

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19625

研究課題名(和文)ミトコンドリア遺伝子発現不全に伴う新たな髄鞘化障害疾患概念の提唱

研究課題名(英文)A novel pathogenic mechanism of delayed myelination caused by deficit of mitochondrial small RNA

研究代表者

市野井 那津子 (Ichinoi, Natsuko)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：40509402

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)：先天性大脳白質形成不全症を呈する家系で同定された、新規の疾患候補遺伝子変異を有する患者細胞の機能解析を行った。患者皮膚線維芽細胞において、ミトコンドリア内低分子RNA発現は低下していた。ミトコンドリア内RNAであるCox1とCox2間のスプライシング異常は本研究では確認されなかった。酸素消費量測定によるミトコンドリア機能解析で、患者細胞のミトコンドリア機能障害が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多様な遺伝的背景を有する髄鞘化障害を示す疾患群では、これまでミトコンドリア内RNAの翻訳障害が原因とされる一群が知られていた。本研究は、髄鞘化障害を呈する患者の細胞のミトコンドリア内への低分子RNA輸送障害すなわちミトコンドリア内低分子RNA減少と、それに伴うミトコンドリア機能障害を示した。本研究により、髄鞘化障害を呈する疾患において既知の病態機序に加えて、ミトコンドリア内低分子RNAの不足に伴うミトコンドリア機能障害の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed skin fibroblasts from a patient with delayed myelination who had compound heterozygous mutations in PNPT1. The expression of a mitochondrial small RNA was decreased in the patient's fibroblasts than in control. In mitochondrial RNA splicing analysis, including Cox1 and Cox2 region, we confirmed the normal splicing process contrary our hypothesis. We showed reduced mitochondrial function in the patient cells by low oxygen consumption rate using the Extracellular Flux Analyzer. We have been trying to generate transgenic mice that have Pnpt1 missense mutation. Deficit of mitochondrial small RNA may be involved in developing delayed myelination.

研究分野：小児科

キーワード：低分子RNA 髄鞘化障害 先天性大脳白質形成不全 ミトコンドリア

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

先天性大脳白質形成不全症は髄鞘化障害により難治性のけいれんや重度の精神発達遅滞などを呈する疾患群であり、その遺伝要因は非常に多様である。近年、エクソーム解析等により新規の原因遺伝子が明らかとなってきた。これまで髄鞘化障害を呈する疾患では、ミトコンドリア内 RNA の成熟障害が病態に関与する一群が示されていた<sup>1, 2)</sup>。

我々は、先天性大脳白質形成不全症 26 例に対して、アレイ CGH, エクソーム解析を含む網羅的な遺伝学的解析により、本疾患群における遺伝学的多様性を示した<sup>3)</sup>。加えて、本疾患群の一家系において、新規の疾患候補遺伝子 *PNPT1* を同定しえた。*PNPT1* 遺伝子は、ミトコンドリア膜に存在する蛋白 PNPase をコードし、ミトコンドリア内への低分子 RNA 輸送に関与する<sup>4)</sup>。今回、同定した新規候補遺伝子の機能解析により、ミトコンドリア内 RNA の輸送障害の髄鞘化障害への関与を示すことは、髄鞘化障害における疾患概念の一部を補完することができると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア内低分子 RNA 減少と髄鞘化障害との関連性を明らかにすることを目的とした。具体的には、(1)患者皮膚線維芽細胞におけるミトコンドリア内低分子 RNA 解析、(2)患者皮膚線維芽細胞を用いたミトコンドリア機能解析、(3)動物モデルの表現型解析を行うことの三点を掲げた。

## 3. 研究の方法

### (1) 患者細胞を用いたミトコンドリア内低分子 RNA の検証

ミトコンドリア mRNA のスプライシングの解析：既報論文を参照し、ミトコンドリア内 mRNA のスプライシング異常の有無を RT-PCR による RNA サイズの差異により検証する<sup>4)</sup>。ミトコンドリア画分を抽出し、ミトコンドリア RNA に RT-PCR を行う。得られた cDNA を用いて、ミトコンドリア遺伝子 *COX1*, *COX2* について、プロセッシング領域を含む部位を増幅し、産物を電気泳動する。また、ミトコンドリア内低分子 RNA の発現を確認する。

### (2) ミトコンドリア機能解析

Extracellular Flux Analyzer を使用したミトコンドリアの酸素消費量測定を行う。本解析は本大学病態液性制御学分野より支援を得る。患者およびコントロールの皮膚線維芽細胞を用い、3 種類の OXPHOS (oxidative phosphorylation: 酸化的リン酸化)阻害剤の添加により呼吸条件を変更し、各段階の酸素消費量を測定する。

### (3) 動物モデルの表現型解析

本学分子血液学分野に支援を得て CRISPR/Cas9 システムを用いて *Pnpt1* 遺伝子改変マウスを作製し、その表現型解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 患者細胞を用いたミトコンドリア内低分子 RNA の検証

PNPase の機能障害ではミトコンドリアでの RNA プロセッシング障害が起こることが知られている<sup>4)</sup>。本研究では、患者とコントロール間でプロセッシング領域の RT-PCR 産物に差を認めなかった(図 1)。また、コントロールと比較して、患者皮膚線維芽細胞では RNase P RNA のミトコンドリア内への取り込みが低下していた

### (2) ミトコンドリア機能解析

患者皮膚線維芽細胞の Extracellular Flux Analyzer を用いたミトコンドリア酸素消費量測定では、正常コントロールと比較して、各段階における酸素消費量の低下を認めた(図 2)。

### (3) 動物モデルの表現型解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した *Pnpt1* 遺伝子の 4 塩基欠失をもつ遺伝子改変マウスが胎生致死であったことから、生仔を得るために、本家系で同定したミスセンス変異のノックインマウス作製を試行した。しかしながら、研究期間内に目的としたマウスは得られず表現型を確認することはできなかった。

以上より、本研究では、*PNPT1* 遺伝子変異におけるミトコンドリア内低分子 RNA の減少およびミトコンドリア機能障害を明らかにした。患者細胞でミトコンドリア内 RNA のスプライシング異常は確認されなかった。髄鞘化障害を来す疾患群の一部において、ミトコンドリア低分子 RNA 減少が病態機序に関与することが示唆された。

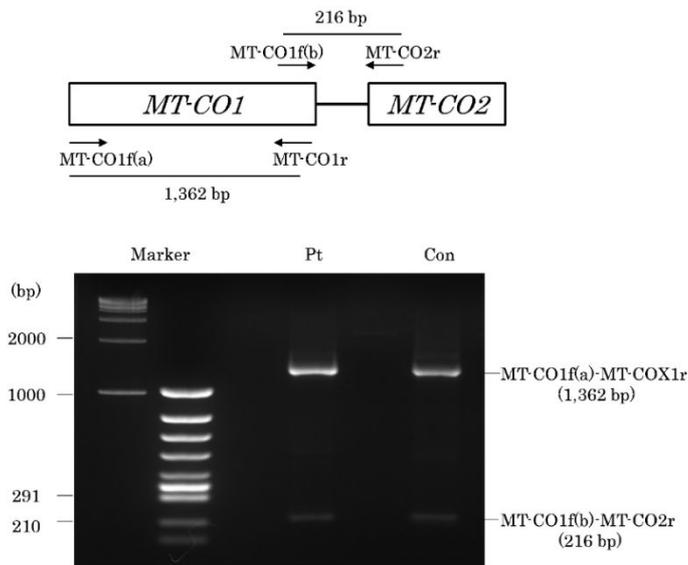


図 1. ミトコンドリア mRNA プロセシングの解析

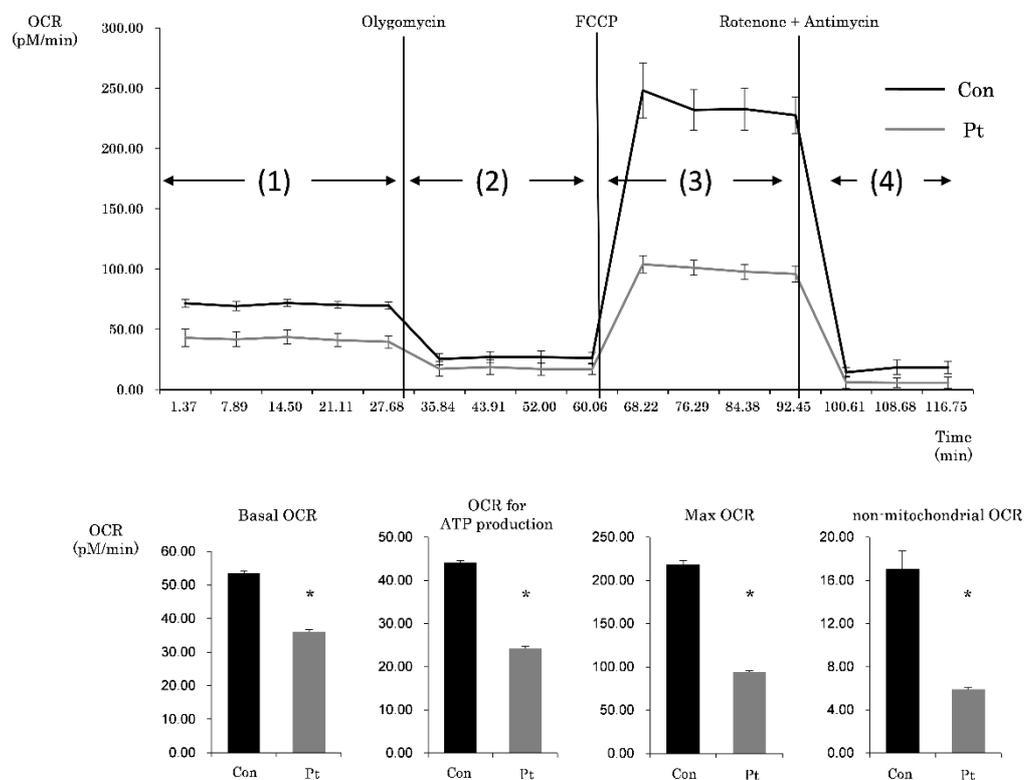


図 2. ミトコンドリア酸素消費量測定

< 引用文献 >

- 1) Saito H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, et al. Mutations in POLR3A and POLR3B encoding RNA Polymerase III subunits cause an autosomal-recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2011; 89(5): 644-51.
- 2) Wolf NI, Salomons GS, Rodenburg RJ, Pouwels PJ, Schieving JH, Derks TG, et al. Mutations in RARS cause hypomyelination. *Ann Neurol.* 2014; 76(1): 134-9.
- 3) Arai-Ichinoi N, Uematsu M, Sato R, Suzuki T, Kudo H, Kikuchi A, et al. Genetic heterogeneity in 26 infants with a hypomyelinating leukodystrophy. *Hum Genet.* 2016; 135(1): 89-98.
- 4) Wang G, Chen HW, Oktay Y, Zhang J, Allen EL, Smith GM, et al. PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell.* 2010; 142(3): 456-67.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato R, Arai-Ichinoi N, Kikuchi A, Matsuhashi T, Numata-Uematsu Y, Uematsu M, Fujii Y, Murayama K, Ohtake A, Abe T, Kure S.	4. 巻 93
2. 論文標題 Novel biallelic mutations in the PNPT1 gene encoding a mitochondrial-RNA-import protein PNPase cause delayed myelination	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Genetics	6. 最初と最後の頁 242 ~ 247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1111/cge.13068	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菊池敦生、佐藤亮、市野井那津子、松橋徹郎、植松有里佳、植松貢、藤井裕士、村山圭、大竹明、阿部高明、呉繁夫
2. 発表標題 ミトコンドリアRNAインポートタンパクPNPaseをコードするPNPT1遺伝子の新規両アレル性変異は髄鞘化遅延を起こす
3. 学会等名 第62回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kikuchi A, Sato R, Ichinoi N, Matsuhashi T, Numata-Uematsu Y, Uematsu M, Fujii Y, Murayama K, Ohtake A, Abe T, Kure S.
2. 発表標題 Novel biallelic mutations in the PNPT1 gene encoding a mitochondrial-RNA-import protein PNPase cause delayed myelination
3. 学会等名 American Society of Human Genetics Annual Meeting 2017（国際学会）
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----