

植物ホルモン様物質がミトコンドリアの機能に及ぼす影響の解析

谷 春菜 (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>

ミトコンドリアは生体内におけるエネルギーの大部分を産生する細胞小器官であり、核ゲノムとは独立した環状二本鎖構造のミトコンドリア DNA (mtDNA) を細胞あたり数百~数千コピー有している。mtDNA には、ATP 産生を行う呼吸酵素複合体を構成する 13 種類の構造遺伝子とそれらの翻訳に必要な 2 種類の rRNA と 22 種類の tRNA がコードされている。

病原性突然変異の生じた mtDNA が細胞内にある一定以上の割合で蓄積すると、ミトコンドリア呼吸機能低下が引き起こされ、その結果、ミトコンドリア病と総称される一連の疾患が誘発されることが知られている。ミトコンドリア病は脳卒中様症状や運動機能低下などを呈する重篤な疾患であり、様々な治療法の研究がされているが未だ確立された治療法は存在していない。

また、ミトコンドリア内膜はクリステという非常に特徴的な形態を形成している。ミトコンドリアにおける ATP 産生を担う呼吸鎖酵素複合体は内膜に存在しており、クリステの形成は内膜の表面積を増加させることで、ATP 産生の効率化に寄与していると考えられている。近年、クリステの形成/維持は内膜に存在する MICOS 複合体 (mitochondrial contact site and cristae organizing system) が関与することが明らかとなった。また MICOS 複合体は外膜のタンパク質とも相互作用をし、外膜と内膜の接触部位を形成するなどミトコンドリアの形態制御においても重要な役割を果たすことが報告されており、ミトコンドリアの機能維持において非常に重要な要素として注目を集めている。

クリステの崩壊はミトコンドリア呼吸機能低下と関連することが知られているが、病原性突然変異型 mtDNA に起因するミトコンドリア呼吸機能不全における MICOS 複合体の関与や重要性などはほとんど報告されていない。そのような中、ごく最近、植物ホルモン様物質であるインドール化合物をスクリーニングする事で得られた新規化合物 (MA-5) が MICOS 複合体の主要因子である mitofilin に結合するという新たな事実が発見された。MA-5 は mitofilin に結合しクリステの安定化に寄与することで、ミトコンドリア呼吸機能や ATP 産生能の向上に繋がる可能性が考えられている。

そこで本研究では MA-5 の mitofilin 結合能力に着目し、病原性突然変異型 mtDNA を含有するモデル系を用いて、MA-5 のミトコンドリア呼吸機能に対する効果を検証することで、ミトコンドリア病の新規治療法として可能性を明らかにすると共に、ミトコンドリア呼吸機能不全における mitofilin の生物学的意義を理解することを目的とする。

<方法>

(1) 突然変異型 mtDNA 含有細胞における mitofilin 含有量の検証

ミトコンドリア呼吸酵素複合体は核 DNA と mtDNA の両者から由来するタンパク質によって構成されているため、mtDNA の影響を直接的に評価出来るように核が HeLa 細胞に統一された下記の細胞を用いた。

HeEB 細胞: HeLa 細胞を薬剤処理によって mtDNA を消失させた細胞 (HeLap0 細胞) に、HeLa 細胞の mtDNA を再度導入した細胞

HeLamt Δ 細胞: HeLap0 細胞に野生型 mtDNA より 5,196 bp が欠失した大規模欠失型 mtDNA (Δ mtDNA) を 93.6% で含有する細胞

HeLamt3243 細胞: HeLap0 細胞に *tRNA^{Leu(UR)}* に A3243G 点突然変異が生じた mtDNA を 88.1% で含有する細胞

HeLamt Δ 細胞の持つ Δ mtDNA、HeLamt3243 細胞の持つ A3243G 点突然変異型 mtDNA はヒトのミトコンドリア病の原因となる変異である。HeEB 細胞は野生型 mtDNA のみを持つ為、この細胞を control として用いた。

これら計 3 種類の HeLa 細胞株において mitofilin の含有量をウェスタンブロッティング法により定量を行った。

(2) 突然変異型 mtDNA 含有細胞に対する MA-5 の作用の検証

上記に示した HeEB 細胞株、HeLamt Δ 細胞株、HeLamt3243 細胞株に対し、MA-5 を 100 μ M で添加し 24h 培養後、ミトコンドリアの呼吸機能の解析を行った。

(3) ミトコンドリア病態モデルマウスに対する MA-5 の作用の検証

Control として野生型マウス (C57BL/6J)、ミトコンドリア病態モデルマウスとして mtDNA 上の 6 つの tRNA 遺伝子と 7 つの構造遺伝子を含む 4,696 bp が欠失した大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA4696) をマウス胚に導入することで所属研究室が作製したモデルマウス (mito-mice Δ) を使用した。Mito-mice Δ は体内に含有する Δ mtDNA の割合が個体により異なり、 Δ mtDNA が加齢と共に蓄積することでミトコンドリア呼吸機能低下に起因する病態を発症する事が知られている。

これらのマウスに対して、MA-5 を corn oil に溶かし、50 mg/kg body weight となる様に 1 日 1 回の長期的な経口投与を行い、病態に対する影響の評価を行った。

<結果>

詳細な結果については発表会にて報告予定である。