

ミトコンドリア分裂の生物学的意義：ミトコンドリアゲノム変異の病原性制御

田村真 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中田和人 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

細胞小器官の1つであるミトコンドリアは、核とは異なる独自のDNA (ミトコンドリアDNA: mtDNA) を有しており、酸化的リン酸化によって生命活動に必要なエネルギーの大部分を生産している。mtDNA分子は、環状二本鎖の構造をしており、細胞あたりに数百~数千コピー含有されている。哺乳類のmtDNAにはミトコンドリア内の呼吸酵素複合体を構成する13種のタンパク質の構造遺伝子と、それらの翻訳に必要な2種のrRNA、22種のtRNAがコードされている。

細胞内の個々のミトコンドリアは分裂と融合を介して内容物(mtDNAや遺伝子産物)の交換を行っており、この分裂と融合のバランスによってミトコンドリアの形態と機能が維持されている(ミトコンドリア間相互作用)。所属研究室では、仮にmtDNAに病原性の突然変異が生じ、そのような分子種が蓄積したとしても、その蓄積が優位にならない限り、「ミトコンドリア間相互作用」の存在によって野生型mtDNA由来の遺伝子産物が突然変異型mtDNAの病原性を相補し、ミトコンドリアの呼吸機能は正常に維持されることを実験的に立証している。

所属研究室では、病原性欠失突然変異型mtDNA (Δ mtDNA) と野生型mtDNAを含有するミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウス(mito-mice Δ)の作製に成功している。このmito-mice Δ の病態発症も前述のミトコンドリア間相互作用によって制御され、細胞や組織に Δ mtDNAが含有されていても、それが優位に蓄積されない限り、病態は誘導されない。ごく最近、mito-mice Δ の組織ではミトコンドリア分裂が Δ mtDNAの蓄積とともに亢進する可能性が見出された。この現象の生物学意義を検証するため、mito-mice Δ の肝臓・血球組織特異的に核DNAにコードされたミトコンドリア分裂因子Drp1をノックアウトさせたマウスDrp1KO:mito-mice Δ を作出し、病態解析を行ったところ、Drp1を破壊した状況下では、 Δ mtDNAの含有率が低い場合でも、病原性が増強され、病態発症に至ることが分かった。これらの結果は、ミトコンドリアの分裂が Δ mtDNAの病原性制御、ならびにミトコンドリア関連疾患の病態制御に重要な役割を果たしていることを示唆している。

このような所属研究室の先行研究をふまえ、本研究ではミトコンドリア分裂による変異型mtDNA分子種の病原性制御をさらに検証するため、活性酸素種(ROS)を漏出させる変異型mtDNAを導入したモデルマウス(mito-mouseND6)を活用した。mito-mouseND6は、ミトコンドリア呼吸酵素複合体Iを構成するサブユニット遺伝子(ND6)に病原性のG13997A点突然変異を有するmtDNA(mtDNA-G13997A)のみを含有し(ホモプラスミー)、老化とともに高血糖とリンパ腫が頻発する。本研究では、臓器特異的にDrp1を破壊したmito-mouseND6を作出し、1) mtDNA-G13997A点突然変異の病原性増強として更なるROSの漏出が誘導されるのか、否か、2) 高血糖やリンパ腫が早期に発症するのか、さらには新たな病態が誘導されるか、否かを検証することを目的

とした。

方法

mtDNA-G13997Aのみを含有するmito-mouseND6とCre-loxP系により肝臓と血球特異的にミトコンドリア分裂因子Drp1をノックアウトさせることのできるマウス(Drp1^{lox/lox};Mx1-Cre)を交配させた。得られたマウスは、mtDNA-G13997Aのみを含有し、さらに薬剤投与によって後天的にDrp1を肝臓と血球特異的に破壊することができる。本実験では、得られたマウスのうち雄のみを、薬剤投与によってDrp1を破壊したマウス群(Drp1KO:mito-mouseND6)と薬剤投与しないマウス群(Drp1WT:mito-mouseND6)に分類してその比較解析を行った。

結果

Mito-mouseND6(雌3個体)とDrp1^{lox/lox};Mx1-Creマウス(雄1個体)を交配させ、現在までに23個体(雄10個体、雌13個体)のF₁を得た。本実験では、Cre-loxP系がホモ接合体のマウスを利用する必要があるため(過去に作出されたDrp1KO:mito-mice Δ はホモ接合体であった)、得られたF₁個体をさらに交配し、150個体(雄80個体、雌70個体)のF₂を得た。これらのうち31個体はCre-loxP系がホモ接合体であり、ヘテロ接合体は89個体であった。得られたCre-loxP系のホモ接合体のうち、雄20個体(10個体は薬剤投与によるDrp1KO:mito-mouseND6、残りの10個体は薬剤非投与によるDrp1WT:mito-mouseND6)を本実験に用いることとした。ホモ接合体の雌(11個体)は薬剤非投与によるDrp1WT:mito-mouseND6と交配させることで、ホモ接合体である個体の維持、増殖に用いることとした。

現在、生後4週齢で薬剤投与したDrp1KO:mito-mouseND6と非投与のDrp1WT:mito-mouseND6の比較解析(体重と血液生化学)を実施している。生後16週(薬剤投与から11週)の時点で、両群に大きな差異は認められていない。今後、両群の比較解析を継続するとともに、肝臓や血球におけるROSの漏出を比較解析する予定である。