

老化ミトコンドリア原因説のマウス逆遺伝学

玉城 大敬 (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、外膜および内膜の二重膜を有し、内膜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 とは異なる独自のミトコンドリア DNA (mtDNA) を細胞あたりに数百~数千コピー有している。mtDNA には複合体 II を除くその他の複合体の一部を構成する構造遺伝子と、その翻訳に必要な rRNA および tRNA がコードされている。また、mtDNA は酸化的リン酸化反応の副産物として生じる活性酸素種による酸化ストレスに常に晒されている上、修復機構が十分でないことから突然変異が発生・蓄積しやすいと考えられている。

ミトコンドリアは老化と関連しているとする説がある。老化ミトコンドリア原因説では、加齢に伴って mtDNA に突然変異が蓄積し、その蓄積した突然変異によってミトコンドリア呼吸機能が低下することが、老化表現型を誘導する一因であるとされている。

哺乳類の mtDNA の唯一のポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ γ (PolG) には mtDNA の複製機能と校正機能が備わっている。先行研究において、PolG の校正機能のみをホモで欠損したマウス (mtDNA mutator mouse) においては、mtDNA の複製を繰り返すたび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知られている。mtDNA mutator mouse の組織では、ミトコンドリア呼吸機能の低下が見られ、老化の症状 (脱毛、生殖機能の低下、脊柱後弯、短寿命など) の表現型を呈する。このため、mtDNA mutator mouse は早老症のモデルマウスとして考えられている。

mtDNA mutator mouse 系統における PolG の遺伝子型はメンデルの法則に従うため、校正機能を欠損した変異型 PolG 遺伝子を有さない野生型のマウスと、ホモで有する上記の mtDNA mutator mouse (mut/mut マウス) の他にもヘテロで有するマウス (+/mut マウス) が生まれる。+/mut マウスにおける mtDNA への突然変異の蓄積の程度を考えると、mut/mut マウスの半分程度の蓄積が予想される。したがって、老化の症状の表現型についても同様、野生型と mut/mut マウスの中間の表現型を示すと考えられる。しかしながら、実際には+/mut マウスの表現型は野生型マウスと同等であることが知られている。つまり、+/mut マウスでは mtDNA に一定の突然変異が蓄積していると考えられるにも関わらず、老化表現型が誘導されないことになる。このように、変異型の PolG をヘテロで有する+/mut マウスでは、mtDNA への突然変異の蓄積が老化表現型の原因になるとする老化ミトコンドリア原因説と矛盾する点が生じると考えられる。そこで、これまでほとんど注目されてこなかった+/mut マウスを用いて改めて老化ミトコンドリア原因説を検証する必要があるのではないかと考えた。

前述のように、老化ミトコンドリア原因説では、mtDNA への突然変異の蓄積はミトコンドリア呼吸機能低下を誘導し、これが老化表現型を誘導するとしている。そこで本研究では、まず+/mut

マウスの呼吸活性に着目することにした。mut/mut マウスは老化表現型による影響のため、10 ヶ月齢前後で死亡することが多い。そこで、mut/mut マウスで老化表現型を最も強く観察できる 10 ヶ月齢時点における+/mut マウス、mut/mut マウス、野生型マウスの呼吸活性を比較した。その一方で、+/mut マウスは老化表現型を呈することなく 3 年近く生存する個体もいる。加齢に伴う mtDNA への突然変異の蓄積が呼吸機能低下を誘導するならば、加齢した+/mut マウスは 10 ヶ月齢時点よりも呼吸機能が低下していると考えられるため、24 ヶ月齢の+/mut マウスの呼吸活性も伏せて比較した。

【材料】

10 ヶ月齢の+/mut マウス、mut/mut マウス、野生型マウス、24 ヶ月齢の+/mut マウスの凍結組織 (腎臓、肝臓、心臓、十二指腸、骨格筋)。

【方法】

ミトコンドリア呼吸活性を評価するために、各凍結臓器から 10 μm の切片を作製し、cytochrome *c* oxidase (COX) および succinate dehydrogenase (SDH) の活性に応じて組織の細胞を染め分ける COX/SDH 染色を実施した。

【結果】

まず、10 ヶ月齢の+/mut マウス、mut/mut マウス、野生型マウスのミトコンドリア呼吸機能を COX/SDH 染色法を用いて比較した。その結果、+/mut マウスの呼吸活性は、mtDNA mutator mouse ほどではないが低下していた。

一方、24 ヶ月齢の+/mut マウスのミトコンドリア呼吸機能は、10 ヶ月齢の+/mut マウスと同程度であった。この結果より、ミトコンドリア呼吸機能の低下と mtDNA への突然変異の蓄積は相関しないことが示唆された。

【考察】

+/mut マウスでは、軽度のミトコンドリア呼吸機能低下が見られたが、老化表現型が現れている様子はない。また、加齢に伴って mtDNA に突然変異が蓄積したはずの 24 ヶ月齢の+/mut マウスと 10 ヶ月齢の+/mut マウスでは、ミトコンドリア呼吸機能に差はなく、老化表現型が強まっている様子もない。つまり、これらの結果は、加齢に伴う mtDNA への突然変異の蓄積がミトコンドリア呼吸機能低下を誘導し、これが老化表現型を誘導するという老化ミトコンドリア原因説に矛盾する可能性がある。したがって、今後は野生型、mut/mut および+/mut マウスの各組織における mtDNA の変異率の比較などを行い、今回得られた結果と照らし合わせつつ老化ミトコンドリア原因説を再検証していきたい。