

mtDNA に点突然変異を有する新規モデルマウスの加齢病態の解析

宮田 大輝 (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】

細胞小器官の一つであるミトコンドリアは、内膜に存在する呼吸酵素複合体による酸化リン酸化反応によって生体エネルギーである ATP を産生しており、生命維持に必須な役割を果たしている。ミトコンドリアは内部に核ゲノムとは独立した環状二本鎖構造のミトコンドリア DNA (mtDNA) を有しており、この mtDNA には呼吸酵素複合体の一部を構成する 13 種類の構造遺伝子およびそれらの翻訳に必要な 2 種類の rRNA 遺伝子、22 種類の tRNA 遺伝子がコードされている。

mtDNA は 1 細胞あたり数百から数千コピー存在するが、病原性突然変異型 mtDNA が高率に蓄積すると、ミトコンドリア呼吸機能の低下を介して、ミトコンドリア病と総称される神経症状や筋症状を主訴とした全身性の代謝疾患が引き起こされる。

これまでに、mtDNA に生じる病原性突然変異は多数同定されてきた。mtDNA にコードされている遺伝子は全てが呼吸機能に関係するものであるため、mtDNA の病原性突然変異は例外なく、ミトコンドリア呼吸機能の低下を引き起こす。ところが興味深いことに、実際に患者において発現する病態は、原因となった mtDNA 突然変異の種類ごとに一定の型があることが知られている。ミトコンドリア呼吸機能の低下という共通の一次現象が、多様な病態に結びつく機構はわかっていない。このような mtDNA 変異種特異的な病態形成機構を解明する為には、多様な病原性突然変異型 mtDNA を有するモデルマウスを樹立し、それらの病態解析を通じてそれぞれの突然変異に特有な病態が発現する仕組みを検証することが有効な研究戦略である。

mtDNA の遺伝子操作技術は確立されておらず、特定の変異型 mtDNA を人為的に導入したモデルマウスの作製は困難であったが、所属研究室では天然に存在していたわずかな突然変異型 mtDNA を濃縮し、細胞質移植の技術を駆使する事で mtDNA に突然変異を有するモデルマウスを複数樹立することに成功している。そこで私は所属研究室で新たに作製された、mtDNA の tRNA 遺伝子領域に点突然変異を有するモデルマウスに着目した。当該モデルマウスと相同な突然変異は、ヒトにおいて病原性突然変異として報告されており、ミオパチーや筋力低下を始めとする筋障害や高乳酸血症および呼吸酵素複合体 I の活性低下の原因となることが明らかにされている。当該モデルマウスを用いて、若齢期 (3 ヶ月齢) および成熟期 (10 ヶ月齢) における病態解析が先行して行われており、成熟期において血中乳酸値の上昇、脳および肝臓での呼吸酵素複合体 I の活性低下など、臨床初見と一致する病態が確認されている。しかし、樹立されて間もないモデルマウスであるため、老齢個体のマウスコロニーは現在準備中であり、10 ヶ月齢を超えた病態解析は行われておらず、成熟期から老齢期にかけての病態変化は未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、当該モデルマウスの加齢病態の解析に先立ち、モデルマウスの作製過程で得られたキメラマウスの老齢個体の病態解析を行う事によって、tRNA 遺伝子領域の点突然変異を原因とする病態について、加齢の影響を予備的に検証した。

【方法】

当該モデルマウスは、突然変異型 mtDNA を野生型 mtDNA と同一細胞内で混在したヘテロプラスミー状態で有している。また、本研究に用いるキメラマウスは、当該変異をヘテロプラスミーで有する ES 細胞を野生型マウス胚に導入して得られたものであるため、野生型 mtDNA のみを有する細胞と変異型 mtDNA をヘテロプラスミーで有する細胞が全身にキメラ状に分布している。このため、変異型 mtDNA の含有率は個体ごと、また組織ごとに異なる。本研究では、キメラマウスの尾より抽出した DNA を用いて算出した変異型 mtDNA の含有率と月齢により表のようにキメラマウスの個体群を以下の 4 群に群分けした。

月齢	若齢 (6 ヶ月齢)		老齢 (20 ヶ月齢)	
	% low (< 10%)	% high (> 70%)	% low (< 10%)	% high (> 70%)
変異 mtDNA 含有率				

(1) 血中乳酸値の測定

ミトコンドリアの機能低下は一般に解糖系の亢進を誘導し、副産物として生じる乳酸が血中に放出されるため、血中乳酸値の上昇の原因となる。そこで、キメラマウスにおけるミトコンドリアの呼吸機能低下の有無を確認するための指標として、定常時の血中乳酸値を測定した。

(2) 各臓器における変異型 mtDNA の検出

キメラマウスより主要な組織を摘出し、DNA を抽出した。これらの DNA を用いて、PCR-RFLP 法により各組織における目的の病原性突然変異型 mtDNA の含有率を定量した。

(3) Blue Native-PAGE による呼吸酵素複合体の存在量および活性の検証

各臓器よりミトコンドリア画分を抽出し、Blue Native-PAGE により呼吸酵素複合体 I の活性および各呼吸酵素複合体の存在量を定量することで、臓器ごとのミトコンドリア機能を検証した。

【結果】

詳細な結果については発表会にて報告予定である。