

ミトコンドリア病の加齢による病態変化機構の解明

[1] 組織

代表者：中條 岳志
(熊本大学大学院生命科学研究部 (医))
対応者：魏 范研
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

可逆性小児肝不全は、MTU1 遺伝子の変異に伴う疾患で、乳児期に重度の肝機能障害を引き起こすが、急性期を過ぎれば回復し再発しない。一方で、変異によっては急性期に死に至ることもあり、発症機構の解明を通じた治療法の創出が求められている。

ミトコンドリアは、核ゲノムとは独立した DNA と遺伝子発現系を有する。ミトコンドリア DNA には、呼吸鎖複合体関連タンパク質の遺伝子、およびその翻訳に使われるトランスファー RNA (tRNA) などがコードされている。ミトコンドリア内で転写された tRNA は、様々な転写後修飾を受けて成熟するが、このような RNA 修飾の一つとして、tRNA の硫黄化修飾がある。MTU1 は、核ゲノムにコードされ、細胞質で翻訳された後にミトコンドリアに輸送され、ミトコンドリア tRNA の硫黄化修飾を担う酵素である。

魏教授らはこれまでに、肝臓特異的 Mtu1 ノックアウトマウスを用いた研究により、Mtu1 が破綻すると Mtu1 によるミトコンドリアのトランスファー RNA の硫黄化修飾が失われ、ミトコンドリア機能が低下し、肝機能障害が引き起こされることを証明してきた (Wu et al. *PLoS Genet.* 2016)。しかしながら、



図1. ミトコンドリアtRNAへのMTU1による硫黄化修飾

「可逆性小児肝不全患者の原因変異が、MTU1 タンパク質にどのような影響を与えるか？」は未解明であった。そこで、本研究では、可逆性小児肝不全患者で見られる MTU1 変異により、どのような分子機序で MTU1 の機能が損なわれるかの解明を目的とした。

この目的を達成するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて MTU1 をノックアウトした HEK293FT 細胞において、可逆性小児肝不全を引き起こす変異 (G14S 変異、または L233F 変異) を有する MTU1 遺伝子または比較対象として野生型 MTU1 遺伝子をレンチウイルスで安定的に導入した。次に、野生型または変異 MTU1 を相補した際の MTU1 タンパク質の定常状態量やミトコンドリア tRNA の硫黄修飾量を定量した。また、細胞質の翻訳阻害剤を作用させてチェイスすることにより、野生型 MTU1 と変異 MTU1 の分解スピードを測定した。さらに、変異 MTU1 の分解を担う酵素を同定した。

本研究は、加齢研の魏教授が熊本大学に在籍していた時に大学院生と開始したものであり、魏教授が加齢研に異動された後も、ディスカッションを密に行うことで実施した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

MTU1 ノックアウト細胞に対して野生型 MTU1-Myc または患者型の変異 MTU1-Myc を安定的に相補し、各 MTU1-Myc の定常状態量を比較した結果、G14S 変異 MTU1-Myc も L233F 変異 MTU1-Myc も野生型に比べて定常状態量が顕著に低下することを明らかにした。G14S 変異は MTU1 の ATP 結合ドメインに存在するため、G14S 変異を有する MTU1-Myc は硫黄化修飾能を完全に失うと予想されたが、G14S 変異 MTU1-Myc も発現量を上げると、弱いながらも硫黄化修飾を行うことが判明した。L233F 変異 MTU1-Myc は顕著な定常状態量の低下を示したが、発現量を上げると硫黄化修飾量とミトコンドリアで翻訳される MTCO1 タンパク質量が野生型 MTU1-Myc 相補時の半分まで復活することが判明した。以上の結果より、MTU1 にこれらの変異が入ると MTU1 タンパク質量が低下するが、MTU1

タンパク質量を増やせば tRNA の硫黄化修飾量とミトコンドリアにおける翻訳をある程度復活させられることが判明した。

次に、疾患変異 (G14S または L233F) を有する MTU1-Myc の定常状態量がどのような分子機序で低下するかの解明を目指した。核ゲノムにコードされ、細胞質で翻訳されてミトコンドリアに運び込まれるタンパク質の定常状態量が減少した場合、減少の原因の候補として、タンパク質の翻訳量の減少、細胞質における分解の促進、ミトコンドリアにおける分解の促進が考えられる。変異 MTU1-Myc 量の減少の原因が主に翻訳の減少によるのか分解の加速によるのかを検証するために、細胞に翻訳阻害剤を作用させ、チェイス実験を行なった。結果、野生型 MTU1-Myc の半減期が 43 時間であったのに対し、G14S 変異 MTU1-Myc の半減期は 13 時間、L233F 変異 MTU1-Myc の半減期は 8 時間であり、疾患変異を有する MTU1-Myc では分解が顕著に加速されることが判明した。

次に、疾患変異 (G14S または L233F) を有する MTU1-Myc の分解をどのタンパク質分解酵素が担うかを検証した。細胞質における変異 MTU1-Myc の分解酵素の候補として、プロテアソームが分解に関与するかをプロテアソーム阻害剤 MG132 で検証した。結果、MG132 処理により L233F 変異 MTU1-Myc 量が約 2 倍に増加した。G14S 変異 MTU1-Myc 量もやや増加したが、増加幅は限定的であった。一方で、ミトコンドリアにおける分解酵素の候補である LONP1 や CLPP を siRNA でノックダウンした結果、G14S 変異 MTU1-Myc 量が増加し、si-Control を導入した場合と比較して si-CLPP を導入した際には MTU1-Myc の寿命が約 3 倍、si-LONP1 を導入した際には MTU1-Myc の寿命が約 2.5 倍になった。si-CLPP の導入により、ミトコンドリア tRNA の硫黄化修飾量も約 2 倍に増加した。

以上より、本研究では可逆性小児肝不全の原因として知られる G14S 変異と L233F 変異が MTU1 タンパク質に与える影響を解明した。すなわち、G14S 変異は、ATP 結合部位の変異により MTU1 のミトコンドリア tRNA 硫黄化修飾能が低下するのみならず、ミトコンドリア内での MTU1 の分解を促進する。一方、L233F 変異はミトコンドリアに MTU1 が輸送される前に主に細胞質における MTU1 の分解を促進することを明らかにした。さらに、これらの MTU1 変異体を分解するプロテアーゼを同定した。加えて、これらの変異 MTU1 は、その定常状態量を増やせば tRNA 硫黄化修飾能をある程度復活させられることを明らかにした。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究の知見より、可逆性小児肝不全の急性期において、MTU1 変異体を分解するプロテアーゼに対する阻害剤を作用させるという新しい治療戦略が考えられる。これは、これまで手の施しようのなかった急性期の可逆性小児肝不全患者とその家族にとって朗報となる可能性を秘める。ただし、慎重さを要する点として、プロテアーゼの阻害は不要なタンパク質の蓄積も引き起こし副作用を与える危険性が考えられる。可逆性小児肝不全の急性期における治療を目指す上で、まずは疾患変異を有する肝細胞モデル等を用いて、適切な種類と量のプロテアーゼ阻害剤により、肝細胞の傷害マーカー量が減少するかといった検証を要するだろう。

[4] 成果資料

本研究で解明した知見は 2021 年内に原著論文として投稿予定である。また、本研究の関連成果として、以下の論文が挙げられる。

- (1) **Chujo, T.** and Tomizawa, K. Human transfer RNA modopathies: diseases caused by aberrations in transfer RNA modifications. **FEBS Journal**. Review article. (2021) in press.