

## 点突然変異型 mtDNA を有するマウスの逆遺伝学：褐色脂肪組織における表現型の解析

秋元 奈緒（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

ミトコンドリアは呼吸酵素複合体 I~V により、生体エネルギーである ATP の大部分を産生する細胞小器官である。また、ミトコンドリアは核 DNA とは異なる独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) を、細胞当たり数百~数千コピー保有している。哺乳類の mtDNA には呼吸酵素複合体 I・III・IV・V を構成する 13 種類の構造遺伝子と、その翻訳に必要な 2 種類の rRNA、22 種類の tRNA がコードされている。

脂肪組織には白色脂肪組織 (WAT) と褐色脂肪組織 (BAT) の 2 種類が存在し、それぞれ異なる機能を持つ。WAT は脂質貯蔵を行うのに対し、BAT は非震え型の熱産生を行う器官であり、げっ歯類などの小型哺乳類で発達し、ヒトの成人においても肩甲骨間など限られた部位に少量存在している。BAT のミトコンドリアには脱共役タンパク質 1 (UCP1) というタンパク質が特異的に発現し、ATP 産生の過程で生み出されるプロトン濃度勾配によるエネルギーを脱共役することで、ATP ではなく熱を産生している。BAT は体温調節としての発熱だけでなく、脂肪を熱として放散しエネルギー消費を行う脂質代謝の機能も担っているため、その脂質代謝が破綻することで肥満や生活習慣病が誘発されることが知られている。そのため、肥満や生活習慣病の管理・治療のターゲットとして BAT の生理機能が注目されている。現在、老化や肥満などの要因により BAT の熱産生機能が低下することが分かっており、これにミトコンドリア機能障害が関わっていることが示唆されているが未だ不明な点が多い。

そこで所属研究室では、BAT とミトコンドリア機能の関係を調べるために、mtDNA に突然変異を導入することでミトコンドリア機能異常を引き起こしたマウス (mito-mice) を用いた研究が行われてきた。先行研究では 6 種類の tRNA 遺伝子と 7 種類の構造遺伝子が欠失した大規模欠失型 mtDNA ( $\Delta$ mtDNA) を保有するマウス (mito-mice  $\Delta$ ) の解析により、 $\Delta$ mtDNA の含有率によって BAT の白色化や再褐色化と考えられる現象が観察されており、ミトコンドリア機能が BAT の可塑性に関わっていることが示唆された。

本研究ではさらに詳しくミトコンドリア機能と BAT との関係を調査するために、呼吸酵素複合体 I のタンパク質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-ND6<sup>M</sup>) をホモプラスミーで保有する mito-miceND6<sup>M</sup> を用いて解析を行った。先行研究において mito-miceND6<sup>M</sup> は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ことが分かっている。

本研究は、mito-miceND6<sup>M</sup> の BAT における表現型を解析することで、ミトコンドリア機能と BAT の関係を調べ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 は野生型とされる C57BL/6J (B6) 系統であり、mtDNA にのみ突然変異を有する。そのため、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 BAT の表現型の差異を解析した。また、先行研究により 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ことが明らかとなっているため、それぞれの系統において生後 18 か月とその前後 (12 か月齢・18 か月齢・24 か月齢) のマウスで解析を行った。

## 使用したマウス群

マウス	月齢
B6	12
B6	18
B6	24
mito-miceND6 <sup>M</sup>	12
mito-miceND6 <sup>M</sup>	18
mito-miceND6 <sup>M</sup>	24

## 使用した臓器について

上記 6 群のマウスを解剖し、肩甲骨間に存在する BAT を摘出した。また、染色に使用するためホルマリン固定後にパラフィン包埋し、組織切片を作製した。

## 細胞サイズの解析について

組織形態を観察するためにヘマトキシリン・エオジン染色で細胞質と核を染色した。その後、画像解析ソフト Axio vision LE ver.4.8.2.0 (Zeiss) を用いてそれぞれの細胞の面積を測定し、細胞のサイズ分布を解析した。

## 各種免疫染色について

<抗 m<sup>1</sup>A 免疫染色>

tRNA に特異的な修飾核酸である 1-メチルアデノシン (m<sup>1</sup>A) は、組織が酸化ダメージを受けることによって増加する。そこで m<sup>1</sup>A に対する抗体で染色することにより、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解析した。

## &lt;抗 UCP1 免疫染色&gt;

BAT 特異的に発現し熱産生に必須なタンパク質である UCP1 に対する抗体で染色することにより、熱産生機能を解析した。

## &lt;抗 F4/80 免疫染色&gt;

マクロファージ表面に存在するマーカーである F4/80 に対する抗体で染色することにより、炎症性ダメージを解析した。

## 結果

詳細な結果・考察は発表会にて報告予定である。