

## mtDNA 突然変異多発マウスが発現する呼吸欠損の原因解明

太田 あずさ (筑波大学 生物学類) 指導教員: 林 純一 (筑波大学 生命環境系)

## 背景・目的

ミトコンドリアは核ゲノムとは異なる独自のゲノム(ミトコンドリア DNA : mtDNA) を有する細胞小器官であり、酸化的リン酸化によって生命活動に必要な大部分の ATP 産生を担っている。mtDNA には酸化的リン酸化に寄与する呼吸酵素複合体のサブユニットの一部 (13 種) と、これらを翻訳するために必要な rRNA (2 種) と tRNA (22 種) がコードされており、細胞あたり数百から数千コピー程度存在する。したがって mtDNA に病原性の突然変異が生じると、ミトコンドリア呼吸機能が低下し、多様な病態を発症する可能性がある。実際に、mtDNA の病原性突然変異が全身性のミトコンドリア機能異常を呈するミトコンドリア病になることが示唆されている。

近年、mtDNA の多様な突然変異とミトコンドリア呼吸機能低下が老化の一因であるという「老化ミトコンドリア原因説」が提唱されている。この仮説では、老化と共に mtDNA 分子に多様な突然変異が蓄積し、このような多様な変異型 mtDNA から転写、翻訳された異常なタンパク質群がミトコンドリア呼吸酵素複合体からの活性酸素種の漏出を増加させるとともに、ミトコンドリア呼吸機能を低下させ、さらに漏出した活性酸素種によって mtDNA 分子に多様な突然変異が再誘発されるという悪循環に陥ることで、結果として老化が進行すると想定されている。一方、所属研究室の先行研究では、細胞内のミトコンドリアは分裂・融合を介して遺伝子産物の交換を行うという「ミトコンドリア間相互作用」の存在を証明している (Nature Genet., 2001; Nature Med., 2001; PNAS, 2005)。「ミトコンドリア間相互作用」の存在は、仮に老化に伴って mtDNA 分子に多様な突然変異が生じたとしても、他の正常な mtDNA 分子に由来する遺伝子産物が供給されるために、変異の病原性は発揮されず、ミトコンドリア呼吸機能は正常に維持されることを意味している。ところが最近、「老化ミトコンドリア原因説」を支持するモデルマウスとして、mtDNA mutator mice の作製が報告された (Nature, 2004; Science, 2005)。mtDNA mutator mice は、ミトコンドリア唯一のポリメラーゼであるポリメラーゼ $\gamma$ の校正機能のみを破壊することで、mtDNA の複製の際に後天的な突然変異が生じるように遺伝子操作されている。実際に、このマウスにおいて、多様な変異型 mtDNA 分子種が蓄積し、ミトコンドリア呼吸機能低下や、早期老化表現型 (寿命短縮・脱毛・脊柱後湾など) が引き起こされることが示されている。しかしながら、mtDNA mutator mice においてミトコンドリア呼吸機能低下が引き起こされる機構は未だに明らかにされていない。mtDNA mutator mice におけるミトコンドリア呼吸機能低下の原因は、欠失突然変異型 mtDNA の蓄積であるとする説や、mtDNA へのランダムな点突然変異の蓄積であるとする説が提唱されているが、これらの説を実験的に証明した例はこれまでに存在しないばかりか、ミトコンドリア呼吸機能低下の原因が mtDNA の突然変異であるという直接的な証拠さえ未だに示されていない。そこで本研究では、mtDNA mutator mice 由来の mtDNA を有するサイブリ

ッドを作製することで、mtDNA mutator mice のミトコンドリア呼吸機能低下の原因が mtDNA の突然変異であるか否かを検証し、さらに、同サイブリッドを用いてミトコンドリア呼吸機能低下が引き起こされる機構を解明することを目的とした。

## 方法

細胞質移植法によって mtDNA mutator mice 由来の mtDNA と正常マウス由来の核を有する細胞質雑種 (サイブリッド) を作製し、COX/SDH 染色および酸素消費量測定によってミトコンドリア呼吸機能を評価した。また、同サイブリッドにおいて、クローニング・シーケンシングによって点突然変異を、サザン・ブロットティングによって欠失突然変異型 mtDNA を、それぞれ検出した。

## 結果・考察

本研究で作製した mtDNA mutator mice 由来の mtDNA を有するサイブリッドでは、COX/SDH 染色および酸素消費量測定のいずれの方法においても呼吸機能低下が確認された。また、クローニング・シーケンシングによってランダムな点突然変異が多数検出されたが、サザン・ブロットティングの結果から、欠失突然変異型 mtDNA は存在しないことが明らかとなった。以上の結果から、mtDNA mutator mice のミトコンドリア呼吸機能低下の原因が mtDNA の突然変異であることが直接的に証明された。また、mtDNA mutator mice 由来の mtDNA を有するサイブリッドにおける呼吸機能低下は、欠失突然変異型 mtDNA ではなくランダムな点突然変異によって引き起こされることが示唆された。さらに、本研究の結果は、ミトコンドリア間相互作用の存在にもかかわらず、ランダムな点突然変異がその病原性を発揮し得る未知の機構の存在を強く示唆している。今後は、本研究で作製したサイブリッドを用いて同機構を具体的に明らかにしていきたいと考えている。