

令和元年6月17日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21331

研究課題名(和文)SGA性低身長を呈するミトコンドリア呼吸鎖異常症での脂肪酸輸送体FATP3の役割

研究課題名(英文)The role of Fatty Acid Transport Protein 3 in mitochondrial respiratory chain disorders exhibiting small-for-gestational age short stature

研究代表者

徳澤 佳美 (Yoshimi, Tokuzawa)

愛媛大学・医学系研究科・助教(特定教員)

研究者番号：20406531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミトコンドリア病の原因遺伝子の可能性の高いFATP3遺伝子の生理的役割を解明するため、FATP3ノックアウトヒトiPS細胞を作製し、未分化状態のヒトiPS細胞への影響を検討した。未分化マーカーの発現や呼吸鎖酵素複合体のサブユニット量を比較したところ、FATP3ノックアウト細胞と野生型細胞の間で差は認められなかった。このことから、FATP3はヒトiPS細胞の未分化状態やミトコンドリア呼吸鎖には影響を与えないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎内発育不全性低身長症の患者でミトコンドリア呼吸鎖複合体の酵素活性の低下がみられたため、この患者は胎生期、及び出生後の成長に必要なエネルギー産生が不足していることが予想された。FATP3は脂肪酸輸送体をコードする遺伝子であり、ミトコンドリアに局在することが報告されていたが、呼吸鎖酵素複合体とFATP3の間に相互関係があるのかどうかは解明されていない。今回の研究で、FATP3ノックアウトヒトiPS細胞が作製できたことから、この細胞を分化誘導した時のFATP3の影響を検討することが可能となった。胎生期におけるFATP3の機能を解析するためのツールとして有用であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial diseases are inherited metabolic disorders, which caused by the reduction in the enzyme activities of respiratory chain complexes. FATP3 gene was extracted as causative gene for mitochondrial disorder by whole exome sequencing of a patient. In this study, to clarify the physiological role of FATP3 in mitochondria, we generated FATP3-knockout (KO) hiPSCs from healthy individual derive hiPSCs using a CRISPR-Cas9 system. The expression levels of assembly factors for respiratory chain complexes and the amount of mitochondrial DNA in FATP3 KO hiPSCs were compared with those of the wild-type iPSCs. There were no differences between wild-type and FATP3 KO hiPSCs. These results showed that FATP3 deficiency was not affect the undifferentiated state and the mitochondria respiratory chain complexes in hiPSCs.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：ミトコンドリア 先天代謝異常 遺伝子疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究対象である患者は small-for-gestational age (SGA:胎内発育不全)性の低身長症を主訴とし、この患者由来の皮膚線維芽細胞においてミトコンドリア呼吸鎖複合体 I と IV の酵素活性の低下が認められた。そのため、ミトコンドリア病と診断された。ミトコンドリア病は電子伝達系の機能不全によって生じる先天性疾患である。細胞のエネルギー産生の際であるミトコンドリアは全ての臓器に存在するため、ミトコンドリア病の症状は痙攣、筋力低下、肝不全、難聴等、様々な臓器で多岐にわたる。低身長もそういった症状のひとつである。

(2) このミトコンドリア病患者の原因遺伝子を特定するため、全エクソーム解析を行った結果、抽出された候補遺伝子のなかで、唯一「ミトコンドリアに部分的に局在する(J. Lipid Res. 2012. 53: 888-900.)」ことが報告されている遺伝子が、本研究対象の Fatty Acid Transport Protein 3 (FATP3)であった。一般的に脂肪酸代謝に関わる遺伝子異常は、脂肪酸酸化の障害を引き起こし、電子伝達系全体が抑制されることでエネルギー産生の低下を招く。

FATP3 はパルミチン酸、オレイン酸、 ω -リノール酸、アラキドン酸のような長鎖脂肪酸を基質とする脂肪酸アシル CoA 合成酵素である。また、FATP ファミリーの解析から脂肪酸輸送体としての機能も有すると推測されている。しかし、これまでのところ FATP3 の変異を原因とする遺伝子疾患は報告されていない。また、FATP3 が脂肪酸輸送体や脂肪酸アシル CoA 合成酵素としてミトコンドリアで何をしているのか、その具体的な役割はよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では FATP3 のミトコンドリアにおける生理的意義を細胞レベルで明らかにすることを目的に FATP3 ノックアウトヒト iPS 細胞を作製し、未分化状態におけるミトコンドリアへの影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) FATP3 ノックアウトヒト iPS 細胞の作製

FATP3 ノックアウト用に設計したターゲティングベクター及び、gRNA/Cas9 発現ベクターをエレクトロポレーションでヒト iPS(hiPS)細胞へ導入した。ターゲティングベクターは FATP3 遺伝子の第一エクソンに選択マーカーが挿入されるように設計した。変異株を選択するため、ピューロマイシンを添加して3日間、培養した。生成されたコロニーを拾って拡大培養を行い、凍結保存とゲノム DNA(gDNA)の抽出を行った。変異株のスクリーニングは、各コロニー由来の gDNA を鋳型にして、PCR 法にて実施した。薬剤選択カセットの挿入と欠失変異が検出されたクローンについては、サンガーシーケンスを行って、塩基配列を確認した。

上記で変異が確認されたクローンから Total RNA を抽出し、FATP3 や未分化マーカー遺伝子の発現解析に用いた。また、ミトコンドリア画分を単離し、ウエスタンブロッティングに用いた。

FATP3 ノックアウト株由来の gDNA を用いて、定量 PCR 法でミトコンドリア DNA(mtDNA)量を定量した。補正用に gDNA 領域を増幅させるプライマーセットでも定量 PCR 法を実施した。

4. 研究成果

1) FATP3 ノックアウト(KO)hiPS 細胞の作製

ピューロマイシンで薬剤選択した後に生成されたコロニーを 144 個ピックアップした。その内、83 クローンから gDNA を抽出し、相同組み換え体のスクリーニングを PCR 法にて行った。そのなかから、薬剤選択カセットが挿入されており、且つもう片アレルにも変異が挿入された可能性のある株を選び、相同組換え領域や変異領域の PCR 産物の配列をサンガーシーケンスで確認した。その結果、薬剤選択カセットが挿入されており、且つもう片アレルにも変異が挿入された株が5クローン取得できた。

FATP3 は未分化状態の hiPS 細胞で発現しているため、これらのクローンにおける FATP3 の発現量を比較した。その結果、両アレルが変異した株(#1, #2, #20, #22)では、FATP3 タンパク質が検出されなかった。従って、これらの hiPS 細胞株は FATP3KO 株であることが確認できた。#12 と #23 は変異が挿入されなかった株で、コントロールとして使用した(図1)。

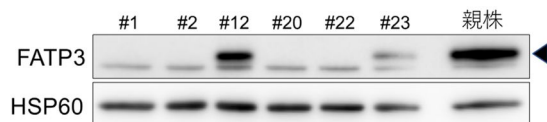


図1. FATP3欠損hiPS細胞の作製
ウエスタンブロッティングにてFATP3の発現消失を確認した。
#1, #2, #20, #22がFATP3 KO株、#12, #23は野生型株である。

(2) 未分化マーカーの発現量の検討

FATP3KO hiPS 細胞は、顕著な増殖能の低下は認められなかった。しかし、拡大培養の際、ごく一部の細胞が分化したことがあった。親株の培養ではそのような分化細胞は観察されない。そのため、FATP3 の発現が減少したことにより、多能性を維持しにくくなっている可能性を考えた。そこで、未分化マーカーの SOX2、OCT3/4 の発現量を定量 PCR 法で測定したが、野生型株と KO 株の間で差は認められなかった(図 2)。

(3) FATP3KOhiPS 細胞の呼吸鎖複合体量の検討

維持培養した KO 株、野生型株からミトコンドリア画分を単離し、ウエスタンブロッティングで、各呼吸鎖複合体のサブユニットの発現量を検出した(図 3)。野生型(#12、親株)と比較して、KO 株で顕著な変化は認められなかった。

また、これらの株における mtDNA も定量し、野生型株との違いを比較したが、KO 株との間で差は検出できなかった。

以上の結果から、FATP3 は少なくとも未分化状態においては、hiPS 細胞の多能性、増殖能、ミトコンドリア呼吸鎖活性に影響は与えないことがわかった。hiPS 細胞では電子伝達系よりも解糖系によるエネルギー代謝の方が優位であるため、分化誘導前の hiPS 細胞では表現型が検出されにくい可能性が考えられる。本研究課題内では、内胚葉や外胚葉への分化誘導後の FATP3 の影響まで解析を進めることができなかった。しかし、FATP3 遺伝子に変異を持つ患者は胎内発育不全を呈したことから、今後は、外胚葉、内胚葉、さらにその先の体細胞に分化誘導させた時のミトコンドリア呼吸鎖複合体や mtDNA 量の検討が必要である。

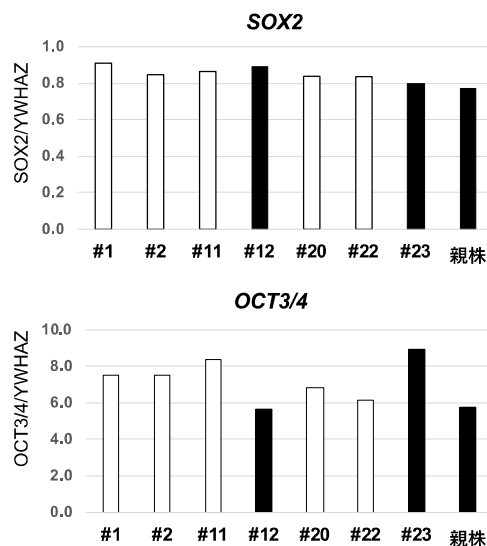


図2. 未分化マーカー遺伝子の発現
定量PCRにてSOX2, OCT3/4の発現を測定した。#1, #2, #11, #20, #22がFATP3 KO株、#12, #23は野生型株である。

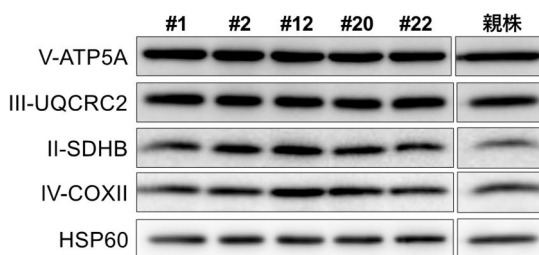


図3. ミトコンドリア呼吸鎖複合体量の比較
ウエスタンブロッティングにて、各複合体のサブユニットのタンパク質量を検出した。HSP60はローディングコントロールである。#1, #2, #20, #22がFATP3 KO株、#12は野生型株である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Takekoshi D, Tokuzawa Y, Sakanaka M, Kato H.
The N-end rule pathway enzyme Naa10 supports epiblast specification in mouse embryonic stem cells by modulating FGF/MAPK. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2019.55.355-367. doi: 10.1007/s11626-019-00341-8. 査読有
2. Borna NN, Kishita Y, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI, Tokuzawa Y, Kohda M, Nyuzuki H, Yamashita-Sugahara Y, Nasu T, Takeda A, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y.
A novel mutation in TAZ causes mitochondrial respiratory chain disorder without cardiomyopathy. *J Hum Genet.* 2017.62, 539-547. doi: 10.1038/jhg.2016.165. 査読有
3. Kopajtich R, Murayama K, Janecke AR, Haack TB, Breuer M, Knisely AS, Harting I, Ohashi T, Okazaki Y, Watanabe D, Tokuzawa Y, Kotzaeridou U, Kölker S, Sauer S, Carl M, Straub S, Entenmann A, Gizewski E, Feichtinger RG, Mayr JA, Lackner K, Strom TM, Meitinger T, Müller T, Ohtake A, Hoffmann GF, Prokisch H, Stauffer C.
Biallelic IARS Mutations Cause Growth Retardation with Prenatal Onset, Intellectual Disability, Muscular Hypotonia, and Infantile Hepatopathy. *Am J Hum Genet.* 2016.4.99.414-22. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.05.027. 査読有

[学会発表](計2件)

1. 外山研介、元野誠、加門啓子、日浦雄太、徳澤佳美、茂木正樹、近藤洋一、加藤英政
ヒト iPS 細胞を用いた外胚葉分化様式の解明、第 41 回日本分子生物学会、2018 年

2. Motono M, Hiraki K, Funayama S, Bagheri M, Tokuzawa Y, Kato H.
TET1-Induced Human Induced Pluripotent Stem Cells, T-iPS Cells, and their Improved
Differentiation Capabilities for Neuroectoderm and Mesendoderm.
ISSCR2017、2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。