

本論文では、遺伝情報解読機構の全容を明らかにするため、最も簡略化された遺伝暗号解読系を持つ哺乳動物ミトコンドリア(mt)の翻訳系に注目し、tRNA のアンチコドン 1 字目(ウォブル位)に存在する修飾塩基の構造と機能に関する研究を進めている。

通常、tRNA が全てのセンスコドンを読み分けるにはウォブル位の塩基への転写後修飾が重要な役割を果たすことが知られている。中でも、コドン 3 字目のピリミジン塩基との誤認識を避けるはたらきを持つと考えられる修飾ウリジン(U*)は、哺乳動物ミトコンドリア tRNA において未同定であるため、この U* の構造解析と、機能や生合成を明らかにする研究を行っている。

第 1 章は序論であり、研究の背景と目的および既往の研究について述べている。

第 2 章では主に研究で行った実験方法について述べている。特に、構造解析を進めるにあたり微量にしか存在しない mt tRNA を簡便かつ大量に精製する方法としてチャプレットカラムクロマトグラフィー法を開発しており、その手法の詳細を 2 節 2 項にて説明している。また、近年になって分子生物学の分野で大きく発展した分析法の一つである LC/MS を用いた、RNA の一般的な解析法を 2 節 4 項にて述べている。

第 3 章では実験結果と、結果を踏まえた考察を、主に 7 節に渡って述べている。

1~2 節では、mt tRNA の調製結果が述べられている。特に、2 章で述べたチャプレットカラムクロマトグラフィーにより実際に哺乳動物ミトコンドリアの持つ全 22 種類の tRNA を同時かつ大量に精製を行っており、得られた tRNA の収量・収率の面からも優れた手法であるという結果を示している。

3~4 節では U* の検出と構造決定の結果を示している。精製した tRNA の LC/MS を用いたヌクレオシド解析により、U* を持つ 5 種類の tRNA のウォブル位に 2 種類の新規修飾ウリジンを見出し、APM ゲル電気泳動法、UV スペクトル測定、 ^1H - ^1H COSY、フラグメントイオン解析、フーリエ変換イオンサイクロロン共鳴質量分析等の解析や修飾ウリジンの有機合成を行い、最終的に、修飾構造中にタウリン骨格を含む 5-タウリノメチルウリジン(tm^5U)および 5-タウリノメチル-2-チオウリジン($\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$)の構造を決定している。また、この修飾構造のはたらきについての考察を加えている。更に、哺乳動物 mt tRNA のアンチコドン中の修飾塩基の解析を行い、センスコドンの読みわけに必要なウォブル位の修飾塩基がわずか 4 種類であることを 4 節 8 項にて明らかにしている。

5 節では 5-タウリノメチル基がコドン認識の際にどのような役割を持つかの研究を行っている。ヒトミトコンドリア脳筋症 MERRF 由来の点変異 tRNA^{Lys} はコドン認識能が低下することが知られていたが、この変異 tRNA^{Lys} は 5 位の修飾と 2 位の修飾を同時に欠いたものであり、各修飾構造のコドン認識への寄与の程度は不明であった。今回、ウォブル位の塩基が異なる 3 種類のウシ mt tRNA($\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$ 、 tm^5U 、U を持つ tRNA^{Lys})を用いたスモールサブユニットバインディングアッセイにより各修飾構造の寄与を個別に評価する実験を行った結果、 tm^5U を持つ tRNA においてもコドン認識能を有意に持っていたことから、5-タウリノメチル基も単独でコドンの正常な認識に寄与し得ることを明らかにしている。

6 節では、ヒトミトコンドリア脳筋症 MELAS、MERRF の点変異 tRNA 中の $\text{tm}^5(\text{s}^2)\text{U}$ の修飾欠損機構の解明にもつながる、 $\text{tm}^5(\text{s}^2)\text{U}$ の生合成経路を明らかにする研究を行っている。安定同位体標識したタウリンを培養細胞に与えることにより mt tRNA 中の $\text{tm}^5(\text{s}^2)\text{U}$ の質量変化を追跡する実験を行っている。合成した ^{18}O 原子を 2 つ含む [^{18}O]タウリンを用いた結果により、5 種類全ての tRNA で修飾構造中の O 原子に由来する分子量が 4 増加した [^{18}O] $\text{tm}^5(\text{s}^2)\text{U}$ が含まれていることを示している。更に [^{15}N]タウリンを用いて同様の実験を行い、 [^{15}N]タウリンが修飾構造中に取り込まれることを示唆する結果が得たことから、最終的に 5-タウリノメチル基のタウリン骨格がタウリン分子に由来することを明らかにし、各種生物における修飾ウリジンの生合成と比較して考察している。

7 節では、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たことにより、ウシ肝臓より単離したミトコンドリアを用いた *in vitro* トランスポートアッセイを行っている。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を示し、ミトコンドリアの低分子移送系に関する考察を行っている。

4 章では本論文の総括と今後の展望について述べている。

以上、本論文は修飾塩基としては初めての、構造中にスルホン基を含む新規修飾ウリジン $\text{tm}^5(\text{s}^2)\text{U}$ の構

構造を決定し、更に構造の持つ機能を明らかにすることでMELAS、MERRFなどの臨床症状との関連性を指摘している。また、修飾構造の生合成過程における前駆体の一つがタウリンに由来することを明らかにし、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ことにより、タウリンが生体高分子中に取り込まれる初の例として、タウリンの新たな機能と代謝経路の存在を見出している。これらの成果は化学生命工学、特にミトコンドリアの翻訳系における分子生物学の進展に大きく貢献している。

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。