

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3年5月7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2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「複合型酸化的リン酸化異常 (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 3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) 星野総一郎	大学院理工学府	大学院生(M2)	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わかると、細胞増殖能、Flow cytometry、遺伝子発現解析を用いて検証する。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。よって、ホモ型のマウスは致死的と判断した。

昨年度は培養細胞を使った *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。今年度は転写因子同定実験により、*ICT1* は2つの転写因子が関与するグループ1、*C12orf65* は一つの転写因子が関与するグループ2、*mtRF1* と *mtRF1a* では4つの転写因子が関与するグループ3という、3つの転写機構に分類できることがわかった。*ICT1* が属するグループ1の転写機構は、グループ3の転写機構に比べ特定の転写因子が効率よく活性化することができるので転写量が相対的に多いと予想された。これらの結果から、ミトコンドリア翻訳停滞解消因子群それぞれに特有の転写因子が存在していることが示唆された。

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

Shiraishi Y, Koga K, Yamagata R, Hatada I, Shiratori-Hayashi M, Tsuda M. α 1A-adrenaline receptors in dorsal horn inhibitory neurons have an inhibitory role in the regulation of chloroquine-induced itch in mice. *Molecular Brain* 2021 Mar 16;14(1):55. doi: 10.1186/s13041-021-00768-9.

Sugimoto H, Horii T, Hirota J, Sano Y, Shinoda Y, Konno A, Hirai H, Ishizaki Y, Hirase H, Hatada I, Furuichi T & Sadakata T. The Ser19Stop single nucleotide polymorphism (SNP) of human PHYHIP1 affects the cerebellum in mice. *Molecular Brain* 2021 Mar 12;14(1):52. doi: 10.1186/s13041-021-00766-x.

堀居拓郎、森田純代、畑田出穂、エピゲノム編集による先天性疾患モデル動物の作製、*遺伝子医学 MOOK* 36, 51-57, 2021

堀居拓郎、森田純代、畑田出穂、狙ったエピゲノムが変異した疾患モデル動物の開発、*BIO Clinica* 36(5) 103-108, 2021

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

畑田先生および堀居先生と、理工学府のマウスの作製状況の報告そして今後の実験展開の相談をメール等でやりとりをした。現在は、*C12orf65* 欠損マウスに関する論文の準備をしているところである。