

## ミトコンドリア病 MELAS のモデルマウスの作出に向けた基礎研究

永田 留理 (筑波大学 生物学類) 指導教員：中野 賢太郎 (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、呼吸酵素複合体による酸化的リン酸化によって ATP を合成する。ミトコンドリアは独自の環状二本鎖 DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) を有しており、一つの細胞内に数百から数千コピー存在するとされる。mtDNA は、呼吸酵素複合体の一部のサブユニットを構成する構造遺伝子 13 種類と、その翻訳に必要な 22 種類の tRNA 遺伝子、2 種類の rRNA 遺伝子をコードしている。

mtDNA に病原性突然変異が生じ、それが高い割合で蓄積すると、ミトコンドリア呼吸機能が低下し、ミトコンドリア病と呼ばれる疾患群を発症することが知られている。ミトコンドリア病の発症原因となる mtDNA の突然変異は多数同定されており、いずれの病原性突然変異によってもミトコンドリア呼吸機能が低下する。しかし、その分子種ごとに生じる病態は様々であり、そのような多様な病態が発病する分子機構は明らかにされていない。

MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) と呼ばれる病型は、ミトコンドリア病の中でも発症頻度が高く、脳卒中様の症状を特徴とする。また、MELAS は主にヒト mtDNA *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* に生じる点突然変異が原因で発症し、患者の約 80% で、当遺伝子領域内の 3243 位において A>G 点突然変異が検出されている。このような MELAS であるが、ミトコンドリア呼吸機能が低下することで生じる病態の分子的な発症メカニズムは未解明であり、治療法も確立されていない。MELAS に関する研究を進めるには、ヒト mtDNA A3243G 点突然変異と相同な、マウス mtDNA A2689G 点突然変異を有するモデルマウスを作製することが有効である。

マウス mtDNA A2689G 点突然変異を有するモデルマウスを作製するためには、同変異を高率で有する培養細胞を得ることが必要である。しかし、mtDNA は核 DNA に比べコピー数が非常に多く、また、核には核膜孔が存在し細胞分裂時に核膜が消失するのに対しミトコンドリアは完全な脂質二重層で囲まれている。さらに、核 DNA に比べて mtDNA は損傷修復機構が乏しい。これらの特徴から、mtDNA は外部からの遺伝子操作が困難である。そこで本研究では、天然に生じたマウス mtDNA A2689G 点突然変異を低率で有する細胞から、同変異を高率で有する培養細胞を作製することとした。

### 【材料】

先行研究において、核 DNA にコードされている mtDNA 唯一の複製酵素である Polymerase  $\gamma$  (PolG) の Exonuclease 活性だけを欠損させたマウスの血小板と、mtDNA 欠損マウス培養細胞 ( $\rho^0$ B82 細胞) を融合することで、B82mtPolG<sup>mut/mut</sup>細胞が得られている。mtDNA の塩基配列解析の結果、この細胞には、A2689G 点突然変異が極めて低率 (2/19201 分子、約 0.01%) に含まれていることがわかっている。本研究では、この B82mtPolG<sup>mut/mut</sup>細胞を出発材料とした。

### 【方法】

変異型 mtDNA の Bottleneck 効果による濃縮により、変異型 mtDNA を高率でも培養細胞を得ることを試みた (図 1)。B82mtPolG<sup>mut/mut</sup>細胞に、mtDNA の複製阻害剤として知られるエチジウムブロマイドを 30  $\mu$ g/mL で 24 時間作用させ、回復を 24 時間行った後、シングルセルクローニングを行った。また、得られたクローンをを用いて同様の方法でリクローニングを繰り返した。各クローンの変異率は、A2689G 変異箇所を含む領域を PCR で増幅後に、制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism) によって変異の有無を検証する PCR-RFLP 法によって判断した。

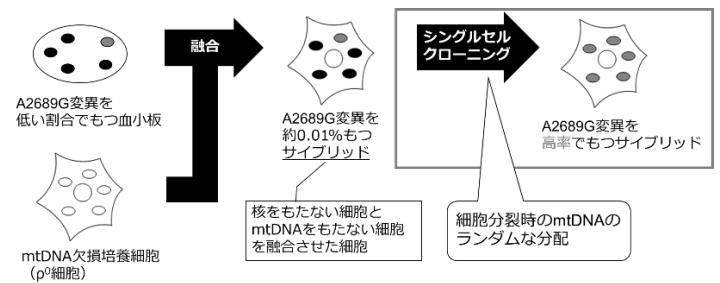


図 1. mtDNA A2689G 点変異を高率で有する培養細胞の作製計画

### 【結果】

発表会にて報告予定である。

### 【今後の展望】

マウス mtDNA A2689G 変異を有する培養細胞のリクローニングを今後も継続し、変異率を上げたいと考えている。同変異を十分に高い割合で有する培養細胞を得られたら、当該クローンを脱核して得られた細胞質体を、mtDNA を消失させたマウス ES 細胞と融合することでマウス mtDNA A2689G 変異を高率で有する ES 細胞を作製し、目的のモデルマウスを作出するための材料としたい。