

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19209019
 研究課題名（和文）
 ミトコンドリア DNA の異常発生機構解析に基づいた体系的診断システムの構築
 研究課題名（英文）
 Mitochondrial DNA disease and its diagnostic system
 研究代表者
 康 東天（KANG DONGCHON）
 九州大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号：80214716

研究成果の概要（和文）：3つの基本プロジェクト（1）ミトコンドリア DNA 維持機構の基礎研究、（2）ミトコンドリア DNA 検査診断システム、（3）体細胞ミトコンドリア DNA 解析を融合させ、体系的なミトコンドリア DNA 検査診断システムを構築し、大学内外からの検査依頼の応じられるようになった。マウスを用いて、ミトコンドリア DNA の保護が自然老化の進行を抑制できることを示した。さらに九州大学の「久山町コホート研究」で集められた約3千例の DNA サンプルのミトコンドリア DNA 配列を決定し、糖尿病発症との関連を解析している。

研究成果の概要（英文）：The following three projects are integrated for further understanding of mitochondrial disease and for construction of its diagnostic system: (1) molecular mechanism of maintenance of mitochondrial DNA (mtDNA), (2) molecular diagnosis of mitochondrial disease, and (3) mtDNA analysis of somatic cells. Now we accept genetic tests of mitochondrial disease from all over Japan. During this period, we have shown that maintenance of mtDNA can delay natural aging process in TFAM-expressing transgenic mice. The mtDNA analysis of somatic cells is on going.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	20,300,000	6,090,000	26,390,000
2008年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
年度			
年度			
総計	38,800,000	11,640,000	50,440,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ミトコンドリア DNA、遺伝子診断、活性酸素、糖尿病、ミトコンドリア病、遺伝子多型、老化

1. 研究開始当初の背景

(1) はじめに：ミトコンドリア DNA は ATP を合成する電子伝達系サブユニットを

コードし、細胞が正常な機能を保って生存するために必須のゲノムである。ミトコンドリアは細胞内最大の活性酸素発生部位

であり、そこに存在するミトコンドリア DNA は非常に強い酸化障害を受ける環境下にある。DNA 修復系が限られていることもあいまって、ミトコンドリア DNA は核 DNA に比べ約 100 倍高い変異率を示すことが実証されている。核 DNA とは異なり、ミトコンドリア DNA は分裂を終えた終末分化細胞（神経細胞や心筋細胞など）でも DNA 複製が継続している。そのため、ミトコンドリア DNA 障害（あるいは変異）が加齢に伴って体細胞に蓄積し、パーキンソン病などの神経変性疾患や心血管系の異常、糖尿病、癌などのいわゆる common disease の発症と進展、さらには全般的な個体の老化にも重要な役割を果たしているとの概念が徐々に認められつつある。

(2) 国内・国外の研究動向及び位置づけ：
これまで、ミトコンドリア DNA 異常は、稀な疾患である先天性のミトコンドリア脳筋症の原因としてしか考えられてこなかった。つまり、生殖細胞系列におけるミトコンドリア DNA の変異にほとんどの研究が集中されて来た。しかし、近年ようやく体細胞のミトコンドリア DNA 異常の重要性に多くの研究者が注目し始めている。申請者は世界に先駆けて体細胞ミトコンドリア DNA の維持の重要性に着目し、その維持機構と疾患との関連について研究を続けてきた。

(3) 経緯： 申請者は、ミトコンドリアでの活性酸素産生の研究から、体細胞ミトコンドリア DNA 酸化障害の修復の重要性について着想するに至り、酸化障害 DNA の修復系としての塩基除去修復系がミトコンドリアに存在することを遺伝子、蛋白質、活性の全ての面から初めて証明し、その神経疾患、心疾患、癌との病態との関連についても報告してきた。

そのようなミトコンドリア DNA 維持機構研究過程で、申請者は、転写因子として微量にしか存在しないと思われていたミトコンドリア転写因子 A (TFAM) が過去の報告より 100 倍多く存在することを見出し、従来、裸に近いと考えられていたヒトミトコンドリア DNA を覆うヒストン様蛋白質として機能していることを見出した。このことから、TFAM がミトコンドリア DNA のヌクレオソーム様構造 (ヌクレオイド) を形成しているとの新概念を提唱している。

このヌクレオイド構造の維持はミトコンドリア DNA 維持に決定的に重要であることも RNAi を用いた実験で明らかにした。このことから、TFAM の過剰発現はミトコンドリア

DNA 維持に特異的に働くことが期待されるため、TFAM 過剰発現トランスジェニックマウスを作製したところ、心臓に対する心筋梗塞後酸化ストレスモデルで、野生型の死亡率 35% に対して、トランスジェニックマウスでは死亡率が 0% という強い抵抗性を示す結果を得た。さらに、このトランスジェニックマウスは自然飼育環境においても、形態的のみならず行動的にも老化変化の進行が遅い傾向を示しており、疾患と老化の予防において体細胞ミトコンドリア DNA を守ることの重要性をはっきり示すことが出来た。このような研究成果から、今後ミトコンドリア DNA とその維持に関わる遺伝子の検査は、先天性のミトコンドリア脳筋症の様な稀な疾患の検査だけでなく、幅広く一般疾患にも重要であると考えられるようになった。

2. 研究の目的

3 つの基本プロジェクト単位を組織し、それを有機的につなげるシステムを作り上げることを目指している。3 つの基本プロジェクト単位とは (1) ミトコンドリア DNA 維持機構の基礎研究、(2) ミトコンドリア DNA 検査診断システム、(3) 体細胞ミトコンドリア DNA 解析である。これまで蓄えてきた基礎的なミトコンドリア DNA 維持機構の知見に基づき、新規の検査システムを開発し、これまで実施してきたミトコンドリア遺伝子検査に加えた体系的でかつ網羅的なミトコンドリア DNA 検査診断システムを構築する。さらにこのシステムを用いて患者や地域の検体の解析を行い臨床診断に役立てると共に、その知見を基礎的なミトコンドリア DNA 維持機構の解明研究へとフィードバックさせると言うものである

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア DNA 維持機構の解析

(i) ミトコンドリア DNA 転写・複製の in vitro 再構成系の確立

・転写/複製の in vitro 再構成に必要な蛋白質のタグ付リコンビナント蛋白質を比較的大量に発現精製する

・in vitro 再構成系の鋳型としてミトコンドリア DNA の転写複製制御領域である D-loop 領域をクローニングする。

・上記を用いて in vitro 再構成系での至的な RNA、DNA 合成条件を検討する。

(ii) ミトコンドリア DNA 結合蛋白質の探索

ミトコンドリア DNA ヌクレオイド構成蛋白質の LC/MS/MS による同定。現在この系は順調に稼動しており、同定の継続と確認作業である。

(iii) TFAM 発現トランスジェニックマウ

スの解析

・自然老化の表現型観察の継続：体重、骨変形、血液生化学、発癌等を野生型と比較

(2) 検査診断システムの構築および患者検体の検査

(i) CVが5%以内のミトコンドリアDNAコピー数のPCR定量系の確立

そもそもPCRを用いたDNA定量法は、一般的な臨床化学的検査に比べ定量的な再現性がまだ満足する段階にあるとは言えないのが現状である。当検査部でも、当初CVが20%にもなり、時系列の比較に問題となっていた。その原因となる要因を一つ一つ検討する。

(ii) ミトコンドリアDNA維持関連蛋白質の遺伝子配列決定系の確立

核DNAでコードされるミトコンドリアDNA維持に必須の蛋白質群 (TFAMやDNA polymerase gamma等) の異常によっても、当然ミトコンドリアDNA異常は生じ、ミトコンドリア機能異常を来す。実際、核DNA異常が原因のミトコンドリア病がいくつか報告されている。これら蛋白質の遺伝子配列決定系を確立する。これら蛋白質群の軽度機能異常は加齢に伴うミトコンドリアDNA異常を促進する可能性があり、コホート研究のためのデータベース作りにも取り入れる。

(iii) ミトコンドリア蛋白質に対する抗体の作製

ミトコンドリア蛋白質異常確認のため、電子伝達系サブユニットを含め、ミトコンドリア蛋白質に対する抗体の作製とそれを用いた免疫染色系を確立する。

(3) 体細胞ミトコンドリアDNA解析

九州大学の「久山町コホート研究」の中で集められたDNAサンプルを用いて、ミトコンドリアDNAのD-loop領域の配列を決定し、コホート研究での連鎖解析の検討項目の一つとする。1年に1000サンプル程度の配列決定を継続する予定。検体提供者の各種の情報を備えたサンプルがすでに多数集められてある。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアDNA維持機構の解析

(i) ミトコンドリアDNA転写・複製のin vitro再構成系の確立

転写/複製のin vitro再構成に必要な、転写因子 (TFAM, TFB) mitochondrial RNA polymerase、DNA polymerase のリコンビナント蛋白質を発現精製し、再構成系を構築した。この再構成系を用いて、mitochondrial RNA polymerase が鋳型DNAがスーパーコイル構造の時には転写因子非依存性かつ配列非依存性にRNA合成ができることを見出し、

mitochondrial RNA polymerase がDNA複製のRNAプライマー合成酵素としての役割があることを示した(原著6)。

(ii) ミトコンドリアDNA結合蛋白質の探索 LC/MS/MSによりミトコンドリアDNAヌクレオイド構成蛋白質のひとつとしてこれまでミトコンドリアにあることが報告されていなかったERAL1を同定した。本研究でERAL1が確かにミトコンドリアマトリックスに存在すること、ミトコンドリアリボソームの適切な構成に必要であること、その発現抑制がミトコンドリアDNAコード蛋白質翻訳を強く阻害し、細胞増殖も抑制するなど、ミトコンドリア電子伝達系機能の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの結果はミトコンドリア内における翻訳とミトコンドリアDNA転写がミトコンドリアDNAのヌクレオイドという高次構造を足場に密接に関連していることを示唆するものである(原著22)。

(iii) TFAM発現トランスジェニックマウスの解析

ミトコンドリアDNA機能の老化への影響を解析するために、TFAM発現トランスジェニックマウスの自然老化を観察した。老化のマーカーとして、記憶学習能力および運動能力などを24月齢と8週齢マウスで比較評価したが、野生型のマウスに比べ、TFAM発現トランスジェニックマウスでは、24月齢でも8週齢野生型マウスと殆んど同等の能力を維持しており、ミトコンドリアDNAの保護が、老化の進行を抑制できることをはっきりと示すことができた(原著2)。

(2) 検査診断システムの構築および患者検体の検査

(i) CVが5%以内のミトコンドリアDNAコピー数のPCR定量系を確立し、九州大学病院検査部ミトコンドリア病遺伝子診断システムの1つとして稼働している(原著5)。

(ii) ミトコンドリアDNA維持関連蛋白質の遺伝子配列決定系の確立

核DNAでコードされるミトコンドリアDNA維持に必須の蛋白質群 (TFAMやDNA polymerase gamma, TWINKL, ANT1) の遺伝子配列決定系を確立し、九州大学病院検査部ミトコンドリア病遺伝子診断システムの1つとして稼働している。

(iii) ミトコンドリア蛋白質に対する抗体の作製

ミトコンドリアDNAは核とは違う遺伝暗号を用いているために、合成ペプチドを用いて抗体作製を試みたが、実用可能な抗体は得られなかった。そこで、遺伝暗号を核と同じにな

るよう設計した約300bp程度の化学合成DNAを用いてより長いリコンビナント蛋白質作製を試みている所である。

(3) 体細胞ミトコンドリアDNA解析

九州大学の「久山町コホート研究」の中で集められた約3千例のDNAサンプルを用いて、ミトコンドリアDNAのD-loop領域、ND6領域の配列を決定した。現在、糖尿病発症と関連付けてのコホート解析をしている所である。

上記のように、この3年間に於いて一部を除きほぼ所期の計画を達成することができた。

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29件)

(原著、すべて査読あり)

1. Ohgaki, K., Kanki, T., Fukuoh, A., Kurisaki, H., Aoki, Y., Ikeuchi, M., Kim, S.H., Hamasaki, N. and Kang, D. (2007) The C-terminal tail of mitochondrial transcription factor a markedly strengthens its general binding to DNA. **J Biochem**, 141, 201-211.
2. Hayashi, Y., Yoshida, M., Yamato, M., Ide, T., Wu, Z., Ochi-Shindou, M., Kanki, T., Kang, D., Sunagawa, K., Tsutsui, H. et al. (2008) Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. **J Neurosci**, 28, 8624-8634.
3. Hojo, S., Tsukimori, K., Kinukawa, N., Hattori, S., Kang, D., Hamasaki, N. and Wake, N. (2008) Decreased maternal protein S activity is associated with fetal growth restriction. **Thromb Res**, 123, 55-59.
4. Ohga, S., Ideguchi, H., Kato, J., Ishimura, M., Takada, H., Harada, N., Kawanaka, H., Hattori, Y., Kang, D., Hamasaki, N. et al. (2008) Thromboembolic Complications in Splenectomized Patients with Dominantly Inherited beta-Thalassemia. **Acta Haematol**, 120, 31-35.
5. Urata, M., Koga-Wada, Y., Kayamori, Y. and Kang, D. (2008) Platelet contamination causes large variation as well as overestimation of mitochondrial DNA content of peripheral blood mononuclear cells. **Ann Clin Biochem**, 45, 513-514.
6. Fukuoh, A., Ohgaki, K., Hatae, H., Kuraoka, I., Aoki, Y., Uchiumi, T., Jacobs, H.T. and Kang, D. (2009) DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase. **Genes Cells**, 14, 1029-1042.
7. Hokazono, E., Osawa, S., Nakano, T., Kawamoto, Y., Oguchi, Y., Hotta, T., Kayamori, Y., Kang, D., Cho, Y., Shiba, K. et al. (2009) Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-III. **Ann Clin Biochem**, 46, 296-301.
8. Ishimura, M., Saito, M., Ohga, S., Hoshina, T., Baba, H., Urata, M., Kira, R., Takada, H., Kusuhara, K., Kang, D. et al. (2009) Fulminant sepsis/meningitis due to Haemophilus influenzae in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy. **Eur J Pediatr**, 168, 673-677.
10. Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M. and Klionsky, D.J. (2009) Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. **Dev Cell**, 17, 98-109.
10. Kanki, T., Wang, K., Baba, M., Bartholomew, C.R., Lynch-Day, M.A., Du, Z., Geng, J., Mao, K., Yang, Z., Yen, W.L. et al. (2009) A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. **Mol Biol Cell**, 20, 4730-4738.
11. Ono, M., Aoki, Y., Masumoto, M., Hotta, T., Uchida, Y., Kayamori, Y. and Kang, D. (2009) High-dose penicillin G-treatment causes underestimation of serum albumin measured by a modified BCP method. **Clin. Chim. Acta**, 407, 75-76.
12. Pohjoismaki, J.L., Goffart, S., Tynismaa, H., Willcox, S., Ide, T., Kang, D., Suomalainen, A., Karhunen, P.J., Griffith, J.D., Holt, I.J. et al. (2009) Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks. **J**

- Biol Chem*, 284, 21446-21457.
13. Sumitani, M., Kasashima, K., Ohta, E., Kang, D. and Endo, H. (2009) Association of a novel mitochondrial protein M19 with mitochondrial nucleoids. *J Biochem*, 146, 725-732.
 14. Schumann, G., Canalias, F., Joergensen, P.J., Kang, D. and Klauke, R. (2010) IFCC reference procedures for catalytic concentration measurement of enzymes: Corrigendum, notes and useful advice. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48, 615-621
 15. Shiota, M., Eto, M., Yokomizo, A., Tada, Y., Takeuchi, A., Masubuchi, D., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Kuroiwa, K., Uchiumi, T. et al. (2010) Sorafenib with doxorubicin augments cytotoxicity to renal cell cancer through PERK inhibition. *Int J Oncol*, 36, 1521-1531.
 16. Shiota, M., Song, Y., Yokomizo, A., Tada, Y., Kuroiwa, K., Eto, M., Oda, Y., Inokuchi, J., Uchiumi, T., Fujimoto, N. et al. (2010) Human heterochromatin protein 1 isoform HP1{beta} enhances androgen receptor activity and is implicated in prostate cancer growth. *Endocr Relat Cancer*.
 17. Shiota, M., Yokomizo, A., Kashiwagi, E., Tada, Y., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Kuroiwa, K., Uchiumi, T., Seki, N. and Naito, S. (2010) Foxo3a expression and acetylation regulate cancer cell growth and sensitivity to cisplatin. *Cancer Sci*.
 18. Shiota, M., Yokomizo, A., Masubuchi, D., Tada, Y., Inokuchi, J., Eto, M., Uchiumi, T., Fujimoto, N. and Naito, S. (2010) Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus. *Prostate*, 70, 540-554.
 19. Shiota, M., Yokomizo, A., Tada, Y., Inokuchi, J., Kashiwagi, E., Masubuchi, D., Eto, M., Uchiumi, T. and Naito, S. (2010) Castration resistance of prostate cancer cells caused by castration-induced oxidative stress through Twist1 and androgen receptor overexpression. *Oncogene*, 29, 237-250.
 20. Shiota, M., Yokomizo, A., Tada, Y., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Kuroiwa, K., Uchiumi, T., Fujimoto, N., Seki, N. and Naito, S. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Mol Endocrinol*, 24, 114-127.
 21. Takazaki, S., Abe, Y., Yamaguchi, T., Yagi, M., Ueda, T., Kang, D. and Hamasaki, N. (2010) Mutation of His 834 in human anion exchanger 1 affects substrate binding. *Biochim Biophys Acta*, 1798, 903-908.
 22. Uchiumi, T., Ohgaki, K., Yagi, M., Aoki, Y., Sakai, A., Matsumoto, S. and Kang, D. (2010) ERAL1 is associated with mitochondrial ribosome and elimination of ERAL1 leads to mitochondrial dysfunction and growth retardation. *Nucleic Acids Res*.
 23. Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., Hamasaki, N. and Mitsuoka, K. (2010) Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals. *J Struct Biol*, 169, 406-412.
 24. Yamaguchi, T., Ikeda, Y., Abe, Y., Kuma, H., Kang, D., Hamasaki, N. and Hirai, T. (2010) Structure of the membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography. *J Mol Biol*, 397, 179-189.
 25. Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Eriguchi, Y., Nagasaki, Y., Shimono, N. and Kang, D. (2010) Clonal spread in Eastern Asia of ciprofloxacin-resistant Escherichia coli serogroup O25 strains, and associated virulence factors. *Int J Antimicrob Agents*, 35, 444-450.
 26. Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Harada, Y., Kadowaki, M., Shimono, N. and Kang, D. (2010) Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli strains in Asia. *Int*

J Antimicrob Agents, 35, 387-391.

(総説、すべて査読あり)

1. Kang, D., Kim, S.H. and Hamasaki, N. (2007) Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. **Mitochondrion**, 7, 39-44.
2. Fukuoh, A. and Kang, D. (2009) Methods for Assessing Binding of Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) to DNA. **Methods Mol Biol**, 554, 87-101.
3. Kanki, T., Kang, D. and Klionsky, D.J. (2009) Monitoring mitophagy in yeast: the Om45-GFP processing assay. **Autophagy**, 5, 1186-1189.

[学会発表](計5件)

(国際学会招待講演)

1. D. Kang: Mitochondria: genome and ROS “**Summer School of Society of Free Radical Research International**” (2009, Niigata)
2. D. Kang: Importance of Mitochondrial Genome in Cellular Functions “**The 21st Annual Meeting of the Korean Society of Molecular and Cellular Biology**” (2009, Seoul, Korea)
3. D. Kang: Promoter-independent RNA synthesis activity of human mitochondrial RNA polymerase “**The 7th European Meeting on Mitochondrial Pathology**” (2008, Stockholm, Sweden)
4. D. Kang: Primase-like function of Mitochondrial RNA Polymerase “**ScandoMit2007**” (2007, Teisko, Finland)
5. D. Kang: Importance of mtDNA Nucleoid in Maintenance of mtDNA and Prevention of Apoptosis “**The 4th Conference of the Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine**” (2007, Seoul Korea)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cclm/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

康 東天 (KANG DONGC)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 80214716

(2)研究分担者

栢森 裕三 (KAYAMORI YUZO)

九州大学・大学病院・技師長

研究者番号: 90398066

内海 健 (UCHIUMI TAKESHI)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 80253798

(2008 2009)

神吉 智丈 (KANKI TOMOTAKE)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 50398088

(2009)

福應 温 (FUKUOH ATSUSHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 80363365

(2007)

高柳 涼一 (TAKAYANAGI RYOICHI)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 30154917

(2007 2008)

古野 純典 (KONO SUMINORI)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 70128015

(2007 2008)

(3)連携研究者

高柳 涼一 (TAKAYANAGI RYOICHI)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 30154917

(2009)

古野 純典 (KONO SUMINORI)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 70128015

(2009)