

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15531

研究課題名(和文)ミトコンドリア内非コードRNAを病因とするミトコンドリア病の新規発症メカニズム

研究課題名(英文)Novel mechanisms of mitochondria diseases caused by mitochondrial noncoding RNAs

研究代表者

岡崎 康司(Yasushi, Okazaki)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80280733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア病の発症原因として、タンパクをコードしているミトコンドリア関連遺伝子そのものに変異が生じたことが病因ではなく、それらを標的対象として制御する非コードRNAに質的・量的変化が生じることで、ミトコンドリア病が発症する可能性も考慮する必要があると思われる。本研究ではRNA干渉法やCRISPRの手法により一部のミトコンドリア関連遺伝子発現を抑制した細胞を用いて、非コードRNAの発現解析を行った。その結果、ミトコンドリア関連遺伝子の抑制に伴って、マイクロRNAを含む複数の非コードRNAの発現変動を検出した。これらの中に、ミトコンドリア機能を制御する非コードRNAが含まれることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：The cause of mitochondrial diseases could be explained not only by the mutations of mitochondrial protein coding genes but also by the changing of quality and quantity of noncoding RNAs that could regulate mitochondrial genes. In this study, we performed expression analysis of noncoding RNAs using model cells in which specific mitochondrial genes are inhibited by RNA interference and CRISPR. As a result, we detected several noncoding RNAs including micro RNAs that were differentially expressed by inhibition of mitochondrial genes. We estimate that those include the functional regulatory noncoding RNAs which regulate mitochondrial function.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：mitochondria noncoding RNA

### 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呼吸鎖複合体の機能低下により ATP 合成能が減少し、心筋や神経をはじめとする全身の様々な組織で機能不全が現れる疾患である。申請者らは埼玉医科大学小児科学教室の大竹明教授らと共に、142名のミトコンドリア病患者 DNA について全エキソーム解析を実施した。その結果、新規のミトコンドリア関連遺伝子 6 種類の変異をはじめとして、遺伝的な発症原因を多数同定することができた (Kohda et al., PLoS Genetics, 2015)。しかし 40 検体では、核 DNA の遺伝子領域またはミトコンドリア DNA のいずれにおいても、ミトコンドリア病の発症原因と判断できる塩基配列変異が存在しなかった。一方、マイクロ RNA はヒトでは現在約 1,300 種類知られており、それぞれが特定の細胞や生理的条件下で発現し、複数の標的遺伝子 RNA に作用して、様々な生命現象の調節を行っている。長鎖非コード RNA は現在約 3~4 万種類程度知られているが、機能が明らかになっているものはわずか 100 種類程度である。これらの非コード RNA はミトコンドリア内にも一定程度存在し、ミトコンドリア機能制御に重要な関わりを有している可能性が指摘されている (Mattick, Cell, 2011)。ミトコンドリア内での明確な役割を記述した報告は今までのところない。そこで本研究では、ミトコンドリア内に存在する非コード RNA に焦点を当て、これらがミトコンドリア機能に影響を及ぼすことを検証する。

ミトコンドリア病における近年の研究では、次世代シーケンサーによる全エキソーム解析により、病因となる遺伝子変異を検出する事が主流となっている。しかし、この解析で明確な病因変異が検出できないものが多く存在する。これらの検体では、タンパクをコードした遺伝子に変異が生じた事が病因ではなく、タンパクをコードしない他の RNA の質的・量的変化により発症原因を説明できる可能性があると考えられる。

ミトコンドリア内には、マイクロ RNA を含め核ゲノム DNA から転写された様々な非コード RNA が存在することが近年報告されている (Mattick, 2011, Cell)。我々も、ヒト線維芽細胞からミトコンドリア画分を抽出してマイクロ RNA 発現アレイ解析を行い、ミトコンドリア内に顕著に存在するマイクロ RNA を実際に同定することができている。また、マイクロ RNA が実際に作用を及ぼす複合体である RISC (RNA-induced silencing complex) がミトコンドリア内にも存在することが指摘されており (Jagannathan R, et al., Cell, 2015)、マイクロ RNA がミトコンドリア内で重要な調節機能を担っている可能性が高い。しかし、これまでミトコンドリア内の特定の非コード RNA がミトコンドリア機能に直接影響を及ぼすことを具体的に実証した報告はまだない。本研究ではミトコ

ンドリア内の RNA に焦点を当て、ミトコンドリア内の非コード RNA がミトコンドリア機能に影響を及ぼす可能性を追求する。本研究により、特定のミトコンドリア内非コード RNA がミトコンドリア内で量的・質的に変化することでミトコンドリア病が発症するという、ミトコンドリア病の全く新しい発症メカニズムを提唱できると考えられる。全エキソーム解析やミトコンドリア DNA 配列解析で病因遺伝子変異を検出できないミトコンドリア病の新規患者は今後も多く出現すると予想される。本研究によりミトコンドリア病の新しい発症メカニズムが提唱されれば、こうした患者に対しても発症要因を具体的に説明することができるようになると期待される。さらに、同定された非コード RNA を標的とするミトコンドリア病の新規の診断体制の確立や創薬・治療の開発へとつなげていくことが可能となると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア内に存在する非コード RNA に焦点を当て、これらがミトコンドリア機能に影響を及ぼすことを検証する。ミトコンドリア機能に深く関わっていることが知られる遺伝子を抑制させた細胞を用いて、ミトコンドリア機能が抑制されている細胞からミトコンドリア画分を抽出し、ミトコンドリア内の RNA の存在量を網羅的に定量し、正常細胞と比較することで、ミトコンドリア機能に影響を及ぼしうる RNA を探索する。

### 3. 研究の方法

ミトコンドリア機能が抑制された細胞環境を構築するため、ヒト HEK293FT 細胞において、DNM1L 遺伝子を CRISPR 法を用いてノックアウトした細胞を作製した。また、ヒト HeLa 細胞において、C1QBP (p32) 遺伝子と、MFN2 遺伝子を RNA 干渉法を用いてノックダウンした。それぞれ 3 種類の siRNA を試行し、定量 RT-PCR 法によりそれぞれの遺伝子の発現量を測定して、ノックダウン効率が最も高い siRNA を選択して以降の実験に使用した。これらの細胞について、ミトコンドリアを MitoTrackerRed で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてミトコンドリアの形状を観察した。ミトコンドリア画分はミルテニー社の磁気ビーズ法を用いて分取した。分取したミトコンドリア画分より small RNA を含む全 RNA をキアゲン社のカラムを用いて精製した。サンプルのミトコンドリア画分濃縮度の測定は定量 qRT-PCR 法にて行った。ミトコンドリア特異的遺伝子 ND4 と、 $\alpha$ -アクチンに対するプライマーを設定し、CYBR Green 法を用いて各遺伝子を定量した。分取したミトコンドリア画分 RNA を用いて、ThermoFischer 社の発現アレイを用いて発現定量解析を行った。miRNA は miRNA アレイを、長鎖非コード

RNA と mRNA は Mouse Transcriptome Array を用いて定量した。サンプル調製はそれぞれのプロトコルに従って実施した。得られたデータは RMA 法にて標準化し、各 RNA のサンプル間での発現量を比較した。

#### 4 . 研究成果

ヒト HeLa 細胞および HEK293FT 細胞において、DNM1L および p32、MFN2 の各遺伝子を CRISPR、あるいは RNA 干渉法において抑制させた細胞を用いた。HEK293FT 細胞でミトコンドリア分裂に關与する DNM1L 遺伝子を CRISPR によりノックアウトした細胞では、ミトコンドリアが細胞内で膨化し、ミトコンドリア機能が低下しているのを確認することができた。またミトコンドリアの融合に關わる遺伝子である MFN2 遺伝子と、ミトコンドリア内タンパク翻訳等に關わる機能をもつ遺伝子である C1QBP (p32) 遺伝子をそれぞれ RNA 干渉法にて抑制を試みたところ、それぞれ 90% 以上のノックダウン効率が得られた。MFN2 ノックダウン細胞では、ミトコンドリアの融合が抑制され、細かい粒状のミトコンドリアが多く存在することが確認された。

次に、ミトコンドリア画分の分取についての条件検討を行った。分取したミトコンドリア画分と細胞全体について、ミトコンドリア内特異的遺伝子である ND4 遺伝子と、核ゲノム由来である アクチン遺伝子のプライマーを用いてリアルタイム定量 RT-PCR により解析したところ、ミトコンドリア画分では ND4 遺伝子 RNA が有意に濃縮されており、また逆に アクチン遺伝子 RNA の存在量が非常に低いことが示され、ミトコンドリア画分を高度に濃縮して分取できていることが確認できた。

得られた細胞内ミトコンドリア画分を用いて、miRNA、mRNA、長鎖非コード RNA について、それぞれ発現定量解析を行った。DNM1L をノックアウトした細胞、また p32 と MFN2 をそれぞれノックダウンした細胞のミトコンドリア内では、それぞれ 136 種類、230 種類、244 種類の miRNA の存在量が 2 倍以上変動していることが分かった。また、また p32 と MFN2 をそれぞれノックダウンした細胞で発現変動した miRNA のうち、それぞれ 20 種類、11 種類は、細胞質内でも同様に存在量が変動していることが分かった。また、ミトコンドリア内で発現変動した miRNA のうち 90 種類は、p32 と MFN2 のどちらをノックダウンした場合でも発現変動が見られた。これらのマイクロ RNA は、ミトコンドリア機能と密接な関係があることが示唆された。同様の発現解析を長鎖非コード RNA についても行ったところ、p32 と MFN2 をそれぞれノックダウンした細胞のミトコンドリア内では、それぞれ 223 種類、204 種類の長鎖非コード RNA の存在量が 2 倍以上変動していることが分かった。

このように、ミトコンドリア内に存在する複

数の miRNA と長鎖非コード RNA について、顕著に発現が変動するものを検出することができた。これらの非コード RNA の中に、実際にミトコンドリア機能に大きく影響を及ぼすものが含まれていることが示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Erika Ogawa, Masaru Shimura, Takuya Fushimi, Makiko Tajika, Keiko Ichimoto, Ayako Matsunaga, Tomoko Tsuruoka, Mika Ishige, Tatsuo Fuchigami, Taro Yamazaki, Masato Mori, Masakazu Kohda, Yoshihito Kishita, Yasushi Okazaki, Shori Takahashi, Akira Ohtake, Kei Murayama、Clinical validity of biochemical and molecular analysis in diagnosing Leigh syndrome: a study of 106 Japanese patients、Journal of Inherited Metabolic Disease、査読有、Volume 40、2017、pp 685-693、<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10545-017-0042-6>

René G. Feichtinger, Monika Oláhová, Yoshihito Kishita, Caterina Garone, Laura S. Kremer, Mikako Yagi, Takeshi Uchiumi, Alexis A. Jourdain, Kyle Thompson, Aaron R. D'Souza, Robert Kopajtich, Charlotte L. Alston, Johannes Koch, Wolfgang Sperl, Elisa Mastantuono, Tim M. Strom, Saskia B. Wortmann, Thomas Meitinger, Germaine Pierre, Patrick F. Chinnery, Zofia M. Chrzanowska-Lightowlers, Robert N. Lightowlers, Salvatore DiMauro, Sarah E. Calvo, Vamsi K. Mootha, Maurizio Moggio, Monica Sciacco, Giacomo P. Comi, Dario Ronchi, Kei Murayama, Akira Ohtake, Pedro Rebelo-Guiomar, Masakazu Kohda, Dongchon Kang, Johannes A. Mayr, Robert W. Taylor, Yasushi Okazaki, Michal Minczuk, Holger Prokisch、Biallelic C1QBP Mutations Cause Severe Neonatal-, Childhood-, or Later-Onset Cardiomyopathy Associated with Combined Respiratory-Chain Deficiencies、American Journal of Human Genetics、査読有、Volume 101、2017、pp 525-538、<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929717303373?via%3Dihub>

Atsuko Imai-Okazaki, Yoshihito Kishita, Masakazu Kohda, Yukiko Yatsuka, Tomoko Hirata, Yosuke Mizuno, Hiroko Harashima, Keiichi Hirono,

Fukiko Ichida, Atsuko Noguchi, Masayuki Yoshida, Chiho Tokorodani, Ritsuo Nishiuchi, Atsuhito Takeda, Akihiro Nakaya, Yasushi Sakata, Kei Murayama, Akira Ohtake, Yasushi Okazaki, Barth Syndrome: Different Approaches to Diagnosis, The Journal of Pediatrics, 査読有、Volume 193、2018、pp 256-260、<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002234761731329X?via%3Dihub>

〔学会発表〕(計2件)

水野 洋介、木下 善仁、神田 将和、岡崎 康司、非コードRNAによるミトコンドリア機能の制御、ConBio2017、2017年12月7日

水野 洋介、木下 善仁、神田 将和、岡崎 康司、Regulation of mitochondria function by noncoding RNA、RCGM2017、2017年12月1日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岡崎 康司 (OKAZAKI, Yasushi)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80280733

### (2)研究分担者

水野 洋介 (MIZUNO, Yosuke)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30406532