

## オルガネラバイオロジー：変異型 mtDNA が及ぼす影響

佐藤 雪歩（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】

生命活動に必要なエネルギーである ATP は、真核生物においてその合成の大部分をミトコンドリアに依存している。

ミトコンドリアは、外膜と内膜の二重の生体膜をもち、内膜に局在する I～V の呼吸酵素複合体によって酸化的リン酸化反応を行い、エネルギーを産生する細胞内小器官（オルガネラ）である。

ミトコンドリアは祖先型真核生物に共生した  $\alpha$  プロテオバクテリアに起源をもち、外膜は祖先型真核生物に由来し、内膜は  $\alpha$  プロテオバクテリアに由来する。また内膜の内側（マトリクス）には  $\alpha$  プロテオバクテリアに由来する独自の環状 DNA（Mitochondrial DNA : mtDNA）を複数コピーもつが、ミトコンドリアの祖先がもともと有していた遺伝子の大部分は核 DNA に移行しており、ミトコンドリアの機能が核ゲノムによる制御を受けていることがわかっている。

mtDNA には呼吸酵素複合体 I, III, IV, V のサブユニットの一部を構成する 13 種の構造遺伝子と 22 種の tRNA と 2 種の rRNA がコードされている。したがって mtDNA に生じる突然変異の病原性は、ATP 産生低下として表現されることが予想される。しかし近年、ミトコンドリア病をはじめ、がん、神経変性疾患、糖尿病など、多様な病態表現型に突然変異型 mtDNA が関与するとして注目を浴びている。

ミトコンドリアは高等動物のオルガネラの中では唯一その起源が異なることから、他のオルガネラとは独立して機能していると考えられていた時代もあった。しかし前述のように核 DNA の制御を受けることが解明され、ごく近年になって、ミトコンドリアが他のオルガネラと協働し、細胞内生理の様々な機能を担っていることが解ってきた。

そこで本研究では、ミトコンドリアが相互作用しているオルガネラとして小胞体（Endoplasmic Reticulum : ER）に着目した。ER は一重の生体膜からなる、板状もしくは網目状のオルガネラであり、タンパク質の合成・修飾・貯蔵や、脂質合成、カルシウムイオンの貯蔵などの機能を担う。ミトコンドリアの融合・分裂制御、オートファゴソームの形成などにおいて、ミトコンドリアとの相互作用が報告されている。

多様な病態を生じさせる突然変異型 mtDNA の分子病理を理解することを本研究の最終目的として、異なる突然変異型 mtDNA 分子種を含有するモデル細胞を用いて、ミトコンドリアと ER の形状や局在に変化や多様性が見られるか、否かを比較解析した。

## 【材料・方法】

所属研究室が所有している以下の①～④に示す細胞株を用いて、ミトコンドリアと ER をそれぞれ Mito-tracker と ER-tracker によって蛍光標識した上で、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。なお、全ての細胞株で核 DNA の遺伝的背景は C3H/AN 系統マウス由来の Fibroblast に起源をもつ。

- ①B82mtB6 : 野生型 mtDNA のみを含有するマウス細胞株。
- ②B82mtA11 : 複合体 I のサブユニット ND6 をコードする領域に点突然変異 (G13997A) を含有するマウス細胞株であり、この突然変異はミトコンドリアでの ROS 産生を上昇することが知られている。
- ③B82mt $\Delta$  : 4696 bp の大規模欠失を有する mtDNA (欠失型 mtDNA) と野生型 mtDNA の両方を含有するマウス細胞株で、欠失型 mtDNA の含有率が病原発揮の閾値を超えると著しい呼吸機能異常 (ATP 産生低下) が誘導される。
- ④B82mtPolG<sup>mut/mut</sup> : 核 DNA にコードされた mtDNA 複製因子 PolG の校正機能のみを破壊したマウスの血小板を融合させたマウス細胞株で、多様な突然変異が生じた mtDNA 分子種を含有している。著しい呼吸機能異常 (ATP 産生低下) が誘導される。

## 【結果・考察】

共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察によって、野生型 mtDNA のみを含有する細胞株①に比べ突然変異型 mtDNA を含有する細胞株②～④において、ミトコンドリアの短径が小さいことを明らかにした。また、著しい呼吸機能異常 (ATP 産生低下) が誘導される細胞株③・④において、細胞株①・②で高頻度に観察される密集した大きな ER 凝集は低頻度で観察され、細胞株①・②で低頻度に観察される細胞質に散在する小さな ER 凝集が高頻度で観察された。

この二つの変化は、細胞株の性質を反映した変化であり、病態表現型の多様性を誘導する一端を担っている可能性がある。近年、ミトコンドリアの融合・分裂に ER とミトコンドリアの物理的な接触が関わっていることを示唆する報告がなされ、注目を集めている。本研究で呼吸機能が低下している細胞株③・④において高頻度で観察された細胞質全体に広がる ER の分布は、ER とミトコンドリアの接触頻度を高めるものであり、これらの細胞においてミトコンドリアの融合や分裂の頻度が上昇していることを示唆する。