

論文内容の要旨

論文題目 変異 tRNA のタウリン修飾欠損に起因する ミトコンドリア病の分子機構

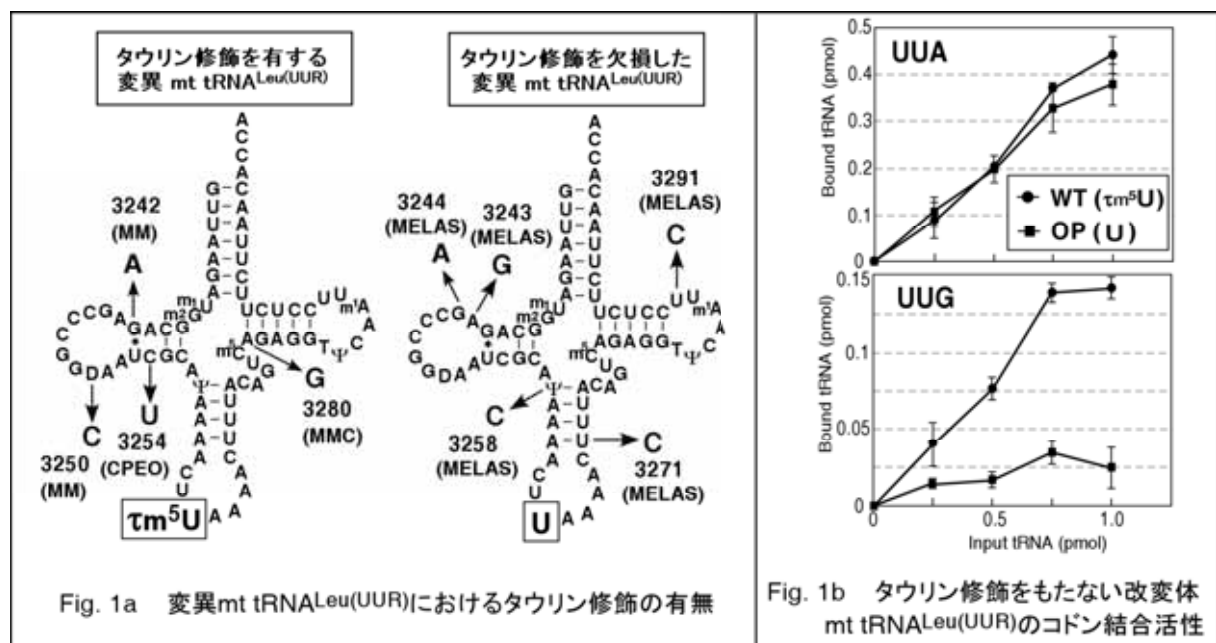
氏名 桐野 陽平

ミトコンドリア病とはミトコンドリアの機能異常を原因とする疾患の総称であり、主に脳、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がもたらされる重篤な遺伝病である。そのうちの多くはミトコンドリア DNA (mtDNA) 上にコードされるミトコンドリア tRNA (mt tRNA) 遺伝子内の変異が原因であり、現在までに 100 箇所以上もの mt tRNA 遺伝子変異が様々なミトコンドリア病と関連があることが報告されている。しかし、変異と疾患との関連性が明らかになる一方で、変異が分子レベルでどのように mt tRNA の機能を障害しミトコンドリア機能異常を引き起こすのか、その詳細な分子機構は未解明であった。tRNA 分子は転写後に様々な修飾を受けることによって成熟し、初めてその機能が発現することが知られている。したがって、ミトコンドリア病発症の分子機構を探るためには mt tRNA 遺伝子変異をただの塩基配列の変化としてのみとらえるのではなく、tRNA の成熟過程を踏まえた詳細な解析を行う必要がある。本研究ではミトコンドリア病由来の変異 mt tRNA の構造と機能に関する生化学的な解析を行い、アンチコドン修飾の欠損が疾患発症の中心的な役割を果たしていることを突き止めた。

MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) は脳卒中様症状と高乳酸血症を特徴とするミトコンドリア病の代表病型で、ほとんどの患者が mt tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子内に変異を持つ。当研究室のこれまでの研究において、正常 mt tRNA^{Leu(UUR)} ではアンチコドン 1 字目に、転写後修飾ウリジンである 5-タウリノメチルウリジン ($\tau\text{m}^5\text{U}$ 、以下タウリン修飾) が存在するのに対し、代表的な MELAS 変異である A3243G および T3271C それぞれを有する変異 mt tRNA^{Leu(UUR)} は共通してタウリン修飾を欠損し、アンチコドン 1 字目は未修飾

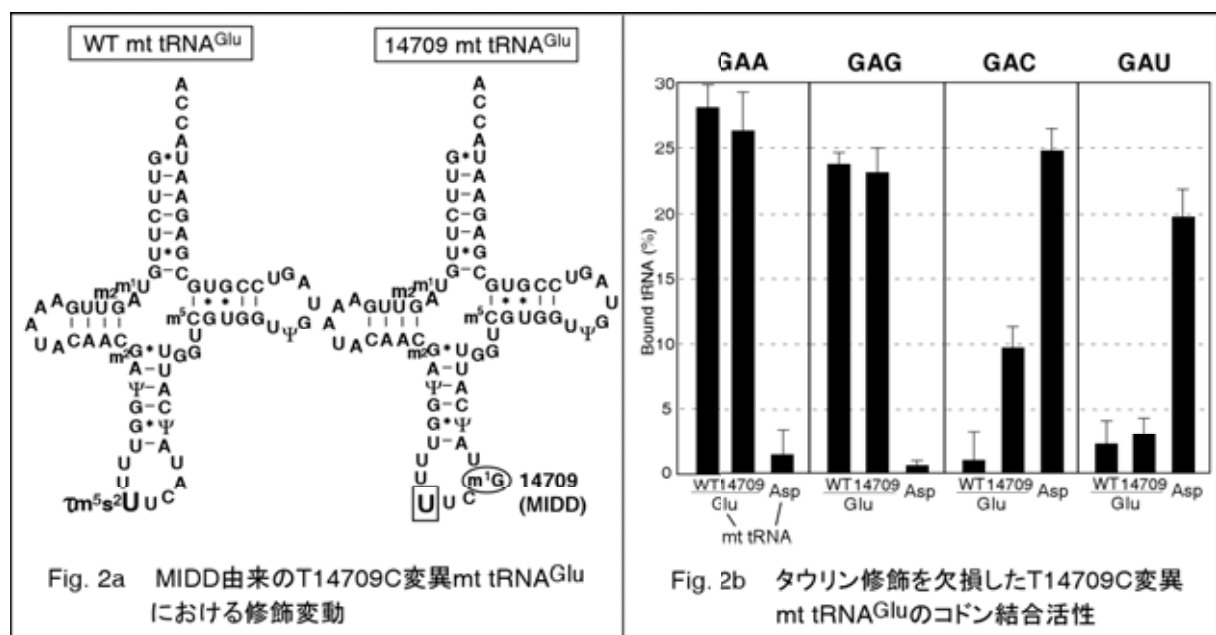
ウリジンであることが見出された。本研究ではこのタウリン修飾欠損とミトコンドリア病との関連性を明らかにする目的で、プライマー伸長法を応用することにより、超微量な全 RNA 画分を用いて mt tRNA^{Leu(UUR)} のタウリン修飾の有無を判別する方法を確立した。これにより 0.5~1 mg の実際の患者生検組織を用いたタウリン修飾の解析に成功した。その結果、MELAS 患者由来の 5 種類の変異 (A3243G、G3244A、T3258C、T3271C、T3291C) を有する mt tRNA^{Leu(UUR)} は全てタウリン修飾を欠損しており、他の病型である MM (Mitochondrial myopathy)、MMC (Maternal myopathy and cardiomyopathy) および CPEO (Chronic Progressive External Ophthalmoplegia) 患者由来の 4 種類の変異 (G3242A、T3250C、C3254T、A3280G) を持つ mt tRNA^{Leu(UUR)} はタウリン修飾を欠損していないことが判明した (Fig. 1a)。この結果は、MELAS というミトコンドリア病の一臨床病型と変異 mt tRNA^{Leu(UUR)} のタウリン修飾欠損が明確に関連付けられることを示しており、MELAS は原因点変異の影響で生じるのではなく、点変異によってもたらされた mt tRNA^{Leu(UUR)} のタウリン修飾欠損によって引き起こされることが明らかになった。

アンチコドン 1 字目に存在する修飾塩基は、一般に正確で効率のよいコドンの読みわけに重要な役割を果たしており、MELAS 変異 tRNA に見られたタウリン修飾欠損はコドン認識の異常をもたらすと予想された。その実験的検証のために、MELAS の変異 mt tRNA^{Leu(UUR)} において、点変異の効果を排除しアンチコドン 1 字目のタウリン修飾欠損のみの影響を明確にする目的で、ヒト胎盤 27kg から大量精製した野生型 mt tRNA^{Leu(UUR)} のタウリン修飾ウリジン (τ^m5U) を、分子整形術により未修飾なものに置換した改変体 mt tRNA^{Leu(UUR)} を作製した。この改変体はタウリン修飾以外の RNA 修飾は野生型と同一であり、更に変異 tRNA と異なり点変異を持たない。この改変体のコドン認識をリボソームの A 部位における mRNA と tRNA の結合実験により解析した結果、タウリン修飾をもたない改変体 tRNA (OP) は野生型 tRNA (WT) に比べ、対応する 2 つのコドン (UUA、UUG) のうち UUG コドンのみに特異的に結合できないことが明らかになった (Fig. 1b)。mtDNA にコードされる 13 種類のタンパク質遺伝子のうち、呼吸鎖酵素複合体 I のサブユニットである ND6 は UUG コドンの使用頻度が圧倒的に高い。したがって、タウリン修飾を欠損した MELAS 変異 mt tRNA^{Leu(UUR)} による UUG コドン特異的な翻訳阻害は ND6 のように UUG コドンが高頻度で使用されるタンパク質の発現を特異的に抑えられ、これは長年分子レベルでの理由が不明であった呼吸鎖酵素複合体 I の活性低下という MELAS 患者の生化学的症候をうまく説明することができる。



糖尿病と難聴が特徴のミトコンドリア病である MIDD (maternally inherited diabetes and deafness) の患者において、mt tRNA^{Glu} 遺伝子中の 14709 位が T から C (mt tRNA 上では A から G) へと変異する症例が報告されている。この疾患の発症機構に迫るため、外来細胞由来の核と患者由来の mtDNA を融合させた人工融合細胞 (サイブリド) を用いて mtDNA 変異単独のミトコンドリア機能におよぼす影響を解析した。mtDNA に T14709C 変異が 100% 存在する変異型細胞は、野生型細胞に比べ、ミトコンドリアタンパク質の合成速度および定常状態量に変化は見られなかった。一方で変異型細胞は酸素消費速度が低下しており、ミトコンドリアの機能低下が観測された。また、マイクロアレイによる mRNA 発現プロファイル解析の結果、変異型細胞では抗酸化酵素であるペルオキシレドキシシン 2 の mRNA 量が上昇しており、酸化ストレスに暴露されていることも明らかになった。これらの結果により、T14709C 変異はミトコンドリアタンパク質の量的低下ではなく何らかの質的異常によって、ミトコンドリアの機能異常を引き起こすことが示唆された。

そこで tRNA の異常を解析するため、T14709C 変異 mt tRNA^{Glu} を大量培養した変異型細胞から単離・精製し、LC/MS やその他の生化学的手法を用いて、修飾塩基を含めた詳細な配列解析を行った。その結果、正常 mt tRNA^{Glu} ではアンチコドン 1 字目に、5-タウリノメチル 2-チオウリジン ($\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$) が存在するのに対し、T14709C 変異 mt tRNA^{Glu} はその約 70% がタウリン修飾を欠損し、未修飾ウリジンであることが明らかになった (Fig. 2a)。また、変異の位置である tRNA の 37 位は全ての変異 mt tRNA^{Glu} で 1-メチルグアノシン (m^1G) に修飾されていた。次にこの変異 mt tRNA^{Glu} のコドン認識能をリボソームの A 部位における mRNA と tRNA の結合実験により解析した (Fig. 2b)。野生型 mt tRNA^{Glu} (WT) は対応する 2 つのグルタミン酸のコドン (GAA, GAG) を認識し隣のアスパラギン酸のコドンは認識しない。ところが、タウリン修飾を欠いた T14709C 変異 mt tRNA^{Glu} (14709) においては対応する 2 つのコドンには効率よく結合し、更に対応しないアスパラギン酸の GAC コドンにも誤って結合するという現象が観測された。また、放射性アミノ酸を用い、ミトコンドリアタンパク質合成系へのアミノ酸の取り込みをパルスラベル実験によって解析したところ、変異型細胞は野生型細胞に比べアスパラギン酸の取り込みは低く、グルタミン酸の取り込みが高いという結果が得られた。これらの結果はタウリン修飾を欠損した変異 mt tRNA^{Glu} が細胞内においてアスパラギン酸コドンを誤翻訳し、アスパラギン酸が入るはずの箇所にグルタミン酸が取り込まれた異常なミトコンドリアタンパク質が合成され、前述した T14709C 変異型細胞におけるミトコンドリア機能異常が引き起こされることを示している。



以上の実験結果より MELAS, MIDD においていずれも点変異はタウリン修飾の欠損を引き起こすという共通性が観測され、RNA 修飾の異常がミトコンドリア病変異 mt tRNA で広くおこる一般的な現象であることが示唆された。更にタウリン修飾が欠損した MELAS および MIDD 変異 mt tRNA は、それぞれ異なったパターンで異常なコドン認識様式を示し(Fig. 3)、これがミトコンドリアタンパク質合成ひいてはミトコンドリア機能の異常を引き起こし、最終的にそれぞれの疾患で特異な臨床症状を発現すると考えられる。

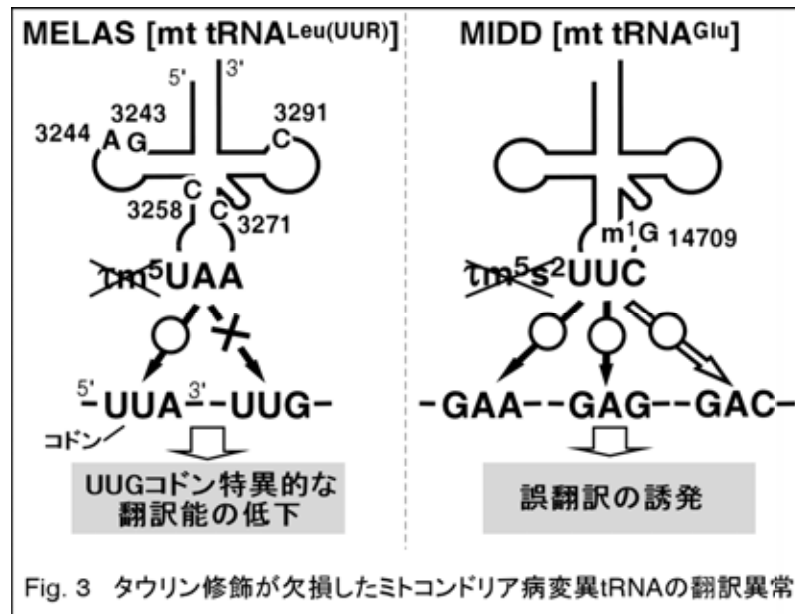


Fig. 3 タウリン修飾が欠損したミトコンドリア病変異tRNAの翻訳異常

ミトコンドリア病における変異 tRNA のタウリン修飾欠損は、RNA 修飾の異常がヒトの疾患の直接的な原因になっていることを示した初めての例であるが、これはヒト疾患発症の原因究明において、タンパク質や mRNA の量的変化のみならず、機能性 RNA の質的な変化を解析する必要性を示している。