

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06865

研究課題名（和文）ミトコンドリアtRNA修飾核酸の網羅的測定による新規ミトコンドリア病診断法の確立

研究課題名（英文）Profiling of modified nucleosides in mitochondrial tRNAs for diagnosis of mitochondrial diseases

研究代表者

秋山 泰利（Akiyama, Yasutoshi）

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70635557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内の転移RNA（tRNA）に含まれる修飾核酸を網羅的に測定しプロファイリングを行い、未だ治療法の確立していないミトコンドリア病の病態解明や重症度予測などに役立てることを目的とした。ミトコンドリアtRNAを高純度で精製する手法を開発し、ミトコンドリアtRNAに特異的な修飾核酸の定量も可能になった。ミトコンドリア病の患者からiPS細胞を樹立し、さらに同一患者からヘテロプラスミーの異なるクローンを樹立した。以上より、今後iPS細胞を用いて、ミトコンドリア病におけるミトコンドリアtRNAの修飾核酸プロファイリングを行うための一連のプロトコルを確立することができた。

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未だ根本的な治療法が確立していない難病で、その病態に未解明な点が多いことも治療法の開発を妨げる要因の一つとなっている。本研究は、ミトコンドリア病の病態への関与が示唆されている、ミトコンドリアtRNAの修飾核酸を網羅的定量によりプロファイリングし、その情報をミトコンドリア病の病態解明に役立てようとするものである。ミトコンドリア病を、修飾核酸というこれまでにない新たな視点で評価するものであり、依然不明な点の多いミトコンドリア病の病態の理解に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to clarify the pathophysiology of mitochondrial diseases by comprehensive quantification of modified nucleosides in mitochondrial tRNAs. We established 1) the method to specifically purify mitochondrial tRNAs from total RNA, 2) the comprehensive quantification system for profiling the modified nucleosides in mitochondrial tRNAs, and 3) iPS cell clones derived from patients with mitochondrial diseases such as MELAS, all of which will be an important basis for the clinical application of our profiling method to patients with mitochondrial diseases.

研究分野：ミトコンドリア病、tRNA、細胞のストレス応答

キーワード：ミトコンドリア病 tRNA MELAS iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病は、細胞内のミトコンドリア DNA (mtDNA) の点変異や欠失などにより心筋症、脳卒中様症状、糖尿病、難聴などを引き起こす症候群の総称である。代表的な疾患として MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode) が挙げられ、その中でも A3243G 変異を有する患者が全 MELAS 患者の 80%程度を占めるとされる。近年 MELAS の脳卒中様症状に対する治療としてタウリン散の内服が認可されたものの、あくまでも症状を和らげる対症療法としての薬剤であり、新規治療法の確立のため病態の詳細な解明が求められている。

ミトコンドリア病はミトコンドリア機能不全を病態の基礎とするが、mtDNA の異常がどのようにミトコンドリア機能不全を引き起こすかは不明な点も多い。機序の一つとして有力視されているのが、転移 RNA (tRNA) の転写後修飾の阻害による tRNA の機能不全である。RNA には、構造の基礎となる核酸である A, U, G, C に加え、様々な転写後修飾を受けた修飾核酸が存在することが知られており、これまでに 100 種を超える修飾核酸が報告されている。tRNA は特に修飾核酸の種類や量が豊富な RNA 分子として知られている。これまで A3243G 変異を持つ MELAS 患者では、mtDNA に変異の存在する領域の転写産物であるロイシン tRNA (mt-tRNA^{Leu}) におけるタウリン修飾が阻害されると報告されている (PNAS 2005)。加えて、変異の存在しない他の複数のミトコンドリア tRNA の別の修飾 (2-メチルチオ化修飾) も阻害されることが報告されており (Cell Metab 2015)、ある修飾核酸の量や割合が変動すると他の修飾の形成に影響を及ぼす、修飾核酸間のクロストークが存在する可能性が示唆されている。興味深いことに、同じ mt-tRNA^{Leu} 上の変異でも変異部位の差異により症状が異なり、さらに修飾核酸のプロファイルも異なることが報告されている。申請者は、ミトコンドリア tRNA の修飾核酸プロファイルが、ミトコンドリア病の病態や重症度を反映する可能性を見出すことで、未だ不明な点の多いミトコンドリア病の診断や治療に貢献したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリア病患者のミトコンドリア tRNA 内に存在する修飾核酸の一斉定量を行い、様々なミトコンドリア病に特異的な修飾核酸の変動パターンを同定し、ミトコンドリア病の病態と修飾核酸変動との相互作用を明らかにするとともに、疾患ごとの修飾核酸のパターンをミトコンドリア病の診断、重症度分類、治療効果判定などの新たな手法として応用することを目的とした。

3. 研究の方法

①ミトコンドリアからの tRNAs の効率的な抽出、②LC-MS/MS による修飾核酸の一斉定量系の構築、③ミトコンドリア病患者から樹立したヘテロプラスミーの異なる iPS 細胞クローンの樹立、の 3 項目を柱とした。

①ミトコンドリア tRNA 特異的抽出法の確立

LC-MS/MS による修飾核酸定量のためのサンプル調整法を開発する。tRNA 特異的にオリゴを連結し成熟 tRNA のみを特異的に抽出する手法を開発し、これをミトコンドリア分画抽出と組み合わせることで、total RNA のほとんどを占める細胞質由来の RNA の混入を防ぎ、ミトコンドリア tRNA を高純度で含んだサンプルを調整できるプロトコルを確立する。測定の信頼性を高めるためには、オリゴのライゲーションやその後のプルダウン、ミトコンドリア tRNA の酵素的消化など、多くの過程において最適化が必要であり、まず培養細胞を用いて予備検討を行う。

②ミトコンドリア tRNA 特異的修飾を含めた修飾核酸一斉定量系の構築

ミトコンドリア tRNA には修飾の中間体も含めると少なくとも 15 種類以上の修飾核酸が存在するとされている (Nat Commun 2020)。その中にはタウリン修飾 (5-aurinomethyluridine; tm5U, 5-aurinomethyl-2-thiouridine; tm5s2U) や 2-メチルチオ化修飾 (2-methylthio-N6-isopentenyladenosine; ms2i6A) など、mt-tRNA に特異的に存在する修飾も含まれる。これらを含めた修飾核酸の一斉定量を可能にするため、定量に必要な内部標準物質と安定同位体の合成を進める。

③同一 MELAS 患者由来でヘテロプラスミーの異なる iPS 細胞クローンの樹立

A3243G 変異は、MELAS の原因として最も高頻度であることから精力的に研究が進められて

おり、またタウリン修飾や2-メチルチオ化修飾の形成が阻害されると報告されていることから、本研究の解析系の妥当性確認のためにも最適な評価対象と考えられる。A3243G 変異を持つ MELAS 患者の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、MELAS の病態解明のための疾患モデル細胞を確立する。また、同じ患者由来であっても、クローン毎に変異ミトコンドリアを持つ割合（ヘテロプラスミー）が異なることを確認している。変異ミトコンドリアの比率依存的な修飾核酸の変動を明らかにするため、異なるヘテロプラスミーのクローンを樹立する。さらにこの iPS 細胞を心筋細胞などに分化させることで、MELAS の病態（心筋細胞であれば心筋症）のモデル細胞として確立させる。

4. 研究成果

①ミトコンドリア tRNA 特異的抽出法の確立

1) 成熟 tRNA 特異的抽出法の開発

サンプル調整においては、さまざまな RNA 分子を含む total RNA から、高純度のミトコンドリア tRNA を抽出する必要がある。tRNA の精製は一般的に電気泳動の泳動度を指標に行われるが、同じ 75 塩基程度の小分子 RNA が混入してしまう問題がある。また電気泳動とその後のゲルの切り出しは煩雑であり、臨床応用にとっては障壁となることが予測される。そこで、成熟 tRNA に特異的に結合するオリゴを用いたライゲーションを行い、オリゴに付加されたビオチンをストレプトアビジンビーズでプルダウンすることで、高純度の tRNA 分画を精製する方法を開発した（図 1）。面倒な電気泳動やゲルの切り出しが不要なプロトコルとなっているのが大きな特徴である。連結されるオリゴ（計 24 塩基長）は 2 塩基を除いて全て DNA 成分でできており、測定値に与える影響はほぼ無視できる。

開発したこの手法で total RNA から tRNA 分画を抽出し、核酸染色とノザンプロットで評価したところ、成熟 tRNA のみが高純度で抽出されていた（図 2）。ミトコンドリア tRNA に対するノザンプロットでは、オリゴが連結され、通常より長くなったミトコンドリア tRNA が検出されたことから、この手法はミトコンドリア tRNA の特異的抽出においても有用であることが確認された。

今回開発した方法は、tRNAs の高次構造（tRNA の 3'-CCA 末端）特異的に結合する DNA オリゴと成熟 tRNAs を連結させるものである。本研究の予備検討としてこの手法の最適化を行い、さらにこの手法を用いて、tRNAs の 3'-CCA 末端が細胞のストレスにより切断されうることを明らかにした。この結果は本研究の重要な基礎データとなるものであり論文として報告を行なった（*Front Mol Biosci* 2022）。

2) ミトコンドリア分画抽出法の最適化

申請者が開発したサンプル調整法は、成熟 tRNA 特異的プルダウンを用いたものであるため、tRNA 以外の RNA 分子（特に total RNA の大部分を占めるリボソーム RNA など）の混入は最小限に抑えられる。従って、高純度のミトコンドリア tRNA サンプルを調整するためには、細胞質の tRNA 成分を可能な限り除外することが最重要となる。細胞質成分の除去の効率化と、ミトコンドリア分画の収量の増加を指標に検討を行い、市販のミトコンドリア抽出キットと比較し、細胞質 RNA 成分の混入が少なく、ミトコンドリア RNA の収量が大幅に改善した抽出プロトコルを開発した（図 3）。この手法で抽出したミトコンドリア分画 RNA を用いて、1) の成熟 tRNA 特異的プルダウンを行うこと

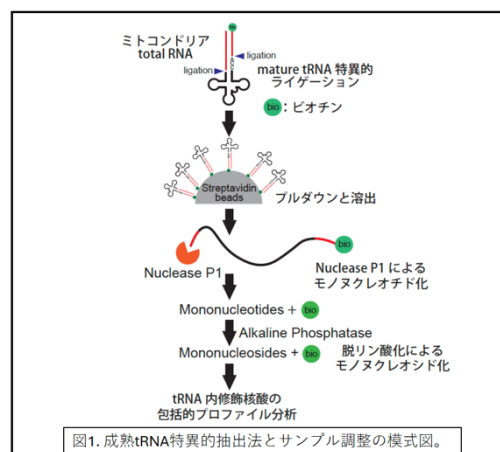


図1. 成熟tRNA特異的抽出法とサンプル調整の模式図。

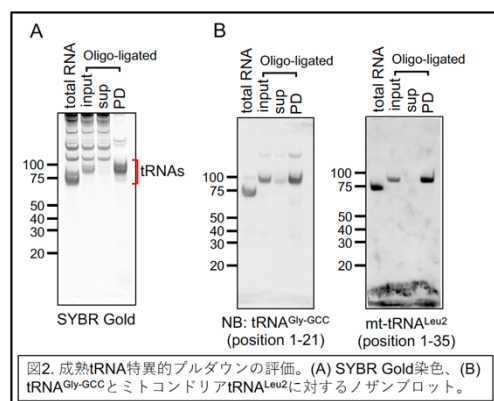


図2. 成熟tRNA特異的プルダウンの評価。(A) SYBR Gold染色、(B) tRNA^{Gly-GCC}とミトコンドリアtRNA^{Leu2}に対するノザンプロット。

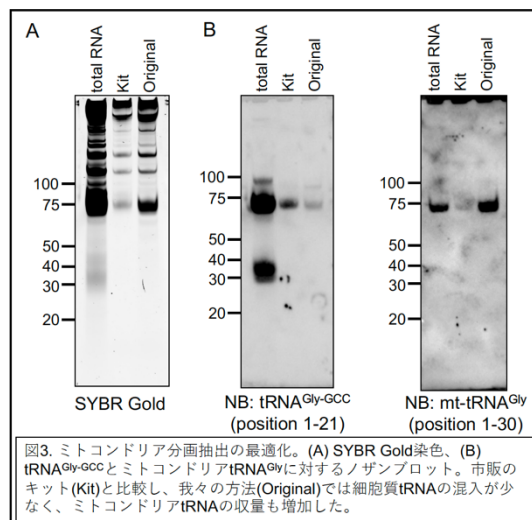


図3. ミトコンドリア分画抽出の最適化。(A) SYBR Gold染色、(B) tRNA^{Gly-GCC}とミトコンドリアtRNA^{Gly}に対するノザンプロット。市販のキット(Kit)と比較し、我々の方法(Original)では細胞質tRNAの混入が少なく、ミトコンドリアtRNAの収量も増加した。

により、total RNA から高純度でミトコンドリア tRNA のみを抽出し、LC-MS/MS の測定サンプルを調整するプロトコルを確立することができた。

②ミトコンドリア tRNA 特異的修飾を含めた修飾核酸一斉定量系の構築

1) 成熟 tRNA 分画を用いたプレリミナリー解析

まず成熟 tRNA 分画と total RNA からそれぞれサンプルを調整し (図 1 参照)、LC-MS/MS で一斉定量を行った。それぞれの修飾核酸濃度は非修飾核酸濃度で補正し、total RNA 分画での存在量を 1 としたときの tRNA 分画での存在比を算出した (図 4)。total RNA のうち、およそ 15%は tRNA とされており、tRNA のみに存在する修飾核酸は理論上、total RNA 分画に対する tRNA 分画での存在比が 15% : 100%で、およそ 7 となることが予想される。実際、tRNA に特異性が高いと考えられている修飾核酸は、理論値の 7 に近い値を取っていた。これらの結果より、開発した成熟 tRNA 抽出法が有用であること、さらに本測定系を用いて、修飾核酸のプロファイリングが異なるサンプルを明確に区別できることが示唆された。

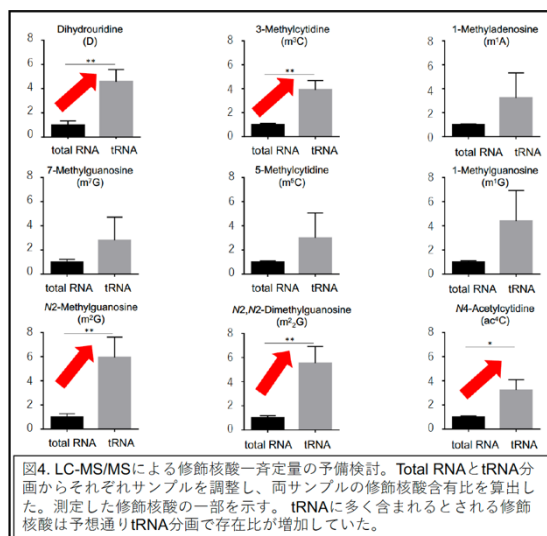


図4. LC-MS/MSによる修飾核酸一斉定量の予備検討。Total RNAとtRNA分画からそれぞれサンプルを調整し、両サンプルの修飾核酸含有比を算出した。測定した修飾核酸の一部を示す。tRNAに多く含まれるとされる修飾核酸は予想通りtRNA分画で存在比が増加していた。

2) ミトコンドリア tRNA 修飾核酸の測定

ミトコンドリア tRNA 特異的な修飾核酸の定量系を確立するため、 $\text{tm}5\text{s}2\text{U}$ 、 $\text{ms}2\text{i}6\text{A}$ 、 $\text{tm}5\text{U}$ 、 $\text{f}5\text{C}$ といった、ミトコンドリア特異的修飾核酸の安定同位体の合成に成功し、これらの精密定量が可能となった。しかしながら現時点では感度の問題から、培養細胞を用いてもこれらの検出のためには大量の細胞を必要とすることが課題となっている。引き続き感度改善のための測定条件や測定方法の検討を進め、実用性の向上を目指す。

③同一 MELAS 患者由来でヘテロプラスミーの異なる iPS 細胞クローンの樹立

iPS 細胞クローンの樹立に関しては、MELAS 患者由来の iPS 細胞で、異常ミトコンドリアの割合が 0%と約 80%のクローンを樹立し、いずれもトロポニン陽性率を指標として 80%程度の心筋誘導効率が得られている。しかしながら現時点では、LC-MS/MS の感度の問題から、誘導心筋におけるミトコンドリア tRNA の修飾核酸の測定には至っていない。LC-MS/MS の感度を飛躍的に改善させることは困難なため、心筋への誘導と比較し細胞数を確保しやすい血管平滑筋への誘導を行い、血管平滑筋におけるミトコンドリア tRNA の修飾核酸プロファイリングを、今後パイロット試験として行なっていく予定である。

iPS 細胞の分化に関しては、ヘテロプラスミーの異なるクローンを心筋細胞、血管平滑筋細胞、膵 β 細胞、肝細胞など、さまざまな細胞に分化させ解析を行う道筋が立った。ヘテロプラスミーの異なるクローンを比較することで、細胞内の変異ミトコンドリアの割合がミトコンドリア病の病態に与える影響を検討することが可能であるため、今後本研究で得られた成果をミトコンドリア病の病態解明、および新規ミトコンドリア病治療法の開発に発展させていく。

(その他の研究成果)

本研究に並行して、tRNA 断片を介した細胞のストレス応答について研究を進め、ストレスにて切断された tRNA 断片が、小胞体ストレス応答などにおいて機能する RNA リガーゼ(RTCB 複合体)により修復されること、さらに酸化ストレス下では RTCB の抑制により修復が抑制され tRNA 断片の産生量が増幅することを明らかにし、報告を行った (*IJMS* 2022)。また、tRNA 断片を介した細胞のストレス応答機序に関する総説を 2 報発表した (*WIREs RNA* 2023, *Antioxid Redox Signal* 2024)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akiyama Yasutoshi, Takenaka Yoshika, Kasahara Tomoko, Abe Takaaki, Tomioka Yoshihisa, Ivanov Pavel	4. 巻 23
2. 論文標題 RTCB Complex Regulates Stress-Induced tRNA Cleavage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232113100	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 Yamasaki Akitaka, Miyake Rikuto, Hara Yuta, Okuno Hideki, Imaida Takuya, Okita Kouki, Okazaki Shogo, Akiyama Yasutoshi, Hirotani Kenji, Endo Yuichi, Masuko Kazue, Masuko Takashi, Tomioka Yoshihisa	4. 巻 -
2. 論文標題 Dual targeting therapy against HER3/MET in human colorectal cancers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5673	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 Yamasaki Akitaka, Maruyama Takahashi Kumiko, Nishida Kento, Okazaki Shogo, Okita Kouki, Akiyama Yasutoshi, Suzuki Hideaki, Endo Yuichi, Masuko Kazue, Masuko Takashi, Tomioka Yoshihisa	4. 巻 -
2. 論文標題 CD98 regulates the phosphorylation of HER2 and a bispecific anti HER2/CD98 antibody inhibits the growth signal of human breast cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13016	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 Akiyama Yasutoshi, Lyons Shawn M., Fay Marta M., Tomioka Yoshihisa, Abe Takaaki, Anderson Paul J., Ivanov Pavel	4. 巻 9
2. 論文標題 Selective Cleavage at CCA Ends and Anticodon Loops of tRNAs by Stress-Induced RNases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 791094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2022.791094	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 Akiyama Yasutoshi, Ivanov Pavel	4. 巻 14
2. 論文標題 tRNA derived RNAs: Biogenesis and roles in translational control	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 WIREs RNA	6. 最初と最後の頁 e1805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/wrna.1805	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 Akiyama Yasutoshi, Ivanov Pavel	4. 巻 40
2. 論文標題 Oxidative Stress, Transfer RNA Metabolism, and Protein Synthesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 715 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2022.0206	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

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秋山泰利、阿部高明、富岡佳久、Pavel Ivanov
2. 発表標題 Cytoplasmic processing of human transfer RNAs
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹中慶香、秋山泰利、松本洋太郎、富岡佳久
2. 発表標題 RTCB ligase complex regulates stress-induced tRNA cleavage
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山泰利、竹中慶香、山田明日香、松本洋太郎、富岡佳久
2. 発表標題 tRNA cleavage in host cells by Mycoplasma contamination
3. 学会等名 第24回日本RNA学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田明日香、秋山泰利、竹中慶香、松本洋太郎、富岡佳久
2. 発表標題 Profiling of RNase L-mediated tRNA cleavage
3. 学会等名 第24回日本RNA学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹中慶香、秋山泰利、松本洋太郎、富岡佳久
2. 発表標題 Regulation of RNase L-induced RNA cleavage by RTCB ligase complex
3. 学会等名 第24回日本RNA学会
4. 発表年 2023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	豊原 敬文 (Toyohara Takafumi) (60594182)	東北大学・大学病院・准教授 (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		
米国	Brigham and Women's Hospital	Boston University	