

## 生体内におけるオートファジーの誘導に関する基礎研究

高木 純輝 (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】

細胞小器官の一種であるミトコンドリアは、外膜及び内膜の二重膜を有し、内膜には存在する呼吸酵素複合体 I ~ V が存在している。呼吸酵素複合体は、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。この ATP の産生の過程では、電子伝達系から漏出した電子により活性酸素 (ROS) が産生されることが知られている。また、ミトコンドリアは独自の DNA である、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を有しており、哺乳類では、細胞当たり数百~数千コピー含有されている。

mtDNA には呼吸酵素複合体 II を除く、呼吸酵素複合体 I、III、IV、V を構成する 13 種類の構造遺伝子と、それらの翻訳に必要な 2 種類の rRNA 遺伝子と 22 種類の tRNA 遺伝子がコードされている。また、mtDNA は、ROS による酸化ストレスに常にさらされており、突然変異が発生・蓄積しやすいと考えられている。そして、病原性突然変異型 mtDNA が細胞内に蓄積すると、ミトコンドリアの呼吸機能低下 (ATP 産生不全) が誘導され、ミトコンドリア病をはじめとする様々な疾患群が引き起こされる。

したがって、細胞や生態が恒常性を保つためには機能的なミトコンドリアを維持し、機能不全のミトコンドリアを分解する品質管理機構が重要である。このような品質管理機構として、オートファジーと呼ばれる分解系がある。オートファジーは従来、非選択的であると考えられていた。しかし近年、ミトコンドリアを選択的に分解するオートファジーであるマイトファジーという現象が細胞内の余剰なミトコンドリアや、機能が低下した異常なミトコンドリアを選択的に分解し、ミトコンドリアのターンオーバーを促進する可能性が報告されている。マイトファジーの異常はがんやパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患・代謝性疾患など幅広い疾患や、老化の原因の一つになると考えられている。また、新たな薬剤の標的としても多くの研究がされている。

しかし、マイトファジーに関する実験系の多くは、マイトファジー関連遺伝子とされている Parkin や PINK1 を過剰発現させた細胞を用い、かつ脱分極剤によってミトコンドリア膜電位を強制的に低下させるといった、非生理的条件下で検証を行っている。そのため、生理的条件下において、マイトファジーやオートファジーがミトコンドリアの機能維持にどの程度寄与しているのかについては、いまだに不明な点が多い。

そこで本研究では、ミトコンドリアの品質管理機構への依存度が野生型マウスと比べて高いと想定される、ミトコンドリア病モデルマウスを用いることで、マイトファジーおよびオートファジーが、生理的条件下で実際にどの程度の頻度で誘導されていて、それらが呼吸機能の低下とどの程度相関しているのかを明らかにすることを目的とした。

## 【材料】

オートファジーを可視化できるマウスとして、オートファジーマーカーである LC3 に GFP を結合させた GFP-LC3

を全身で発現する GFP-LC3 マウスを、東京大学の水島昇教授より分与して頂いた。本実験では、呼吸機能が正常なコントロールとして GFP-LC3 マウスを、ミトコンドリア病モデルマウスとして大規模欠失突然変異型 mtDNA ( $\Delta$ mtDNA) を全身に有する mito-mice $\Delta$  を GFP-LC3 マウスと交配して得られた GFP-LC3/mito-mice $\Delta$  を用い、それぞれ 7-9 カ月齢時点で採材した心臓を解析対象とした。GFP-LC3/mito-mice $\Delta$  においては、 $\Delta$ mtDNA の含有率が 70% を超えると急速に呼吸機能の低下が誘導されることがわかっている。そこで、 $\Delta$ mtDNA 含有率が 30-69% までの個体を  $\Delta$ low 群、70% 以上の個体を  $\Delta$ high 群としてコントロールと併せて 3 群に分けて検証を行った。

## 【方法】

各群のマウスから摘出した心臓を 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で一晩浸漬固定した後に、10%、20%、30% の Sucrose 溶液に順次置換し、Tissue-tek O.C.T. compound に包埋して -80°C で保存した。この凍結組織から 10  $\mu$ m 厚の切片を作製し、TBS-T で洗浄、5% BSA でブロッキングを行った後に抗 Tom20 抗体 (sc11415, SantaCruz) を 4°C で一晩反応させた。翌日、TBS-T 洗浄後に抗ウサギ IgG-Alexa594 抗体 (A-11012, Invitrogen) を 4°C で一晩反応させた。翌日 TBS-T で洗浄後、1  $\mu$ g/mL の DAPI で核を染色し、PLUS Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories) で封入し、共焦点顕微鏡 (LSM700, Zeiss) で観察した。

各群のオートファジーの誘導については、抗 LC3 抗体 (PM036, MBL) を用いた Western blot によっても検証した。

また、呼吸機能を調べるために免疫染色を施した切片の隣接切片を用いて COX 染色を行った。pH5.5 に調整した COX 染色液 (0.1 M acetate buffer, 2 mg/mL DAB, 0.1% MnCl<sub>2</sub>, 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) に切片を 45 分浸漬し、直ちに生物顕微鏡 (DMRE, Leica) で観察した。

## 【結果】

呼吸機能の低下が起こる  $\Delta$ high 群では、オートファジーおよびマイトファジーの頻度が他の 2 群よりも増加することが確認された。しかし、増加していた  $\Delta$ high 群であってもマイトファジーの頻度は 1 核あたり 0.35 個程度と決して多くはなかった。これらは、従来の Parkin や PINK1 の強制発現細胞や脱分極剤を用いて検証されてきたマイトファジーの頻度と比べると圧倒的に低く、生理的条件下においてマイトファジーが強力に誘導されることはほとんどないのではないかと考えられる。

なお、各細胞の呼吸機能とオートファジーやマイトファジーの頻度の検証結果については、報告会で述べる。