

シンポジウム

ミトコンドリア異常症の治療戦略

太田成男

日本医科大学大学院医学研究科加齢科学専攻  
細胞生物学分野

**要旨:** ミトコンドリア異常症 MELAS と MERRF の原因としてミトコンドリア tRNA 遺伝子変異が同定されたのは 15 年前である。遺伝子変異から、いかに発症するかを分子レベルで明らかにすることによって治療への戦略をたてるのが可能になるはずである。筆者らは変異 tRNA 分子を分離・精製することによって、変異 tRNA ではアンチコドンのタウリン修飾が欠損していることを明らかにした。この tRNA のタウリン修飾を回復することが MELAS、MERRF の根本治療への道となるであろう。

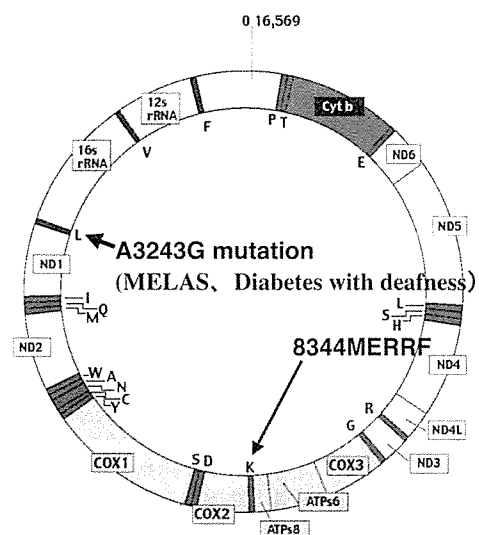
**Key Words:** サイブリド、転写後修飾、タウリン、tRNA、ミトコンドリア脳筋症

はじめに

細胞内小器官であるミトコンドリアは好氣的な酸化的リン酸化によってエネルギーを産生し、母系遺伝するミトコンドリア DNA (mtDNA) を持つ<sup>1,2)</sup>。ヒト mtDNA の長さは 16,568 塩基対であり、環状 2 本鎖 DNA である (図 1)。ミトコンドリアではミトコンドリア独自の蛋白質合成系により、mtDNA 上にコードされている 13 種類の蛋白質を合成される。この蛋白質合成に使われる tRNA は細胞質ゾル (サイトゾル) とは別の tRNA であり、mtDNA に遺伝子がコードされており、22 種類の tRNA からなりたっている。またリボソーム RNA もミトコンドリア特有のものであり、構成する 2 つの 12S、16S リボソーム RNA 遺伝子は mtDNA 上にコードされている。一方、リボソーム蛋白質、その他の複製、転写、翻訳反応関連因子類は全て核ゲノムにコードされ、サイトゾルで合成されミトコンドリアに移入される。mtDNA にコードされている蛋白質はいずれも呼吸鎖酵素複合体と ATP 合成酵素のサブユニットであり、ミトコンドリアが細胞、組織、臓器、そして最終的には個体が活動するために必要なエネルギーの大半を生産するために不可欠な構成成分である。mtDNA は組織、細胞によって異なるが 1 細胞内に数百から数千コピー存在している。核遺伝子とは異なり多コピーなので変異 mtDNA と正常 mtDNA が混在する場合があります、混在の状態をヘテロプラズミーと呼ぶ。ヘテロプラズミーにおける正常 mtDNA と変異 mtDNA の比率は多様であり、ミトコンドリア異常症の多彩な臨床症状の原因のひとつでもある<sup>3,4)</sup>。

ミトコンドリア異常症の概観

ミトコンドリア異常症、あるいはミトコンドリア病とはミトコンドリア機能異常が第一義的な原因である疾患の総称である<sup>5)</sup>。ミトコンドリアは ATP を合成しており、ATP 合成系と呼吸鎖を構成する蛋白質は mtDNA と核 DNA の双方にコードされていてどちらの遺伝子の変異



**図 1** ヒトミトコンドリア DNA の遺伝子配置  
ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6 は複合体 I のサブユニット、Cyt b は複合体 III のサブユニット、CO I、CO II、CO III は複合体 IV のサブユニット、ATPase6、ATPase8 は複合体 V のサブユニットを示す。22 種類の tRNA 遺伝子はそれぞれ一文字表記アミノ酸で対応する。また 12S rRNA、16S rRNA はリボソーム RNA 遺伝子を示す。L (ロイシン)、S (セリン) に対応する tRNA だけは 2 種類存在する。tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) は、UUA と UUG を認識する (R = A and G, Y = C and U)。

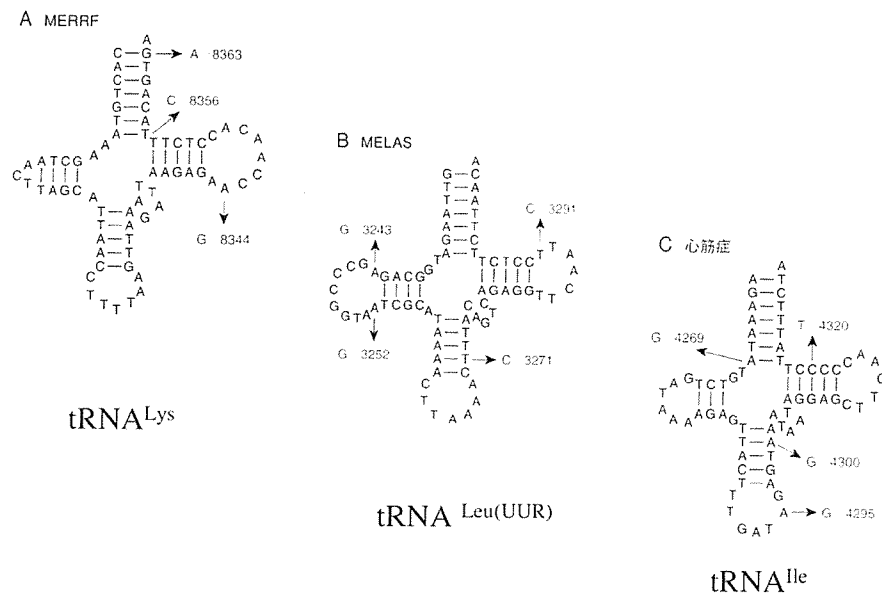


図2 MELAS、MERRF、心筋症患者にみられるミトコンドリア tRNA の変異

A : MERRF は tRNA<sup>Lys</sup> 遺伝子の点変異、B : MELAS は tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> の点変異、C : 心筋症は tRNA<sup>Ile</sup> 変異によって発症する。変異の位置に示してある番号は mtDNA の塩基番号。

で起こっていてもミトコンドリアに異常が生じ、いずれの場合もミトコンドリア異常症と呼ぶ。近年では複合的原因の一つであってもミトコンドリア異常が明確である場合にはミトコンドリア病と呼ぶ場合も出てきたように概念が拡張してきている<sup>2)</sup>。

mtDNA の変異によって異常が認められるのは、エネルギー需要が大きい骨格筋や中枢神経が中心である。そのため、ミトコンドリア異常によって筋と中枢神経に主に症状が現われる疾患を総称してミトコンドリア脳筋症と呼び、全身に症状があらわれる時はミトコンドリアサイトパチーと呼ぶ。最近ではまとめてミトコンドリア病とよぶことが多い。ミトコンドリア脳筋症では、筋力低下、易疲労性、小脳失調がおこる。子供の場合は身長が低い。さらに、痙攣、頭痛、神経性の難聴、痴呆などの症状があらわれることが多い。しかし、必ずしも全ての症状がすべての患者に同様に現われるわけではない。また、酸化的リン酸化の障害を補償するために解糖系が亢進され、最終産物である乳酸が高濃度になるため血液が酸性になる。ミトコンドリア脳筋症の3大病型は臨床症状の特徴の頭文字をとって以下のように名付けられている。外眼筋麻痺を特徴とする CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia)、筋肉の痙攣 (ミオクローヌステんかん) を特徴とする MERRF (myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers)、脳卒中様症状が特徴の MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) が主な病型である。網膜色素変性と心伝導障害を伴う CPEO は Kearns-Sayre 症候群として分類され、KSS は CPEO に含まれる。これらの症候群が提唱されたのはそれほど以前のことでなく MELAS が症候群としてのはじめて記載されたの

は 1984 年のことである。変異遺伝子が同定されたのは 1990 年のことであることを考えれば変異遺伝子の同定は極めて速やかだったといえる<sup>3)</sup>。しかし、変異遺伝子の同定から発症のメカニズムを決定するのにさらに長い時間を要することになった。

### CPEO と MERRF の原因遺伝子変異の同定

CPEO は mtDNA の欠失により発症する<sup>4)</sup>。その欠失の長さは 0.5 - 8kbp まで様々でその欠失の場所もさまざまであるが、いずれかの tRNA 遺伝子部分を欠失しているのが特徴である。瞼が垂れ下がるという眼瞼下垂が病気の特徴であるにもかかわらず、まぶたの筋に欠失 mtDNA が多いわけではなく、その特徴を生じさせる原因は今も不明である<sup>5)</sup>。mtDNA は母親の遺伝子のみが伝えられる母系遺伝によって子孫へ伝えられることが判明しているが、欠失 mtDNA は親には認められないにもかかわらず患者の代になって欠失が生じる孤発例はるかに多い。

MERRF はミオクローヌス痙攣を特徴とし、比較的高齢になって発症する。比較的高齢になってから発症するので遺伝様式は比較的明確にすることができ、母系遺伝である。そのため、mtDNA の変異が原因であることが当初から疑われ、実際、MERRF 患者の mtDNA 塩基配列を決定することで、ミトコンドリア tRNA<sup>Lys</sup> 遺伝子の点変異が同定された<sup>7)</sup>。興味深いことに MERRF 患者からは tRNA<sup>Lys</sup> の変異は塩基番号 8344 だけでなく、8356、8363 のいずれにも認められたので、tRNA<sup>Lys</sup> 遺伝子の変異が MERRF の原因である。ただし、8344 変異が患者の大多数を占める。MERRF の変異 tRNA 遺伝子と変異の場所を図 2 左に示す。tRNA<sup>Lys</sup> の変異によ

って、なぜ、特徴的な痙攣（ミオクローヌス）、が現れるかは不明である。

MELAS、MERRF 以外の症状を示すミトコンドリア病で様々なミトコンドリア tRNA 遺伝子上の変異が見つまっている<sup>3)</sup>。詳しくは MITOMAP、<http://infinity.gen.emory.edu/MITOMAP/>を参照。また、心筋症では塩基番号 4269、4295、4300、4320 の tRNA<sup>Ile</sup> 遺伝子上に点変異が多く見つまっている（図2右）。

### MELAS の原因遺伝子の同定

MELAS は脳卒中様症状を示す疾患で重篤である。MELAS は小児期に発症することが多いので患者の子孫が基本的に存在しないために遺伝様式が明らかではなく、mtDNA の変異によって発症するかどうか、1980年代当時は予測がつかなかった。mtDNA の塩基配列は個人差が大きく、たとえ mtDNA に塩基置換があったとしてもそれが病因であるかどうかをすぐに結論することはできない。病因であるか単なる個人差なのかを明らかにする必要がある。さらに病因である場合でも、正常 mtDNA と変異 mtDNA が混在していることが多く、変異 mtDNA の塩基配列を決定して原因変異を同定しようとしても、たまたま正常 mtDNA 遺伝子をクローニングしてしまえば変異が見つからない場合もあるかもしれない。

著者らは、自治医科大学小児科桃井真里子教授（現）グループと共同研究で、MELAS 患者の筋生検試料から細胞を培養して、細胞をクローン化することに成功した<sup>3,4)</sup>。そのために筋細胞の増殖能を増進させるために SV40 DNA で形質転換させた。そのクローンの中には呼吸鎖活性がある細胞クローンと呼吸鎖活性がない細胞クローンの両者が存在した<sup>5)</sup>。すなわち、同一患者の同じ組織から得られた細胞にもかかわらず、呼吸鎖酵素活性が欠損していたクローンと正常なクローンが株化できた。そのふたつの細胞は同一の人に由来するので核は共通であり、mtDNA 塩基配列のちがいは個人差に起因しない。このふたつの細胞株から分離した mtDNA に何らかの違いがあればその違いが病因であるはずである。例えば変異 mtDNA が存在していても、ヘテロプラズミーによって混在している正常 mtDNA をクローニングしてしまう可能性もあるので、PCR 産物の塩基配列を直接決定した。また、ヘテロプラズミーの程度違いから呼吸鎖活性の違いが生じていないことにも気をつけて、全塩基配列プロファイルを注意深く検討した。以上のような可能性を考えながらそれぞれの株の mtDNA の全塩基配列を決定した。すると、全塩基配列中わずか 1 カ所のみ塩基配列が異なっていた。そこで、この塩基置換が遺伝子多型でなく病因となる点変異であると結論した。この塩基変異は tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) 遺伝子上の点変異（塩基番号 3243）であった。その後の様々な報告などから MELAS 患者の約 80% にこの塩基置換が認められた。塩基番号

3271、3252 や 3291 の tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) 遺伝子上の変異をもつ患者もいた。いずれにしてもミトコンドリア tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) 遺伝子上に変異があるのが特徴である（図2中央）。

### サイブリドの作製法の開発

細胞には核ゲノムとミトコンドリアゲノムの二つが共存する。ミトコンドリア遺伝子に変異があり原因であるとしても、必要十分条件ではない。核遺伝子とミトコンドリアゲノムの双方に変異があってはじめて発症する可能性も否定できない。そこで、正常型 mtDNA と変異 mtDNA による違いだけを明確にするためには、共通の核をもつ細胞間で比較しなければならない。すなわち、mtDNA の変異が病気の本質的原因であることを証明するため患者細胞の核の影響を排除しなければならない。つまり患者由来の変異 mtDNA を持ち、かつ患者由来ではない共通の核を持つ細胞を人為的に作成することが必要である。mtDNA が完全に消失した HeLa 細胞（ $\rho^0$  細胞）と脱核した患者の細胞（細胞質）を融合することによって、核は HeLa 細胞、mtDNA は患者由来の細胞を作成することが可能であると考えた<sup>14)</sup>。

そこで、筑波大学の林純一教授（現）と共同で、まず mtDNA が完全に消失した HeLa 細胞を分離した。mtDNA の複製には RNA の鋳型が必要であり、その鋳型をつくるのは mtRNA ポリメラーゼである。エチジウムブロマイド (EtBr) は mtRNA ポリメラーゼの強力な阻害剤である。酵母の mtDNA は EtBr で処理することによって容易に mtDNA の欠失 mtDNA がえられることが知られていたので、それをヒントに、HeLa 細胞を長期に EtBr で処理した。ほとんどの細胞は mtDNA の消失によって死滅したが、その中から mtDNA が完全に消失した細胞を分離することができた。

一方、患者の線維芽細胞をサイトカラシンで処理して、細胞骨格のアクチンを脱重合し、遠心によって核を除去した。核は重いので遠心によって細胞からちぎれてしまうのである。核を失った細胞質（サイトプラズム）と mtDNA 消失細胞を融合することによって、核は HeLa で、それぞれの mtDNA をもつ細胞を作製することができた。細胞間の融合 (Hybrid) ではなく、サイトプラズムと細胞の融合であるので、サイブリドと名付けた（図3）。

実際、変異 mtDNA を持つサイブリドを作成すると、欠失 mtDNA の場合は明快地 tRNA 量の減少に伴って減少した蛋白合成量の低下して、酵素活性が定量的に減少した。mtDNA の欠失変異によって tRNA が欠乏してミトコンドリア翻訳反応が停止したのがミトコンドリア異常の原因であることが推察された<sup>15)</sup>。

一方、点変異が原因である場合も MERRF の 8344 点変異、MELAS の 3243、3271 点変異はそれぞれの変異を持つサイブリドが呼吸鎖酵素活性の異常を示したこと

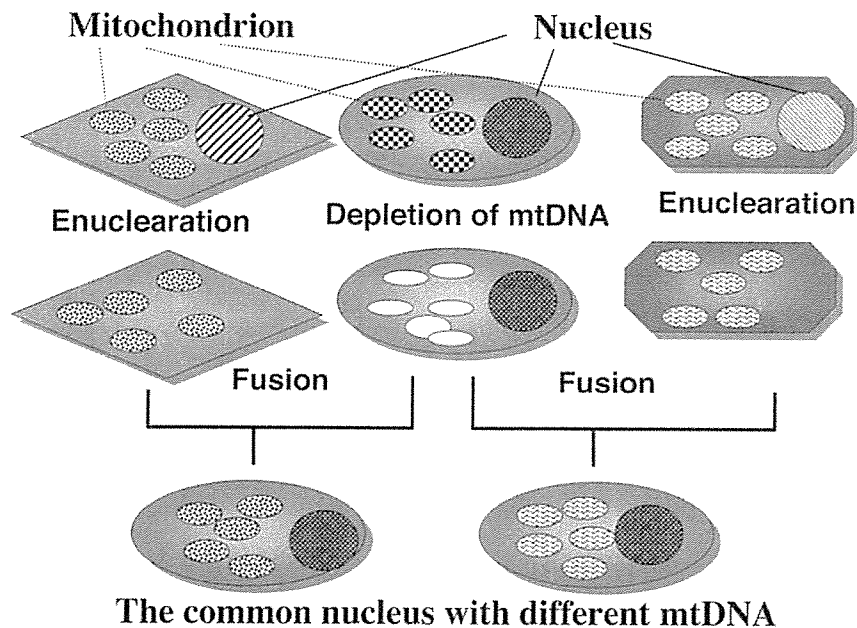


図3 サイブリドの作製法

HeLa細胞からmtDNAを消失した細胞を分離した(中央)。変異mtDNAあるいは正常mtDNAをもつ細胞をサイトカラシンB処理し、遠心することにより脱核する(右と左)。融合することによって、核は共通でmtDNAだけが異なるサイブリドを分離することができる。実際には8-アザグアニン耐性HeLaを用いて、サイブリドを8-アザグアニン存在下で培養してサイブリドを選択する。mtDNAの消失した細胞にもミトコンドリアは存在する。

で病因遺伝子変異であることが証明されたが<sup>10)</sup>、具体的にどのようなメカニズムで異常が発生したかは欠失の場合のように簡単には説明がつかなかった。

MERRF患者由来のtRNA<sup>Lys</sup>遺伝子(A8344G)変異をもつ場合は、正常のポリペプチドよりも短いポリペプチドが観察されたので、翻訳停止によってprematureな蛋白が生じたものと当初考えられた<sup>11)</sup>。しかしながらMELASやMERRFの原因点変異を持つtRNAが具体的にいかんして上記したような異常を引き起こしているかは以前不明であった。

これらの現象を分子レベルで解明するには細胞質のtRNAに比べて存在量が1/100と非常に少ないミトコンドリアtRNAを精製して*in vitro*で解析することが必要であるが、実際に変異tRNAを精製するには技術的に困難で、精製した変異tRNAを用いた解析は長い間行われなかった。

サイブリドは核遺伝子に対するmtDNAの役割を明確にしただけでなく、変異mtDNAの維持を容易にした。例えば患者由来の線維芽細胞が変異mtDNAを持つ場合、SV40遺伝子で形質転換しても細胞分裂寿命がある。しかも我々の用いるHeLa細胞の核をもつサイブリドは細胞寿命がなく無限に増殖させることが可能であるために、大量培養に適している。また、サイブリドを再細胞クローニングすることによって、変異mtDNAと正常mtDNAの比率が様々な細胞株を得ることが可能である。こうして、変異mtDNAに富む細胞株を分離することが容易になり、大量培養も可能になった。また、東大

の渡辺研究室では効率よいtRNAの精製法が確立された<sup>12)</sup>。大量培養された細胞からミトコンドリアtRNAを精製することが可能になったのである。点変異を持つtRNAの異常なふるまいを明解にするには単一に精製された変異tRNAの解析が必須であり、サイブリドの構築とtRNAの精製法の確立により、精製tRNAを用いたtRNA分子解析の前提条件が揃ったのである。

#### 変異tRNAのアンチコドンの塩基修飾の欠損

一般にRNAの塩基配列はTがUに変わっているだけで鋳型DNAの塩基配列と同じはずである。しかし、tRNAの場合は、転写後にも様々な塩基修飾を受け変化する。これらのtRNAの修飾塩基には様々な役割がある。tRNAの3次構造を正しく保つ、各種酵素・因子から正確に認識される、コドンの正確な読み分けなどに必要である。特にアンチコドンの修飾塩基はコドンの正確な読み分けに本質的な役割を果たしているため、変異tRNAが正常に修飾を受けているかを解析するのは病因を探るうえで重要であると考えた。アンチコドンはmRNAと結合する3つの塩基であり、mRNAの翻訳に本質的に重要な領域である。多くの修飾塩基の位置、種類はtRNA遺伝子のDNA配列から予測できない。

そこで著者らは東大工学部の渡辺公綱教授(当時)と共同で、変異tRNAを精製することにした。変異tRNAの機能異常を探るため、変異tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)(A3243G)とtRNA<sup>Leu</sup>(UUR)(T3271C)<sup>13)</sup>、またtRNA<sup>Lys</sup>(A8344G)<sup>14)</sup>をもつサイブリドを大量培養し、それぞれの変異サイブリ

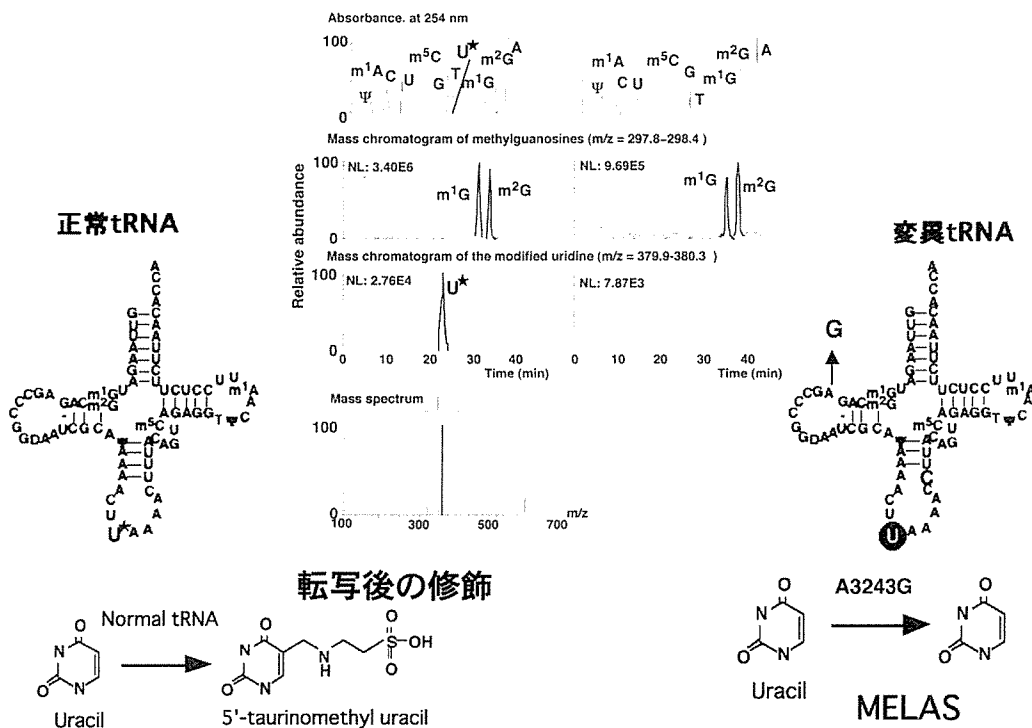


図4 MELAS (A3243G) 変異をもつ変異 tRNA のアンチコドンのタウリン塩基修飾の欠損

正常ヒト tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)と A3243G 変異 tRNA を精製してアンチコドンの解析を行った。中央は TOF-マスペクトルパターン。正常 tRNA には U\* (タウリン修飾 U) が検出されるのに対し、変異 tRNA では U\* が消失している (中央3段目)。一方、m1G (1-メチル G) と m2G (2-メチル G) の修飾は同じ (中央2段目) であるのでタウリン修飾の欠損は特異的である。正常 tRNA では転写後修飾されるのに対し、変異 tRNA では修飾されず U のままとどまる (下図)。(左右の tRNA 図: m1G; 1-methylguanosine, m2G; 2-methylguanosine, D; dihydrouridine,  $\psi$ ; pseudouridine, m5C; 5-methylcytidine, T; ribothymidine m1A 1-methyladenosine U\* はタウリン U 誘導体)。

ドから tRNA を精製した。まず、カラムクロマトにより分画し、最終的には固相化したオリゴヌクレオチドニハイブリダイズさせて効率よく精製した。そして、その一次構造を決定した。RNA 配列解析法である Donis-Keller 法、ポストラベル法や精密質量分析機器 LC/MS を用いた核酸分析により、まず野生型の tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) と tRNA<sup>Lys</sup> の修飾塩基を含む塩基配列を決定した (図4)。すると両方の正常 tRNA のアンチコドンの第一文字の U (ウリジン) は修飾されており、当時未知の修飾塩基であった。ところが、3243、3271、8344 変異をそれぞれ持つ tRNA のアンチコドンの第一文字はいずれも未修飾の U のままで全く修飾されていなかった。他の修飾塩基は変異 tRNA と正常 tRNA の間で違いは認められず、アンチコドンの塩基のみの特異的欠損であった<sup>13,14)</sup> (図4)。同時に、MERRF の 8344 変異を持つサイブリドでは tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) は正常に塩基が修飾されていた。また、3243 変異をヘテロプラズミー状態で持っているサイブリドでは変異 tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) と正常 tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) が混在しており、変異 tRNA のみの塩基修飾が欠損していた。これらの知見は変異 tRNA における修飾欠損が二次的効果ではなく、病因である点変異そのものがアンチコドン修飾酵素の認識を妨げて tRNA 分子内のアンチコドンが変化していることを意味していた<sup>13)</sup>。その後、この修飾塩基にはタウリンが結合している

ことがウシ tRNA の構造解析から明らかとなった<sup>15)</sup>。3243 変異と 3271 変異の MELAS の代表的な点変異を持つ二つの tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) のどちらにおいてもアンチコドン 1 文字目はタウリン修飾が欠損していた (図5)。同一 tRNA 内の異なる位置の点変異により同じ病型を示すのはタウリン修飾の欠損が原因であると示唆された。

#### 患者組織の tRNA の解析

以上のように HeLa 核をもつサイブリド細胞では、tRNA 遺伝子の変異によってタウリン修飾が欠損することが明らかとなった。しかし、mtDNA の挙動はしばしば核の影響をうける。そのため HeLa の核の支配によってタウリン修飾欠損が生じるのではないかという可能性も否定できない。そこで、MERRF、MELAS の患者組織から tRNA を抽出してタウリン修飾が欠損しているかどうかを調べた (東大 鈴木、新潟県犀潟病院福原らとの共同研究)。患者の組織でも、HeLa 以外の核をもつサイブリドでも同じように MELAS、MERRF の原因点変異によってタウリン修飾が欠損することが明らかになった<sup>16)</sup>。以上の結果より、3243 変異、3271 変異、8344 変異によってタウリン修飾が欠損する現象を普遍化することができた。

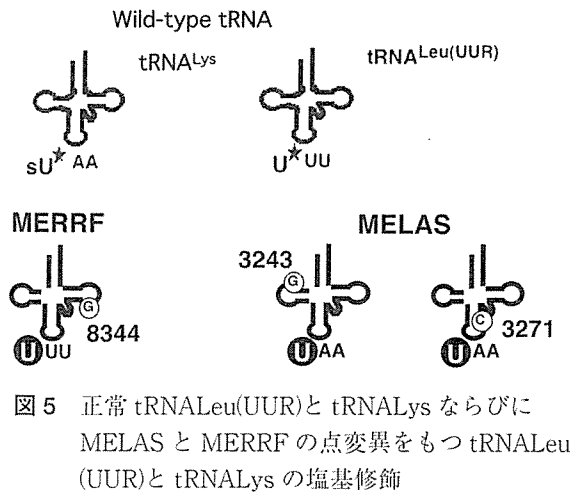


図5 正常 tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)と tRNA<sup>Lys</sup>ならびに MELAS と MERRF の点変異をもつ tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)と tRNA<sup>Lys</sup> の塩基修飾

正常 tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)と tRNA<sup>Lys</sup> のアンチコドンの第一文字の塩基はタウリン修飾され、さらに tRNA<sup>Lys</sup> ではイオウが結合している。MELAS の 3243 変異、3271 変異、MERRF の 8344 変異をもつ tRNA では共通にアンチコドンの一文字目が未修飾である。

アンチコドンの修飾欠損と蛋白質合成停止

一種類の tRNA 分子が数種類のコドンを認識する機構を一般に wobble (ゆらぎ) 塩基対合と呼び、ごく少数の例外を除けば、アンチコドン 1 文字目に様々な修飾塩基を導入することによって、コドン効率よく正確に読み分けている<sup>17)</sup>。ミトコンドリア tRNA はわずか 22 種類である。大腸菌の tRNA が 85 種類もあるのに比べてミトコンドリア tRNA の種類はとて少なく大腸菌のようにひとつのコドンに対して複数の tRNA は存在しない。そのため、ひとつの tRNA 種を別の tRNA 種で補償することができない。そしてミトコンドリアでは 22 種類の tRNA 種で 20 種類のコドンを読むためにアンチコドン 3 文字目に未修飾の U を持つ tRNA が 8 種類存在する。アンチコドンの第 1 文字目の U は、mRNA 側のコドン 3 文字目が A、G、C、U いずれでも対合することになる。一方、コドンの第 3 文字が A か G のものとのみ選択的に対合する tRNA のアンチコドンの第一文字の塩基は修飾されている (tRNA<sup>Leu</sup>(UUR), tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Glu</sup> の 5 種類は U、tRNA<sup>Met</sup>

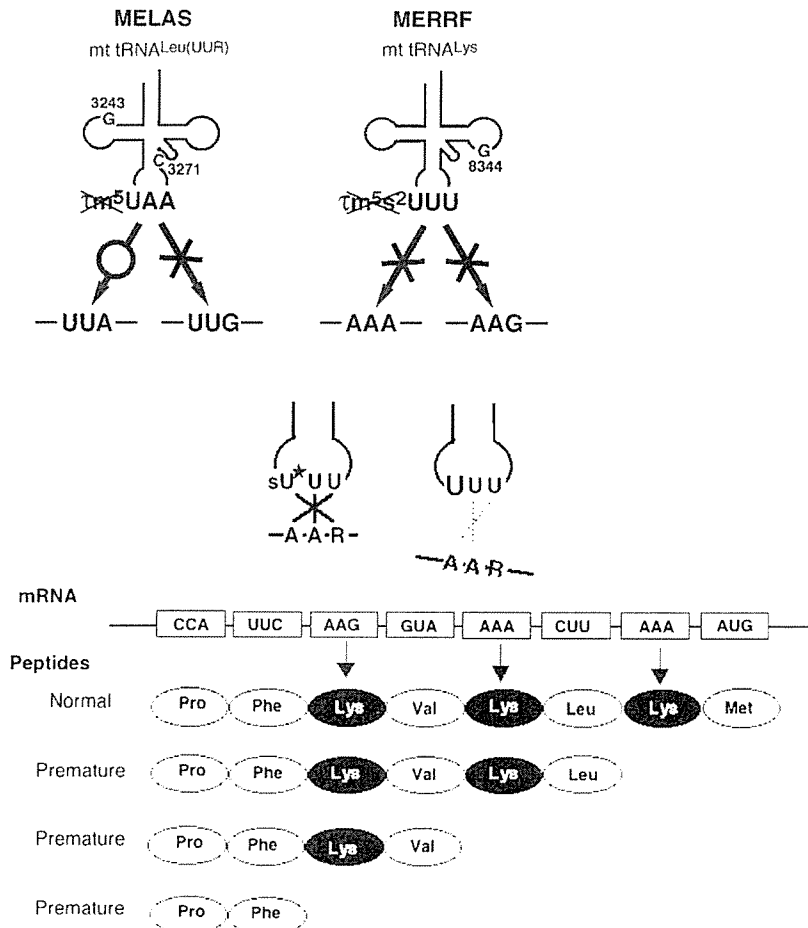


図6 MELAS 変異 tRNA と MEERF 変異 tRNA によるコドンの識別

MELAS 変異 tRNA では mRNA のコドン UUG を読み取ることができず、UUA にも結合する。一方、MERRF 変異 tRNA では AAA と AAG を読みとることができない (上図)。もし、変異 tRNA<sup>Lys</sup> がコドン AAG か AAA のコドンに遭遇すると蛋白質合成はその場で停止して、途中までできた蛋白質 (premature protein) が生成することになる。

はCの誘導体)。これらの塩基認識は、ミトコンドリア wobble ルールとして確立していた<sup>17)</sup>。

そのため、前述のミトコンドリア wobble ルールに従って考えてアンチコドンの第1文字のUが修飾されていない変異 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>や変異 tRNA<sup>Lys</sup>は、mRNA側のコドンの3文字目がAGUCのいずれにも結合してしまつてまちがったアミノ酸を蛋白質合成の際に導入してしまうことが予測された。tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>なら自分のコドンUUA、UUG以外にフェニルアラニンコドンであるUUC、UUUも誤翻訳してしまうことになる。

しかし、さらに研究をすすめると意外にも、変異 tRNAは従来のミトコンドリア wobble 法則には従わないことが判明した<sup>18,19)</sup>。実際にえられた実験結果は、tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>やtRNA<sup>Lys</sup>のアンチコドン3文字目のUの修飾がコドンとの正確で効率のよい対合を保証するために不可欠であるというものであった。変異 tRNA<sup>Lys</sup>ではAAAとAAGのコドンを読み取ることができず、蛋白質合成が停止する。そのため、合成途中の蛋白質が出現することになる(図6)。この結果は premature 蛋白質の出現など従来示唆されていた結果と一致するものであった。

#### 分子整形によるタウリン欠損 tRNA の機能解析

tRNAのタウリン修飾欠損はtRNA機能の消失につながる事が強く示唆されたが、変異 tRNAには変異塩基は存在している。そのため、変異塩基が存在せずに、タウリン修飾だけが欠損している tRNA を用いて tRNA 機能を調べる必要があった。そこで、正常 tRNA のアンチコドン部分だけをタウリン修飾していない合成 RNA と置換した。正常ヒトミトコンドリア tRNA を得るために、ヒト胎盤を用いた。ヒトミトコンドリア tRNA をヒト胎盤より大量に精製して、アンチコドン部を合成 RNA に置換することで、タウリン修飾のみを欠損し、その他は正常 tRNA と全く同一の tRNA を分子整形法によって人工的に作製した。この結果、変異 tRNA の機能不全は変異塩基にあるのではなく、アンチコドンのタウリン修飾の欠損が原因であることが明確になった。さらに tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>にタウリン修飾が欠損した場合には UUA コドンを読み取ることができず、UUG コドンは読みとることができないことが明らかとなった(図6)<sup>19)</sup>。一方、変異 tRNA<sup>Lys</sup>でタウリン修飾を欠損している場合はAAAとAAGの双方を読みとることができない(図6)<sup>18)</sup>。同じタウリン修飾欠損でも、変異 tRNA が読み取る範囲が異なるのは興味深い。

#### タウリンによるミトコンドリア機能回復

変異 tRNA のタウリン修飾欠損は MELAS と MERRF の根本原因なら培養液にタウリンを加えるとサイブリドのミトコンドリア機能が回復するのではないかと考えた。3243変異、3271変異、8344変異をもつ

サイブリド細胞(核は HeLa 細胞でそれぞれの変異 mtDNA をもつように作製した人工細胞)に10mM-60mMのタウリンを加えて1-4日間培養して、ミトコンドリアの機能が回復するかどうかを調べた。ミトコンドリア膜電位は MitotrackerRed の蛍光染色の強度をフローサイトメーターで調べた。酸素消費速度は酸素電極により測定し、ミトコンドリアの形態は共焦点顕微鏡により観察した。ミトコンドリア内タンパク質合成はエメチン存在下でアイソトープメチオニンを取り込ませ、ミトコンドリアを分画後電気泳動によって合成タンパク質を測定した。すると、高濃度タウリン存在下で、MELAS、MERRF の点変異 mtDNA をもつサイブリド細胞では、膜電位、酸素消費速度、形態、ミトコンドリア蛋白質合成速度、いずれも改善した。40mM のタウリン存在下で4日間培養すると、30%程度酸素消費速度が回復した。タウリン添加によって分子量の大きい蛋白質の合成が改善させたので、tRNA の機能が回復したことを示唆する。

しかし、以上の結果は、タウリンが10mM濃度以上の高濃度で効果が見られたので、現実的にタウリンを飲用した時の効果を示すものではない。そこで、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調べた。すると、特に8344変異を持つサイブリド細胞では、MitoTracker の蛍光強度が濃度依存的に増加し、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(図7)。

タウリン合成を抑制した場合には0.3mM程度の低濃度のタウリンでも十分効果があるので、飲用によってミトコンドリア脳筋症の病態改善に有効である可能性がある。どのような条件下でタウリンが有効であるかをさらに明らかにする必要がある。このタウリンの効果は、変異 tRNA にタウリン修飾が回復したためかどうかは現在不明である。別の機構でミトコンドリア機能回復をしている可能性があるが、副作用のないタウリンがミトコンドリア機能回復に一役かってくれば病態改善の方法として利用できる可能性がある。

#### tRNA 機能回復遺伝子の分離

現在の遺伝子工学の技術では変異 mtDNA を正常 mtDNA に置換して変異遺伝子を正常化することはできない。mtDNA を導入できるのは現在酵母だけである。また、例えば正常 mtDNA を導入することができたとしても、ヘテロプラズミー状態になり、変異 mtDNA によって最終的に置き換わってしまいかもしれない。理由は不明だが、正常 mtDNA よりも変異 mtDNA が増加する傾向がある。そこで、現段階では mtDNA を正常化させて根本治療するという考えは成り立たない。

バクテリアや酵母の遺伝学手法では revertant (回復株)あるいは suppressor mutant (抑圧変異株)を分離

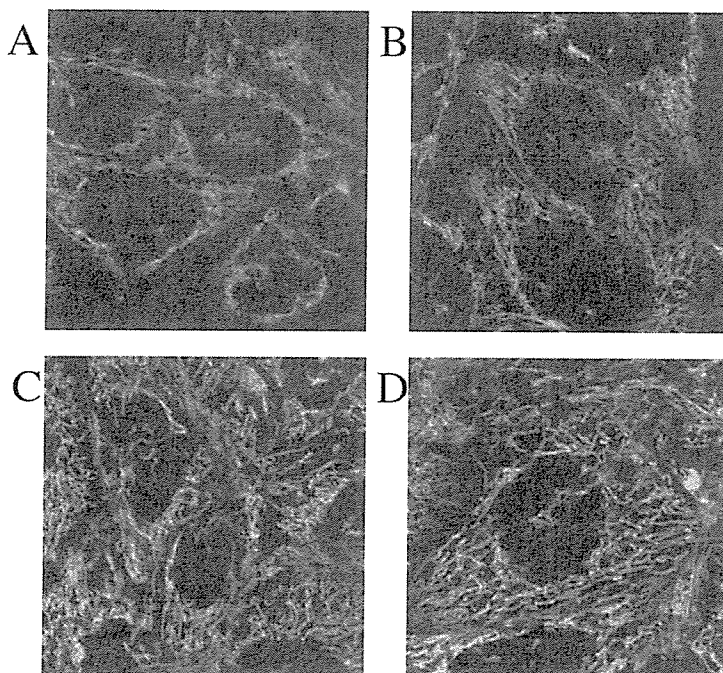


図7 培養液にタウリンを加えたときのMERRFサイブリド細胞のミトコンドリア

MERRF 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。

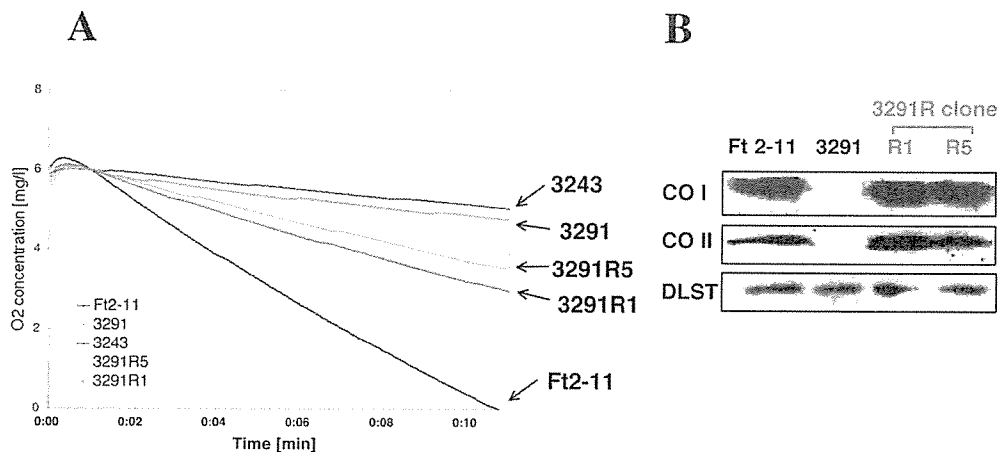


図8 mtDNAに変異を持ちながらミトコンドリア機能回復しているサイブリド株の分離

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
-