

ミトコンドリア病研究公開フォーラム
2021年1月23日

ミトコンドリア病の研究最前線

順天堂大学大学院 神経学講座
IMS三芳総合病院 臨床検査科
田中雅嗣

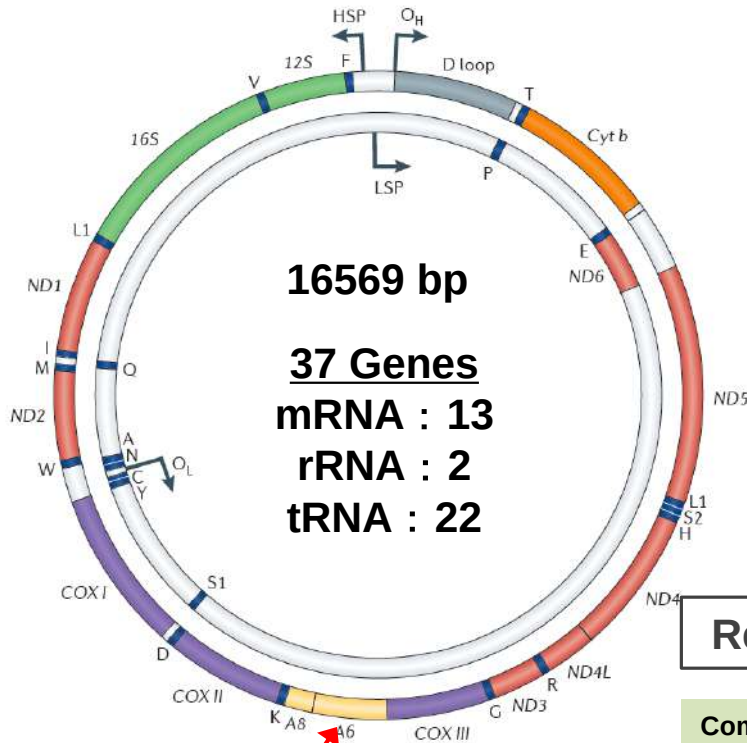


ミトコンドリア病の診断・治療

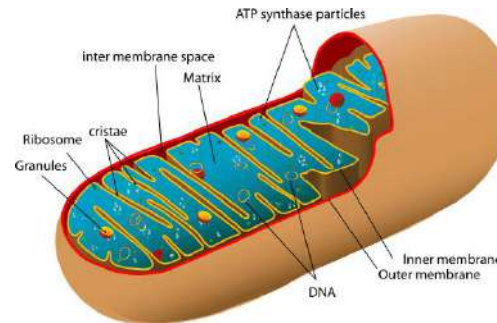
1. 制限酵素による治療 (MLS-CoxIV-SmaI)
2. ビルビン酸ナトリウムの臨床試験
3. ミトコンドリア病の診断薬開発 (GDF15)
4. 非侵襲的呼気分析 ($[^{13}\text{C}]$ -Pyr)
5. 細胞内過還元改善療法 (LOXCAT)
6. ゲノム編集 (CRISPR-Cas9)
7. 新しい遺伝子治療法 (TALE-DddA-UGI)
8. GDF15受容体 (GFRAL) と抗体医薬

ミトコンドリアDNA (mtDNA)

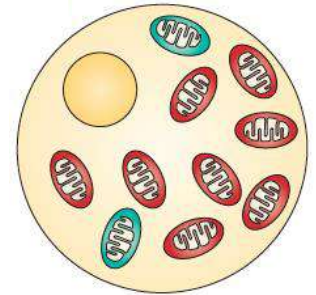
Mitochondrial DNA



Mitochondria



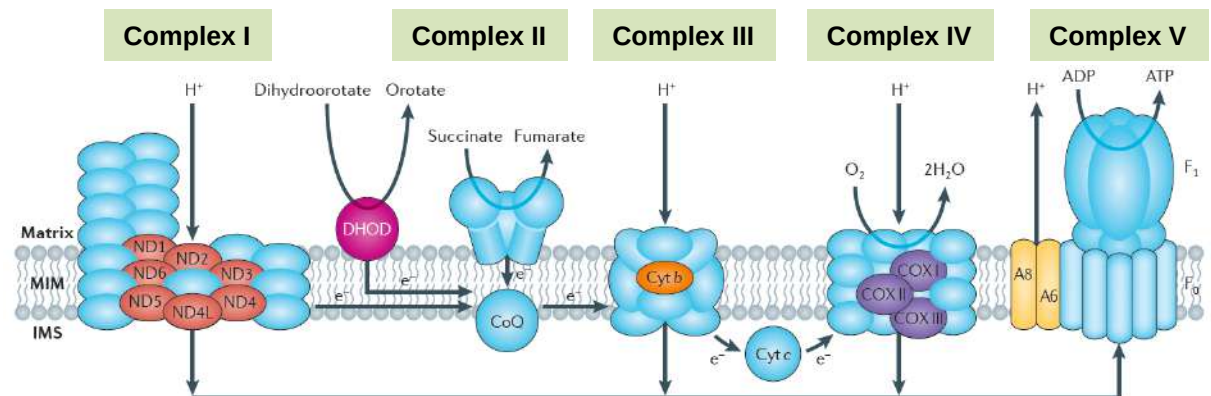
Cell



Heteroplasmy

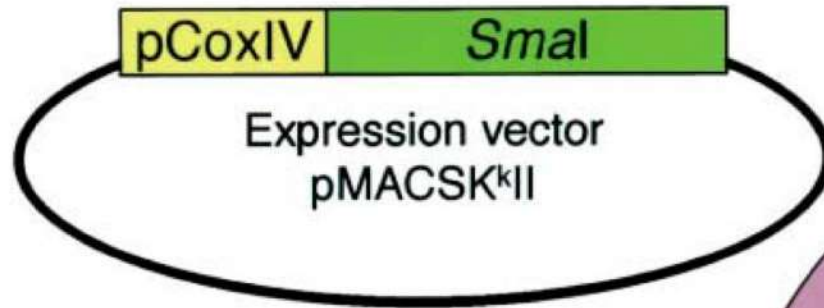
Presence of mutant and wild-type mtDNA in a cell

Respiratory Chain: Oxidative Phosphorylation System



NARP mutation
m.8993T>G
ATP6 p.L156R

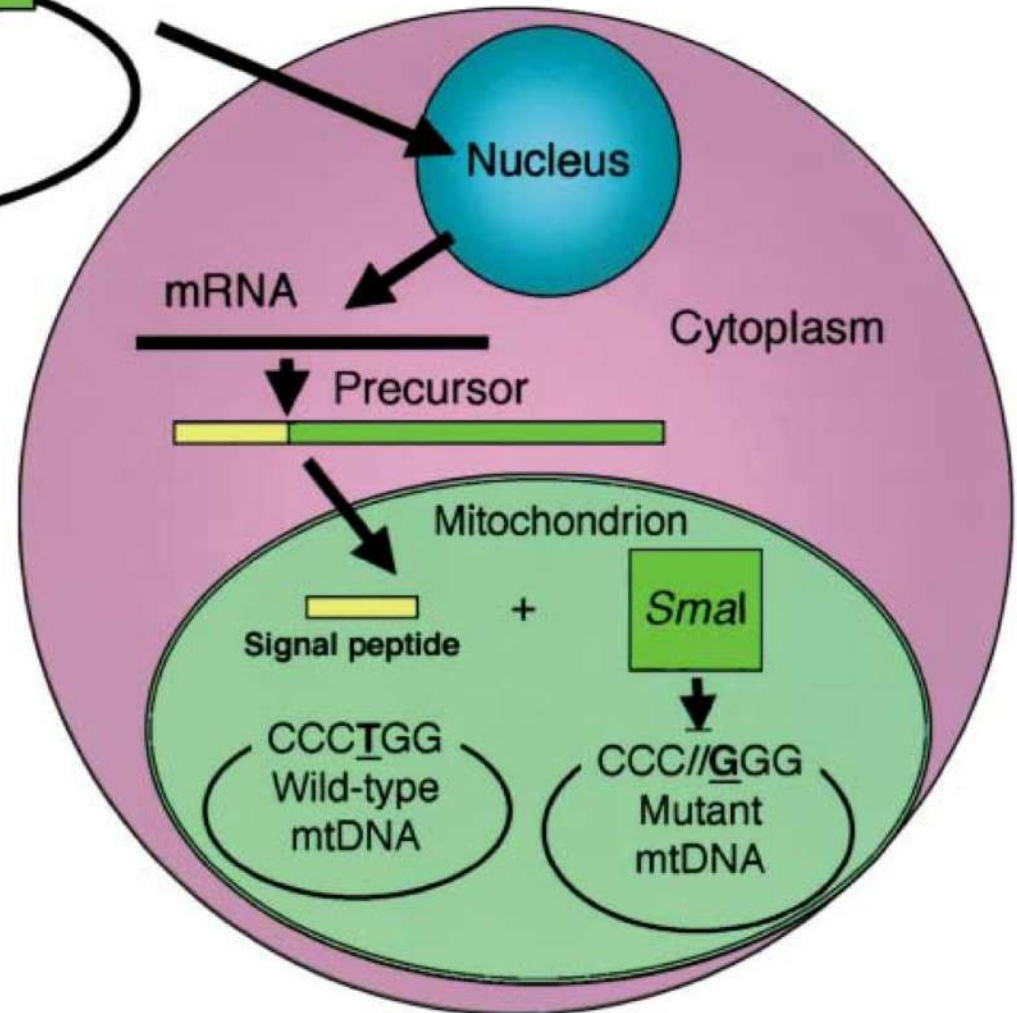
m.8993T>G変異に基づくNARP病に対する 制限酵素を用いた遺伝子治療法



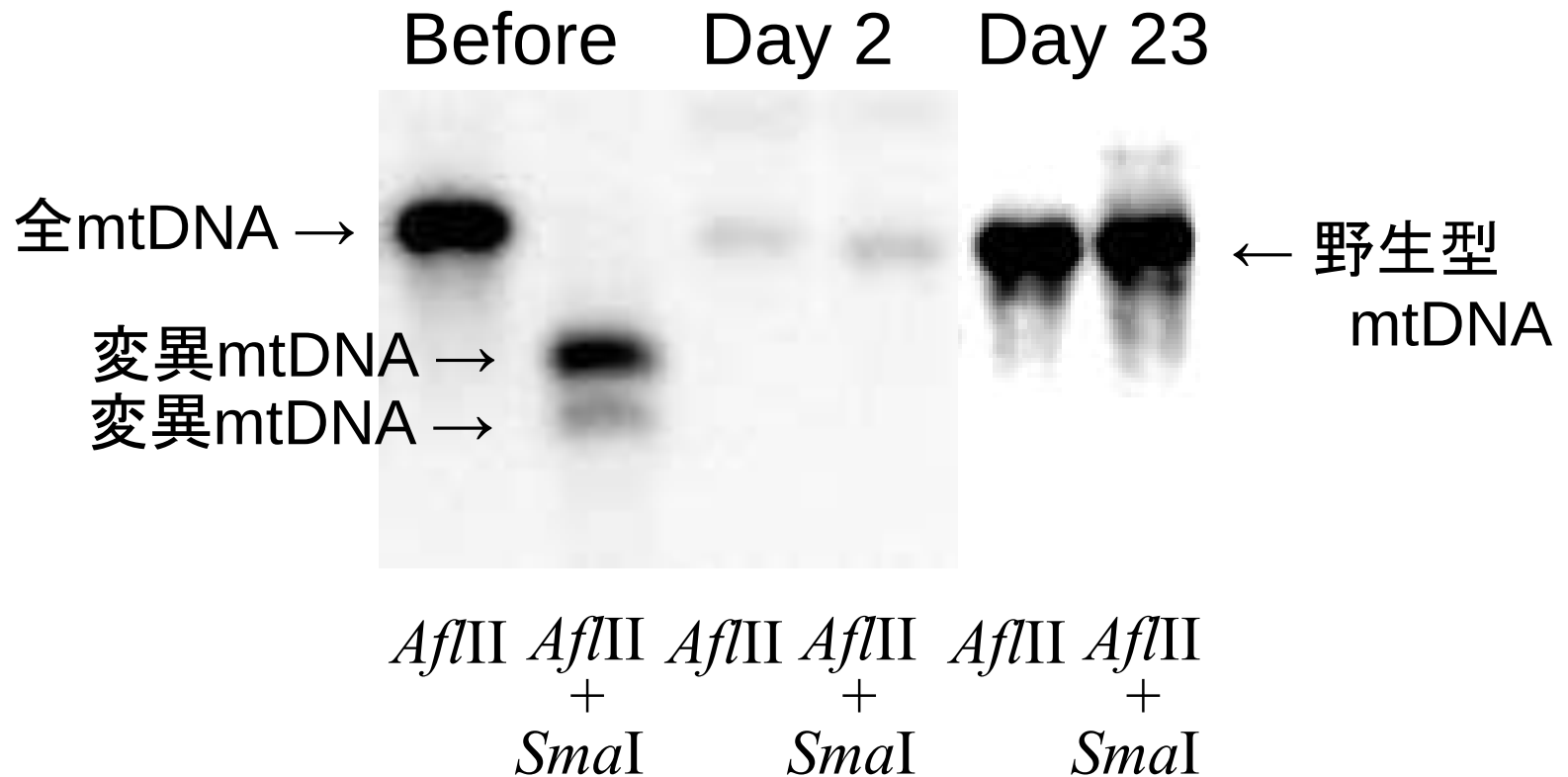
ミトコンドリアに
制限酵素を
送り込む



完全なる治癒

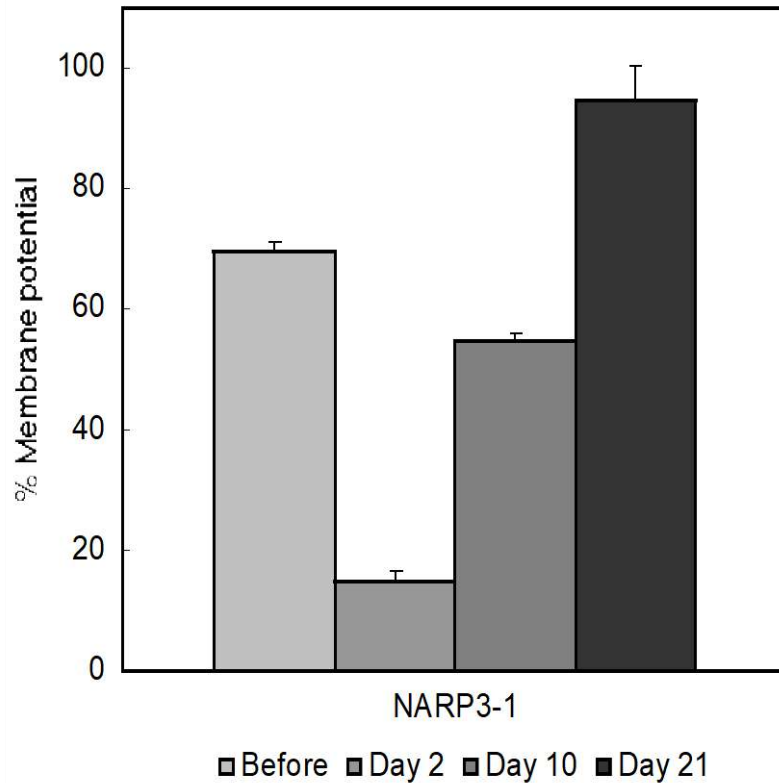


変異mtDNAの排除と野生型mtDNAの復権

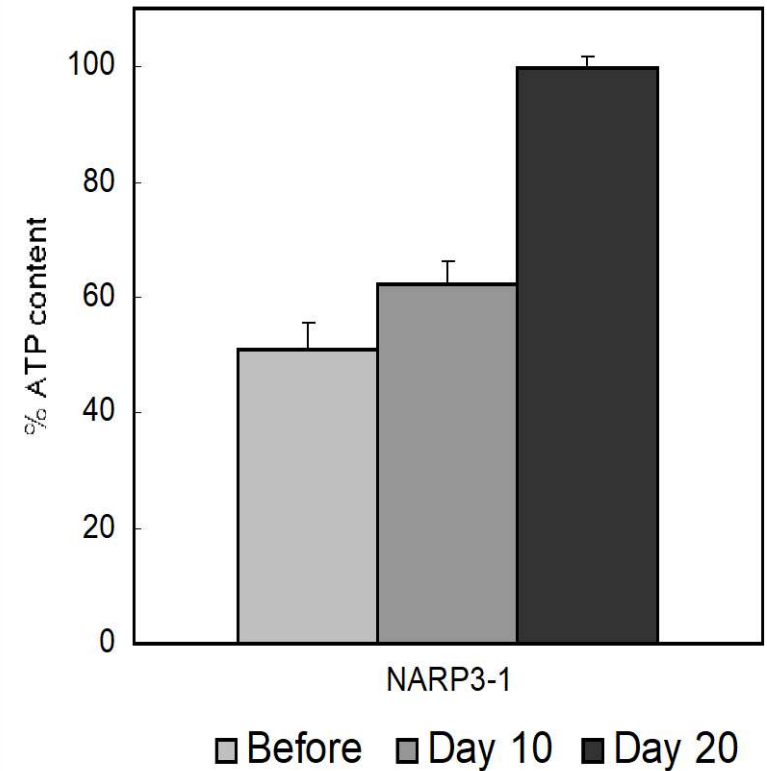


NARP3-1サイブリッドに遺伝子導入し3週間培養した
サザンブロット解析

遺伝子導入後にミトコンドリア膜電位と ATPレベルが正常化した



% 膜電位
細胞の蛍光測定



細胞内ATP含量
ルシフェラーゼ法

ミトコンドリア遺伝子治療の過程

制限酵素 *Sma* I の発現



変異mtDNAの破壊



呼吸鎖酵素の生合成の低下



エネルギー危機 (ATP 欠乏)



野生型mtDNA複製の促進



ATP合成と呼吸活性の上昇

→ 完全治癒

結論と今後への展望

我々は制限酵素 *Sma* I をミトコンドリアに輸入し
変異型 mtDNA を選択的に除去した

解決すべき問題

1. どのように m.3243A>G 変異を特異的に攻撃する酵素を設計できるか？
2. どのように遺伝子を骨格筋・心筋・脳に送り届けることができるか？
3. どのように遺伝子治療の間のエネルギー危機を克服できるか？

2020年 ノーベル化学賞「ゲノム編集」

生命の設計図を操る最先端技術

品種改良や病気の治療

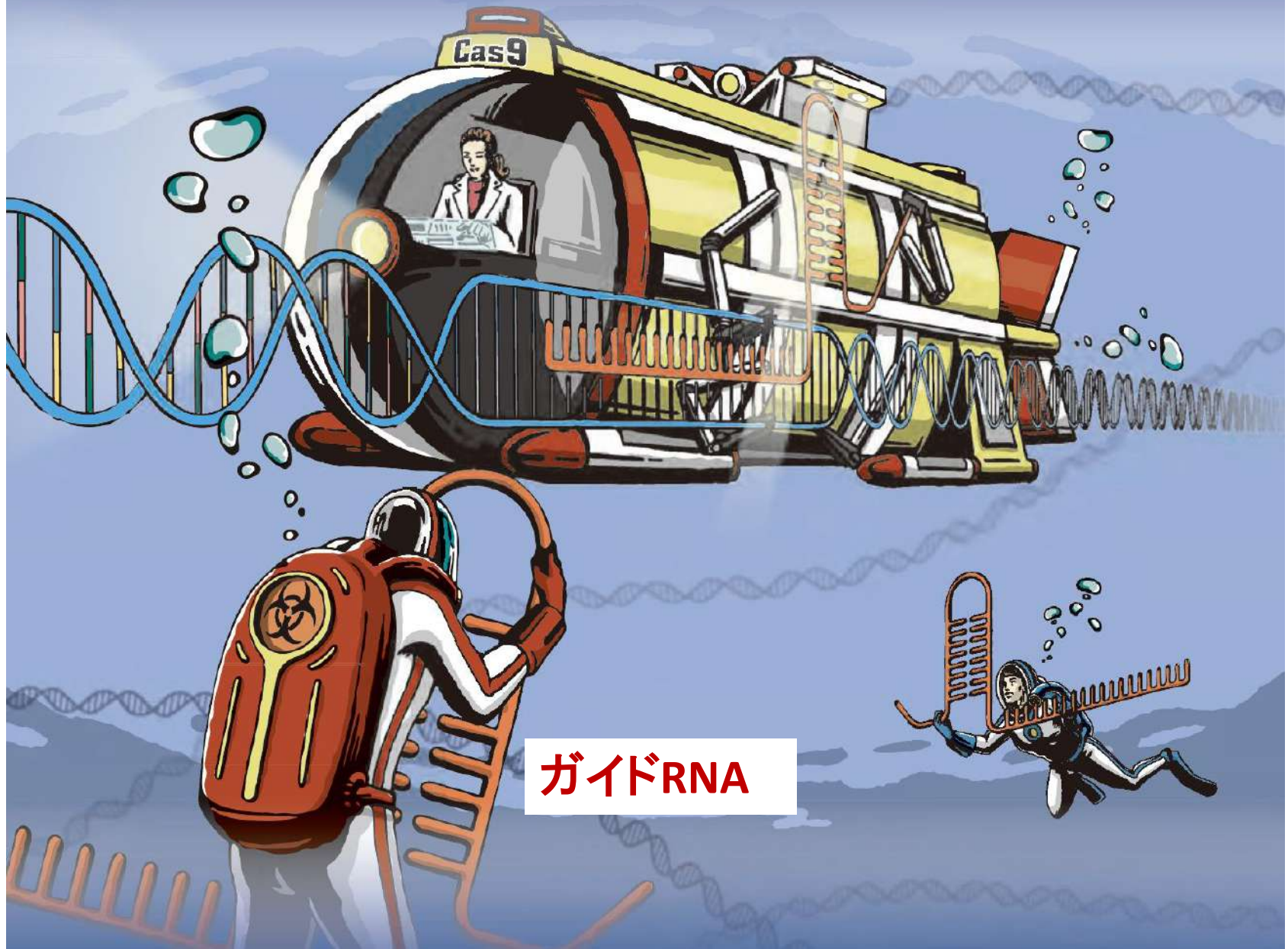


リライティング・ザ・コード・オブ・ライフ

エマニュエル・シャルパンティエ

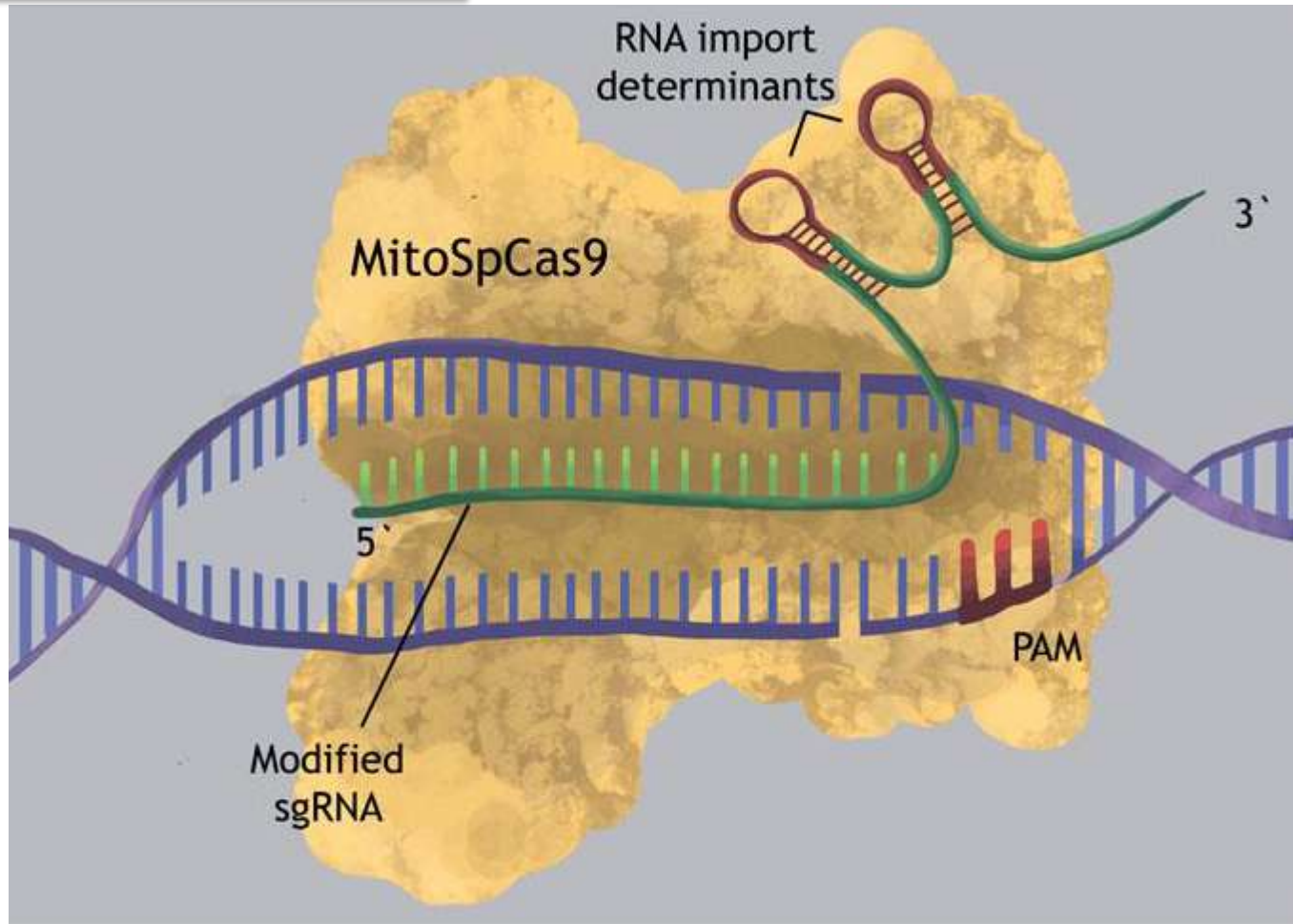
ジェニファー・ダウドナ

CRISPR/Cas9によるゲノム編集



ガイドRNA

mitoRGEN/SpCas9



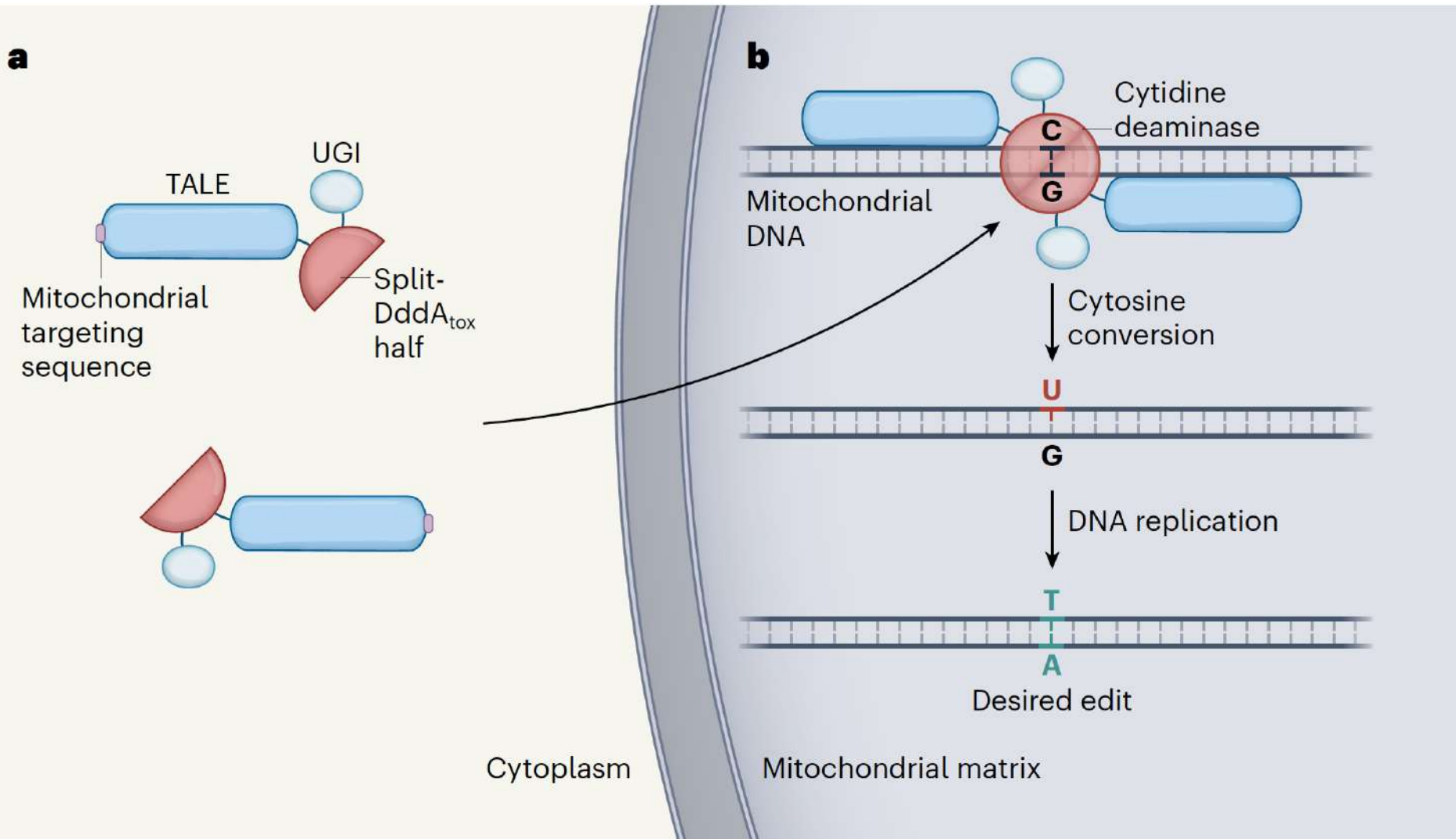
ヌクレアーゼにミトコンドリアの標的シグナルを付加する。
ガイドRNAにRNAインポート決定因子に付加する(現時点ではヒトミトコンドリアへのRNAインポートの4つの決定要因:MRP、RP、HDおよびHF)。
ヘアピン構造をガイドRNAの足場構造(テトラループ・ステムループ)の中に導入する。

問題点

- ◎ ミトコンドリアにCas9を送り込む
- × ミトコンドリアにsgRNAを送り込む

sgRNA (single guide RNA)

塩基エディター **DdCBE** を使ってmtDNA **C•G**→**T•A** に修正

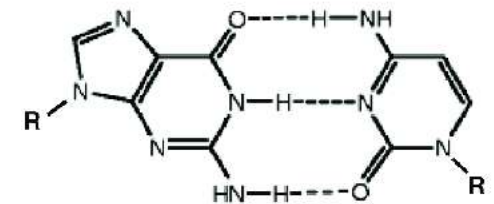
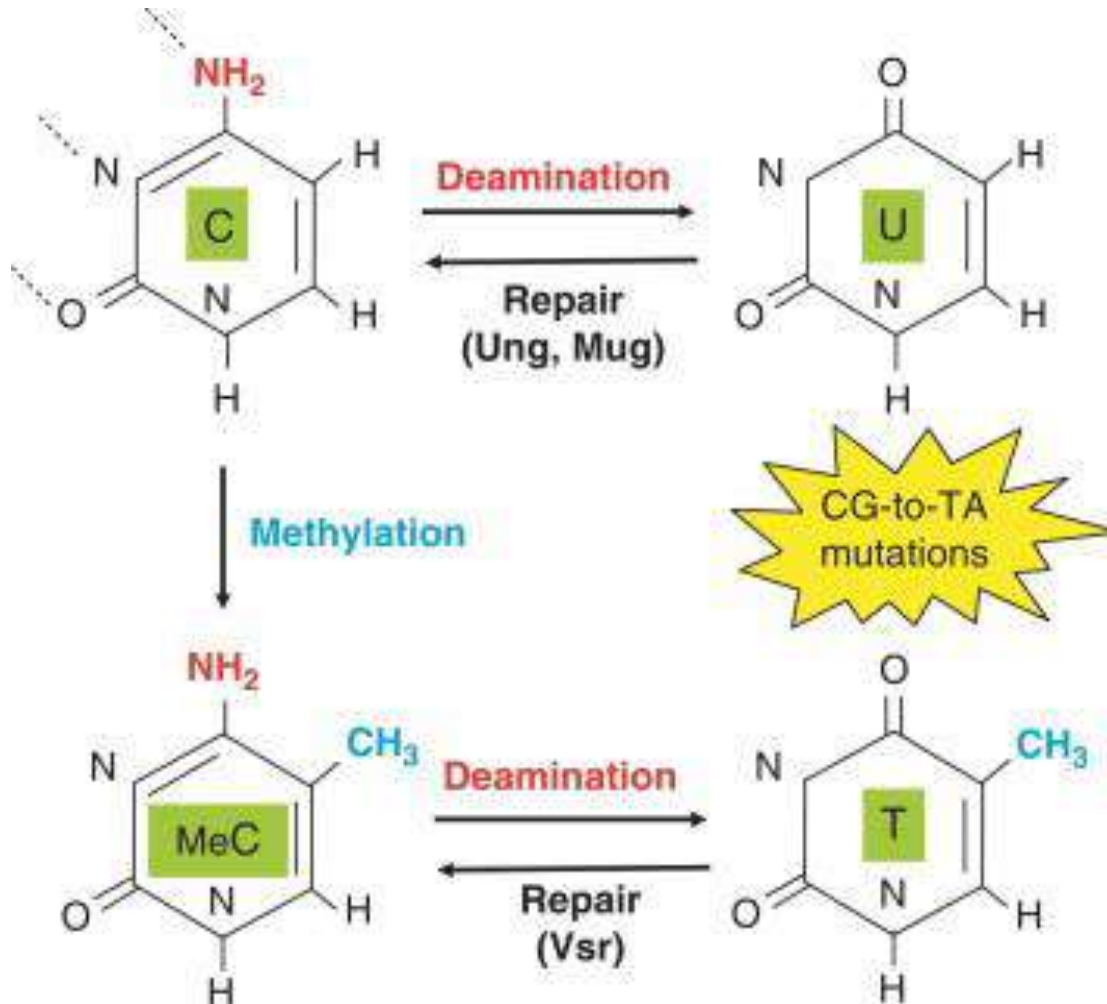


A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing.

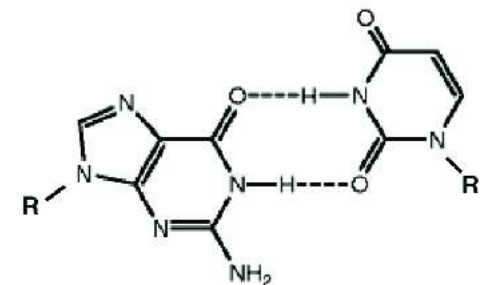
Mok et al. Nature 2020-07-08.

(Mitochondrial genome editing gets precise. Aushev, Herbert. Nature 2020-07-08

シトシン(**C**)の脱アミノ反応によって ウラシル(**U**)が生じる



Guanine:Cytosine



Guanine:Uracil

ミトコンドリア病の新規遺伝子治療法

部位特異的に**C**を**U**に変える酵素**DdCBE**をミトコンドリアに送り込む

変異型の塩基配列

5' -G**G**GCCC-3'

3' -C**C**CGGG-5'

酵素**DdCBE**による塩基変換 (C→**U**)

5' -G**G**GCCC-3'

3' -C**U**CGGG-5'

DNA複製で**U**の反対側に**A**が取り込まれる

5' -G**A**GCCC-3'

3' -C**U**CGGG-5'

DNA複製で**A**の反対側に**T**が取り込まれる

5' -G**A**GCCC-3'

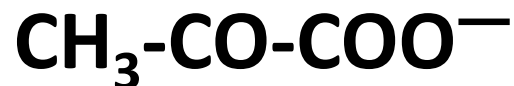
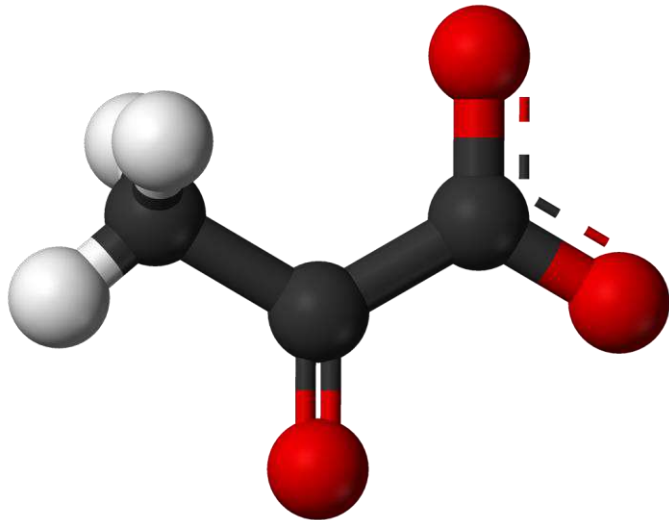
3' -C**T**CGGG-5'

これは**野生型**の塩基配列である

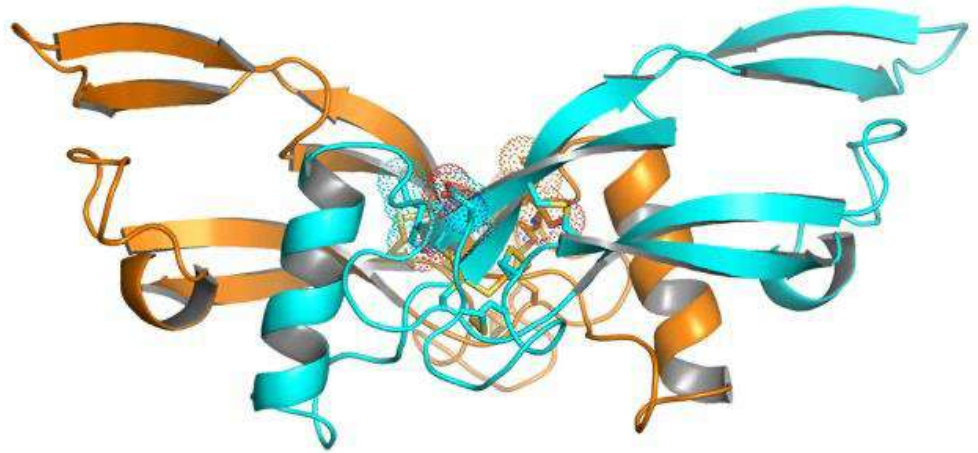
しかし、まだMELASの病因となる
m.3243**A**>**G**変異は修正できない

ミトコンドリア病に対する 治療薬・診断薬の同時開発

ピルビン酸



GDF15



Growth Differentiation Factor 15

平成30年度 日本医療開発研究機構
難知性疾患等実用化研究事業
ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対する
ピルビン酸ナトリウムの臨床治験

—試薬からの希少疾病治療薬開発の試み—
GMPに準拠した治験薬製造
安全性・安定性・急性毒性
第Ⅱ相臨床試験を完了

点滴用ピルビン酸ナトリウム

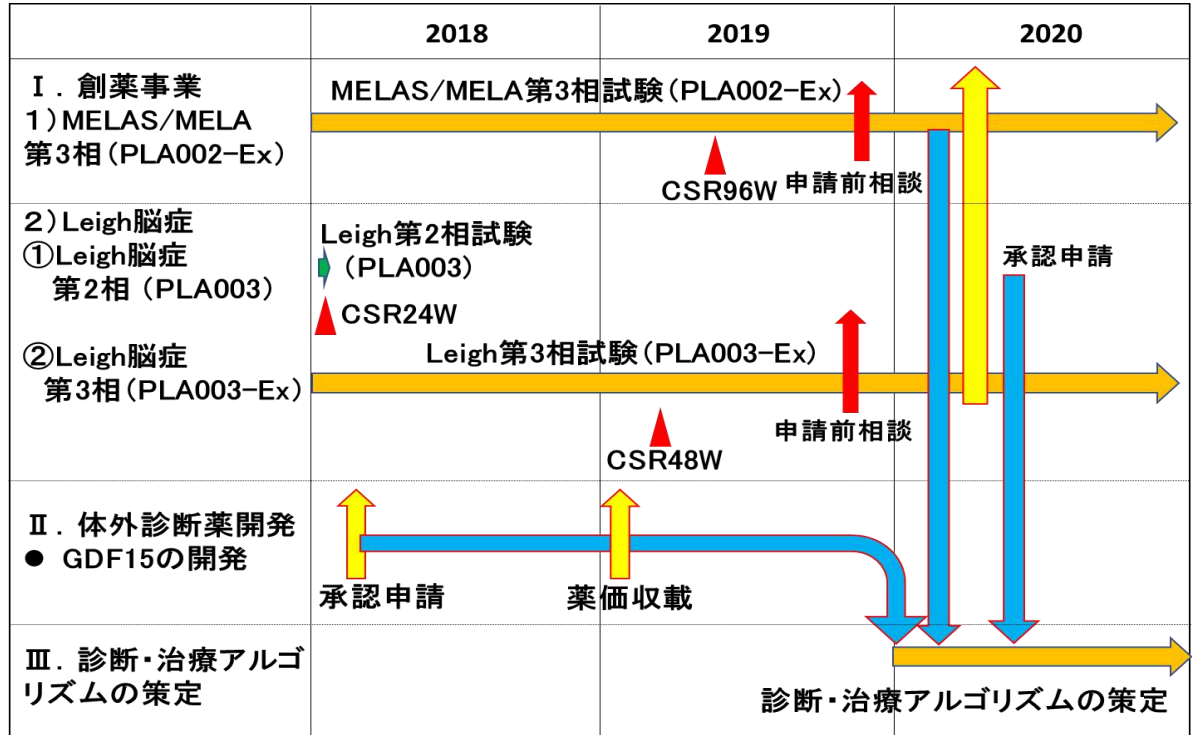


150 mM ピルビン酸Na
16.5 g/L
8.25 g/500 mL

点滴: 150 mM × 0.5 L
→ 15 mM × 5 L blood

メイロンに代わる
新しいアシドーシス補正薬

治療薬開発のスケジュール



ミトコンドリア病
(リー脳症)

ヒトがATPを得る方法は2つ

解糖系 vs. 酸化リン酸化系

ミトコンドリアに期待できないなら

解糖系に頼るしかない

乳酸自体に毒性はない

NADHの過剰が悪者である

解糖系を動かす方法 = ピルビン酸投与

ρ^0 細胞の培養にピルビン酸添加が必須 (mtDNAを失った細胞 or 呼吸機能を失った細胞)

ブドウ糖

↓ → 2 **NADH** + 2 **H⁺**

ピルビン酸

↓ ← 2 **NADH** + 2 **H⁺**

乳酸

解糖系における
水素 (**NADH**) の
収支はゼロ

細胞はブドウ糖の他に
アミノ酸などを代謝する

アミノ酸の酸化により
水素が過剰になる

NADHが蓄積し

NAD⁺が不足する

乳酸／ピルビン酸 比↑

解糖系が機能停止

過剰な**NADH**が解糖系を停止

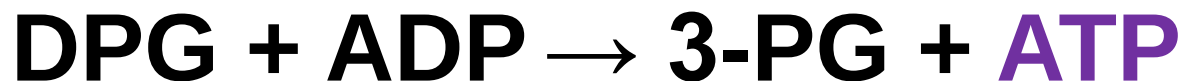
1. GAPDH (グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)



GAP = glyceraldehyde 3-phosphate

DPG = 1,3-diphosphoglycerate

2. PGK (diphosphoglycerate kinase)



これら 2 つの反応は強固に連結されているので
過剰な**NADH**は解糖系による**ATP**産生を阻害する

NAD⁺不足で解糖系が停止

1. GAPDH (グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)



この反応が右向きに進むためには
自由エネルギー変化が負である必要がある
このためには[NAD⁺]の濃度は[NADH]
の 1000倍以上でなくてはならない

L/P比が25.6以上になると
解糖系によるATP産生が停止する
(Voet and Voet: Biochemistry)

ピルビン酸はATP合成を回復させる



$$[\text{乳酸}]/[\text{ピルビン酸}] < 25.6$$

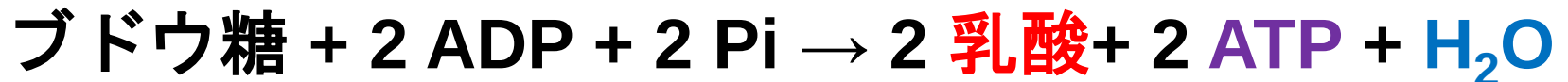
$$[\text{乳酸}] = 2.56 \text{ mM} = 23.04 \text{ mg/dL}$$

$$[\text{ピルビン酸}] = 0.1 \text{ mM} = 0.88 \text{ mg/dL}$$

$$[\text{乳酸}] = 25.6 \text{ mM} = 230.4 \text{ mg/dL}$$

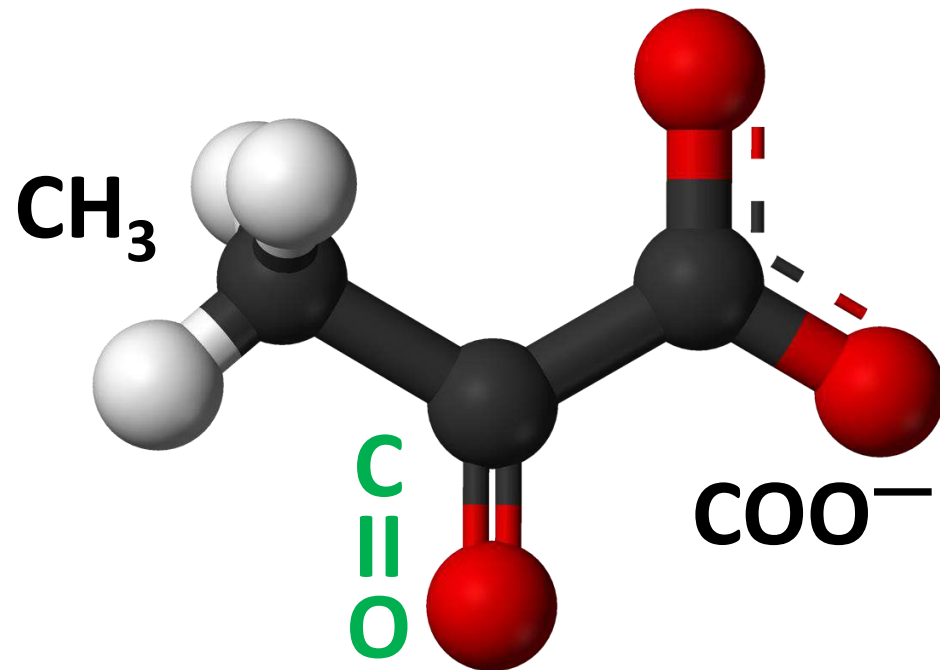
$$[\text{ピルビン酸}] = 1 \text{ mM} = 8.8 \text{ mg/dL}$$

[ピルビン酸]の濃度を上昇させれば
[乳酸]の濃度が高くてもATPを作り出せる



ピルビン酸は最小のケト酸

Pyruvate



ピルビン酸はお酒の元

ブドウ糖 → ピルビン酸

ピルビン酸 → エタノール + $\text{CO}_2 \uparrow$

(中間代謝物 = アセトアルデヒド)

$\text{CH}_3\text{-CO-COOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{-CHO} + \text{CO}_2 \uparrow$

$\text{CH}_3\text{-CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$

日本酒・ビール・ワインの
醸造過程において

二酸化炭素の泡が出ている時
そこにはピルビン酸が大量に存在

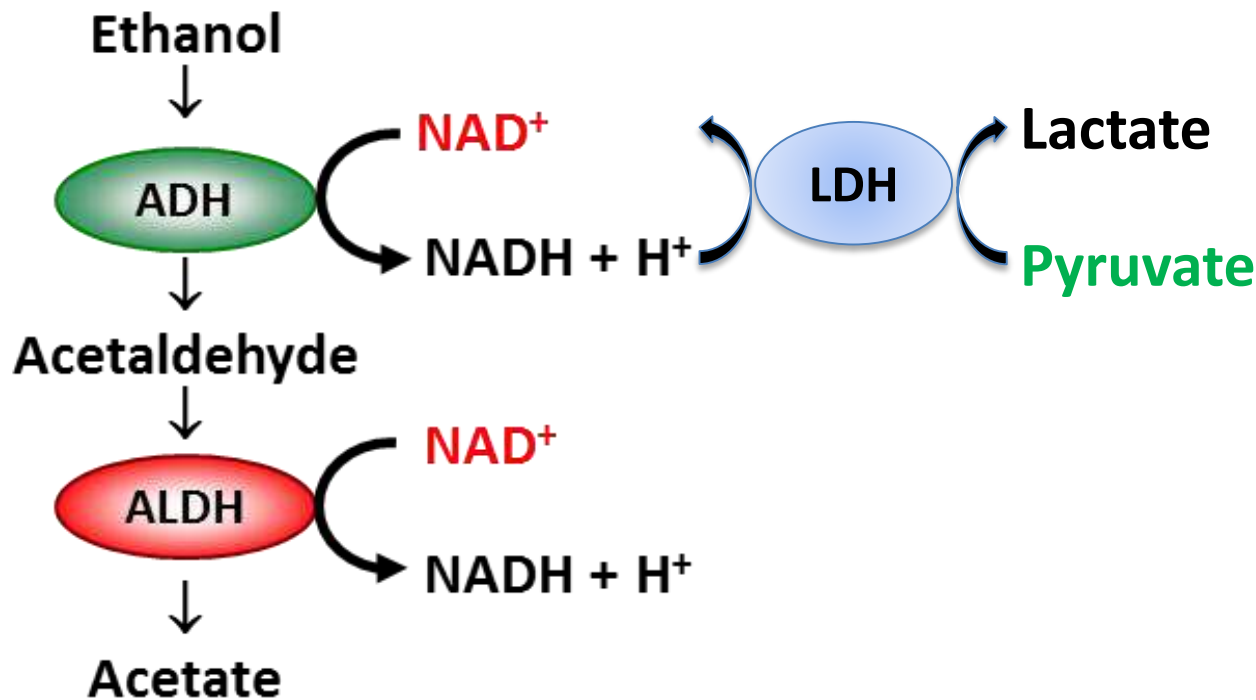
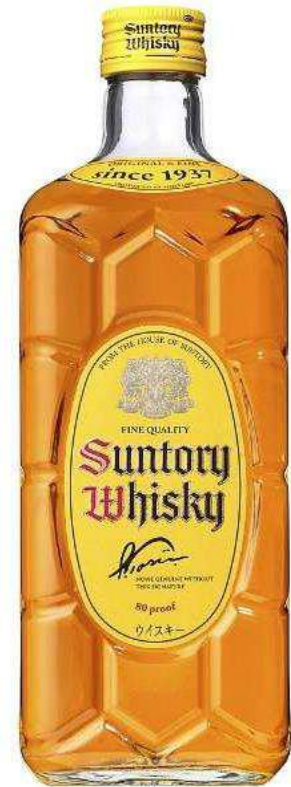


自分を実験台にする

09:00 サントリー角 50 mL + H₂O 50 mL

10:00 ピルビン酸ナトリウム 5 g

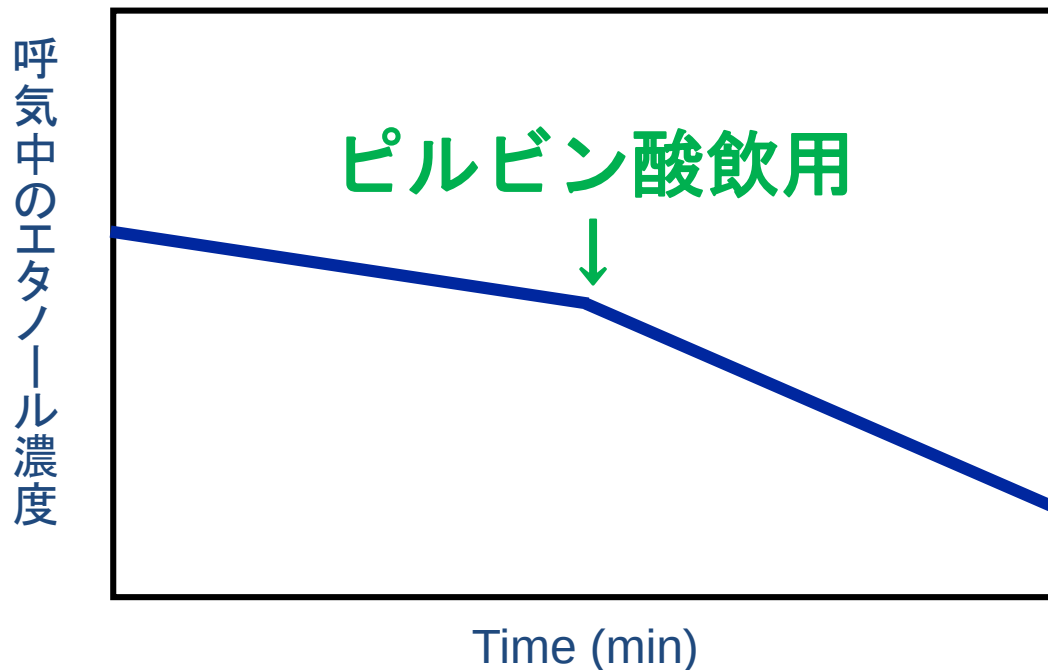
呼気中のアルコール濃度を測定

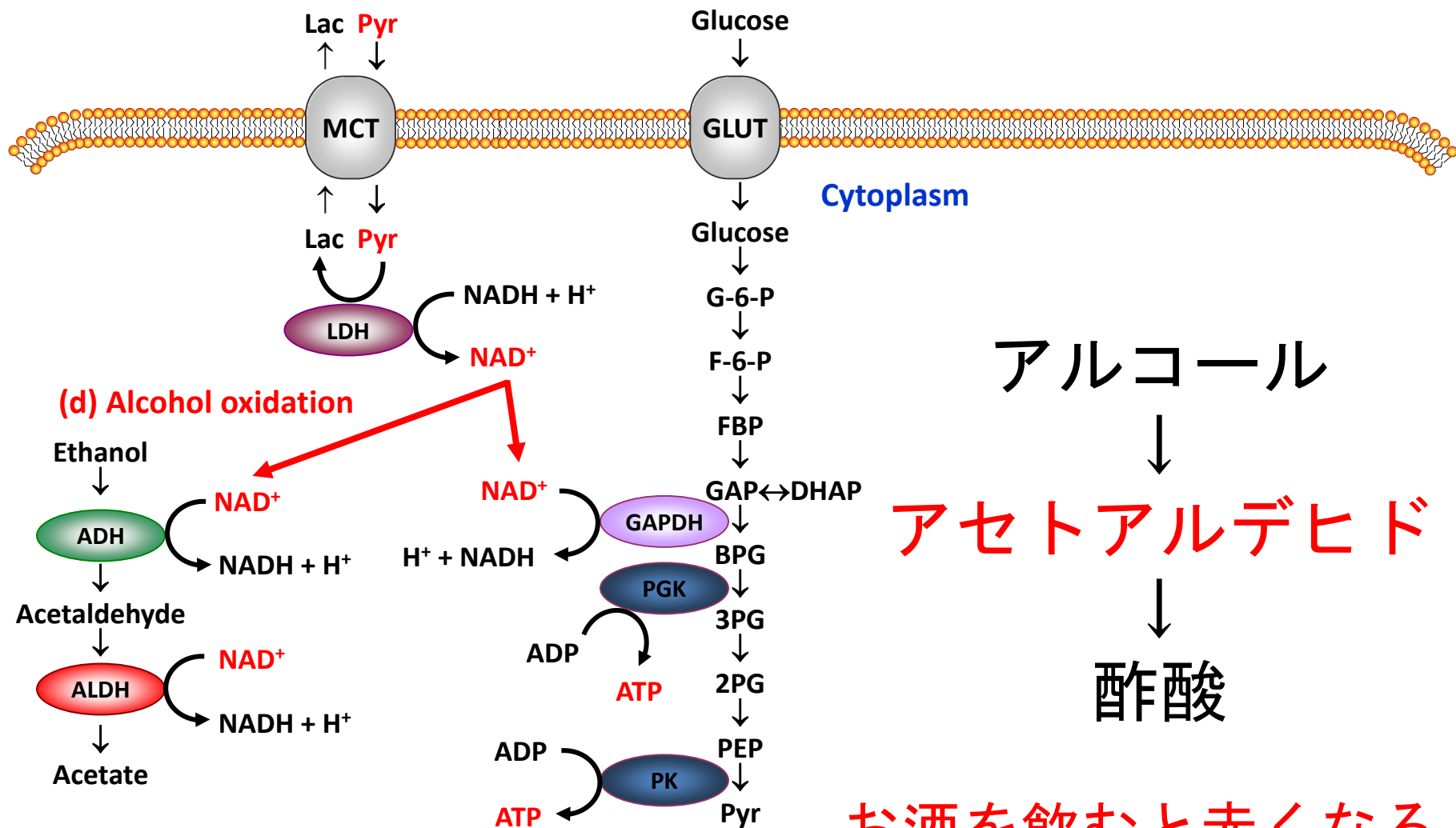


Effect of pyruvate on alcohol metabolism: We studied the effect of pyruvate on alcohol metabolism (Fig. 1d). Oral administration of 5 g of sodium pyruvate accelerated alcohol oxidation by 20% (Japan Patent 2000-204038). In subjects with a genetic defect in aldehyde dehydrogenase (ALDH2), pyruvate further elevated the acetaldehyde level, this is because the first reaction by the alcohol dehydrogenase (ADH) from ethanol to acetaldehyde is stimulated by supplementation of NAD⁺ by pyruvate, whereas the second reaction from acetaldehyde to acetic acid is blocked by the enzyme defect. To ameliorate the increased level of acetaldehyde, we administered 1440 mg of L-cysteine along with pyruvate, because acetaldehyde reacts with L-cysteine to form a thiazolidine derivative that can be excreted to urine. Combination of pyruvate and L-cysteine accelerated alcohol oxidation by 30% (Japan Patent 2002-187839). These results indicate that orally administered pyruvate can increase intracellular NAD⁺/NADH ratio at least in the liver.

ピルビン酸はアルコール分解促進

アルコール $\rightarrow$ アセトアルデヒド $\rightarrow$ 酢酸





アルコール
↓
アセトアルデヒド
↓
酢酸

お酒を飲むと赤くなる人
ALHD2*2 heterozygote
ピルビン酸投与によって
アセトアルデヒドが上昇

ピルビン酸療法の理論的背景



Available online at www.sciencedirect.com



Mitochondrion 7 (2007) 399–403

Mitochondrion

www.elsevier.com/locate/mito

Letters to the Editor

Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases

Mitochondrial disorders caused by mutations in the mitochondrial or nuclear genome are devastating diseases resistant to various medications. We propose here that pyruvate has a therapeutic potential for mitochondrial diseases. We have started an open clinical study on the effects of sodium pyruvate on mitochondrial diseases and type II citrullinemia.

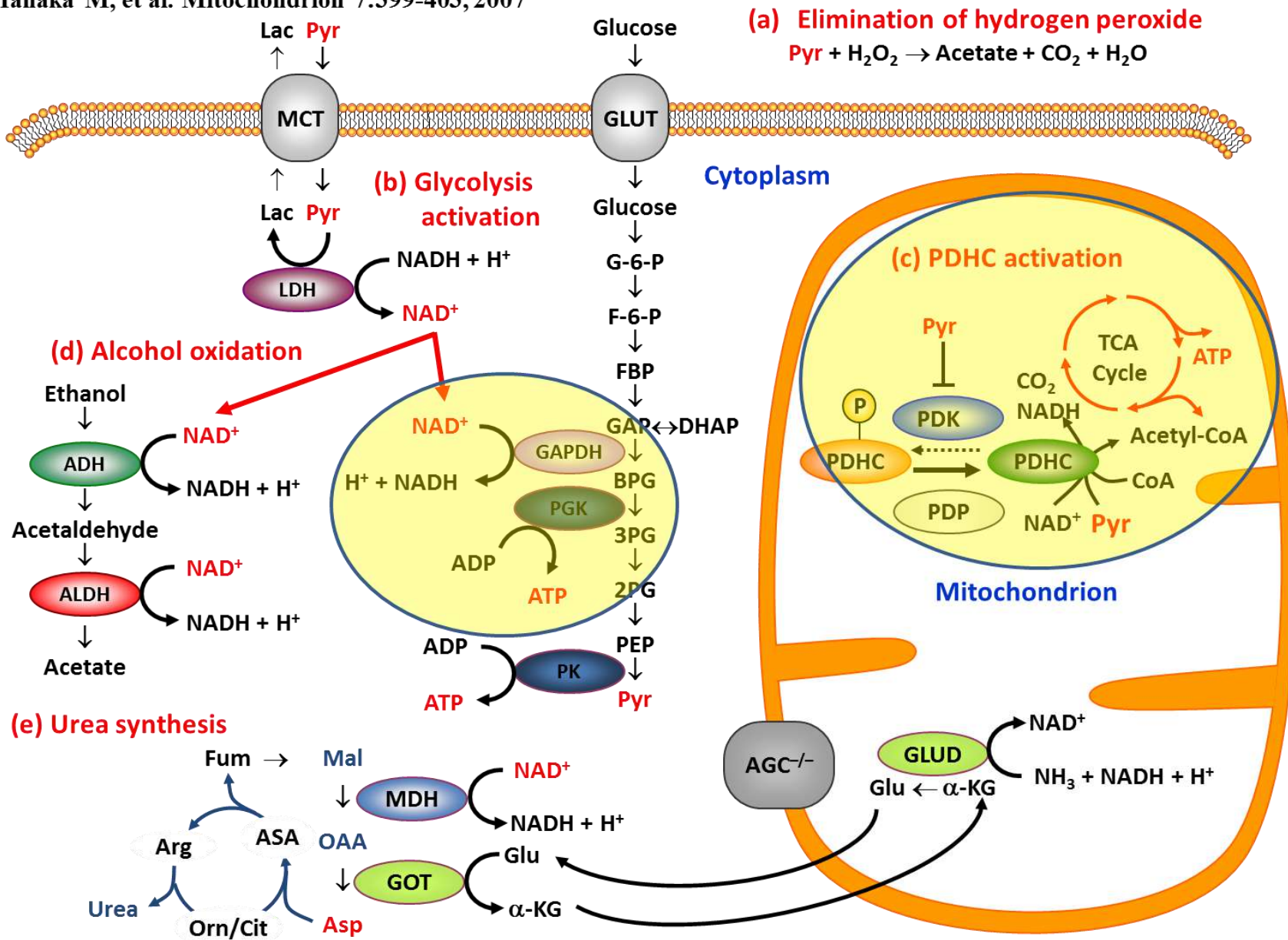
pyruvate added exogenously (and converted to lactate) is replaced by a mole of pyruvate derived from glycolysis (Fig. 1b). Because NAD^+ that has been formed by the action of LDH on the extraneously added pyruvate is then used for the oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate, glycolysis is now able to proceed for production of ATP. Thus, when 1 mol (110 g) of sodium pyruvate is administered, 2 mol (1014 g) of ATP is formed even when oxidative phosphorylation function is null.

Activation of PDHC by pyruvate: Pyruvate activates

14年前

ピルビン酸ナトリウムの作用機序

Tanaka M, et al. Mitochondrion 7:399-403, 2007



解糖系によるATP産生

ブドウ糖



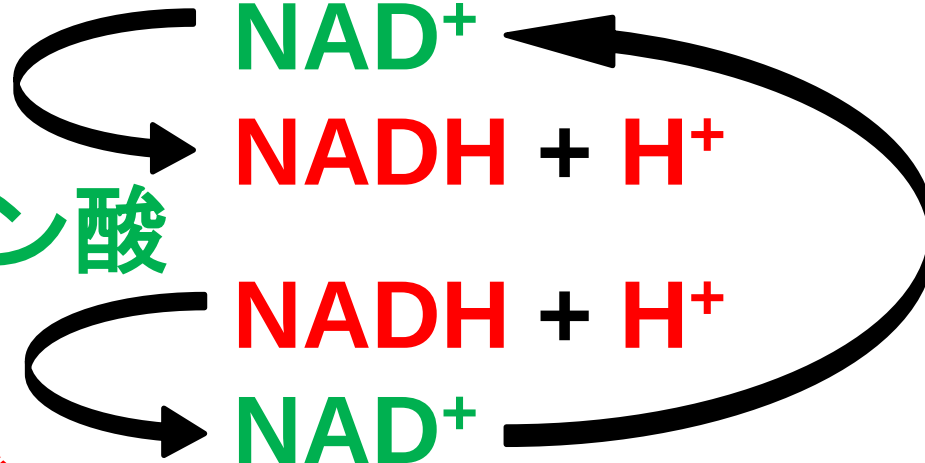
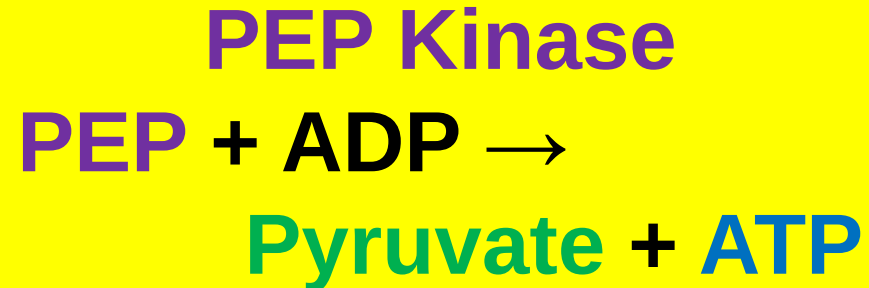
2 PEP



2 ピルビン酸



2 乳酸



ブドウ糖から
2分子のピルビン酸が生じ
2分子のATPが得られる

PEP (ホスホエノールピルビン酸)

解糖系はNAD⁺不足で停止する

ブドウ糖



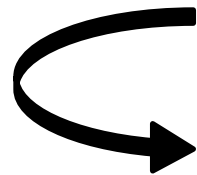
GAP



ピルビン酸

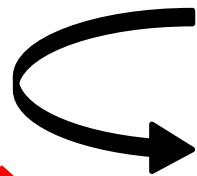


乳酸



NAD⁺

NADH + H⁺



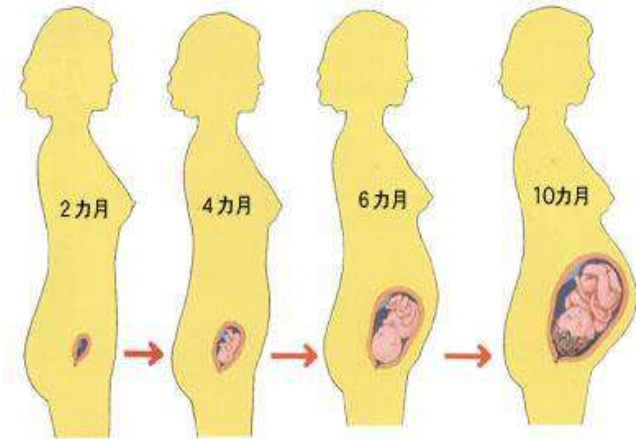
NADH + H⁺

NAD⁺

乳酸の過剰蓄積
ピルビン酸の絶対的不足
NAD⁺が再生不能
ATPが得られない

ミトコンドリアでも
解糖系でも
ATPが作れない

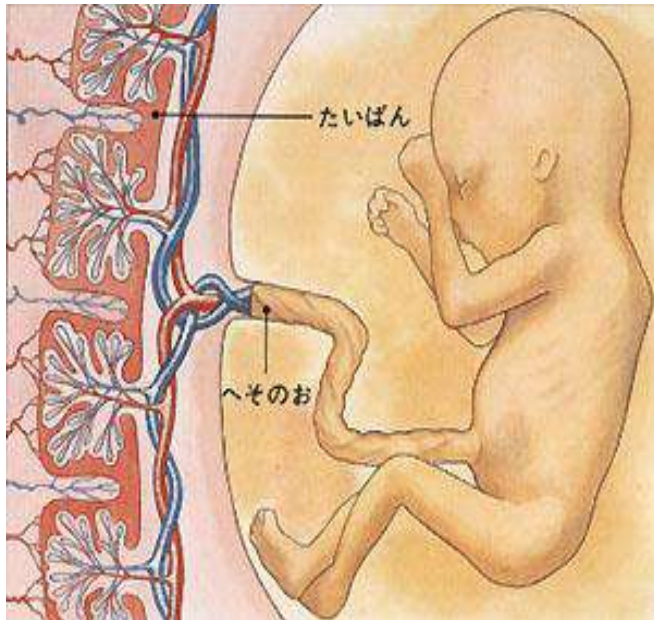
ミトコンドリア病の赤ちゃん



胎児は臍帯と胎盤によって
母親とつながっている



出生時体重は 3000 g



母体と切り離されると
高乳酸血症を発症する

胎児は**乳酸**を排出し

母親は**乳酸**からブドウ糖を
糖新生系によって再生する

透析によって子宮内環境を維持する



母体



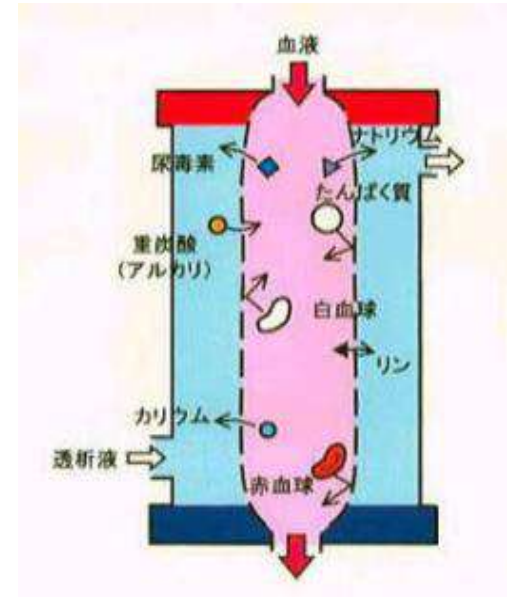
胎盤



臍帯



乳酸



ピルビン酸

点滴用 **ピルビン酸** ナトリウム



メイロンに代わる新しい
アシドーシス補正薬
(製薬企業 募集中)

ピルビン酸Na

150 mM

16.5 g/L

8.25 g/500 mL

点滴

150 mM × 0.5 L

**→ 15 mM × 5 L
blood**

ドイツでの臨床試験の報告

特発性心筋症患者8人の冠状動脈に
ピルビン酸ナトリウム 150 mM
を直接注入

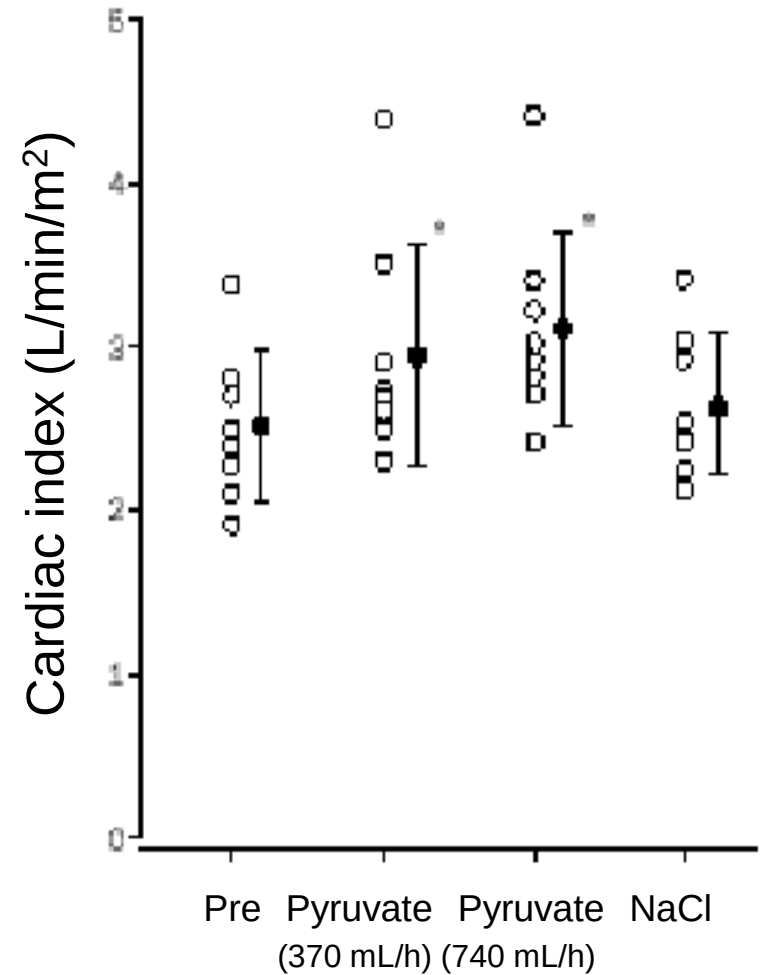
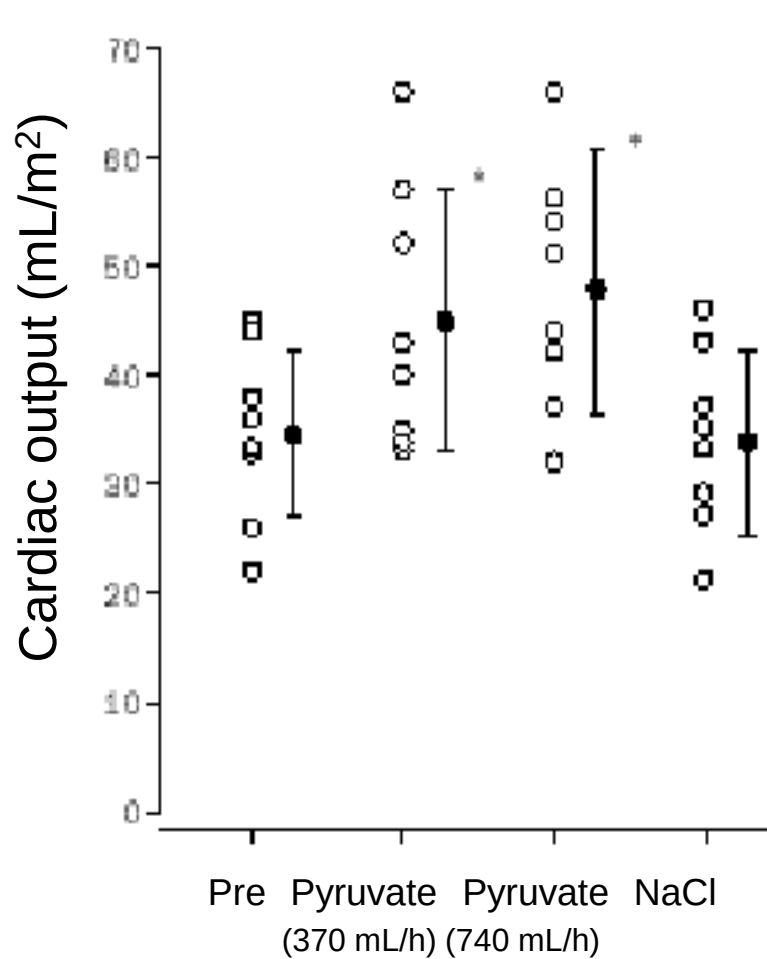


心拍出量の上昇・心拍数の低下
陽性変力作用

Haemodynamic effects of intracoronary pyruvate in patients with congestive heart failure: an open study

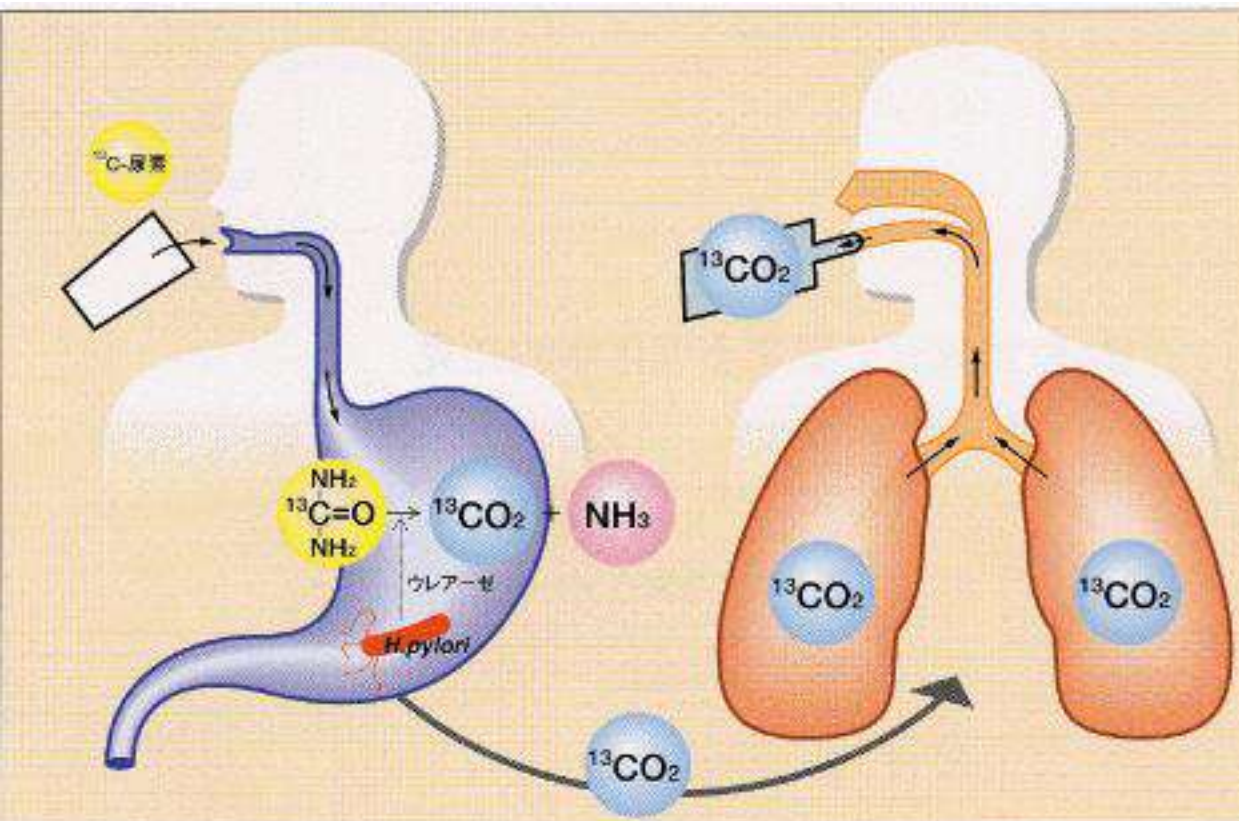
Hermann *et al.* *Lancet* 353: 1321-1323, 1999

心拍出量および心係数への ピルビン酸の効果



ミトコンドリア病の非侵襲的検査 安定同位元素を用いた呼気試験

ピロリー菌 → 除菌 → 胃癌予防



[^{13}C]尿素
呼気テスト

炭酸ガス
炭素同位体比分析装置



赤外分光法による $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比の測定

赤外吸光

酸素や窒素は吸収しない

二酸化炭素

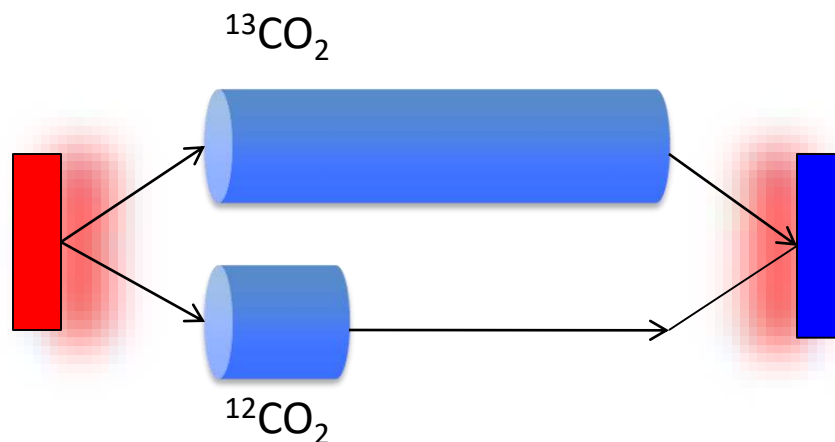


$\textcolor{red}{^{13}\text{CO}_2}$ の波数 = 2280 cm^{-1}

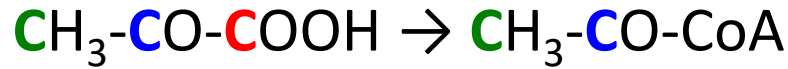
$\textcolor{green}{^{12}\text{CO}_2}$ の波数 = 2380 cm^{-1}

4気圧に圧縮して感度を上げる

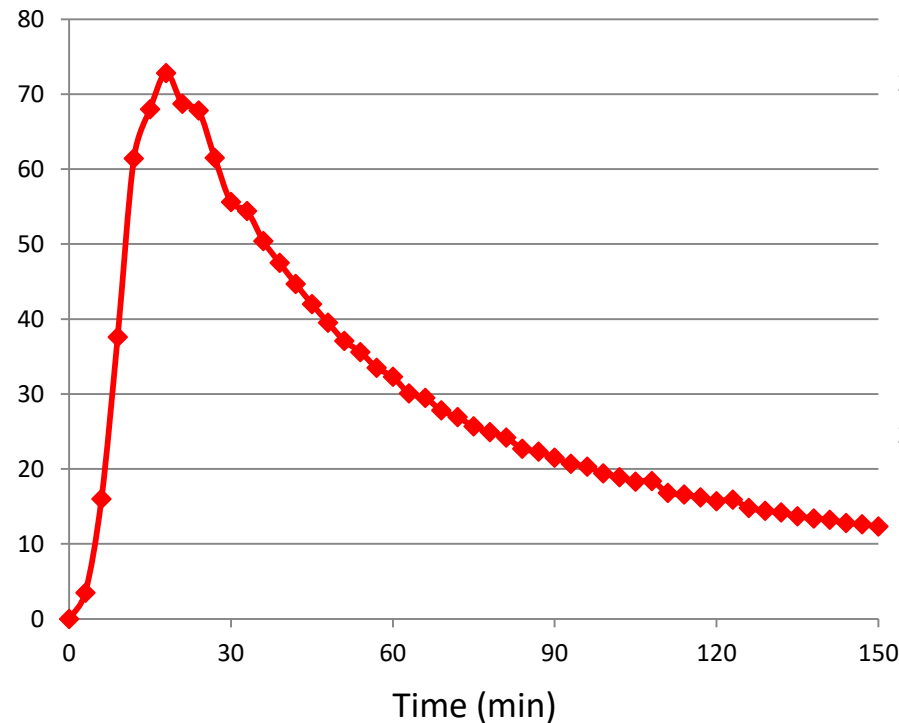
POC One（大塚電子）



^{13}C 標識ピルビン酸



[1- ^{13}C]Pyruvate



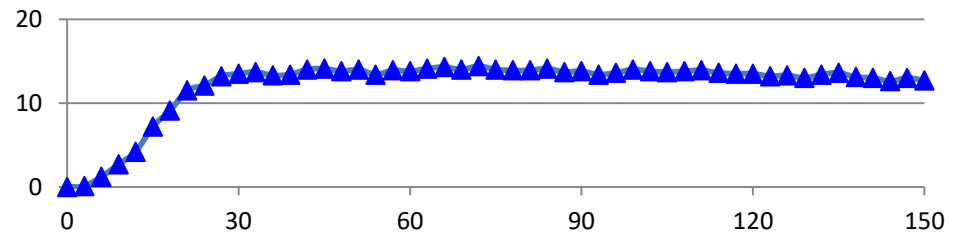
[1- ^{13}C]ピルビン酸からの $^{13}\text{CO}_2$ の急速な排出は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDHC) の活性を示す。

[1- ^{13}C]Pyruvate $\rightarrow$ [1- ^{12}C]Acetyl-CoA

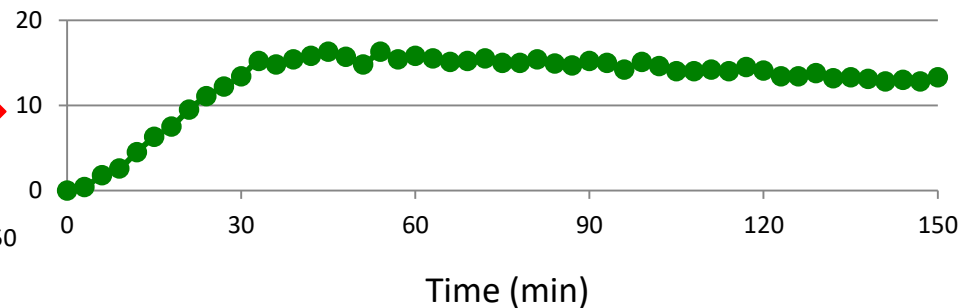
[2- ^{13}C]Pyruvate $\rightarrow$ [1- ^{13}C]Acetyl-CoA

[3- ^{13}C]Pyruvate $\rightarrow$ [2- ^{13}C]Acetyl-CoA

[2- ^{13}C]Pyruvate



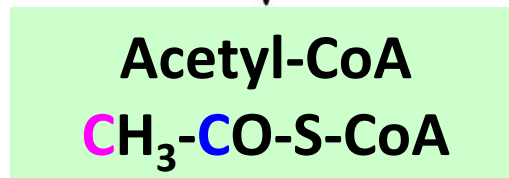
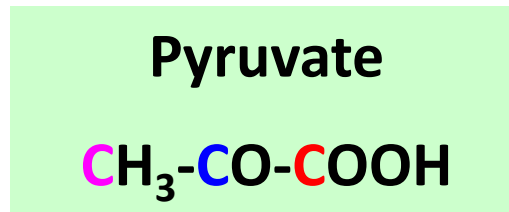
[3- ^{13}C]Pyruvate



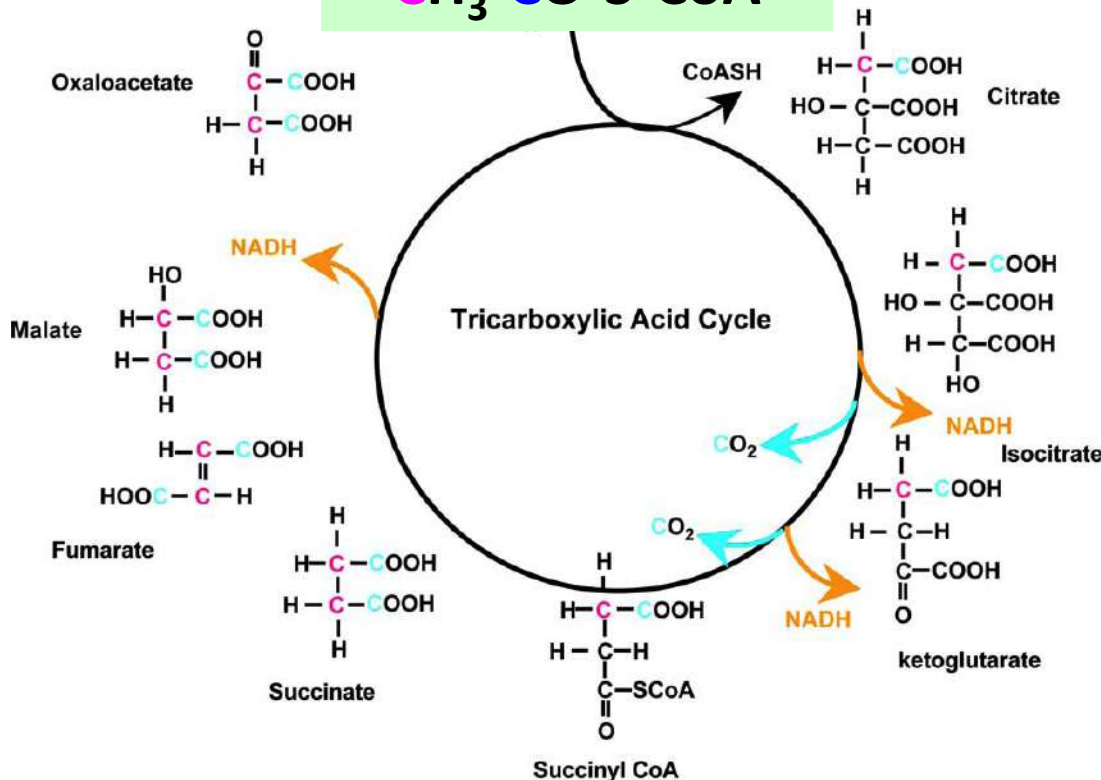
[2- ^{13}C]ピルビン酸または[3- ^{13}C]ピルビン酸を基質として使用した場合、急速な排出は検出されない。

PDHC

ピルビン酸 脱水素酵素



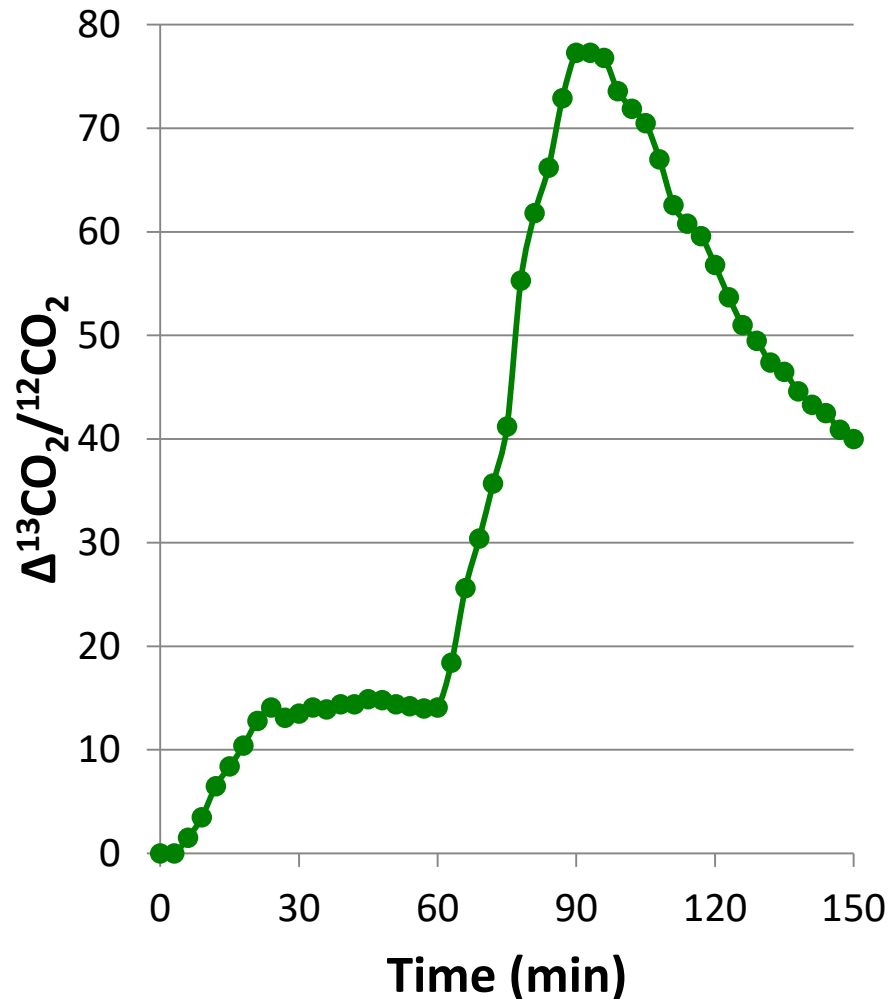
ミトコンドリア機能
非侵襲的評価
 ^{13}C 標識ピルビン酸
代謝分析



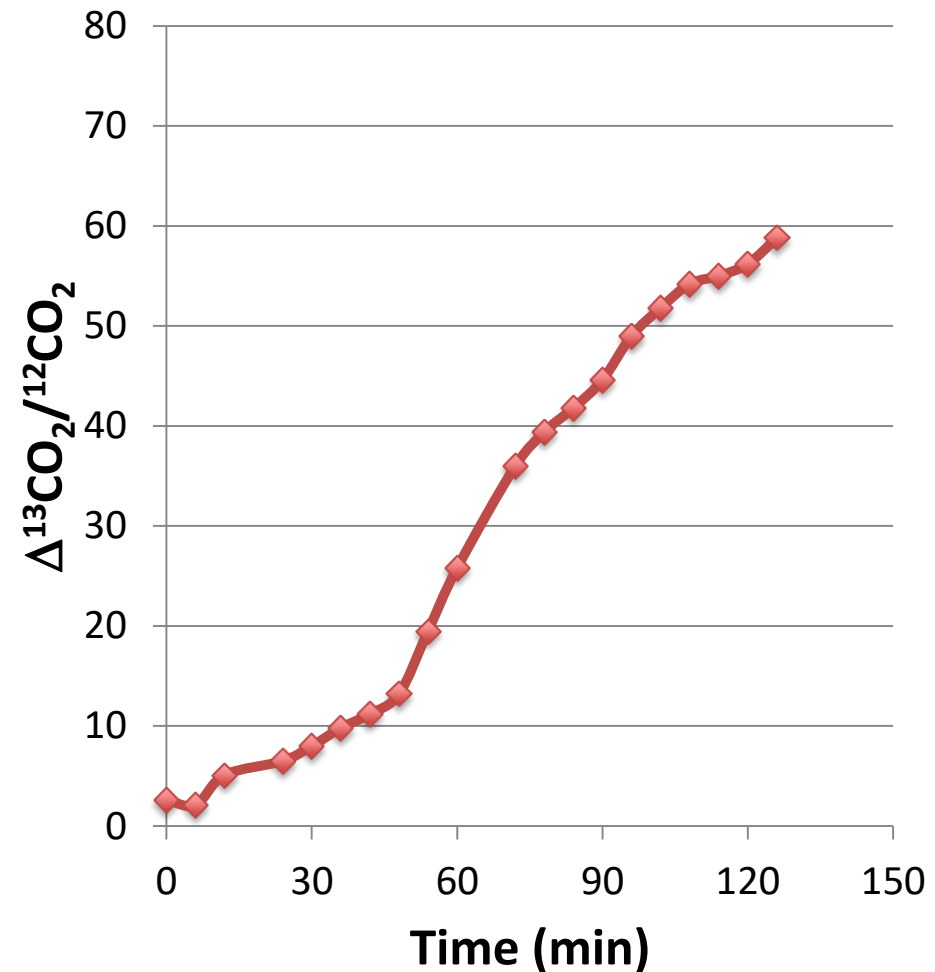
Wu *et al.*
Metabolic analysis of ^{13}C -
labeled pyruvate for
noninvasive assessment of
mitochondrial function.
Ann NY Acad Sci
1201: 111–120, 2010

PDHC欠損症に対する非侵襲的検査 健常成人と10ヶ月児 [p.Ala169Val]の比較

100 mg of [2-¹³C] or [1-¹³C]Pyruvate



20 mg of [2-¹³C] or [1-¹³C]Pyruvate



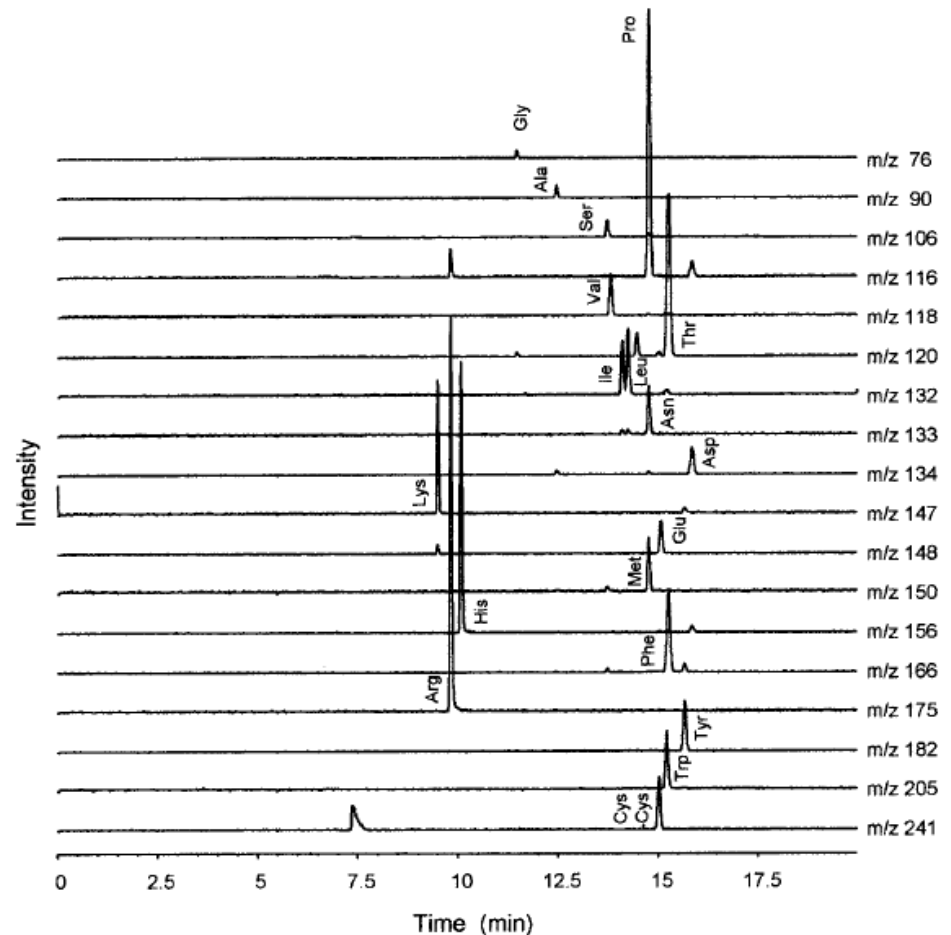
CE-TOFMSによる細胞内代謝産物の解析

[¹³C]-Labeled Lactate vs
[¹³C]-Labeled Pyruvate

Capillary Electrophoresis Time of Flight Mass-Spectrometry

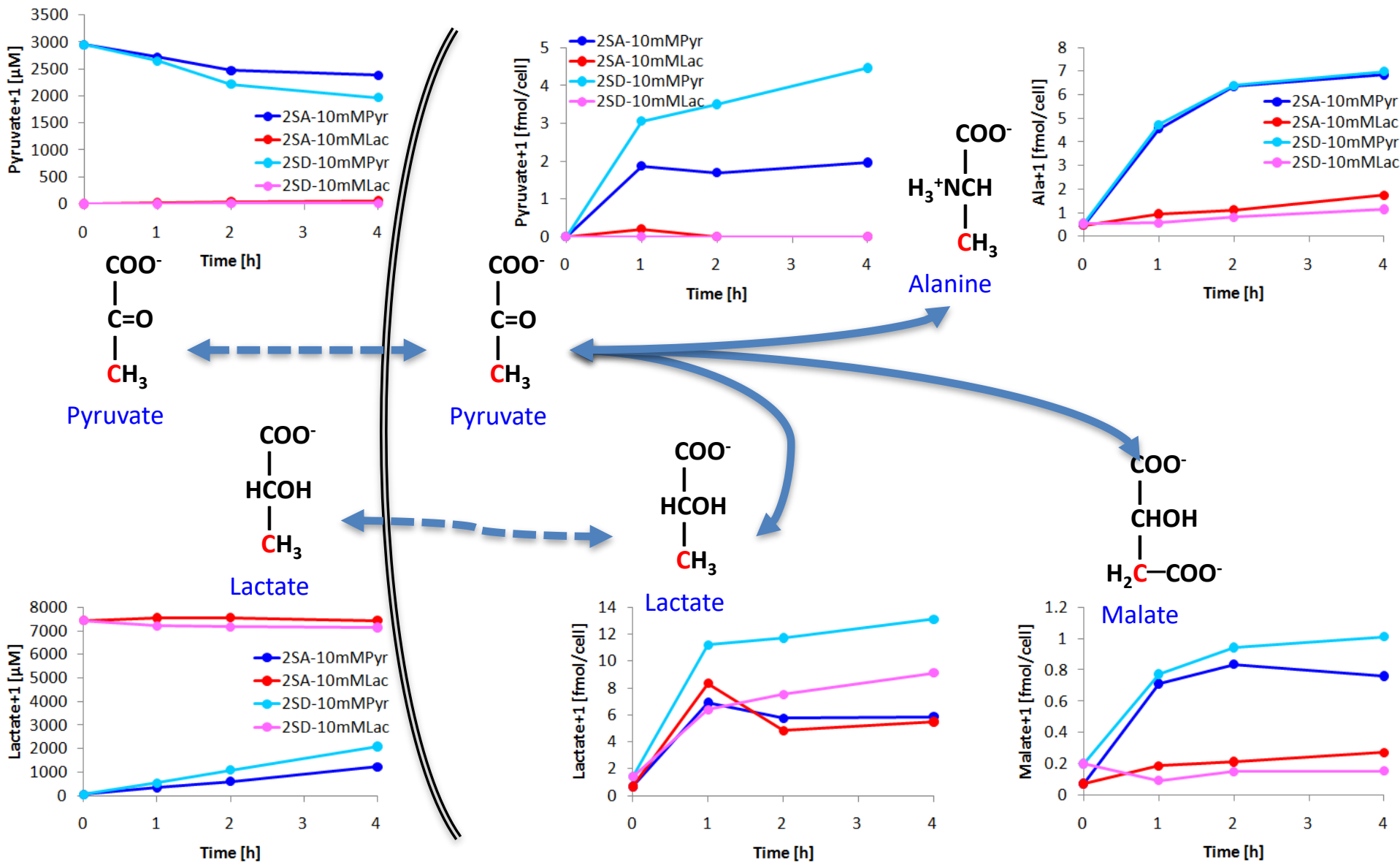


紙健次郎 博士
曾我朋義 教授
慶應義塾大学
鶴岡キャンパス

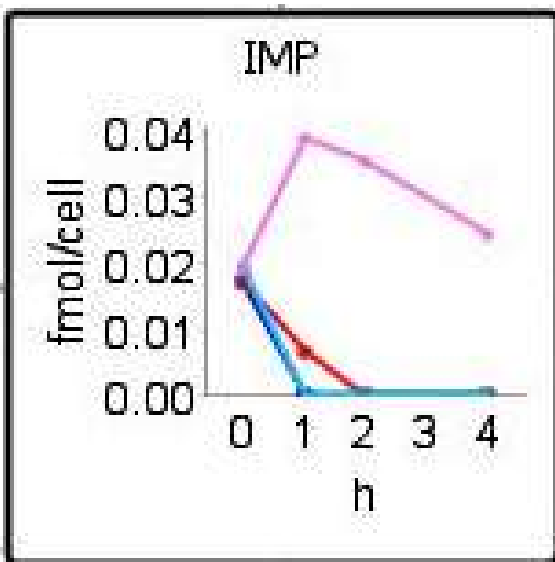
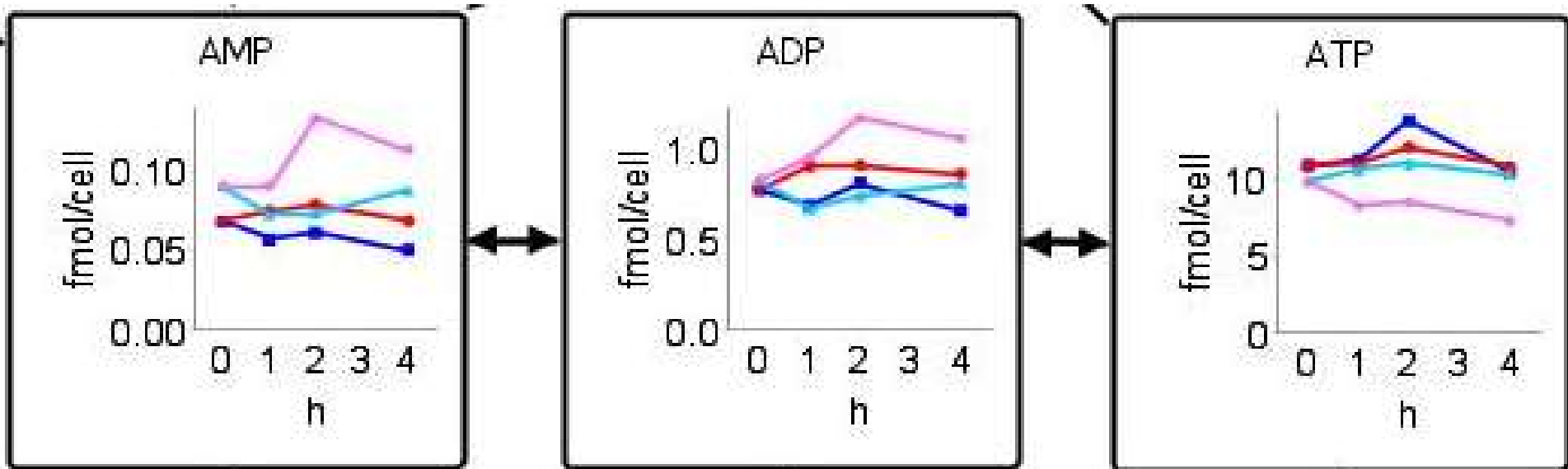


細胞内外の $[^{13}\text{C}]$ ピルビン酸と $[^{13}\text{C}]$ 乳酸の交換

細胞内に取り込まれたピルビン酸はアラニン・乳酸・リンゴ酸に転換



乳酸の影響 ATP↓, ADP↑, AMP↑, IMP↑



アデニル酸キナーゼ



AMPデアミナーゼ



● 2SA-10mMPyr

● 2SA-10mMLac

● 2SD-10mMPyr

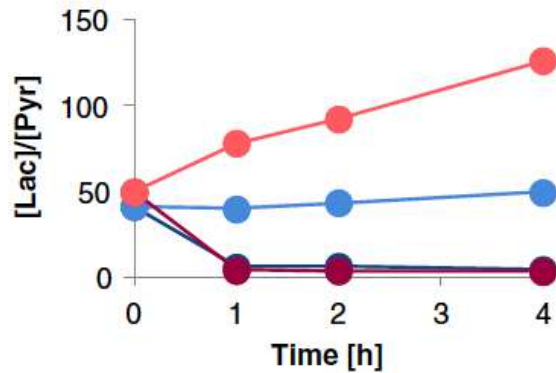
● 2SD-10mMLac

乳酸による
エネルギー危機

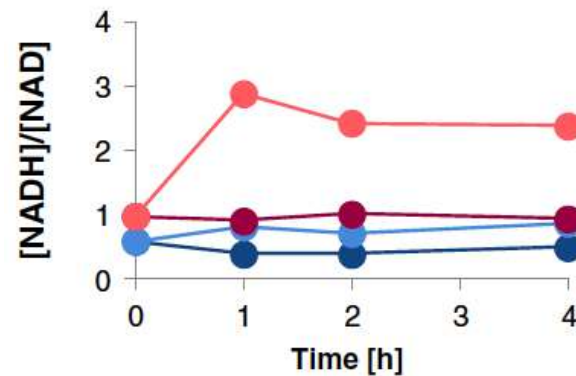
2SD 細胞の生体エネルギー的な変化

暴露実験 10 mM 乳酸 vs 10 mM ピルビン酸

Lactate/Pyruvate Ratio

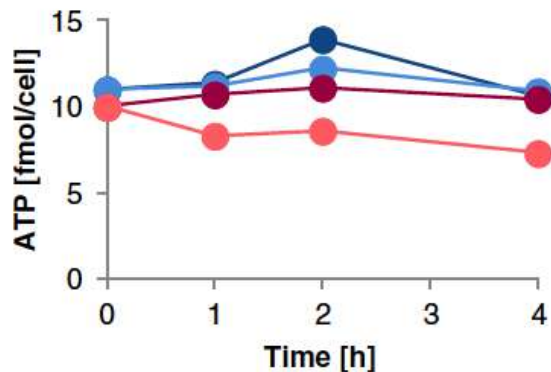


NADH/NAD⁺

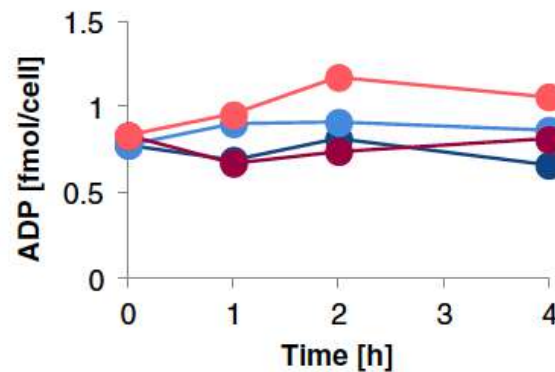


- 2SA cell (10 mM Lactate)
- 2SA cell (10 mM Pyruvate)
- 2SD cell (10 mM Lactate)
- 2SD細胞 (10 mM Pyruvate)

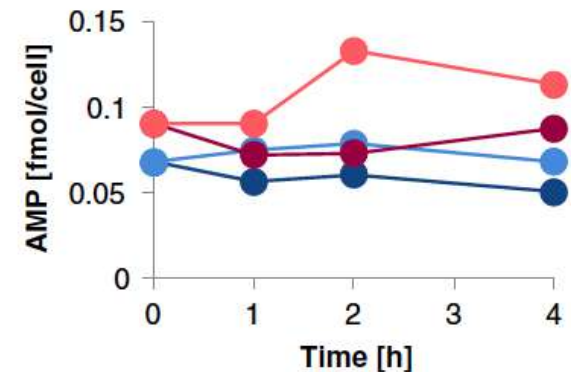
ATP



ADP



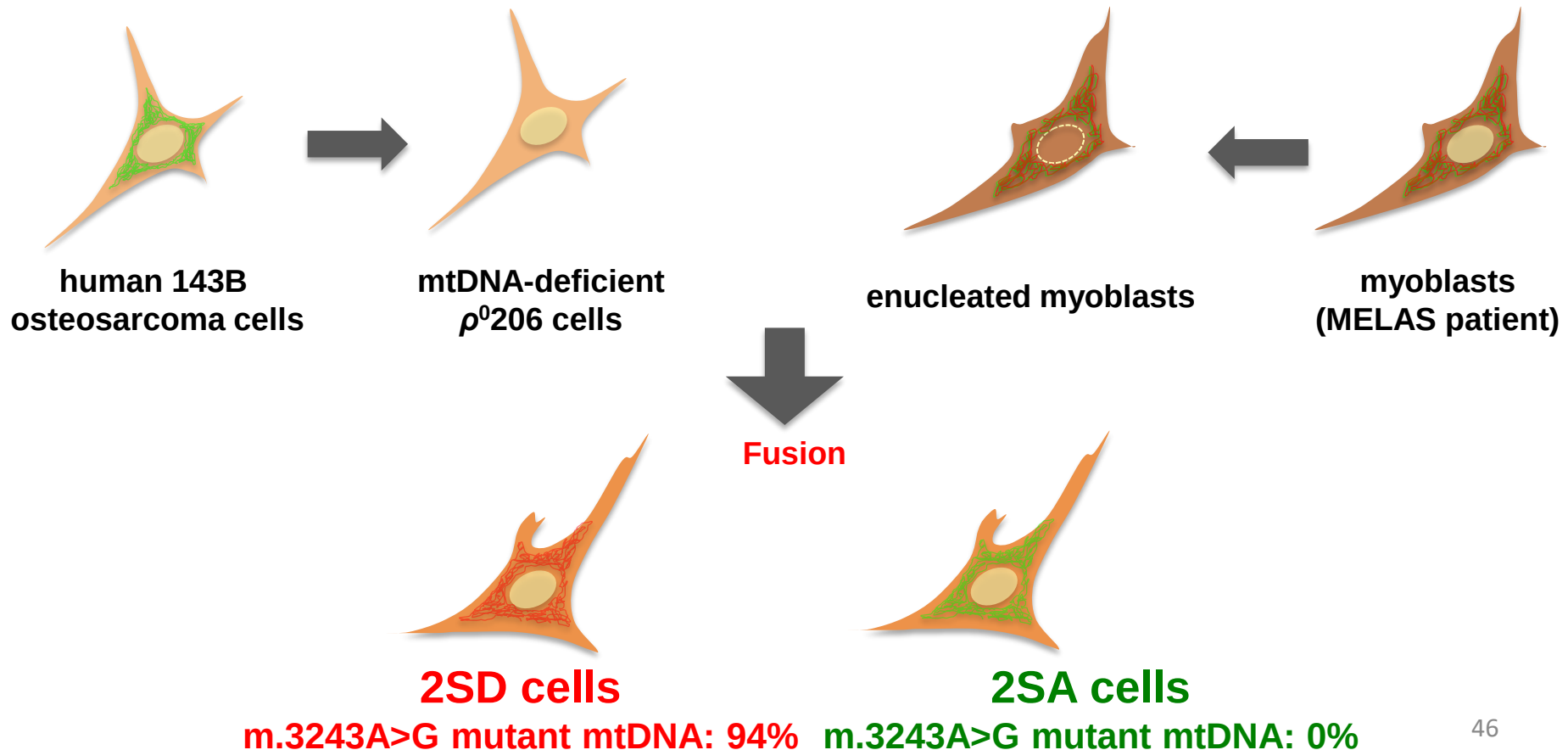
AMP



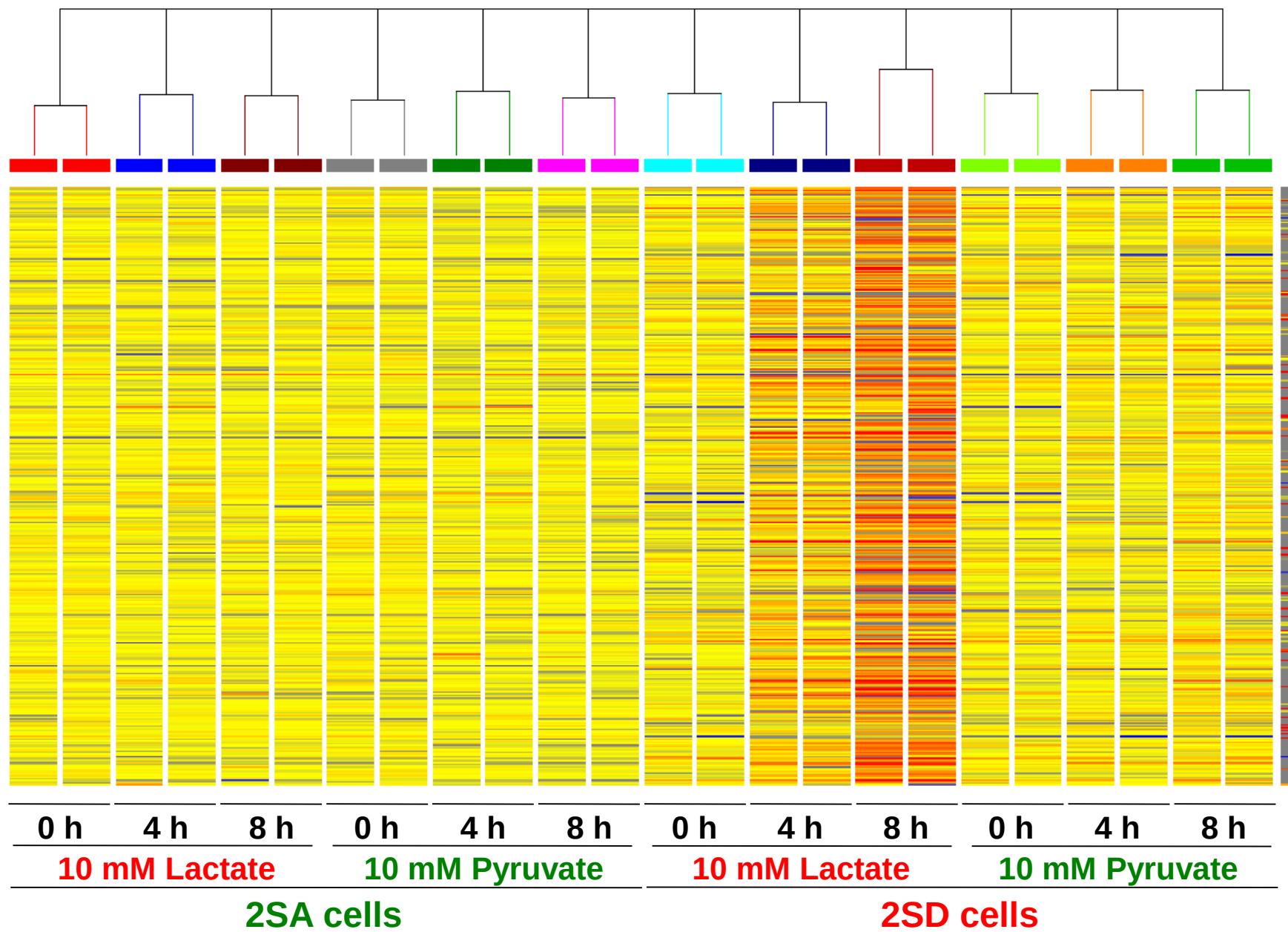
ミトコンドリア病の体外診断薬の開発

Mitochondrion 20: 34-42, 2015

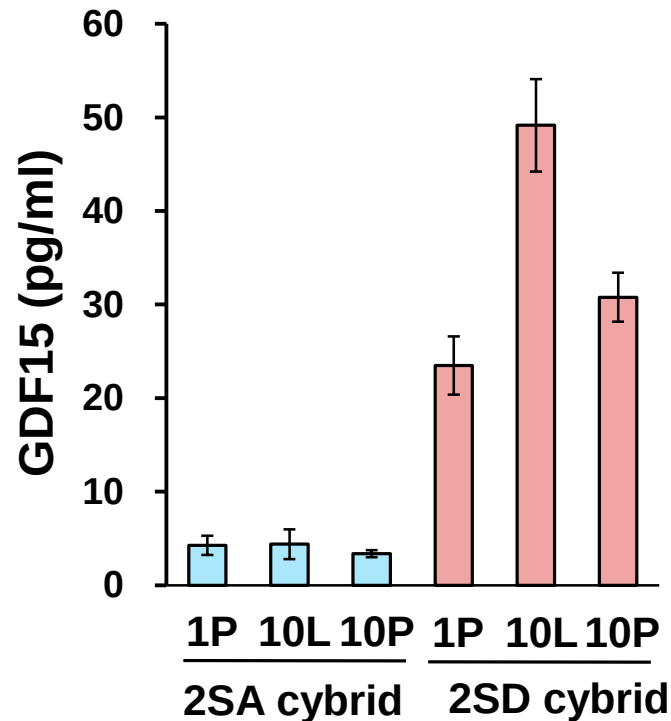
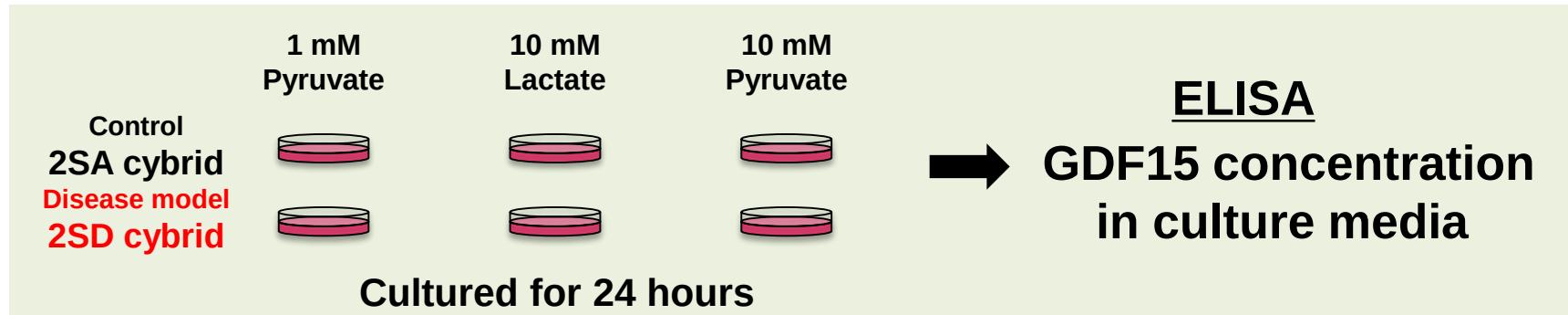
ミトコンドリア病の病因変異を有する細胞モデルで
乳酸負荷で上昇し、**ピルビン酸投与**で発現が低下する遺伝
子産物を同定 → ELISA: 培養上清・患者血清で測定



乳酸暴露後の遺伝子発現パターンのクラスター解析

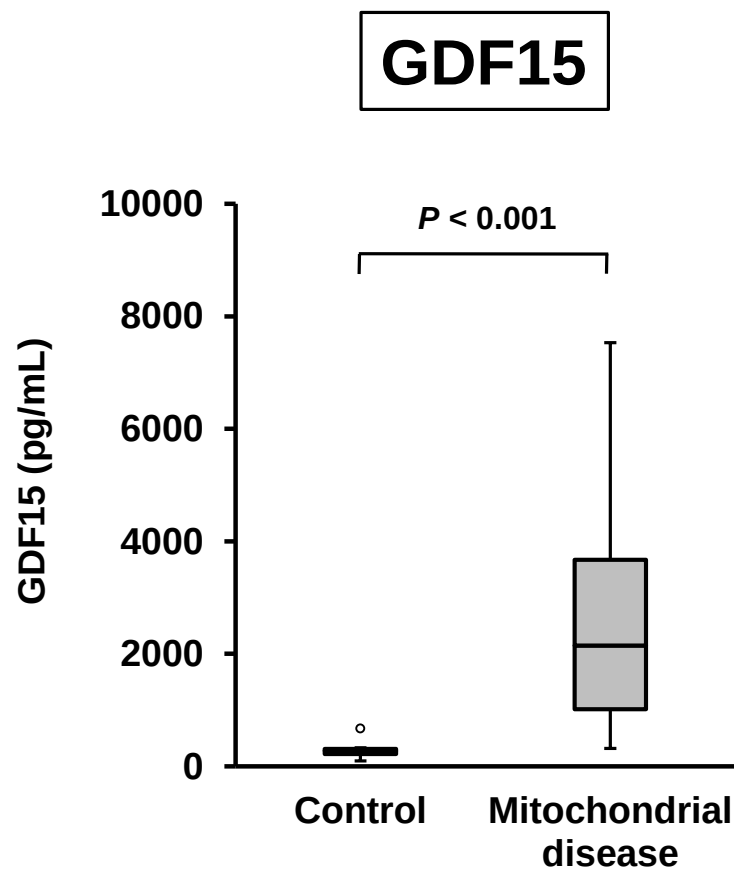


GDF15は細胞培養液に分泌される



1P : 1 mM Pyruvate
10L : 10 mM Lactate
10P : 10 mM Pyruvate

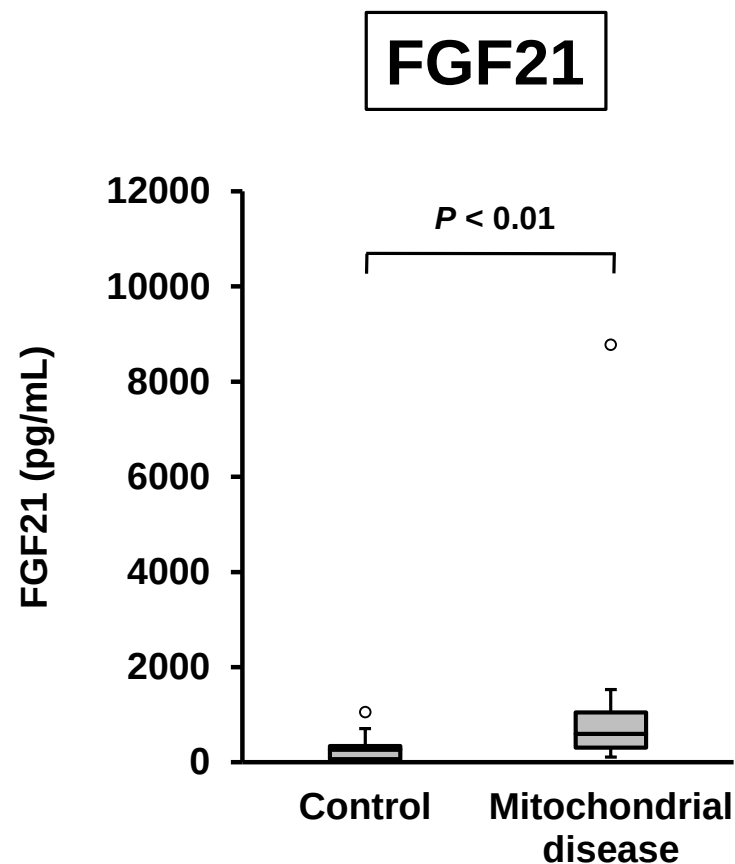
ミトコンドリア病患者血清 GDF15とFGF21



Mean

285.2
(pg/ml)

2632.9
(pg/ml)



Mean

294.6
(pg/ml)

1138.1
(pg/ml)

ミトコンドリア病の新規体外診断薬

医学生物学研究所に抗体作成依頼

抗GDF15ポリクローナル抗体

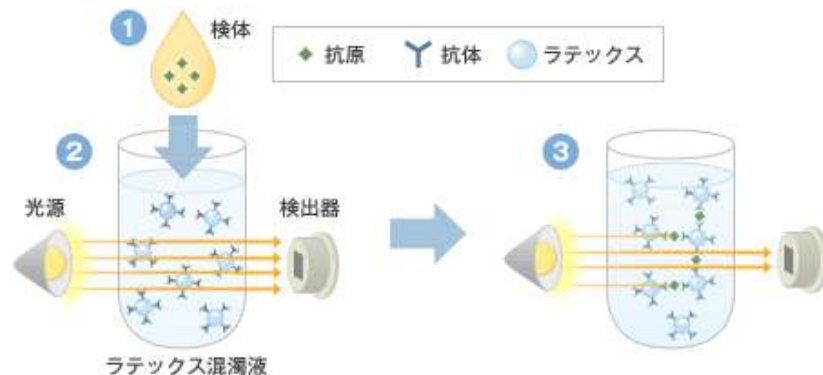
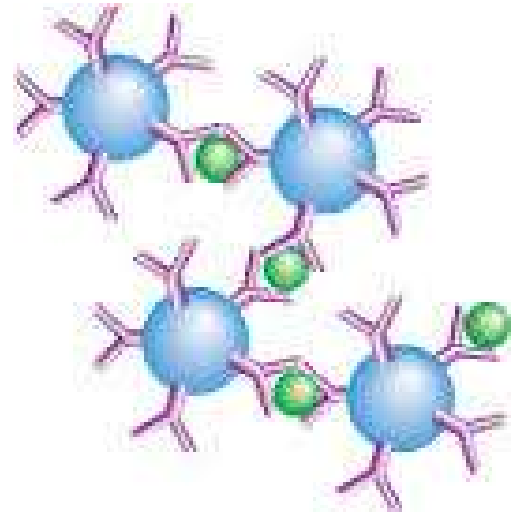
抗GDF15モノクローナル抗体

ELISAによる測定系完成

ラテックス凝集法による測定系開発

薬事承認申請・保険収載を目指す

汎用機（TBA-16000c）での検査



ピルビン酸ナトリウム
酸塩基平衡を保つ

乳酸アシドーシス治療剤

乳酸アシドーシスの病態

血液が酸性に傾く

細胞内も酸性になる

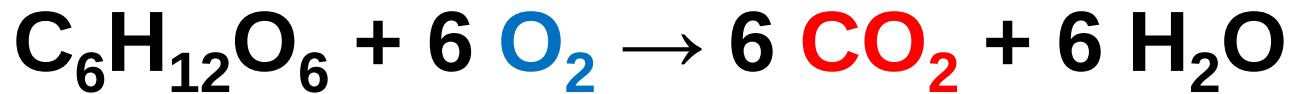
細胞内から「有機酸」を排出できない

細胞内の中間代謝物のバランスが崩れる

細胞がエネルギーを得ることができない

神経細胞が壊死してしまう

細胞内を中性に保つために 血液を弱アルカリ性に保つ 肺と腎臓の働き



細胞内で生じた二酸化炭素を肺から排出する

細胞内で生じた有機酸を血液に排出する

腎臓は「酸」を尿に排泄する

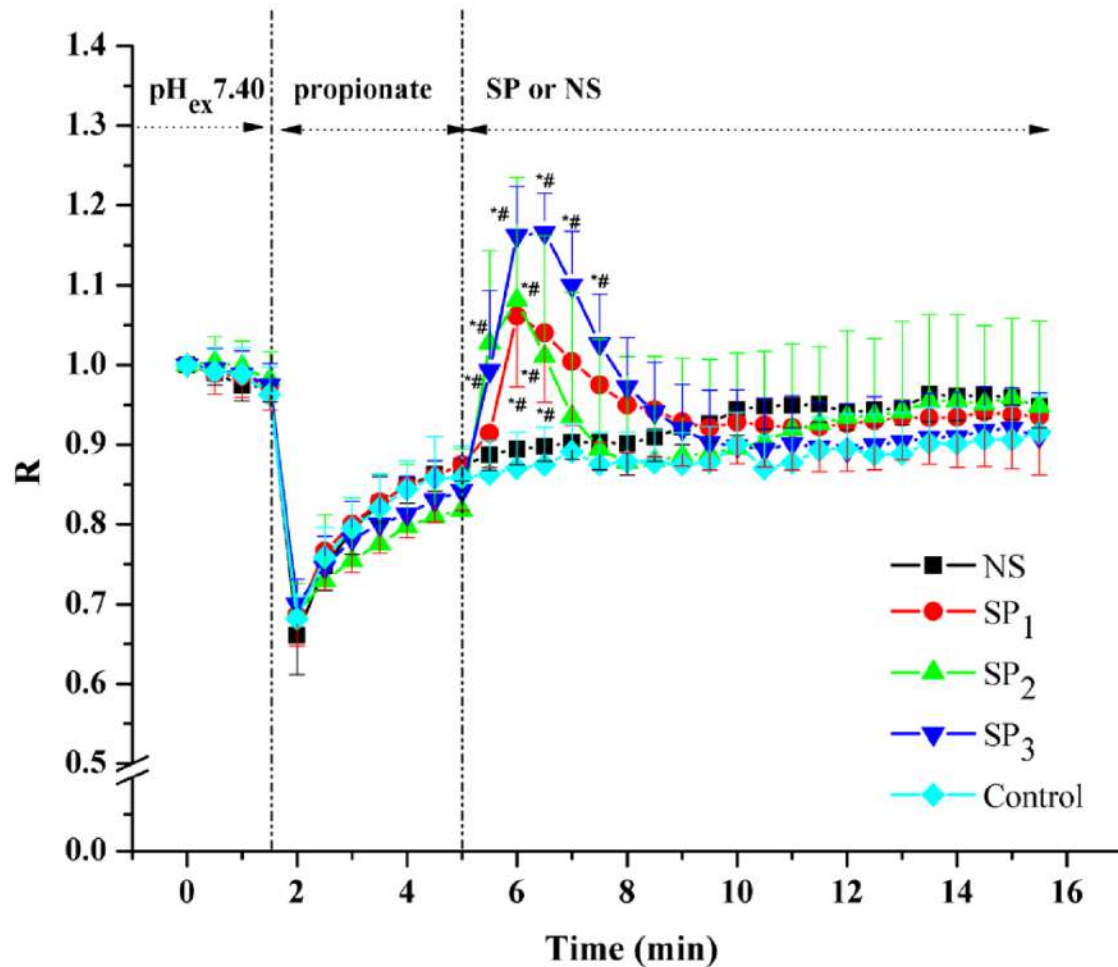
細胞内を中性に保つために 血液を弱アルカリ性に保つ

血液pHの正常値は7.4

7.0以下 or 7.6以上では長く生存できない

血液pHが弱アルカリ性である理由

- 1) 細胞内で絶えず産生される酸を中和する
- 2) ほぼ中性に保たれている細胞内pHの下では、細胞の中間代謝産物が解離する
- 3) 血液が酸性では有機酸を細胞から排出できない
- 4) 血液が弱アルカリ性なら有機酸を細胞から血液へ排出できる



代謝性アシドーシスの改善に対する ピルビン酸ナトリウムの効果

Yang et al. Artificial Cells, Nanomedicine,
and Biotechnology, 2016; 44: 48–55

目的: 代謝性アシドーシスに対するピルビン酸ナトリウム (SP) の効果を調べる。方法: 生体内実験では、塩化アンモニウム (NH_4Cl) 誘発高塩素アシドーシスラットモデルに対するSPの効果を評価しました。SPは、SP1、SP2、およびSP3グループに対して、それぞれ2、4、および6 mmol / kg-1の全用量で注入されました。重炭酸ナトリウム (SB) による治療を陽性対照 (2 mmol/kg) として使用し、生理食塩水 (NS) による治療を容量対照 (2 mL/kg) として使用しました。注射後のpH、血液ガス、電解質、グルコース、クレアチニン (Cr)、および尿素分析のために、眼静脈叢から血液をサンプリングしました。in vitro実験では、プロピオン酸を適用して、ヒト内皮細胞の細胞内アシドーシスを誘発しました。細胞内pH (pHi) は、SPの添加後に蛍光測定されました。結果: 生体内研究では、SP1群のpHはNS群のpHと比較して有意な差を示さなかった。SP2およびSP3グループは、NSグループよりも高いpHでした ($P < 0.01$)。SP3グループは、SBグループ ($P < 0.05$) およびSP1グループ ($P < 0.05$) よりも高いpHを示しました。さらに、SP治療はカルシウムの異常を改善し、血中カリウム濃度を低下させました。SP3グループは、SP1グループよりも高い血糖値を示しました ($P < 0.05$)。血漿Crおよび尿素レベルのすべてのグループ間で有意差は観察されませんでした。in vitro試験では、SPの添加直後にpHiが上昇しました。結論: データは、SPによる血管内治療が代謝性アシドーシスを改善するための新しい治療戦略であることを示唆しています。

Figure 5. Changes in intracellular pH (pHi) in response to sodium propionate loading and addition of sodium pyruvate (SP) 33 mmol·L⁻¹ (SP1 group, $n = 45$), 66 mmol·L⁻¹ (SP2 group, $n = 45$) and 100 mmol·L⁻¹ (SP3 group, $n = 45$). NS addition was performed as negative control group (NS group, $n = 45$). No addition was performed as blank control group (Control group, $n = 45$). There was a positive correlation between BCECF emission ratio (R , $R = F(\text{Ex} = 488\text{nm}/\text{Em} = 535\text{nm})/F(\text{Ex} = 445\text{nm}/\text{Em} = 535\text{nm})$) and pHi. Data are presented as means (SD). * $P < 0.05$, vs. NS; # $P < 0.05$, vs. control.

最近の基礎研究 (Harvard大学)

An engineered enzyme that targets circulating lactate to alleviate intracellular NADH:NAD⁺ imbalance

細胞内の過還元状態を解消する

Anupam Patgiri^{1,2,3}, Owen S. Skinner^{1,2,3}, Yusuke Miyazaki⁴, Grigorij Schleifer⁴, Eizo Marutani⁴, Hardik Shah^{1,2,3}, Rohit Sharma^{1,2,3}, Russell P. Goodman^{1,2,3,5}, Tsz-Leung To^{1,2,3}, Xiaoyan Robert Bao^{1,2,3,6}, Fumito Ichinose⁴, Warren M. Zapol⁴ and Vamsi K. Mootha^{1,2,3*}

An elevated intracellular NADH:NAD⁺ ratio, or 'reductive stress', has been associated with multiple diseases, including disorders of the mitochondrial electron transport chain. As the intracellular NADH:NAD⁺ ratio can be in near equilibrium with the circulating lactate:pyruvate ratio, we hypothesized that reductive stress could be alleviated by oxidizing extracellular lactate to pyruvate. We engineered LOXCAT, a fusion of bacterial lactate oxidase (LOX) and catalase (CAT), which irreversibly converts lactate and oxygen to pyruvate and water. Addition of purified LOXCAT to the medium of cultured human cells with a defective electron transport chain decreased the extracellular lactate:pyruvate ratio, normalized the intracellular NADH:NAD⁺ ratio, upregulated glycolytic ATP production and restored cellular proliferation. In mice, tail-vein-injected LOXCAT lowered the circulating lactate:pyruvate ratio, blunted a metformin-induced rise in blood lactate:pyruvate ratio and improved NADH:NAD⁺ balance in the heart and brain. Our study lays the groundwork for a class of injectable therapeutic enzymes that alleviates intracellular redox imbalances by directly targeting circulating redox-coupled metabolites.

Our recent work utilizing *LbNOX*, a water-forming NADH oxidase that directly oxidizes intracellular NADH to NAD⁺, demonstrates that reductive stress can cause cellular pathologies, such as impaired proliferation in the face of ETC dysfunction³.

The extracellular lactate:pyruvate ratio has classically been used as a marker of intracellular NADH:NAD⁺ status⁸ due to the high LDH reaction flux and robust transport of lactate and pyruvate across the plasma membrane by monocarboxylate transporters⁹. LDH catalyzes the oxidation of NADH to NAD⁺, while transferring two electrons from NADH to pyruvate to make lactate. Blood lactate:pyruvate levels are often elevated in a variety of diseases, including mitochondrial ETC dysfunction^{2,10}, in response to an increased intracellular NADH:NAD⁺ ratio. Previously, it was shown that decreasing the extracellular lactate:pyruvate ratio by adding exogenous pyruvate in the medium lowers the intracellular NADH:NAD⁺ ratio in cultured cells^{11,12}. Sodium pyruvate has also been tested as a therapy for mitochondrial dysfunction^{13,14}. However, this approach has been ineffective clinically, in part because it requires administering stoichiometric amounts of the metabolite.

Here, we investigate the possibility of directly targeting the circulating milieu to alleviate intracellular redox imbalance by taking

人工的に酵素を連結する

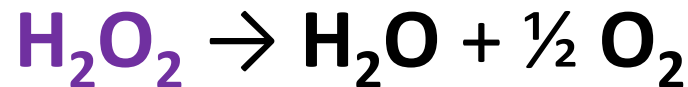
LOXCAT

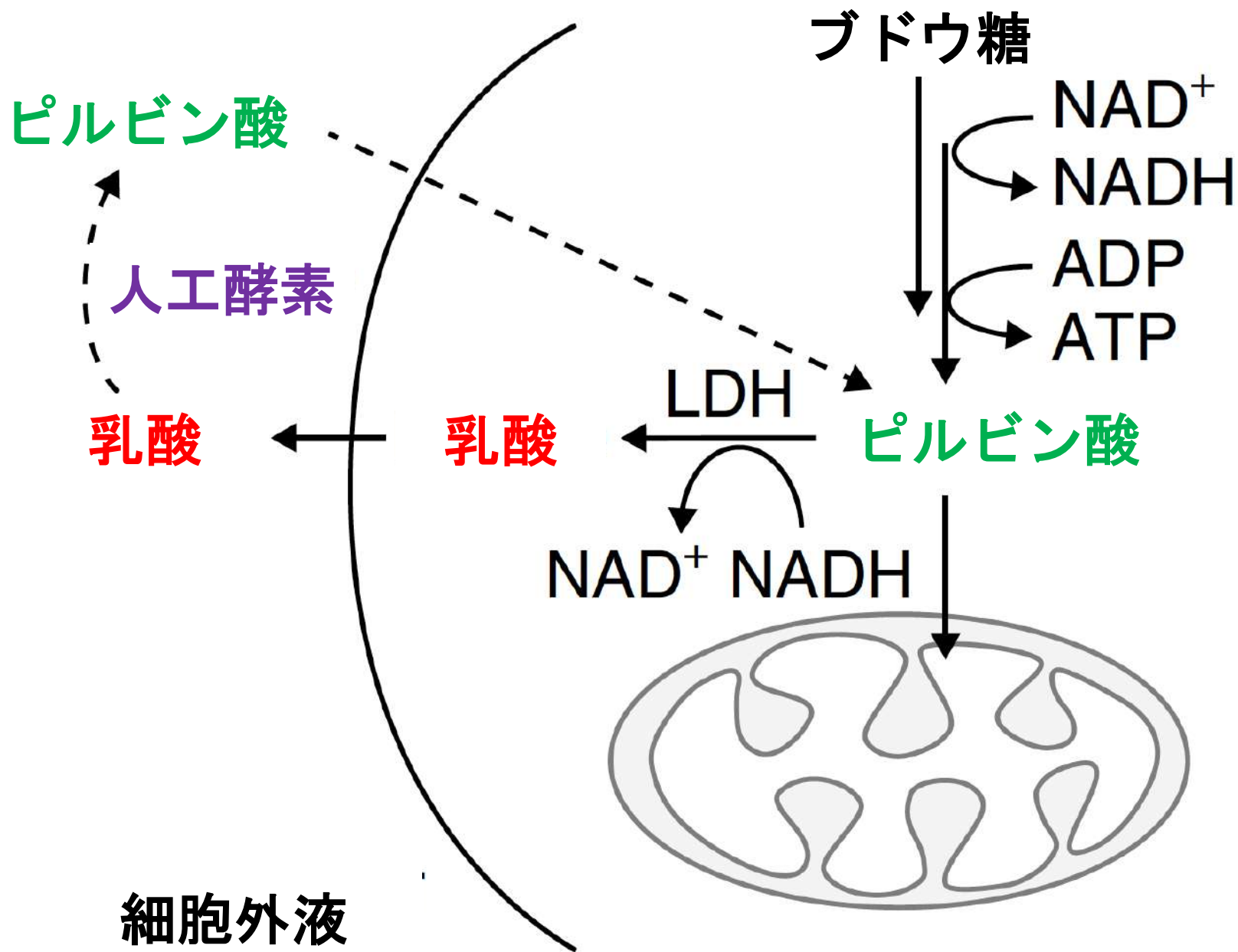
乳酸酸化酵素とカタラーゼ

乳酸をピルビン酸に酸化する

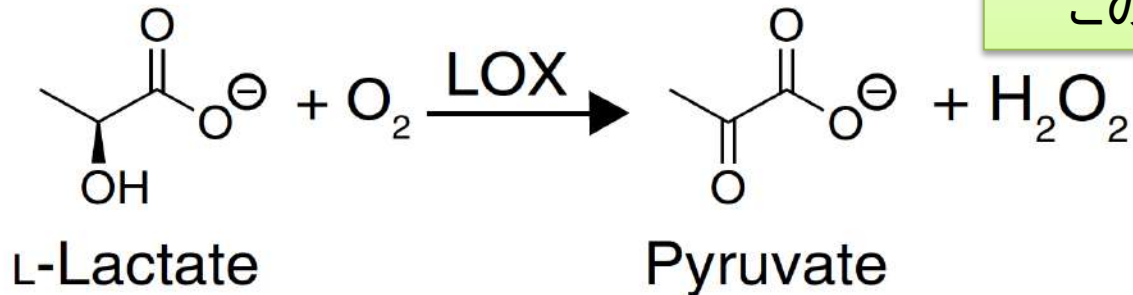


その時に生じた過酸化水素を水と酸素にする





Enzyme reactions



LOX = Lactate Oxidase

乳酸酸化酵素

乳酸を酸化し、ピルビン酸に変換する
この時、過酸化水素を発生する



CAT = Catalase

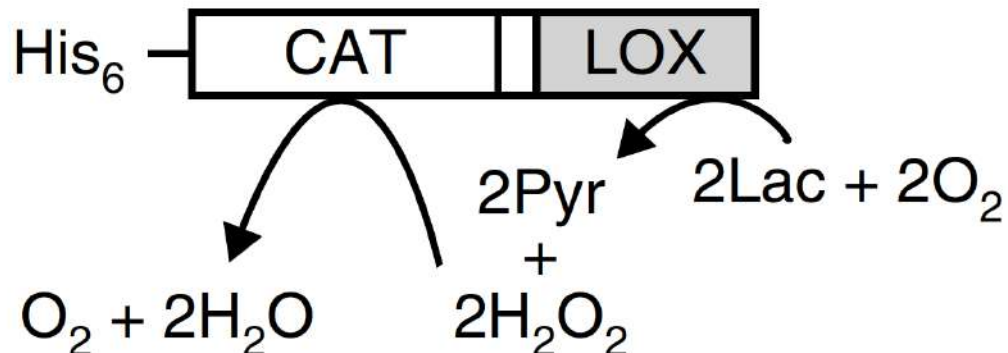
カタラーゼ

過酸化水素を水分子に変換する
この時、酸素を発生する

LOXCAT construct

N terminus

C terminus



LOXCAT

融合酵素

乳酸をピルビン酸に変換
酸素と水分子を生じる

ピルビン酸ナトリウムの効能効果

ミトコンドリア研究から新規医薬品を開発
代謝性アシドーシス改善薬の妥当性

代謝性アシドーシスの原因

心筋梗塞・溺水・窒息・敗血症

一酸化炭素中毒・シアン中毒

末梢組織への酸素供給の途絶

ミトコンドリア酸化リン酸化系の障害

皆さん、長い間にやあ

辛りやあことや

ええこともありますで
がんばってちょうだい



おかげさまです

きん

ありがとう