

図7 培養液にタウリンを加えたときのMERRFサイブリド細胞のミトコンドリア

MEERFサイブリドを細胞内のタウリン合成を抑制するためにタウリン合成の材料であるメチオニンとシステインを必要最小限の濃度として、4日間培養し、その後0.1mM～1mMの低濃度のタウリンの効果を調べた。ミトコンドリアの膜電位に依存して蛍光を発するMitoTrackerで染色すると、タウリン濃度依存的に蛍光強度が増加し、形態も糸状になりミトコンドリア機能が回復したことが示唆された。異常ミトコンドリアは膨らんだ点状であるのに対し、正常ミトコンドリアは線状である。A：タウリン0mM, B：0.1mM, C：0.3mM, D：1mM。

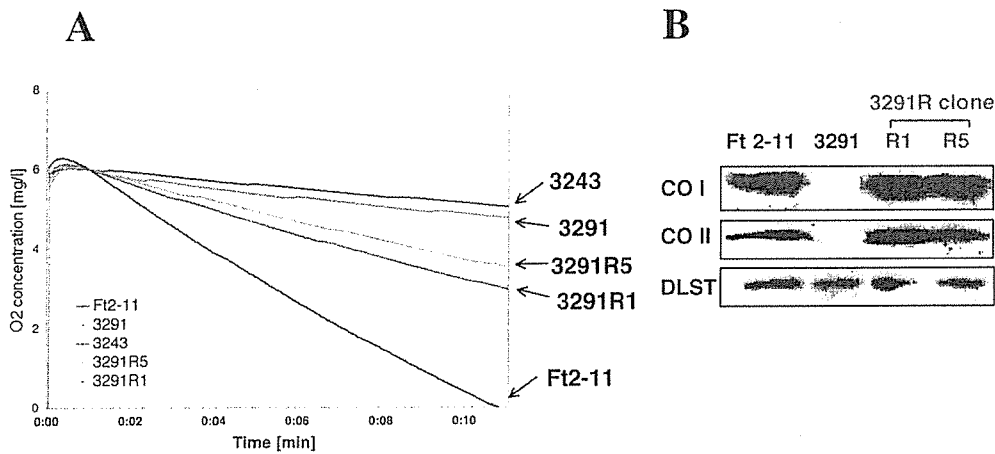


図8 mtDNAに変異を持ちながらミトコンドリア機能回復しているサイブリド株の分離

MELAS3291変異mtDNAを95%以上持ちながら、呼吸活性が部分的に回復した細胞株(3291R1と3291R5)を分離した。(A)は酸素電極による酸素消費速度。3243、3291はそれぞれ変異mtDNAをもつサイブリド、Ft2-11は正常株。Western blotによりミトコンドリア内の蛋白質合成を確認すると3291株では蛋白合成が行われていないのに対し、回復株では蛋白合成が回復していた(B)。COIとCOIIはmtDNAにコードされており、DLSTは核遺伝子にコードされたミトコンドリア蛋白質。

して変異解析を行うのが一般的である。ある変異によってある機能を失った細胞では別の変異によって正常化する変異株は必ず分離できるはずであるという考えに基づいている。mtDNAに変異があり、tRNAのタウリン修飾が欠損していても、何らかの関連遺伝子の変異によってタウリン修飾が回復してミトコンドリア機能も回復する可能性もあるはずである。幸運にも、MELAS由来の

3291変異mtDNAが98%あるサイブリドにおいて、ミトコンドリア機能が回復したサイブリド株を分離することに成功した。このサイブリドでは、mtDNAに変異があるにもかかわらず、tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>のタウリン修飾が部分的に回復し、ミトコンドリア蛋白質合成と呼吸活性も回復していた(図8)。さらに、このサイブリドの核を正常HeLa細胞の核と交換すると再びタウリン修飾は

欠損してミトコンドリア機能は低下した。すなわち、なんらかの核遺伝子変異によって、mtDNAに変異がある場合にも変異tRNAのタウリン修飾を回復させ、ミトコンドリア機能を回復させることが判明した。この変異遺伝子を分離し、変異mtDNAをもつ細胞に導入すればミトコンドリア機能を回復させることができる。この方法は基本的に遺伝子治療であるが、この遺伝子をヒントに新しい治療法を開発できる可能性もあると期待している。

### おわりに

ミトコンドリア tRNA は細胞質ゾルの tRNA に比べその存在量が極めて少なく解析が困難であった。しかしながら RNA 分子の精製技術の進歩とサイブリド法の確立によりミトコンドリア脳筋症の原因遺伝子変異をもつ tRNA を精製し解析することが可能になった。その結果、変異 tRNA には予想もしなかったようにタウリン修飾が共通に欠損していたのである。RNA 分子の特定の塩基修飾という詳細な解析から高次生命現象であるヒトの疾患の根本原因が見出されたことは意義深いことであり、この知見は RNA の修飾欠損が直接疾患の原因であることを示した初めての例である。MELAS、MERRF に対しては、RNA 修飾酵素やその関連遺伝子の同定と機構の解明・改変といったアプローチからの治療という、今まででは考えなかった発想を我々に与えてくれた。今後、tRNA の塩基修飾関連遺伝子を解析することによって、ミトコンドリア脳筋症の根本的治療法を確立したい。

### 謝 辞

本研究は、多くの方々との共同研究の集積です。自治医科大学桃井真里子教授、筑波大学林純一教授、東京大学渡辺公綱教授（当時）、鈴木勉助教授、犀潟病院の福原信義先生の諸先生方に感謝します。一連の研究は多大な労力を必要として研究成果であり、1990年当時に mtDNA の全塩基配列を決定した小林葉子さん（当時自治医科大学大学院生）、変異 mtDNA を維持しながらサイブリドを大量培養した石井徳恵さん（日本医科大学）、サイブリドならびに胎盤から tRNA を精製して膨大な研究結果を蓄積した安川武宏さん（当時東大大学院生）、胎盤から tRNA を精製し分子整形をした桐野洋平さん（東大大学院生）らにこの場をもって感謝いたします。

### 文 献

- 1) 太田成男: ミトコンドリア DNA の変異によって生じるミトコンドリア病とミトコンドリアの形成制御機構. 生化学 67: 15-32, 1995.
- 2) Ohta, S. (2003) A Multi-Functional Organelle Mitochondrion is Involved in Cell Death, Proliferation and Disease. *Curr. Med. Chem.* 10: 2485-2494, 2003.
- 3) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S.: A point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem Biophys Res Commun* 173: 816-822, 1990.
- 4) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Shimoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S.: Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Am J Hum Genet* 49: 590-599, 1991.
- 5) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S, et al.: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320: 1293-1299, 1989.
- 6) Kawashima S, Ohta S, Kagawa Y, Yoshida M, Nishizawa M. Widespread tissue distribution of multiple mitochondrial DNA deletions in familial mitochondrial myopathy. *Muscle Nerve* 17: 741-746, 1994.
- 7) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, and Wallace DC.: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 61: 931-937, 1990.
- 8) Schon EA, Bonilla E. and DiMauro S.: Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 29: 131-149, 1997.
- 9) Hayashi J, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y, and Nonaka I.: Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:10614-10618, 1991.
- 10) Hayashi J, Ohta S, Takai D, Miyabayashi S, Sakuta R, Goto Y, Nonaka I.: Accumulation of mtDNA with a mutation at position 3271 in tRNA(Leu)(UUR) gene introduced from a MELAS patient to HeLa cells lacking mtDNA results in progressive inhibition of mitochondrial respiratory function. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1049-1055, 1993.
- 11) Enriquez JA, Chomyn A and Attardi G.: MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat Genet* 10: 47-55, 1995.
- 12) Kaneko T, Suzuki T, Kapushoc ST, Rubio MA, Ghazvini J, Watanabe K, Simpson L, and Suzuki T.: Wobble modification differences and subcellular localization of tRNAs in *Leishmania tarentolae*: implication for tRNA sorting mechanism. *EMBO J.* 22:657-667, 2003
- 13) Yasukawa T, Suzuki T, Suzuki T, Ueda T, Ohta S and Watanabe K.: Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem* 275: 4251-4257, 2000.
- 14) Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, Ueda T, Ohta S and Watanabe K.: Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA(Lys) with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Lett* 467: 175-178, 2000.
- 15) Suzuki T, Suzuki T, Wada T, Saigo K, and Watanabe K.: Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new

- insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.* 21:6581-6589. 2002
- 16) Yasukawa T, Kirino Y, Ishii N, Lehtinen SK, Jacobs HT, Makifuchi T, Nobuyoshi Fukuhara N, Ohta S, Suzuki T, and Watanabe K. : Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett* in press (2005)
- 17) Barrell BG, Anderson S, Bankier AT, de Bruijn MH, Chen E, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, and Young IG.: Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77:3164-3166. 1980
- 18) Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S. : Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J.* 22: 4794-4802, 2001.
- 19) Kirino Y, Yasukawa T, Ohta S, Akira S, Ishihara K, Watanabe K, and Suzuki T.: Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:15070-15075. 2004
-