

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23954

研究課題名(和文) Novel mitochondrial ribosomal genes are associated with mitochondrial disorders

研究課題名(英文) Novel mitochondrial ribosomal genes are associated with mitochondrial disorders

研究代表者

ヌルン・ナハール ボルナ (borna, nurun nahar)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：30849609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者の所属する研究グループではこれまでに約700例のミトコンドリア病患者の全エクソーム解析を行ない、10以上の新規ミトコンドリア病原因遺伝子を世界に先駆けて同定してきた。それら先行解析の中で、核にコードされたミトコンドリアリボソーム関連遺伝子のバリエーションが病因であることが示唆された症例が5例あった。本研究課題では、さらに詳細な遺伝子や遺伝子発現解析、遺伝子機能解析を行い、解析した3つ全てのバリエーションがミトコンドリア病の原因である可能性が強く支持された。それらの遺伝子はこれまでにミトコンドリア病との関連報告はなく、新規のミトコンドリア病原因遺伝子の同定に繋がる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア病は様々な臓器、年齢で発症する代謝疾患の一つであり、核・ミトコンドリアゲノム両方のバリエーションが病因となりうる。現在までに根本的治療法は確立されておらず、発症の分子機構の解明は治療・診断双方の面から重要である。本研究課題では核にコードされたミトコンドリアリボソーム関連遺伝子が新規のミトコンドリア病原因遺伝子として強く示唆された。ミトコンドリア病原因遺伝子としてのミトコンドリアリボソーム関連遺伝子の報告例は未だ少なく、本研究課題の成果により、新たなミトコンドリア病発症機構の理解、それらに応用した新たな治療法・診断法への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are essential organelles that produce ATP through the oxidative phosphorylation system (OxPhos). This study is focused on the identification of novel causative genes of mitochondrial disease. Our group has analyzed about 700 mitochondrial disease patients with whole-exome sequencing analysis. It predicted five novel candidate nuclear genes of the mitochondrial ribosomes. I attempted to validate whether three of these five genes are related to mitochondrial disease by mitochondrial functional assays, two genes were removed from the study due to unavailable samples. In this study, I performed genomic, expression, and functional analysis using samples derived patients for further clarifications of the variants. These results strongly suggest that these variants are causative for mitochondrial diseases. Since these genes have not been reported in mitochondrial diseases, this study potentially lead to identification of novel causative genes for mitochondrial diseases.

研究分野：小児科学

キーワード：Mitochondrial disease Mitoribosome OxPhos ATP

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは酸化的リン酸化により細胞内エネルギー源である ATP を産生する重要な細胞小器官である。酸化的リン酸化を担うタンパク質は核・ミトコンドリアゲノムの両方にコードされており、それらの遺伝子異常は様々な臓器に支障を来す先天代謝異常症であるミトコンドリア病を引き起こす (1)。

研究代表者の所属する研究グループではこれまでに約 700 例のミトコンドリア病患者の全エクソーム解析を行ってきており、10 以上の新規ミトコンドリア病原因遺伝子を世界に先駆けて同定してきた (図 1)。それらの先行解析の中で、核にコードされたミトコンドリアリボソーム関連遺伝子のバリエーションが病因であることが示唆された症例が 5 例あった。哺乳類のミトコンドリアリボソームは mtDNA にコードされた 12S リボソーム RNA (rRNA) と 16S rRNA に加え、核にコードされたタンパク質からなる小サブユニット (mt-SSU, 28S) とラージサブユニット (mt-LSU, 39S) で構成されている (図 2)。ミトコンドリアリボソームはミトコンドリア内でのタンパク質の合成に必須であり、酸化的リン酸化の活性制御に重要な役割を果たしている

(2, 3)。他グループの先行研究により、いくつかのミトコンドリアリボソーム遺伝子バリエーションがミトコンドリア病原因遺伝子として報告されているが (4, 5)、私たちの研究グループの先行研究により同定された 3 つのミトコンドリアリボソーム関連遺伝子はこれまでにミトコンドリア病との関連報告のない新規の遺伝子である。本研究課題では、これらの遺伝子のバリエーションに着目し、患者由来の皮膚線維芽細胞を用いた機能解析を行い、ミトコンドリア病の病因変異か否かを決定することを目的とした。

### 2. 研究の目的

ミトコンドリア病は様々な臓器、年齢で発症する代謝疾患の一つであり、核・ミトコンドリアゲノム両方のバリエーションが病因バリエーションとなりうる (6)。現在までに根本的治療法は確

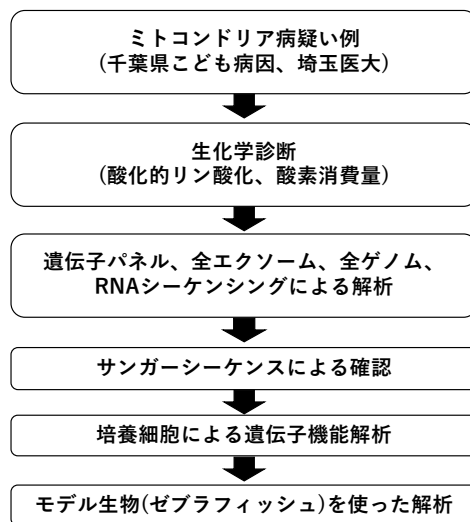


図 1 本研究課題の実験計画

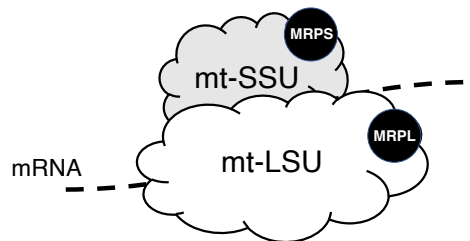


図 2 ミトコンドリアリボソームの構造

立されておらず、発症の分子機構の解明は治療・診断双方の面から重要である。本研究課題では新規のミトコンドリア病原因遺伝子を同定し、その発症機構を明らかにすることにより、治療や診断へ応用するための基盤を築くことを目的とする。

### **3. 研究の方法**

#### **(1) 全ゲノム解析・RNA 解析**

予備的な実験より得られたミトコンドリア病原因遺伝子候補のバリエーションをより詳細に検証するために、患者由来の血液を用いた全ゲノム解析や全エクソーム解析、皮膚線維芽細胞を用いた RNA シーケンス解析、サンガーシーケンスによる解析を行った。また、遺伝的な要因を調べるためにハプロタイプフェージングにより複合ヘテロ接合体を確認した。

#### **(2) 候補遺伝子の発現確認**

病因候補となったミトコンドリアリボソーム関連遺伝子の発現レベルを確認するために、健常者および患者由来の皮膚線維芽細胞を用いて qRT-PCR とウェスタンブロッティングを行った。同様に、ミトコンドリアリボソーム RNA の 12S と 16S の発現レベルを確認するために qRT-PCR を行った。

#### **(3) プロテオーム解析**

ミトコンドリアリボソーム関連遺伝子バリエーションがミトコンドリアにおけるタンパク質合成に与える影響を調べるために、患者細胞と健常者細胞の細胞抽出液を質量分析計により解析し、ミトコンドリアタンパク質の定量的解析を行った。

#### **(4) ミトコンドリアの機能解析**

健常者および患者由来の皮膚線維芽細胞より単離したミトコンドリアを用いて Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) を行い、ウェスタンブロッティングにより呼吸鎖複合体の会合状態を確認した。また、スクロース密度勾配遠心法によりミトコンドリアリボソームの会合状態を確認した。ATP 産生量はルシフェラーゼ発光を利用とした CellTiter-glo (promega)、ミトコンドリア呼吸能は細胞外フラックスアナライザー XFe96 (Agilent) を用い、ミトコンドリア機能を解析した。

#### **(5) レンチウイルスを用いた機能補完解析**

候補遺伝子の病因性をより詳細に検証するために、患者由来皮膚線維芽細胞にレンチウイルスを用いて野生型遺伝子を導入し安定発現株を樹立し、上述の種々の解析を行った。

#### 4. 研究成果

先行研究により行われたミトコンドリア病患者の遺伝子解析により、ミトコンドリアリボソーム関連遺伝子のバリエントが病因候補として見つかった。本研究課題において、全エクソーム、全ゲノム、RNA-seq やサンガーシーケンスなどにより詳細な検証を行ったところ、small mitochondrial ribosomal subunit (MRPS) の構成タンパク質 1 つと large mitochondrial ribosomal subunit (MRPL) の構成タンパク質の 2 つの遺伝子バリエントが同定された (それぞれ MRPS 患者、MRPL 患者 1、MRPL 患者 2 とする)。qRT-PCR やウエスタンブロットティングによりそれらの候補遺伝子の発現レベルを解析したところ、患者由来皮膚線維芽細胞において mRNA およびタンパク質レベルでの発現低下が確認された。さらに、qRT-PCR により 12S および 16S ミトコンドリア rRNA の低下も確認された。次に、スクロース密度勾配法によりミトコンドリアリボソームの会合状態を調べたところ、すべての患者細胞においてミトコンドリアリボソームの会合不全が観察された。

ミトコンドリアリボソームはミトコンドリアにおけるタンパク質合成に必須である。候補バリエントがミトコンドリアタンパク質量に与える影響を調べるために、患者細胞と健常者コントロール細胞よりミトコンドリアを単離し、質量分析計によりミトコンドリアタンパク質を網羅的に定量解析した。興味深いことに、全ての患者細胞においてミトコンドリアタンパク質だけでなく、核遺伝子コードのミトコンドリアタンパク質量の低下も観察された。これらの結果は、患者細胞では新規に同定したミトコンドリアリボソーム関連遺伝子のバリエントによるタンパク質の発現低下、それに伴うミトコンドリアリボソームの会合および機能異常が起きていることを示唆している。

ミトコンドリアでの ATP 産生はミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖複合体 I~V が重要な役割を果たし、ミトコンドリア病患者ではしばしば、複合体の会合不全が確認される。候補遺伝子バリエントのミトコンドリア機能への影響を調べるために、BN-PAGE を行ったところ、MRPS 患者では呼吸鎖複合体 I と IV、MRPL1 患者では IV、MRPL2 患者では I の会合異常が観察された。さらにミトコンドリア機能を詳細に調べるために、ATP 産生量や酸素消費量を測定したところ、3 患者由来全ての細胞において、コントロール細胞と比べた ATP 産生量と酸素消費量の低下が観察された。

以上の結果より、候補遺伝子バリエントの病因性が強く示唆されたので、患者由来皮膚線維芽細胞に野生型を発現させた安定発現株を用いて機能補完解析を行なった。BN-PAGE により呼吸鎖複合体の会合改善が見られ、ATP 産生量や酸素消費速度といったミトコンドリア機能の回復も観察された。

これらの結果より、予備的な結果より得られた病因候補遺伝子のバリエントが、ミトコン

ドリア病の原因であることが示唆された。これまでに *MRPL12* などのミトコンドリアリボソーム関連遺伝子がミトコンドリア病の関連遺伝子として報告されているが (5)、本研究課題で候補に挙げられた遺伝子は新規である (論文未発表のため遺伝子名は非公開)。今後は上記の実験を引き続き行い、研究成果として論文発表していく予定である。

本研究課題で得られた実験結果のまとめ			
	MRPS患者細胞	MRPL患者細胞1	MRPL患者細胞2
遺伝子解析	ヘテロ接合体?	複合ヘテロ接合体	ヘテロ接合体?
RNA発現	低下	低下	低下
タンパク質の発現量	正常	低下	低下
ミトコンドリア呼吸鎖複合体	CI, CIVが低下	CIVが低下	CIが低下
ミトコンドリアリボソーム	mt-SSU不安定化	mt-LSU不安定化	未実施
ATP産生	低下	低下	低下
酸素消費速度	- 非ミトコンドリア呼吸の上昇 - プロトンリークの上昇	- 基礎呼吸の低下 - 最大呼吸量の低下	- 基礎呼吸の低下 - 最大呼吸量の低下
ミトコンドリアタンパク量	低下	低下	低下
レンチウイルスによるレスキュー実験			
原因遺伝子産物	回復	回復	回復
ミトコンドリア呼吸鎖複合体	回復	回復	回復
ATP産生	回復	回復	回復
酸素消費速度	回復	回復	未実施

#### <参考文献>

1. Pearce S, Nezhich CL, Spinazzola A. Mitochondrial diseases: translation matters. *Mol Cell Neurosci*. 2013;55:1-12. Epub 2012/09/19. doi: 10.1016/j.mcn.2012.08.013. PubMed PMID: 22986124.
2. Amunts A, Brown A, Toots J, Scheres SHW, Ramakrishnan V. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science*. 2015;348(6230):95-8. doi: 10.1126/science.aaa1193. PubMed PMID: WOS:000352079500033.
3. Greber BJ, Boehringer D, Leibundgut M, Bieri P, Leitner A, Schmitz N, et al. The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature*. 2014;515(7526):283-6. Epub 2014/10/02. doi: 10.1038/nature13895. PubMed PMID: 25271403.
4. Murayama K, Shimura M, Liu Z, Okazaki Y, Ohtake A. Recent topics: the diagnosis, molecular genesis, and treatment of mitochondrial diseases. *J Hum Genet*. 2019;64(2):113-25. Epub 2018/11/22. doi: 10.1038/s10038-018-0528-6. PubMed PMID: 30459337.
5. Serre V, Rozanska A, Beinat M, Chretien D, Boddart N, Munnich A, et al. Mutations in mitochondrial ribosomal protein MRPL12 leads to growth retardation, neurological deterioration and mitochondrial translation deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(8):1304-12. Epub 2013/04/23. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.04.014. PubMed PMID: 23603806; PubMed Central PMCID: PMC3787750.
6. Chinnery PF. Mitochondrial Disorders Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle Copyright © 1993-2021, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Borna Nurun Nahar, Kishita Yoshihito, Abe Jiro, Furukawa Takuro, Ogawa-Tominaga Minako, Fushimi Takuya, Imai-Okazaki Atsuko, Takeda Atsuhito, Ohtake Akira, Murayama Kei, Okazaki Yasushi	4. 巻 143
2. 論文標題 NAD(P)HX dehydratase protein-truncating mutations are associated with neurodevelopmental disorder exacerbated by acute illness	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 e54 ~ e54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awaa130	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 該当する

1. 著者名 Borna Nurun Nahar, Kishita Yoshihito, Sakai Norio, Hamada Yusuke, Kamagata Koji, Kohda Masakazu, Ohtake Akira, Murayama Kei, Okazaki Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Leigh Syndrome Due to NDUFV1 Mutations Initially Presenting as LBSL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1325 ~ 1325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11111325	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------