

審査結果の要旨

論文提出者氏名 安川 武宏

本論文はヒトミトコンドリア病で見られるミトコンドリア DNA 上にコードされた tRNA 遺伝子の点変異によって引き起こされるミトコンドリア tRNA の機能異常を明らかにすることを目的とし、代表病型 MERRF の患者の 9 割でみられる塩基番号 8344 位に変異を持つ tRNA^{Lys}、もう一つの代表病型 MELAS の患者の 8 割でみられる 3243 位に変異を持つ tRNA^{Leu(UUR)}、1 割でみられる 3271 位に変異を持つ tRNA^{Leu(UUR)}、致死性心筋症患者で見出された 4269 位に変異を持つ tRNA^{Ile}、の 4 種類について、それらの構造・機能を詳細に解析し、いかにして変異 tRNA が患者ミトコンドリアの異常を引き起こしているかを分子レベルで明らかにしたものである。

第 1 章では本研究の背景としてミトコンドリアとその遺伝情報系について概説した。また mtDNA 上の点変異がミトコンドリア異常の原因遺伝子変異であるかを明らかにするために開発された、核は正常細胞由来、ミトコンドリアは患者由来という人工融合細胞サイブリドがミトコンドリア病の細胞レベルでの研究を飛躍的に進め、多くの成果をもたらせたことを解説した。

第 2 章では本研究で行った種々の実験方法—サイブリドの培養法、細胞内ミトコンドリア蛋白質合成活性の評価方法、ミトコンドリア tRNA の種々の解析法、試験管内ミトコンドリア蛋白質合成系による変異ミトコンドリア tRNA の翻訳活性測定方法—を述べた。

第 3 章では本研究で行った実験結果を述べた。まず、各変異サイブリド細胞のミトコンドリアタンパク質合成活性低下は、アミノアシル化された変異 tRNA の存在量の低下やミスアミノアシル化によるものではないことをつきとめた。次に変異 tRNA そのものの構造解析を試みた。この解析に必要な量の tRNA を取得するため、まずサイブリド細胞の大量培養法を確立し、そこから固相化プローブ法を用いて効率よく変異 tRNA を単離精製することに成功した。そして配列特異的 RNase を用いた RNA sequencing 法、修飾塩基を同定するためのポストラベル法と精密質量分析用の LC/MS を用いた塩基決定法を駆使して、各変異 tRNA の修飾塩基を含めた塩基配列を決定し、対照となる正常 tRNA のものと比較した。その結果、MERRF 変異 tRNA^{Lys} と二つの MELAS 変異 tRNA^{Leu(UUR)} で共通にアンチコドン 1 文字目のウリジンの転写後修飾が特異的に欠損していることを発見した。一般にアンチコドン 1 文字目の修飾塩基は正常なコドンだけを正確かつ効率よく翻訳するために不可欠なので、この修飾を欠く変異 tRNA は正常なコドンを効率よく翻訳できない、或いはそれコドン以外のコドンを誤翻訳する、という 2 つの可能性が考えられる。これらの可能性を実験的に検証するために、ヒトと相同性の高い牛肝臓からミトコンドリアを調製してそこから蛋白質合成系を構成する因子類をそれぞれ精製し、*in vitro* ミトコンドリア蛋白質合成系を構築した。この系で精製変異 tRNA の翻訳特性を検討したところ、どの変異 tRNA も正常なコドン解読能が顕著に低下していること、しかし誤ったコドンを誤翻訳はしないこと、が判明した。コドン—アンチコドンの親和性を、30S リボソーム上で変異 tRNA^{Lys} とモデル mRNA としてのオリゴ(A)を用いて調べたところ、アンチコドン 1 文字目の修飾

欠損によって変異 tRNA^{Lys} がコドンとの結合ができなくなっていることが分かった。

また、致死性心筋症患者で見出された 4269 位に変異を持つ tRNA^{Ile} についても同様に解析した結果、この場合は転写後修飾異常はなく、かわりに点変異によって細胞内で tRNA^{Ile} の安定性が極度に低下していることが明らかになった。

第 4 章では上で得られた知見を総合して MERRF、MELAS 変異細胞におけるミトコンドリア異常の分子レベルでの発症機構を論じた。すなわち、これまで考えられていたようにアミノアシル化された変異 tRNA のミトコンドリア内での存在量の低下のみで蛋白質合成能の低下が説明することはできないことが明らかとなった。本研究によって、MERRF に関しては変異 tRNA の量的低下は本質的ではなく、アンチコドン一文字目の修飾欠損によって変異 tRNA^{Lys} のアンチコドンがコドンと対合できなくなるため変異 tRNA^{Lys} は翻訳能を顕著に失い、結果として実際のミトコンドリア内ではリジンコドンのところで蛋白質合成が停滞するため完全な蛋白質の合成量が低下する、というのが分子レベルでの蛋白質合成異常の機構であることが明らかにされた。MELAS の場合も MERRF と同様、アンチコドン修飾欠損によって変異 tRNA^{Leu(UUR)} の翻訳能力が低下することが蛋白質合成異常の主要原因であることが明らかにされた。MELAS の場合は MERRF の場合と違い、変異 tRNA の量が約 1 / 3 に低下していることも明らかにしており、tRNA の質的な活性低下（アンチコドン修飾欠損）だけでなく量的な低下も寄与していることが示唆された。また、MELAS の場合、2 種類の変異 tRNA で 3243 変異を持つ方が 3271 変異を持つ方よりも翻訳活性が顕著に低下していたことより、3243 点変異はなんらかの付加的な影響を tRNA の翻訳活性に与えていることも示唆された。また、臨床的研究から 3243 変異を持つ患者のほうが発症年齢が低いことがわかっており、本研究の結果はこのことと関連があると考えられ非常に興味深い。

最後に本研究でなされた MERRF、MELAS の結果、tRNA^{Ile} の実験結果、そして他のグループによるそれ以外の変異 tRNA の研究とを比較し、一般にミトコンドリア病原因点変異を持つ tRNA に起こり得る異常を考察している。

第 5 章では osteosarcoma、lung carcinoma の核を持つサイブリドを用いて同様の変異 tRNA の解析から同一のアンチコドン修飾欠損を確認し、HeLa 細胞以外の細胞から由来した核を持つサイブリド細胞でも起こる一般的現象であることを明らかにした。そして MERRF 患者の検体でもそのことを確認した。

本論文はミトコンドリア病原因点変異を持つ tRNA の細胞内解析と単一に精製した変異 tRNA の構造・機能解析を詳細に行い、代表病型である MERRF、MELAS の分子レベルでの発症の主要原因が tRNA の転写後修飾欠損に依るものであることを初めて明らかにしたものであり、その基礎および応用両面での学問的意義は大きい。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。