

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

**MRCD疾患モデル細胞を用いたミトコンドリア呼吸鎖複合体の
選択的制御機構の解明**

研究代表者 徳澤 佳美 (ゲノム医学研究センター)

緒言

ミトコンドリア電子伝達系と酸化リン酸化は真核生物にとって必須の生体内反応である。細胞内のATPは主にミトコンドリアで生産されるため、この過程における異常はATP産生量の低下に引き続き細胞の生体反応に重篤なダメージを引き起こす。

ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (Mitochondrial respiratory chain disorder, 以下MRCDと略) は、5000人に1人の割合で発症する難治性疾患であり、ミトコンドリアDNAの変異、あるいは核DNAの変異により、ミトコンドリアのエネルギー産生経路の異常が引き起こされる。電子伝達系のいずれかもしくは複数の呼吸鎖複合体の酵素活性が維持できなくなるによりMRCD患者の臓器や線維芽細胞ではATP産生量の低下、活性酸素種の増加を引き起こす。また、ミトコンドリアはどの細胞にも存在する細胞小器官であるため、MRCDの症状は全身、特にミトコンドリアが豊富な神経系、心臓、肝臓、骨格筋等の臓器で様々な症状を呈し、ひいては個体レベルでの生命維持に影響を及ぼす。MRCD患者の皮膚線維芽細胞や組織では、呼吸鎖酵素複合体の酵素活性の低下に加え、複合体の量そのものの減少が起きている。

5-アミノレブリン酸 (ALA) はALA合成酵素によりグリシンとスクシニルCoA から合成されるヘムの前駆体であり、最終的にプロトポルフィリンIXへ生合成されたあとに鉄イオンを配位してヘムになる¹⁾。ヘムはヘモグロビン、ミオグロビン、シトクロム類のようなヘムタンパク質の補欠分子族として機能する。特にミトコンドリアのヘムタンパク質は呼吸鎖複合体I、Vを除くII、III、IVのサブユニットの酸化還元反応の活性中心として重要な役割を果たす²⁾。2011年にマウスに5-ALAと鉄を同時に経口投与することで、肝臓の呼吸鎖複合体IVサブユニットのタンパク質量とATP量が増加したという報告がなされた³⁾。そこで、我々は、MRCD患者由来皮膚線維芽細胞に5-ALAと二価鉄を同時に投与することで、細胞内ATP産生量が増加するか検討した。その結果、5-ALAと二価鉄の同時投与は、呼吸鎖複合体IからIVまでの複合体量を

激しく変動させることが明らかとなった。しかし、この複合体量の変動の詳しいメカニズムはまだ解明されていない。一方、ミトコンドリアにおいて、鉄はヘム以外に鉄・硫黄クラスターを形成して存在するが、5-ALA/鉄投与時における鉄硫黄タンパク質への影響についても、明らかになっていない。本研究では5-ALAと二価鉄を同時投与した時のミトコンドリアでの鉄硫黄タンパク質の量をSDS-PAGE/ウエスタンブロッティングを用いて解析した。また、CRISPR/Cas9システムを用いてMRCDの原因遺伝子をノックアウトした疾患モデル細胞の作出も試みた。

材料と方法

1. 鉄硫黄タンパク質の発現変動の解析

MRCD患者由来皮膚線維芽細胞を15 cm培養ディッシュに 2×10^6 細胞ずつ播種し、翌日、100 μ M第一クエン酸ナトリウムと0 μ M、50 μ M、100 μ Mの各濃度の5-ALAを添加した培地に交換し、10日間培養した。コントロールとして、健康人由来の皮膚線維芽細胞 (NHDF-Neo) も同時に処理した。これらの細胞から常法に従って、ミトコンドリア画分を単離し、SDS-PAGE/ウエスタンブロッティングにて、ミトコンドリアに局在する鉄硫黄タンパク質 (NDUFS1, NDUFS8, ACO2) の発現量を解析した。また、ヘムタンパク質であるCYC1のタンパク質量の変化も検討した。

2. MRCD疾患モデル細胞の作製

当初はTAL effector nuclease (TALEN) を用いる予定であったが、より簡便なことからCRISPR/Cas9を用いている。標的遺伝子は既知の病因遺伝子であるSURF1、及び文部科学省革新的細胞解析研究プログラムで、同定した新規病因遺伝子の内の一つとした。gRNAを設計して、Addgeneより購入したpSpCas9 (BB)-2A-Puro (pX459) にクローニングした。

結果

MRCD患者由来皮膚線維芽細胞とNHDF-Neoと合わせて12検体に5-ALAと鉄を同時に投与し、ミトコンドリア

に局在する鉄硫黄タンパク質の発現量を解析した。この内、ミトコンドリア量が評価できない検体が5検体あった。残りの7検体全てにおいて、5-ALAを添加した時にNDUFS1の発現量が減少していた。またNDUFS8は5検体で発現量の減少が認められた。ACO2は4検体で発現量が減少していた。他の検体では濃度依存的な変化を示さなかった(data not shown)。一方、ヘムタンパク質であるCYC1の発現量は、NHDF-Neoで増加傾向を示したものの、MRCDC患者検体では、顕著な傾向が認められなかった。今回、MRCDC患者由来線維芽細胞から単離できたミトコンドリア量が少なく、充分な解析が実施できなかった検体もあるため、今後も引き続きサンプリングと解析を行う必要がある。また、MRCDC患者由来線維芽細胞の中には増殖が遅い検体もあり、解析に必要な細胞数を取得するのに限界があるため、293FT細胞を使ってMRCDC疾患モデル細胞を作製し、それらを用いて5-ALA/鉄投与の影響を調べる予定であった。しかし上記の解析に時間がかかり、現在作製を進行中である。

考 察

今回の解析により鉄硫黄タンパク質の発現量は、5-ALA/鉄の投与時に減少する傾向が認められた。この結果は、ヘムの合成量の増加が鉄・硫黄クラスター形成に少なからず影響を与えていることを示唆している。NDUFS1、NDUFS8は呼吸鎖複合体Iの構成因子をコードしており、呼吸鎖複合体Iの活性の低下や複合体のアッセンブリ量の低下を示す患者において、これらの遺伝子の変異が報告されている^{4,5)}。実際5-ALAと鉄を投与すると呼吸鎖複合体Iのアッセンブリ量が低下する傾向があった(data not shown)が、その原因としてNDUFS1、NDUFS8の発現量の減少にあることが示唆された。今後は他の鉄硫黄タンパク質の発現量についても影響を受けているのかどうか調べる必要がある。また今回、サンプル量が少ないため評価できなかった検体については今後の解析が待たれる。一方、5-ALAと鉄の同時投与によりヘムタンパク質であるCYC1の顕著な増加は認められなかったが、5-ALAと鉄の同時投与により細胞内のヘムが増加していることを示すため、CYC1以外の呼吸鎖複合

体を構成するヘムタンパク質について引き続き検討する必要がある。また、本実験で用いたMRCDC患者検体は元々呼吸鎖複合体Iの酵素活性が低下した検体を中心に選んでいるが、今後は呼吸鎖複合体I以外の酵素活性が低下した検体における5-ALA/鉄の投与の影響も検討していく必要がある。

謝 辞

本研究はゲノム医学研究センターゲノム科学部門において実施されました。本研究を実施するにあたり、多大な御協力を頂いた岡崎康司教授、清水千春技術員さん、大久保桃絵技術員さん、八塚由紀子助手に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Hagiya Y, Adachi T, Ogura S, An R, Tamura A, Nakagawa H, et al. Nrf2-dependent induction of human ABC transporter ABCG2 and heme oxygenase-1 in HepG2 cells by photoactivation of porphyrins: biochemical implications for cancer cell response to photodynamic therapy. *J Exp Ther Oncol* 2008;7:153-67.
- 2) Xu W1, Barrientos T, Andrews NC. Iron and copper in mitochondrial diseases. *Cell Metab* 2013;17:319-28.
- 3) Ogura S1, Maruyama K, Hagiya Y, Sugiyama Y, Tsuchiya K, Takahashi K, et al. The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome c oxidase activity in mouse liver. *BMC Res Notes* 2011;4:66.
- 4) Hoefs SJ, Skjeldal OH, Rodenburg RJ, Nedregaard B, van Kaauwen EP, Spiekercotter U, et al. Novel mutations in the NDUFS1 gene cause low residual activities in human complex I deficiencies. *Mol Genet Metab* 2010;100: 251-6.
- 5) Procaccio V, Wallace DC. Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUFS8 mutations. *Neurology* 2004;62:1899-901.

研究成果リスト

なし