

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19521

研究課題名（和文）硫黄代謝に基づく革新的にミトコンドリア治療薬の開発

研究課題名（英文）Drug development for mitochondrial disease based on sulfur metabolism

研究代表者

魏 范研（Wei, Fanyan）

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90555773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、難病疾患であるミトコンドリア病の発症機序に基づき、ミトコンドリア代謝障害の抜本的改善につながる治療標的の創出を目的とする。研究期間中に、ミトコンドリアtRNAに病原性点変異を有する細胞株を用いて、ゲノムワイドスクリーニング系を構築した。また、スクリーニング結果をさらに検証した結果、ミトコンドリア病モデル細胞において、硫黄代謝に関わる遺伝子の抑制が硫黄代謝の改善ならびにエネルギー代謝の亢進につながることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、硫黄代謝に関わる遺伝子がミトコンドリア病創薬において有力な標的であることが示唆された。今後は同遺伝子の抑制が個体においてもミトコンドリア機能改善効果を有するかを検証するとともに、同遺伝子産物に対する低分子阻害剤の開発を進める予定である。これらの研究開発により、ミトコンドリア機能を根底から改善しうる薬剤の創出が可能となり、指定難病であるミトコンドリア病に新たな希望をもたらすことができる。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial disease is a devastating genetic disease, which is mainly caused by the pathogenic mutations in mitochondrial DNA. Currently, there is no effective treatment that can cure the disease. This study is aimed to develop a functional screening system that leads to the discovery of drug target for the treatment of mitochondrial disease. In this study, we utilized a genome-wide shRNA lentiviral system and screened over 3,000 mitochondria-related genes in cell lines carrying pathogenic mitochondria DNA. We discovered a specific shRNA, which targets a gene involved in sulfur metabolism, was capable to upregulate mitochondrial reactive sulfur species as well as respiratory activity, thereby leading to an efficient energy metabolism. These results thus lay the foundation for novel and innovative drug development in near future.

研究分野：生理学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリア病 tRNA 硫黄修飾

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアには独自の DNA が存在し、22 種類のトランスファーRNA(mt-tRNA)、2 種類のリボソーム RNA、13 種類の mRNA をコードする。これらのミトコンドリア RNA は、好気呼吸に不可欠な呼吸鎖複合体タンパクを産生するため、ミトコンドリア DNA の変異はミトコンドリアでのタンパク質産生を障害しエネルギー代謝異常を引き起こすことで、様々な疾患の発症につながる。特に、ミトコンドリア病とよばれる病型は、ミトコンドリアの機能障害を伴う疾患のうち、最も重篤な病型である。ミトコンドリア病の病型で最も多いのは、MELAS および MERRF と呼ばれるもので、ミトコンドリア DNA のうち、ロイシンならびにリジンに対応する mt-tRNA 領域 (mt-tRNA^{Leu}、mt-tRNA^{Lys}) に点変異を有するものである。しかし、一塩基変異によるミトコンドリア病発症の分子メカニズムは不明であり、現状では有効な治療法と治療薬が存在しない。したがって、ミトコンドリア病発症機序の理解ならびにその機序に基づく治療法の開発が患者の QOL を改善するうえで喫緊の課題である。

tRNA は、80 塩基ほどの長さの小分子 RNA であり、mRNA の遺伝暗号を読み取ることでタンパク質翻訳を行う。近年の分析技術の発展により、tRNA を構成する RNA 塩基に多彩な化学修飾が存在することが明らかになってきた。哺乳動物の mt-tRNA では、合計 15 種類の化学修飾が見出されており、そのうち、半数以上の化学修飾が mRNA と結合するアンチコドン領域に存在する。これらの化学修飾は、アンチコドン領域の立体構造の維持などを介して、ミトコンドリアタンパク質翻訳の効率と正確性に必要であり、修飾の欠損がタンパク質翻訳を障害し、エネルギー代謝異常を引き起こすことが明らかになりつつある。

申請者は、これまで質量分析を用いてヒトなど哺乳動物の mt-tRNA に、ms²i⁶A 修飾、tm⁵U 修飾、tm⁵s²U 修飾といった硫黄原子を含む mt-tRNA 修飾を見いだしてきた。また、これら硫黄修飾を行う酵素を同定し、修飾酵素の欠損がミトコンドリアタンパク質翻訳異常を引き起こし、エネルギー代謝を障害することを明らかにした(Cell Metab. 2015; Nucl Acids Res. 2017; Nucl Acids Res. 2018)。特に、MELAS や MERRF 患者の検体を用いて解析した結果、mt-tRNA^{Leu} や mt-tRNA^{Lys} 病原性点変異は、同 mt-tRNA におけるタウリン修飾(tm⁵U や tm⁵s²U)の欠失と強く関連することを見いだした。加えて、MELAS や MERRF 患者の mt-tRNA では ms²i⁶A 修飾も顕著に低下することを明らかにした(Cell Metab. 2015)。これらのことから、mt-tRNA 硫黄修飾の欠失が MELAS や MERRF の発症原因であることが強く示唆された。しかし、現在ミトコンドリア病に対する治療は対症療法のみであり、ミトコンドリア病の根底にある tRNA 修飾異常を改善できる方法はなく、患者の生命予後が極めて不良であり、新しいアプローチから治療法や治療薬の開発が求められている。

2. 研究の目的

上記のように mt-tRNA の硫黄修飾の欠損がミトコンドリア病発症の主要原因であり、ミトコンドリア病の症状を改善するには tRNA 修飾の回復が必要である。そこで、本研究は、ミトコンドリア tRNA 修飾ならびにミトコンドリア代謝機能の改善を指標としたスクリーニング系の構築と実施を目的とした。本研究の最終目標が「ミトコンドリア障害を根底から改善しうる薬剤の開発」である。ミトコンドリア病の発症原因となる病原性変異は、ミトコンドリア病患者のみならず、糖尿病患者や加齢性難聴患者にも存在することが知られており、本研究は将来的にこれらミトコンドリア関連疾患への応用も視野に入れている。

3. 研究の方法

1) shRNA スクリーニング系の構築

ミトコンドリア機能と mt-tRNA 硫黄修飾の改善につながる分子標的を同定するため、本研究では shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングシステムを構築した。具体的には、ミトコンドリア代謝に関わる約 3000 遺伝子に対するカスタム shRNA を設計し、レンチウイルスベクターに組み込んだ。レンチウイルスベクターは、パッケージングベクターと共に、HEK293 細胞に導入し、ウイルス粒子を作製した。レンチウイルスのタイターはプラークアッセイにより算出した。

2) ミトコンドリア病患者由来の細胞株における一次スクリーニングの実施

本スクリーニングは、ミトコンドリア病の主要病原性変異である A3243G 変異を有する細胞株(A323G 細胞)を用いて行なった。A3243G 変異はミトコンドリア DNA のうち、mt-tRNA^{Leu} に位置しており、mt-tRNA^{Leu} タウリン修飾の欠損を引き起こす。A3243G 細胞において、ほぼすべてのミトコンドリア DNA が A3243G 変異を有しているため、同細胞ではミトコンドリアタンパク質翻訳と好気呼吸が著しく障害され、逆に嫌氣的な解糖による ATP 産生が著しく亢進する。このように A3243G 細胞の生存はグルコース濃度に依存しており、培地中のグルコース濃度が低い場合、A3243G 細胞がすべてのエネルギー源を短時間で消費し、最終的に死滅する。

本スクリーニングは上記の特性を利用し、1) で作製した shRNA ライブラリーを含むレンチウイルス粒子を A3243G 細胞に感染させた。その後、細胞株を低グルコース培地で培養し、ミトコンドリア代謝機能が改善され、厳しい栄養条件でも生存できる細胞を選抜した。さらに、回収した細胞から DNA を抽出し次世代シーケンサーで解析し、ミトコンドリア機能改善と細胞生存につながる shRNA の配列を解析することで、ミトコンドリア機能改善につながる標的遺伝子の同定を試みた。

3) 二次スクリーニングの実施

一次スクリーニングで同定した shRNA については、個別に二次スクリーニングを行った。具体的には、ライブラリーに用いた配列と異なる配列の shRNA を作製し、レンチウイルスを作製した。次に、各々のレンチウイルスを A3243G 細胞に感染させ、標的遺伝子の発現を抑制した。その後、低グルコースで長期培養を行い、細胞生存能を検討した。さらに、蛍光色素を用いたミトコンドリア膜電位解析、放射性アミノ酸を用いたミトコンドリアタンパク質翻訳解析、質量分析を用いた mt-tRNA の修飾解析や代謝物解析を行ない、一次スクリーニングのさらなる検証を行った。

4. 研究成果

1) 機能的スクリーニングによる標的遺伝子の探索

shRNA ライブラリーを含むレンチウイルス粒子を作製した後、ミトコンドリア病患者由来の A3243G 細胞に感染させた。一方、コントロールとして感染していない A3243G 細胞を準備した。感染細胞と非感染細胞を低グルコース培地で 7 日間培養した結果、非感染の A3243G 細胞はほぼ死滅したが、感染細胞の中には明らかに増殖し続けている細胞集団が出現した。これら生存細胞からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーにより shRNA の配列を解析し、同 shRNA の標的遺伝子を同定した。この一次スクリーニングを 3 回繰り返した後、3 回のスクリーニングで生存した細胞集団に共通して含まれる 7 種類の shRNA を陽性 shRNA とした。

2) 二次的スクリーニングによる標的遺伝子の同定

一次スクリーニングで陽性となった 7 種類の shRNA の効果を検証するため、shRNA の配列を新たにデザインし、レンチウイルス粒子を作製した。次に、同ウイルス粒子を A3243G 細胞に感染させ、低グルコースで再度スクリーニングを行った。その結果、7 種類の shRNA のうち、ある特異的な shRNA が A3243G 細胞の生存率を顕著に促進し、一次スクリーニングの結果再現に成功した。この shRNA は硫黄代謝に関わる遺伝子を抑制することから、同遺伝子の抑制による硫黄代謝環境の改善が A3243G 細胞の生存率向上につながったと考えられた。

3) 硫黄代謝関連遺伝子の抑制によるミトコンドリア機能改善の検討

上記の硫黄代謝関連遺伝子が A3243G 変異を伴うミトコンドリア病の治療標的となりうるかを検証するため、同遺伝子の抑制によるミトコンドリアの硫黄代謝、ミトコンドリア膜電位、mt-tRNA 硫黄修飾への影響を検討した。硫黄代謝については、質量分析を用いて硫黄修飾の基質として機能する活性硫黄種を定量した。その結果、同遺伝子を抑制した A3243G 細胞では、グルタチオンパースルフィドの量が大幅に上昇した。ミトコンドリア膜電位については、膜電位を検出する蛍光色素を用いて検討した。その結果、同遺伝子を抑制した A3243G 細胞では、ミトコンドリアの膜電位が顕著に上昇した。ミトコンドリア膜電位は呼吸鎖複合体の活性化によって維持されているため、上記の結果は、硫黄代謝関連遺伝子の抑制が A3243G 細胞の呼吸鎖複合体の活性を改善したことをよく示唆する。また、 tm^5U 修飾や $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$ 修飾といった mt-tRNA の硫黄修飾を質量分析で検討した結果、同遺伝子を抑制した A3243G 細胞では硫黄修飾の亢進が認められた。

以上のことから、本研究は、ミトコンドリア病患者由来の細胞を用いた機能的スクリーニング系を構築し、ミトコンドリア病モデル細胞の機能改善につながる標的遺伝子の同定に成功した。本研究で同定した標的遺伝子は硫黄代謝に関わっており、同遺伝子の抑制がミトコンドリア病モデル細胞において、活性硫黄量の増加、mt-tRNA 硫黄修飾の亢進、ミトコンドリア代謝機能の改善、といった効果を有することが明らかになった。これらの結果は、この遺伝子がミトコンドリア病創薬において極めて有力な標的であることを示唆する。今後は同遺伝子の抑制が個体においてもミトコンドリア機能改善効果を有するかを検証するとともに、同遺伝子産物に対する低分子阻害剤の開発を進める予定である。これらの研究開発により、ミトコンドリア機能を根底から改善しうる薬剤の創出が可能となり、指定難病であるミトコンドリア病に新たな希望をもたらすことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mon, E.E., Wei, F.-Y., Ahmad, R.N.R., Yamamoto, T., Moroishi, T., Tomizawa, K.	4. 巻 69
2. 論文標題 Regulation of mitochondrial iron homeostasis by sideroflexin 2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Physiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 359-373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12576-018-0652-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fakruddin, M., Wei, F.-Y., Suzuki, T., Asano, K., Kaieda, T., Omori, A., Izumi, R., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Miyata, K., Araki, K., Oike, Y., Scorrano, L., Suzuki, T., and Tomizawa, K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Defective Mitochondrial tRNA Taurine Modification Activates Global Proteostress and Leads to Mitochondrial Disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 482-496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2017.12.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano, K., Suzuki, T., Saito, A., Wei, F.-Y., Ikeuchi, Y., Numata, T., Tanaka, R., Yamane, Y., Yamamoto, T., Goto, T., Kishita, Y., Murayama, K., Ohtake, A., Okazaki, Y., Tomizawa, K., Sakaguchi, Y., and Suzuki, T.	4. 巻 46
2. 論文標題 Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 1165-1583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gky068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 魏范研
2. 発表標題 tRNA modification in mitochondria disease.
3. 学会等名 15th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----