

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と
臨床実用化に関する研究

研究分担者 李 鍾國 大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座准教授

研究要旨

ヒト臨床サンプルを用いた遺伝子解析より検出された遺伝子変異のうち、新規候補遺伝子として同定されたものについては、迅速に *in vivo* の機能解析実験系の STEP へ検証を進めることが重要である。

本研究は診断法及び創薬に関する標的同定を最終目標とし、その迅速な臨床実用化を企図している。これまでに行ってきた、希少難治性疾患動物モデル開発、病態機序解析、及びヒト臨床研究で得た多くの成果は、本研究が目指す診断治療の創薬開発とその迅速なる臨床実用化に大きく寄与させることが可能である。詳細なゲノム情報の利用実現は、難治性疾患の原因遺伝子に基づく医療アプローチを可能とすると予想される。

難治性循環器疾患の遺伝性家系及び心不全症例の生体試料バンクより、ゲノム解析を行い同定し得た遺伝子に就いて、心筋症マウス解析とゼブラフィッシュイメー징ングの利用による迅速な *in vivo* 解析を行う。

またゲノム創薬へ向けてヒト iPS 細胞による検証も用いた治療標的リガンド開発と臨床実用化など得られたゲノム情報を迅速かつ有効に診療に結実させことを目的として研究環境の整備を進める。

A. 研究目的

遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例を対象に行った遺伝子解析から同定された、原因遺伝子と推定される新規 rare variant を対象に、診断および治療薬標的を見出し、臨床実用化するために迅速に *in vivo* の機能解析を行い生物学的意義を検証できる実験系を構築する。

評価を行う。大阪大学医学部未来医療センターの協力を得て、前項分子標的リガンドの薬剤 assay 系にも用いる。その際、同定した標的分子に対するシーク化合物の探索も同時に進め、化合物を得た際には疾患 iPS 細胞を用いて同定された遺伝子変異を持つヒト細胞を用いた、病態機序および新規薬剤や既存薬の薬効評価と機能解析検討も行えるよう、創薬研究の基盤整備を行う。

B. 研究方法

ゲノム情報の臨床実用化 (ゲノム創薬、診断薬開発と細胞治療への応用)

原因遺伝子発端者から採血検体を得て、組織からの疾患 iPS 細胞株を樹立し、これまで構築してきた高効率心筋細胞分化系を用いて、病態機序、分子機能解析を行うとともに、既存治療薬剤の薬効

(倫理)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿

名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要性に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられる。これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて: 提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

原因遺伝子発端者組織から iPS 細胞を樹立し、独自の高効率心筋細胞分化系を用いて、病態機序、分子機能解析を行うため、承諾を得た家系に対しての iPS 細胞作製について具体的に 8 例の細胞株を樹立ないし樹立を開始した。

また、樹立した iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導を行い、iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、分子シグナル、電気生理特性、細胞内 Ca 制御特性、収縮特性等の分子機能・生理機能の解析実験基盤を整備し、病態発症機構の解明および創薬に向けた実験を開始した。

SSS1 および新規同定心筋症原因遺伝子を有する家系を対象に、iPS 細胞株樹立へ向けて症例の遺伝的バックグラウンドの検証に入っている。本遺伝子蛋白をシーズとして開発された化合物を用いた機能解析を行うため、化合物の入手および培養

細胞実験における変化を培養細胞における検討を行う準備を開始するとともに、iPS 細胞でも行う事ができるよう実験準備を行っている。

D. 考察

原因遺伝子発端者由来の疾患 iPS 細胞株の樹立は、それを用いた特異的実験系を実際のヒト症例の組織へ分化した培養細胞で組むことができる。そのため、従来の培養細胞を用いた生理実験、in vitro / in vivo 薬理実験、動物生体実験、ヒト臨床試験への橋渡しとして、効率良くかつ精度を高め同定した遺伝子の機能解析として有用である。

これまで構築してきた高効率心筋細胞分化系を用いて、病態機序、分子機能解析を行うとともに、既存治療薬剤の薬効評価を行う。大阪大学医学部未来医療センターの協力を得て、前項分子標的リガンドの薬剤 assay 系にも用いる準備を進めている。

同定した標的分子に対して、シーズ化合物の探索も同時に進め、または既に得た化合物を用いて、疾患 iPS 細胞による、新規薬剤開発検討および薬効評価に関する検討を進めており、次世代シーケンサーを用いた、ゲノム解析による創薬基盤研究整備を行う上でも、非常に重要な実施モデルとなると考えられる。

E. 結論

平成 24 までに同定された疾患原因遺伝子に対して、平成 25 年度からの本格的検討開始を視野に、遺伝子機能及び生物学的意義を検証できる解析を実施し、将来探索化合物を用いた機能解析を行うための実験準備として、iPS 細胞株化への準備を開始した。

新規同定心筋症原因遺伝子を有する家系への次世代ゲノム解析の継続と、同定した標的分子に対して、シーズ化合物の探索も同時に進め、または既に得た化合物を用いて、疾患 iPS 細胞による、新規薬剤開発検討および薬効評価に関する検討は非常に重要な実施モデルとなると考えられる。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1、論文発表 (英文原著)

- 1) Miwa K, Lee JK, Takagishi Y, Opthof T, Fu X, Hirabayashi M, Watabe K, Jimbo Y, Kodama I, Komuro I. Axon guidance of sympathetic neurons to cardiomyocytes by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). PLoS One. 8(7):e65202, 2013

2、学会発表

- 1) 李鍾國. Electrical Properties of Engineered Heart Tissues: Its Implication and Application for Arrhythmias. 心臓再生治療と不整脈. 第17回日本心不全学会学術集会 シンポジウム. 2013年11月29日・さいたま
- 2) Haruyo Yasui, Jong-Kook Lee, Akira Yoshida, Teruki Yokoyama, Junichi Nakai, Issei Komuro. Electrical Propagation of Three-dimensional Engineered Hearts Using Decellularized Extracellular Matrix. Biophysical society 58th Annual Meeting. 2014年2月19日 (San Francisco, USA)
- 3) 李鍾國、永井 敏雄、宮川 繁、田畑 泰彦、坂田 泰史、澤 芳樹、小室 一成. 細胞動員の制御による心筋再生治療: 第13回日本再生医療学会総会 シンポジウム (京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1、特許取得 なし

2、実用新案登録 なし

3、その他 以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)

分担研究報告書

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と 臨床実用化に関する研究

研究分担者 扇田久和 滋賀医科大学 生化学・分子病態生化学講座 教授

研究要旨

従来行ってきた希少難治性疾患動物モデル開発、病態機序解析、及びヒト臨床研究で得た多くの成果をもとに、難治性循環器疾患の診断治療の創薬開発とその迅速なる臨床実用化を目指す。

次世代シーケンス解析の実践と同定遺伝子情報を診断治療に迅速に応用する独創的手法を利用し実施する。迅速なゲノム医療への応用のため、既知変異の迅速な鑑別除外により、新規変異を持つ確率の高い症例に次世代解析を行い、新規分子ないし変異に対する機動力ある表現型機能解析と同定遺伝情報の臨床応用への時間短縮をはかる。難治性循環器疾患の遺伝性家系の生体試料バンクを利用し、ゲノム解析の精度と速度を高める方策をとると共に、モデルマウス解析とゼブラフィッシュイメージングの利用による *in vivo* 検証の迅速化や、生化学的解析法を利用した独自の生理活性物質同定およびシーズ探索技術を利用し、治療標的リガンド開発と臨床実用化など得られたゲノム情報を迅速かつ有効に診療に結実させるよう研究を進める。

A. 研究目的

難治性不整脈疾患の原因遺伝子同定を行うことを目的とする。また、解析に際しては本研究班において開発される統一された配列解析プロトコールおよび情報解析プロトコールが、他施設に広げて行うことが可能かどうかについての比較検証が行えるようプロジェクトを進める。

新規 rare variant(遺伝子変異)が同定された場合には、その分子機能解析と、生理的意義を知るための相互作用分子を同定し、実用化診断治療薬となる分子標的を見出すことを研究目標とする。

B. 研究方法

ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

遺伝性が示唆される難治性心血管系疾患症例(不整脈症例)を対象に、ヒトゲノム解析の説明と同意を得て、滋賀医科大学で採取した採血検体(ゲノム DNA 抽出)を用いて、大阪大学との共同研究を行う。

難治性不整脈症例についてのゲノム解析を Illumina 社製 GA IIx を用いて行う。データスループットは大阪大学、国立循環器病研究センターで実施している本研究のプロトコールと同一のものをい、

配列解析に関しては Hiseq2000 で行った際の解析に揃えた設定とし、情報解析は本研究用に開発したパイプライン(大阪大学 Linux サーバー)を用いてバリエーションを検出する。

滋賀医科大学内で実施した不整脈疾患の Illumina 社製 GA IIx を用いた解析結果と大阪大学の解析結果について、比較検討する。

(倫理)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重に行う。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

①試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

②試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 本研究での解析に使用する検体は通常の診療の際に医学的必要性に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

③試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて: 提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化さ

れたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

④動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

本年度は、難治性不整脈 1 家系 4 検体を対象として、全 Exome 解析を実施した。解析は Illumina 社製 GA IIx を用いて行った。臨床データと連結可能匿名化されており、臨床情報をガイドに原因遺伝子の同定を行った。シーケンスのクオリティについては、従来比較検討されてきたものと同様のデータを取ることができ、情報解析のプロトコールの実施に際しても支障なく実施することができた。

全 Exome 解析用の日本人 SNV データベースが必ずしも網羅できていない状況もあり、また、今回解析を実施した家系数および検体数が少数であり、完全な原因遺伝子の同定には至っていない。しかし、候補遺伝子1つについて cDNA のクローニングを行い、哺乳類細胞での発現ベクターを構築した。このベクターを利用することで、in vitro および in vivo 実験系による機能解析を行う準備を進めている。

D. 考察

独自に解析をすることと比較して、循環器ゲノム解析施設が均一な配列解析、情報解析プロトコールで解析を実施することにより、将来的にも互換性のあるデータの蓄積を行う事ができた。

In house dataの蓄積と日本のバリエーションデータベースの公開を待たなければ、小家系における原因遺伝子の同定には至らないことにならないが、将来の公共データベース利用が可能となった際には、同様の解析を行っている施設のデータとも参照、ないし同様の臨床家系症例を有する施設との統一解析プロトコールを用いての解析結果を蓄積していく

ことの意義は大きいものと考える。

また、逆に循環器施設が共同してこれら症例の蓄積を進めていくことにより循環器疾患解析に適応させたIn house genome referenceを構築することも可能となる。これらは将来有用性の高いシステムの構築に資するものと考えられた。

E. 結論

難治性不整脈 4 検体について、家系症例全 Exome 解析を実施した。連結可能匿名化された臨床データを元に、家系情報から現在利用できる手法での原因遺伝子の絞り込みを試みた。しかし一般に利用できる全 Exome 解析用の日本人 SNV データベースはなく、現時点では一つの遺伝子に到達することはできなかった。

In-house database および今後整備される日本人 SNV データベースの利用により原因を突き止められるように引き続きデータ、検体の蓄積を継続する。

循環器ゲノム解析施設が多施設間で配列解析、情報解析を行えるようにシステムの普及実用化を目指す上では、均一のプロトコルを作り、均一な配列解析、情報解析を実施することにより、将来的にも互換性のあるデータの蓄積を行う事が望ましいと考えられた。

また循環器施設が共同してこれら症例や循環器疾患解析に適応させたIn house genome referenceの蓄積を進めていくことの重要性についても示唆的な検討を行うことができた。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文原著)

- 1) Maeda T, Takeuchi K, Pang X, Zankov DP, Takashima N, Fujiyoshi A, Kadowaki T, Miura K, Ueshima H, Ogita H.

Lipoprotein-associated phospholipase A2 regulates macrophage apoptosis through the Akt and caspase-7 pathways. *J Atheroscler Thromb*. In press. 2014.

- 2) Yamane T, Murao S, Kato I, Kashima L, Yuguchi M, Kozuka M, Takeuchi K, Ogita H, Ohkubo I, Ariga H.
Transcriptional regulation of the legumain gene by p53 in HCT116 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 438: 613-618. 2013.
- 3) Majima T, Takeuchi K, Sano K, Hirashima M, Zankov DP, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Miyoshi J, Ogita H.
An Adaptor Molecule Afadin Regulates Lymphangiogenesis by Modulating RhoA Activity in the Developing Mouse Embryo. *PLoS One*. 8: e68134. 2013.
- 4) Zankov DP, Ogita H.
ACTN4 (actinin, alpha4). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 17: 663-669. 2013.

2. 学会発表

- 1) Pang Xiaoling, Toshinaga Maeda, Keisuke Takeuchi, Hisakazu Ogita.
Regulation of macrophage apoptosis by lipoprotein-associated phospholipase A2 through the caspase-7 and Akt pathways. 日本循環器学会 2014年3月・東京
- 2) 村木早苗、上山久雄、山出新一、田邊詔子、扇田久和、大路正人
日本人先天色覚異常の2型3色覚における遺伝子型とアノマロスコープ結果との比較 日本臨床眼科学会 2013年10月・横浜
- 3) 真島崇、扇田久和
アダプター分子アフアディンによる単量体 GTPアーゼ RhoA を介したリンパ管形成の制御機構 日本血管生物医学会 2013年9月・豊中
- 4) Keisuke Takeuchi, Dimitar P. Zankov, Takashi Majima, Hisakazu Ogita.
Afadin regulates lymphangiogenesis through RhoA activation in mouse embryos. 日本生化学会大会 2013年9月・横浜
- 5) 前田利長、竹内圭介、Pang Xiaoling、扇田久和

リポタンパク質関連ホスホリパーゼ A2 変異型 (V279F) 遺伝子によるアポトーシス誘導機序の検討 日本生化学会近畿支部例会 2013 年 5 月・吹田

- 6) 村木早苗、上山久雄、豊田太、扇田久和、大路正人
杆体一色覚における網膜錐体 cGMP 依存性カチオンチャネルの変異の機能的解析 日本眼科学会総会 2013 年 4 月・東京

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

- 1、特許取得
なし
- 2、実用新案登録
なし
- 3、その他
以上、特筆すべき事項なし

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation

Hidetaka Kioka^{a,b,1}, Hisakazu Kato^{a,1}, Makoto Fujikawa^c, Osamu Tsukamoto^a, Toshiharu Suzuki^{d,e}, Hiromi Imamura^f, Atsushi Nakano^{a,g}, Shuichiro Higo^{a,b}, Satoru Yamazaki^h, Takashi Matsuzaki^b, Kazuaki Takafujiⁱ, Hiroshi Asanuma^j, Masanori Asakura^g, Tetsuo Minamino^b, Yasunori Shintani^a, Masasuke Yoshida^e, Hiroyuki Noji^k, Masafumi Kitakaze^g, Issei Komuro^{b,l}, Yoshihiro Asano^{a,b,2}, and Seiji Takashima^{a,2}

Departments of ^aMedical Biochemistry and ^bCardiovascular Medicine and ^cCenter for Research Education, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan; ^dDepartment of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Tokyo University of Science, Chiba 278-8510, Japan; ^eChemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8503, Japan; ^fDepartment of Molecular Bioscience, Kyoto Sangyo University, Kyoto 603-8555, Japan; ^gThe Hakubi Center for Advanced Research and Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan; Departments of ^hClinical Research and Development and ⁱCell Biology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Osaka 565-8565, Japan; ^jDepartment of Cardiovascular Science and Technology, Kyoto Prefectural University School of Medicine, Kyoto 602-8566, Japan; and ^kDepartment of Applied Chemistry, School of Engineering and ^lDepartment of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-8656, Japan

Edited by Gottfried Schatz, University of Basel, Reinach, Switzerland, and approved November 19, 2013 (received for review October 7, 2013)

The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system generates most of the ATP in respiring cells. ATP-depleting conditions, such as hypoxia, trigger responses that promote ATP production. However, how OXPHOS is regulated during hypoxia has yet to be elucidated. In this study, selective measurement of intramitochondrial ATP levels identified the hypoxia-inducible protein G0/G1 switch gene 2 (G0s2) as a positive regulator of OXPHOS. A mitochondria-targeted, FRET-based ATP biosensor enabled us to assess OXPHOS activity in living cells. Mitochondria-targeted, FRET-based ATP biosensor and ATP production assay in a semi-intact cell system revealed that G0s2 increases mitochondrial ATP production. The expression of G0s2 was rapidly and transiently induced by hypoxic stimuli, and G0s2 interacts with OXPHOS complex V (F_0F_1 -ATP synthase). Furthermore, physiological enhancement of G0s2 expression prevented cells from ATP depletion and induced a cellular tolerance for hypoxic stress. These results show that G0s2 positively regulates OXPHOS activity by interacting with F_0F_1 -ATP synthase, which causes an increase in ATP production in response to hypoxic stress and protects cells from a critical energy crisis. These findings contribute to the understanding of a unique stress response to energy depletion. Additionally, this study shows the importance of assessing intramitochondrial ATP levels to evaluate OXPHOS activity in living cells.

energy metabolism | live-cell imaging

Maintaining cellular homeostasis and activities requires a stable energy supply. Most eukaryotic cells generate ATP as their energy currency mainly through the mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) system. The OXPHOS system consists of five large protein complex units (i.e., complexes I–V), comprising more than 100 proteins. In this system, oxygen (O_2) is essential as the terminal electron acceptor for complex IV to finally produce the proton-motive force that drives the ATP-generating molecular motor complex V (F_0F_1 -ATP synthase).

Hypoxia causes the depletion of intracellular ATP and triggers adaptive cellular responses to help maintain intracellular ATP levels and minimize any deleterious effects of energy depletion. Although the metabolic switch from mitochondrial respiration to anaerobic glycolysis is widely recognized (1–4), several recent reports have shown that hypoxic stimuli unexpectedly increase OXPHOS efficiency as well (5–7). In other words, cells have adaptive mechanisms to maintain intracellular ATP levels by enhancing OXPHOS, particularly in the early phase of hypoxia, in which the O_2 supply is limited but still remains. However, the mechanism by which OXPHOS is regulated during this early hypoxic phase is still not fully understood.

Revealing the mechanism of this fine-tuned regulation of OXPHOS requires accurate and noninvasive measurements of OXPHOS activity. Although researchers have established methods to measure OXPHOS activity, precise measurement, especially in living cells, is still difficult. Measuring the intracellular ATP concentration is one of the most commonly used methods for evaluating OXPHOS activity. However, there are two major problems with this method. First, the intracellular ATP concentration does not always accurately reflect OXPHOS activity, because it can also be affected by glycolytic ATP production, cytosolic ATPases, and ATP buffering enzymes, such as creatine kinase and adenylate kinase (8). Second, because measurements of the ATP concentration by chromatography (9), MS (10), NMR (11), or luciferase assays (12) are based on cell extract analysis, these methods cannot be used to measure the serial ATP concentration changes in living cells in real time.

In this study, we overcame these problems by the selective measurement of the intramitochondrial matrix ATP concentration ($[ATP]_{mito}$) in living cells. In the final step of OXPHOS, ATP is produced not in the cytosol but in the mitochondrial matrix. Therefore, we hypothesized that a selectively measuring $[ATP]_{mito}$ is suitable for the highly sensitive evaluation of cellular ATP production by OXPHOS. In fact, real-time evaluation of both $[ATP]_{mito}$ and the cytosolic ATP concentration ($[ATP]_{cyto}$) in living cells revealed that $[ATP]_{mito}$ reflected OXPHOS activity with far more sensitivity than $[ATP]_{cyto}$. Using this fine method, we found that G0/G1 switch gene 2 (G0s2), a hypoxia-induced

Significance

We developed a sensitive method to assess the activity of oxidative phosphorylation in living cells using a FRET-based ATP biosensor. We then revealed that G0/G1 switch gene 2, a protein rapidly induced by hypoxia, increases mitochondrial ATP production by interacting with F_0F_1 -ATP synthase and protects cells from a critical energy crisis.

Author contributions: Y.A. and S.T. designed research; H. Kioka, H. Kato, O.T., and A.N. performed research; M.F., T.S., H.I., S.H., S.Y., T. Matsuzaki, K.T., H.A., M.A., T. Minamino, Y.S., M.Y., H.N., M.K., and I.K. contributed new reagents/analytic tools; H. Kioka and H. Kato analyzed data; and Y.A. and S.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹H. Kioka and H. Kato contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. E-mail: asano@cardiology.med.osaka-u.ac.jp or takasima@cardiology.med.osaka-u.ac.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1318547111/-DCSupplemental.

protein in cardiomyocytes, increases OXPHOS activity. G0s2 interacted with F_0F_1 -ATP synthase and increased the ATP production rate. Our results suggest that hypoxia-induced protein G0s2 is a positive regulator of OXPHOS and protects cells by preserving ATP production, even under hypoxic conditions.

Results

Establishment of a Sensitive Method to Assess OXPHOS Activity in Living Cells. To elucidate the mechanism by which OXPHOS is regulated under hypoxia, it is essential to establish a sensitive method for assessing OXPHOS activity in living cells. For this purpose, we used an ATP indicator based on ϵ -subunit for analytical measurements (ATeam), which is an ATP-sensing FRET-based indicator (13). We introduced this ATP biosensor into cardiomyocytes that possess an abundance of mitochondria and produce the highest levels of ATP among all primary cells (14, 15). The ATeam assay can measure both $[ATP]_{cyto}$ (i.e., the Cyto-ATeam assay) and $[ATP]_{mito}$ when a duplex of the mitochondrial targeting signal of cytochrome *c* oxidase subunit VIII is attached to the indicator (i.e., the Mit-ATeam assay). In this case, the YFP/CFP emission ratio of the ATeam fluorescence represents the ATP concentration in each compartment. Interestingly, the Mit-ATeam assay was a far more sensitive method than the Cyto-ATeam assay in determining OXPHOS activity in living cells. For example, a very low dose of oligomycin A (0.01 μ g/mL), a specific OXPHOS complex V (F_0F_1 -ATP synthase) inhibitor, greatly reduced the YFP/CFP emission ratio of the Mit-ATeam fluorescence that represents $[ATP]_{mito}$ within 10 min (Fig. 1 *A*, Upper and *B* and Movie S1). In contrast, the same dose of oligomycin A resulted in a slight and slow decline of the YFP/CFP emission ratio of Cyto-ATeam fluorescence (Fig. 1 *A*, Lower and *B* and Movie S1). The same phenomenon was observed when the cells were exposed to hypoxia, which suppresses the activity of OXPHOS complex IV (cytochrome *c* oxidase). Again, $[ATP]_{mito}$ decreased more markedly than $[ATP]_{cyto}$ during 2.5 h of hypoxia (Fig. 1 *C* and *D* and Movie S2). These results indicate that the Mit-ATeam assay is far more sensitive for measuring the activity of OXPHOS than the Cyto-ATeam

assay. In addition, OXPHOS inhibition decreased the YFP/CFP emission ratio of the Mit-ATeam fluorescence of HeLa cells as well as cardiomyocytes (Fig. S1), suggesting the broad applicability of this assay. Therefore, we used Mit-ATeam for the assessment of the OXPHOS activity in living cells.

Hypoxia-Induced Gene G0s2 Affects the Intramitochondrial ATP Concentration. The expression of genes involved in OXPHOS regulation is considered to be up-regulated in the early phase of hypoxia. Thus, to find unique OXPHOS regulators, we focused on the rapidly induced genes in response to hypoxic stimulation. We compared the gene expression profiles of cultured rat cardiomyocytes at three different time points during hypoxic conditions (0, 2, and 12 h) (Fig. S2*A*). The expression of well-known hypoxia-induced genes, such as VEGF- α and hexokinase 2 mRNA (16, 17), was slightly up-regulated at 2 h and further enhanced at 12 h of hypoxia. In contrast, three other genes (*Adams1*, *Cdkn3*, and *G0s2*) underwent rapid increases in expression at 2 h but declined at 12 h of sustained hypoxia (Fig. S2 *B* and *C*). This rapid and transient time course of expression implies that these three genes may play distinct regulatory roles, especially in the early hypoxic phase, in which oxygen is limited but still available. To examine whether these genes are involved in the regulation of OXPHOS activity, we knocked down these genes by shRNA (see Fig. S7*A*) and examined $[ATP]_{mito}$ using the Mit-ATeam assay. In this experiment, $[ATP]_{mito}$ in cardiomyocytes treated with shRNA for G0s2 clearly declined within 24 h compared with the control cardiomyocytes (Fig. 2*A* and Movie S3). In addition, the time course of ATP decline was in agreement with the time course of G0s2 depletion (Fig. 2*A* and Fig. S3*A*). Importantly, the over-expression of G0s2 restored normal ATP levels (Fig. 2 *B* and *C*), and again, the Cyto-ATeam assay could not detect a significant effect of G0s2 knockdown within this time frame (Fig. S3*B* and Movie S4). These findings imply that mitochondrial ATP production through OXPHOS was inhibited by G0s2 ablation. We confirmed that the mRNA and protein levels of G0s2 both increased after 2–6 h of hypoxia and then declined after 12 h of hypoxia (Fig. 2 *D* and *E*). G0s2 was first reported as a gene with

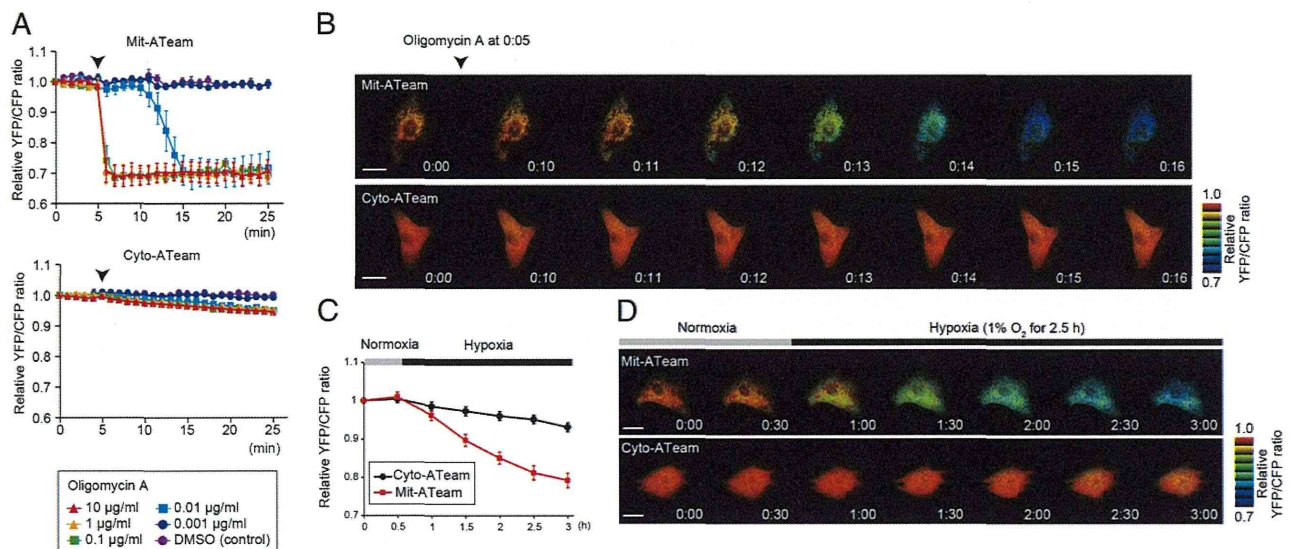


Fig. 1. Establishment of a sensitive method to assess OXPHOS activity in living cells. (*A*) YFP/CFP emission ratio plots of (Upper) Mit-ATeam and (Lower) Cyto-ATeam fluorescence in cardiomyocytes. Various concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1, and 10 μ g/mL) of oligomycin A or DMSO (control) were added at 5 min (arrowhead; $n = 3$). (*B*) Representative sequential YFP/CFP ratiometric pseudocolored images of (Upper) Mit-ATeam and (Lower) Cyto-ATeam in cardiomyocytes. Oligomycin A (0.01 μ g/mL) was added at 5 min. (Scale bars: 20 μ m.) (*C*) YFP/CFP emission ratio plots of Mit-ATeam and Cyto-ATeam fluorescence in cardiomyocytes ($n = 10$). (*D*) Representative sequential YFP/CFP ratiometric pseudocolored images of (Upper) Mit-ATeam and (Lower) Cyto-ATeam in cardiomyocytes. Cells were exposed to 1% hypoxia from the time point 30 min. All of the measurements were normalized to the YFP/CFP emission ratio at 0 min. Data are represented as the means \pm SEMs. (Scale bars: 20 μ m.)