のメチル化酵素である。3位のアミノカルボキシプロピル基の修飾酵素は未同定である。3D rRNA modification maps database⁶¹⁾を参考に作成。

Nop58p, Nop56p, Snu13p (ヒトでは 15.5K) の4種のタンパク質が結合し, Box C/D snoRNP を形成している。一方 Box H/ACA snoRNP には snoRNP と Ψ synthase である Cbf5p (ヒトでは dyskerin), Gar1p, Nhp2p, Nop10p の4種のタンパク質から構成される。これらの共通の RNA 修飾酵素がターゲット配列に特異的な snoRNA と結合し, snoRNP を形成することで多数の RNA 修飾を間違えることなく効率的に行うことが可能である。snoRNA は2か所のガイド配列を持ち, 1種類の snoRNA が複数の修飾部位をガイドすることができる (表2)。snoRNP はリボソームの生合成の場である核小体に局在し, rRNA 前駆体 (pre-rRNA) の転写と協調して修飾が形成されることが知られている⁸⁾。

4. リボソーム生合成における rRNA 修飾の役割

リボソームの生合成は rRNA の転写と協調して進行することが知られている⁹⁾。rRNA 前駆体の転写に伴い, rRNA の二次構造や高次構造が形成され, 段階的にリボソームタンパク質が組み込まれる。またその過程で rRNA 前駆体の

プロセッシングが進行し, rRNA 修飾が導入される。これらの過程には, RNA ヘリカーゼや GTPase に代表されるアッセンブリー因子と呼ばれる多くの非リボソームタンパク質を要求し, ATP や GTP などのエネルギーを消費する⁹⁾。rRNA 修飾酵素の中にはアッセンブリー因子として機能するものがある。

細菌の RlmE (RrmJ, FtsJ) は 23S rRNA のヘリックス 92 (H92) に存在する Um2552 (図4) のメチル化酵素である¹⁰⁾。Um2552 は同じ H92 内の C2556 および H71 の U1955 と base triple を形成し (図4C), ドメイン V と IV (図4A) の会合に関与している。また H92 は通称 A ループと呼ばれ, Um2552 の隣の G2553 は, 翻訳中に A サイト tRNA の CCA 末端の C75 と塩基対合する重要な塩基である (図4B)¹¹⁾。実際, Um2552 は A ループの構造形成に寄与していることが示唆されている¹²⁾。Um2552 と RlmE は修飾部位と酵素ともに, 進化的に高度に保存されている。出芽酵母には, RlmE のホモログとして, Mrm2p と Spb1p が存在する。Mrm2p はミトコンドリアリボソームの 21S rRNA の Um2791 を形成し¹³⁾, Spb1p は細胞質リボソームの 25S rRNA の Um2921 と Gm2922 を形成する (表3)^{14,15)}。Um2921 は Spb1p の他に snoRNA (snR52) 依存的なメカニズムによっても形成される (表2)¹⁴⁾。これら二つの Um はともに大腸菌 23S rRNA の Um2552 と相同する位置に存在する。ヒトでは FTSJ3 と FTSJ2 がそれぞれのホモログに相当する。これらの事実は RlmE の担う役割が生物種を超えて重要であることを示唆している。*rlmE* を欠損した大腸菌は著しい生育阻害を示し, 翻訳活性や翻訳精度への影響が生じるが^{10,16)}, この欠損株で最も特徴的なのは, 50S の後期のアッセンブリー中間体である 40S 粒子が蓄積することである¹⁷⁾。この 40S 粒子は, 高濃度のマグネシウムイオン (~10 mM) 存在下では, 沈降係数が 50S に変化するという特徴的な物性を有している。また, 40S 粒子には, late assembly protein として位置づけられている L16 や L28 の組み込み効率が低いことが知られている。*rlmE* 欠損によって生じるリボソームのアッセンブリー異常は, アッセンブリー因子として知られる二つの GTPase, ObgE や EngA の過剰発現により緩和することができる¹⁸⁾。これらの事実から, RlmE による Um2552 のメチル化は, 50S の後期のアッセンブリー過程において重要な役割を担っていると考えられる。筆者らは, RlmE による Um2552 形成が Um2552-C2556-U1955 の base triple (図4C) を安定化させることで, ドメイン V と IV の会合を促進するのではないかと考え, 現在その検証を行っている。

細菌の KsgA は 16S rRNA の3'末端近傍 A1518 と A1519 をジメチル化する酵素である (表1)。*ksgA* を欠損した大腸菌では, 16S rRNA の前駆体である 17S rRNA が蓄積することが知られている¹⁹⁾。また, KsgA 変異体を過剰発現

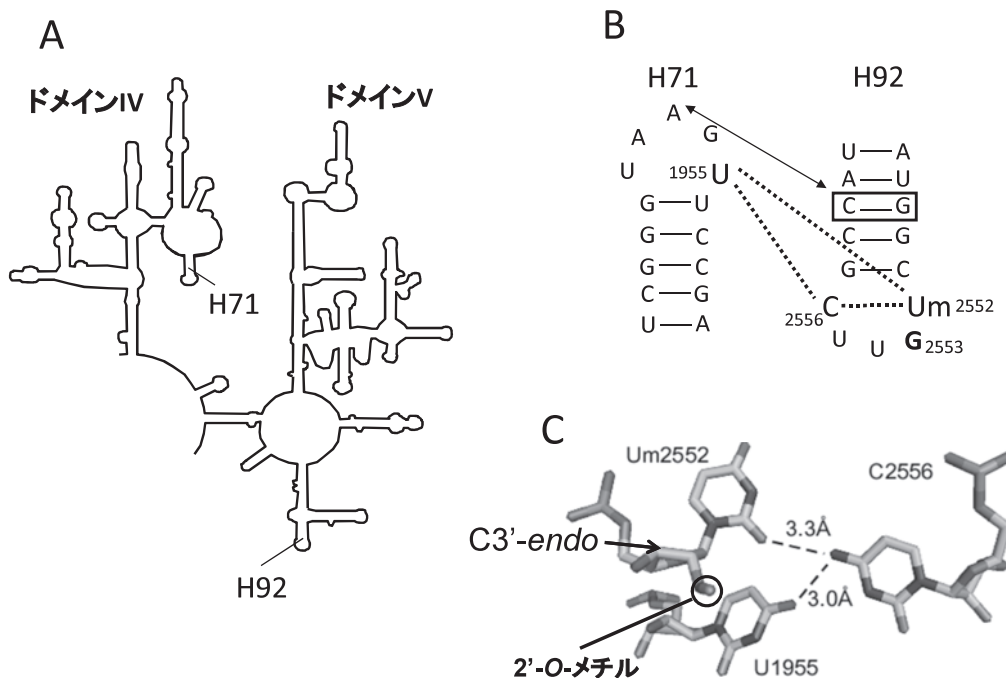


図4 23S rRNAのUm2552はドメイン間の会合に関与する
 (A) 23S rRNAのドメインIVとVの二次構造, H71とH92の位置を示した. (B) H92とH71の相互作用. (C) Um2552-C2556-U1955のbase triple.

するとKsgAが結合した17S rRNAを含む30Sの前駆体が蓄積することから, KsgAによるrRNAのジメチル化は17Sから16Sへのプロセッシングを促進する役割があることが示唆されている¹⁹⁾. また, KsgAは進化的に広く保存されており, Dim1pは真核生物のホモログである²⁰⁾(表3). DIM1は必須遺伝子であり, Dim1pは33S rRNA前駆体のA1位, すなわち18S rRNAの5'末端のプロセッシングに必須の因子であることが知られている²¹⁾. しかし, A1位のプロセッシングが正常でかつ, ジメチル化活性を持たないDIM1変異体が取得されている²²⁾ことから, Dim1pによる18S rRNAのジメチル化と5'末端のプロセッシング促進能は分離した機能であることが推察されている. KsgA/Dim1pは小サブユニットの生合成中間体に結合し, rRNAのプロセッシングの促進とジメチル化を触媒することで, 小サブユニットの形成に寄与すると考えられる.

細菌のRluDは23S rRNAのH69の1911, 1915, 1917位の3か所を Ψ 化する Ψ シンターゼである(表1). H69はtRNAとの結合や30Sサブユニットとの会合に関与する重要な機能部位である²³⁾. *rluD*を欠損した大腸菌は, 生育阻害を示し50Sの生合成中間体が蓄積することから, RluDによるH69の Ψ 化は50Sの生合成に関与すると考えられている²⁴⁾. また*rluD*欠損株の生育阻害は, RluDの Ψ 化活性のない変異体でも相補できることから, Ψ そのものが重要ではなく, RluDが50Sの生合成中間体に結合することが50Sのアッセンブリーに寄与すると考えられて

いる²⁵⁾. しかし, *rluD*欠損による表現型は, 解離因子であるRF2の変異により相補することができるため, *rluD*欠損によって生じる50Sのアッセンブリー異常は, 翻訳異常に起因する二次的な効果による可能性も指摘されている²⁶⁾.

細菌のRlmKLは当研究室で同定された修飾酵素であり, m⁷G2069を修飾するRlmKとm²G2445を修飾するRlmLの融合タンパク質である¹⁾(表1). この二つの修飾部位は23S rRNAドメインVのH74の両側に位置する. *in vitro*メチル化再構成実験で, RlmKLにはH74の二本鎖構造を解くRNAヘリカーゼ様の活性があることが判明しており, 実際に, H74の二本鎖構造を解いた基質の方が, それぞれのメチル化活性が高いことも判明している. このことは, 50Sアッセンブリーの過程において, RlmKLは局所的に23S rRNAを解きながらメチル化を導入していることを示唆している(図5). 実際, *rlmKL*欠損株はアッセンブリー因子である*deaD*の欠損と合成的な生育阻害と低温感受性を示し, 50Sサブユニットの生合成中間体の蓄積が観測されている. 以上の知見は, RlmKLは酵素そのものが, H74およびドメインVの構造形成を通じて50Sアッセンブリーに寄与していることを示唆している.

5. 翻訳におけるrRNA修飾の機能

多くのrRNA修飾は, 小サブユニットの暗号解読中心(decoding center)や大サブユニットのペプチド転移反応活

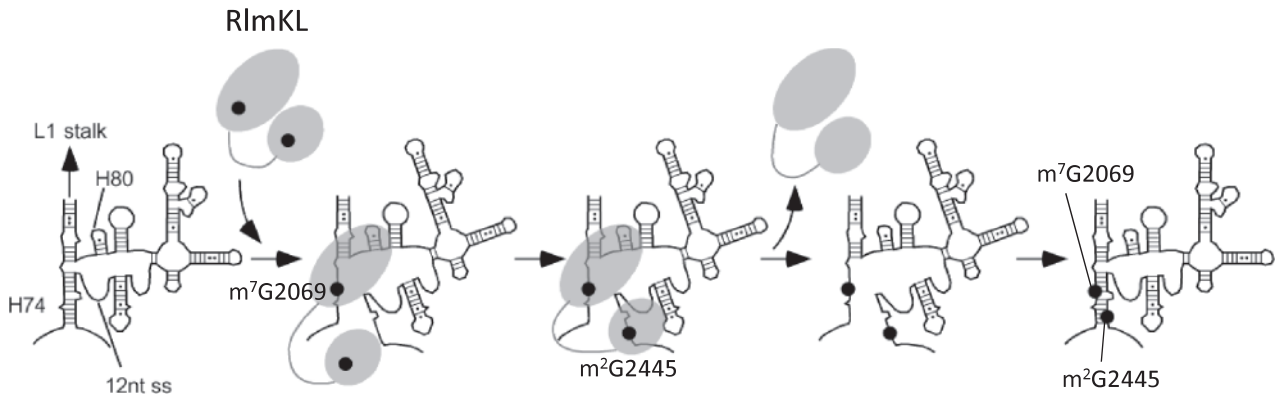


図5 RlmKLによるメチル化はドメインVの局所的な構造変化を伴う

RlmKLはRNAヘリカーゼ様の活性を持ち、修飾の過程でドメインVのH74を解くと考えられる。

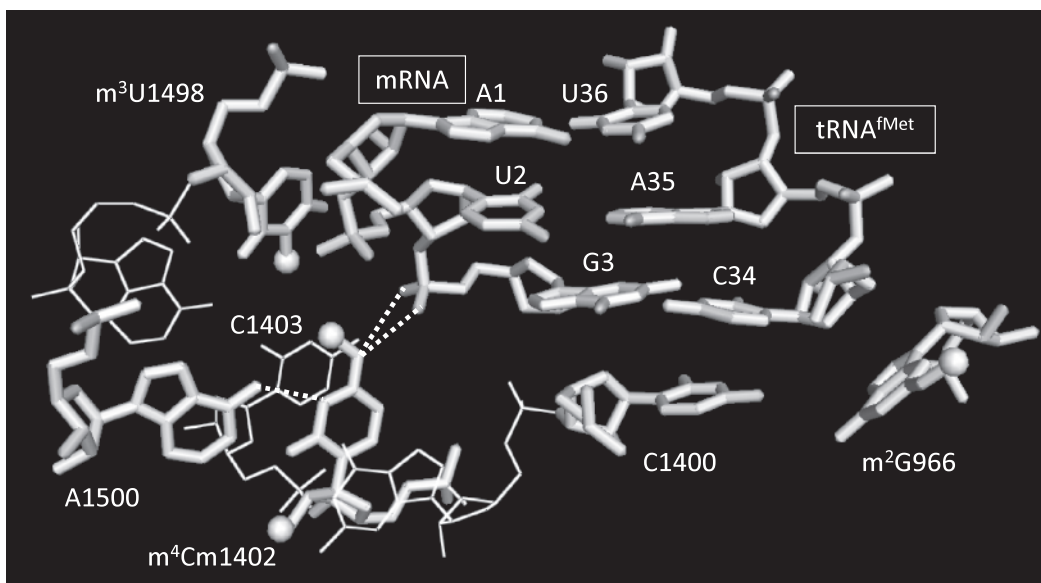


図6 大腸菌リボソームPサイトにおける $m^4Cm1402$ とその近傍

RNA修飾のメチル基を球体で示した。A1, U2, G3はそれぞれPサイトのコドン1, 2, 3字目を示す。C34, A35, U36はそれぞれ $tRNA^{fMet}$ のアンチコドン1, 2, 3字目を示す。水素結合を点線で示した。

性中心 (peptidyl transferase center), さらにはサブユニット間の会合面 (intersubunit bridge) などにみられ、翻訳の効率や精度を微調節する役割が知られている。

16S rRNAの $m^4Cm1402$ はPサイトに位置しており、この修飾は翻訳精度の維持に関与することがわかっている。RsmHとRsmIは当研究室で発見されたメチル化酵素であり、 $m^4Cm1402$ の N^4 -メチル化と2'-O-メチル化をそれぞれ触媒する⁶⁾(表1)。*rsmH*欠損株では、AUUコドンからの翻訳開始効率の上昇が観察された。これは、 $m^4Cm1402$ の N^4 -メチル化がAUGコドン以外からの翻訳開始を妨げる役割を担っていることを示唆している。また一方で、*rsmI*欠損株では、UGAコドンのリードスルーやフレームシフトの上昇が観測された。30Sサブユニットの結晶構造(図6)によると $m^4Cm1402$ は N^4 位でPサイトコドンの2, 3字目間のリン酸基と水素結合しており、 N^4 -メチル化は

この相互作用を弱める役割があると考えられ、*rsmH*欠損株でAUUコドンからの翻訳開始効率が上昇したのはこのためかもしれない。また、 N^4 -メチル基は m^3U1498 のメチル基とファンデルワールス相互作用により疎水的な環境を作っていると考えられる(図6)。2'-O-メチル基は $m^4Cm1402$ をC3'-endo型に平衡を偏らせると考えられ、A1500との水素結合やC1403とのスタッキング相互作用にも影響を与えると考えられる(図6)。

真核生物のrRNAにはたくさんの Ψ が存在するが、 Ψ の機能として、興味深い結果が報告されている。先述したように、 Ψ はBox H/ACA snoRNPによって導入される。酵母における Ψ シンターゼであるCbf5p(ヒトではdyskerin)の遺伝子は必須遺伝子であるが、 Ψ 化形成能を失った変異体(D95A)が取得されており、この変異株のrRNAにはすべての Ψ が欠損している²⁷⁾。このリボソームの翻

訳能を調べたところ、IRES (internal ribosome entry site) 依存的な翻訳開始反応が著しく減少することが判明した。また、翻訳の精度を調べたところ、フレームシフト効率の上昇と終止コドンのリードスルーの効率の低下が観測された。実際にこの変異株からリボソームを単離し解析したところ、野生株由来リボソームと比較して、IRES や tRNA との結合能が低下していることが判明した²⁸⁾。したがって、rRNA の Ψ は IRES や tRNA との結合を強めることで IRES 依存的な翻訳開始や翻訳の精度の維持に寄与していると考えられる。

タンパク質の発現量は、しばしば新生ペプチド鎖と、50S サブユニットのトンネル (peptide exit tunnel) との相互作用によって調節されている。特に、SecM や ErmCL などの新生ペプチド鎖にはトンネルと強く相互作用することでタンパク質合成を停止させ、下流にコードされたタンパク質の発現を誘導する機能があることが知られている²⁹⁾。m²A2503 は新生ペプチドトンネルの入口近傍に位置し、新生ペプチド鎖との相互作用を調節することで、翻訳調節に関与することが知られている³⁰⁾。ErmCL の新生ペプチド鎖は erythromycin 存在下で、トンネルと強く相互作用することでリボソームが停滞するが、m²A2503 のメチル化酵素である RlmN の欠損株では、ErmCL の新生ペプチド鎖との相互作用が弱く、翻訳アレストが十分に保てないことが明らかとなっている。

6. rRNA 修飾と抗生物質耐性

抗生物質の中には、リボソームを標的として、タンパク質合成を阻害するものが多く存在する。しばしば rRNA 修飾は抗生物質に対する感受性を大きく変化させることが知られている。

たとえば、RluC を欠損した大腸菌は、tiamulin, clindamycin, linezolid などに対する感受性が増大する³¹⁾。これらの抗生物質はいずれもペプチド転移活性中心を標的とする。RluC は 955, 2504, 2580 位を Ψ 化する修飾酵素であり、このうちペプチド転移活性中心に存在する Ψ 2504 の形成が、これらの抗生物質に対する耐性に寄与していることが判明している。また、逆に修飾形成が抗生物質に対する感受性に寄与する例もある。16S rRNA の h45 に存在する二つのジメチルアデノシン (m⁶₂A1518, m⁶₂A1519) は KsgA により形成されるが、この酵素の欠損株では、kasugamycin に対して耐性になることが知られている³²⁾。同様に、16S rRNA の m⁷G527 のメチル化酵素 RsmG の欠損株では、streptomycin 感受性が低下することが報告されている³³⁾。リボソームの結晶構造をみると、streptomycin が 30S サブユニットに結合するためには、G527 のメチル化が必要であることが確認できる³⁴⁾。

また、抗生物質耐性遺伝子の中にはしばしば rRNA のメ

チル化酵素が見ついている。このような修飾酵素は、抗生物質を産生する細菌が、自身のリボソームを保護する手段として獲得したものであり、それが、プラスミドなどを介した水平伝播によって病原菌などほかの細菌に広がったものと考えられる。マクロライド系抗生物質、リンコサマイド系抗生物質、ストレプトグラミン系抗生物質などを含む、いわゆる MLS 抗生物質は、50S サブユニットの新生ペプチド鎖が通るトンネルの入口近傍に結合することで、タンパク質合成を阻害する³⁵⁾。Erm ファミリーと呼ばれる一連のメチル化酵素は、新生ペプチドトンネル内の A2058 の N⁶ 位をメチル化することでマクロライドなどの結合を妨げ、抗生物質耐性を付与することが知られている³⁶⁾。放線菌の一種でマクロライド系抗生物質 tylosin を産生する *Streptomyces fradiae* は耐性遺伝子として *ermN* (*tlrD*) と *ermS* (*tlrA*) を持っているが、それぞれの産物が、A2058 をモノメチル化、ジメチル化することがわかっている³⁷⁾。さらに、別の耐性遺伝子である *rlmAII* (*tlrB*) が G748 の N¹ 位をメチル化する³⁷⁾。これら 2 か所のメチル化が協動的に tylosin 耐性に寄与していることが知られている。*erm* 遺伝子の発現は、翻訳段階でマクロライドの濃度依存的に調節されることが知られている³⁸⁾。Erm メチラーゼである ErmC の翻訳量は、先述したように 5' リーダーペプチドである ErmCL の翻訳中にマクロライドの erythromycin が存在すると、新生ペプチド鎖とトンネルとの強い相互作用により、リボソームが停滞し、mRNA の二次構造が変わることで下流の ErmC が発現するという巧妙な仕組みを用いている。

7. rRNA 修飾による自然免疫の回避

樹状細胞やマクロファージなどに発現する一群の Toll-like receptor (TLR) は、細菌、真菌やウイルスなどの病原微生物の構成成分をリガンドとして認識し、自然免疫応答を引き起こすことが知られている³⁹⁾。いくつかの TLR は修飾度の低い細菌の RNA をリガンドとして認識することが知られている。昨年、マウスの TLR13 は細菌 23S rRNA の 2055~2064 位の RNA フラグメントをリガンドとして認識することが報告された⁴⁰⁾。さらに興味深いことに Erm ファミリー遺伝子を持つ細菌由来の 23S rRNA は TLR13 に認識されないことが判明した。すなわち、Erm メチラーゼによる A2058 のメチル化は、MLS 抗生物質に対する耐性を獲得するだけでなく、マウスの TLR13 による認識を妨げることで、自然免疫から回避するという機能も兼ね備えていることになる。

8. rRNA 修飾異常と疾患

ヒトの一細胞中において、毎分 7,500 個ものリボソームが生産されると見積もられている。したがって細胞にとっ

表4 rRNA修飾の異常と疾患

疾患名	原因遺伝子	酵母ホモログ	機能
先天性角化不全症 (dyskeratosis congenital: DC)	<i>DKC1</i> (dyskerin)	<i>CBF5</i>	Box H/ACA snoRNP の Ψ シンターゼ, scaRNP およびテロメラーゼの構成因子
先天性角化不全症 (DC)	<i>NOP10</i>	<i>NOP10</i>	Box H/ACA snoRNP, scaRNP, テロメラーゼの構成因子
先天性角化不全症 (DC)	<i>NHP2</i>	<i>NHP2</i>	Box H/ACA snoRNP, scaRNP, テロメラーゼの構成因子
トリーチャー・コリンズ症候群 (Treacher Collins syndrome: TCS)	<i>TCOF1</i> (Treacle)	なし	rRNA の転写促進, 18S rRNA の 2'-O-メチル化に関与
ボーエン・コンラディ症候群 (Bowen-Conradi syndrome: BCS)	<i>EMG1</i>	<i>EMG1</i>	18S rRNA における $m^1\text{acp}^3\Psi$ のメチル化酵素
B 細胞悪性リンパ腫 (B cell lymphoma)	<i>U50, U50B</i>	なし	28S rRNA の Cm2849 と Gm2864 の Box C/D snoRNA

て、リボソームの生合成は、大量の因子とエネルギーを消費する重要なイベントである。リボソームの構成因子やアッセムリー因子の異常は、しばしばヒトの疾患として現れ、これらはリボソーム病 (ribosome disease, ribosomopathy) と総称される。リボソーム病の中でも、rRNA の修飾異常に起因すると思われるものを表4にまとめた。これらの多くは遺伝性疾患であり、各遺伝子のヘテロ変異が原因となっている。また、組織や器官特異的に異常が現れ、症状はさまざまである。その一方、成長阻害やがん発症リスクの増加は、多くのリボソーム病にみられる特徴である。

1) 先天性角化不全症 (dyskeratosis congenital : DC)

この疾患の主な症状として、爪や皮膚、粘膜の形成異常、骨髄の異常とともに、がん発症のリスクが高まることが知られている。DC は X 連鎖性劣性遺伝、常染色体劣性遺伝、常染色体優性遺伝と3種類に分類される。このうち X 連鎖性劣性遺伝によるものが最も重い症状を呈するが、原因は X 染色体にコードされている *DKC1* (dyskerin, 出芽酵母では Cbf5p) の変異であることがわかっている⁴¹⁾。DKC1 は Box H/ACA snoRNP の Ψ シンターゼであり、変異により rRNA の Ψ の形成率が低下することが判明している。また、 Ψ は正常な rRNA のプロセシングに必要であり、実際、*DKC1* に変異を持った DC のモデルマウスでは、rRNA 中に含まれる Ψ が減少しリボソーム生合成の阻害がみられる⁴²⁾。このモデルマウスは骨髄形成不全と肺と乳腺にがんが発生し、ヒト DC の表現型を示した。また先述したように、rRNA の Ψ は IRES 依存的な翻訳開始や翻訳の精度の維持にも寄与していることから、DC では翻訳

の質が低下し、プロテオーム全体に影響が生じている可能性も考えられる。また、常染色体劣性遺伝による DC の原因として報告されているのが *NOP10* と *NHP2* である⁴¹⁾。これらもまた Box H/ACA snoRNP の構成成分である。さらに、DKC1, *NOP10*, *NHP2* は、small Cajal body-specific RNP (scaRNP) やテロメラーゼ複合体の構成因子でもあることから、この疾患はリボソーム以外のシステムにも影響があると考えられる。実際、テロメラーゼを構成する逆転写酵素 TERT や、RNA 成分 TERC の変異が、常染色体優性遺伝の DC の原因になっていることが知られており⁴¹⁾、この疾患の発症メカニズムを理解するためには、リボソームとテロメラーゼの機能の両面から探究する必要がある。

2) トリーチャー・コリンズ症候群 (Treacher Collins syndrome : TCS)

TCS は常染色体優性遺伝疾患であり、頭部および顔面の形成異常を主な症状とする⁴³⁾。原因遺伝子である *TCOF1* の変異が現在では 200 例近く報告されている⁴⁴⁾。TCOF1 は核小体に局在し、RNA ポリメラーゼ I の転写因子 UBF と相互作用し、rDNA の転写に関与していることが示された⁴⁵⁾。また TCOF1 は、Box C/D snoRNP の NOP56 と相互作用し、18S rRNA の 2'-O-メチル化に関与することが報告された⁴⁶⁾。実際、TCOF1 の発現を抑制すると 18S rRNA の 2'-O-メチル化が減少することが知られている。したがって、TCOF1 の変異は、rRNA の転写量の減少に加え、2'-O-メチル化効率の低下が、発生の過程で特定の胚細胞の分化に影響を与えていると考えられている。TCOF1 のヘテロ変異マウスは、神経堤細胞の形成と増殖

に影響がみられ、TCSにみられるような頭部および顔面の形成異常を示した⁴⁷⁾。この原因として、神経上皮においてリボソームの定常状態量の減少があげられており、結果として、神経堤細胞のアポトーシスが増加した可能性が考えられている。*TCOF1* 変異の影響が神経上皮にしか現れない理由は、いまだに明らかにされていないが、少なくとも rRNA 修飾を含めたりボソーム生合成の異常と疾患の症状との関連が見いだされた。

3) ボーエン・コンラディ症候群 (Bowen-Conradi syndrome : BCS)

BCSは常染色体劣性遺伝疾患であり、新生児の成長障害、精神運動遅滞、小頭症や関節障害等を主な症状とする。発症した新生児の大半は、出生後1年以内に死に至る。原因遺伝子である *EMG1* は、18S rRNA の m¹acp³Ψ (酵母では1191位) のメチル化酵素をコードしている⁴⁸⁾ (表3)。*EMG1* のミスセンス変異 (D86G) を持つ BCS 患者の繊維芽細胞では、*EMG1* タンパク質の定常状態量が減少していることが報告されている⁴⁹⁾。*EMG1* の機能は rRNA のメチル化以外に、他のリボソームアッセムブリー因子と相互作用してリボソーム前駆体の複合体形成に関与することも知られている⁵⁰⁾。*EMG1* の減少あるいは m¹acp³Ψ 修飾の減少がどのようなメカニズムで BCS の発症につながるかは今後の課題である。

4) B細胞リンパ腫 (B cell lymphoma)

snoRNA の欠損や発現異常が疾患に関連するという報告がある。B細胞悪性リンパ腫では Box C/D snoRNA である U50 と U50B の発現量が減少していることが知られている⁵¹⁾。U50 と U50B は宿主遺伝子である *U50HG* のイントロンにコードされており、この疾患では *U50HG* と *BCL6* の間で染色体の転座がみられることが原因と考えられている。U50 と U50B は 28S rRNA の Cm2849 と Gm2864 の 2'-O-メチル化をガイドするが、この疾患でこれらのメチル化が低下しているかどうかは不明である。また、前立腺がん⁵²⁾ や乳がん⁵³⁾ で U50 に変異が見つかっている。非小細胞肺がんではいくつかの snoRNA が高発現しており、snoRNA を診断マーカーとして利用できる可能性が提唱されている⁵⁴⁾。出芽酵母においては、単一の snoRNA を欠損させても顕著な表現型がみられないことが知られているが、ゼブラフィッシュでは U26 や U44 などの snoRNA の発現を抑制させると、胚発生時において形態形成異常を引き起こすことが、剣持らによって報告されている⁵⁵⁾。

5) プラダー・ウィリー症候群 (Prader-Willi syndrome : PWS)

rRNA 修飾に関与するかどうかは明確でないが、

snoRNA の欠損で生じる疾患としてプラダー・ウィリー症候群 (Prader-Willi syndrome : PWS) が知られている。PWS は、筋緊張低下、性腺機能低下、肥満、知的障害を主な症状とする。PWS では第15染色体の 15q11-q13 領域が欠損していることが知られている⁵⁶⁾。この領域には Box C/D snoRNA である HBII-85 がクラスターを形成している。またゲノムインプリンティングによる制御を受けており、通常は父系染色体のみが発現している。実際に、PWS では HBII-85 の発現低下が観測されている。しかし、HBII-85 のガイド配列には rRNA や snRNA と相補的な配列が見いだせず、HBII-85 の機能は明らかになっていない。マウスにおいて対応する snoRNA を欠損させると PWS の症状が再現される⁵⁷⁾ ことから、HBII-85 が PWS の発症に直接的に関与することが示唆される。

rRNA 修飾異常に起因する疾患の症状はさまざまである。なぜ、広範に存在するリボソームの生合成因子の異常が、特定の組織や器官のみに現れるのかは大きな謎である。リボソーム病に共通する特徴としては、大半の原因遺伝子はヘテロ変異であり、それがドミナントネガティブではなくハプロ不全を通して、発症につながっている点が増えられる。

9. おわりに

RNA 修飾は進化の過程で獲得されてきたものであり、RNA の機能に付加価値をつけるための戦略と捉えることもできる。土壌に生育する細菌は、常にほかの細菌との生存競争にさらされていることから、リボソームの生合成をより円滑に行い、翻訳の効率や精度をファインチューニングするために、rRNA 修飾を獲得したと考えられる。また、自身あるいはほかの細菌が生産する抗生物質に対する防御のために rRNA 修飾を獲得し、それを水平伝搬して広まったものもある。また、宿主に寄生して生存する細菌は宿主の免疫系から逃れるために、rRNA 修飾をうまく活用したのであろう。個々の rRNA 修飾の機能を知るためには、修飾遺伝子を破壊あるいは発現を抑制し、その表現型をみる遺伝学的手法が有効であるが、実験室的な培養環境では、しばしばその表現型が軽微であり、機能解析が難しい場合が少なくない。環境中における細菌の生育条件に着目し、さまざまなストレス条件下において機能解析を行ったときに初めて rRNA 修飾が担う本来の機能がみえてくるのかもしれない。真核生物における rRNA 修飾の研究は高次生命現象との関係を探る方向で進展していくであろう。そのためには、未知の修飾部位や修飾酵素を探索する必要がある。疾患との関連性はノックアウトマウスを用いた解析が有効であるが、リボソームの機能異常と表現型を結びつけるような新たなアプローチが必要であると感じている。

謝辞

本稿の執筆にあたり、数々の助言と有用な情報をいただいた木村聡博士（東京大学）に感謝いたします。

文 献

- 1) Kimura, S., Ikeuchi, Y., Kitahara, K., Sakaguchi, Y., & Suzuki, T. (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4071-4085.
- 2) McCusker, K.P., Medzihradsky, K.F., Shiver, A.L., Nichols, R.J., Yan, F., Maltby, D.A., Gross, C.A., & Fujimori, D.G. (2012) *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 18074-18081.
- 3) Alian, A., DeGiovanni, A., Griner, S.L., Finer-Moore, J.S., & Stroud, R.M. (2009) *J. Mol. Biol.*, **388**, 785-800.
- 4) Miracco, E.J. & Mueller, E.G. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11826-11829.
- 5) Weitzmann, C., Tumminia, S.J., Boublik, M., & Ofengand, J. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 7089-7095.
- 6) Kimura, S. & Suzuki, T. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1341-1352.
- 7) Reichow, S.L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A.R., & Varani, G. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1452-1464.
- 8) Kos, M. & Tollervey, D. (2010) *Mol. Cell*, **37**, 809-820.
- 9) Shajani, Z., Sykes, M.T., & Williamson, J.R. (2011) *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 501-526.
- 10) Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., & Richarme, G. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 714-718.
- 11) Kim, D.F. & Green, R. (1999) *Mol. Cell*, **4**, 859-864.
- 12) Blanchard, S.C. & Puglisi, J.D. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3720-3725.
- 13) Pintard, L., Bujnicki, J.M., Lapeyre, B., & Bonnerot, C. (2002) *EMBO J.*, **21**, 1139-1147.
- 14) Bonnerot, C., Pintard, L., & Lutfalla, G. (2003) *Mol. Cell*, **12**, 1309-1315.
- 15) Lapeyre, B. & Purushothaman, S.K. (2004) *Mol. Cell*, **16**, 663-669.
- 16) Widerak, M., Kern, R., Malki, A., & Richarme, G. (2005) *Gene*, **347**, 109-114.
- 17) Hager, J., Staker, B.L., Bugl, H., & Jakob, U. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 41978-41986.
- 18) Tan, J., Jakob, U., & Bardwell, J.C. (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 2692-2698.
- 19) Connolly, K., Rife, J.P., & Culver, G. (2008) *Mol. Microbiol.*, **70**, 1062-1075.
- 20) Lafontaine, D., Delcour, J., Glasser, A.L., Desgrès, J., & Vandenhoute, J. (1994) *J. Mol. Biol.*, **241**, 492-497.
- 21) Lafontaine, D., Vandenhoute, J., & Tollervey, D. (1995) *Genes Dev.*, **9**, 2470-2481.
- 22) Lafontaine, D.L., Preiss, T., & Tollervey, D. (1998) *Mol. Cell Biol.*, **18**, 2360-2370.
- 23) Hirabayashi, N., Sato, N.S., & Suzuki, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 17203-17211.
- 24) Gutsell, N.S., Deutscher, M.P., & Ofengand, J. (2005) *RNA*, **11**, 41-1152.
- 25) Gutsell, N.S., Del Campo, M., Raychaudhuri, S., & Ofengand, J. (2001) *RNA*, **7**, 990-998.
- 26) O'Connor, M. & Gregory, S.T. (2011) *J. Bacteriol.*, **193**, 154-162.
- 27) Zebarjadian, Y., King, T., Fournier, M.J., Clarke, L., & Carbon, J. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7461-7472.
- 28) Jack, K., Bellodi, C., Landry, D.M., Niederer, R.O., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Kopmar, N., Krasnykh, O., Dean, A.M., Thompson, S.R., Ruggero, D., & Dinman, J.D. (2011) *Mol. Cell*, **44**, 660-666.
- 29) Ito, K., Chiba, S., & Pogliano, K. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 1-5.
- 30) Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., Kannan, K., & Mankin, A.S. (2010) *EMBO J.*, **29**, 3108-3117.
- 31) Toh, S.M. & Mankin, A.S. (2008) *J. Mol. Biol.*, **380**, 593-597.
- 32) Helser, T.L., Davies, J.E., & Dahlberg, J.E. (1971) *Nat. New Biol.*, **233**, 12-14.
- 33) Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y., & Ochi, K. (2007) *Mol. Microbiol.*, **63**, 1096-1106.
- 34) Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., & Ramakrishnan, V. (2000) *Nature*, **407**, 340-348.
- 35) Poehlsaard, J. & Douthwaite, S. (2005) *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 870-881.
- 36) Skinner, R., Cundliffe, E., & Schmidt, F.J. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 12702-12706.
- 37) Liu, M. & Douthwaite, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14658-14663.
- 38) Chancey, S.T., Zähler, D., & Stephens, D.S. (2012) *Future Microbiol.*, **7**, 959-978.
- 39) Arpaia, N. & Barton, G.M. (2013) *Curr. Opin. Microbiol.*, **16**, 17-22.
- 40) Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., Koedel, U., Akira, S., Kawai, T., Buer, J., Wagner, H., Bauer, S., Hochrein, H., & Kirschning, C.J. (2012) *Science*, **337**, 1111-1115.
- 41) Walne, A.J. & Dokal, I. (2009) *Br. J. Haematol.*, **145**, 164-172.
- 42) Ruggero, D., Grisendi, S., Piazza, F., Rego, E., Mari, F., Rao, P.H., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P.P. (2003) *Science*, **299**, 259-262.
- 43) Dixon, J., Edwards, S.J., Gladwin, A.J., Dixon, M.J., Loftus, S. K., Bonner, C.A., Koprivnikar, K., & Wasmuth, J.J. (1996) *Nat. Genet.*, **12**, 130-136.
- 44) Splendore, A., Fanganiello, R.D., Masotti, C., Morganti, L.S., & Passos-Bueno, M.R. (2005) *Hum. Mutat.*, **25**, 429-434.
- 45) Valdez, B.C., Henning, D., So, R.B., Dixon, J., & Dixon, M.J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10709-10714.
- 46) Gonzales, B., Henning, D., So, R.B., Dixon, J., Dixon, M.J., & Valdez, B.C. (2005) *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2035-2043.
- 47) Dixon, J., Jones, N.C., Sandell, L.L., Jayasinghe, S.M., Crane, J., Rey, J.P., Dixon, M.J., & Trainor, P.A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13403-13408.
- 48) Meyer, B., Wurm, J.P., Kötter, P., Leisegang, M.S., Schilling, V., Buchhaupt, M., Held, M., Bahr, U., Karas, M., Heckel, A., Bohnsack, M.T., Wöhnert, J., & Entian, K.D. (2011) *Nucleic Acids Res.*, **39**, 1526-1537.
- 49) Armistead, J., Khatkar, S., Meyer, B., Mark, B.L., Patel, N., Coghlan, G., Lamont, R.E., Liu, S., Wiechert, J., Cattini, P.A., Koetter, P., Wrogemann, K., Greenberg, C.R., Entian, K.D., Zelinski, T., & Triggs-Raine, B. (2009) *Am. J. Hum. Genet.*, **84**, 728-739.
- 50) Schilling, V., Peifer, C., Buchhaupt, M., Lamberth, S., Liou-tikov, A., Rietschel, B., Kötter, P., & Entian, K.D. (2012) *Yeast*, **29**, 167-183.
- 51) Tanaka, R., Satoh, H., Moriyama, M., Satoh, K., Morishita, Y.,

- Yoshida, S., Watanabe, T., Nakamura, Y., & Mori, S. (2000) *Genes Cells*, **5**, 277–287.
- 52) Dong, X.Y., Rodriguez, C., Guo, P., Sun, X., Talbot, J.T., Zhou, W., Petros, J., Li, Q., Vessella, R.L., Kibel, A.S., Stevens, V.L., Calle, E.E., & Dong, J.T. (2008) *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 1031–1042.
- 53) Dong, X.Y., Guo, P., Boyd, J., Sun, X., Li, Q., Zhou, W., & Dong, J.T. (2009) *J. Genet. Genomics*, **36**, 447–454.
- 54) Liao, J., Yu, L., Mei, Y., Guarnera, M., Shen, J., Li, R., Liu, Z., & Jiang, F. (2010) *Mol. Cancer*, **9**, 198.
- 55) Higa-Nakamine, S., Suzuki, T., Uechi, T., Chakraborty, A., Nakajima, Y., Nakamura, M., Hirano, N., & Kenmochi, N. (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, 391–398.
- 56) Sahoo, T., del Gaudio, D., German, J.R., Shinawi, M., Peters, S.U., Person, R.E., Garnica, A., Cheung, S.W., & Beaudet, A. L. (2008) *Nat. Genet.*, **40**, 719–721.
- 57) Ding, F., Li, H.H., Zhang, S., Solomon, N.M., Camper, S.A., Cohen, P., & Francke, U. (2008) *PLoS One*, **3**, e1709.
- 58) Jenner, L.B., Demeshkina, N., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2010) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 555–560.
- 59) Sergiev, P.V., Golovina, A.Y., Prokhorova, I.V., Sergeeva, O. V., Osterman, I.A., Nesterchuk, M.V., Burakovsky, D.E., Bogdanov, A.A., & Dontsova, O.A. (2011) in *Modifications of Ribosomal RNA: From Enzymes to Function*, Springer-Verlag, Wien.
- 60) Ofengand, J. & Del Campo, M. (2004) in *Modified Nucleosides in Escherichia coli Ribosomal RNA*, ASM Press, Washington, DC.
- 61) Piekna-Przybylska, D., Decatur, W.A., & Fournier, M.J. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, D178–D183.
-