

点突然変異型 mtDNA が骨格筋タンパク質の分解・合成に及ぼす影響の解析

松浦 佑実子 (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>

ミトコンドリアはほとんどの真核生物で見られる細胞小器官の一種であり、外膜と内膜の二重の膜からなっている。特に、内膜には電子伝達系が存在している。この電子伝達系では、呼吸酵素複合体 I～V による酸化的リン酸化によって膜間に H⁺ が輸送され、内膜を隔てて生じた濃度勾配により呼吸酵素複合体 V にあたる ATP 合成酵素が駆動し、生命活動に必要な ATP の大部分が産生される。また、ミトコンドリアマトリクス (内膜の内側) には、独自の環状二本鎖 DNA (mtDNA) が、細胞あたり数百から数千コピー含有されている。これらの mtDNA に突然変異が生じ、このような変異型 mtDNA が蓄積すると、「ミトコンドリア病」と総称される多様な疾患が発症することが知られている。さらに近年、糖尿病や個体老化、パーキンソン病やアルツハイマー病といった多様な疾患を発症した患者組織から変異型 mtDNA が見出されたことを受け、変異型 mtDNA と多様な病態との因果関係も示唆されはじめています。

哺乳類の mtDNA には、呼吸酵素複合体 II を除く複合体サブユニットの一部を構成する 13 種の構造遺伝子とその翻訳に必要な 2 種類の rRNA 及び 22 種類の tRNA の遺伝子がコードされている。呼吸酵素複合体を構成するその他のサブユニットの遺伝子は (前述の 13 種以外) は、核 DNA にコードされている。このように呼吸酵素複合体は核とミトコンドリアの両方を由来として構成されており、核 DNA と mtDNA の二重支配を受けていることから、mtDNA の変異と多様な疾患との因果関係を解析するためには、野生型の核背景をもち、mtDNA にのみ突然変異を有するモデルマウス (mito-mice) を活用ことが有効である。

所属研究室で作製された mito-mice の 1 種である mito-mice ND6^M では、慢性的な酸化ストレスの状態と骨格筋の萎縮 (筋萎縮) が確認されている。mito-mice ND6^M は、呼吸酵素複合体 I のサブユニットをコードする ND6 遺伝子上に G13997A 点突然変異を細胞内の全ての mtDNA に有する、ホモプラスミーの状態で含有している。mito-mice ND6^M の表現型として、呼吸酵素複合体 I の活性低下による軽度な呼吸機能不全、活性酸素種 (ROS) の過剰産生、加齢時の高血糖やリンパ腫の発症頻度の増加などが知られている。

骨格筋を構成する筋繊維は出生後、通常は細胞分裂により新たな筋繊維を分化させることなく、既存の筋繊維のタンパク質の分解と合成を絶えず繰り返すことで、筋繊維のサイズを制御している。このため、筋萎縮はタンパク質分解経路、及び、合成経路のバランスが崩れることで起こることが分かっている。興味深いことに、加齢による筋萎縮 (サルコペニア) や廃用性骨格筋萎縮が認められる症例において、ミトコンドリアの機能異常が観察されることが報告されている。これらのことから、変異型 mtDNA の蓄積によるミトコンドリア機能異常と筋萎縮には何らかの相関があると考えられている。

そこで本研究では、mito-mice ND6^M における骨格筋の組織をモデルとして、点突然変異型 mtDNA が骨格筋タンパク質の分解・合成経路に及ぼす影響の解析を目的とした。

<材料・方法>

1. 使用したマウス

所属研究室において樹立されている mito-mice ND6^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) 由来である。そのため、コントロールとして、核 DNA、mtDNA がともに B6 系統であるマウスを用い、各系統 10 カ月齢のマウスから摘出した大腿四頭筋を解析サンプルとした。

2. ウェスタン・ブロッティング

骨格筋タンパク質分解系、及び、合成系のマスターレギュレーターとされるタンパク質を中心にウェスタンブロット法による定量を行った。

WSE-7420 EzRIPA Lysis kit を用いて大腿四頭筋から抽出したタンパク質溶液を出発材料とした。ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、PVDF 膜にブロッティングした。室温にて 3 時間ブロッキングを行い、数回 TBS-T にて洗浄した後、1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合 2 次抗体を室温にて 1 時間反応させた。TBS-T を用いて数回洗浄後、ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて骨格筋タンパク質分解系、及び、合成系のマスターレギュレータータンパク質を検出した。

<結果>

詳細な結果については発表会にて報告予定である。