

モデルマウスを用いた多型突然変異型 mtDNA に関する基礎研究

平 正史 (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呼吸により産生する細胞小器官であり、細胞核に存在する核 DNA とは異なる独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) を有している。mtDNA は環状二本鎖構造をしており、呼吸酵素複合体を形成するために必須な 13 種の構造遺伝子とそれらを翻訳するのに必要な 22 種の tRNA、2 種の rRNA がコードされている。ミトコンドリアの呼吸酵素複合体は mtDNA の遺伝子だけでなく、核 DNA の遺伝子にもコードされているため、ミトコンドリアの機能は核 DNA と mtDNA による二重支配によって制御されている。

mtDNA に生じた突然変異は、病原性突然変異と多型突然変異の 2 種類に分類される。病原性突然変異はミトコンドリアの呼吸機能低下を引き起こし、ミトコンドリア病などの疾患を誘導する。これに対し、多型突然変異はミトコンドリアの呼吸機能に影響を及ぼさず、野生型と変わらない表現型を示すと考えられている。

しかし、mtDNA の多型突然変異が特定の疾患の罹患率と関与していることを示唆する報告がある。例えば、ヒトハプログループと疾患発症頻度に関する先行研究である。ハプログループとは、ヒト集団を mtDNA の多型突然変異のタイプで分類したグループのことである。ハプログループ間で疾患発症頻度を検証した疫学的な研究では、ハプログループごとに特定の疾患の発症頻度が異なっており、mtDNA の多型突然変異が病態と何らかの因果関係を示す可能性があることが示唆された。このように疫学的な研究により多型突然変異が生体に影響を及ぼす可能性については報告はされているものの、この関係を実験的に証明したという報告はほとんどない。

この関係について実験的に調べるために、野生型とされている C57BL/6J (B6) 系統と、同種異系統にあたる NZB/BINJ (NZB) 系統のマウスを利用しようと考えた。B6 系統と NZB 系統の mtDNA の配列間には 91 箇所の相違があり、そのうち 13 箇所においてアミノ酸置換を伴う非同義変異が存在するが、これらの変異箇所はヒトにおいて報告されている病原性突然変異に相当する場所ではないことが知られている。

所属研究室の先行研究において、mtDNA の違いによる影響のみを比較するために、核 DNA を B6 系統由来に統一し、mtDNA が B6 系統由来あるいは NZB 系統由来で異なる培養細胞を用いて、そのミトコンドリア呼吸機能と細胞増殖能を調べたところ、それらの培養細胞間で有意な差が認められなかったことが報告されている。このことから、少なくともこの先行研究に用いられた培養細胞においては、NZB 系統の mtDNA は病原性を発揮しない多型突然変異に相当することが示された。

多型突然変異はミトコンドリアの呼吸機能に影響を及ぼさないと上述したが、生物の進化を探るための指標として利用される以外にはほとんど注目されてこなかったため、多型突然変異が生

体に及ぼす影響については、その有無も含めてほとんど検証されていない。

そこで本研究では、培養細胞においてミトコンドリア呼吸機能に影響を及ぼさなかった mtDNA の多型突然変異が生体に及ぼす影響をマウス個体レベルで検証することで、多型突然変異とミトコンドリア呼吸機能の生体における関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】

所属研究室では、mtDNA が母性遺伝する性質を利用した戻し交配によって、核 DNA が B6 系統に限りなく近く mtDNA が NZB 系統である多型マウス (B6mtNZB) が既に樹立されている。核 DNA と mtDNA がともに B6 系統である野生型マウス (B6mtB6) をコントロール群とし、B6mtNZB マウスを実験群として、両者の間にミトコンドリアの呼吸機能をはじめとする幾つかの表現型について何らかの違いが観察できるか否かを検証した。通常の飼育条件下では影響がなくても、代謝的な負荷を加えることによって表現型に違いが生じる可能性を考慮し、B6mtB6 マウスと B6mtNZB マウスをそれぞれ通常食 (ND) を与える群と高脂肪食 (HFD) を与える群に分け、約 21 ヶ月齢で比較解析を行った (下記表参照)。

使用したマウス実験群

マウス	投与食
B6mtB6	ND
B6mtNZB	ND
B6mtB6	HFD
B6mtNZB	HFD

表現型について

上記 4 群のマウスについて、体重、定常時血糖値、定常時乳酸値、空腹時血糖値、空腹時乳酸値を測定した。これらの測定項目は、糖代謝に異常がある場合に変化すると想定される項目群である。また、臓器におけるミトコンドリアの呼吸機能を検証する目的で、マウス個体を解剖し、心臓および腎臓、骨格筋の組織切片を用いて、COX/SDH 染色を実施した。この染色法は、ミトコンドリアの呼吸機能に応じて組織を染め分けることができるものである。さらに、解剖時、複数の個体において肝臓にがんが観察された。これらのがんについて、その大きさを定量し、比較した。

【結果】

詳細な結果については発表会にて報告予定である。