

点突然変異型 mtDNA による酸化ダメージの蓄積に関する研究

福田 里利子 (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】

ミトコンドリアは細胞小器官の一つとして知られ、内膜には呼吸酵素複合体 I～V が存在する。それらが行なう酸化的リン酸化により生体エネルギーである ATP を産生する。ミトコンドリア内部には核 DNA とは異なる独立のミトコンドリア DNA (以下、mtDNA) が、細胞あたり数百から数千コピー存在している。mtDNA には呼吸酵素複合体を構成する 13 種類のタンパク質およびそれらの翻訳に必要な 2 種類の rRNA と 22 種類の tRNA がコードされている。

病原性突然変異を有する mtDNA がある一定以上の割合で細胞内に蓄積するとミトコンドリアの呼吸機能が低下し、ミトコンドリア病と総称される全身性の代謝性疾患が引き起こされることが知られている。近年では、がんや老化なども mtDNA の突然変異が関与している可能性が報告されている。また、ミトコンドリア呼吸機能低下によって引き起こされる ATP 量の低下や過剰に産生される乳酸、活性酸素種 (以下、ROS) がこれらの疾患に関与する可能性も示唆されている。ROS は電子伝達の過程で、少量の電子が複合体から漏出することにより産生される。病原性突然変異型 mtDNA が蓄積した場合に過剰産生した ROS が細胞や組織を構成する核酸や生体膜、タンパク質などに酸化ダメージを与え、疾患を誘発する可能性が報告されているが、mtDNA の突然変異が多様な疾患の原因である直接的な証拠はなく両者の因果関係は未だに解明されていない。

mtDNA の突然変異と多様な疾患とのより詳細な関係性の探索には、mtDNA に突然変異を有し、それによって病態を発症するミトコンドリア病モデルマウス (以下、mito-mice) を用いることが効果的である。所属研究室では、これまでに複数の mito-mice を作製してきた。その中の一つの mito-miceND6^M 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 をホモプラスミーで有する。特徴として、軽度な呼吸機能低下と ROS の過剰産生、加齢とともに高血糖や B 細胞リンパ腫の発生頻度の増加が見られる。このことは mito-miceND6^M が、G13997A 点突然変異を有する mtDNA をホモプラスミーで有し ROS を過剰産生するにも関わらず、加齢後の高血糖とリンパ腫以外の異常が認められていないということであり、臓器間・組織間の ROS 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暗に示唆している。

本研究では、G13997A 点突然変異を有する mtDNA をホモプラスミーで有する mito-miceND6^M において、臓器間・組織間の酸化ダメージの蓄積に差異が生じるという作業仮説を立て、この仮説を検証するために臓器間・組織間で酸化ダメージの蓄積の程度を比較検討することを目的とした。

mito-miceND6^M は mtDNA にのみ突然変異を有し、核 DNA は野生型とされている C57BL/6J (B6) 系統であるため、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た。また、それぞれの系統において 3 か月齢、12 か月齢、24 か月齢のマウスを用意し、突然変異による影響と加齢による影響の比較検討を行うこととした。

使用したマウス群

マウス	月齢
B6	3
B6	12
B6	24
mito-miceND6 ^M	3
mito-miceND6 ^M	12
mito-miceND6 ^M	24

② 酸化ダメージの解析

ROS は産生後、大部分が抗酸化物質や酵素により直ちに消去されてしまうため、臓器や組織に存在する ROS の量を測定することは極めて困難である。そこで、ROS の過剰産生で生じる臓器や組織への酸化ダメージの蓄積度を 1-メチルアデノシン (以下、m¹A) に対する免疫染色を用いて比較することとした。m¹A は tRNA に特異的な修飾核酸である。この m¹A を含む tRNA が酸化ダメージを受けることにより、立体構造が変化し、切断と分解の過程を経て m¹A 分子を放出するため、m¹A は酸化ダメージの蓄積により増加するとされている。

本研究では、上記 6 群のマウス個体を解剖し、各臓器の組織切片を用いて抗 m¹A 免疫染色を行った。

【結果】

詳細な結果については発表会にて報告予定である。

【材料・方法】

① 使用したマウス