

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10060

研究課題名(和文)非コードRNAを分子基盤とするミトコンドリア病の新規発症機構の解明

研究課題名(英文)Novel mechanism of mitochondrial disease based on noncoding RNA

研究代表者

水野 洋介 (Mizuno, Yosuke)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30406532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの分裂や融合、エネルギー産生能やストレス制御に関わる遺伝子の機能が欠損・抑制された細胞では、ミトコンドリア機能に関わる非コードRNAの発現量にも大きな変化が生じていると考えられる。このような非コードRNAを同定するため、ヒト培養細胞を用いてミトコンドリア内で重要な機能を持つ遺伝子を抑制させ、RNAを抽出した。発現解析によりmRNA、長鎖非コードRNA、マイクロRNAの発現量を定量した結果、ミトコンドリア関連遺伝子の機能を抑制させた場合に、その影響を受けて発現量が変化したミトコンドリアmRNA、長鎖非コードRNA、マイクロRNAを検出することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアの分裂や融合に関わる遺伝子を抑制することにより、共通して発現が変動する長鎖非コードRNAやマイクロRNAも複数検出することが出来た。この中に、ミトコンドリア機能を制御したり影響を及ぼし、ひいてはミトコンドリア病の発症要因にもなるRNAが含まれていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Functional loss of mitochondrial genes which are involved in mitochondrial fission, fusion, energy generation and stress regulation can change the expression level of several noncoding RNAs which could involve in mitochondrial function. To identify those RNAs, we obtained RNA samples from human cultured cells in which dysfunction of crucial mitochondrial genes was introduced. By expression analysis, we identified several messenger RNAs, long noncoding RNAs and microRNAs whose expression level was changed by the results of dysfunction of crucial mitochondrial genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア病 非コードRNA 呼吸差酵素 マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病はミトコンドリア呼吸鎖複合体の機能低下により ATP 合成能が減少し、心筋や神経をはじめとする全身の様々な組織で機能不全が現れる疾患である。申請者らは埼玉医科大学小児科学教室の大竹明教授らと共に、142 名のミトコンドリア病患者 DNA について全エクソーム解析を実施した。その結果、新規のミトコンドリア関連遺伝子 6 種類の変異をはじめとして、遺伝的な発症原因を多数同定することができた (Kohda et al., PLoS Genetics, 2016)。しかし 40 検体では、核 DNA の遺伝子領域またはミトコンドリア DNA のいずれにおいても、ミトコンドリア病の発症原因と判断できる塩基配列変異が存在しなかった。

一方、miRNA はヒトでは現在約 1,300 種類知られており、それぞれが特定の細胞や生理的条件下で発現し、複数の標的遺伝子 RNA に作用して、様々な生命現象の調節を行っている。これまでにミトコンドリア機能に関わる miRNA としては、miR-761 がミトコンドリアの融合に関わる遺伝子 MFN2 を制御することなどを始めとして、幾つかの報告がなされている。核ゲノムにコードされているミトコンドリア関連遺伝子は約 1,500 種類知られており、miRNA がそれらを標的としてミトコンドリア機能を制御する可能性が考えられる。しかし、これらのミトコンドリア関連遺伝子を標的対象とし、ミトコンドリア機能に影響を与える miRNA を広くスクリーニングして、その機能解析を行った研究はまだない。

また、lncRNA は現在約 3~4 万もの種類が知られており、DNA や RNA の特定の標的部位に様々なタンパク複合体をリクルートして核酸修飾を行うことなどにより、遺伝子機能を調節する働きがあることが少しずつ報告されてきている。最近、lncRNA の一種である SAMMSON が、ミトコンドリアの恒常性と代謝に重要な役割を持つ遺伝子 p32 への作用を介して細胞のがん化に関与している事が報告された (Leucci E, et al., Nature, 2016)。このことから、ミトコンドリア機能制御に lncRNA が関与することの重要性が最近注目されつつある。しかし、数万種類も存在する lncRNA は長さもそれぞれまちまちで作用機序も様々な可能性が考えられる事から、現在までに機能が明らかになっているものはわずか 100 種類程度にとどまり、特にミトコンドリア機能に影響を与える lncRNA の機能を詳細に突き止めた例は上記以外にはほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア機能に影響を及ぼす非コード RNA を同定し、その作用機序の解明と、ミトコンドリア病発症との関連性の解明を行う。このために、まず、ミトコンドリア機能が特に必要な心筋細胞、神経細胞で、特異的に存在する非コード RNA を同定する。また、ミトコンドリア機能を人為的に抑制した細胞条件下で発現量が変化する非コード RNA を同定する。さらに、同定された非コード RNA が制御する標的遺伝子を探索し、これらの非コード RNA がミトコンドリア機能を制御することを検証する。

3. 研究の方法

1. ミトコンドリア機能を低下させた細胞で発現減少する非コード RNA の同定

ミトコンドリアの分裂や融合、エネルギー産生能やストレス制御に関わる DNML1 等の遺伝子の機能が欠損・抑制された細胞や、薬剤処理を加えた細胞では、ミトコンドリアの伸展等の形態変化やエネルギー産生能の低下を生じる。こうした細胞ではミトコンドリア機能に関わる非コード RNA の発現量にも大きな変化が生じていると考えられる。このような非コード RNA を同定するため、ヒト細胞株を用いて DNML1, MFN2, p32 遺伝子を RNA 干渉によりノックダウンした細胞を準備する。また別途ミトコンドリア脱共役剤 CCCP や低濃度の KCN を細胞に添加してミトコンドリアストレスを与えた細胞を準備する。これらの細胞と対照用の野生型細胞・薬剤未添加細胞について、全 RNA を抽出する。

2. 同定した非コード RNA の標的遺伝子の同定 ~ 公共データベースを用いた検索

miRNA と一部の lncRNA については公共データベースに標的遺伝子候補が収載されているので、それを活用して標的遺伝子候補を検索する。特に約 2,000 種類のミトコンドリア関連遺伝子が標的候補遺伝子となるものを重点的に抽出する。

4. 研究成果

本研究において、特定のミトコンドリア関連遺伝子を CRISPR/CAS でノックアウトしたヒト線維芽細胞と、さらに別の複数のミトコンドリア関連遺伝子を RNA 干渉法によりノックダウンしたヒト線維芽細胞を用いた実験を行った。ミトコンドリアの分裂や融合、エネルギー産生能やストレス制御に関わる DNML1, MFN2, p32 等の遺伝子の機能が欠損・抑制された細胞では、ミトコンドリアの伸展、分裂、融合等の形態変化やエネルギー産生能の低下を生じる。こうした細胞ではミトコンドリア機能に関わる非コード RNA の発現量にも大きな変化が生じていると考えられる。このような非コード RNA を同定するため、ヒト培養細胞を用いて DNML1, MFN2, p32 遺伝子を RNA 干渉法によりノックダウン、もしくは CRISPR システムによりノックアウトした細胞からミトコンドリアおよびミトコンドリア内膜内成分 (マイトプラスト) を分画して全 RNA を抽出し

た。ミトコンドリア関連遺伝子を抑制させたことの効果として、ミトコンドリアの形態が変化していることを確認した。得られたミトコンドリア RNA について発現アレイを用いて mRNA、長鎖非コード RNA、マイクロ RNA の発現量を定量した結果、ミトコンドリア関連遺伝子の機能を抑制させた場合に、その影響を受けて発現量が変化したミトコンドリア mRNA、長鎖非コード RNA、マイクロ RNA を検出することが出来た。ミトコンドリアの分裂や融合に関わる遺伝子を抑制することにより、共通して発現が変動する長鎖非コード RNA やマイクロ RNA も複数検出することが出来た。この中に、ミトコンドリア機能を制御したり影響を及ぼし、ひいてはミトコンドリア病の発症要因にもなる RNA が含まれていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 水野 洋介、木下 善仁、神田 将和、岡崎 康司
2. 発表標題 非コードRNAによるミトコンドリア機能の制御
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野 洋介、木下 善仁、神田 将和、岡崎 康司
2. 発表標題 Regulation of mitochondria function by noncoding RNA
3. 学会等名 RCGM2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野 洋介、木下 善仁、神田 正将、岡崎 康司
2. 発表標題 非コードRNAによるミトコ ンドリア機能の制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野 洋介
2. 発表標題 非コードRNAを病因とする ミトコンドリア病の新規発 症機構の解明
3. 学会等名 川野小児医学奨学財 団第29回助成研究 成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Mizuno, Akira Ohtake, Yoshihito Kishita, Masakazu Kohda, Yasushi Okazaki
2. 発表標題 Regulation of mitochondria function by noncoding RNA
3. 学会等名 2019 Keystone Symposia Conference, X2: Long Noncoding RNAs: From Molecular Mechanism to Functional Genetics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihito Kishita, Masakazu Kohda, Yosuke Mizuno, Yukiko Yatsuka, Tomoko Hirata, Hiroko Harashima, Masaru Shimura, Kei Murayama, Akira Ohtake, Yasushi Okazaki
2. 発表標題 Novel disease causing genes associated with mitochondrial dynamics in mitochondrial disorders
3. 学会等名 International YoungMito 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木下 善仁、神田 将和、八塚 由紀子、平田 智子、水野 洋介、今井-岡崎 敦子、原嶋 宏子、村山 圭、大竹 明、岡崎 康司
2. 発表標題 ミトコンドリア病患者における非ミトコンドリア病原 因遺伝子の発見
3. 学会等名 RCGM2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Lim Sze Chern, Yoshihito Kishita, Masakazu Kohda, Yosuke Mizuno, Tomoko Hirata, Yukiko Yatsuka, Nurn Nahar Borna, Hiroko Harashima, Kei Murayama, Akira Ohtake, Yasushi Okazaki
2. 発表標題 Identification of the genetic causes of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) disease
3. 学会等名 American Society for Human Genetics
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----