

博士論文

遺伝暗号の解読に関わる tRNA 修飾の生合成機構と機能解析 Biogenesis and function of tRNA modification involved in the decoding process

指導教員 鈴木勉 教授

東京大学大学院工学系研究科
化学生命工学専攻
鈴木研究室

37-137119 酒井 雄介

【背景と目的】

tRNA はタンパク質合成過程において、mRNA 上の遺伝情報を解読し、対応するアミノ酸を導入するアダプター分子である。tRNA は前駆体としてゲノムから転写された後、様々なプロセッシングによって成熟し、その過程で多彩な化学修飾を受けること (tRNA 修飾) が知られている。これまで tRNA 修飾は様々な生物種から 90 種以上の化学構造が同定されているが、近年になっても新規な修飾構造が同定されており、RNA 修飾のケミカルスペースは更に増加すると考えられている。tRNA 修飾は、tRNA の構造的な安定化に加え、アミノアシル化やコドン認識に必要であり、タンパク質合成における様々な過程で重要な役割を演じている。特にアンチコドン 1 字目は通称 wobble 位と呼ばれ、多種多様な修飾構造 (wobble 修飾) が見出されている。Wobble 修飾は精確で効率的なコドンの認識や、読み枠の維持など、翻訳において不可欠な機能を担っている。バクテリア tRNA の wobble 位におけるウリジン修飾は、遺伝暗号の解読能を制御する役割が知られている。ウリジン修飾は、ウラシル環 5 位に炭素原子を介して側鎖が結合した xm^5U 系と、酸素原子を介して修飾側鎖が結合している xo^5U 系に大別することができる。 xm^5U 系はコドン 3 字目にプリン塩基を持つ 2 コドンセット (NNR) に対応する tRNA に用いられ、NNY コドンの誤翻訳を防ぎ、コドン認識を NNR コドンに限定する役割を担っている。 xo^5U 系はファミリーコドンボックスに対応する tRNA に用いられており、コドン 3 字目にどの塩基が来ても解読できるよう、暗号解読能を拡張する役割を担っている (Fig. 1)。

先行研究から、大腸菌においては Ala、Leu、Pro、Ser、Thr、Val の 6 つのファミリーコドンボックスに対応する tRNA が、5-カルボキシメトキシウリジン (cmo^5U) とそのメチルエステル誘導体である 5-メトキシカルボニルメトキシウリジン ($mcmo^5U$) を用いる事が知られている。これらの修飾によってコドン 3 字目の G や U との塩基対合が安定化されている事が生化学的に示されている (Takai *et al.* 1996)。また、アイソアクセプター tRNA を欠損した株の解析から、一部の tRNA についてはこの修飾の寄与によって 3 字目に C を持つコドンの認識も可能となっている事が示されていた (Nasvall *et al.* 2007)。

先行研究から、大腸菌においては Ala、Leu、Pro、Ser、Thr、Val の 6 つのファミリーコドンボックスに対応する tRNA が、5-カルボキシメトキシウリジン (cmo^5U) とそのメチルエステル誘導体である 5-メトキシカルボニルメトキシウリジン ($mcmo^5U$) を用いる事が知られている。これらの修飾によってコドン 3 字目の G や U との塩基対合が安定化されている事が生化学的に示されている (Takai *et al.* 1996)。また、アイソアクセプター tRNA を欠損した株の解析から、一部の tRNA についてはこの修飾の寄与によって 3 字目に C を持つコドンの認識も可能となっている事が示されていた (Nasvall *et al.* 2007)。

cmo^5U および $mcmo^5U$ の生合成機構については、Fig. 2 に示すような多段階の反応機構である事が明らかになっている。これまで、5-ヒドロキシウリジン (ho^5U) から cmo^5U への変換を担う遺伝子 $cmoA$ と $cmoB$ が同定されており (Nasvall *et al.* 2004)、これら二つの酵素による cmo^5U 形成反応がすでに明らかにされている (Kim *et al.* 2013)。しかし、 ho^5U を形成するウリジンのヒドロキシル化については、その反応にコリスミ酸が寄与している事、酸素を必要としない事 (Hagervall *et al.* 1990) が知られていたが、酵素や基質については明らかにされていなかった。更に、 $mcmo^5U$ 生合成の最後のメチル化のステップについては、AdoMet を基質としている事は明らかにされていた (Pope *et al.* 1978) が、遺伝子は未同定であった。私は本研究中で、大腸菌 tRNA の cmo^5U と $mcmo^5U$ に着目し、 xo^5U 系修飾の生合成機構の全容解明とこれら wobble 修飾の生理的意義を明らかにする事を目的とした。特に、最初

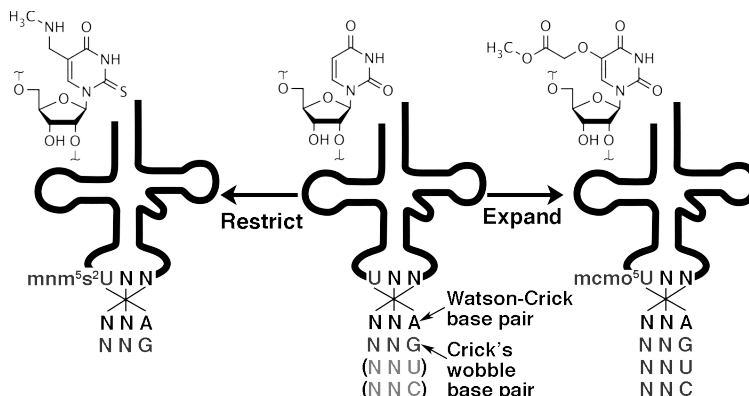
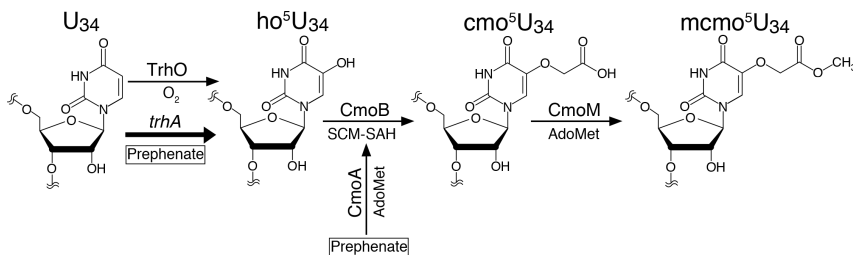


Figure 1 wobble 修飾によるコドン対合の制限と拡張。 xm^5U 系の例として mmm^5s^2U 、 xo^5U 系の例として $mcmo^5U$ を提示した。

Figure 2 大腸菌における xo^5U 系の生合成経路。本研究によって $trhA$ 、 $trhO$ によるヒドロキシル化のステップ、 $cmoM$ によるメチル化のステップが明らかとなった。



のヒドロキシル化反応と、 $mcmo^5U$ 生合成のメチル化反応について研究を行った。

【方法と結果】

A. tRNA ヒドロキシル化機構の解析

当研究室の先行研究によって xo^5U 修飾における最初のヒドロキシル化に関わる遺伝子 *trhA* が発見された。そこで *trhA* の遺伝学および生化学的解析を進める事でヒドロキシル化に関わる基質の特定や生合成機構について探究した。

大腸菌において *trhA* は cmo^5U 生合成のヒドロキシル化に関わっている

大腸菌において、 $tRNA^{Ala1}$ 、 $tRNA^{Ser1}$ 、 $tRNA^{Pro3}$ 、 $tRNA^{Thr4}$ 、 $tRNA^{Leu3}$ 、 $tRNA^{Val1}$ の 6 種類に cmo^5U または $mcmo^5U$ が存在することが知られていたが、これらの修飾がそれぞれの tRNA ごとにどのような比率で用いられているかはわかっていなかった。そこでまず私は、大腸菌野生株から、往復循環クロマトグラフィー法を用いて、これら 6 種類の tRNA を単離精製し、LC/MS 解析により wobble 修飾を詳細に解析した。その結果、 $tRNA^{Ala1}$ 、 $tRNA^{Ser1}$ 、 $tRNA^{Pro3}$ 、 $tRNA^{Thr4}$ には主に $mcmo^5U$ が使われていること、 $tRNA^{Leu3}$ 、 $tRNA^{Val1}$ には主に cmo^5U が使われていることが判明した。次に、*trhA* 欠損株より、これら 6 種類の tRNA を単離し、wobble 位を解析したところ、予想通り、多くの tRNA で未修飾ウリジン(U34)が観測されたが、その一方で、tRNA の種類によって 0~30%の cmo^5U および $mcmo^5U$ が観察された。特に $tRNA^{Leu3}$ と $tRNA^{Pro3}$ ではほとんどの修飾が失われていた。この結果から、*trhA* は $cmo^5U/mcmo^5U$ 生合成の最初のステップであるウリジンのヒドロキシル化に寄与している一方で、ヒドロキシル化の経路には *trhA* 以外の因子も関わっていることが示唆された。

比較ゲノム解析によって *trhA* と独立に tRNA のヒドロキシル化を行う *trhO* が見つかった

前述の結果から、*trhA* とは独立したヒドロキシル化経路の存在が示唆されたため、比較ゲノム解析を用いてこの経路に関わる二つ目の遺伝子の探索を行った。*cmoB* など xo^5U 系の wobble 修飾に必要な遺伝子を持つ生物種はその中間体となる ho^5U の合成遺伝子を持つと考えられるため、これらの生物種の中で、*trhA* を持たない生物種を探索した。それらの生物種が、共有する遺伝子群から、酸化還元に関与するドメインを持つ遺伝子 *trhO* を見つけた。次に実際に *trhO* がヒドロキシル化に関わるかどうかを検証するために、大腸菌において、*trhA* と *trhO* の二重欠損株を構築し、tRNA を取得後に、LC/MS で解析したところ、この二重欠損株ではウリジンのヒドロキシル化が完全に失われる事が明らかとなった。

以上の結果から、 xo^5U 系の修飾生合成において、*trhA* と *trhO* は redundant にヒドロキシル化を担っていることが判明した。なお、*trhO* 単独欠損株で減少する xo^5U 修飾は限定的であるため、ヒドロキシル化反応において、*trhA* がメジャーな役割を担い *trhO* が関与する経路はバックアップ的に関わっていると考えられた。

trhA はプレフェン酸を基質としてヒドロキシル化を行う

先行研究から xo^5U はコリスミ酸あるいはその下流の代謝物を基質とし、嫌気的な培養条件においても修飾される事が報告されていた。ヒドロキシル化に関わる基質を同定するために、まずコリスミ酸下流の全 5 つの代謝経路をそれぞれ欠損した株を構築し、基質の絞り込みを行った。その結果、チロシンやフェニルアラニンへ向かう経路を遮断した *tyrA/pheA/trhO* 三重欠損株において *trhA* 依存的なヒドロキシル化活性が失われ、 cmo^5U が完全に消失した。この知見から、*trhA* の基質の候補は、プレフェン酸、フェニルピルビン酸、4-ヒドロキシプレフェン酸の三つの代謝物にまで絞り込まれた。プレフェン酸は、フェニルピルビン酸や 4-ヒドロキシプレフェン酸の共通

の前駆体であり、大腸菌においては、PheA と TyrA それぞれが持つコリスミ酸ムターゼ活性(CM)によってコリスミ酸から合成されるが、すぐに PheA のプレフェン酸デヒドラターゼ活性(PDT)によってフェニルピルビン酸に、または TyrA のプレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性(PDH)によって 4-ヒドロフェニルピルビン酸にそれぞれ代謝される(Fig. 3)。また、プレフェン酸は CmoA によって ho⁵U のカルボキシメチル化に用いられ、フェニルピルビン酸に変換される。そこで、PheA の PDTドメインに点変異を導入し、CM 活性のみを有する PheA 変異体を構築し、*pheA/tyrA/cmoA/trhO* 四重欠損株に、この *pheA* 変異体を相補することでプレフェン酸を蓄積する株を構築した。その結果、四重欠損株において欠失していた ho⁵U がこのベクターの相補により復活した。さらに、この四重欠損株をプレフェン酸添加培地で培養したところ、ho⁵U が部分的に相補された。したがって、*trhA* はプレフェン酸を基質としてヒドロキシル化反応を担っている事が明らかとなった。

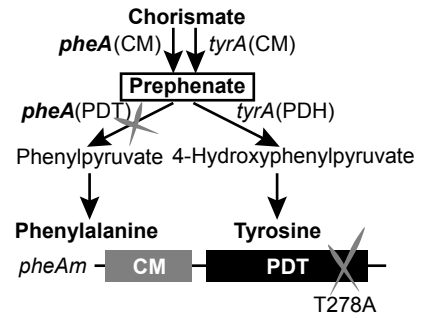


Figure 3 プレフェン酸蓄積株構築のための *pheA* 変異体 *pheAm* の設計。

TrhO は酸素分子を直接の基質として ho⁵U を合成するヒドロキシル化酵素である

TrhO が実際に ho⁵U の合成を担う酵素であるかを調べるために、TrhO の組換えタンパク質を取得し、転写合成した tRNA との結合能をゲルシフトアッセイによって確かめた。TrhO は tRNA^{Ala1} とは結合する一方、tRNA^{Leu3} とは複合体を形成しなかった。これは、TrhO が特定の tRNA のみを認識することを示し、tRNA^{Leu3} のヒドロキシル化は主に *trhA* によって行われているという結果と一致する。

次に、組換え TrhO を用い、転写合成した tRNA^{Ser1} を基質として、試験管内での修飾再構成を試みた。その結果、効率は高くないものの、実際に tRNA に ho⁵U が形成された。したがって、TrhO がヒドロキシル化酵素であることが判明した。

先行研究で報告のあるように *cmo*⁵U/*mcmo*⁵U 修飾は嫌気培養においても導入されることが知られている。しかし、*trhA* 欠損株を嫌気培養すると、*trhO* 依存的なヒドロキシル化が顕著に阻害されたため、*trhO* は酸素分子をヒドロキシル化の直接の基質としていると予想した。そこで、¹⁸O で安定同位体標識した酸素(¹⁸O₂)を含む混合ガス環境下で *trhA/cmoB* 二重欠損株を培養し、*trhO* によって合成された ho⁵U を蓄積させた。取得した tRNA をヌクレオシドに分解し、LC/MS で解析した結果、この ho⁵U は 5 位に ¹⁸O で標識された酸素原子が取り込まれていることが判明した。この結果から、TrhO は酸素分子をヒドロキシル基の基質として、修飾を行っている事が明らかとなった。

B. *cmo*⁵U メチル化機構の解析

当研究室の先行研究において、*mcmo*⁵U のメチル化に関与する遺伝子 *cmoM* が見つかった。そこでこの遺伝子の詳細な解析を行った。

cmoM は *cmo*⁵U から *mcmo*⁵U への変換に必要な遺伝子である

cmoM 欠損株から tRNA を取得し、wobble 位の修飾を LC/MS で解析したところ、全ての tRNA において *mcmo*⁵U が失われ、*cmo*⁵U のみになっている事が明らかとなった。また、*cmoM* 欠損株にベクターを用いて *cmoM* 遺伝子を相補したところ、*mcmo*⁵U の生合成が相補された。以上の結果から、*cmoM* が *mcmo*⁵U 合成の最後のメチル化を担う遺伝子であると結論付けた。

CmoM は AdoMet を基質に cmo⁵U をメチル化する

CmoM の組換えタンパク質を取得し、*cmoM* 欠損株から単離した cmo⁵U を有する tRNA を基質に、AdoMet 存在下で、*in vitro* メチル化実験を行った。その結果、CmoM が AdoMet 依存的に cmo⁵U をメチル化し、mcmo⁵U 形成を触媒している事が確かめられ、cmo⁵U メチル化酵素であることが判明した。

大腸菌 tRNA^{Pro3} で見られる生育相依存的な mcmo⁵U 修飾の変動

大腸菌を培養し、経時的に菌体を回収することで、異なる growth phase における wobble 修飾の変化を観測した。その結果、初期の対数増殖期において、wobble 位に mcmo⁵U を持つ 4 種類の tRNA のうち tRNA^{Pro3} は、低い修飾率(約 30%)を示し、growth phase が進行するにしたがって修飾率が上昇し、後期対数増殖期から定常期にかけて、修飾率がほぼ 100%に達することが明らかとなった。他の三種の tRNA は初期の対数増殖期において、すでに mcmo⁵U 修飾がほぼ 100%導入されており、growth phase による修飾率の変化は観測されなかった。この結果は、growth phase の進行に伴い、tRNA^{Pro3} の wobble 修飾を cmo⁵U から mcmo⁵U へ変化させることで、Pro コドン特異的に翻訳調節をする機構の存在を示唆している。

C. xo⁵U 修飾の機能解析

本研究により、U から ho⁵U へのヒドロキシル化と、cmo⁵U から mcmo⁵U へのメチル化のそれぞれの経路を担う遺伝子が同定されたため、これらの修飾を失った株、特に完全に未修飾の U になっている株の形質を調べることが初めて可能となった。これら修飾欠損株の形質を調べる事で xo⁵U 修飾の生理的意義に迫る試みを行った。

アイソアクセプターの欠損と掛け合わせることによって *trhA/trhO* 二重欠損株が高温感受性を示す

一連の遺伝子欠損株を培養したところ、cmo⁵U 修飾を完全に欠損した *trhA/trhO* 二重欠損株で若干の生育低下が観測されたものの、修飾欠損による顕著な形質は見られなかった。これは xo⁵U 修飾を用いる tRNA が担当するコドンボックスにおいて、redundant にコドンを読解する他の tRNA(アイソアクセプター)の存在によって、修飾欠損の影響が消されているためと考えた。そこで、Ser と Pro、Thr のコドンボックスにおいて cmo⁵U を持つ tRNA と独立してコドンを読解するアイソアクセプターを遺伝的に欠損させ、cmo⁵U 修飾の各遺伝子欠損と掛け合わせた。その結果、UCG コドンを読むアイソアクセプター遺伝子 *serU* の欠損と、*trhA/trhO* の二重欠損を掛け合わせた株が顕著な高温感受性を示すことが判明した。興味深い事に、tRNA^{Ser1} の wobble 位が 70~80%未修飾の U となる *trhA* 単独欠損株に *serU* 欠損を導入した二重欠損株においては高温感受性が見られなかった。この事は、20~30%の xo⁵U が存在すれば高温感受性を示さない事を意味している。

同様に、ACG コドンを読むアイソアクセプター遺伝子 *thrW* の欠損を修飾遺伝子欠損と掛け合わせたところ、修飾を持たない *thrW/trhA/trhO* 三重欠損株のみ、最小培地において高温感受性を示した。

UCG コドンの効率的な解読に ho⁵U が必要

次に、xo⁵U 修飾のコドン認識への寄与を調べるために、レポーターアッセイを行った。大腸菌 RF-2 のリコーディングサイトを用い、テストコドンの翻訳活性によって、+1 フレームシフトの効率が変化することで、wobble 修飾の有無による暗号解読能の活性を間接的に調べる系を用いた。その結果、ho⁵U が蓄積する *cmoB* 欠損株において、GCG の認識効率が有意に低下している事が示された。これは先行研究の結果と一致しており、実験系が成立していることを意味する。加えて、mcmo⁵U を失い、wobble 修飾が cmo⁵U のみになる *cmoM* 欠損株も、

cmoB 欠損株ほど顕著ではないものの GCG の認識効率に有意に低下している事が明らかとなった。これは、*mcmo*⁵U のメチル化がコドン認識に寄与していることを示す初めての成果である。*trhA/trhO* 二重欠損株は概ね *cmoB* 欠損株と同様の傾向が見られ、GCG や UCG のコドン認識効率が有意に野生株より低下した。特に *serU* を欠損した際に、*ho*⁵U 修飾を持つ *cmoB* 欠損株と比べても完全に未修飾になる *trhA/trhO* 欠損株の方が有意に UCG コドンの認識効率が低下している事が明らかとなった。この結果は、*ho*⁵U 修飾の活性を初めてとらえた成果である。

【総括と考察】

本研究によって、*xo*⁵U 修飾生合成の第一段階であるヒドロキシル化に関与する二つの遺伝子(*trhA* と *trhO*)が見つかったことで、ヒドロキシル化修飾の機能を初めて解析することが可能になった。それぞれ Ser 及び Thr のアイソアクセプターである *serU* 及び *thrW* と修飾遺伝子との間に遺伝的相互作用が観測され、更にレポーターアッセイにより、ヒドロキシル化修飾が欠損すると、UCG コドンの解読能が著しく低下するという結果を得た。この結果は、*xo*⁵U 系 wobble 修飾のウラシル 5 位の水酸基が暗号解読能に直接かかわることを示した初めての知見であり、tRNA 修飾による遺伝暗号解読メカニズムの理解に大きく貢献した成果であると考えている。リボソーム小サブユニットの A サイトにおけるコドン対合の結晶構造解析の結果(Weixlbaumer *et al.* 2007)、*cmo*⁵U34 のウラシル 5 位の水酸基は U33 の 2'水酸基と水素結合していることが明らかとなっている。この相互作用により、アンチコドンの構造が安定化し、非ワトソンクリック型の塩基対合も可能になると考えられており、今回の結果と一致する。現在、*xo*⁵U 系 wobble 修飾には、*mo*⁵U、*cmo*⁵U、*mcmo*⁵U、*mcmo*⁵Um が知られているが、いずれの場合も、ウラシル 5 位の水酸基の機能が基盤になり、それぞれの側鎖に応じた機能を獲得したと考えられる。

ヒドロキシル化反応には、*trhA*と*trhO*が関与する二つの異なる経路が冗長に関与していることが明らかとなった。このような堅牢な修飾機構を獲得した背景には、バクテリアが環境中を生き延びるために *xo*⁵U 系 wobble 修飾の維持が不可欠であることを示唆している。様々なバクテリアにおいて、*trhA*と*trhO*のホモログを探索すると、そのうちの一方しか持たないバクテリアも多く、大腸菌においては *trhO* の活性が低いことから、異なる生物種がそれぞれ *trhA*、*trhO* によるヒドロキシル化機構を独立に獲得し、水平伝播によって二重に持つ生物種が生まれた可能性が考えられる。*trhA* によるヒドロキシル化は芳香族アミノ酸や二次代謝物を合成するシキミ酸経路の下流に生じるプレフェン酸を必要とすることが判明した。この結果から、*xo*⁵U 系 wobble 修飾がシキミ酸経路の一部をモニターしていると考えられる。一方の *TrhO* は酸素分子を基質とし、嫌気環境においては活性を持たないため、この経路は気相の酸素濃度をモニターして修飾率を変化させる生理的機能と関係する可能性を示唆している。バクテリアは進化の過程で、*cmo*⁵U や *mcmo*⁵U の修飾率を変化させることにより、個々の tRNA の暗号解読能を調節し、芳香族アミノ酸の生合成や嫌気環境に適応する機構を獲得している可能性がある。

ヒドロキシル化反応は、生命の活動において様々な代謝に関わっている。ALKBH や TET、JmjC に代表される 2-オキソグルタル酸/Fe²⁺ 依存的なオキシゲナーゼのファミリーが、生体高分子のヒドロキシル化に関わっていることが知られてきたが、今回見つかった二つの遺伝子は既知のヒドロキシル化酵素に属さず、それぞれ新規の反応機構によって tRNA をヒドロキシル化していると考えられる。特に *trhA* によるヒドロキシル化において、プレフェン酸がどのように用いているのか不明であり、全く新しい反応機構の存在が示唆される。*trhA*、*trhO* それぞれのヒドロキシル化経路における分子機構について、更なる研究が必要である。

【参考文献】

- Hagervall *et al. J. Bacteriol.*, 172, 252-259 (1990)
- Kim *et al. Nature*, 498, 123-126 (2013)
- Nasvall *et al. RNA*, 10, 1662-1673 (2004)
- Nasvall *et al. RNA*, 13, 2151-2164 (2007)
- Pope *et al. Nucl. Acid. Res.*, 5, 1041-1057 (1978)
- Takai *et al. Nucl. Acid. Res.*, 12, 2894-2899 (1996)
- Weixlbaumer *et al. Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 498-502 (2007)

【発表状況】

投稿論文

1. Akinori Kuzuya, **Yusuke Sakai**, Takahiro Yamazaki, Yan Xu, and Makoto Komiyama, “Nanomechanical DNA origami ‘single-molecule beacons’ directly imaged by atomic force microscopy.” *Nat. Commun.* **2**, 449 (2011).
2. Takahiro Yamazaki, Yuichiro Aiba, Kohei Yasuda, **Yusuke Sakai**, Yusei Yamanaka, Akinori Kuzuya, Yuichi Ohya, and Makoto Komiyama, “Clear-cut observation of PNA invasion using nanomechanical DNA origami devices.” *Chem. Commun.* **48**, 11361–11363 (2012).
3. **Yusuke Sakai**, Kenjyo Miyauchi, Satoshi Kimura and Tsutomu Suzuki, “Biogenesis and growth phase alteration of 5-methoxycarbonyl-methoxyuridine (mcmo⁵U) in tRNA anticodon.” *Nucl. Acid. Res.* **44**, 509-523 (2016).
4. Satoshi Kimura, **Yusuke Sakai**, Tsutomu Suzuki, “Biogenesis and iron-responsive regulation of ribosomal RNA hydroxylation” *Nucl. Acid. Res.* (submitted)
5. **Yusuke Sakai**,[†] Satoshi Kimura,[†] Tsutomu Suzuki (in preparation, [†] equal contribution)

学会発表

6. Akinori Kuzuya, **Yusuke Sakai**, Naohiro Koshi, Takahiro Yamazaki and Makoto Komiyama, “アロステリック酵素を模倣した可動式 DNA オリガミによる高感度単分子検出”, 2011 The Chemical Society of Japan, 3B7-13, Kanagawa. March, 2011. (国内学会口頭発表, ○発表者)
7. **Yusuke Sakai**, Kenjyo Miyauchi, Satoshi Kimura and Tsutomu Suzuki, “CmoM, the novel methyltransferase responsible for the last step of uridine-5-oxyacetic acid methyl ester (mcmo⁵U) biogenesis.” 25th tRNA Conference. 39. Kyllini, Pelopponnesse, Greece. September, 2014. (国際学会ポスター発表)
8. **Yusuke Sakai**, “Identification of Novel tRNA methyltransferase CmoM and the biogenesis of cmo⁵U,” 「新生鎖の生物学」第2回若手ワークショップ, Yamagata, September, 2015. (国内学会口頭発表)
9. **Yusuke Sakai**, “Biogenesis and function of tRNA modification involved in the decoding process.” 18th Tokyo RNA club, Tokyo, January, 2016. (国際シンポジウム口頭発表)
10. **Yusuke Sakai**, “Biogenesis and function of tRNA modification involved in the decoding process.” NIG 187th Biological Symposium, Mishima, Japan, May, 2016. (国際シンポジウム口頭発表)

【受賞等】

1. 2013年度日本学術振興会特別研究員(DC1)採用 2013年4月
2. NAR Breakthrough Article 選出 (Oxford Journal) 2015年12月