

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06935

研究課題名（和文）ミトコンドリアに内在する長鎖非コードRNAの同定と機能解析

研究課題名（英文）Studies on mitochondrial long noncoding RNA

研究代表者

本間 好 (Homma, Yoshimi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60192324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：正常C57BL/6マウスおよびその代謝性疾患モデル（C57BL/6-ob-, C57BL/6-db-, C57BL/6-NASH）の肝細胞精製ミトコンドリア標品に存在するncRNAをRNA-seq法にて網羅的に解析し、結果をGEOデータベースに登録した。RNAの内訳はmRNA（断片を含む）が92.5%、lncRNAが3.2%であった。未同定RNAが330種あった。Fish法にてmalat1やlncRNAが核およびミトコンドリアマトリックスに存在することを示す予備結果が得られた。ヒトHEK293細胞を用いて、呼吸鎖II複合体や酸化複合体に含まれるlncRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、RNAの細胞内の動きや新しい機能について新しい発見が相次いでいる。核内遺伝子の調節に関与するRNAの報告は膨大に存在するが、ミトコンドリアに関する記述は全く無く、データベースも存在しない。今回、マウスモデルの肝ミトコンドリアに含まれるRNA情報を網羅的に解析し、データベースに登録したことで、将来、この分野の研究におおきく貢献できる。また、RNAを用いてミトコンドリア機能を回復させることも現実的と考えられ、代謝疾患の新しい治療法の開拓に道を拓く可能性を包含する。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial were purified from hepatocytes of normal C57BL/6 mice and their metabolic disease models (C57BL/6-ob, C57BL/6-db, C57BL/6-NASH), and ncRNA present in the fractions was comprehensively analyzed by RNA-seq method, and the results were registered in the GEO database. The breakdown of RNA was 92.5% for mRNA (including fragments) and 3.2% for lncRNA. There were 330 unidentified RNAs. Preliminary results obtained by the Fish method showed the presence of malat1 and lncRNA in the nucleus and mitochondrial matrix were. Human HEK293 cells were also used to identify lncRNAs contained in the respiratory chain II complex and beta-oxidation complex.

研究分野：生体機能分子医化学

キーワード：ミトコンドリア RNA

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞エネルギー生成の大半を担う細胞小器官であり、酸化リン酸化による ATP 合成を行う一方、酸素呼吸に伴って生じる活性酸素種 (ROS) や他の代謝生成物の産生し、さらには細胞死因子の放出などを介してさまざまな細胞制御を行っている。近年、多様な非コード RNA (ncRNA) がミトコンドリア機能を制御することが明らかになった。特にマイクロ RNA (miRNA) については、がん、パーキンソン病、ある種の心臓疾患などにおいて、そのエピジェネティックな転写調節作用を介してミトコンドリアダイナミクスやアポトーシスを制御することが報告されている。パーキンソン病で miR-34b/c 発現低下が DJ-1 や Perkin の減少を誘導し、ミトコンドリア断片化を促し、引いては細胞死を誘導することが一例である。

一方、ミトコンドリアにも多様な ncRNA が存在することが知られている。これまでに、いくつかの長鎖非コード RNA (lncRNA) や miRNA の存在が報告されているが、それらの機能については未だに明らかにされておらず不明な点が多い。われわれは、先行研究で呼吸鎖 II 複合体及び酸化複合体中にある種の lncRNA が含まれることを見出し、その量が細胞の飢餓状態や ROS 生成の増加に伴って変動する可能性を示唆した。これらの知見は、ミトコンドリアに内在する lncRNA の機能は何か、という基本的な未解決の問題を提起した。すなわち、ミトコンドリアゲノムサイズに比して多種多様の lncRNA が存在するのは何故か、エピジェネティック作用以外の特異機能があるのではないかと、lncRNA が呼吸鎖複合体や酸化系複合体などに影響を及ぼし ROS 産生などを制御しているのではないかと、肥満や糖尿病などの病態によってミトコンドリア内 lncRNA の発現レベルが変化するのではないかと、という疑問である。これまでに、ミトコンドリアに存在する lncRNA に関する報告やデータベースは皆無である。

2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリアに存在する非コード RNA (ncRNA) を同定し、それらの機能を明らかにすることを目的とする。次の2方向から解析を進める。1) 正常および代謝性疾患モデルマウスの肝細胞ミトコンドリア精製標品に存在する ncRNA を RNA-seq 法にて網羅的に解析し、結果をデータベースとして登録することを目指す。さらに代謝性疾患で発現量が著しく変化する ncRNA 候補を選定し、相互作用分子の解析、および過剰発現や siRNA を用いたノックダウン等の方法によってそれらの機能を明らかにする。今回、モデルマウスとして正常 C57BL/6 のほかに、肥満モデルとして C57BL/6-ob/ob、糖尿病モデルとして C57BL/6-db/db、非アルコール性脂肪肝 (NASH) モデルとして C57BL/6-NASH を用いる。2) 呼吸鎖複合体 II 及び酸化複合体に含まれる lncRNA を RNA-seq 法にて解析し、siRNA を用いたノックダウン等の方法によってそれらの機能を明らかにする。また、lncRNA 発現用レンチウイルスベクターを作製し、マウス 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化モデルを用いて、lncRNA クローン発現の脂肪細胞分化や脂肪合成に与える効果を観察する。

3. 研究の方法

4種のマウス (C57BL/6 および C57BL/6-NASH、遺伝的バックグラウンドが異なる C57BL/6-db/db および C57BL/6-ob/ob、7週齢雄) より肝臓を摘出し、既報に従いシヨ糖密度勾配遠心法により肝ミトコンドリア分画を得た。ミトコンドリアの精製度を上げるために密度勾配遠心を繰り返し行った。同様に、SDHA-FLAG (呼吸鎖 II 複合体) または VLCAD-FLAG (酸化複合体) を発現したマウス 3T3 細胞およびヒト HEK293 細胞よりミトコンドリア分画を得た。さらに可溶化処理後、M2 beads にて各複合体を回収した。精製ミトコンドリア分画および各複合体より RNA を抽出し、rRNA を除去後に次世代シーケンサーにて RNA-seq 解析を行った。代表的な lncRNA について蛍光 FISH プローブを作製してミトコンドリア内局在を観察した。また、lncRNA の機能を明らかにするために、過剰発現解析用のレンチウイルスベクターとノックアウト解析用の siRNA を作製し、それぞれの作用を酵素レベルおよび細胞レベルで解析した。

4. 研究成果

1) 網羅的 RNA 解析

正常および3種の代謝疾患モデルマウスの肝ミトコンドリア分画に含まれる約 37000 種余の RNA (rRNA を除く) を同定した。リード数を標準化処理した後、サンプル間の比較を行った。同定された RNA の内訳は mRNA (断片を含む) が 92.5%、lncRNA が 3.2%、miRNA が 2.9%、snoRNA などが 1.4%であった。未同定 RNA が 330 種あった。

アノテーションを付した解析情報を GEO データベースに登録した。表 1 に登録番号を示す。

表 1

C57BL/6 (正常)	GSM4815735
C57BL/6-ob/ob	GSM4815736
C57BL/6-NASH	GSM4815737
C57BL/6-db/db	GSM4815738

表2 4種マウス間の lncRNA 発現量の比較

Gene ID	TMM (normalized read count)				Gene symbol
	N	ob	NASH	db	
ENSMUSG00000097171	1.88	5.75	2.78	1.97	AC136316.1
ENSMUSG00000085438	4.56	4.83	4.61	4.63	1700020I14Rik
ENSMUSG00000097312	1.77	3.47	5.55	2.47	AC131780.3
ENSMUSG00000034764	3.14	0	2.93	0.77	1700006J14Rik
ENSMUSG00000056579	2.15	3.01	2.61	2.77	Tug1
ENSMUSG00000097121	1.56	2.38	0	1.39	AC131759.1
ENSMUSG00000021268	4.88	3.28	2.93	3.68	Meg3
ENSMUSG00000075511	2.88	1.33	2.19	2.58	1700001L05Rik
ENSMUSG00000092341	6.79	11.86	6.86	7.79	Malat1
ENSMUSG00000092274	3.37	11.99	2.92	6.54	Neat1

同定できた RNA の中で比較的発現が高かった lncRNA を表2に示す。同じ遺伝的バックグラウンドを持つ正常マウスと NASH マウスとの比較において発現量が2以上の lncRNA を表3に示す。

表3 発現が2倍以上異なる主な lncRNA

N/NASH > 2	N/NASH < 0.5
ENSMUSG00000086951	ENSMUSG00000087380
ENSMUSG00000063109	ENSMUSG00000073155
ENSMUSG00000021268	ENSMUSG00000097042
ENSMUSG00000084866	ENSMUSG00000097312
ENSMUSG00000097625	ENSMUSG00000093470
ENSMUSG00000087579	ENSMUSG00000087107
ENSMUSG00000071753	ENSMUSG00000097451

2) lncRNA の局在

精製ミトコンドリア画分に極めて多くの mRNA 断片が含まれている。また、主に核や核小体に存在すると考えられている snoRNA が認められた。これらの事実は、核や細胞質の RNA がミトコンドリア画分に混入している可能性が考えられたため、実際にミトコンドリア内に lncRNA が存在することを Fish 法にて観察した。malat1 などいくつかの lncRNA を選定し、それぞれに特異的な Fish プローブを作製した。これまでに得られた予備結果は、malat1 や lncRNA が核およびミトコンドリアマトリックスに存在することを示唆した。今後、RNA の細胞内分布をさらに詳しく解析し lncRNA がミトコンドリア膜間腔またはマトリックスに存在することを確実に証明する必要がある。

当初、ミトコンドリア機能と密接に関連している lncRNA を選定し、各 lncRNA について、miRNA を用いて特に活性酸素の産生や脂肪細胞の分化を指標にした細胞機能への影響を解析する計画を立てていた。しかし、ミトコンドリア内の lncRNA だけをノックダウンする方法が無いことから、研究を保留した。

一方、malat1 について過剰発現用のレンチウイルスベクターを作製した。これを用いて malat1 の過剰発現の活性酸素の産生や脂肪細胞の分化への影響を評価した。しかし、これまでに有意な影響を検出できていない。

3) 呼吸鎖 II 複合体および 酸化 VLCAD 複合体に含まれる lncRNA

マウス 3T3 細胞とヒト HEK293 細胞のミトコンドリア分画より呼吸鎖複合体 II および 酸化複合体を精製した。これらの複合体を弱く RNase 処理すると複合体そのものの量が減少し、さらにデヒドロゲナーゼ活性も 20 ~ 30% 減少することが明らかになった。この結果は、複合体形成や酵素活性の発現に RNA が必要であることを強く示唆した。そこで、これらの機能複合体に含まれる RNA を網羅的に解析した。

表4 酸化 VLCAD 複合体中に検出された主な lncRNA

Gene ID	Gene symbol
ENSG00000273420	CTD-2540B15.13
ENSG00000270132	WISP1-UT1
ENSG00000254887	CTC-378H22.1
ENSG00000235513	RP4-756G23.5
ENSG00000246640	RP11-1094H24.4
ENSG00000227060	LINC00629
ENSG00000267421	AC005498.3

表4にヒト **HEK293** 細胞から回収した 酸化 **VLCAD** 複合体中に検出された主な **lncRNA** を示す。これら7種全てについておのおの **miRNA** を作製し、**VLCAD-FLAG** を発現した **HEK293** 細胞に導入した。**VLCAD** 複合体を回収して複合体の量やデヒドロゲナーゼ活性を測定した結果、有意な影響は観察できなかった。同様の結果は、**SDHA** 呼吸鎖 **II** 複合体から得られた。これらの結果は、機能複合体と **lncRNA** との連関が単純ではない可能性を示している。今後はタグを結合させた **lncRNA**、例えば **lncRNA-FLAG** を合成し、これをベートに結合タンパク質を特定するなどの新しい方法で研究を進展させることができるかも知れない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------