

平成 30 年 5 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08178

研究課題名(和文) ミトコンドリアtRNA修飾の分子基盤及び生理機能解析

研究課題名(英文) Physiological role of mitochondrial tRNA modification

研究代表者

魏 范研 (Wei, Fan-Yan)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：90555773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ミトコンドリアに局在する酵素であるCdk5rap1の生理機能及び疾患との関連を明らかにした。Cdk5rap1は4種類のミトコンドリアtRNAをチオメチル化修飾する。同修飾は、コドン・アンチコドン結合の強化を介して効率的なタンパク質翻訳に重要である。Cdk5rap1の欠損マウスでは、ミトコンドリアでのタンパク質翻訳量が低下したことで電子伝達系の形成及び機能が障害され、骨格筋や心筋におけるエネルギー代謝が低下した。また、ミトコンドリア病患者においてCdk5rap1によるチオメチル修飾の低下が疾患の重篤度と相関した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we report that Cdk5 regulatory subunit-associated protein 1 (Cdk5rap1) is responsible for 2-methylthio (ms2) modifications of mammalian mt-tRNAs for Ser(UCN), Phe, Tyr and Trp codons. Deficiency in ms2 modification markedly impaired mitochondrial protein synthesis, which resulted in respiratory defects in Cdk5rap1 knockout (KO) mice. The KO mice were highly susceptible to stress-induced mitochondrial remodelling and exhibited accelerated myopathy and cardiac dysfunction under stressed conditions. Furthermore, we demonstrate that the ms2 modifications of mt-tRNAs were sensitive to oxidative stress and were reduced in patients with mitochondrial disease. These findings highlight the fundamental role of ms2 modifications of mt-tRNAs in mitochondrial protein synthesis and their pathological consequences in mitochondrial disease.

研究分野：生理学

キーワード：代謝 ミトコンドリア RNA 修飾

1. 研究開始当初の背景

タンパク質翻訳は最も基本的な生命機能であり、その破綻は糖尿病など様々な疾患に繋がる。我々は以前、2型糖尿病の危険因子である *Cdkal1* の解析を介して、tRNA の化学修飾がタンパク質翻訳の重要な調節機構であることを明らかにした。*Cdkal1* はリジンに対応する tRNA であるアンチコドンが UUU である tRNA^{Lys}(UUU) を特異的に認識し、チオメチル (S-CH₃) 化修飾を行う酵素であった (J. Biol. Chem. Vol. 285, 28425, 2010)。チオメチル化修飾は、コドン・アンチコドン結合を安定化することで、リジンコドンにおける正確かつ効率的な翻訳に重要であった。*Cdkal1* 欠損マウスを作製し解析した結果、リジンの誤翻訳に起因する異常なプロインスリンがβ細胞内に蓄積し、糖尿病を誘発した (J. Clin. Invest. (121):3598, 2011)。さらに、チオメチル化高感度検出法を独自に開発し (Clin. Chem. (59):51, 2013)、2型糖尿病と相関する危険型 *Cdkal1* 遺伝子を持つヒトにおいて tRNA^{Lys}(UUU) のチオメチル修飾が低下することを発見し (Hum. Mol. Genet. (23):4639, 2014)、*Cdkal1* による tRNA^{Lys}(UUU) のチオメチル化修飾の生理意義及びその破綻による2型糖尿病発症機構を解明した。

Cdkal1 には、硫黄・鉄クラスターと結合するモチーフが含まれ、tRNA のチオメチル修飾に重要である。このようなモチーフを有するタンパク質は、*Cdkal1* 以外にも数種類存在する。我々は、哺乳動物由来の細胞において配列的に *Cdkal1* と相同性を持つ *Cdk5rap1* を新たに発見した。興味深いことに、*Cdk5rap1* の N 末端にミトコンドリア局在シグナルが存在する。ミトコンドリアには、ミトコンドリア DNA がコードする 2 種類の mt-tRNA が存在し、電子伝達系に組み込まれる 1 3 種類のミトコンドリアタンパクの翻訳に使用される。しかし、細胞質における翻訳制御機構と異なり、ミトコンドリアにおける翻訳制御機構に関する知見は非常に少ない。これまでの結果から、*Cdk5rap1* は mt-tRNA チオメチル化修飾を介してミトコンドリアでのタンパク質翻訳ならびにミトコンドリアの呼吸機能を制御する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、新規ミトコンドリア tRNA 修飾酵素 *Cdk5rap1* の生理機能及び疾患との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

① *Cdk5rap1* によって修飾される tRNA の同定:

野生型マウス及び *Cdk5rap1* 欠損マウスの臓器から精製した全 RNA から各種 mt-tRNA をアフィニティカラムによって分取し、その後質量分析器を用いてチオメチル化修飾を測定することで、*Cdk5rap1* によって特異的にチオメチル化修飾される mt-tRNA の種類及び部

位を同定する。

② *Cdk5rap1* によるミトコンドリアタンパク質翻訳制御:

野生型及び *Cdk5rap1* 欠損マウス由来の繊維芽細胞を作製し、35S メチオニンを用いてミトコンドリアでのタンパク質翻訳を検討する。さらに、放射線ラベリングしたミトコンドリア分画を native PAGE で分離することで、呼吸鎖複合体の形成も検討する。

③ *Cdk5rap1* によるミトコンドリア機能制御:

野生型及び *Cdk5rap1* 欠損マウスの組織からミトコンドリアを単離し、細胞外フラックスアナライザーを用いて呼吸鎖複合体の活性、酸素消費量を測定することで、*Cdk5rap1* によるミトコンドリア代謝制御機構を明らかにする。

④ *Cdk5rap1* による骨格筋・心筋の機能制御:

野生型マウス及び *Cdk5rap1* 欠損マウスをトレッドミルに乗せ、運動量を測定する。また、心エコーを用いて心臓の機能を測定する。

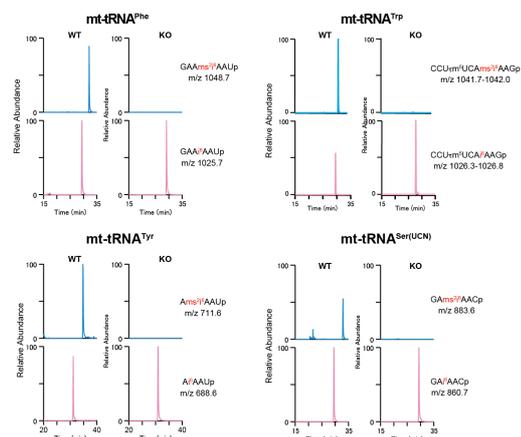
⑤ 疾患との関連:

ミトコンドリア病はミトコンドリア機能低下で発症する典型的な疾患である。ミトコンドリア病患者由来の RNA 検体を用いて、ミトコンドリア tRNA のチオメチル修飾を測定し、疾患との関連を明らかにする。

4. 研究成果

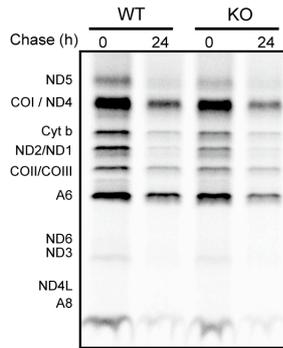
① ミトコンドリア tRNA のチオメチル修飾:

野生型および *Cdk5rap1* 欠損マウスの肝臓の total RNA からミトコンドリア DNA 由来のミトコンドリア tRNA を精製した。その後、RNase で tRNA を消化し、分解産物を質量分析機で分析した。その結果、野生型マウス (WT) 由来の tRNA と比較して *Cdk5rap1* 欠損マウス (KO) 由来のミトコンドリア tRNA では ms2i6A (2-methylthio-N⁶-isopentenyladenosine) と呼ばれる修飾が欠損していた。また、欠損する tRNA 種は、mt-tRNA (Trp), mt-tRNA (Phe), mt-tRNA (Tyr), および mt-tRNA (Ser/UCN) の 4 種類であった (下図参照)。

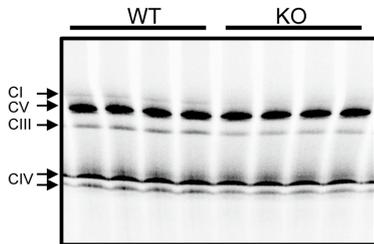


②チオメチル化修飾によるミトコンドリアタンパク質翻訳制御

野生型マウスと Cdk5rap1 欠損マウス由来の線維芽細胞に 35S-メチオニンを加えた後、ミトコンドリアを単離し、SDS-PAGE 及びオートラジオグラフィを用いてミトコンドリア DNA に由来する 13 種類のタンパク質の翻訳量を評価した。その結果、Cdk5rap1 欠損細胞のミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳量が野生型マウスのミトコンドリアと比較して顕著に低下した（下図参照）。

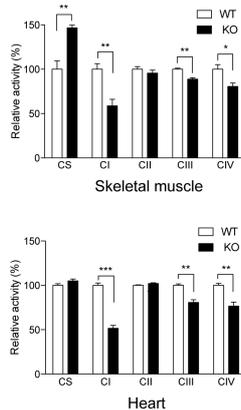


さらに、35S-メチオニンで標識したミトコンドリアから呼吸鎖複合体を単離し、native PAGE で各複合体の形成を評価した。その結果、野生型細胞と比較して Cdk5rap1 欠損細胞のミトコンドリアにおいて複合体 I、III と IV 形成が障害されたことが明らかになった（下図参照）。

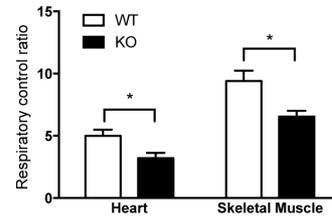


③Cdk5rap1 によるミトコンドリア機能制御：

野生型及び Cdk5rap1 欠損マウスの心筋および骨格筋からミトコンドリアを単離し、呼吸鎖複合体の活性を測定した。その結果、Cdk5rap1 欠損マウスの心筋と骨格筋ミトコンドリアにおいて呼吸鎖複合体 I、III と IV の活性が有意に低下した（下図参照）。



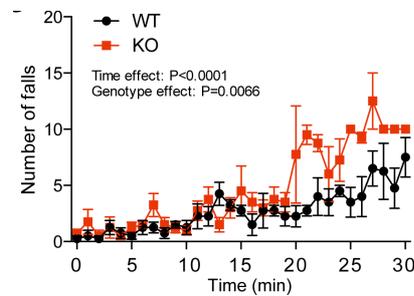
さらに、単離したミトコンドリアを細胞外フラックスアナライザーで酸素呼吸量を測定したところ、Cdk5rap1 欠損マウスの心筋および骨格筋ミトコンドリアにおいて好氣的な酸素呼吸が低下した（下図参照）。



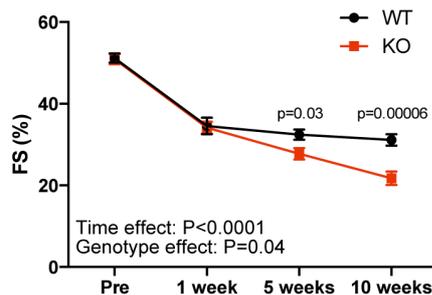
④Cdk5rap1 による骨格筋・心筋の機能制御

Cdk5rap1 によるミトコンドリアでの翻訳制御が組織機能にどのように寄与するかを検討するため、野生型マウスおよび Cdk5rap1 欠損マウスをトレッドミルで走らせ、骨格筋機能を評価した。一方、心筋機能を評価するために、麻酔下で心エコーを実施し、心室の収縮率を計測した。

通常飼育条件では Cdk5rap1 欠損マウスの骨格筋機能及び心筋機能が野生型マウスと比較して有意な差を認めなかった。そこで、野生型マウス及び Cdk5rap1 欠損マウスに高脂質食（ケトン食）を与え、ミトコンドリアに負荷をかけた時に骨格筋機能がどのように変化するかを検討した。その結果、ケトン食を摂取した Cdk5rap1 欠損マウスは、トレッドミルでの走行距離が野生型マウスより有意に低下した（下記参照）。



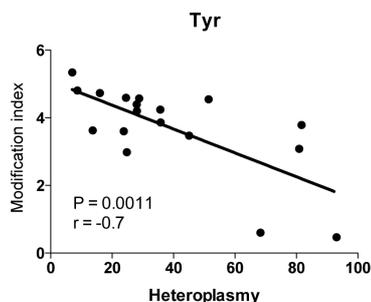
一方、心筋に負荷を与えるために、大動脈結紮実験を行い、経時的に心エコーを実施し左心室収縮率を計測することで心機能を評価した。その結果、野生型マウスと比較して Cdk5rap1 欠損マウスでは、動脈結紮によって心機能が著しく低下した（下図参照）。



⑤疾患との関連

ミトコンドリアの機能低下が様々な疾患と関連する。特に関連深い疾患としてミトコンドリア病が挙げられる。ミトコンドリア病は一般的にミトコンドリア DNA の点変異を起因とする神経難病である。効果的な治療法と治療薬がないため、一旦発症すると、骨格筋機能や心機能が急激に低下し、患者の容態が悪化する。ミトコンドリア病を誘発する点変異のうち、ミトコンドリア tRNA (Leu) に位置する A3243G 変異がもっとも頻度の高い。A3243G 変異を有するミトコンドリア DNA のコピー数が高いほどミトコンドリア病の発症率が高い。しかし、なぜたった一箇所の点変異がこれほど重篤な疾患を誘発するかその原因がわかってない。

我々は A3243G 変異を有する患者の血液由来の RNA サンプルを用いて、ミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾レベルを検討した。その結果、A3243G 変異率 (Heteroplasmy) が高いほど、チオメチル修飾率が低下した (下図参照)。



⑥結論と考察

本研究により、Cdk5rap1 はミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾酵素であることが明らかになった。Cdk5rap1 は 4 種類のミトコンドリア tRNA を修飾し、ミトコンドリアでの効率的な翻訳を制御することで、ミトコンドリアのエネルギー代謝を調節し、骨格筋や心筋の生理機能に重要である。さらに、A3243G 変異を有するミトコンドリア病患者では、変異率が高いほど Cdk5rap1 によるチオメチル修飾が低下したことから、ミトコンドリア病の発症にチオメチル修飾の低下が関わっていることが示唆された。

⑦本研究結果の位置付け、インパクトと将来の展望

ミトコンドリアはエネルギー代謝を支える細胞内小器官であり、あらゆる生命活動に必要であることはいうまでもない。また、ミトコンドリアの機能異常が様々な疾患の原因となるため、ミトコンドリアを対象とする研究は世界的なトレンドの 1 つである。

ミトコンドリアは他の小器官と決定的に異なるところは、独自の DNA がコードする 13 種類のタンパク質を翻訳することである。この 13 種類のミトコンドリアタンパク質はいずれも呼吸機能に必須であるため、ミトコン

ドリアでのタンパク翻訳制御がミトコンドリア機能のみならず、すべての細胞機能にとっても重要であることは明らかである。しかしながら、ミトコンドリアの融合分裂に代表される形態学研究が現在のミトコンドリア研究を席捲しており、ミトコンドリアの本質とも言える独自のタンパク質翻訳システムに対する理解は進んでいない。

本研究は、ミトコンドリア tRNA に存在するチオメチル化修飾が効率的なタンパク質翻訳に必要であり、また病態的な環境においてチオメチル化修飾が変動することを明らかにした。ミトコンドリア tRNA には様々な化学修飾が存在することは知られていたが、これらの修飾はミトコンドリアの祖先であるバクテリアからの名残りとして考えられ、具体的な生理意義が不明であった。本研究結果は、tRNA 修飾がミトコンドリアタンパク翻訳を制御する重要なコンポーネントであることを提示するものであり、ミトコンドリアの本質に対する理解を深めるものである。

また、本研究成果は、臨床的な観点において非常に意義が高いといえる。ミトコンドリア病は、効果的な治療法が存在しない神経難病である。ミトコンドリア病自体は希少疾患であるため、新規創薬が遅れている。本研究成果は、チオメチル修飾が新たな治療標的となりえることを提示し、ミトコンドリア病に対する新しい治療法・治療薬の開発に繋がるものである。

本研究で明らかにした Cdk5rap1 によるミトコンドリア tRNA のチオメチル化修飾を明らかにしたが、Cdk5rap1 自身の制御機構がまだ不明である。特に Cdk5rap1 は硫黄鉄クラスターを補酵素として使用するが、硫黄鉄クラスターがどのような型で Cdk5rap1 に受け渡されるか、また Cdk5rap1 が硫黄鉄クラスターをどのように酸化環境から保護するかなどの点についてさらに研究を深める必要がある。これらのことが明らかになれば、将来的に Cdk5rap1 の保護剤を開発することで、ミトコンドリアの機能低下に対する新たな治療薬の開発に繋がるということが可能である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Wei F.Y., Zhou B., Suzuki T., Miyata K., Ujihara Y., Horiguchi H., Takahashi T., Xie P., Michiue H., Fujimura A., Kaitsuka T., Matsui H., Koga Y., Mohri S., Suzuki, Oike Y., Tomizawa K. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contribute to myopathy in mice and humans. *Cell Metab.* 21, 428-442, 2015.

2. Watanabe S, Wei FY, Matsunaga T,

Matsunaga N, Kaitsuka T, Tomizawa K. Oxytocin Protects against Stress-Induced Cell Death in Murine Pancreatic β -Cells. Sci Rep. 2016 May 4;6:25185.

3. Wu Y, Wei FY, Kawarada L, Suzuki T, Araki K, Komohara Y, Fujimura A, Kaitsuka T, Takeya T, Oike Y, Suzuki T, Tomizawa K.. Mtu1-mediated thiouridine formation of mitochondrial tRNAs is required for mitochondrial translation and is involved in reversible infantile liver injury. PLOS Genetics. 12(9):e1006355. 2016.

4. Takahashi N, Wei FY, Watanabe S, Hirayama M, Ohuchi Y, Fujimura A, Kaitsuka T, Ishii I, Sawa T, Nakayama H, Akaike T, Tomizawa K. Reactive sulfur species regulate tRNA methylation and contribute to insulin secretion. Nucleic Acids Res. 2017, Jan 9;45(1):435-445.

〔学会発表〕(計 7 件)

① 魏 范研

第 93 回日本生理学会大会
tRNA 修飾異常による X 染色体連鎖性精神遅滞の発症分子メカニズムの解析 (口演)
2015 年 3 月 21 日札幌市

② 魏 范研

第 17 回日本 RNA 学会年会
tRNA 修飾異常による X 染色体連鎖性精神遅滞の発症分子メカニズムの解析 (口演)
2015 年 7 月 17 日福井市

③ 魏 范研

第 94 回日本生理学大会
心血管の機能と病態におけるミトコンドリア恒常性制御 (口演)
2016 年 3 月 28 日浜松市

④ 魏 范研

国際 RNA 学会 (RNA2016)
Taurino-modification of mitochondrial tRNAs governs cellular proteostasis that contributes to the development of mitochondrial disease
2016 年 7 月 2 日 (京都市)

⑤ 魏 范研

第 30 回モロシヌス研究会
マウス個体発生におけるミトコンドリア tRNA 修飾の役割 (口演)
2017 年 6 月 23 日

⑥ 魏 范研

第 19 回日本 RNA 学会年会
ミトコンドリア tRNA タウリン修飾によるタンパク質恒常性ネットワークの制御 (口演)
2017 年 7 月 20 日 (富山市)

⑦ 魏 范研

第 95 回日本生理学会年会

疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出 (シンポジウム口演)

2018 年 3 月 28 日

〔図書〕(計 2 件)

① 魏 范研、富澤一仁. イオウ tRNA 編集の分子機構及び生理機能
細胞工学, 34: 384-388, 2015.

② 魏 范研、富澤一仁. tRNA のチオメチル化修飾による翻訳制御と代謝疾患
生化学, 88:1-7, 2016.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: ミトコンドリア tRNA 修飾の検出法
発明者: 富澤一仁, 魏 范研
権利者: 熊本大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-25580
出願年月日: 2016 年 12 月 28 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
<http://kumamoto-physiology.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

魏 范研 (Wei, Fan-Yan)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 90555773

(2)研究分担者

該当しない

(3)連携研究者

該当しない

(4)研究協力者

毛利聡 (Mohri, Satoshi)