

突然変異型 mtDNA 導入細胞を用いたミトコンドリア・ダイナミクス因子の解析

小倉佳奈 (筑波大学 生物学類)

指導教員：石川 香 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

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リン酸化反応を行い、生体内で必要とされるエネルギーの大部分を産生する細胞内小器官である。

ミトコンドリアは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) を有している。mtDNA には、ATP 産生を行う呼吸酵素複合体の遺伝子を構成する 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。また呼吸酵素複合体は核ゲノムにもコードされていることから、ミトコンドリアの呼吸機能は両方のゲノムによる二重支配を受けていることが知られている。

細胞内の個々のミトコンドリアは融合と分裂を頻繁に繰り返しながら、その形態をダイナミックに変化させている(ミトコンドリア・ダイナミクス)。ミトコンドリア分裂の実行因子として Drp1 が機能しており、機能不全に陥ったミトコンドリアを孤立させ、ターンオーバーを促進すると考えられている。一方で Mfn1/2 によるミトコンドリア融合を介して内容物 (mtDNA や遺伝子産物) の交換が行われ、細胞へのダメージを平均化し、ミトコンドリアの機能が維持されると考えられている(ミトコンドリア間相互作用)。このようにミトコンドリア・ダイナミクスはミトコンドリアの品質管理において重要な役割を果たし、細胞の生存維持に寄与している。

ミトコンドリア・ダイナミクスと同様に細胞のミトコンドリア機能を正常に保つ上で重要な機構として、シャペロンタンパク質によるミトコンドリアへのタンパク質の輸送と Folding がある。核 DNA にはミトコンドリアで機能することが明らかとなっている 1000 種を超えるタンパク質がコードされており、これらが正常に機能するためにはシャペロンのはたらきが不可欠である。ミトコンドリアには幾つかのシャペロンタンパク質が局在しているが、そのうち Grp75 は細胞質からミトコンドリア内へのタンパク質輸送に機能し、その働きは Tid1 によって補助されている。HSP60 はミトコンドリア内へ輸送されたタンパク質の Folding を行う。

このように、ミトコンドリア・ダイナミクスとシャペロンタンパク質の働きは、それぞれミトコンドリアが正常な機能を維持する上で必要不可欠であると考えられる。しかし、mtDNA の欠損や mtDNA への病原性突然変異の蓄積などによりミトコンドリアに機能異常が起きるような条件下において、これらの因子がどのような役割を担っているかという点についてはほとんど解析されていない。そこでミトコンドリアの機能異常に対して、ミトコンドリア・ダイナミクス因子やシャペロンタンパク質の発現量がどのように変化するかを調べることを通じて、それらの因子の役割を考察することを目的として、実験を行った。

【材料・方法】

所属研究室で樹立された以下の①~⑤に示す細胞株を用いて、ミトコンドリア・ダイナミクス因子やシャペロンタンパク質の発現量をウエスタン・ブロッティング法により定量した。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。

②B82mtΔ: 4696 bp の大規模欠失を有する mtDNA (ΔmtDNA) と野生型 mtDNA の両方を含有し、ΔmtDNA の含有率が病原性発現の閾値を超えると著しい呼吸機能異常が誘導される。

③B82mtA11: 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) を有する mtDNA のみを含有し、複合体 I の活性低下と活性酸素種 (ROS) の増加が認められる。

④B82mtPolG^{mut/mut}: 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することで、mtDNA にランダムな突然変異が蓄積されるようになったマウスの mtDNA を細胞融合により導入した細胞株で、著しい呼吸機能異常が誘導される。

⑤p⁰B82: ミトコンドリアは存在しているが、mtDNA を完全に欠損したマウス細胞株。好気呼吸による ATP 産生は不可能であるが、解糖系によって、生存のためのエネルギーを賄っている。

【結果・考察】

<ミトコンドリア・ダイナミクス因子について>

B82mtB6 と B82mtΔ を比較すると、ΔmtDNA の割合が高くなるにつれて、Drp1 の活性型とされる pS616-Drp1 と Mfn1/2 の発現がいずれも増加した。このことは、ミトコンドリアの分裂と融合が共に活性化されていることを示唆しており、ΔmtDNA の蓄積に対して呼吸機能を維持しようとする防御反応である可能性が考えられる。しかし B82mtΔ を除くその他の細胞株においては、pS616-Drp1 の発現量に有意差はなかった。即ち、突然変異の種類の違いは、ミトコンドリア・ダイナミクスに異なる影響を与えると考えられる。

<シャペロンタンパク質について>

細胞株間で Hsp60 に有意差はなかったが、Tid1 に着目すると、B82mtPolG^{mut/mut} および p⁰B82 といった呼吸機能が著しく低下している細胞株において、Tid1-S の発現が高くなると観察された。Tid1-S は抗アポトーシス因子としても知られていることから、今回観察された変化は細胞の生存を維持しようとする防御反応である可能性が考えられる。

【展望】

本研究では、いくつかのタンパク質が呼吸機能の維持や細胞生存に貢献していると考えられた。そこで、それらをノックダウンすることで、ミトコンドリアの呼吸機能や生存率にどのような影響を及ぼすのかを解析したい。さらに分裂または融合因子を過剰発現させることで、呼吸機能が回復する可能性も検証したい。