

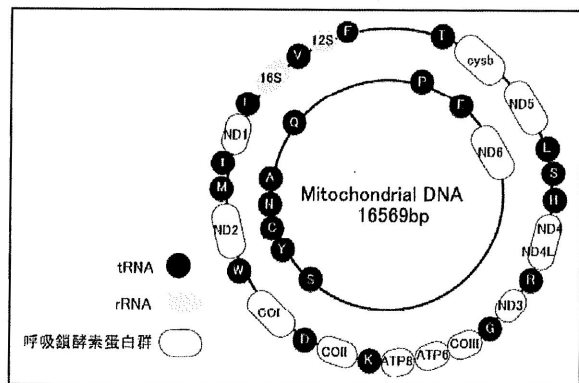
## 論文内容の要旨

### 論文題目      ミトコンドリア RNA の変異による疾患の分子機構

氏 名                      日野 成実

#### 序論

ミトコンドリア病は、個体の活動に必要なエネルギーの約90%を供給するミトコンドリアの機能異常に起因する疾患の総称である。ミトコンドリア病は、遺伝子病のなかで最も患者数が多く、脳、心臓、骨格筋などのエネルギー需要の高い器官を中心に機能不全をもたらし、時には死に至るような深刻な症状をもたらす。ミトコンドリアは、核とは別の独自のゲノムと、細胞質とは別の独自の翻訳系を有している。ヒトミトコンドリアゲノムには翻訳系に不可欠な全ての tRNA、2種類の rRNA、そして呼吸鎖酵素蛋白群の一部がコードされている。ミトコンドリア病は核ゲノムにコードされたミトコンドリアに関わる遺伝子変異が原因の場合もあるが、多くの場合はミトコンドリアゲノムにコードされた遺伝子変異が原因である。なかでもミトコンドリア tRNA(mt tRNA)遺伝子変異は数多く報告されており、ミトコンドリア rRNA(mt rRNA)遺伝子変異は、多くの患者で見つかっている。



#### 1. ミトコンドリア tRNA 遺伝子変異による疾患

ミトコンドリア tRNA 遺伝子変異に関しては、病原性点変異による mt tRNA のプロセッシング効率の低下、アンチコドン修飾塩基の欠落、アミノアシル化効率の低下などが報告されている。本研究では、乳児致死性心筋症(fatal infantile cardiomyopathy)患者から見出された、ミトコンドリア tRNA<sup>leu</sup> 遺伝子内の 4269 位の A が G に置換された変異(A4269G)に着目し、点変異が tRNA に及ぼす構造変化とそれに付随する tRNA 機能低下について解析した。A4269G 変異は、核ゲノムの影響を排除するため、HeLa 細胞からミトコンドリア

ア DNA を完全に除去した $p^0$ HeLa 細胞と、脱核した患者の線維芽細胞を融合させた、人工融合細胞サイブリドを用いた研究がなされている。A4269G 変異をもつサイブリドはミトコンドリア蛋白質合成活性の喪失、それが原因と考えられる呼吸鎖酵素活性の低下が報告されている(Hayashi *et al. J.Biol.Chem.* 1994, 269)。また変異 tRNA<sup>lle</sup> の細胞内定常状態量は通常の半分に低下しており、細胞内で非常に不安定であるということも見出されている。

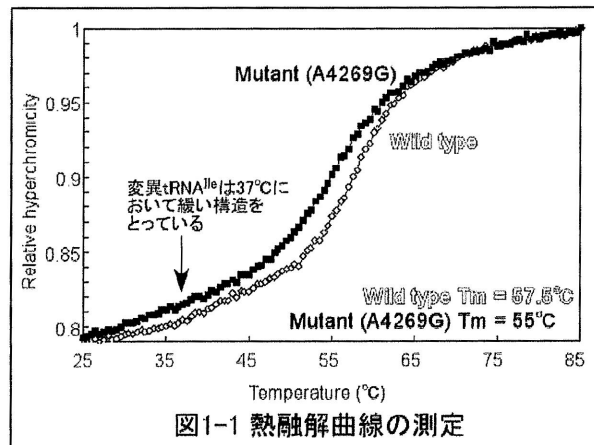


図1-1 熱融解曲線の測定

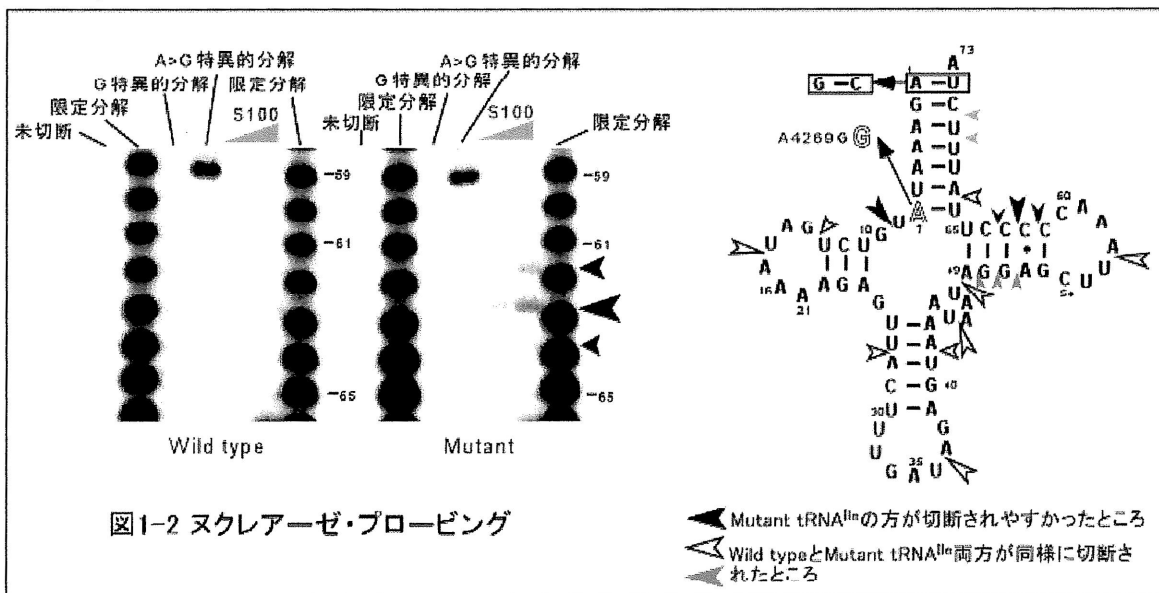


図1-2 ヌクレアーゼ・プロービング

これらの解析から、変異 tRNA<sup>lle</sup> の異常な不安定性が機能的な tRNA<sup>lle</sup> の減少を招き、発症の直接の原因となっているのではないかと考えた。tRNA の熱融解曲線測定の結果(図 1-1)、変異 tRNA<sup>lle</sup> は正常型 tRNA<sup>lle</sup> より融解温度が 2.5°C 低く、熱安定性が低下し、生理学的温度 37°C においてすでに構造緩んでいることが明らかとなった。またミトコンドリアヌクレアーゼ(S100)による tRNA<sup>lle</sup> の切断パターンの比較から、変異 tRNA<sup>lle</sup> は T-ステムの構造が変化していることが示唆された(図 1-2)。

翻訳因子 EF-Tu はアミノアシル tRNA をリボソームに運搬する蛋白質である。EF-Tu の tRNA 認識部位はアクセプターステムと T-ステムであることから、4269 位の点変異は EF-Tu との相互作用に影響を与えている可能性を考えた。アミノアシル tRNA<sup>lle</sup> と EF-Tu との結合能をゲルシフトアッセイで調べたところ、変異 tRNA<sup>lle</sup> の EF-Tu に対する解離定数は正常型 tRNA<sup>lle</sup> の約 2 倍であり、変異 tRNA<sup>lle</sup> は EF-Tu に対する結合能が低下していることが見出された(図 1-3)。

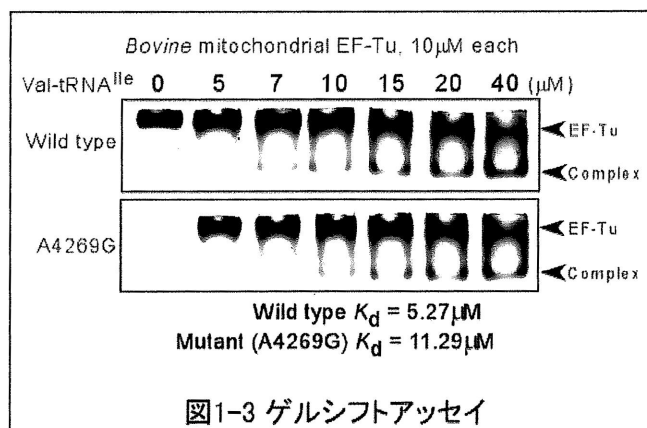


図1-3 ゲルシフトアッセイ

以上のことから、A4269G 変異により tRNA<sup>leu</sup> の構造が変化し、細胞内で非常に分解されやすくなるため、tRNA 分子の定常状態量が正常な場合の半分に低下していると考えられる。また変異 tRNA<sup>leu</sup> は、たとえ分解を免れても EF-Tu との結合能が低下しているため、実際に翻訳反応に参加できる変異 tRNA<sup>leu</sup> 量はさらに低下していると考えられる。翻訳反応に参加できる tRNA<sup>leu</sup> 量の低下はミトコンドリア翻訳停止、それに基づく呼吸鎖酵素活性の低下を招き、発症にいたる原因の一つとなると考えられる。

## 2. ミトコンドリア rRNA 遺伝子変異による疾患

ミトコンドリアゲノムにコードされたミトコンドリアリボソーム(ミトリボソーム)小サブユニットの 12S rRNA 遺伝子の 1555 位の A が G に置換された変異(A1555G)は、ストレプトマイシンに代表されるアミノグリコサイド系抗生物質(AG)誘発性難聴の症状を示す。AG は、健常者でも投与量が多いと副作用として難聴を誘発するが、A1555G 変異がある場合は低投与量でも不可逆的な難聴を誘発する。AG は原核生物型リボソームと結合し、翻訳における誤りを誘発する抗生物質である。ミトリボソームは原核生物型であるため、AG の標的となり、ミトコンドリア翻訳系の異常を引き起こすことが発症の原因ではないかと考えた。

A1555G 変異をもつ患者の細胞核を HeLa 核に置き換えた細胞(サイブリド)を使用し、AG 存在下で培養したところ、変異をもつ細胞ではより低 AG 濃度での生育阻害(図 2-1)、呼吸鎖活性の顕著な低下が観察された。AG 存在下でのミトコンドリア翻訳活性と産物を、細胞質の翻訳を停止させ、<sup>35</sup>S メチオニンをを用いてパルスラベルで見たところ(図 2-2)、A1555G 変異をもつ細胞では、変異をもたない細胞より翻訳効率の低下が大きいことがわかった。また A1555G 変異をもつ細胞では変異をもたない細胞では見られない、移動度の異なるバンドが検出され、AG により誤翻訳が誘発されていることが示唆された。これらのことから AG はミトコンドリアの翻訳系に直接作用し、A1555G 変異は AG 感受性を高めることを明らかにした。

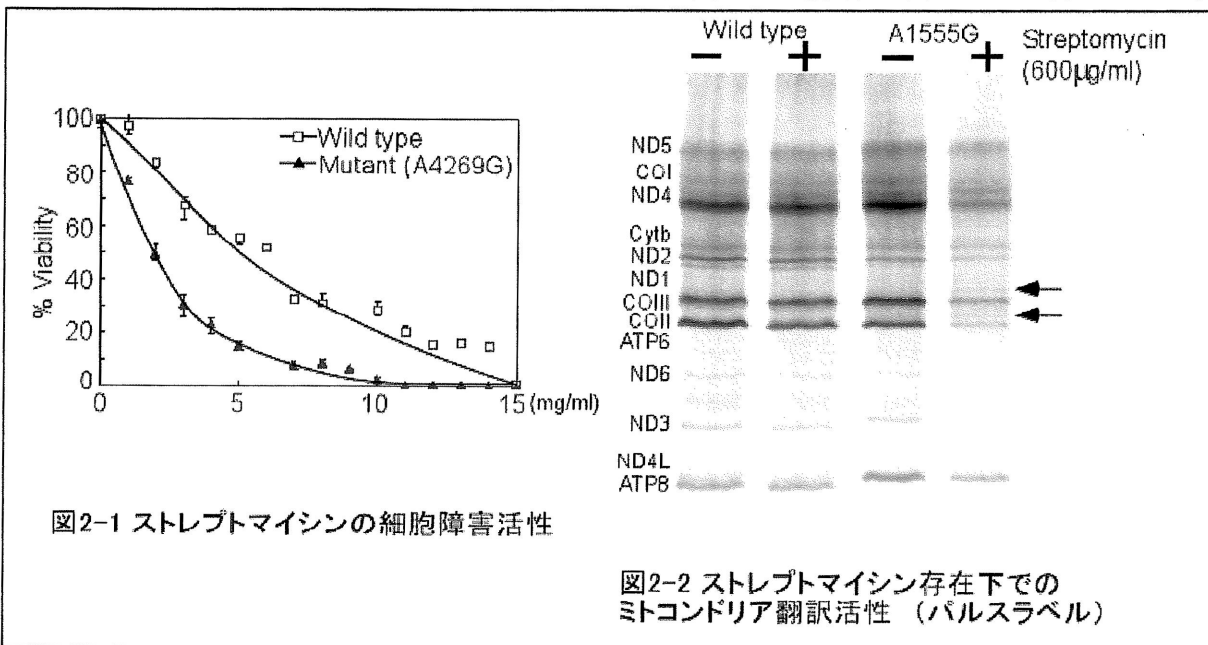


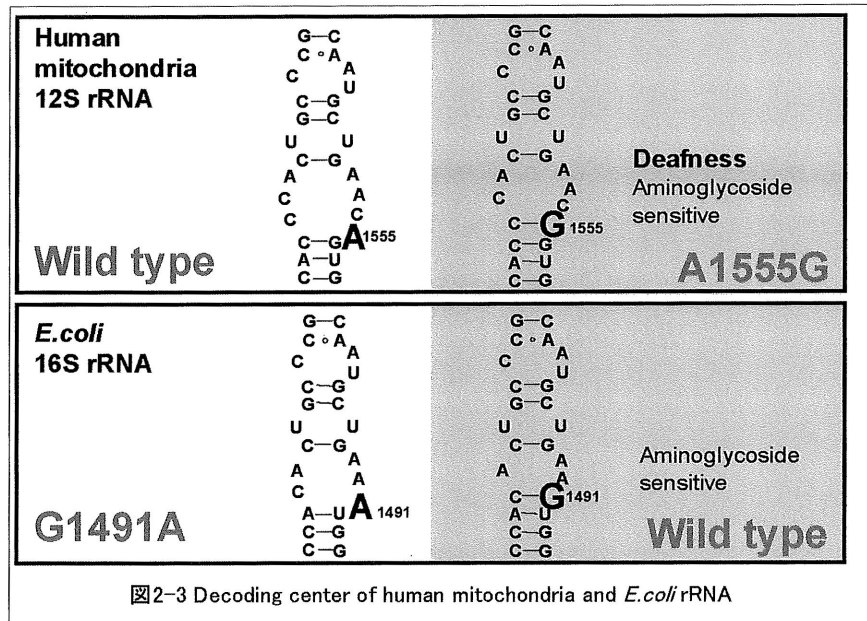
図2-1 ストレプトマイシンの細胞障害活性

図2-2 ストレプトマイシン存在下でのミトコンドリア翻訳活性 (パルスラベル)

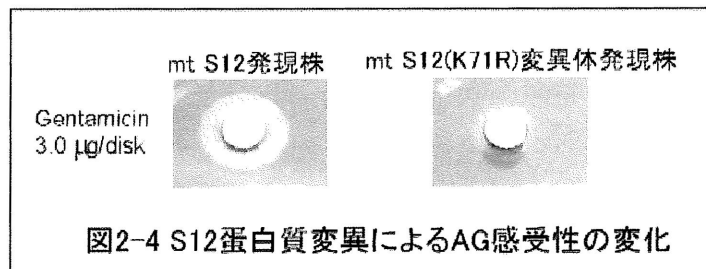
大腸菌リボソームにおいて A1555 位は 16S rRNA の 1491 位にあたり、この部位は G で AG 感受性を示す(図 2-3)。つまり大腸菌野生株は遺伝型、表現型ともに A1555G 難聴患者と同じであり、難聴患者のモデル生物として用いることができるのではないかと考えた。そこでまず、健常者モデルの大腸菌 G1491A 変異株を作製し、難聴患者モデルの大腸菌野生株と AG 感受性を比較したところ、予想通り G1491A 変異株は野生株より AG 感受性が低いことが示され、大腸菌野生株を難聴患者のモデル生物と

して使用することの妥当性が示された。実際に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いた翻訳精度を測定するレポーターアッセイにより G1491A 変異株(健常者モデル)は野生株(難聴患者モデル)より AG による誤翻訳が起きにくいことを明らかにした。

A1555 位は AG 結合部位であるとともに、翻訳の精度を調節している領域に位置している。その近傍に位置するリボソーム蛋白質 S12 もまた AG 結合に関与しており、翻訳の精度も調節している。原核生物では S12 蛋白質のいくつかのアミノ酸変異は AG 耐性変異として報告されている。これらの知見から、ミトコンドリア



ゲノムにコードされた 12S rRNA の A1555G 変異による AG 感受性の上昇や、翻訳精度の低下を、核ゲノムにコードされたリボソーム蛋白質 S12 の改変によって相補できるのではないかと考えた。そこで既に原核生物において AG 耐性をもたらしことが報告されている変異(K71R)を導入した mt S12 蛋白質を大腸菌野生株(難聴患者モデル)で発現させたところ、AG 感受性の緩和が観察された(図2-4)。この結果は、遺伝子操作が不可能なミトコンドリア DNA の病的変異を治療タンパク質を導入することで改善できる可能性を示唆し、将来的な遺伝子治療の可能性も含めて更なる研究を展開していきたい。



## 結論

乳児致死性心筋症から見出された mt tRNA 遺伝子病原性変異のひとつである A4269G 変異の解析を行い、構造変化による不安定化、翻訳因子 EF-Tu との結合能の低下を見出した。これらのことが相乗的にミトコンドリアの翻訳機能の不全を誘起し、発症へと至るのであろう。また本研究において見出したこれらの現象は他の mt tRNA 遺伝子変異にもあてはまる可能性があり、ミトコンドリア病発症のひとつの分子機構であると考えられる。

アミノグリコサイド系抗生物質(AG)誘発性難聴に由来する mt rRNA 遺伝子病原性変異のひとつである A1555G 変異の解析を行い、アミノグリコサイドがミトコンドリア翻訳系に作用していること、この変異によりアミノグリコサイド感受性が向上することを細胞レベルで明らかにした。またミトコンドリアゲノムにコードされた rRNA の変異 (A1555G) を、核ゲノムにコードされたミトコンドリアリボソーム蛋白質 S12 の改変により相補できる可能性を見出した。