

## 2-Methylthio Conversion of N6-Isopentenyladenosine in Mitochondrial tRNAs by CDK5RAP1 Promotes the Maintenance of Glioma-Initiating Cells (CDK5RAP1によるミトコンドリア tRNA の N6-イソペンテニルアデノシンにおける 2-メチルチオ修飾はグリオーマ幹細胞の生存に働く)

### [ 目的 ]

Cdk5 regulatory subunit-associated protein 1 (CDK5RAP1) はミトコンドリア内に局在し、ミトコンドリア tRNA の A37 位を修飾する酵素である。CDK5RAP1 は N6-イソペンテニルアデノシン (i6A) を 2-メチルチオ修飾することでミトコンドリア内の翻訳制御、エネルギー代謝に働いているとされている。本研究では、この CDK5RAP1 によるミトコンドリア tRNA の i6A を 2-メチルチオ修飾により 2-メチルチオ-N6-イソペンテニル (ms2i6A) へと変換する働きがグリオーマ幹細胞の生存に働くことを明らかにした。

### [ 方法 ]

熊本大学医学部付属病院にて加療を受けた膠芽腫患者由来のグリオーマ幹細胞株を用いて *in vitro*、*in vivo* の実験を行った。同培養細胞における CDK5RAP1 やその他の遺伝子のノックダウンおよび遺伝子導入には作成したレンチウイルスベクターを使用した。電子顕微鏡や蛍光免疫染色での観察、フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア機能解析、培養細胞から分離、抽出したタンパク、RNA、ヌクレオシドをそれぞれウェスタンブロット、qPCR、LCMS/MS 等で解析することで検証を行った。

### [ 結果 ]

CDK5RAP1 はグリオーマ幹細胞の自己複製能、未分化状態等に代表される幹細胞性の維持に働いていた。この働きは CDK5RAP1 のミトコンドリア内翻訳制御によるミトコンドリア機能の変化によるものではなく、ミトコンドリア tRNA の i6A を 2-メチルチオ修飾により ms2i6A へと変換することで細胞内 i6A の抗腫瘍作用を軽減していたためであった。グリオーマ幹細胞では細胞内に i6A が蓄積すると AMPK-mTOR 経路の活性を介してオートファジーが亢進し、幹細胞性の消失、細胞増殖能の低下が惹起されることが明らかとなった。また、この現象はミトコンドリア tRNA の i6A を ms2i6A へと修飾する CDK5RAP1 の活性により左右されることが分かった。さらに CDK5RAP1 は内包する硫黄-鉄クラスター構造の影響で細胞が低酸素状態にあると活性が亢進するため、低酸素状態であってもグリオーマ幹細胞が生存できる一因に CDK5RAP1 の働きがあることが示唆された。

### [ 結論 ]

CDK5RAP1 によるミトコンドリア tRNA の i6A における 2-メチルチオ修飾はグリオーマ幹細胞の幹細胞性の維持、生存に働くことを明らかにした。