

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15662

研究課題名（和文）乳児突然死に関連したミトコンドリア呼吸鎖異常症の原因遺伝子PNPLA4の機能解明

研究課題名（英文）Functional elucidation of PNPLA4, a causative gene for mitochondrial respiratory chain abnormalities associated with sudden infant death

研究代表者

入月 浩美（Nyuzuki, Hiromi）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：80793926

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）：本研究は乳児突然死で発症したミトコンドリア呼吸鎖異常症の原因遺伝子PNPLA4の分子生物学的機能を明らかとすることを目的とした。まず、CRISPR/Cas9システムを用いてPNPLA4ノックアウトゼブラフィッシュを作製した。続いて、in situハイブリダイゼーション法等によって、生体内でのPNPLA4 mRNA発現分布を確認した。さらに、ノックアウトゼブラフィッシュ脳を試料とした網羅的脂質解析、タンパク質発現解析、RNA-seq解析を実施し、脂質やエネルギー代謝に関連した代謝産物や遺伝子発現の顕著な変動を認めた。以上の研究を通じて、我々はPNPLA4の生体における機能の一側面を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の進行性希少難病であるミトコンドリア呼吸鎖異常症の病態は未だ不明な点が多く、個々の原因遺伝子の詳細な機能を明らかにすることが病態解明の鍵となる。本研究を通じて、乳児突然死として発症したミトコンドリア呼吸鎖異常症の原因遺伝子の一つであるPNPLA4の機能の一側面が明らかとなった。今後のミトコンドリア呼吸鎖異常症の病態解明につながる大きな成果であり、将来的に新たな治療戦略の創出並びに乳児突然死の予防法提唱に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the molecular biological functions of PNPLA4, the gene responsible for mitochondrial respiratory chain disorders associated with sudden infant death. First, we generated PNPLA4 knockout zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. Then, we confirmed the distribution of PNPLA4 mRNA expression by in situ hybridization and other methods. Furthermore, we performed comprehensive lipid analysis, protein expression analysis, and RNA-seq analysis of knockout zebrafish brain samples, and found significant changes in metabolites and gene expression related to lipid and energy metabolism. Through these studies, we have elucidated one aspect of the function of PNPLA4.

研究分野：小児医学

キーワード：PNPLA4 ミトコンドリア呼吸鎖異常症 乳児突然死 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

本研究対象の *PNPLA4* (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 4) は、本研究代表者らがミトコンドリア呼吸鎖異常症の新規原因遺伝子として報告した遺伝子である。睡眠中に突然の心停止を起こして死亡した乳児を対象にエクソーム解析を実施し、本遺伝子を同定した。この患者は、後の解析でミトコンドリア呼吸鎖複合体活性の低下を認め、ミトコンドリア呼吸鎖異常症と診断された。本研究代表者らはエクソーム解析の結果をもとに機能解析を行った。まず、培養細胞を用いて *PNPLA4* の発現を確認したところ、患者皮膚線維芽細胞で *PNPLA4* の mRNA とタンパク質の発現が著明に低下していた。また、蛍光免疫染色等によって、*PNPLA4* 遺伝子産物がミトコンドリアに局在していることを発見した。さらに、遺伝子相補実験を行い、患者皮膚線維芽細胞に正常型 *PNPLA4* を導入したところ、Blue Native-PAGE で呼吸鎖複合体 I、III、IV 形成能が回復した。これらの結果より、*PNPLA4* がミトコンドリア呼吸鎖異常症の新規原因遺伝子であることを確定した (Kohda, Nyuzuki et al., *PLoS Genet* 2016)。

ミトコンドリア呼吸鎖異常症は表現型及び遺伝学的多様性をもつ先天代謝異常症である。電子伝達系の機能不全によってエネルギー産生が障害され、全身に多彩な症状を呈する。幼小児期発症例は重篤な症例が多く、その大半は核遺伝子異常による。現在、1000 を超える核遺伝子がミトコンドリア機能に関与していると推定され、病因遺伝子の報告数も近年ますます増加しているが、ミトコンドリア呼吸鎖異常症の病態は未だ十分に解明されていない。ミトコンドリア呼吸鎖異常症はその臨床像から複数の病型に分類されている。本研究の発端者で認めた乳幼児突然死も、近年ミトコンドリア呼吸鎖異常症も主要な病型の一つと考えられるようになってきた (Ohtake et al., *Biochim Biophys Acta* 2014; Murayama et al., *J Hum Genet* 2019)。乳幼児突然死症候群は睡眠中の乳児が何の予兆や既往歴もないまま死に至る疾患であり、その原因は未だ解明に至っていない。ミトコンドリア呼吸鎖異常症の病態解明が乳幼児突然死症候群の病態解明につながる可能性がある。

PNPLA4 は X 染色体上に位置する遺伝子で、9 種類のホスホリパーゼからなる PNPLA ファミリーの一つである。これまでに、培養細胞におけるリン脂質代謝や細胞周期への関与が報告されている (Hermansson et al., *Biochim Biophys Acta* 2016) が、生体内での生理的意義は未だ不明であり、標的脂質も明らかでない。

ミトコンドリアはその構造及び機能において脂質との関連が深い。我々は、*PNPLA4* 機能不全による脂質代謝異常がミトコンドリア機能障害を引き起こす可能性があると考えた。本研究では、ゼブラフィッシュをモデル生物として *PNPLA4* の分子生物学的機能を明らかとし、小児希少難病であるミトコンドリア呼吸鎖異常症の新たな病態を解明することを目的とした。そして、ミトコンドリア呼吸鎖異常症の新規治療戦略の創出や乳児突然死の発症予防につなげていくことを目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*PNPLA4* の分子生物学的機能を明らかとし、小児の希少難病であるミトコンドリア呼吸鎖異常症および乳児突然死症候群/乳児突発性危急事態の新たな発症機序を解明することである。*PNPLA4* とヒト疾患との関連を示す報告は本研究代表者らが過去に報告した例が初であり、本研究でその機能を解明する意義は大きい。*PNPLA4* の生体内での役割を解明するためにはモデル生物を用いた研究が必要不可欠だが、本遺伝子はマウスでは発現していない。そのため、我々はモデル生物としてゼブラフィッシュを選択した。ゼブラフィッシュは世代時間が短く、遺伝学やイメージング解析で非常に優れている。また、CRISPR/Cas9 システムなどによって容易に疾患モデルを作製することが可能な脊椎動物である。全ゲノム配列はヒトと高い相同性を有し、遺伝子数や主要臓器・組織の発生および構造もヒトとの類似性が高い。本研究を通して *PNPLA4* の詳細な分子メカニズムが明らかとなれば、ミトコンドリア呼吸鎖異常症の新たな治療戦略の創出ならびに乳児突然死の予防法提唱に大きく寄与する可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、疾患モデルとなる *PNPLA4* ノックアウトゼブラフィッシュを作製してその表現型を観察することとした。さらに、ミトコンドリア呼吸鎖複合体活性と脂質代謝への影響を調べることで、変異 *PNPLA4* が及ぼす生体への影響と脂質代謝への関与を明らかとする方針とした。

(1) *PNPLA4* ノックアウトゼブラフィッシュの作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて *PNPLA4* ノックアウトゼブラフィッシュを作製するため、ガイド RNA を設計・作製し、Cas9ヌクレアーゼと混合して 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクション法で注入した。PCR-ダイレクトシーケンシングで遺伝子型を決定し、ヘテロ接合体同士を交配して、ホモ接合変異体 (*PNPLA4* ノックアウト) を得た。続いて、野生型ゼブラフィッシュと変異型ゼブラフィッシュの組織を摘出し、サンプル調整後、SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロット法で *PNPLA4* のタンパク質発現量を観察した。

(2) 生体における *PNPLA4* mRNA 発現分布の評価

ゼブラフィッシュを用いてホルマウントの *in situ* ハイブリダイゼーション法を行い、生体における *PNPLA4* mRNA 発現分布の評価を行った。また、ゼブラフィッシュの各組織から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成して、リアルタイム PCR 法を用いて、*PNPLA4* mRNA 発現量を評価した。

(3) *PNPLA4* ノックアウトゼブラフィッシュの表現型の評価

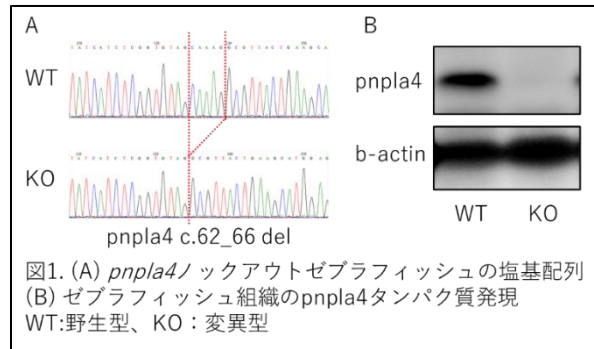
① *PNPLA4* 変異が乳児突発性危急事態の乳児で同定されたことから、*PNPLA4* ノックアウト個体で短命となることが予測された。ヘテロ接合体同士を交配して得られた稚魚を用いて、PCR-ダイレクトシーケンシングで遺伝子型を確認し、野生型と変異型の寿命と比較した。

② 組織学的解析のため、野生型及び変異型ゼブラフィッシュのホルマ組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、脱灰処理後、パラフィン包埋して切片を作製した。作製したパラフィン切片を用いて HE 染色を実施した。

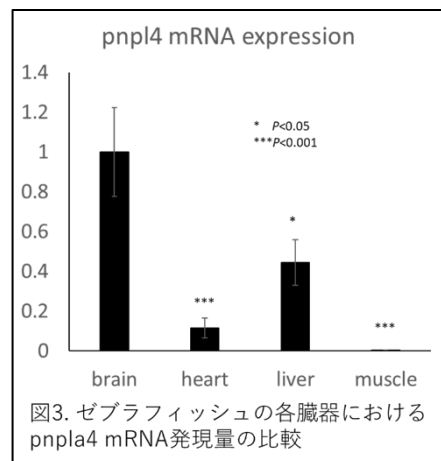
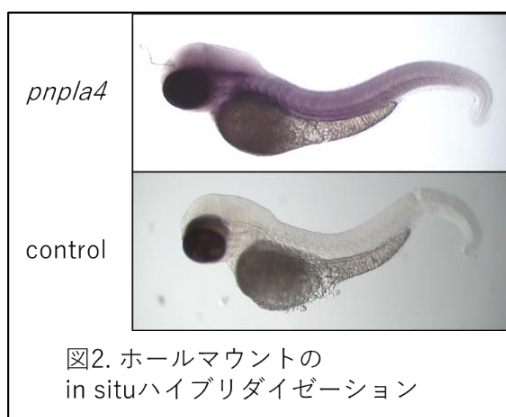
③ 野生型及び変異型ゼブラフィッシュから脳を摘出し、タンパク質を抽出した。液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いて、各サンプルで発現しているタンパク質を同定し、相対的定量を行った。得られたデータをもとに、遺伝子オントロジー分析を行い、タンパク質発現変動の解析を行った。また、野生型及び変異型ゼブラフィッシュから脳を摘出し、RNA を抽出して RNA-seq 解析を実施した。さらに、野生型及び変異型ゼブラフィッシュから脳を摘出し、質量分析法を用いて網羅的に脂質代謝物を解析した。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 システムを用いて *PNPLA4* ノックアウトゼブラフィッシュを作製した。図 1 (A) は *PNPLA4* ノックアウトゼブラフィッシュの尾ひれを用いて gDNA のシーケンス解析を行った結果であり、5 塩基欠失の変異が確認された。我々は、図に示した系統を含め、複数の *PNPLA4* ノックアウトゼブラフィッシュの系統を樹立した。続いて、図 1 (B) はゼブラフィッシュ組織の *PNPLA4* タンパク質発現を解析した結果であり、変異型において *PNPLA4* タンパク質が消失していることが確認できた。



(2) 続いて、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって、ゼブラフィッシュ脳および筋組織において *PNPLA4* mRNA の発現が高いことを発見した (図 2)。これは、過去のヒト組織を用いた mRNA 発現解析結果 (Labonne et al., *J Clin Med* 2020) と一致する結果だった。また、各臓器から抽出した RNA を用いて合成した cDNA のリアルタイム PCR 法による解析でも *PNPLA4* の発現が脳において高いことを確認した (図 3)。



(3) 野生型と変異型の寿命の比較では、両者に明らかな違いは認められなかった。また、組織学的解析において HE 染色では野生型と変異型に明らかな差を認めなかった。一方、ノックアウトゼブラフィッシュ脳を試料とした網羅的脂質解析においてトリアシルグリセロールの代謝異常を示唆する結果を得た。また、タンパク質発現解析では、ノックアウトゼブラフィッシュにおいて、エネルギー代謝に関連するミトコンドリア周辺タンパク質の変動を多数認めた。さらに RNA-seq 解析では、脂質に関連した遺伝子発現の顕著な変動を認めた。

以上、我々は本研究を通じて *PNPLA4* の生体における機能の一側面を明らかとした。

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
---------	---------