REGULAR PAPER

ESI/Iontrap MS を用いた微量修飾ヌクレオシドの解析

High Sensitive Analysis of Modified Nucleosides by LC/MS
Using ESI/Iontrap Mass Spectrometry鈴木 勉^{*a)}・鈴木健夫^{a)}・上田卓也^{a), b)}・渡辺公綱^{a)}

Tsutomu SUZUKI, Takeo SUZUKI, Takuya UEDA, and Kimitsuna WATANABE

(Received November 5, 1998; Accepted February 4, 1999)

It has been known that RNA has a lot of modified nucleosides which are post-transcriptionally introduced by specific enzymes. Modified nucleosides play an important role in the RNA function. In the case of transfer RNA, modified uridine at the first letter of anticodon is thought to participate in the selection of cognate codon so as to ensure the accurate translation. In this report, we tried to detect unknown species of modified uridine from bovine mitochondrial tRNAs by ESI/iontrap mass spectrometer with a new method for derivatizing the modified uridines with CMC [*N*-cyclohexyl-*N'*-*b*-(4-methylmorpholinium)ethylcarbodiimide].

1. 緒 言

転移 RNA (tRNA) やリボソーム RNA (rRNA) には、修飾されたヌクレオシドが多く含まれることは古くから知られているが、その機能については未知な部分が多く、RNA の機能発現における修飾塩基の役割を解明することは今なお残された課題の一つである。近年、リボソーム RNA はペプチド転移反応を触媒する上で中心的な役割を担うことが一般的に認められつつあるが、特にペプチド転移反応に関与する領域 (peptidyltransferase center) にプソイドウリジン (ϕ) というウリジンの誘導体が、集中的に存在することが知られており、何らかの触媒機能に関与しているのではないかとされている¹⁾。また、同じ領域に存在する 2'-O-メチルグアノシン (Gm) の修飾酵素の欠如によってリボソームの機能が失われるという報告²⁾もあり、RNA が転写後に修飾を受けることによって初めて本来の機能を発揮できると考えられる。また一方、tRNA には多種多様な修飾ヌクレオシドの存在が知られており、現在までに 100 種類程度のものが同定されており³⁾、さらにまだ未同定なヌクレオシドも数多く存在することが予想される。tRNA はリボソーム上で mRNA に記されたコドンと正しく認識し、遺伝暗号に従ってアミノ酸を重合させる役割を担っている。この際、tRNA のアンチコドン 1 文字目に存在する

修飾ヌクレオシドはコドンと正しく翻訳するために中心的な役割を担うことが知られており、この位置のヌクレオシドを同定することは遺伝暗号の解読機構を明らかにするための重要な手段である。細胞由来の微量な修飾ヌクレオシドの同定と構造解析には、LC/MS による分析が最も一般的であり、既知のものについては HPLC の保持時間、 m/z 値、フラグメントイオンのパターンから確実かつ迅速に同定することが可能である⁴⁾。

細胞内小器官であるミトコンドリアは核とは独立した遺伝子翻訳機構を有し、特に動物のミトコンドリアでは 22 種類という非常に少ない tRNA と鎖長の短い 2 種類のためのリボソーム RNA をもつため、最も原始的な翻訳装置であると考えられる。蛋白合成という生物固有の反応における共通原理を見いだすために、我々は哺乳動物ミトコンドリアの翻訳系に着目し、特に RNA 中の修飾ヌクレオシドが果たす役割について研究している。基本的にミトコンドリアの翻訳系において、4 種類のコドンが単一のアミノ酸に対応する 4 コドンボックス (XXN, N は A, U, G, C) は、アンチコドン 1 文字目に未修飾のウリジン (U) をもつ 1 種類の tRNA によって解読される (Fig. 1)。未修飾のウリジンは A, G, C, U のどの塩基とも対合できるので、ミトコンドリアではこのようにアンチコドン 1 文字目に未修飾の U を使うことで tRNA の数を減らしていると考えられる (4 way wobble rule)⁵⁾。ところが、コドン 3 文字目にプリン塩基 (A, G) をもつ 2 コドンボックス (XXR, R はプリン) を翻訳する tRNA では、そのアンチコドン 1 文字目は基本的に修飾されたウリジン (U*) をもつことが必須であり、この修飾によってコドン 3 文字目にピリミジン (U, C) をもつコドン (XXY, Y はピリミジン) の誤認識を避ける仕組みを獲得していると考えられている (Fig. 1)⁶⁾。哺乳動物ミトコンドリアの場合、コドン 3 文字目にプリン塩基

*a) 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)

Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo (7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan)

b) 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)

Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo (7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan)

Fig. 1. Decoding property of uridine derivatives at first letter of anticodon.

amino acid	codon	anti-codon	amino acid	codon	anti-codon	amino acid	codon	anti-codon	amino acid	codon	anti-codon
Phe	UUU	GAA	UCU	Tyr	UAU	G*UA	Cys	UGU	(GCA)		
	UUC		UCC		UAC			UGC			
Leu	UUA	U*AA	UCA	stop	UAA		Trp	UGA	U*CA		
	UUG		UCG		UAG			UGG			
	CUU		CCU	His	CAU	G*UG		CGU			
Leu	CUC		CCC		CAC		Arg	CGC	UCG		
	CUA	UAG	CCA	Gln	CAA	U*UG		CGA			
	CUG		CCG		CAG			CGG			
Ile	AUU	GAU	ACU	Asn	AAU	(GUU)	Ser	AGU	GCU		
	AUC		ACC		AAC			AGC			
Met	AUA	C*AA	ACA	Lys	AAA	U*UU	stop	AGA			
	AUG		ACG		AAG			AGG			
	GUU		GCU	Asp	GAU	G*UC		GGU			
Val	GUC	UAC	GCC	Glu	GAC	U*UC	Gly	GGC	UCC		
	GUA		GCA		GAA			GGA			
	GUG		GCG		GAG			GGG			

C* = 5-formyl cytidine

Fig. 2. Decoding system in animal mitochondria. Two codon boxes corresponding to XXR codon are shaded. Estimated anticodons from the gene sequences are parenthesized.

(A, G) をもつ XXR ボックスは全部で 6 カ所存在し (Fig. 2), tRNA 遺伝子の配列からアンチコドン 1 文字目の塩基はメチオニン (Met) のみシチジンであり, 残りの 5 種類についてはすべてウリジンであることがわかっているが, これらはすべて転写後に修飾されていることが予想される。そのうち AUA コドンであるメチオニン (Met) については, 例外的に修飾されたシチジン (5-formyl cytidine, f5C) によって二つのコドンが翻訳されることが, 我々の研究ですでに明らかになっている⁷⁾。今回はいまだ解析の進んでいない, XXR ボックスであるグルタミン (Gln), リジン (Lys), グルタミン酸 (Glu), トリプトファン (Trp), ロイシン (Leu) に対応する 5 種類の tRNA に注目した。本稿では精製したこれらの tRNA からアンチコドン 1 文字目に存在する未同定修飾ウリジンを検出した経緯について紹介する。

2. 実験

2.1 ミトコンドリア tRNA の精製

牛肝臓 1 kg から定法⁸⁾に従って約 1 g の tRNA 粗画分

を得た。目的の tRNA を濃縮するため DEAE sepharose fast flow (3.5 cm i.d.×150 cm) にロードし, 緩衝液 A (250 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 8 mM MgCl₂) と緩衝液 B (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 16 mM MgCl₂) の直線グラジエントにより, 430 本のフラクションに分けて回収した。ドットハイブリダイゼーション法⁹⁾により目的の tRNA を多く含む画分を確認し回収した。各 tRNA は固相化 DNA プローブ法^{10, 11)}により, 濃縮した画分から 1 ステップで単離した。なお, 用いたプローブの配列は以下のとおりである。最終的に単離した tRNA は変性ポリアクリルアミドゲルにより精製し, LC/MS 用のサンプルとした。

tRNA^{Glu} 5'-CTAGAACTATAGGAATCGAACCTACTCTA-biotin-3'

tRNA^{Lys} 5'-TCACCAAGGAGAGTATATGGCTCTCAATCT-biotin-3'

tRNA^{Glu} 5'-TATTCTTACATGGAATCTAACCATGACTAA-biotin-3'

tRNA^{Trp} 5'-CAGGAATTAAGTAAATTGTACTTGCTTAGG-biotin-3'

tRNA^{Leu} 5'-TGTTAAGGAGAGGATTTGAATCTCTGATA-biotin-3'

2.2 ポストラベル法による修飾塩基の分析

基本的に口野らによって開発された手法¹²⁾に基づいて行った。精製された tRNA 約 0.5 μg を 10 μl の dH₂O に溶かし, 95°C で 30 秒加熱することで, RNA 鎖を部分的に切断した (分子内で 1 カ所以下になるように切断)。[³²P] ATP と T4 polynucleotide kinase を用い, 切断された RNA の 3' 側断片の 5' 末端に [³²P] リン酸を導入し標識した。15% 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で, 標識された鎖長の異なる RNA 断片を分離した (1 塩基差のラダーができる)。各断片をゲルから抽出後, スクレアゼ P1 で完全消化した。消化物を二次元 TLC で展開することで, 標識された各断片の 5' 末端ヌクレオチドを同定した。なお, TLC の展開系は以下に示す 2 種類の系を用い, 5' モノリン酸ヌクレオチド (AMP, GMP, UMP, CMP) をマーカーとして用いた。既知の修飾ヌクレオチドはマーカーとの相対的移動度から同定することができる。

「系 1」 (1 次元目) イソ酪酸: 濃アンモニア: 水 (66:1:33)

(2 次元目) イソプロパノール: 塩酸: 水 (70:15:15)

「系 2」 (1 次元目) イソ酪酸: 濃アンモニア: 水 (66:1:33)

(2 次元目) 0.1 M リン酸ナトリウム (pH 6.8) 100 ml + 硫酸 60 g + n-プロパノール 2 ml

2.3 ヌクレオシドの CMC 化

精製した tRNA (2.5~5 μg) またはヌクレオシド (5 nmol) を 50 μl の 20 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) に溶かし, 直前に DMF に溶解した CMC [N-シクロヘキシル-N'-β-(4-メチルモルフォリニウム) エチルカルボジイ

ミド] *p*-トルエンスルホン酸塩を 50 nmol 加え、遮光して室温で一晩反応させた。ヌクレオシドの場合は 1% ギ酸を等量加えて反応を止めて、LC/MS 用のサンプルとした。tRNA の場合は共沈剤としてグリコーゲンを加え、エタノール沈殿で tRNA を回収した。70% エタノールで沈殿をリンスした後、乾燥させ、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解しヌクレアーゼ P1 (0.3 μ g) とアルカリホスファターゼ (0.18 unit) を加え、37°C で 1 時間消化した。消化後 1% ギ酸を等量加えて LC/MS で分析した。

2.4 HPLC の分離条件

ポンプはスペクトラシステム P4000 (Thermo Separation Products), 検出器にはスペクトラシステム UV2000 (Thermo Separation Products) を用いた。カラムには GL サイエンス社製 ODS3 (2.1 mm i.d.×250 mm, 粒径 5 μ m, 100 Å pore) を採用し、カートリッジ式のプレカラム (3 mm i.d.×20 mm) を用いた。分離の諸条件は以下に示すとおりである。

検出波長: 260 nm

流速: 200 μ l/min

Fig. 3. Mass chromatograms of nucleosides from *Candida* tRNA^{Leu}. It has been known that 6-methylguanosine (m6A) is produced from m1A by methyl transfer reaction during the preparation.

移動相: A 液 5% メタノール水溶液

B 液 100% メタノール

溶離条件: 0 min; A 液 100%, B 液 0%

60 min; A 液 74%, B 液 26%

2.5 LC/MS の測定条件

質量分析計には ESI を装備したイオントラップ型質量分析計 LCQ (Thermo Quest, San Jose, CA, USA) を用いた。なお測定の諸条件は以下のとおりである。

キャピラリー温度: 260°C

キャピラリー電圧: 3 V

シースガス (窒素): 75 arb

スプレー電圧: 4.25 kV

測定範囲: m/z 103~750

3. 結果および考察

3.1 エレクトロスプレーイオン化 (ESI) におけるヌクレオシドの検出感度について

ESI によるイオン化法ではヌクレオシドの pK_a と $(M+H)^+$ イオンの検出感度により相関関係があることがすでに指摘されており¹³⁾、実際 pK_a の最も高いシチジンと最も低いウリジンの間には約 100 倍の検出感度の差が観測されている。したがって tRNA 一分子に一つだけ存在する U^* を検出するためには多量のサンプルが必要であり、ミトコンドリア由来の微量なサンプルを ESI で解析するのは非常に困難であることが予想された。Fig. 3 は一例とし

てアンチコドン 1 文字目に既知の U^* である ncm5Um (5-carbamoylmethyl-2'-O-methyluridine) を有する *Candida* 酵母由来の tRNA (Fig. 4) を LC/MS で解析した結果であるが、まず、ウリジンの検出感度が他のヌクレオシド (C, A, G) と比較して極端に低いことに気づく。さらにアンチコドン 1 文字目の ncm5Um は検出が非常に困難であり、イオン化の際に分解した塩基部分のフラグメントイオンがかろうじて観測されている。この場合 U^* がすでに同定されているために検出できるのであって、未知の U^* では検出することは不可能であると思われる。一方、m1A (1-methyl-adenosine) と m6A (6-methyl-adenosine) は非常に感度よく検出されていることから、検出感度はイオン化の効率に大きく影響されていることが理解できる。したがって通常の測定では、 U^* の検出は不可能であると考え、検出感度を上げる試みを開始した。

3.2 ウリジン誘導体特異的標識と高感度化の検討

縮合剤の一種である CMC [*N*-シクロヘキシル-*N'*-(2-モルフォリノエチル)カルボジイミド] は古くから核酸の修飾剤として知られている¹⁴⁾ が、Fig. 5 のようにウリジンの 3 位とグアノシンの 1 位に可逆的に反応し誘導体を形成する。アンチコドン 1 文字目に存在する U^* はコドンと対合するため、水素結合に直接関与する 3 位が修飾されている可能性はない。(実際報告されているアンチコドン 1 文字目の U^* はすべて 3 位がフリーである。) したがって理論的には、すべての U^* が CMC 化されると考えられる。また、

Fig. 4. Primary sequence of *Candida* tRNA^{Leu} and structures of modified nucleosides.

Fig. 5. Derivatization of uridine and guanosine with CMC.

Fig. 6. Mass chromatograms of CMC-uridine and uridine.

CMC は分子内に安定なプラスチャージをもつため、CMC 誘導体化物は高感度に検出することが期待される。Fig. 6 は 100 pmol のウリジンと CMC 化したウリジンを LC/

MS で分析しその検出感度を比較したものであるが、この条件ではウリジンのプロトンアダクトは検出が困難であるのに比べ CMC-U は非常に高い感度で検出された。また修

飾ウリジンである pseudouridine (ψ) と 5-methyluridine (m5U) (Fig. 7) についても、同様の検討を行ったところ、いずれも検出感度の上昇が確認された。CMC 化はグアノシンよりもウリジンの方が反応効率が高いため、ウリジン誘導体を特に感度よく検出することが可能である。さらに反応効率に及ぼす pH の影響を調べたところ、ウリジンとその誘導体に関しては pH 9 付近が最も効率がよく、グアノシンに対しては pH 8 付近が至適条件であるため、pH 9.5~10 で反応を行うことでウリジンとその誘導体のみを特異的に標識することも可能であることがわかった。Fig. 8 には例として、4 種の U*, ψ (pseudouridine), m5U (5-methyluridine), ncm5Um (5-carbamoylmethyl-2'-O-methyluridine), cmnm5U (5-carboxymethylaminomethyluridine), とおよび、グアノシンの CMC 誘導体化物のマ

Fig. 7. Chemical structure of modified uridines.

ススペクトルを示した。CMC 誘導体化物は $M+252$ として観測されるが、イオン化の際にメチルホルホルン (101) がはずれたイオン ($M+252-101$) と CMC (252) がフラグメントイオンとして同時に観測されるという特徴をもつ (Fig. 5)。また、in source CID や MS/MS によって積極的にフラグメンテーションを起こすことにより、糖 (132) の部分がはずれたイオンなどが検出されることから CMC は塩基部分に結合していることが確認された。CMC 化の反応の際の過剰な CMC はすべて水が付加した尿素型 (270) に変換されるため、 m/z 252 でマスキンググラムをとることで CMC 誘導体化物のみを特異的に検出することができる。したがってこの方法は単なる高感度化のみならず、ウリジンの誘導体のみを特異的に標識する目的としても使用できる。Fig. 9 は *Candida* 酵母の tRNA を CMC 化した分析例であるが、 m/z 252 のマスキンググラムをみると主に 4 本のピークが観測された。これらの CMC 誘導体化物はそれぞれ CMC- ψ , CMC-U, CMC-G, CMC-ncm5Um と帰属することができた。Fig. 4 の配列から CMC 化される可能性のあるヌクレオシドはほかに m2G, m22G があるが、この反応条件では検出されなかったことからウリジン誘導体を特異的に標識することが可能であることが示された。

3.3 ミトコンドリア tRNA の解析

一般にミトコンドリア tRNA は存在量が少なく、かつては単一の標品を得るのにたいへんな労力と時間を費やしたが、我々が開発した塩基配列特異的に tRNA を単離精製する方法 (固相化プローブ法)^{10), 11)} を用いることで、メチオ

Fig. 8. Mass spectra of CMC adducts.

Fig. 9. Mass chromatograms of nucleosides from *Candida* tRNA^{Leu} treated with CMC. Peaks derived from CMC adducts are indicated by arrow heads.

ニンを除く XXR ボックスに対応する 5 種の tRNA を牛肝臓から微量ながらも単離精製することに成功した。精製した各 tRNA は、まず [³²P] リン酸標識を用いるポストラベル法で塩基配列の確認と修飾塩基の同定を行った。2 次元 TLC のマッピングから、5 種類の tRNA はすべてアンチコドン 1 文字目に共通の U*をもつことが明らかになった (Fig. 10)。次に CMC 化したロイシン tRNA を LC/MS で解析したところ (Fig. 11a), m/z 252 のマス chromatogram から 5 本のピークが観測され、そのうち 4 本は CMC- ϕ , CMC-U, CMC-G, CMC-m2G であることがわかったが、保持時間 8.96 min に溶出する CMC 誘導体化合物は m/z 633.41 であるため、分子量 381.2 のヌクレオシドであると考えられるが既知のヌクレオシドとは一致しないことから新規の修飾ヌクレオシドであると考えられる。Fig.

11b にそのマスペクトルを示したが、他の CMC 誘導体化合物同様にメチルホルホルンがはずれた -101 のイオンと CMC が同時に観測されている。他の 4 種類の tRNA から同一の CMC 誘導体化合物が観測されたことから、このヌクレオシドはミトコンドリア tRNA に共通なアンチコドン 1 文字目に存在する未知の U*であると考えられる。今後は、TMS 化や重水素置換などの他の誘導体化をはじめ、MS/MS や精密 MS の測定、さらには NMR による解析などから構造決定を行う予定である。

4. ま と め

ウリジン誘導体を感度よく検出するために、サーモスプレーイオン化 (TSI) 法や大気圧化学イオン化 (APCI) 法など、他のイオン化法を検討することも選択肢の一つである

Fig. 10. Two dimensional TLC analyzing U* at the first letter of anticodon from mitochondria tRNA^{Leu} by 2 solvent systems. 5'-³²P labeled U* was visualized by exposing on Imaging plate (Fuji photo system). Solvents used in each system was described in experimental section. Four standard nucleotides, AMP, GMP, UMP, and CMP, were co-developed with 5'-³²P labeled U* and visualized by UV-shadowing.

が、ESI でウリジン誘導体以外のヌクレオシドは感度よく検出できる点を考慮し、ウリジン誘導体の特異的標識を試みた。CMC 化による U* の標識は特異性と ESI での感度が非常に高く、また他の誘導体化に比べ、水溶液中での誘導体化物の安定性が高く LC/MS での分析も可能であるという利点が挙げられる。また、CMC 誘導体化物に共通なフラグメントイオンを利用することで、複雑なスペクトルの中から、確実に U* を検出することが可能である。感度的には現状のシステムでも解析可能であるが、マイクロボアカラムやキャピラリーカラムを導入することで、さらに微量なサンプルに対応できることが予想される。本稿で報告した U* は牛ミトコンドリア由来であるが、最近ヒトのミトコンドリアとホヤのミトコンドリアから同一の U* を検出した。したがって、この U* は哺乳動物をはじめ脊椎動物から原索動物のミトコンドリアで保存されている可能性が高い。しかし酵母のミトコンドリアにおいては cmnm

(Fig. 11(a) caption on p. 176)

Fig. 11. (a) Mass chromatograms of nucleosides from mitochondria tRNA^{Leu} treated with CMC. All peaks derived from CMC adducts are indicated by arrow heads. Two peaks corresponding to retention times, 3.84 and 26.60, must be contaminated materials from ODS column.

(b) Mass spectrum of a modified uridine with unknown structure (U*).

5Uであることがすでに報告されており¹⁵⁾、今後他の生物種について解析を行うことで、U*の保存性および構造的な進化が明らかになるものと考えられる。U*の分子量381.2は既知の修飾ウリジンと比較すると最大の分子量をもつことになり、その構造および生合成経路に注目していきたい。またU*の構造を明らかにすることで動物ミトコンドリアにおける遺伝暗号の解読機構に統一的な解釈ができるものと期待される。

謝 辞 cmnm5Uのヌクレオシド標品を恵与していただきました村尾捷利先生（自治医大）に感謝いたします。

文 献

- 1) B. G. Lane, J. Ofengand, and M. W. Gray, *FEBS Lett.*, **302**, 1-4 (1992).
- 2) K. Sirum-Connolly and T. L. Mason, *Science*, **262**, 1886-1889 (1993).
- 3) P. A. Limbach, P. F. Crain, S. C. Pomerantz, and J. A. McCloskey, *Biochimie*, **77**, 135-138 (1995).
- 4) S. C. Pomerantz, and J. A. McCloskey, *Methods Enzymol.*, **193**, 796-824 (1990).
- 5) S. G. Bonitz, R. Berlani, G. Coruzzi, M. Li, G. Macino, F. G. Nobrega, M. P. Nobrega, B. E. Thalenfeld, and A. Tzagoloff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 3167-3170 (1980).
- 6) S. Yokoyama, T. Watanabe, K. Murao, H. Ishikura, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, and T. Miyazawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4905-4909 (1985).
- 7) J. Moriya, T. Yokogawa, K. Wakita, T. Ueda, K. Nishikawa, P. F. Crain, T. Hashizume, S. C. Pomerantz, J. A. McCloskey, G. Kawai, N. Hayashi, S. Yokoyama, and K. Watanabe, *Biochemistry*, **33**, 2234-2239 (1994).
- 8) G. Zubay, *J. Mol. Biol.*, **4**, 347 (1962).
- 9) T. Yokogawa, Y. Kumazawa, K. Miura, and K. Watanabe, *Nucl. Acids Res.*, **17**, 2623-2638 (1989).
- 10) H. Tsurui, Y. Kumazawa, R. Sanokawa, Y. Watanabe, T. Kuroda, A. Wata, K. Watanabe, and T. Shirai, *Anal. Biochem.*, **221**, 166-172 (1994).
- 11) K. Wakita, Y. Watanabe, T. Yokogawa, Y. Kumazawa, S. Nakamura, T. Ueda, K. Watanabe, and K. Nishikawa, *Nucl. Acids Res.*, **22**, 345-353 (1994).
- 12) Y. Kuchino, H. Hanyu, and S. Nishimura, *Methods Enzymol.*, **155**, 376-396 (1987).
- 13) J. F. Banks, Jr., S. Shen, C. M. Whitehouse, and J. B. Fenn, *Anal. Chem.*, **66**, 406-414 (1994).
- 14) N. W. Y. Ho and P. T. Gilham, *Biochemistry*, **6**, 3632-3639 (1967).
- 15) R. P. Martin, A. P. Sibley, C. W. Gehrke, K. Kuo, C. G. Edmonds, J. A. McCloskey, and G. Dirheimer, *Biochemistry*, **29**, 956-959 (1990).

Keywords: ESI/Iontrap, Mitochondria, tRNA, Modified uridine, CMC