

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461539

研究課題名(和文)ミトコンドリア異常症における呼吸鎖複合体アセンブリーの解析

研究課題名(英文)Analysis of respiratory chain complex assembly in mitochondrial disorders

研究代表者

三牧 正和 (Mimaki, Masakazu)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：40392419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア異常症の疑われる患者の診断を確定するために、Blue Native 電気泳動(BN-PAGE)を用いた呼吸鎖複合体の解析や、ミトコンドリアDNAを含む遺伝子解析を行った。ミトコンドリアDNAの新規変異や、POLGなどの核遺伝子異常を見出し、呼吸鎖複合体の解析を診断に活かすことができた。また、m.3243A>Gなどの既知のミトコンドリアDNA異常も多数見出し、その症状と遺伝子異常の関係も明らかにした。さらに、FOXRED1遺伝子異常をもつ患者の呼吸鎖複合体の集合(アセンブリー)の解析により、FOXRED1が複合体Iの形成に不可欠な因子であることを示した。

研究成果の概要(英文)：To make a precise and correct diagnosis of mitochondrial disorders, we performed Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) using mitochondria derived from patients combined with analyses of DNA including mitochondrial DNA (mtDNA). We identified novel mtDNA mutations such as m.9155A>G mutation and nuclear DNA mutations such as POLG mutations in patients with mitochondrial respiratory chain disorders. As for common mtDNA mutations, such as the m.3243A>G mutation, we analyzed the impacts of the mutations on clinical features. We also investigated mitochondrial respiratory chain complex assembly process in the patient carrying FOXRED1 (FAD-dependent oxidoreductase domain-containing protein 1) mutations using BN-PAGE and our study revealed that FOXRED1 is a crucial component in the productive assembly of complex I. In conclusion, a combination of BN-PAGE and DNA analyses is useful and powerful to make prompt diagnoses of patients with mitochondrial disorders.

研究分野：小児神経学

キーワード：ミトコンドリア異常症 呼吸鎖複合体 ミトコンドリアDNA アセンブリーファクター Blue Native電気泳動 遺伝 先天代謝異常

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリア異常症は、先天代謝異常症のなかで最も頻度の高い疾患群であり、小児科領域の患者が多い難病の一つである。従来生検筋を用いた病理診断やミトコンドリア DNA の遺伝子検査などによって患者の診断確定が行われてきたが、今なおミトコンドリア異常症の約半数においては病因診断がなされていない。このことは、正確な診断に立脚した治療法の開発や、的確な遺伝カウンセリングを行ううえで大きな妨げとなっている。

(2) ミトコンドリア異常症の診断が困難である理由の一つに、ミトコンドリア DNA には遺伝子多型が多いこと、核 DNA の影響を考慮する必要があることなどから、新規のミトコンドリア DNA 変異を見出しても、その病因性を証明するのは容易ではないことが挙げられる。

(3) ミトコンドリア異常症の原因の中核は呼吸鎖の機能異常であるが、呼吸鎖はミトコンドリア DNA と核 DNA の二重支配を受けている。そのため、ミトコンドリア DNA のみならず核 DNA にコードされる呼吸鎖酵素構成タンパクの遺伝子異常の探索が不可欠であるが、タンパク数が多いため全患者に対して原因遺伝子を同定するのは容易でない。また、成熟した複合体を完成させるまでの集合(アセンブリー)プロセスは複雑で、これに関与する因子(アセンブリーファクター)の異常が疾患原因になっている可能性があり、さらに診断を困難なものにしている。

(4) Blue Native 電気泳動(BN-PAGE)では、呼吸鎖複合体を分解することなく泳動し、呼吸鎖複合体のアセンブリーを解析することができる。BN-PAGE を用いた複合体の量的・質的評価により、ミトコンドリア異常症疑いの患者における呼吸鎖異常の証明に役立つことが可能である。さらに、アセンブリープロセスの解析が、呼吸鎖複合体の

biogenesis や、関連因子の機能の解明、ミトコンドリア患者の病態の理解につながると期待される。

2. 研究の目的

病因不明のミトコンドリア異常症患者の発症原因を解明することを第一の目的とする。BN-PAGE を用いたミトコンドリアの解析で、呼吸鎖異常が明らかとなった患者を選択し、その病因遺伝子の探索を行い、遺伝子診断に至った患者については、臨床情報をもとに遺伝子異常と表現型の関係についても明らかにする。さらに、患者由来の細胞を使用した呼吸鎖複合体のアセンブリープロセスの解析により、関与する因子を同定して呼吸鎖の biogenesis への理解を深め、今後の患者診断に役立つ知見を得ることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 臨床情報の詳細な検討及び病理学的検査を経てミトコンドリア異常症が強く疑われる症例に対し、抽出したミトコンドリアを用いた BN-PAGE で呼吸鎖の評価を行い、その量の低下や質的異常をもつ呼吸鎖異常症患者を見出す。

(2) 呼吸鎖異常症と診断した患者についてミトコンドリア DNA の全塩基配列決定を行う。新規塩基置換が見出された患者については、患者細胞を脱核し、ミトコンドリア DNA を失った細胞と融合させた細胞(サイブリッド)を作製する。患者の初代培養細胞や筋肉のみならず、サイブリッドでも呼吸鎖酵素活性が低下していることを示し、新規のミトコンドリア DNA 変異の病因性を証明する。

(3) 病因性が明らかなミトコンドリア DNA 変異を有する患者につき、臨床症状・経過を詳細に検討し、未診断の他患者の診断に役立つ情報を整理する。

(4) 細胞質の翻訳を抗生物質により停止させて細胞を ^{35}S メチオニンで標識し、ミトコ

ンドリアの翻訳産物のみ放射ラベルする(パルスラベル法)ことにより、患者細胞における複合体のアセンブリー異常のメカニズムを明らかにする。

(5) ミトコンドリア DNA に変異がなく、核 DNA の異常が病因である可能性が高い患者由来の細胞あるいは生検検体を用いて呼吸鎖のアセンブリーの異常を検討する。アセンブリーに異常のある患者については、その過程に関与する核遺伝子の解析を行うとともに、網羅的遺伝子解析による未知のアセンブリー因子の発見も目指す。

4. 研究成果

1) 既知のミトコンドリア DNA 変異を有する患者の解析

過去に報告のあるミトコンドリア DNA 変異を見出した患者の臨床症状などを解析した。最も多く見出されるミトコンドリア DNA の 3243 番目の塩基変異 (m.3243A>G) の解析では、308 例の患者の 7 割が MELAS (mitochondrial, myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) と診断されていたが、難聴を伴う糖尿病など他の病型を呈した症例もあった。筋生検ではほぼ全例にミトコンドリア異常を示唆する所見を得た。低年齢発症例や筋病理異常が強い例ほど変異率が高い傾向を認め、3243 変異率が臨床症状に大きく影響することが示唆された。筋肉と血液の変異率には相関を認めず、DNA 検査においては、筋肉を用いた病理学的検査と併せて総合的に診断することが望ましいことを示し、临床上重要な情報を提供した。

2) ミトコンドリア異常症疑い患者の未診断例の診断確定

BN-PAGE に引き続くイムノプロット解析により、患者由来細胞の呼吸鎖複合体の量と大きさの異常を検討した結果、複数の未診断患者において呼吸鎖異常症が明らかとなり、生

化学的診断に至った。さらに、引き続く遺伝学的検討によって、遺伝子診断に至ることができた。例えば、複数の呼吸鎖の量的低下が証明できた患者においては、ミトコンドリア DNA 解析で多重欠失が明らかとなったことから、ミトコンドリア DNA のポリメラーゼ異常 (POLG 遺伝子異常) を検出することができた。POLG 関連疾患は本邦では極めてまれとされるが、効率的な診断システムによって明らかにされうる未診断例が多く存在することを示唆するものとする。

また、病的意義づけの不明な新規ミトコンドリア DNA 変異についても、サイブリッドを作製や生化学的検討を行って病因性を検討した。例えば、複合体 V のサブユニット内の未報告の点変異 (m.9155A>G) を複数の患者で発見し、生化学的評価にて複合体 V の異常を証明し、重度腎障害を来たす特異な病型の原因となる可能性を示した。

3) 呼吸鎖複合体のアセンブリーの解析

ミトコンドリア DNA 異常がなく、核遺伝子異常によると思われる患者細胞の解析を行った。核性因子である FOXRED1 の遺伝子異常を有する患者細胞につき、BN-PAGE とパルスラベル法を用いて呼吸鎖複合体の形成がアセンブリー過程の途中で障害されることを示した。これにより、機能が不明であった FOXRED1 が呼吸鎖複合体 I のアセンブリーファクターの一つであることが明らかとなった。

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5件)

Saitu H, Fukai R, Ben-Zeev B, Sakai Y, Mimaki M, Okamoto N, Suzuki Y, Monden Y, Saito H, Tziperman B, Torio M, Akamine S, Takahashi N, Osaka H, Yamagata T, Nakamura K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N. Phenotypic spectrum of GNAO1 variants: epileptic encephalopathy to involuntary

movements with severe developmental delay. Eur J Hum Genet. (査読有) 2016, 24(1):129-34. doi:

10.1038/ejhg.2015.92

Formosa LE*, Mimaki M*, Frazier AE, McKenzie M, Stait TL, Thorburn DR, Stroud DA, Ryan MT: Characterization of mitochondrial FOXRED1 in the assembly of respiratory chain complex I. Hum Mol Genet. (査読有) 2015, 24(10): 2952-65. doi: 10.1093/hmg/ddv058 * These authors equally contributed.

Mimaki M, Shiihara T, Watanabe M, Hirakata K, Sakazume S, Ishiguro A, Shimojima K, Yamamoto T, Oka A, Mizuguchi M: Holoprosencephaly with cerebellar vermis hypoplasia in 13q deletion syndrome: Critical region for cerebellar dysgenesis within 13q32.2q34. Brain Dev. (査読有) 2015, 37(7):714-8. doi: 10.1016/j.braindev.2014.10.009

〔学会発表〕(計 34件)

水野葉子、三牧正和、太田さやか、下田木の実、高橋長久、岩崎博之、岡明、片山菜穂子、生井良幸、水口雅、後藤雄一：Blue-Native PAGE (BN-PAGE) にて呼吸鎖複合体 I および IV 低下を認め、POLG 遺伝子異常が判明したミトコンドリア病の一例。第 57 回日本小児神経学会学術集会，2015 年 5 月 29 日，帝国ホテル大阪 (大阪府・大阪市)

Formosa LE, Mimaki M, Frazier AE, McKenzie M, Thorburn DR, Stroud DA, Ryan MT: Characterization of mitochondrial FOXRED1 in the assembly of respiratory chain complex I. AussieMit 2014, December 2.2014, Perth (Australia)

水野葉子，三牧正和，太田さやか，下田木の実，高橋長久，岩崎博之，齋藤真木子，岡明，水口雅，後藤雄一：ミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断における Blue-Native 電気泳動 (BN-PAGE)。第 56 回日本小児神経学会学術集会，2014 年 5 月 29 日～5 月 31 日，アクトシティ 浜松 (静岡県・浜松市)

竹下絵里、三牧正和、吉田寿美子、西野一三、後藤雄一：Leigh 脳症 64 例にお

ける原因遺伝子の検討。日本人類遺伝学会第 58 回大会，2013 年 11 月 20 日～23 日，江陽グランドホテル (宮城県・仙台市)

眞下秀明、太田さやか、水野葉子、下田木の実、高橋長久、岩崎博之、三牧正和、岡明、水口雅：PDHC 欠損症に合併した症候性 West 症候群に対する ACTH 療法中に Leigh 脳症を発症した 1 例。第 59 回日本小児神経学会関東地方会，2013 年 9 月 21 日，神奈川県民共済みらいホール (神奈川県・横浜市)

Takeshita E, Mimaki M, Ishii T, Awazu M, Shinjoh M, Hasegawa Y, Miki J, Hidaka Y, Kumagai E, Goto Y: A novel mitochondrial point mutation (m.9155A>G) in two patients with chronic renal failure caused by focal glomerular sclerosis. The 27th Congress of the International Pediatric Association, August 24-29, 2013, Melbourne (Australia)

内野俊平、三牧正和、岩崎博之、太田さやか、水野葉子、高橋長久、水口雅、後藤雄一：PDHA1 遺伝子異常を認めた患者の臨床像の検討。第 55 回日本小児神経学会学術集会，2013 年 5 月 30 日～6 月 1 日，iichiko 総合文化センター (大分県・大分市)

竹下絵里、三牧正和、西野一三、埜中征哉、後藤雄一：ミトコンドリア病の遺伝子診断には、long PCR、サザンプロット法、全周シーケンス法を用いた解析と総合的な判断が必要である。第 55 回日本小児神経学会学術集会，2013 年 5 月 30 日～6 月 1 日，iichiko 総合文化センター (大分県・大分市)

三牧正和、竹下絵里、西野一三、埜中征哉、後藤雄一：ミトコンドリア DNA m.3243A>G 変異を有する 308 例の検討。第 55 回日本小児神経学会学術集会，2013 年 5 月 30 日～6 月 1 日，iichiko 総合文化センター (大分県・大分市)
Mimaki M, Takeshita E, Nishino I,

Nonaka I, Goto Y: A total of 308 patients carrying the m.3243A>G mutation. The 9th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 9-12, 2013, Kuching (Malaysia)

研究者番号：40392419

(2)研究分担者

()

研究者番号：

〔図書〕(計11件)

三牧正和：日本臨牀社，Alpers 症候群．別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.33 骨格筋症候群 (第2版)，2015，217-221

三牧正和：日本臨牀社，Leigh 脳症．別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.33 骨格筋症候群 (第2版)，2015，222-228

三牧正和：日本臨牀社，良性乳児ミオパチー．別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.33 骨格筋症候群 (第2版)，2015，229-232

三牧正和：中山書店，ミトコンドリア異常症．小児科臨床ピクシス 3 小児てんかんの最新医療改訂第2版．(五十嵐隆総編集，岡明専門編集) 2014，50-51

(3)連携研究者

後藤 雄一 (GOTO, Yuichi)
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・疾病研究第二部・部長
研究者番号： 20225668

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

三牧 正和 (MIMAKI, Masakazu)
帝京大学・医学部・教授