

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

分担課題：不育症患者の血栓性素因の遺伝学的解析、流産とミトコンドリア

研究分担者 康 東天 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野教授

研究要旨

不育症例でプロテイン S、プロテイン C、第 XII 因子の遺伝子解析を行い、プロテイン C で未報告の遺伝子変異を見出した。今後遺伝子解析症例を増やして行き、遺伝子異常の頻度を明らかにする。

p32 のノックアウトマウスより樹立した MEF 細胞の解析から、p32 が“ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的なシャペロン”という、今までに報告の無い新しい機能を持つ蛋白質である可能性が示唆された。p32 のノックアウトマウスが胎児の成長におけるミトコンドリアでのエネルギー代謝の重要性を明らかにするための新しいマウスモデルになる可能性を示している。

A. 研究目的

本邦における不育症の実態は不明であり、かつ不育症例に対するスクリーニング法や治療法の確立には至っていない。これらを明らかにするため、不育症のリスク因子の検索と評価を行う必要がある。リスク因子の 1 つとして、血液凝固異常の関与が強く示唆されている。本研究では、不育症における血液凝固異常の関与のなかでも、プロテイン S、プロテイン C、凝固因子 XII の（1）遺伝子変異と（2）活性の観点から明らかにすることで、EBM に基づいた不育症の診断、検査、および治療に関する指針の確立に寄与することを目的としている。また、胎児の成長におけるミトコンドリアでのエネルギー代謝の重要性を明らかにするためのマウスモデルの作製とその機能解析を行う。

B. 研究方法

（1）遺伝子変異解析

XII 因子、Protein C、Protein S 活性検査は一次スクリーニングとして各施設で全て行ない、低下症例について Protein C、Protein S は全エクソンの遺伝子配列決定を行ない、XII 因子については活性に大きな影響を与える第 46 塩基の多型を調べる。

（2）p32 ノックアウトマウスの作製と解析

p32 蛋白質は従来 RNA スプライシング因子の 1 つとして、核で作用すると考えられていた因子であるが、分担研究者の康のグループがそのほとん

どがミトコンドリアマトリックスに存在し、酸化リン酸化による ATP 合成に重要な役割を果たしていると報告したものである。p32 のノックアウトマウスは胎児発育におけるミトコンドリア機能不全の良いモデルになると考えられる。

p32 の全身ノックアウトマウスを作製し、その胎児からマウス胎児線維芽細胞（MEF）細胞を樹立。そのミトコンドリア電子伝達系機能を測定。（倫理面への配慮）

研究方法、試料提供協力者に対する説明同意等、九州大学を含む各大学倫理委員会で承認された計画のもとで行われている。

C. 研究結果

（1）遺伝子変異解析

今年度は 4 例の解析を行った。

（2）p32 ノックアウトマウスの作製と解析

p32 ノックアウトマウスは胎生 10.5 日で致死であった。そこで胎児より MEF 細胞を樹立した。樹立した細胞の細胞増殖は野生型に比べ、きわめて不良であった（図 1）。細胞増殖は p32 cDNA の導入により回復したことから、p32 遺伝子の欠損が原因と考えられる。

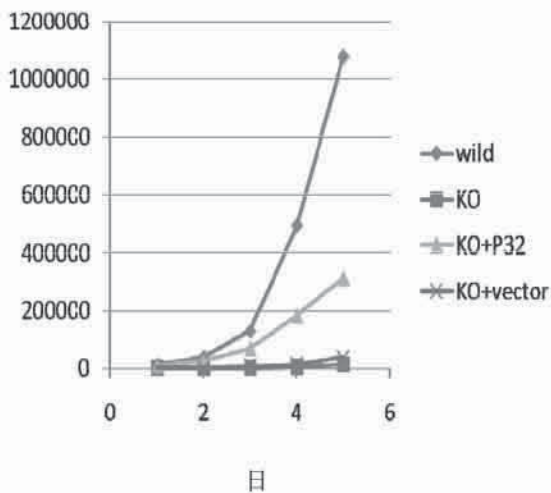


図1 細胞増殖

細胞増殖能の低下がミトコンドリア電子伝達系機能の低下によるかを調べるため、ミトコンドリア電子伝達系の各複合体の活性を測定した（図2）。複合体 I, III, IV の活性低下が認められた。

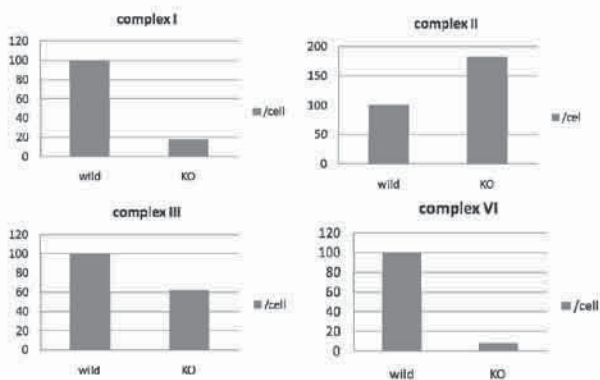


図2 電子伝達系複合体活性

#### D. 考察

今年度は4例の不育症の血液凝固系因子の遺伝子検査を実施した。今後も遺伝子検査症例を増やしていくことで、プロテイン S、プロテイン C、第XII因子の遺伝子異常の不育症での役割がより明らかになっていくであろう。

p32 のノックアウトマウスから樹立した MEF 細胞ではミトコンドリア DNA にコードされた蛋白質を含む複合体のみで、活性低下が見られた。ミトコンドリア DNA 量やミトコンドリア DNA 由来の mRNA 量に変化が無いことから、p32 は、ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的なシャペロンであることが示唆される。ミトコンドリア内で翻訳された蛋白質も正しくフォールディング

するためには、シャペロン蛋白質が当然必要であるが、これまで、ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的なシャペロンの存在は報告されておらず、ミトコンドリア機能異常症における新しい疾患概念の提唱につながる可能性があることを期待している。今後ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的なシャペロンであることをさらに明確にするために、MEF 細胞を使い、ミトコンドリアでの翻訳レベル、ミトコンドリア DNA コード蛋白質の半減期、電子伝達系複合体の高次構造状態を明らかにしていく必要がある。

#### E. 結論

不育症例でプロテイン S、プロテイン C、第XII因子の遺伝子解析を行い、プロテイン C で未報告の遺伝子変異を見出した。今後も、遺伝子解析症例を増やして行き、遺伝子異常の頻度を明らかにする。

p32 のノックアウトマウスより樹立した MEF 細胞の解析から、p32 が“ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的なシャペロン”という、今までに報告の無い新しい機能を持つ蛋白質である可能性が示唆された。p32 のノックアウトマウスが胎児の成長におけるミトコンドリアでのエネルギー代謝の重要性を明らかにするための新しいマウスモデルになる可能性を示している。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) M. Sumitani, K. Kasashima, E. Ohta, D. Kang and H. Endo, Association of a novel mitochondrial protein M19 with mitochondrial nucleoids, *J Biochem*, (2009).
- 2) J.L. Pohjoismaki, S. Goffart, H. Tyynismaa, S. Willcox, T. Ide, D. Kang, A. Suomalainen, P.J. Karhunen, J.D. Griffith, I.J. Holt and H.T. Jacobs, Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks, *J Biol Chem* 284, (2009), pp. 21446-57.

- 3) M. Ono, Y. Aoki, M. Masumoto, T. Hotta, Y. Uchida, Y. Kayamori and D. Kang, High-dose penicillin G-treatment causes underestimation of serum albumin measured by a modified BCP method, *Clin. Chim. Acta* 407, (2009), pp. 75-76.
- 4) M. Ishimura, M. Saito, S. Ohga, T. Hoshina, H. Baba, M. Urata, R. Kira, H. Takada, K. Kusuhara, D. Kang and T. Hara, Fulminant sepsis/meningitis due to *Haemophilus influenzae* in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy, *Eur J Pediatr* 168, (2009), pp. 673-7.
- 5) E. Hokazono, S. Osawa, T. Nakano, Y. Kawamoto, Y. Oguchi, T. Hotta, Y. Kayamori, D. Kang, Y. Cho, K. Shiba and K. Sato, Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-III, *Ann Clin Biochem* 46, (2009), pp. 296-301.
- 6) A. Fukuoh, K. Ohgaki, H. Hatae, I. Kuraoka, Y. Aoki, T. Uchiumi, H. T. Jacobs and D. Kang, DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase, *Genes Cells* 14, (2009), pp. 1029-42.
- 7) T. Kanki, D. Kang and D.J. Klionsky, Monitoring mitophagy in yeast; The Om45-GFP processing assay, *Autophagy* 5, (2009), pp. 1-4.
- 8) A. Fukuoh and D. Kang, Methods for Assessing Binding of Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) to DNA, *Methods Mol Biol* 554, (2009), pp. 87-101.
- 9) T. Yamaguchi, T. Fujii, Y. Abe, T. Hirai, D. Kang, K. Namba, N. Hamasaki and K. Mitsuoka, Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals, *J. Struct. Biol.* In press
- 10) T. Yamaguchi, Y. Ikeda, Y. Abe, H. Kuma, D. Kang, N. Hamasaki, T. Hirai, Structure of membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography, *J. Mol. Biol.* In press
2. 学会発表
- 1) Mitochondria: genome, ROS, and cellular functions Dongchon Kang (Invited speaker) SFRR (Society of Free Radical Research) International Free Radical School in Japan 2-6 September 2009 (Yuzawa, Niigata)
- 2) ミトコンドリア病とミトコンドリアDNA. 康 東天 (招待教育講演) 第49回日本臨床化学会年次学術集会 (長崎) 2009年9月18日-20日
- 3) Importance of Mitochondrial Genome in Cellular Functions Dongchon Kang (Invited speaker, Symposium: Mitochondrial Dysfunction: Cell Life and Death Decisions) The 21st Annual Meeting of the Korean Society of Molecular and Cellular Biology (KSMCB) 15-16 October, 2009 (Seoul, Korea)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Sumitani, K. Kasashima, E. Ohta, D. Kang, H. Endo,	Association of a novel mitochondrial protein M19 with mitochondrial nucleoids,	J Biochem,	146(5)	725-732	2009
J. L. Pohjoismaki, S. Goffart, H. Tynnismaa, S. Willcox, T. Ide, D. Kang, A. Suomalainen, P. J. Karhunen, J. D. Griffith, I. J. Holt , H. T. Jacobs	Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks,	J Biol Chem	284	21446-21457	2009
M. Ono, Y. Aoki, M. Masumoto, T. Hotta, Y. Uchida, Y. Kayamori, D. Kang,	High-dose penicillin G-treatment causes underestimation of serum albumin measured by a modified BCP method,	Clin. Chim. Acta	407	75-76	2009
M. Ishimura, M. Saito, S. Ohga, T. Hoshina, H. Baba, M. Urata, R. Kira, H. Takada, K. Kusuhara, D. Kang, T. Hara,	Fulminant sepsis/meningitis due to Haemophilus influenzae in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy,	Eur J Pediatr	168	673-677	2009

E. Hokazono, S. Osawa, T. Nakano, Y. Kawamoto, Y. Oguchi, T. Hotta, Y. Kayamori, D. Kang, Y. Cho, K. Shiba, K. Sato,	Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-II I,	Ann Clin Biochem	46	296-301	2009
A. Fukuoh, K. Ohgaki, H. Hatae, I. Kuraoka, Y. Aoki, T. Uchiumi, H.T. Jacobs, D. Kang,	DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase,	Genes Cells	14	1029-1042	2009
T. Kanki, D. Kang, D. J. Klionsky,	Monitoring mitophagy in yeast; The Om45-GFP processing assay,	Autophagy	5	1-4	2009
A. Fukuoh D. Kang,	Methods for Assessing Binding of Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) to DNA,	Methods Mol Biol	554	87-101	2009
T. Yamaguchi, T. Fujii, Y. Abe, T. Hirai, D. Kang, K. Namba, N. Hamasaki, K. Mitsuoka,	Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals,	J. Struct.			in press
T. Yamaguchi, Y. Ikeda, Y. Abe, H. Kuma, D. Kang, N. Hamasaki, T. Hirai,	Structure of membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography,	J. Mol. Biol.			in press