

マウス卵母細胞から変異型ミトコンドリア DNA が消失する機構の検証

佐々木 悠馬（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】

細胞内小器官の一つであるミトコンドリアは、内部にミトコンドリア DNA、通称 mtDNA と呼ばれる核 DNA とは異なる独自の DNA を有している。哺乳類では、mtDNA は体細胞で数百～数千コピー、成熟した卵で十万コピーほど存在するといわれている。また、mtDNA はミトコンドリアの呼吸機能に関係する遺伝子をコードしているため、病原性突然変異が生じた mtDNA が蓄積した場合、ミトコンドリアの呼吸機能が低下し、ミトコンドリア病を発症することが知られている。

ミトコンドリア病の原因となる病原性突然変異の一種として、大規模欠失型突然変異がある。この欠失によって mtDNA 全長の約 1/3 が抜け落ちて短くなった mtDNA を Δ mtDNA と呼んでいる。所属研究室では、ヒトの Δ mtDNA とほぼ同じ領域を欠失したマウス Δ mtDNA を有するミトコンドリア病モデルマウスの樹立に成功しており、このマウスを Mito-mice Δ と呼んでいる。Mito-mice Δ は野生型 mtDNA と Δ mtDNA の両方を有しており、 Δ mtDNA の割合はマウスの個体ごとだけでなく、単一個体の臓器や細胞ごとにも異なる。

Mito-mice Δ では、 Δ mtDNA が母親から仔へ遺伝するため、系統維持することが可能である。雌の Δ mtDNA の割合が低すぎると、 Δ mtDNA はほとんど次世代に受け継がれず、高すぎると不妊になる。そのため、 Δ mtDNA の割合が 10～30%程度の雌を野生型の雄と交配させることで Mito-mice Δ の系統維持を行なっている。この系統維持を通じ、「母親が若齢のときには、 Δ mtDNA を様々な割合で有する仔が得られるのに対して、母親が加齢すると、 Δ mtDNA が仔に伝わらなくなる」という現象が明らかになっている。

そこで、本研究では、「いつ Δ mtDNA が消失するのか」を検証した。この問いに関しては、「仔に Δ mtDNA が伝わらなくなる月齢はいつか（個体レベル）」と、「 Δ mtDNA が消失する卵胞のステージはいつか（細胞レベル）」という 2 つの意味合いがある。個体レベルの「いつ」に関して、先行研究により、「母親が 6 ヶ月齢を超えると、仔に Δ mtDNA がほとんど伝達されない」ということが明らかになっている。細胞レベルのいつに関して、卵が Δ mtDNA を含んでいる場合、①卵が排卵されない②受精できない③発生過程で致死に至るという 3 つの仮説が立てられるが、「母親が加齢しても、産仔数の減少はみられない」ため、②と③の仮説は棄却される。したがって、①の仮説を検証するため、排卵に至るまでの卵の形成過程に焦点を当てて解析した。

【方法】

・卵巣を用いた組織学的解析

野生型マウスと 10～30%の割合で Δ mtDNA を有する Mito-mice Δ の雌から、2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月時点で卵巣を採取し、連続切片を作製した。それらの切片に対してヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を行い、卵巣の中心付近 260 μ m の範囲に含まれる原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞の数をカウントした。

・単一卵母細胞における Δ mtDNA の定量

生殖系列の細胞のみが GFP 陽性になる Stella-GFP マウスを、京都大学の斎藤通紀教授より提供して頂き、Mito-mice Δ の雌と交配させた。得られた産仔のうち、10～30%の割合で Δ mtDNA を有する雌に対して、様々な月齢で過排卵処理を行い、排卵した卵と、卵巣中に含まれる様々な発達段階の GFP 陽性卵母細胞を、顕微鏡下ハンドピックにより採取した。採取した卵と卵母細胞に含まれる Δ mtDNA の割合を定量した。

【結果・考察】

詳細な結果と考察については発表会にて報告する予定である。