

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870545

研究課題名(和文)ミトコンドリア-小胞体相互作用とミトコンドリア病発症メカニズムの関連の解明

研究課題名(英文) Analysis of the relationship between the loss of ER-mitochondria interaction and mitochondrial diseases

研究代表者

木下 善仁 (Kishita, Yoshihito)

埼玉医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20634398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ミトコンドリア病の新規原因遺伝子の発見および新たな疾患発症メカニズムの解明を目的としている。特に小胞体(ER)とミトコンドリアの接触点(MAM)に局在するタンパク質に着目し、ERを介した新たな疾患発症メカニズムの解析を目指した。エクソーム解析からMAMとの関連が示唆されているOCIAD2の変異を同定した。患者線維芽細胞ではOCIAD2のmRNAとタンパク質の両方の発現が顕著に減少していた。また、患者細胞では、ミトコンドリアの異常な伸長を認めた。これらのことから、OCIAD2変異を持つ患者ではミトコンドリアの分裂異常が原因となって、ミトコンドリア機能不全が生じていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are essential for energy production through oxidative phosphorylation and are dynamic organelles that continuously undergo fusion and fission. Mutations in mitochondrial or nuclear genes cause mitochondrial dysfunction in various organs and energy generation disorders. To identify novel causative genes for mitochondrial disorders, we performed whole exome sequencing on affected subjects. I identified compound heterozygous variants in OCIAD2 gene whose product localizes at mitochondria and mitochondria-associated ER membrane (MAM). In the present study, I found apparent loss of protein probably due to the instability of mutant gene products. The elongated and tubular mitochondria were increased in the patient derived fibroblasts. siRNA-mediated knockdown of OCIAD2 also leads to mitochondrial interconnectivity and elongation. These findings indicate that mutations in OCIAD2 cause mitochondrial disorder and defects in mitochondrial fission/fusion.

研究分野：生物学・医歯薬学

キーワード：ミトコンドリア 小胞体 ミトコンドリア病 遺伝性疾患

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病は出生 5000 人に一人の割合で発症し、ミトコンドリア機能異常を呈する難治性疾患である。小児領域で発症するミトコンドリア病の 25% はミトコンドリア DNA に原因があるとされているが、残りは核遺伝子に原因があると考えられている。しかし、いまだに多くの核遺伝子異常は解明されておらず、病態の発生メカニズムも十分に理解されていないのが現状である。これまでにいくつかの研究グループがミトコンドリア関連遺伝子(ミトコンドリアゲノムにコードされた遺伝子および核ゲノムにコードされたミトコンドリア関連遺伝子)を対象とした大規模なエクソーム解析を行っているが (Calvo et al, 2010, Nat Genet; Calvo et al, 2012, Sci Transl Med; Lieberet al, 2013, Neurology) 彼らの患者集団の半分以上で原因遺伝子が同定されておらず、ミトコンドリア関連遺伝子以外にも原因があることが疑われている。申請者らの先行研究でも、150 例を超える患者のエクソーム解析を行ってきた。この解析では、全エキソンを対象としているため、ミトコンドリア関連遺伝子以外にも病因候補遺伝子を見出している。この中には、ミトコンドリア 小胞体 (ER; Endoplasmic reticulum) の接着点 (MAM、mitochondria-associated ER membrane) に局在するタンパク質をコードする遺伝子 (MAM 関連遺伝子) がいくつか含まれていた。本研究では、この MAM 関連遺伝子を新規ミトコンドリア病原因遺伝子であることを実験的に証明することで、ミトコンドリア病の新たな疾患発症メカニズムの概念を提唱できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリア病の新規原因遺伝子の発見および新たな疾患発症メカニズムの解明を目的とする。現在までに 250 近くのミトコンドリア病原因遺伝子が報告されているが、そのほとんどはミトコンドリア局在のタンパク質をコードしている。申請者らの先行研究では 150 を超えるミトコンドリア病患者を対象としたエクソーム解析を実施し、そこから病因候補遺伝子を同定した。本研究ではこのうち、ER とミトコンドリアの接触点に局在するタンパク質に着目し、ER を介した疾患発症メカニズムの解明を目指した。特に、エクソーム解析より同定された *OCIAD2* 遺伝子を持つ患者に焦点を当て、遺伝子機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1)患者線維芽細胞における *OCIAD2* 遺伝子発現の解析
患者線維芽細胞より RNA を回収し、mRNA 発現量を qRT-PCR で定量する。また、タンパク質の発現を確認するため、細胞抽出液を回収し、患者細胞における *OCIAD2* タンパク質発現量

をウエスタンブロットにより解析する。

(2)変異型遺伝子の発現解析

患者の持つ *OCIAD2* 変異を導入した発現ベクターを作成する。これを細胞に導入し、遺伝子発現効率を qRT-PCR およびウエスタンブロットにより評価する。また、変異タンパク質の細胞内局在を確認する。

(3)患者線維芽細胞のミトコンドリア呼吸鎖複合体酵素活性測定および呼吸鎖複合体形成の解析

患者線維芽細胞におけるミトコンドリア機能を評価するため、生化学的手法により呼吸鎖複合体酵素活性の測定を行う。また、呼吸鎖複合体形成の評価を行うため、Blue-native (BN) PAGE/ウエスタンブロットを行い、呼吸鎖複合体の存在量を確認する。

(4)患者線維芽細胞におけるミトコンドリア形態観察

患者線維芽細胞におけるミトコンドリア形態および動態の観察を行うため、MitoTracker 等の染色試薬でミトコンドリアを標識し、共焦点顕微鏡で観察を行う。また、リアルタイムの動態観察を行う。

(5)ER およびミトコンドリアに局在する蛍光タンパク質を用いた細胞内動態観察

患者線維芽細胞および正常線維芽細胞に ER-BFP および Mito-RFP を導入し、各オルガネラの蛍光観察を行う。また、*OCIAD2*-GFP を導入し、蛍光タンパク質の共発現により *OCIAD2* の細胞内局在を観察する。

(6)siRNA による遺伝子ノックダウン

OCIAD2 の遺伝子欠損による影響を観察するため、siRNA により *OCIAD2* のノックダウンを行う。また、ノックダウン細胞におけるミトコンドリア機能を評価するため、呼吸鎖複合体酵素活性測定と BN-PAGE を実施する。また、ミトコンドリアの形態観察を行う。

(7)遺伝子過剰発現による遺伝子機能相補実験

患者細胞に *OCIAD2* を過剰発現するベクターを導入し、*OCIAD2* 過剰発現によるミトコンドリア機能への影響を評価する。呼吸鎖複合体酵素活性測定やミトコンドリアの形態観察により、ミトコンドリア機能を確認する。

4. 研究成果

(1)患者線維芽細胞における *OCIAD2* 遺伝子の発現低下

患者線維芽細胞の *OCIAD2* タンパク質の発現はウエスタンブロットで検出できなかった。このことから、本解析で同定した *OCIAD2* 変異はタンパク質発現に影響を与えるものであると考えられた。

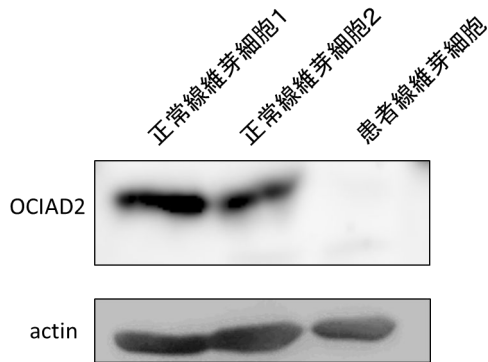


図1.患者線維芽細胞におけるOCIAD2タンパク質の消失

(2) 変異型タンパク質の不安定性

正常線維芽細胞に患者の持つ変異型 *OCIAD2* 遺伝子を導入した。強制発現系を使用したため、mRNAレベルは正常型 *OCIAD2* と同等であった。しかし、タンパク質は正常型に比べ、優位に低下していた。これらのことから、変異型タンパク質はタンパク質の安定性が低く分解が起きていると考えられた。

(3) ガラクトース培地での呼吸鎖機能の低下

患者線維芽細胞における呼吸鎖複合体活性を測定したところ、通常のグルコース培地では大きな変化は観察されなかった。しかし、ミトコンドリア呼吸鎖の利用が困難となるガラクトース培地においては、呼吸鎖 I および IV の活性が低下していた。

(4) 患者線維芽細胞における異常なミトコンドリアの伸長

ミトコンドリア形態の観察を行ったところ、患者線維芽細胞ではミトコンドリアが異常に長くなっており、また密につながったミトコンドリアが増えていた。これらのことから、*OCIAD2* の異常はミトコンドリアの分裂・融合の制御に関わることが示唆された。

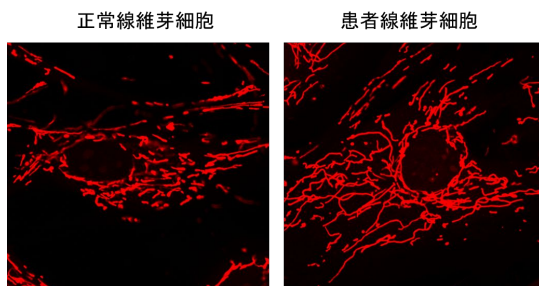


図2.患者線維芽細胞におけるミトコンドリアの異常な伸長

ミトコンドリアを MitoTrackerOrange により染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

(5) *OCIAD2* のミトコンドリア局在

ER-BFP および Mito-RFP、*OCIAD2*-GFP を同時に細胞に導入し、*OCIAD2* の細胞内局在を観察

した。*OCIAD2* はほとんどがミトコンドリアに局在しているようであったが、一部は ER に局在している可能性が示唆された。

(6) *OCIAD2* ノックダウン細胞でのミトコンドリア機能異常

OCIAD2 を HepG2 細胞にて、siRNA によりノックダウンした。ミトコンドリア呼吸鎖活性 (呼吸鎖 I および IV) は低下していた。また、患者細胞と同様に *OCIAD2* のノックダウンはミトコンドリアの異常な伸長を亢進させた。

(7) *OCIAD2* 過剰発現によるミトコンドリア分裂の亢進

OCIAD2 を過剰発現させたときの患者線維芽細胞のミトコンドリア機能を評価したが、呼吸複合体機能は回復していなかった。*OCIAD2* を過剰発現させた後ミトコンドリア形態を観察したところ、患者線維芽細胞や *OCIAD2* ノックダウン細胞とは逆にミトコンドリアの断片化が促進していた。*OCIAD2* の過剰発現では、逆に異常にミトコンドリア分裂が亢進し、そのためミトコンドリア機能は回復されなかったと考えられた。

以上のことから、今回新たに *OCIAD2* を新規ミトコンドリア病原因遺伝子として同定し、それがミトコンドリア分裂制御に関わる分子であることを明らかにした。当初は、MAM に着目した研究としてスタートしたが、*OCIAD2* に関しては、多くがミトコンドリアに局在することから、MAM よりもミトコンドリアでの機能が重要な因子と考えられた。

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2件)

(1) Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita-Sugahara Y, Nakachi Y, Kato H, Okuda A, Tamaru S, Bornha NN, Banskoya K, Aigaki T, Sato-Miyata Y, Ohnuma K, Suzuki T, Nagao A, Maehata H, Matsuda F, Higasa K, Nagasaki M, Yasuda J, Yamamoto M, Fushimi T, Shimura M, Kaiho-Ichimoto K, Harashima H, Yamazaki T, Mori M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS Genet.* 2016 Jan 7;12(1):e1005679. 査読有

(2) Kishita Y, Pajak A, Bolan NA, Marobbio CM, Maffezzini C, Miniero DV, Monné M, Kohda M, Stranneheim H, Murayama K, Naess K, Lesko N, Bruhn H, Mourier A, Wibom R, Nennesmo I, Jespers A, Govaert P, Ohtake A, Van Laer L, Loeys BL, Freyer C, Palmieri

F, Wredenberg A, Okazaki Y, Wedell A.
Intra-mitochondrial Methylation
Deficiency Due to Mutations in SLC25A26.
Am J Hum Genet. 2015 Nov 5;97(5):761-8.
査読有

〔学会発表〕(計3件)

(1)木下善仁, 鈴木聡美, 徳澤佳美, 入月浩美,
神田将和, 村山圭, 大竹明, 岡崎康司、
Mutations in a novel mitochondria-related
gene impaired mitochondrial
fission/fusion balance and caused
mitochondrial cytopathy、第15回日本ミト
コンドリア学会年会、2015年11月19日~20
日、福井県国際交流会館(福井県福井市)

(2)木下善仁, 鈴木聡美, 徳澤佳美, 入月浩美,
神田将和, 村山圭, 大竹明, 岡崎康、ミトコン
ドリアの分裂・融合の異常とミトコンドリア
細胞症を引き起こす新規ミトコンドリア関
連遺伝子の変異の同定と解析、第13回 RCGM
フロンティアシンポジウム、2015年10月30
日~31日、埼玉医科大学創立30周年記念講
堂(埼玉県日高市)

(3)木下善仁, 徳澤佳美, 神田将和, 水野洋介,
森山陽介, 菅原-山下泉, 田丸俊輔, 栃木秀乃,
上原奈津美, 仲地豊, 八塚由紀子, 入月浩美,
鈴木聡美, Nurun Nahar Borna, 平田智子, 的場
奈々, 加藤英政, 奥田晶彦, 森雅人, 安嶋まさ
み, 原嶋宏子, 山崎太郎, 村山圭, 大竹明, 岡崎
康司、ミトコンドリア呼吸鎖異常症の原因遺
伝子の包括的大規模解析 第37回日本分子生
物学会年会、2014年11月25日~27日、パ
シフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔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〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

木下 善仁 (KISHITA Yoshihito)

埼玉医科大学, 医学部, 研究員

研究者番号: 20634398