

モデルマウスを用いた老化ミトコンドリア原因説の検証

佐山 実希 (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】

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 とは異なる独自の環状二本鎖 DNA、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。mtDNA には呼吸酵素複合体を構成する構造遺伝子や、その翻訳に必要な rRNA および tRNA がコードされている。mtDNA は、常に ATP 合成の際に生じる活性酸素種 (ROS) による酸化ストレスにさらされており、通常核 DNA の 5~10 倍変異が蓄積しやすいと言われている。

老化ミトコンドリア原因説では、1) ROS が酸化ストレスとして mtDNA に多様な突然変異を生じさせ、2) 変異型 mtDNA がミトコンドリア機能低下を誘導し、3) この呼吸機能異常がさらなる ROS 産生を誘発する、という悪循環が老化の原因であるとしている。

mtDNA 唯一のポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ γ (PolG) は核 DNA にコードされており、複製機能と校正機能が備わっている。先行研究において、この校正機能のみを欠損したマウス (mtDNA mutator mice) では、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、結果として、加齢に伴って mtDNA に多様な突然変異が蓄積していくことが示されている。mtDNA mutator mice の組織ではミトコンドリア呼吸機能の低下がみられ、そして、老化の症状 (寿命短命、脱毛、脊柱彎曲、生殖機能低下など) の表現型を呈する。このため mtDNA mutator mice は早老症のモデルマウスと考えられている。

しかしながら mtDNA mutator mice を老化モデルであると仮定すると説明が難しい矛盾点が確認されている。

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) の存在を証明している。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。

以上の矛盾点と、先行研究において mtDNA mutator mice で ROS の過剰な産生がみられなかったことから、mtDNA の突然変異と老化の間には先に述べた老化ミトコンドリア原因説の機構とは異なる分子機構がはたらいっていることが示唆された。よってこの仮説の再検証が必要である。

mtDNA mutator mice は交配の過程でメンデルの法則により 1 : 2 : 1 の確率で、変異型 PolG 遺伝子を有さない野生型マウスと、ヘテロで有するマウスと、ホモで有する上記の mtDNA mutator mice が生まれる。興味深いことに、変異型 PolG 遺伝子をヘテロで有するマウスは野生型マウスと表現型に差異が無い。このため、ヘテロ型マウスについて調べている先行研究はほとんどない。本研究では、このヘテロ型マウスに着目し、野生型マウスやホモ型マウスとの差を見ることで、老化ミトコンドリア原因説の再検証ができると考えた。そこでまず、ヘテロ型マウスの PolG タンパク質転写の際、正常型 PolG の mRNA の発現が増強されている可能性を考え、mRNA の発現量を調べた。

【材料】

校正機能を失わせた変異型 PolG の遺伝子をホモで有する mtDNA mutator mice、ヘテロで有するマウス、野生型 PolG を発現するマウスにおける凍結組織。

【方法】

臓器から抽出した RNA を Reverse transcription PCR で逆転写した後に増幅した。制限酵素で PolG の変異箇所を特異的に切断することで、野生型と変異型を識別できるようにした上でアガロース電気泳動により分離した。分離後の泳動パターンを用い、野生型と変異型の PolG の mRNA の量を定量した。

【結果・考察】

詳細は発表会当日にて報告する。