

病原性ミトコンドリア点突然変異型 mtDNA はオートファジーを誘導するのか？

安達 南菜（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、細胞小器官の一つであり、それらの内膜には呼吸酵素複合体 I ~ V が存在している。呼吸酵素複合体は酸化リン酸化反応を介して、生体内で必要とされる ATP の大部分を産生している。この ATP 産生過程では電子伝達系が駆動するため、少なからず電子が漏出され、活性酸素種 (ROS) が産生されることが知られている。ミトコンドリアには独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) が存在し、哺乳類細胞では、1 細胞あたり数百~数千コピーの mtDNA が含有されている。哺乳類の mtDNA には前述の呼吸酵素複合体 I、III、IV、V を構成する 13 種類のタンパク質とそれらの翻訳に必要な 22 種類の tRNA と 2 種類の rRNA がコードされている。このため、突然変異型 mtDNA が蓄積すると、ミトコンドリアの呼吸機能低下 (ATP 産生不全) が誘導され、ミトコンドリア病をはじめとする多様な疾患群が引き起こされる。

現在、異常ミトコンドリアを選択的に分解するミトコンドリアオートファジー (マイトファジー) に注目が集まっている。オートファジーは選択的なタンパク質の分解系であるユビキチン・プロテアソーム系とは異なり、非選択的な分解系である。しかし近年、機能低下または異常なミトコンドリアを選択的に分解するマイトファジーによってミトコンドリアのターンオーバー (品質管理) が促進される可能性が報告された。しかしながら、マイトファジーが観察される実験の多くは、脱分極剤の処理によって強制的にミトコンドリアの膜電位を低下させるため、生理的条件においてマイトファジーやオートファジーがミトコンドリアの機能維持にどの程度寄与しているのかについては、いまだ不明な点が多い。

所属研究室では、これまでに mtDNA に突然変異を有する 4 種のモデルマウス (mito-mice) の作出に成功している。その一つである mito-miceND6^M は、呼吸酵素複合体 I のサブユニットである ND6 をコードする遺伝子領域に G13997A 点突然変異を全身に均一な状態 (ホモプラスミー) で有している。このため、mito-miceND6^M では、呼吸酵素複合体 I の活性低下によって電子の過剰な漏出 (慢性的な ROS の過剰産生) が起こり、結果として、加齢に伴い高血糖や B 細胞リンパ腫の発症頻度の増加が誘導される。

mito-miceND6^M は、同一の突然変異をホモプラスミーで有することから、組織中のミトコンドリアは均一に同程度の酸化ダメージを受けていると考えられていた。ところが、所属研究室の検討において、同一組織の細胞間で酸化ダメージの程度に違いがあることを示唆する結果が得られている。このことから、ホモプラスミーの突然変異を有する同一細胞内のミトコンドリアにおいても、ダメージの程度や機能に差異がある可能性が出てきた。仮にそうした不均一性があるとすれば、ミトコンドリアの品質管理機構に一定のストレスがかかっている可能性が考えられる。このような条件下では、生理的な環境においてもオートファジーやマイトファジーの誘導効率の違いを観察できるのではないかと

と考えた。そこで本研究では、1) mito-miceND6^M の組織においてオートファジー可視化できるマウスを作製し、2) 生体におけるミトコンドリアの品質管理の生物学的な意義を検討することを目的とした。

【材料・方法】

① 使用したマウス

オートファジーの膜動態としては、まず隔離膜と呼ばれる扁平な小胞が伸長・湾曲しながら細胞質の一部を取り囲み、オートファゴソームを形成する。このオートファゴソームが分解酵素を含むリソソームと融合することでオートリソソームとなり、オートファゴソームの内容物が分解される。オートファゴソームに特異的に局在するタンパク質である LC3 (酵母 Atg8 とホモログ) は、オートファゴソーム形成に重要な役割を果たしていると考えられる。この LC3 と緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合したタンパク質である GFP-LC3 を全身の臓器で発現するマウス (GFP-LC3 マウス) では、オートファゴソームを緑色蛍光によって識別可能である。すなわち、このマウスの緑色蛍光を観察することにより、生体組織の細胞におけるオートファジーの発生を観察することが可能である。そこで本研究では、GFP-LC3 発現する mito-miceND6^M を作出した。哺乳類の mtDNA は完全母性遺伝するため、母方を mito-miceND6^M、父方を GFP-LC3 マウスとして掛け合わせを行い、GFP-LC3/mito-miceND6^M を作製した。また、GFP-LC3 マウスは核 DNA と mtDNA がともに野生型である C57BL/6J (B6) 系統のため、このマウスをコントロールとして用いた。

② オートファジーの解析

オートファジーは絶食によって誘導されることが知られている。そこで、GFP-LC3 マウスおよび GFP-LC3/mito-miceND6^M において 24 時間絶食させた群 (絶食群) および自由に摂食させた群 (非絶食群) を準備した。これらのマウス群から臓器を摘出し、Confocal 顕微鏡によるオートファゴソームの観察と Western blot によるオートファジー関連タンパク質の発現解析を行った。

【結果】

詳細な結果については発表会にて報告予定である。