

ミトコンドリア DNA へのランダムな突然変異の蓄積が呼吸欠損を誘導する理由

小林 晃平 (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

細胞小器官の一種であるミトコンドリアは、外膜および内膜からなる二重膜構造を有しており、内膜上に存在する呼吸酵素複合体 I ~ V による酸化的リン酸化反応によって生命活動に必要な ATP の大部分を産生している。また、核 DNA とは異なる独自のミトコンドリア DNA (mtDNA) を細胞あたり数百~数千コピー有している。哺乳類の mtDNA には複合体 II を除くその他の複合体を構成する一部の構造遺伝子と、その翻訳に必要な rRNA および tRNA がコードされている。つまり、複合体 II は核 DNA によってコードされたサブユニットのみで構成されている一方で、複合体 I, III, IV, V は核 DNA と mtDNA の二重支配を受けている。したがって、mtDNA への病原性突然変異の蓄積はミトコンドリア呼吸機能低下を誘導する。

mtDNA 唯一のポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ γ (PolG) には複製機能と校正機能が備わっているが、その校正機能のみを欠損したマウス (mtDNA mutator mice) においては、mtDNA の複製を繰り返す度に後天的にランダムな突然変異が生じる。そのため、加齢に伴って mtDNA に多様な突然変異が蓄積していく。興味深いことに、mtDNA mutator mice では ATP 産生の低下を特徴とする呼吸欠損が誘導されることが報告されているが、その機構は明らかにされていないばかりでなく、後述する所属研究室における先行研究との相違点が存在する。

所属研究室では、ミトコンドリアが融合と分裂を介して mtDNA や遺伝子産物を交換することで、ミトコンドリアの機能を正常に保つはたらき (ミトコンドリア間相互作用) を証明している。このミトコンドリア間相互作用により、mtDNA に同一の病原性突然変異が優位に蓄積しない限りは、ミトコンドリア呼吸機能低下は引き起こされない。また、所属研究室において樹立された野生型 mtDNA と大規模欠失突然変異型 mtDNA (Δ mtDNA) を共に含有する病態モデルマウスにおいては、ミトコンドリア間相互作用により、 Δ mtDNA が 70~80% 以上蓄積してはじめてミトコンドリア呼吸機能低下が誘導される。このことからミトコンドリア呼吸機能低下の誘導には閾値効果が存在する。

ミトコンドリア間相互作用を考慮すると、mtDNA mutator mice においては、たとえ mtDNA にランダムな突然変異が蓄積したとしても同一の変異を有していない異なる変異型 mtDNA から遺伝子産物が供給されるため、ミトコンドリア呼吸機能は正常に保たれることが予想される。また、閾値効果を考慮すると、ミトコンドリア呼吸機能低下を誘導するのに十分な程度に同一の突然変異が蓄積するとは考えられない。それにもかかわらず、mtDNA mutator mice では mtDNA へのランダムな突然変異の蓄積によって呼吸欠損が誘導されるのである。

現在、mtDNA mutator mice において呼吸欠損が誘導される原因としては、複合体の形成が異常となり、その結果として複合体の形成と分解のターンオーバーが早まるという仮説が提唱されている。そこで、本研究においては呼吸酵素複合体およびそれを構成するサブユニットに着目し、mtDNA mutator mice および同マ

ウス由来の mtDNA を有する培養細胞を用いて、mtDNA へのランダムな突然変異が呼吸欠損を誘導する理由を解明することを目的とした。

材料

○mtDNA mutator mice (10 ヶ月齢) における凍結心臓

○培養細胞

- B82mtB6: ρ^0 B82 細胞 (mtDNA を完全に欠損) に C57BL/6 (B6) 系統マウスの野生型 mtDNA を導入した細胞。
- B82mtPolG^{mut/mut}: ρ^0 B82 細胞に 10 ヶ月齢における mtDNA mutator mice の mtDNA を導入した細胞。10 ヶ月の間に蓄積した多様な変異型 mtDNA を含有しているが、B82 の核背景を有しているため校正機能の欠損はなく、培養の繰り返しによる mtDNA への突然変異の頻度は増加しない。

方法・結果

培養細胞において呼吸酵素複合体の存在量を確認するために、Clear Native-PAGE (CN-PAGE) を行った。この手法は強力な変性剤である SDS を用いた SDS-PAGE とは異なり、変性作用の小さい界面活性剤を用いることで、呼吸酵素複合体をサブユニットへ解離させることなく各複合体を分離することができる。この実験の結果、B82mtB6 と比較すると、B82mtPolG^{mut/mut} においてはいくつかの複合体の大幅な減少あるいは消失が認められた。

次に、総タンパク質でのウェスタンブロットティングによって、培養細胞における SdhA (複合体 II を構成するサブユニット、核 DNA コード) および Cox4 (複合体 IV を構成するサブユニット、核 DNA コード) の発現量を調べた。その結果、B82mtB6 と比較して、B82mtPolG^{mut/mut} の SdhA の発現量は同等であったが、Cox4 の発現量は顕著に減少していた。同様の現象が mtDNA mutator mice (10 ヶ月齢) の凍結心臓においても観察された。

考察

CN-PAGE の結果から、培養細胞においては呼吸酵素複合体の形成異常が呼吸欠損を誘導することが示唆された。また、ウェスタンブロットティングの結果から、SdhA および Cox4 はどちらも核 DNA にコードされているにもかかわらず、異なる挙動を示すことが確認された。これらのサブユニットで異なるのは、複合体 II が核 DNA にコードされたサブユニットのみで構成され、複合体 IV が核 DNA および mtDNA の両方にコードされたサブユニットで構成されるという点である。

このことから、mtDNA へのランダムな突然変異の蓄積が mtDNA にコードされたサブユニットの異常を誘導し、その結果として複合体の安定性を低下させていることが示唆された。