

で、たとえ変異が mtDNA に見出されてもこれが本当にミトコンドリア異常を引き起こしているかは分からない。そこで患者の核の影響を排除するために患者ミトコンドリアと外来細胞の核を融合したサイブリド細胞が作製され、これらのサイブリドが実際にミトコンドリアの呼吸活性の低下と蛋白質合成の低下・異常を示したことから、上記の点変異（や mtDNA 大欠失）が原因遺伝子変異であることが証明された。

しかしながら、tRNA 遺伝子上のたった一塩基の置換がどのようにしてミトコンドリア異常を引き起こすのかの直接的な解答は変異が報告されて以来謎であった。私はそれらの根元的原因はその変異を持つ tRNA 分子の異常性とそれにより引き起こされる特に翻訳反応過程の異常ではないかと考え、サンプルが微量であることと精製が技術的に困難であることを克服して、変異 tRNA 分子 (MERRF8344 変異を持つ tRNA^{Lys}, tRNA^{Lys}(A8344G); MELAS3243 変異を持つ tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Leu(UUR)}(A3243G); MELAS3271 変異を持つ tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Leu(UUR)}(U3271C))の構造・機能を直接解析することで発症の分子機構を明らかにすることを目的とした。

まずそれぞれの点変異を持つサイブリド細胞のミトコンドリア蛋白合成活性を評価した (図 2)。そして細胞内での変異 tRNA の存在量・安定性・アミノアシル化を解析した。図 3 にまとめたように tRNA^{Lys}(A8344G)はコントロールサイブリド内の正常配列 tRNA^{Lys} と比べて Lysyl-tRNA^{Lys} 量はほとんど低下していなかった。一方、MELAS 変異を持つ 2 種類の変異 tRNA^{Leu(UUR)}は各サイブリド内でその Leucyl-tRNA^{Leu(UUR)}量が 30%以下にまで低下していた。これらの結果と各サイブリドのミトコンドリア蛋白合成活性を比較してみると、単純にアミノアシル tRNA 量の低下で蛋白合成活性低下を説明することができないことが明らかとなった。

図 2 [35S]Methionine pulse labelによる
ミトコンドリア内蛋白合成活性測定

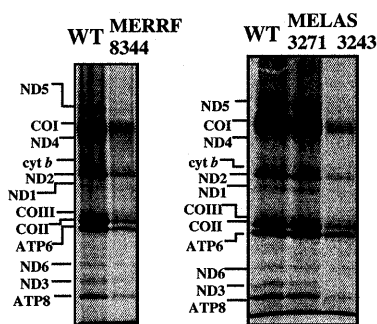
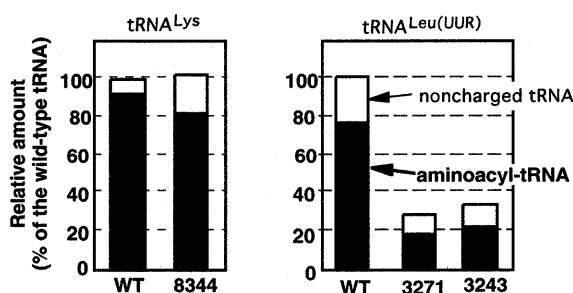


図 3 細胞内での変異tRNAの存在量
とアミノアシル化の割合

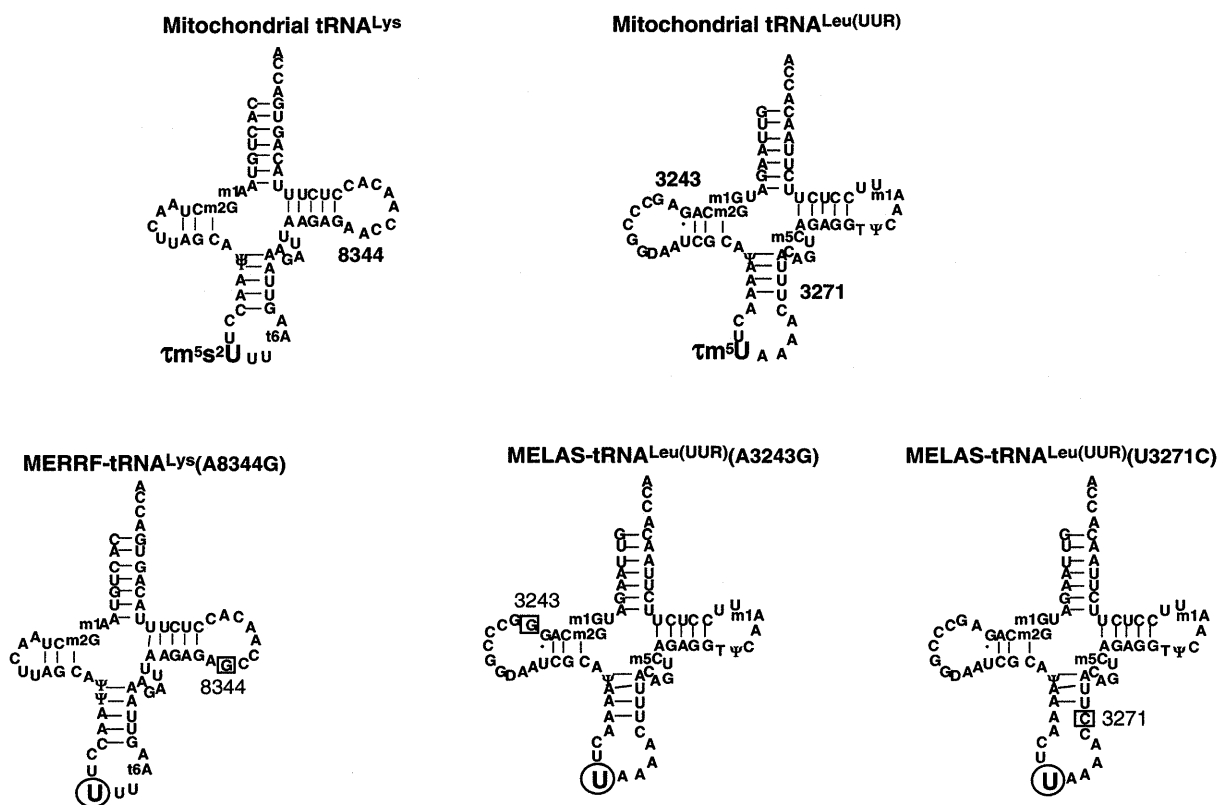


そこで私は変異 tRNA 分子自体の解析を行うこととした。まずサイブリド大量培養法を確立した。それぞれの培養細胞から total RNA を得、陰イオン交換カラムで tRNA を分画し、目的の tRNA がどの画分に含まれているかを dot blotting 法で確認し、tRNA^{Lys}(A8344G)、tRNA^{Leu(UUR)}(A3243G)、tRNA^{Leu(UUR)}(U3271C)を固相化プローブ法により構造解析可能量の単離精製 (正常 tRNA^{Lys}、tRNA^{Leu(UUR)}はコントロール細胞から精製) に成功した。そして酵素的 RNA 配列決定法 (Donis-Keller 法)、ポストラベル-2 次元 TLC 法 (Kuchino 法)、LC/MS 精密質量分析法を駆使して正常型、変異型 tRNA の修飾塩基を含む一次構造を決定したところ、3 種類の変異 tRNA の anticodon 1 文字目のウリジン(U34)への必須の修

飾が特異的に欠落しており、未修飾の U のままであることを見出した(図 4) [1, 2]。この修飾塩基の構造自体は当研究室の鈴木らによって牛 mt tRNA の研究から同定された。tRNA^{Lys} は 5-taurinomethyl-2-thiouridine ($\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$)、tRNA^{Leu(UUR)} は 5-taurinomethyluridine ($\tau\text{m}^5\text{U}$)を持つ。この修飾酵素は全く知られていないが、tRNA 分子内で互いに離れた位置の 3 変異によって U34 の修飾が欠落するという本研究結果から少なくともこの酵素は tRNA の正確な全体構造を認識しており、さらに局所的な塩基配列も認識対象としているかもしれないと考察できる。

一方、乳児致死性心筋症(CM)患者で見つかった 4269 位に塩基置換を持つ tRNA^{Ile} の修飾塩基は全て正常であることも確認した。Human mitochondrial (hmt) tRNA^{Leu(UUR)}、tRNA^{Ile} の RNA 配列は新規決定したので GenBank/EBI Data Bank に登録した。CM の場合は変異 tRNA が非常に不安定であることがミトコンドリア異常の主要原因であると考察した[3]。

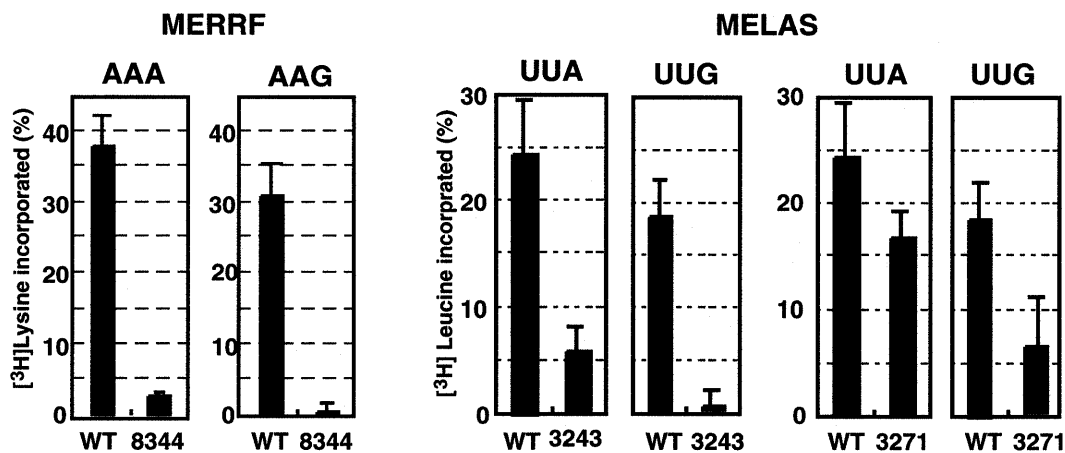
図 4 Wild-type tRNAs、変異tRNAsの修飾塩基を含んだ2次構造



一般に tRNA に存在する修飾塩基は tRNA 分子の高次構造保持や様々な因子・酵素の認識に必要であり、tRNA 分子の機能発現に重要な役割を果たしている。そして特に anticodon loop に存在する修飾塩基は tRNA の codon 認識に不可欠であるので、MERRF、MELAS の場合の anticodon 修飾欠損は変異 tRNA が (1) noncognate codon (tRNA^{Leu(UUR)}なら UUC、UUU) を誤翻訳すること、(2) cognate codon と正常に対合できないこと、を示唆し、変異 tRNA 分子自体の翻訳過程での機能異常が発症原因の可能性が高い。そこで当研究室で確立した *in vitro* ミトコンドリア蛋白質合成系を用いて変異 tRNA の翻訳異常を検証することにした。具体的には、系を構成する翻訳因子を充分量調整するために、ミトコンドリア蛋白質合成系の

各因子の相同性の高い牛の肝臓からミトコンドリアの ribosome や伸長因子（一部大腸菌で発現）などを精製して用いた。そして変異（あるいは正常）tRNA^{Lys}、tRNA^{Leu(UUR)}は大量培養したそれぞれの変異（あるいは正常）サイブリドから単離精製し、放射性ラベルされた lysine、leucine を対応するアミノアシル tRNA 合成酵素で tRNA にチャージさせて系に投入した。そしてこの系で、対応する codon repeat RNA (poly(AAN)₃₀、poly(UUN)₃₀、N = A, G, C, or U)をどれくらい効率よく翻訳するかを重合したアミノ酸の放射活性を測定することで評価した。どの変異 tRNA も対応する正常配列 tRNA に比べて cognate codon の翻訳効率が低下していることが判明した（図 5） [4]。そして3文字目が A の codon よりも G の codon の場合のほうがより効率が低下していた。これは A-U Watson-Click 塩基対よりも G-U wobble 塩基対のほうが不安定であることに起因していると考えられる。この結果は大腸菌 tRNA の研究で U34 が未修飾となった場合、3文字目が A よりも G である codon を読みにくくなるという過去の報告と一致する。また、未修飾の U34 は noncognate codon の認識が予想されたが、*in vitro* 翻訳反応系では noncognate codon でのペプチド合成が観測されなかったことから hmt tRNA^{Lys}、tRNA^{Leu(UUR)}の anticodon の場合は対合力自体が弱まってしまい誤翻訳は起こらないと考えられる。

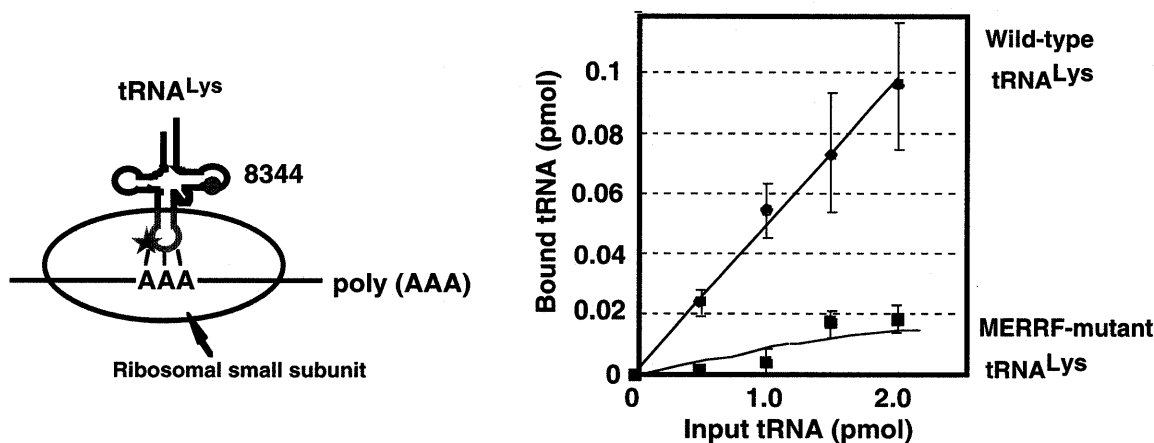
図5 *In vitro* ミトコンドリア蛋白質合成系でのCognate codon reading 効率



また 3 種類の変異 tRNA の中で MERRF tRNA^{Lys} が最も顕著に活性低下を示し、ほとんど伸長反応がおこっていない。ところで他の種の tRNA^{Lys} では U34 の 2、5 位の修飾(5 位の側鎖は hmt tRNA^{Lys} とは異なるが xm⁵s²U 型の修飾である)が codon との対合に不可欠で、修飾を欠くと全く対合できず、特に 2 位のチオ化が重要であるということが tRNA と codon の対合力を評価するとき用いられる non-enzymatic mRNA-programmed ribosomal small subunit binding assay によって直接的に証明されている。そこで、MERRF 変異 tRNA^{Lys} の場合も同様の assay を用いて修飾欠損が本当に翻訳活性消失の直接の原因であるかを実験的に検証することとした。この assay を用いる利点は近年の ribosome の X 線結晶構造解析から tRNA が ribosome 上で codon と対合する時に TΨC loop は ribosomal small subunit と接触せず、anticodon stem-loop (ASL)部位のみが接触することである。なぜなら MERRF 点変異は TΨC loop 上にあるのでこの assay 系を用いれば変異 tRNA^{Lys} と正常 tRNA^{Lys} の ASL 部位の結合力の相対的差異、すなわち U34 修飾の

有無により codon と anticodon が結合できるかを評価することとなるからである。結果は図 6 に示したとおりで poly(AAA)と正常 tRNA^{Lys} は結合するが MERRF 変異 tRNA^{Lys} は結合できず、tRNA^{Lys} が U34 の修飾欠損により codon と対合できないことが直接証明された。この結果は *in vitro* 翻訳反応活性と実際のサイブリドのミトコンドリア蛋白合成活性の顕著な低下をよく説明できる。よって私は変異 tRNA^{Lys} が U34 の修飾欠損により cognate codon と対合できなっていることが MERRF のミトコンドリア機能障害の分子レベルでの主要な原因であると結論した[4]。

図 6 In vitro binding assay の概念図と結果



MELAS の場合も正常 tRNA^{Leu(UUR)}が tRNA^{Lys} と共通の U34 の 5 位の側差を持っていることから、これを欠損した 2 種類の変異 tRNA^{Leu(UUR)}の cognate codon との対合力が弱まっていることが *in vitro* 翻訳反応系で明らかとなった変異 tRNA^{Leu(UUR)}の伸長反応活性低下の原因であると考えられる。但し tRNA^{Leu(UUR)}は元々U34 の 2 位にチオ化を受けずに機能していることから U34 の修飾欠損が *in vitro* 翻訳反応に及ぼす影響は tRNA^{Lys} ほど重大ではないのであろう (図 5)。そして *in vitro* で tRNA^{Leu(UUR)}(U3271C)より tRNA^{Leu(UUR)}(A3243G)のほうが翻訳効率が低下する結果は細胞内のミトコンドリア蛋白合成速度低下の度合いの傾向と一致した (図 2, 5)。故に私は MELAS におけるミトコンドリア機能障害の分子メカニズムは、tRNA^{Leu(UUR)}(A3243G) の場合は修飾塩基欠損に加え点変異による翻訳活性低下であり、一方 tRNA^{Leu(UUR)}(U3271C)の場合は修飾塩基欠損が翻訳活性低下を引き起こしており、点変異自体は大きな影響がないと考察した。一般に tRNA はその分子内の 3 次元的相互作用で高次構造を安定化しており U8-A14 の相互作用もその一つである。ミトコンドリア tRNA は通常の tRNA と異なる構造のものが多いが hmt tRNA^{Leu(UUR)}は通常の tRNA と同様の一次配列を持ち、3 次元相互作用に必要な塩基の多くも保存されており、U8、A14 も保存されているので相互作用が存在する可能性が高い。3243 位変異はこの 14 位に塩基置換を起こすのでこの相互作用を消失してしまうことで tRNA の 3 次元構造が揺らいで ribosome に entry しにくくなっていると考えられる。一方 *in vitro* (図 5)、*in vivo* (図 2)の結果から 3271 変異は anticodon stem の対合を崩すと予想されるが codon-anticodon 対合を阻害していないと推察される。臨床的な MELAS 研究で 3243 変異患者群の方が 3271 変異患者群より発症年齢が若いという報告があり、上記の結果となら

かの関連が予想される。修飾欠損と点変異がそれぞれどれくらい翻訳活性低下に寄与しているかを正確に評価する研究は進行中である。

本研究において RNA 分子の特定の塩基修飾というレベルでの詳細な解析から高次生命現象であるヒトの疾患の根本原因が見出されたことは意義深い。この知見は RNA の修飾欠損が疾患の原因であることを示した初めての例である。本研究の結果から構築できる分子レベルでの発症機構は以下の通りである。まず mtDNA 上の点変異が tRNA 分子に転写され、この点変異により anticodon 一文字目の修飾酵素が U34 に修飾を施すことができなくなる (図 4)。U34 の修飾が欠損したことで変異 tRNA の anticodon は cognate codon と安定に対合できなくなって tRNA 自体の cognate codon 認識能が失われてしまい (図 5, 6)、MERRF では lysine codon のところで、MELAS では leucine UUR codon のところでペプチド重合が正常に進行しなくなり細胞内のミトコンドリア蛋白質合成活性が低下して (図 2)、結果として mtDNA にコードされた呼吸鎖酵素複合体のサブユニットが正常に生産されなくなる。実際 MERRF 細胞においては lysine codon のところで蛋白質合成が止まったために生じた premature terminated product が確認されている。また frame shift が起こっている可能性もある。このような異常なペプチドの大部分は恐らく呼吸鎖酵素複合体を形成できずミトコンドリア内の protease によって分解されてしまい、核にコードされたサブユニットがミトコンドリア内に正常に import されても mtDNA にコードされたサブユニットが少ないため結果として呼吸鎖酵素複合体の量的な低下が起こっている。また、異常なペプチドのうちの一部は複合体に間違っ取り込まれ、正常に機能できない複合体が形成されている可能性もある。このような経路でミトコンドリアの機能障害が引き起こされているのではないかと私は考えている。一方、本研究では異常が起こる tRNA 分子種が tRNA^{Lys} と tRNA^{Leu(UUR)} の場合でどうして臨床病型が異なるのか、また同じ変異を持つ患者でも臨床症状では個人によって重症度が異なったり、一個人内でも組織特異性があったりという個体レベルでの疑問に直接答えることはできなかった。しかしながら tRNA 遺伝子内に発見されたたった一塩基の置換でどのようにして細胞の機能が障害されるかという分子レベルの機構が明らかになり、将来上記の疑問に挑戦するときに必ず役に立つ知見であると私は考えている。

また近年、疾患原因を探るアプローチとしてプロテオーム解析やマイクロアレイ、ディファレンシャルディスプレイなど、蛋白質や mRNA の発現量の変動を調べる方法が普及しているが、本研究を通して疾患原因として機能性 RNA の転写後修飾異常も視野にいれておくことの必要性を強く意識した。また、mtDNA 遺伝子変異が原因であるミトコンドリア病では mtDNA が一細胞あたり数千コピーあることや mtDNA がミトコンドリアの 2 重の膜の内側にあることから、いわゆる遺伝子治療のアプローチが不可能であった。ところが本研究の結果は MERRF、MELAS を始め、tRNA 遺伝子内の点変異が原因のミトコンドリア病の治療法として RNA 修飾酵素やその関連遺伝子の同定と機構の解明・改変、また修飾塩基の基質の投入といったアプローチからの治療の可能性という、今まででは考えなかった発想を与えてくれた。

原著論文

- [1] Yasukawa T. et al. *J. Biol. Chem.* (2000) **275**, 4251-4257, [2] Yasukawa T. et al. *FEBS Lett.* (2000) **467**, 175-178, [3] Yasukawa T. et al. *Nucleic Acids Res.* (2000) **28**, 3779-3784, [4] Yasukawa T. et al. *EMBO J.* (2001) **20**, 4794-4802, [5] Yasukawa T. et al. *Nucleic Acids Symposium Series* (1998) **39**, 257-258