

## ミトコンドリア tRNA 遺伝子に病原性突然変異を有するマウスの作製

長島 瑠子 (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)

## &lt;背景・目的&gt;

ミトコンドリアは酸化リン酸化によって生命活動に必要なエネルギーである ATP を産生する細胞小器官である。ミトコンドリアは脂質二重膜によって細胞質から閉鎖されており、その内膜には酸化リン酸化を行う呼吸酵素複合体 I-V が存在し、更にその内部のマトリックスにはミトコンドリア独自の環状 DNA (ミトコンドリア DNA ; mtDNA) を有している。一細胞当たり二コピーしか存在しない核 DNA と異なり、mtDNA は一細胞当たり数百から数千コピー存在しており、呼吸酵素複合体 I, III, IV, V を構成する構造遺伝子と、その遺伝子の翻訳に必要な tRNA, rRNA をコードしている。mtDNA に突然変異が生じ、かつ、その分子種が高率に存在すると、呼吸酵素複合体の機能低下を介して、ミトコンドリア病や神経変性疾患、がん、糖尿病と言った疾患や老化という生命現象の原因となることが報告されている。

ミトコンドリア病と総称される疾患の中で最も罹患者数が多い疾患は、ミトコンドリア tRNA 遺伝子における突然変異を起因とするミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様症状 (MELAS) である。しかし、MELAS モデル動物は未だ樹立されておらず、病態発症機構の解明のみならず、治療方法の確立、創薬研究の点からも、MELAS モデル動物の早期樹立が求められている。

ミトコンドリア病を含む、突然変異型 mtDNA を起因とする疾患モデルマウスの樹立が、他の遺伝性疾患モデルマウスよりも遅れている原因は、mtDNA に対して、人為的に、かつ、高率に目的の突然変異を導入することが困難である点にある。核 DNA を含む核膜には核膜孔があり、また、細胞分裂の過程で核膜が消失する為、比較的容易に遺伝子を改変することが可能である。しかし、ミトコンドリアが脂質二重膜によって細胞質から閉鎖されていること、また、mtDNA が一細胞に数百から数千コピー存在すること等が、突然変異の人為的な導入を阻む障害となっている。その為、これまで突然変異型 mtDNA を導入したマウス (ミトマウス) の作出報告は殆ど為されていなかった。

それに対し、所属研究室では、これまで数例のミトマウスの樹立を行ってきた。その際、突然変異型 mtDNA を高率に有する細胞を、細胞の複製過程で自然に生じた mtDNA 体細胞突然変異の濃縮や、薬剤処理により誘導された突然変異を利用して樹立してきた。その中で、ミトコンドリア tRNA 遺伝子上に、MELAS の症例報告が為されている点突然変異に相当する突然変異型 mtDNA を高率に有する細胞株の樹立に成功している。

本研究は、その培養細胞における呼吸酵素複合体の機能、並びに、病態を評価すること、また、MELAS モデルに相当するマウスを樹立することを念頭に、その細胞を利用して樹立した ES 細胞がマウス個体を形成できるか評価するべく、三胚葉分化能を有するか確認することを目的とした。

## &lt;方法&gt;

所属研究室では、これまで下記手順に従ってミトマウスの樹立を行ってきた。また、アルキル化剤処理による突然変異の誘導、及び、濃縮によってミトコンドリア tRNA 遺伝子上に MELAS の原因突然変異として報告例のある突然変異に相当する突然変異型 mtDNA を 100% に有する細胞株を樹立した。本研究では、その細胞を使用し、下記手順に従って各実験を行った。

## ミトマウス樹立手順

- ①突然変異型 mtDNA を高率に有する細胞株の樹立と病原性の確認
- ②ミトコンドリアを除去した ES 細胞と、除核した①の細胞質体とを細胞融合し、ES 細胞へ突然変異型 mtDNA を導入
- ③②で樹立した ES 細胞を用いてのキメラマウス作製
- ④③で作製したキメラマウスの交配による、生殖系列への移行を介し、全身に突然変異型 mtDNA を有するミトマウスを樹立

## &lt;結果・考察&gt;

この突然変異型 mtDNA を有する細胞について、培養細胞における呼吸酵素複合体の活性を評価するべく、酸素消費量測定、COX/SDH 染色法を行った。その結果、当該変異を有する細胞が、酸素消費量の有意な減少と、呼吸酵素複合体 IV の活性低下を示した (①)。このことから、当該変異がマウス培養細胞において呼吸酵素複合体の活性低下を誘発するという病原性を有することが確認された。そこで、当該変異を有する細胞を除核して得た細胞質体と、薬剤処理によりミトコンドリアを除去した ES 細胞とを細胞融合し、当該変異を有する ES 細胞を樹立した (②)。更に、この ES 細胞がマウス個体を形成する分化能を維持しているか評価するため、マウス背部皮下に移植して奇形腫を形成させ、三胚葉分化を確認し、今回樹立した ES 細胞がキメラマウス作製に利用可能か判断した。現在、手順③に相当するキメラマウスの樹立を試みている。

## &lt;展望&gt;

現在作製中のキメラマウスを得られた後に、そのキメラマウスを交配させることにより、全身の細胞に突然変異型 mtDNA を高率で有するミトマウスを樹立する。そして、得られたミトマウスを用いて、生体内における MELAS の病態発症機構の解明に繋げる予定である。

所属研究室では、ミトコンドリア病三大病型のうち、MELAS を除く、慢性進行性外眼筋麻痺、並びに、赤色ぼろ繊維を伴うミオクローヌスてんかんについて、各モデルとなり得るマウスが樹立されている。今回のミトマウス樹立後は、それらのモデルマウスとの比較解析を行い、異なる突然変異が「呼吸酵素複合体の活性低下」という共通の過程を経ながらも全く異なる病態を示す発症機構の差異に関して、各突然変異型 mtDNA が呼吸酵素複合体に及ぼす影響の差異を足掛かりとして解析を行う予定である。