

## 点突然変異型 mtDNA を有するマウスの酸化ダメージの臓器特異性

仁平 隆太 (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】

ミトコンドリアは生体エネルギーである ATP の大部分を合成する重要な細胞小器官であり、その内部には核 DNA とは異なる独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) が、細胞あたりに数百~数千コピー含有されている。哺乳類の mtDNA にはミトコンドリア内の呼吸酵素複合体を構成する 13 種のタンパク質の構造遺伝子と、それらの翻訳に必要な 2 種の rRNA、22 種の tRNA がコードされている。そのため、病原性突然変異が生じた mtDNA 分子種が優位に蓄積すると、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多様な病態が誘発されることが報告されている。また、最近では、がんや糖尿病などの疾患の発症にも mtDNA の突然変異が関与している可能性が示唆されている。ミトコンドリアは電子伝達の過程で、少量の電子が漏出することにより活性酸素種 (ROS) を産生することが知られている。したがって、病原性突然変異型 mtDNA が蓄積した場合はさらに ROS が産生され、この過剰産生された ROS が核酸や生体膜、タンパク質など細胞や組織の構成要素に酸化ダメージを与えることで多様な疾患誘発に関与する可能性が報告されている。

しかし、mtDNA の突然変異が多様な疾患の原因となっているという直接的な証拠はなく、両者の因果関係 (発症機構) については未だに解明されていない。疾患の発症機構の詳細理解や治療法の探索には、様々な mtDNA の突然変異に起因するミトコンドリア病モデルマウス (mito-mice) を用いた研究が効果的であり、これまでに所属研究室では複数の mito-mice を作製してきた。その中の 1 つである mito-miceND6<sup>M</sup> は、呼吸酵素複合体 I のサブユニットである ND6 遺伝子に G13997A 点突然変異を有する mtDNA (mtDNA-G13997A) のみをホモプラスミーの状態に含有し、軽度な呼吸機能低下と ROS の過剰産生という表現型を示す。また、加齢とともに高血糖を呈し、B 細胞リンパ腫の発症頻度の増加が見られる。この事実を逆に捉えると、mito-miceND6<sup>M</sup> は全身で mtDNA-G13997A をホモプラスミーで有しているにもかかわらず、血糖上昇とリンパ腫発症以外には異常が認められていないということであり、臓器間・組織間において ROS の産生量や ROS による酸化ダメージの蓄積に差異があることを示唆している。

このような所属研究室の先行研究をふまえ、本研究では、mtDNA-G13997A をホモプラスミーで有する mito-miceND6<sup>M</sup> において、mtDNA は全身均一であったとしても酸化ダメージの蓄積には臓器間・組織間で差異があるのではないかと作業仮説を立て、この仮説を検証するために臓器間および同一の臓器を構成する組織間で酸化ダメージの程度を比較検討することを目的とした。

## 【材料・方法】

## 使用したマウスについて

Mito-miceND6<sup>M</sup> の核 DNA は野生型とされている C57BL/6J (B6) 系統であり、mtDNA にのみ突然変異を有するため、核 DNA と mtDNA がともに B6 系統であるマウスをコントロールとして用い、mtDNA の突然変異のみを原因とする酸化ダメージの蓄積の差異を解析した。また、mito-miceND6<sup>M</sup> の病態は生後約 18 か月を経過した頃から現れると考えられていることから、それぞれの系統において生後 18 か月以前 (12 か月齢) と以降 (24 か月齢) のマウスを用意して解析を行うこととした。

## 使用したマウス実験群

マウス	月齢
B6	12
B6	24
Mito-miceND6 <sup>M</sup>	12
Mito-miceND6 <sup>M</sup>	24

## 酸化ダメージの解析について

ROS はその大部分が抗酸化物質や酵素によって直ちに消去されてしまうため、臓器に存在する ROS の量を測定することは極めて困難である。そこで、ROS の過剰産生によって生じる臓器への酸化ダメージの蓄積を 1-メチルアデノシン (m<sup>1</sup>A) に対する免疫染色を用いて解析することとした。m<sup>1</sup>A は、tRNA に特異的な修飾核酸であり、組織が酸化ダメージを受けることによって増加するとされている。本研究では、上記 4 群のマウス個体を解剖し、各臓器の組織切片を用いて、抗 m<sup>1</sup>A 免疫染色を実施した。

## 【結果】

Mito-miceND6<sup>M</sup> の多くの臓器では酸化ダメージの蓄積に B6 との差異は見られなかった。ただ、B6、mito-miceND6<sup>M</sup> とともに加齢による酸化ダメージの蓄積が見られる臓器と加齢による酸化ダメージの蓄積が見られない臓器が認められた。

一方、特定の臓器については B6 と比べ、大きな酸化ダメージの蓄積が見られた。その臓器は B6 と比べ、ROS が過剰産生されているか、ROS に対する抵抗性が脆弱であることが示唆された。また、同一の臓器内で、酸化ダメージの蓄積が他と明らかに異なる細胞群も認められた。この結果は臓器内の特定の組織や細胞についても ROS の産生量や ROS に対する抵抗性に差異があることを示唆している。より詳細な結果については発表会にて報告する予定である。