

ガス標識戦略による生体内酸素駆動反応の解明

New York University Langone Health

九野 宗大

申請時点では、留学先研究室が重酸素($^{18}\text{O}_2$)による標識手法で主に培養細胞を用いて新規代謝経路の同定を行った報告がされていたので、その手法の個体への応用を最終目標として申請した。渡米後 PI との議論の結果、 $^{18}\text{O}_2$ の個体への応用をいきなり手がけることはリスクが伴うため、同研究室が $^{18}\text{O}_2$ を用いて以前報告した成果である Coenzyme Q10 (CoQ10)の代謝経路のフォローアップから始めた。

【背景】

所属研究室は、膵臓がん細胞株に $^{18}\text{O}_2$ 標識を行い、その後極性代謝物を抽出してメタボローム解析を行ったところ、最も標識された代謝物が 4-hydroxymandelate (4-HMA) という哺乳類では未同定の代謝物であることを見出した。4-HMA は更なる修飾を受け、最終的にミトコンドリアで産生される CoQ10 に組み込まれていた (Banh et al., Nature 597, 420-425, 2021)。CoQ10 はミトコンドリアにおける電子伝達を担うだけでなく、核酸であるピリミジン合成においても電子受容体として働くなど様々な代謝反応で電子授受の役割を担っており、がん細胞の増殖には欠かせない。また、CoQ10 はミトコンドリア外での抗酸化剤としての役割も最近明らかになりつつある。膵臓がんが形成する微小環境は非常に低酸素であることが知られており、所属研究室からの上記報告は、少ない酸素リソースを CoQ10 の合成に割り増殖を維持する膵臓がんの様子を明らかにしている。また CoQ10 は内在性に合成されるだけでなく、食事やサプリメントからも摂取できることが知られている。そこで私たちは、がん細胞は CoQ10 を内在性に合成するだけでなく、外部から取り込むことでもその量を維持するのではないかと仮説を立てた。ところが、CoQ10 は非常に疎水性の高い化合物であり何らかの輸送体やキャリアの存在が示唆されるが、その体内での動態や細胞内でのオルガネラ間の輸送メカニズムについては不明な点が多い。

【目的】

ヒト細胞で未同定の CoQ10 取り込み経路や輸送経路を探索する。また、同定できた場合は、がん増殖への影響や同定経路の生理的な意義の検討を行う。

【結果】

まず、全ゲノムを対象とした CRISPR スクリーニングに最適な条件を検討した。すでに述べたように CoQ10 は内在性に合成されるため、内在性の CoQ10 合成経路を阻害することによって、細胞外からの CoQ10 のみに着目できる細胞を樹立した。その細胞は CoQ10 添加により細胞増殖やミトコンドリアの酸素消費が回復することや、ミトコンドリア活性酸素が低下することを確認した。次に、その細胞を用いて CRISPR スクリーニングを実施した。スクリーニングでは既報で CoQ10 の輸送が報告されている遺伝子や、CoQ10 との結合が示唆されている遺伝子がいくつかヒットしており、スクリーニングがうまく機能したことが窺えた。スクリーニングのヒットの中で、CoQ10 との関わりが報告されていないリソソームに発現する膜貫通型タンパク質があり、私たちはこのタンパク質 A を CoQ10 の輸送体の第一候補としてリストアップした。予備的段階ではあるが、タンパク質 A をノックアウトした細胞では CoQ10 の取り込みが抑制されており、またミトコンドリア機能の低下も見られている。また興味深いことに、タンパク質 A をコードする遺伝子がノックアウト

トされたマウスや機能が低下したヒト患者さんでは神経変性疾患様の症状を示すことが分かっており、CoQ10 輸送とこれら疾患との関連も示唆される。

今後の方針としては、生化学的手法を用いてタンパク質 A の CoQ10 の取り込みにおける役割を明らかにすること、がん細胞の増殖における役割を検討すること、またノックアウトマウスにおける神経症状と CoQ10 の関わりを明らかにすることが挙げられる。CoQ10 の輸送に関わる疾患については今の所報告がないので、メカニズムを含め詳細に解析したい。また $^{18}\text{O}_2$ を用いた標識方法についてはすでに学び習得しているので、当初予定していた *in vivo* での $^{18}\text{O}_2$ 標識実験も上記プロジェクトと並行して進めたいと考えている。