

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06945

研究課題名(和文) ミトコンドリアにおける翻訳停滞解消機構およびその不全による病態発現機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of stalled-ribosome rescue factors in mitochondria

研究代表者

行木 信一 (Nameki, Nobukazu)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：80302959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの翻訳系では、2つの翻訳停滞解消因子ICT1及びC12orf65蛋白質が必須であるが、役割分担は未知である。一方、ヒトではC12orf65遺伝子に変異が起こると、ミトコンドリア病を引き起こす。本研究では、CRISPR/Casゲノム編集法によりC12orf65の欠損マウスの作製を行った。その結果、ヘテロ型な欠損マウスを得ることはできたが、ホモ型の欠損マウスは現在まで得ることができなかった。これは、ヒトの場合と異なりホモ型のマウスは胎生致死であることが示唆された。また、ヒトとマウスにおいて、C12orf65の機能不全に対するICT1の補完能に差異がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria have two stalled-ribosome rescue factors, ICT1 and C12orf65. Both proteins belong to a family of class I peptide release factors (RFs), all characterized by the presence of a GGQ motif. However, differences of roles in ribosome rescue between ICT1 and C12orf65 remain elusive. Loss of function of the c12orf65 gene causes a mitochondrial translation defect, leading to encephalomyopathy. In this study, we were trying to generate c12orf65 knockout mice by CRISPR/Cas9 technique. We obtained c12orf65-defective heterozygous mice, but we have not obtained any homozygous mice so far. These results suggest embryonic lethality of the homozygous mice. Thus, the functional redundancy between ICT1 and C12orf65 may differ among animals.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳停滞解消因子 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

細胞内では、転写が不完全に終わってしまうなどして終止コドンが失った結果、頻りに翻訳が滞ることが知られており(翻訳停滞)、その解消が必須である。しかし、ミトコンドリアでは独自の蛋白質合成系をもつにも関わらず、翻訳停滞に関する研究はこれまで注目されてこなかった。これに対し我々と英国のグループが独立に、ミトコンドリアでの翻訳停滞の解消に ICT1 蛋白質が直接関与することを明らかにした(Nameki et al. *J. Mol. Biol.* 2010; *Nucleic Acids Res.* 2011, 2014)。続いて、ミトコンドリアではさらにもう 1 つの翻訳停滞解消因子 C12orf65 蛋白質が必須なことが明らかとなったが、注目すべきは、この蛋白質の機能発見の端緒が、2 例のミトコンドリア脳髄病の患者のゲノム解析から C12orf65 遺伝子にフレームシフト変異が判明したことによる(Antonicka et al. *Am. J. Hum. Genet.* 2010)。我々は、ICT1 と C12orf65 の立体構造や活性部位に相同性があることを示し、さらに培養細胞を使った解析から、ICT1 と同様に C12orf65 の発現が抑制されるとアポトーシスが誘導され、またミトコンドリア活性、質量、膜電位に著しい影響を与えることを示した(Nameki et al. *Proteins* 2012)。しかし、2 つの因子の生体内での詳細な機能と使い分けは未知である。

C12orf65 遺伝子の変異が原因となるミトコンドリア病は「複合型酸化リン酸化異常 (COXPD)」と現在分類されている。これまで約 15 人の患者(日本人 3 名を含む、遺伝性痙性対麻痺の患者から同定)が報告されているが、興味深いことは、C12orf65 遺伝子のフレームシフト変異によって生じる終止コドンの位置によって、その病態や重篤度(脳髄症、対麻痺、視神経萎縮、リー脳症、軸索神経障害、知的障害など)が異なっている点である(この遺伝子の場合、ナンセンス依存的 RNA 分解(NMD)による mRNA の分解はないことがわかっている)。一見すると、発現する蛋白質の長さが正常に近いほど症状は軽いと考えられたが、最近の論文では、それが単純に当てはまらないことが指摘されている(*Neurol. Genet.* 2017 他)。したがって、「C12orf65 遺伝子の発現領域が異なることで、なぜ病態や重篤度が異なるのか、どのような機序で様々な病態を生み出しているか」を細胞レベルだけでなく、組織・個体レベルで知ることは、この疾患の治療基盤を確立する上で必須である。

2. 研究の目的

蛋白質合成(翻訳)の滞りの解消機構は生物種によって異なる。ミトコンドリアの翻訳系では、2 つの翻訳停滞解消因子 ICT1 及び C12orf65 蛋白質が必須であることを示してきたが、どのような翻訳停滞状態が

生じ、それに対し 2 つの因子がどのように役割分担し機能しているのかは未知である。一方、ヒトでは C12orf65 遺伝子に変異が起こると、その位置により病態の異なるミトコンドリア病を引き起こす。本研究の目的は、CRISPR/Cas ゲノム編集法により C12orf65 の欠損領域が異なるマウスを複数作製し解析することで、解消機構不全によるミトコンドリア病の病態発現機構を解明し、さらにリボソームプロファイリングにより ICT1 あるいは C12orf65 依存的に解消される翻訳停滞解消状態(配列)を明らかにすることで、翻訳停滞解消機構の全容を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas ゲノム編集法による C12orf65 発現不全マウスの作製
CRISPR/Cas 法を使って、患者のゲノムで見ついている変異位置に対応するように変異導入することで、C12orf65 の発現領域が異なる複数の発現不全マウスを作製する。分担者である畑田は、この方法で複数の欠損マウスの作製に成功している(Hatada et al. *Sci. Rep.* 2014 など)。今回は、使用する gRNA 発現ベクターの設計・作製及び、ES 細胞を使った遺伝子破壊の効率チェックなどは行木が行い、受精卵へのベクター導入からマウスの繁殖までは畑田が行った。C12orf65 遺伝子に関しては、ヒトにおいては常染色体劣性遺伝なので、ヘテロなマウスを作製後、交配してホモマウスも得る。ヒトの疾患で確認されている症状を参考に、ホモおよびヘテロな発現不全マウスに対し、表現型解析(臓器・組織などの解剖学的解析、血液中の乳酸値など)、行動形態の解析(中枢神経症状、筋力低下、痙攣)そして脳の MRI 画像解析など行う。そして作製されたマウスに患者と同様な表現型が認められるかを検証する。

(2) リボソームプロファイリングによるミトコンドリアの「翻訳停滞プロファイル」の作成

本実験では、培養細胞あるいは作製したマウスの細胞(主に大脳、筋肉)から採取したミトコンドリアに対しリボソームプロファイリングを行い、ICT1 依存的に、あるいは C12orf65 依存的に翻訳停滞が解消される遺伝子をそれぞれ同定する。例えば C12orf65 の欠損の場合に得られてきた配列は、C12orf65 が存在しないために、翻訳の停滞が解消できずにリボソームが滞っている配列を示していると考えられる。これらと比較・統計的解析することで、ミトコンドリアでの「翻訳停滞プロファイル」を明らかにする。

方法は、細胞から分離してきたミトコン

ドリアに、クロラムフェニコールを加えることで mRNA 上にリボソームを固定させる。mRNA とリボソームの複合体を単離し(シヨ糖密度勾配法),ヌクレアーゼによりリボソームで保護されていない余分な配列を分解する。次に,ARTseq Ribosome Profiling Kit を用いてシーケンスライブラリーの調製を行い,イルミナ次世代シーケンサーによって配列を明らかにする。

4. 研究成果

[標的配列の選択と gRNA のデザイン]

Ensembl データベースより, c12orf65 遺伝子のゲノム配列を入手後, MIT が公開している CRISPR デザイン ツール (<http://crispr.mit.edu/>) を用いてエキソン翻訳配列から gRNA の標的候補配列を設計した。今回始めに設計したターゲットは, ミトコンドリア病患者の中でも症状が重い患者で起きていたフレームシフト変異と同等な変異が入るようにしたものである。これは活性部位である GGQ モチーフよりも上流に変異を与えるもので, 発現したとしても機能することはできない。

[ES 細胞でのノックアウトの効率検証]

前段階として, 上述の gRNA 配列を用いて ES 細胞での c12orf65 ノックアウトの効率を検証した。ノックアウト効率の算出には, あらかじめ標的配列が制限酵素サイトを含むように設計することで, ノックアウト処理を施した細胞のゲノム抽出, PCR, 電気泳動を行うと, 成功していた場合, 制限酵素サイトが変異するために切断されず, 変異していないものより上流にバンドを確認することができる(図1)。ES 細胞に対して, 上述の gRNA を用いて CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集を行い, ゲノム PCR を行った。その結果, 制限酵素処理に対し, 全く切断されていない株が存在した。これは CRISPR/Cas9 法による ES 細胞ノックアウト実験系を確立できたことを示す。

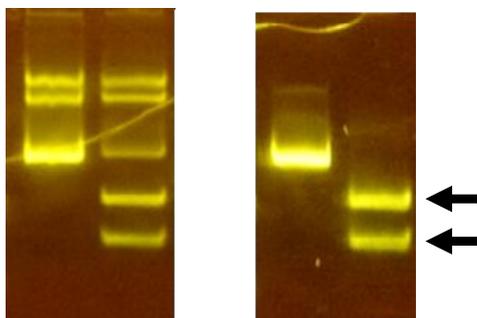


図1 ES細胞由来のゲノムPCR後の制限酵素処理の一例
番号は, サンプルの識別番号。左と右のレーンは, 制限酵素処理がされていないものとされたものをそれぞれ示す。矢印が切断されたバンドを示す。がゲノム編集の成功を示している。

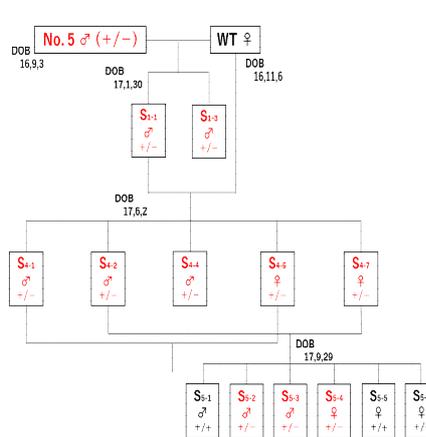


図2 系統樹の一例

[欠損マウスの作製]

ES 細胞で成功した gRNA の配列を用いて, マウス (C57BL/6J, 日本チャールスリバー) の受精卵に RNA のマイクロインジェクションを行った。92 個の受精卵へのインジェクションを行い, 74 個の生存を確認した。翌日, 2 細胞期まで発生した同 74 個の胚を偽妊娠マウスの卵管に移植した。20 日後に 22 匹の産仔が得られたことが確認された。その後離乳した 19 匹に対し genomic typing によって, C12orf65 遺伝子が欠損されているヘテロ型なマウスが 9 匹いることがわかった(図2)。しかし予想通り, ヒトの場合と同様に, 野生型と比較して表現系に差異は発見できなかった。

次に, ヘテロ型マウスである, オス 2 匹およびメス 2 匹を交配させ, ホモ型マウスの作製を行った。その結果, 得られた産仔を genomic typing したところ, ホモ型を得ることができなかった。これは, ヒトと異なりマウスではホモ型は胎生致死であることを示唆している。現在, 胎齢 10.5 ~ 14.5 日目の胎仔をすべて取り出して C12orf65 遺伝子の欠損状態を確認し, ホモ型が存在すればその細胞を解析する予定である。また, より軽度な症状を示すと考えられる配列の欠損のさせ方をしたマウスを作製することを検討している。

[リボソームプロファイリング]

リボソームプロファイリングの実験に関しては, 培養細胞の系で抗生物質によるミトコンドリア翻訳系での安定した停滞状態を引き起こすことを試みたが, 安定した翻訳停滞状態を再現できず, 抗生物質の種類などを変更して条件を検討している。

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4件)

Morimoto A, Kannari M, Tsuchida Y, Sasaki S, Saito C, Matsuta T, Maeda T, Akiyama M, Nakamura T, Sakaguchi

M, Nameki N, Gonzalez FJ, Inoue Y., An HNF4 -microRNA-194/192 signaling axis maintains hepatic cell function., J Biol Chem, 査読有, 292, 2017, 10574-10585.

doi: 10.1074/jbc.M117.785592. Epub 2017 May 2.

Kuwasako, K., Nameki, N., Tsuda, K., Takahashi, M., Sato, A., Tochio, N., Inoue, M., Terada, T., Kigawa, T., Kobayashi, N., Shirouzu, M., Ito, T., Sakamoto, T., Wakamatsu, K., Güntert, P., Takahashi, S., Yokoyama, S., Muto, Y., Solution structure of the first RNA recognition motif domain of human spliceosomal protein SF3b49 and its mode of interaction with a SF3b145 fragment., Protein Sci, 査読有, 26, 2017, 280-229.

doi: 10.1002/pro.3080. Epub 2016 Nov 27.

Kawamura, T., Hirata, A., Ohno, S., Nomura, Y., Nagano, T., Nameki, N., Yokogawa, T., Hori, H., Multisite-specific archaeosine tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) from *Thermoplasma acidophilum*, a thermo-acidophilic archaeon., Nucleic Acids Res., 査読有, 44, 2017, 1894-1908.

doi: 10.1093/nar/gkv1522. Epub 2015 Dec 31.

Himeno, H., Nameki, N., Kurita, D., Muto, A., Abo, T., Ribosome rescue systems in bacteria., Biochimie, 査読有, 114, 2015, 102-112.

doi: 10.1016/j.biochi.2014.11.014. Epub 2014 Nov 28.

〔学会発表〕(計9件)

Ryohei Kanemura, Takahiro Kudo, Nanami Watanabe, Sho Arai, Takuro Horii, Izuho Hatada and Nobukazu Nameki, Functional analysis of two stalled-ribosome rescue factors in mammalian and yeast mitochondria, 4th International Symposium of Gunma University Medical Innovation (GUMI2017), 2017.

仲澤真由美, 小林静香, 岸本宏基, 伊藤暁, 行木信一, 5' RACE 法による大腸菌 yaeQ-yaeJ-nlpE オペロン内部の転写開始点の同定, 平成 29 年度 日本生化学会関東支部例会, 2017.

Sho Arai, Takuro Horii, Hiroyuki Kogure, Izuho Hatada and Nobukazu Nameki, Functional analysis of stalled-ribosome rescue factors in mitochondria, 3rd International Symposium of Gunma University

Medical Innovation (GUMI2016) 2016. 小林静香, 仲澤真由美, 岸本宏基, 伊藤暁, 行木信一, 大腸菌 yaeQ-yaeJ-nlpE オペロンの内部プロモーターの機能解析, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.

井上楓音, 五月女侑洋, 今泉友紀, 行木信一, プロテオソーム解析による酵母ミトコンドリアの翻訳停滞解消因子の機能解明, 第 10 回 日本ゲノム微生物若手の会, 2016.

Nobukazu Nameki, Hiroyuki Kogure, Yoshihiro Handa, Masahiro Nagata, Naoto Kanai, Peter Güntert, Kenji, Kubota, Identification of residues required for stalled-ribosome rescue in the codon-independent release factor YaeJ., The 2016 joint annual meeting of the 21st Annual Meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan 18th Annual Meeting (RNA2016), 2016.

Shizuka Kobayashi, Akihiko Murasato, Sho Arai, Hiroyuki Kogure, Takuro Horii, Izuho Hatada and Nobukazu Nameki, Stalled-ribosome rescue factors are essential for mitochondrial function., 2nd International Symposium of Gunma University Medical Innovation (GUMI2015), 2015.

五月女侑洋, 井上楓音, 今井友紀, 行木信一, 酵母におけるミトコンドリア翻訳停滞解消因子の欠損株を用いた Flow Cytometry 解析, 第 9 回 日本ゲノム微生物若手の会, 2015.

村里旺彦, 小暮裕幸, 堀居拓郎, 浅川直紀, 畑田出穂, 行木信一, ミトコンドリアにおける翻訳停滞解消機構の解明, 平成 27 年度 日本生化学会関東支部例会, 2015.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://molbio.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

行木 信一 (NAMEKI, Nobukazu)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号：80302959

(2) 研究分担者

畑田 出穂 (HATADA, Izuho)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：50212147

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()