

## 28. 修飾ヌクレオシドによる情報伝達機構と病態への関与

魏 范研

\*熊本大学 大学院生命科学研究部 分子生理学分野

Key words : RNA, 化学修飾, ミトコンドリア

### 緒 言

近年、RNA を構成するヌクレオシドに豊富な化学修飾が見出され、これら修飾ヌクレオシドは RNA の構造的安定性や RNA の局在を制御し、RNA に質的な情報を付加する [1]。RNA のうち、特に豊富に化学修飾を含む RNA はトランスファー-RNA (tRNA) である。これまでに 100 種類以上の RNA 修飾が発見され、その 8 割以上が tRNA に見出されている [2]。また、一部の tRNA 修飾については、修飾の破綻がタンパク質翻訳を障害し、2 型糖尿病や神経疾患につながることから、tRNA 修飾が生体高次機能に必要不可欠であることが明らかになってきた [3]。細胞内に存在するほとんどの RNA は核 DNA に由来するが、一部の RNA はミトコンドリア DNA から転写され、ミトコンドリアの中だけで機能する。ミトコンドリア DNA は、22 種の tRNA、13 種の mRNA と 2 種類の rRNA をコードし、これらの RNA 群から 13 種類のミトコンドリアタンパク質が翻訳される。翻訳されるタンパク質はすべての呼吸鎖複合体の一部として機能するため、ミトコンドリアでのタンパク質翻訳は電子伝達系の活性を維持し、エネルギー代謝に必要不可欠である。そのため、ミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳障害は、生体エネルギー代謝の低下を引き起こし、がんなど様々な疾患の発症につながる。

ミトコンドリア機能低下により発症する疾患のうち、最も重篤な疾患の一つはミトコンドリア病である。ミトコンドリア病は、脳、心臓や骨格筋などミトコンドリアが豊富に存在する臓器が機能不全に陥る難治性疾患である。ミトコンドリア病患者のうち、多くの患者においてミトコンドリア DNA の点変異が認められている。また、これらミトコンドリア DNA の点変異のうち、最も頻度が高い変異は mt-tRNA<sup>Leu</sup> をコードする DNA 領域に存在する A3243G 変異である。しかし、なぜ A3243G がミトコンドリア機能障害を引き起こすかについては、これまでにその分子機序が不明であった。唯一分かっていたのは、A3243G 変異を有する mt-tRNA<sup>Leu</sup> において、アンチコドンに存在するタウリンが消失することである [4]。しかし、タウリン修飾の分子機能やタウリン修飾欠損によるミトコンドリア障害の分子機構が不明であった。本研究は、タウリン修飾酵素 *Mto1* に着目し、*Mto1* 欠損マウスを用いてミトコンドリア mt-tRNA の修飾ヌクレオシドであるタウリン修飾の分子機能を解明することを目的とした [5]。

### 方 法

全身性 *Mto1* 欠損マウスおよび心臓特異的 *Mto1* 欠損マウスを作製した。欠損マウスの各組織から RNA を抽出し、質量分析法でタウリン修飾を測定した。ミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳を検討するために、全身性 *Mto1* 欠損マウスの胚から ES 細胞を作製し、Cyclohexylamine 存在下で <sup>35</sup>S-メチオニンを ES 細胞に添加し、ミトコンドリア内におけるタンパク質翻訳を解析した。ミトコンドリアの形態については、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

## 結果および考察

### 1. *Mto1* によるタウリン修飾はミトコンドリア翻訳と好気呼吸に必要な不可欠である

本研究は、まず *Mto1* 欠損マウスの表現系解析を行ない、タウリン修飾の分子機能を検討した。胎生 8 日目の胎児マウスを摘出して解析したところ、*Mto1* 欠損マウス胎児は、胎生 8 日目より前に発生が止まり、胎児の大きさが野生型マウス胎児と比べて半分以下であった (図 1A)。次に、*Mto1* 欠損マウスの受精卵から ES 細胞を作製し、mt-tRNA のタウリン修飾とミトコンドリアタンパク質翻訳を検討した。*Mto1* 欠損細胞由来の mt-tRNA ではタウリン修飾が完全に消失し、ミトコンドリアタンパク質翻訳も著しく低下していた (図 1B-C)。ミトコンドリアでの翻訳されるタンパク質はすべて呼吸鎖複合体に取り込まれ、複合体の一部として機能するため、タンパク質翻訳の低下がミトコンドリアの呼吸鎖複合体の形成と活性に大きく影響する可能性が考えられた。そこで、*Mto1* 欠損 ES 細胞と野生型 ES 細胞からミトコンドリアを単離し、呼吸鎖複合体を解析した。*Mto1* 欠損 ES 細胞では、呼吸鎖複合体の形成が顕著に障害され、また、複合体 I から複合体 IV の活性も低下していた (図 1D)。呼吸鎖複合体での電子伝達異常により、*Mto1* 欠損 ES 細胞ではミトコンドリアの膜電位が低下し、乳酸産生の亢進などミトコンドリア代謝異常が認められた。

ES 細胞は未分化細胞であり、ミトコンドリア機能も未発達である可能性が高い。分化した細胞における *Mto1* の分子機能を解析するために、心臓特異的 *Mto1* 欠損マウスを作製した。心臓特異的 *Mto1* 欠損マウスは、出生直後に死亡した (図 1E)。死亡する前に心臓を摘出し、質量分析によるタウリン修飾分析とウェスタンブロットによるミトコンドリアタンパク量を検討した。心臓特異的 *Mto1* 欠損マウスの心筋において、mt-tRNA のタウリン修飾が消失し、ミトコンドリアで翻訳される MT-COI のタンパク量も著しく低下していたこと (図 1F)。

以上のことから、*Mto1* によるタウリン修飾は、ミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳を制御し、ミトコンドリアの代謝機能に必要な不可欠であることが示された。

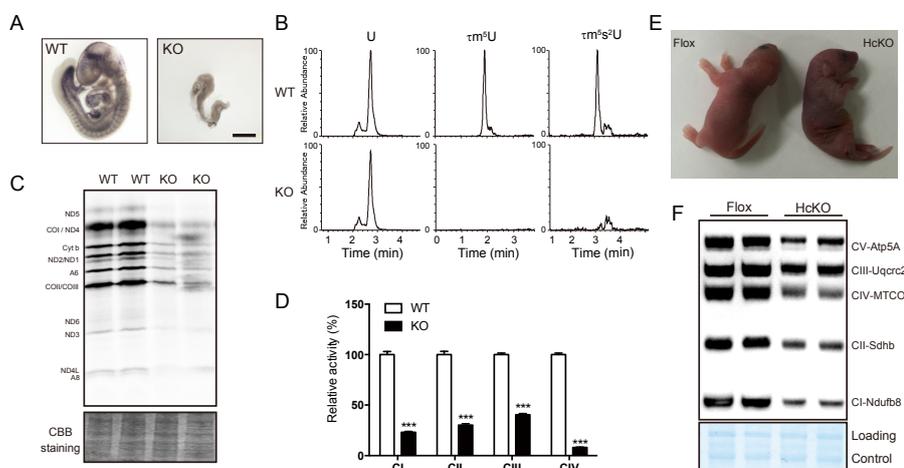


図 1. *Mto1* 欠損マウスの表現型解析

- (A) 胎生 8 日目の野生型マウス胎児 (WT) と全身型 *Mto1* 欠損マウス胎児 (KO) の外見。スケールバーは 0.5 mm を示す。
- (B) 野生型 ES 細胞の mt-tRNA にタウリン修飾 ( $\tau m^5U$  と  $\tau m^5s^2U$ ) が存在するが、*Mto1* 欠損 ES 細胞ではタウリン修飾が消失した。
- (C) ミトコンドリアタンパク質における  $^{35}S$ -メチオニンの取り込みを示す。*Mto1* 欠損 ES 細胞では取り込みが著しく低下し、ミトコンドリアタンパク質翻訳が低下した。
- (D) *Mto1* 欠損 ES 細胞の呼吸鎖複合体 I-IV の活性が野生型細胞と比べて有意に低下していた。統計処理は Student's t-test を用い、\*\*\*は  $P < 0.001$  を示す。
- (E) 出生直後の心臓特異的 *Mto1* 欠損マウス (HckO) と野生型マウス (Flox) の外見を示す。
- (F) 心臓特異的 *Mto1* 欠損マウスのミトコンドリアでは、MT-COI などミトコンドリア呼吸鎖複合体タンパク質の量が野生型マウスと比べて顕著に低下していた。

## 2. タウリン修飾欠損によるミトコンドリア膜の形態異常とタンパク質の品質低下

ミトコンドリア呼吸鎖複合体がミトコンドリア内膜に密集することは以前から知られている。ミトコンドリアの密度が効率的な電子伝達に必要であるのみならず、ミトコンドリアの膜構造維持に必要であることが最近明らかになってきた。タウリン修飾欠損による著しい呼吸鎖障害がミトコンドリアの膜形態に大きく影響する可能性があるため、本研究は電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの膜構造を観察した。野生型細胞では、ミトコンドリアの内膜が細長く形をしており、また規則正しく並んでいたが、*Mto1* 欠損 ES 細胞や *Mto1* 欠損心筋では、ミトコンドリアの内膜構造が短く断片化され、膜構造が激しく破壊されていた。

ミトコンドリアに局在するタンパク質は、ミトコンドリア内で翻訳される 13 種類のタンパク質と、核 DNA に由来し、細胞質で翻訳されてミトコンドリアの膜内に輸送される千種類以上のタンパク質によって構成される。*Mto1* 欠損 ES 細胞では翻訳障害によりミトコンドリア膜が破壊されていたことから、これら細胞質に由来するミトコンドリアタンパク質が正しく輸送されない可能性が考えられた。実際、ミトコンドリアの外膜と内膜に局在する細胞質由来のミトコンドリアタンパク質を解析したところ、*Mto1* 欠損 ES 細胞では、ミトコンドリア内膜に局在するタンパク質が著しく低下していた。ミトコンドリアに局在するタンパク質は一般的に疎水性が強く、凝集しやすい性質がある。そこで、タンパク質の凝集体を蛍光染色すると、*Mto1* 欠損 ES 細胞においてタンパク質凝集体が多数観察された。また、*Mto1* 欠損 ES 細胞では *Chop* や *Xbp1* などに代表される小胞体ストレス遺伝子の発現が亢進していた。さらに、タンパク質凝集体の蓄積を抑制するため、Chemical Chaperon である TUDCA を *Mto1* 欠損細胞に投与したところ、TUDCA が凝集体の蓄積を解消し、小胞体ストレス遺伝子の発現が顕著に抑制された。さらに、TUDCA の投与により、*Mto1* 欠損細胞の増殖能が改善された。

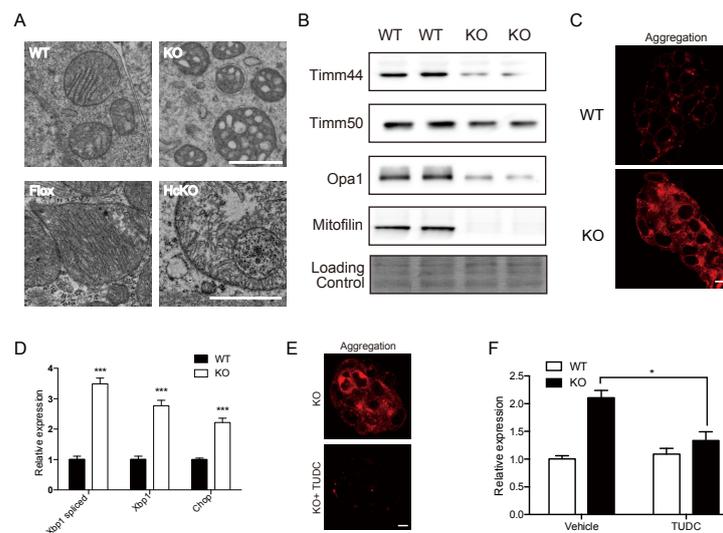


図 1. *Mto1* 欠損細胞におけるミトコンドリア膜構造異常とタンパク質の品質低下

- (A) 野生型細胞 (WT) と *Mto1* 欠損細胞 (KO)、野生型心筋 (Flox) と心臓特異的 *Mto1* 欠損マウスの心筋 (HcKO) におけるミトコンドリアの電子顕微鏡像を示す。スケールバーは  $1\mu\text{m}$  を示す。
- (B) 野生型細胞と比べて、*Mto1* 欠損 ES 細胞のミトコンドリアでは、内膜に局在するタンパク質の量が低下した。
- (C) 細胞内のタンパク質凝集体の蛍光染色像を示す。*Mto1* 欠損 ES 細胞ではタンパク質凝集体が蓄積していた。スケールバーは  $10\mu\text{m}$  を示す。
- (D) *Mto1* 欠損 ES 細胞における小胞体ストレス遺伝子の発現量が野生型細胞と比べて有意に亢進していた。統計処理は Student's t-test を用い、\*\*\*は  $P < 0.001$  を示す。
- (E) 細胞内のタンパク質凝集体の蛍光染色像を示す。TUDCA は *Mto1* 欠損 ES 細胞内のタンパク質凝集体を除去した。スケールバーは  $10\mu\text{m}$  を示す。
- (F) TUDCA は *Mto1* 欠損 ES 細胞における小胞体ストレス遺伝子 *Chop* の発現量を抑制した。統計処理は Student's t-test を用い、\*は  $P < 0.05$  を示す。

以上のことから、タウリン修飾は、ミトコンドリアタンパク質翻訳を介してミトコンドリアの膜構造やミトコンドリア外におけるタンパク質の品質維持にも影響することが示された。

### 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学講座の富澤一仁教授、東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻の鈴木勉教授と鈴木健夫講師である。

### 文 献

- 1) Frye M, Jaffrey SR, Pan T, Rechavi G, Suzuki T. RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat Rev Genet.* 2016 Jun;17(6):365-72. doi: 10.1038/nrg.2016.47. Epub 2016 May 3. Review. PubMed PMID: 27140282.
- 2) Machnicka MA, Milanowska K, Osman Oglou O, Purta E, Kurkowska M, Olchowik A, Januszewski W, Kalinowski S, Dunin-Horkawicz S, Rother KM, Helm M, Bujnicki JM, Grosjean H. MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D262-7. doi: 10.1093/nar/gks1007. Epub 2012 Oct 30. PubMed PMID: 23118484; PubMed Central PMCID: PMC3531130.
- 3) Wei FY, Tomizawa K. tRNA modifications and islet function. *Diabetes Obes Metab.* 2018 Sep;20 Suppl 2:20-27. doi: 10.1111/dom.13405. Review. PubMed PMID: 30230180.
- 4) Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, Ohta S, Watanabe K. Wobble modification defective tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J.* 2001 Sep 3;20(17):4794-802. PubMed PMID: 11532943; PubMed Central PMCID: PMC125593.
- 5) Fakruddin M, Wei FY, Suzuki T, Asano K, Kaieda T, Omori A, Izumi R, Fujimura A, Kaitsuka T, Miyata K, Araki K, Oike Y, Scorrano L, Suzuki T, Tomizawa K. Defective Mitochondrial tRNA Taurine Modification Activates Global Proteostress and Leads to Mitochondrial Disease. *Cell Rep.* 2018 Jan 9;22(2):482-496. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.051. PubMed PMID: 29320742.
- 6) Asano K, Suzuki T, Saito A, Wei FY, Ikeuchi Y, Numata T, Tanaka R, Yamane Y, Yamamoto T, Goto T, Kishita Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, Tomizawa K, Sakaguchi Y, Suzuki T. Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease. *Nucleic Acids Res.* 2018 Feb 28;46(4):1565-1583. doi: 10.1093/nar/gky068. PubMed PMID: 29390138; PubMed Central PMCID: PMC5829720.