

## モデルマウスを用いた早期老化と組織特異的な細胞死に関する研究

森 優貴 (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】

ミトコンドリアは、ほぼすべての真核生物の細胞に存在する細胞小器官で、酸化的リン酸化 (ミトコンドリア呼吸) によって生体内で必要とされる ATP の大部分を産生している。ミトコンドリアは核 DNA とは異なる独自のゲノムである環状二本鎖構造のミトコンドリア DNA (mtDNA) を 1 細胞当たり数百から数千コピー有し、哺乳類の mtDNA には呼吸酵素複合体のサブユニットの一部の遺伝子やその翻訳に必要な rRNA、tRNA がコードされている。mtDNA はミトコンドリア呼吸の過程で生じる活性酸素種 (ROS) にさらされていることなどにより、核 DNA よりも突然変異が蓄積しやすいとされている。

ミトコンドリアは ATP 産生以外にも多くの生体機能に深くかかわっている。その 1 つとして、アポトーシスへの関与があげられる。

アポトーシスは代表的なプログラム細胞死として知られており、大きく分けて 2 種類の経路が存在している。損傷を受けた細胞などで働く内因性経路と細胞外からデスシグナルを受容した細胞で働く外因性経路である。これら 2 つの経路を通じた細胞死は最終的に実行型カスパーゼの活性化により細胞や DNA の断片化が引き起こされるという共通の結末を迎える。内因性経路ではミトコンドリアが直接はたらいいて、かつ 2 つの経路にはクロストークの関係があり外因性経路にもミトコンドリアが関わっていることから、アポトーシスにおいてミトコンドリアは非常に重要な役割を担っているといえる。

アポトーシスは発生過程における正常な形態形成に不可欠であるほか、品質や機能が低下した細胞を除去するためにも誘導される。加齢に伴う組織の機能不全の原因の 1 つとして、品質が低下した細胞のアポトーシスによる細胞死があげられている。細胞死とは別に、ミトコンドリアの機能低下もまた、老化の一因と考えられており、これを立証するモデルとして mtDNA mutator mice が樹立されている。mtDNA mutator mice は、核 DNA にコードされた polymerase  $\gamma$  (POLG) という mtDNA 唯一の複製酵素の校正機能のみを欠損させたマウスであり、複製のたびに mtDNA にランダムな突然変異が蓄積していくとされている。このマウスでは、加齢に伴う mtDNA への突然変異の蓄積に伴って組織の呼吸機能が低下することや、細胞死の頻度が上昇することが報告されている。このため、mtDNA への突然変異の蓄積がミトコンドリアの機能低下を招き、これが細胞死を引き起こして老化の原因となっていることが示唆されているが、これらの間に実際に因果関係があるのか、あるいは単なる並行現象なのか、詳しいことはよくわかっていない。

そこで、本研究ではミトコンドリアの品質や機能の低下とアポトーシス、そして老化表現型の関連性を考察するため、mtDNA mutator mice におけるアポトーシス細胞数を野生型と比較して、組織間やマウス間の違いを検討し、先行研究で得られているミトコンドリア呼吸活性の低下の程度との相関を明らかにすること目的とした。

### 【材料】

mtDNA mutator mice は核 DNA にコードされた遺伝子に変異を有するマウスであるため、遺伝子型として野生型ホモ (+/+ )、ヘテロ (+/mut)、変異型ホモ (mut/mut) の 3 種類が存在する。本研究では、mtDNA mutator mice が早期老化症状を示す 8-10 か月齢時点における POLG +/+マウス、POLG +/mut マウス、POLG mut/mut マウスから摘出した肝臓、腎臓、心臓、脳を用いた。

### 【方法】

各マウスから摘出した組織をパラフィンに包埋し、そこから厚さ 10  $\mu\text{m}$  の切片をスライドガラス上に作製した。それらの切片を用いて、アポトーシス後期に観察される断片化された DNA を検出できる TUNEL 染色を実施し、アポトーシス細胞核数を計測した。同時にアポトーシスを起こしていない正常な細胞核を 1% Methyl Green によって染色し、単位正常細胞核数あたりのアポトーシス細胞核数を算出することで、各組織間および各遺伝子型間でのアポトーシス頻度の比較を行った。

### 【結果】

POLG mut/mut マウスにおける POLG +/+マウスと比較したアポトーシス細胞核数の増加の程度は組織ごとに違いが生じていた。POLG +/mut マウスとの比較を含めた詳細な結果は発表会当日に報告する。

### 【展望】

さらに多くの臓器を採材し、ミトコンドリア呼吸活性の低下との相関の有無をより深く検証したい。また、ミトコンドリアの呼吸機能とアポトーシスの関係をより直接的に研究する目的で、ミトコンドリアの呼吸機能に基づいた活性染色が可能な凍結切片を用いた検証も検討したい。ミトコンドリアの呼吸活性と TUNEL 染色を同一切片上で実施できれば、実際にミトコンドリアの機能低下が起きている細胞で細胞死が誘導されているか否かを直接的に検証できるからである。こうした検証を実施することで、ミトコンドリアの呼吸機能と細胞死、ひいては老化表現型との関係性の理解につなげたいと考えている。