

## 緒言

タンパク質の生合成における情報伝達機構はセントラルドグマと呼ばれている。DNA 上の遺伝情報(コードン配列として表される)は転写の段階でメッセンジャーRNA (mRNA) に伝えられる。mRNA はリボソーム上でタンパク質へと翻訳されるが、その際に mRNA のコードン情報をアミノ酸へと変換する分子がトランスファーRNA (tRNA) である。コードンとアミノ酸の対応関係は遺伝暗号と呼ばれ、ミトコンドリアを除くほとんど全ての生物では共通した普遍暗号が使用されている。

tRNA が全てのセンスコードンを正しく読み分けるのにアンチコードン 1 字目(ウォブル位)の塩基が重要な役割を果たす。ウォブル位の塩基は通常の水ソン・クリック塩基対に加えウォブル塩基対の形成も可能であり、さらに転写後修飾を受けることにより修飾塩基特異的な塩基対形成能を有するようになる。このような制御を受けて進行する遺伝暗号解読機構の全容を理解するため、特徴的な遺伝暗号解読機構を持つ哺乳動物ミトコンドリアの系に注目した。

細胞内小器官であるミトコンドリアは独自のミトコンドリア DNA を持ち、核とは独立した遺伝情報系を有することが知られている。その特徴として、普遍暗号とは異なる、変則暗号を持つということが挙げられる。ミトコンドリア tRNA は全てミトコンドリア DNA にコードされているが、その総数は現存する遺伝暗号解読系としては最少の 22 種しか存在しない。そのため、1 種類の tRNA が複数コードンに対応するような、ミトコンドリアに特徴的なコードン認識機構が存在する。例えば、コードン 3 字目が任意の 4 塩基で単一のアミノ酸に対応するファミリーボックス(XXN, N=U, C, A, G)の翻訳はウォブル位に未修飾ウリジンを持つ 1 種類の tRNA によってなされる。未修飾ウリジンは U, C, A, G のどの塩基とも対合できるので、ウォブル位に未修飾ウリジンを使うことで tRNA の数を減らしていると考えられる。一方、コードン 3 字目にプリン塩基(A, G)を持つ 2 コドンボックス(XXR, R=A, G)は、ウォブル位に修飾ウリジン(U\*)を持つ 1 種類の tRNA により解読される。この修飾によりコードン 3 字目にピリミジン塩基(U, C)を持つ 2 コドンボックス(XXY, Y=U, C)の誤認識を避けていると考えられる(例外的に Met の AUR コドンにはウォブル位に 5-ホルミルシチジンを持つ tRNA が対応する)。

今回の研究で哺乳動物ミトコンドリアにおける U\*として 2 種類の新規の修飾ウリジンを発見し、構造の決定に成功した。また、これまでの当研究室における結果によりヒトミトコンドリア脳筋症(MELAS・MERRF)由来の点変異ミトコンドリア tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>、tRNA<sup>Lys</sup> のウォブル位の U\*の修飾が欠損していることを見出しており、修飾欠損によるコードン解読の異常が発症の原因であることを突き止めている。そこで、U\*のコードン認識における役割の詳細を解析し、さらに U\*修飾欠損により生合成経路が阻害されていることから、U\*の生合成機構に関する研究を進めることで MELAS・MERRF のような修飾異常に起因する病気の発症機構に新たな知見を与えることができると考えられる。

## 結果

## 1. ミトコンドリア tRNA の調製

哺乳動物ミトコンドリアにおいてアンチコードン 1 字目に U\*を有すると考えられている Gln, Glu, Leu(UUR), Lys, Trp に特異的な 5 種類の tRNA を大量に調製した。定法に従いウシ肝臓から RNA を抽出し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによるフラクションのドットハイブリッドアッセイの結果を基に目的のミトコンドリア tRNA を多く含む画分を濃縮し、チャプレットカラムクロマトグラフィーにより目的 tRNA を単離精製した。得られたミトコンドリア tRNA の、Donis-Keller 法およびポストラベル法を用いた解析により、単離した tRNA の配列とアンチコードン 1 字目に修飾ヌクレオシドを有することを確認した。

## 2. 修飾ヌクレオシドの構造解析

単離した tRNA 中に含まれる修飾塩基を液体クロマトグラフィー/質量分析(HPLC/MS)により解析したところ tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>・tRNA<sup>Trp</sup>からは分子量 381 の未同定ヌクレオシド(U\*)が、tRNA<sup>Gln</sup>・tRNA<sup>Glu</sup>・tRNA<sup>Lys</sup>からは分子量 397 の未同定ヌクレオシド(s<sup>2</sup>U\*)が見つかった。このヌクレオシドの CID スペクトルによるフラグメントイオンの解析や、単離した s<sup>2</sup>U\*の APM ゲル電気泳動、UV スペクトル、<sup>1</sup>H-COSY スペクトル測定の結果から、この修飾ヌクレオシドは塩基の 5 位のみ修飾構造を有する(ただし、s<sup>2</sup>U\*は更に塩基 2 位がチオ化さ

れている)修飾ウリジンであることが示唆された。フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析により  $s^2U^*$  の分子式( $C_{12}H_{19}N_3O_8S_2$ )を決定し、これまでに得られた構造に関する知見から、2つの分子構造、5-タウリノメチルウリジン( $\tau m^5U$ :分子量 381)および 5-タウリノメチル-2-チオウリジン( $\tau m^5s^2U$ :分子量 397)を導き出した。最終的に $\tau m^5U$ を有機合成し、tRNA中の $U^*$ との比較を行った。HPLC/MSにおいて合成 $\tau m^5U$ 、tRNA中の $U^*$ 、および両者の混合物が同一の保持時間とマスペクトルのパターンを示したことから、tRNA中の修飾ウリジンが $\tau m^5U$ 、 $\tau m^5s^2U$ であることが決定された。

### 3.5-タウリノメチル基のコドン解読能

ヒトミトコンドリア脳筋症である MERRF の A8344G 変異 tRNA<sup>Lys</sup>ではコドン認識能の異常性として、大腸菌スモールサブユニットへの結合能が低下している。一般的にリボソームへの結合能は2位のチオ化の修飾が重要であるとともに5位の修飾も寄与しているという報告がなされている。そこで、5-タウリノメチル基のリボソーム結合能に与える影響を調べるため、ウシミトコンドリア $\tau m^5s^2U$ -tRNA<sup>Lys</sup>、 $\tau m^5U$ -tRNA<sup>Lys</sup>、転写U-tRNA<sup>Lys</sup>を用いて同様のスモールサブユニットバインディングアッセイを行ったところ、U-tRNA<sup>Lys</sup>と比較して、 $\tau m^5s^2U$ -tRNA<sup>Lys</sup>の結合能は5.5倍、 $\tau m^5U$ -tRNA<sup>Lys</sup>で3.5倍の結合能を有していた。このことは2位のチオ化だけでなく5-タウリノメチル基もコドンの正常な認識に寄与していることを示している。

### 4.修飾ヌクレオシドの生合成経路探索

新規に決定された修飾ウリジンは修飾構造中にタウリン骨格を含む。修飾形成の過程でタウリンが $\tau m^5(s^2)U$ 中に取り込まれている可能性を調べるため、安定同位体標識したタウリンを培養細胞に与えるパルスラベル実験を行い、ミトコンドリアtRNA中の修飾ウリジンの質量変化を追跡する実験を行った。 $^{18}O$ 原子が2つ取り込まれた $[^{18}O]$ タウリンを合成し、この標識タウリンを含むD-MEM/F12培地でHeLa細胞を48時間培養後、回収した細胞からチャプレットカラムクロマトグラフィーにより5種類のミトコンドリアtRNAを単離精製し、HPLC/MSで $\tau m^5(s^2)U$ の解析を行った。その結果、全てのtRNAで、タウリン骨格中のO原子に由来する、分子量が4増加した $[^{18}O]\tau m^5(s^2)U$ が含まれていた。標識タウリンの同位対比率が $[^{18}O]\tau m^5(s^2)U$ においても一定であることから、タウリンは*de novo*の経路によらず培地中のタウリンが直接修飾構造に取り込まれたことを示している。

### 5.ミトコンドリアへのタウリン輸送

パルスラベル実験の結果から、細胞質中のタウリンをミトコンドリアに輸送するためのトランスポーターの存在が示唆される(極性分子であるタウリンは拡散では脂質膜を通過しない)。ウシ肝臓より単離したミトコンドリアを用いて、*in vitro*の系でミトコンドリア中へのタウリンの取り込み活性を測定したところ、時間依存的なタウリンのミトコンドリア内への蓄積が起きていることが確認された。

### 考察

最少の遺伝暗号解読系を有する哺乳動物ミトコンドリアにおけるtRNA中の、アンチコドン1字目の修飾ウリジンは側鎖中にスルホン基を含む新規の修飾塩基、5-タウリノメチルウリジン( $\tau m^5U$ )および5-タウリノメチル-2-チオウリジン( $\tau m^5s^2U$ )であった。大きな負電荷を持つという特徴的な構造を有しているが、コドンの正確な読み分けを行うために必要な構造である。

パルスラベル実験による標識タウリンの修飾塩基中への取り込みにより、 $\tau m^5(s^2)U$ の生合成過程における側鎖構造のドナーのひとつがタウリンに由来することを明らかにした。このことは、これまで知られていなかったミトコンドリアへのタウリン移送機構が存在する可能性を示すものである。更に、タウリンの代謝経路においてタウリンが高分子中に取り込まれる初めての例として、タウリンの生体内での新たな役割を示唆する結果となった。