

突然変異型 mtDNAs を有するマウスの逆遺伝学：骨格筋における表現型の解析

山本 優（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】

骨格筋を構成する筋繊維ではタンパク質の分解・合成が絶えず繰り返されており、これらを制御しているタンパク質分解経路及び合成経路のバランスによって筋繊維径が規定される。骨格筋タンパク質分解経路としては主にユビキチンプロテアソーム系及びオートファジーが知られている。一方、骨格筋タンパク質合成経路としては主にインスリンシグナル伝達経路が知られている。また、がんや飢餓、寝たきりといった状況下では、骨格筋タンパク質分解経路の促進によって骨格筋繊維の萎縮が観察される。一方、運動時には、骨格筋タンパク質合成経路の促進によって骨格筋繊維の肥大が認められる。

骨格筋を構成する筋繊維は、遅筋繊維 (Type 1) と速筋繊維 (Type 2) の2種類に大きく分けられる。Type 1は、ミトコンドリアに富んで酸素を利用した酸化的リン酸化により持久力のある収縮が可能な繊維である。一方、Type 2は、ミトコンドリアはType 1よりも比較的少なく、解糖系により瞬発力のある収縮が可能な繊維である。Type 2は、さらに2A、2X、2Bと分類され、記載順に速筋繊維の性質が強くなる。

ミトコンドリアは酸化的リン酸化によって生命活動に必要なエネルギーである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、病原性突然変異の生じたmtDNAがある一定以上の割合で蓄積すると、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。

事実、所属研究室で樹立されたマウスである大規模欠失突然変異型mtDNA (Δ mtDNA) を野生型mtDNAと共に含有するマウス (mito-mice Δ) では、ミトコンドリア呼吸機能低下に起因する心伝導障害や腎不全など、全身性の多様な病態が誘導される。また、所属研究室の先行研究で、 Δ mtDNAが80%以上の割合で蓄積したmito-mice Δ の大腿四頭筋において、筋繊維の萎縮が引き起こされることが報告された。そこで、本研究ではmtDNAに点突然変異を有するマウスにおいても、骨格筋の表現型に異常をきたすかどうかを逆遺伝学的に調べることを目的とした。今回用いたマウスは、所属研究室で樹立された呼吸酵素複合体IのサブユニットであるND6遺伝子にG13997A点突然変異をホモプラスミーで有するマウス、mito-miceND6^Mである。本マウスは、軽度な呼吸機能低下とROSの過剰産生という表現型を呈し、加齢に伴って高血糖やB細胞リンパ腫の発症頻度の増加が認められる。本研究では、このmito-miceND6^Mを用いて、骨格筋におけるミトコンドリアの機能を逆遺伝学的に解析することを目的として、実験を行った。

【材料・方法】

10カ月齢のMito-miceND6^M及び対照群として同月齢の野生型マウスを使用した。マウスより摘出した大腿四頭筋および腓腹筋をホルマリン固定の後にパラフィン包埋し、マイクロームによって横断面切片を作製した。この切片に対してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、骨格筋繊維の面積を測定した。その後、抗1-メチルアデノシン (m¹A) 抗体を用いた免疫染色と抗F4/80抗体を用いた免疫染色を行った。m¹A染色は、乳酸、活性酸素種 (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tRNAに特異的な修飾核酸である1-メチルアデノシン (m¹A) を染色することで解析する染色法である。F4/80染色は、マクロファージ表面に存在するマーカーであるF4/80を染色することで、組織内に浸潤しているマクロファージを解析する染色法である。

また、骨格筋は構造タンパクであるミオシン重鎖タンパク (myosin heavy chain, MYH) のアイソフォームが繊維タイプごとに異なるため、それぞれ抗ミオシン1抗体、抗ミオシン2A抗体、抗ミオシン2X抗体、抗ミオシン2B抗体を用いた免疫染色を行い、筋繊維をType1、Type2A、Type2X、Type2Bに分類した。さらに、大腿四頭筋及び腓腹筋のATP量の測定を行った。

【結果】

Mito-miceND6^Mの大腿四頭筋及び腓腹筋の筋繊維の横断面積は、野生型と比較して有意に萎縮していた。しかし、体重や大腿四頭筋及び腓腹筋の重量には差異はなく、ATP量も差異はなかった。一方、m¹A染色により、酸化ダメージの蓄積には差異が見られたが、骨格筋繊維によって染色の濃さが薄い箇所や濃い箇所など、疎らに染まっていることが観察された。その他の結果及び考察については、発表会において報告する。