

## 新奇ミトマウス作製戦略：mtDNA 体細胞突然変異の活用

林 千彩音（筑波大学 生物学類）

指導教員：林 純一（筑波大学 生命環境系）

### 背景および目的

ミトコンドリアは酸化的リン酸化を行い ATP を合成する細胞小器官であり、独自に有するミトコンドリア DNA (mtDNA) は一細胞あたり数千コピー存在する。mtDNA に病原性突然変異がある一定の割合以上蓄積することでミトコンドリアの呼吸機能が低下し、ミトコンドリア病と総称される多様な病態を引き起こすことが知られている。しかし、その発症機構ははっきりとわかっておらず治療法も確立していないため、mtDNA 病原性突然変異を有するマウスを用いて mtDNA とミトコンドリア病をはじめとする様々な疾患との関係を見出すことが有効な研究手法と考えられる。すでに所属研究室では数種類のモデルマウス（ミトマウス）が作製されたが、多様な病態を呈するミトコンドリア病との関連を深く追究するには、mtDNA の多様な領域に病原性突然変異を有するモデルマウスを作製する必要がある。今までに作製されたモデルマウスは、マウス培養がん細胞内にすでに高率で有する mtDNA 体細胞突然変異を利用していたが、変異探索の候補を拡大するには低率で存在するものを利用しなければならない。しかし、病態発症には低率で存在する mtDNA 病原性突然変異を 50% 以上の高率へと蓄積させる必要がある。そこで、培養細胞内で自然に生じた mtDNA 体細胞突然変異の中から特定の変異部位に着目し、突然変異を低率で有する細胞から高率で有する細胞を樹立し、モデルマウスの作製へとつなげることを本研究の目的とする。

### 方法および結果

所属研究室が所持し、すでに mtDNA の全塩基配列決定が行われた低転移性マウス肺がん細胞株 P29 をリクローニングして分離した 127 クローンを利用した。進化的に保存されている部位は進化の過程で変化することが許されなかった重要な部位であると推測される。すなわち、そのような部位の突然変異は呼吸機能低下を引き起こす可能性があると考えられるため、それらに着目して体細胞突然変異の探索を行った。

### ① tRNA の機能異常をもたらす突然変異

ミトコンドリア病の三大病型である CPEO, MELAS, MERRF は、それぞれ大規模欠失突然変異  $\Delta$ 、tRNA<sup>-Leu(UUR)</sup>、tRNA<sup>-Lys</sup> の点突然変異が原因であると言われている。所属研究室では CPEO のモデルマウスのみが作製されており、残り 2 つのモデルマウスの作製には至っていない。P29 の mtDNA の塩基配列解析の結果より tRNA<sup>-Lys</sup> をコードする領域に機能異常をもたらすと思われる突然変異が存在しており、何らかの病態を示す可能性がある。

### ② 活性酸素種 (ROS) を産生する突然変異

ROS は主にミトコンドリアの酸化的リン酸化経路において発生し、転移などががんの悪性化の原因になることが示唆されている。所属研究室では有意な ROS 産生を示すモデルマウスを 1 種類作製しており、このマウスは他のモデルマウスが示す呼吸機能低下や乳酸値の増加に加え、B リンパ腫や転移能の増加といった表現型を示している。このような表現型が ROS の産生によって誘導されたものかどうかを検証するには、他の突然変異を有し ROS を有意に産生するようなモデルが必要である。したがって、P29 の mtDNA の塩基配列解析の結果から、ROS 産生に関与している可能性のある呼吸酵素複合体のサブユニットの突然変異を探索する。

現在 PCR および制限酵素処理を行い、これらの突然変異を有する細胞を探索している。

### 今後の展望

特定の mtDNA 体細胞突然変異を有する細胞を樹立し、これらの体細胞突然変異を高率で有するマウス ES 細胞を作製することを第一の目標とする。そして、その ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、交配を繰り返すことで新奇ミトマウスの作製へとつなげる予定である。