

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 2 年 4 月 17 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門
職 名 准教授
研究代表者 行木 信一

下記のとおり令和元年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 18018)

1. 共同研究課題名	翻訳停滞解消不全によるミトコンドリア病の病態発現機構の解明と治療基盤研究			
2. 共同研究目的	C12orf65 遺伝子の変異が原因となり代謝異常を起こし生じるミトコンドリア病は「複合型酸化リン酸化異常 (COXPD)」の1つに分類される。C12orf65 蛋白質は、ミトコンドリア内での翻訳におけるリボソームの滞りを解消することが考えられているが、未知な点が多い。この疾患の特徴は、C12orf65 遺伝子のフレームシフト変異が起こる位置により病態・重篤度の異なる点である。本研究では、CRISPR/Cas ゲノム編集法により、患者のゲノムと同等な変異をもつマウスを複数ライン作製し様々な方法で解析することで、C12orf65 上の変異位置によりどのような代謝異常を起こし様々な病態を引き起こすかその機序を解明し、治療基盤を取得することを目的とする。			
3. 共同研究期間	平成31年 4月 1日 ~ 令和 2 年 3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 行木 信一	群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門	准教授	研究の総括	
(分担研究者) 金村涼平	大学院理工学府	大学院生(D2)	実験全般	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	生体情報ゲノムリソースセンター	氏 名	畑田 出穂

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

①CRISPR/Cas ゲノム編集法による *C12orf65* 発現不全マウスの作製

平成30年度の実験の結果、CRISPR/Cas ゲノム編集法による *C12orf65* が欠損しているヘテロのマウスの作製に成功したが、ヘテロマウスに目立った表現系は得られていない。継続して、ヘテロ同士の掛け合わせにより欠損ホモマウスの作製を行った。

②*C12orf65* 発現不全マウス由来の組織・細胞の解析

ホモな発現不全マウス（胎児の場合もあり）が作製された場合は、異常が特に確認できた組織について、細胞外フラックスアナライザーXFp を使った細胞代謝測定、ミトコンドリア活性の測定、そして解糖系およびTCA サイクルを中心にメタボローム解析を行う。

③培養細胞を使った *ICT1* と *C12orf65* のプロモーター解析および転写因子の同定

④*C12orf65* 欠損による機能不全に対する *ICT1* による補完効果の検証

ICT1 の過剰発現によってミトコンドリアの機能不全が改善できないかを検討するため、*C12orf65* を発現抑制する培養細胞株を樹立し、Tet-ON システムを用いて *ICT1* の発現量を調節することにより、ミトコンドリアの機能が改善するのかを、細胞増殖能、Flow cytometry、遺伝子発現解析を用い検証する。さらに、転写因子（核内受容体）が機知でアゴニストが判明した場合は、そのアゴニストによる発現抑制株の機能の回復を検討する。効果がある場合は、発現不全マウスへの投与も検討する。

7. 共同研究の成果

CRISPR/Cas ゲノム編集法による *C12orf65* 欠損しているヘテロマウスを経過観察したが、昨年度同様、ヘテロマウスに目立った表現系を見いだすことはできなかった。またヘテロ同士の掛け合わせにより欠損ホモマウスの作製を試みたが、これも昨年度同様得られなかった。現在、この遺伝子欠損パターンと異なる別の欠損マウスの作製を始める予定である。

培養細胞を使った *ICT1* と *C12orf65* のプロモーター解析により、Hela 細胞では *ICT1* は *C12orf65* に対して転写量が約6倍多いことおよび、転写調節領域をそれぞれ特定した。さらに、既知のミトコンドリア関連遺伝子の転写因子をコードする発現プラスミドを作製した。それを培養細胞に導入して、*ICT1* および *C12orf65* の転写量の変化を測定することで転写因子の同定を試みた。現在のところ、*ICT1* および *C12orf65* では、予想通り転写因子（群）が異なっていることが示唆された。その中にはアゴニストが判明している転写因子があり、それを培養細胞に添加して各遺伝子の発現量の変化を確かめる予定である。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

（本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。）

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

Gailhouse L, Liew LC, Yasukawa K, Hatada I, Tanaka Y, Kato T, Nakagama H, Ochiya T. MEG3-derived miR-493-5p overcomes the oncogenic feature of IGF2-miR-483 loss of imprinting in hepatic cancer cells. *Cell Death Dis.* 2019 Jul18;10(8):553.

Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Matsunari H, Yashima S, Umeyama K, Takayanagi S, Sakuma T, Yamamoto T, Morita S, Horii T, Hatada I, Nishinakamura R, Nakauchi H, Nagashima H. Anephrogenic phenotype induced by *SALL1* gene knockout in pigs. *Sci Rep.* 2019 May 29;9(1):8016.

Hirano S, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Horii T, Ishitani R, Hatada I, Zhang F, Nishimasu H, Nureki O. Structural basis for the promiscuous PAM recognition by *Corynebacterium diphtheriae* Cas9. *Nat Commun.* 2019 Apr 29;10(1):1968.

②この共同研究に基づくとの記載のある論文