

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21565

研究課題名（和文）活性硫黄の調節によるミトコンドリア機能再生への挑戦

研究課題名（英文）Modulation of mitochondrial function by reactive sulfur signaling

研究代表者

魏 范研（Wei, Fan-Yan）

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア病はミトコンドリア機能に関連する遺伝子の変異により多臓器機能が低下する難病である。現在、関連する遺伝子変異は400種以上報告されており、診断手法の進歩によりその数がさらに増加している。その遺伝背景の多様性により、ミトコンドリア病の発症機序に不明な点が多く、根本的な治療法も存在しない。本研究ではミトコンドリア機能に重要な活性硫黄シグナルに着目した機能的にスクリーニングを行い、ミトコンドリア機能の向上につながる活性硫黄調節因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、活性硫黄に由来するシグナルへの介入がミトコンドリアの機能回復につながることを示された。これにより、将来的に同調節因子を標的とする革新的なミトコンドリア病治療薬の創出、そしてミトコンドリア病の根本的な改善が可能であり、難病治療にブレークスルーをもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial disease is a rare genetic disease characterized by the catastrophic impairment of mitochondrial metabolism caused by pathogenic mutations in mitochondrial DNA or nuclear DNA. However, there is no effective treatment for mitochondrial disease. Recently, our research has discovered that the reactive sulfur species-mediated signaling is involved in the pathogenesis of mitochondrial disease. We found that the reactive sulfur species donate sulfur atoms to mitochondrial tRNA to form tRNA thiolation. Decrease of mitochondrial tRNA thiolation is responsible for the alteration of mitochondrial protein translation and the subsequent metabolic dysfunction. In the current study, we performed a comprehensive genetic screening using shRNA library targeting genes that are related to mitochondrial functions. We identified that knockdown of several genes can lead to the recovery of mitochondrial membrane potential and cell growth in a mitochondrial disease cell model.

研究分野：病態生理学

キーワード：RNA修飾 ミトコンドリア 代謝

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機能に関連する遺伝子の変異により多臓器機能が低下する難病である。現在、関連する遺伝子変異は 400 種以上報告されており、診断手法の進歩によりその数がさらに増加している。その遺伝背景の多様性により、ミトコンドリア病の発症機序に不明な点が多く、根本的な治療法も存在しない。現在、酸化ストレスの除去や血管拡張といったミトコンドリア障害の下流を対象とする治療開発が主流であるが、これらのアプローチはタンパク質翻訳と電子伝達といったミトコンドリアの根幹機能に効果が弱く、疾患の進行を阻止することができない。また、最近国内で承認されたタウリン製剤についても、Non-responder が多く存在する (J Neurol Neurosurg Psychiatry. 90, 529, 2019)。従って、ミトコンドリア病の病態を改善するためには、発症の根底にある原因に着目した新規治療法の開発が不可欠である。

2. 研究の目的

申請者は活性硫黄に由来するミトコンドリア tRNA の硫黄修飾の低下がミトコンドリア病発症に大きく寄与することを見出した【Cell Rep. 2018; Nat Commun. 2017; Nucl Acids Res. 2017; Cell Metab. 2015】。活性硫黄はミトコンドリア tRNA に硫黄修飾を付加し効率的なタンパク質翻訳に必要であり、その破綻がミトコンドリアタンパク質翻訳を障害しミトコンドリア病の発症につながる。加えて、活性硫黄は自身の電子を電子伝達系に供給し、酸素非依存的に ATP を産生する新たなエネルギーソースとしても機能する。そこで、本研究は活性硫黄ならびに活性硫黄由来のミトコンドリア tRNA 硫黄修飾を標的とするスクリーニングを行い、ミトコンドリア機能回復につながる分子・技術基盤の創出に挑戦する。

3. 研究の方法

ミトコンドリアに関連する遺伝子を標的とする shRNA ライブラリーをミトコンドリア病患者由来の培養細胞に導入し、さらに同細胞を低栄養条件下で培養することで、shRNA によって細胞増殖が回復できた細胞を選別する。次に細胞に含まれる shRNA を次世代シーケンサーで解析し、同 shRNA が標的とする遺伝子を同定する。同遺伝子の機能抑制が tRNA 硫黄修飾やミトコンドリアの機能への影響を検討するため、質量分析法による tRNA 硫黄修飾の解析、ミトコンドリアの膜電位、細胞増殖などを多角的に検討する。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア機能回復につながる遺伝子の同定

研究期間中にミトコンドリアに関連する 1158 種の遺伝子を標的とする shRNA ライブラリーを作製した。同ライブラリーをミトコンドリア DNA の A3243G 変異を有する培養細胞に導入した後、細胞を低グルコース培地で培養し、1 週間静置培養をおこなった。その結果、ほとんどの細胞が死滅し、一部の細胞がコロニーを形成して生き残った。次に、生き残った細胞から DNA ならびに RNA を精製し、DNA に組み込まれた shRNA の種類ならびにターゲット RNA を次世代シーケンサーで解析した。同スクリーニングを 3 回繰返した結果、3 回の実験に共通して効果が見られた 7 つの遺伝子を同定することに成功した。論文発表する前であり、また知財の関係上、本報告書では遺伝子名を開示しない。

(2) 同遺伝子抑制によるミトコンドリア機能回復のバリデーション

上記のスクリーニングで同定した遺伝子の効果を検証するため、それぞれの遺伝子に対する shRNA を作製し、ミトコンドリア DNA の A3243G 変異を有するミトコンドリア病モデル細胞に導入した。その結果、7 つの遺伝子のうち、ミトコンドリア内に局在し、ミトコンドリア内の硫黄代謝に関わる遺伝子の発現量を抑制した細胞において機能回復が認められた。具体的には、同遺伝子の発現を抑制した細胞では、コントロール細胞と比べて、ミトコンドリアの膜電位が顕著に上昇し、また増殖速度も速くなった。さらに、細胞内の活性硫黄量を蛍光プローブで検討した結果、活性硫黄量の上昇も認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogawa A, Nagiri C, Shihoya W, Inoue A, Kawakami K, Hiratsuka S, Aoki J, Ito Y, Suzuki T, Suzuki T, Inoue T, Nureki O, Tanihara H, Tomizawa K, Wei FY.	4. 巻 81
2. 論文標題 N6-methyladenosine (m6A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell	6. 最初と最後の頁 674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.12.038.	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 Nagayoshi Y, Chujo T, Hirata S, Nakatsuka H, Chen CW, Takakura M, Miyauchi K, Ikeuchi Y, Carlyle BC, Kitchen RR, Suzuki T, Katsuoka F, Yamamoto M, Goto Y, Tanaka M, Natsume K, Nairn AC, Suzuki T, Tomizawa K, Wei FY.	4. 巻 7
2. 論文標題 Loss of Ftsj1 perturbs codon-specific translation efficiency in the brain and is associated with X-linked intellectual disability.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 eabf3072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abf3072.	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
1. 著者名 Kanno A, Asahara SI, Furubayashi A, Masuda K, Yoshitomi R, Suzuki E, Takai T, Kimura-Koyanagi M, Matsuda T, Bartolome A, Hirota Y, Yokoi N, Inaba Y, Inoue H, Matsumoto M, Inoue K, Abe T, Wei FY, Tomizawa K, Ogawa W, Seino S, Kasuga M, Kido Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 GCN2 regulates pancreatic cell mass by sensing intracellular amino acid levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.128820	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 Tomizawa kazuhito, Wei Fan-Yan	4. 巻 168
2. 論文標題 Posttranscriptional modifications in mitochondrial tRNA and its implication in mitochondrial translation and disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 435 ~ 444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa098	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 Miwa Toru, Wei Fan-yan, Tomizawa Kazuhito	4. 巻 14
2. 論文標題 Cdk5 regulatory subunit-associated protein 1 knockout mice show hearing loss phenotypically similar to age-related hearing loss	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00791-w	査読の有無 無
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 Shi Sheng-Lan, Fukuda Hiroyuki, Chujo Takeshi, Kouwaki Takahisa, Oshiumi Hiroyuki, Tomizawa Kazuhito, Wei Fan-Yan	4. 巻 18
2. 論文標題 Export of RNA-derived modified nucleosides by equilibrative nucleoside transporters defines the magnitude of autophagy response and Zika virus replication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 478 ~ 495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15476286.2021.1960689	査読の有無 無
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 Ogawa Akiko, Wei Fan-Yan	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for preparation and measurement of intracellular and extracellular modified RNA using liquid chromatography-mass spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100848 ~ 100848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100848	査読の有無 無
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 Tsutsuki Hiroyasu, Zhang Tianli, Yahiro Kinnoyuki, Ono Katsuhiko, Fujiwara Yukio, Iyoda Sunao, Wei Fan-Yan, Monde Kazuaki, Seto Kazuko, Ohnishi Makoto, Oshiumi Hiroyuki, Akaike Takaaki, Sawa Tomohiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Subtilase cytotoxin from Shiga-toxicogenic Escherichia coli impairs the inflammasome and exacerbates enteropathogenic bacterial infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104050 ~ 104050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104050	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 魏范研
2. 発表標題 RNAモドミクスに基づく老化メカニズムの理解と応用
3. 学会等名 老化研究産学連携シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 魏范研
2. 発表標題 ミトコンドリア病の分子病態の理解と応用
3. 学会等名 日本ミトコンドリア学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 魏范研
2. 発表標題 ミトコンドリアtRNA修飾破綻によるミトコンドリア病発症機構
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 魏范研
2. 発表標題 Extracellular transport of modified RNA nucleosides and its pathophysiological implications
3. 学会等名 第94回日本生化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 魏范研
2. 発表標題 Modified RNA signaling and its pathophysiological implications
3. 学会等名 RNA modification and beyond (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 魏范研
2. 発表標題 RNA修飾が創発する生命原理の理解と応用-RNA metabolism and COVID-19
3. 学会等名 第99回日本生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 魏范研
2. 発表標題 モデル小動物用呼吸オミックス解析システムの構築と応用
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022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
研究 分 担 者	小川 亜希子 (Ogawa Akiko) (00868565)	東北大学・加齢医学研究所・助教 (11301)	

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
---------	---------