

Laboratory Investigation

Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index

Masaki Uematsu^{1,4}, Ikuroh Ohsawa¹, Toshiyuki Aokage¹, Kiyomi Nishimaki¹, Kouji Matsumoto², Hiroshi Takahashi³, Sadamitsu Asoh¹, Akira Teramoto⁴ and Shigeo Ohta¹

¹Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Development and Aging Sciences, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, Kawasaki, Japan; ²Departments of Pathology; ³Neurosurgery, Second Hospital of Nippon Medical School, Kawasaki, Japan; ⁴Department of Neurosurgery, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

Key words: glioma, MIB-1 index, prognosis, survivin, tumor marker

Summary

Objective: Survivin has been identified as a protein expressed in cancer cells and a member of the inhibitor-of-apoptosis protein family. Recent studies suggest that the expression of survivin increases during the G2/M phase of the cell cycle, and may be used in clinical prognosis. We examined whether survivin expression in human gliomas would be a correlative of prognosis.

Methods: We prepared polyclonal anti-survivin serum to establish a survivin index for stained sections, using an immunohistochemical procedure, according to the method used for scoring MIB-1 index, and then stained 29 paraffin-embedded sections from surgical specimens of 29 patients who were classified into three grades of World Health Organization with the mean age of low grade astrocytoma (grade II) being 34.7; anaplastic astrocytoma (grade III), 48.8; and glioblastoma multiform (grade IV), 58.4.

Results: On staining with the anti-survivin antiserum, all specimens contained positive cells, but the survivin index was heterogeneous among grades. The mean percentage of immunoreactive cells in each specimen was 70.0% (SD 18.2%) in grade II, 81.3% (16.5%) in grade III, and 85.0% (13.6%) in grade IV. Then we compared the survivin index to the MIB-1 index and found that in low-grade gliomas (grade II and III), the difference in survival times between the high and low survivin indexes was significant ($P = 0.007$), whereas that between the high and low MIB-1 indexes was not significant ($P = 0.092$).

Conclusion: Survivin is more sensitive marker than MIB-1 for the evaluation of low-grade gliomas in that it helps to predict patient survival. Much larger glioma patient series are needed to validate the findings of our limited study.

Introduction

Glioma, the most common neoplasm in the human brain, includes tumors derived from astrocytes, oligodendrocytes, ependyma, and choroid plexus epithelium. Gliomas are histologically divided into four grades according to World Health Organization (WHO) guidelines. High grade glioma, GBM (glioblastoma multiform; grade IV), has the worst prognosis with a median survival time of about 12 months, even after surgical resection, radiation therapy, and chemotherapy. Of lower grade gliomas, patients with anaplastic astrocytoma (grade III) have an average survival of 3 years, whereas patients with low grade astrocytoma (grade II) have a better prognosis, with at least 5 years median survival [1]. However, the outcome for patients with anaplastic and low grade astrocytoma is highly variable [2,3]. A significant number of patients rapidly develop malignant glioma [4,5]. It has been reported that the proportion of tumor cells with abnormal p53 immunoreactivity increases in astrocytomas as they undergo malignant progression [6,7]. Thus, an accurate diagnosis is important from both clinical and experimental perspectives.

To date a number of methods for predicting the prognostic subgroups of glioma patients have been described [2,3]. One of the methods, the immunohistochemical determination of proliferative activity with the monoclonal antibody MIB-1 against Ki-67, which is a nuclear antigen, has been widely demonstrated to be clinically useful in distinguishing the biologic behavior of many tumors [5,8]. However, conflicting results from the utilization of Ki-67 as a prognostic marker for glioma especially for low grade glioma, have been reported [9–11].

Survivin is a member of the inhibitor-of-apoptosis protein (IAP) family and has been implicated in both the inhibition of apoptosis and regulation of mitosis [12,13]. IAPs are characterized by the presence of one to three baculovirus inhibitor apoptotic protein repeat domains, which often function as an inhibitor of the cell death process. The survivin gene is of the telomeric position on chromosome 17, to band q25 and its expression is determined in the developing embryo and in rapidly dividing cells including many human cancers [14,15]. Previous studies demonstrated that survivin is expressed at G2/M in a cell-cycle dependent manner and associated with kinetochores of metaphase chromosomes and

the central spindle midzone at anaphase, suggesting that survivin participates as a chromosomal passenger protein in cleavage furrow formation [13,16]. *In vitro*, it bound polymerized microtubules and a putative tubulin-binding domain was identified by mutational analysis. Forced expression of survivin counteracted cell death induced by various apoptotic stimuli, whereas interference with the expression or function of survivin by a dominant negative form or antisense of survivin caused spontaneous apoptosis and multiple cell division defects, suggesting that survivin acts both as a mitotic regulator and as a cytoprotective factor at cell division [16,17].

Overexpression of survivin has been observed in most human cancers including glioma by analysis of its mRNA and/or protein, whereas a low level of survivin expression is detected in normal tissues [18,19]. Recently, Chakravarti et al. has reported that the quantitative determination of survivin by Western blot analysis is useful for prognosis in human glioma [20]. However, in their study, survivin was not detected in 36% of gliomas. Thus, the aim of this study was to evaluate the histological determination of survivin with a sensitive anti-survivin anti-serum in a consecutive series of low- and high-grade gliomas to assess the prognostic significance of survivin expression. We here demonstrated that all gliomas expressed survivin and that the percentage of immunoreactive cells (survivin index) had a strong reverse association with survival time of patients. In particular, the survivin index correlated with patient survival in low grade gliomas.

Materials and methods

Cell culture

Human fibroblast, SK-N-SH (human neuroblastoma), HeLa (human uterin cervix epitheloid carcinoma), SNB-19 (human glioblastoma), FDCP-1 (mouse bonemarrow), and CHO K-1 (Chinese hamster ovary) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's F12 (Life Technologies, Rockville, MD, USA) containing 10% fetal bovine serum with penicillin-streptomycin. Jurkat (human T cell leukemia) cells were cultured in RPMI1640 (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum with penicillin-streptomycin. Free from microbiological contamination was confirmed with PCR procedure (Takara, Tokyo, Japan).

Antiserum preparation

Survivin cDNA was obtained from SK-N-SH by the reverse transcription-PCR method with a pair of primers, 5'-NNGAATTCAATCCATGGCA GCCAGCTG and 5'-NNGAATTCAATGGGTG CCCCAGCGTTG (N means any of the four nucleotides). On digestion with *EcoRI*, the resultant fragment was inserted into pProEx3 GST (Life Technologies) and sequenced to confirm accurate the full-length survivin cDNA. Overexpression and purification of a fusion protein of

survivin with glutathione S-transferase (GST) in *Escherichia coli* were performed by a method described previously [21]. Rabbits were immunized with the purified protein with Freund's adjuvant of a mixture of 1:1 (Life Technologies).

Western blot analysis

Total cell lysates were separated on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto poly-vinyl difluoride membrane (NEN, Boston, MA, USA). The membrane was blocked with 10% fetal bovine serum in Tris buffered saline (TBS) for 1 h, and then incubated with diluted anti-survivin antiserum in TBS with 0.2% Tween-20 (TBS-T) at 4 °C overnight. After a wash with TBS-T, the membrane was incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG (Cappel, Aurora, OH, USA) and specific bands were visualized with AttoPhos substrate (Roche, Mannheim, Germany).

Immunocytochemistry

HeLa and human fibroblast cells were cultured on 4-well plastic dishes (SonicSeal slide, Nalge Nunc, Rochester, NY, USA). The cells were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS. After a wash with PBS, the cells were incubated 30 min in 0.2% Triton X-100, 30 min in a blocking buffer (3% bovine serum albumin and 3% goat serum in PBS), and overnight at 4 °C in a blocking buffer containing anti-survivin antiserum (1:250). After another wash with PBS, the cells were incubated in a blocking buffer containing BODIPY FL goat anti-mouse IgG (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 1 h and imaged with a confocal scanning microscope, the FLUOROVIEW FV/300 (Olympus, Tokyo, Japan).

Tissue processing and clinical data

There were 37 gliomas from 1994 to 2001 and 29 of these were suitable for this analysis. We prepared glioma samples from 29 patients [17 males and 12 females, age from 6 to 80 (mean 45.4) at the time of diagnosis; Table 1] who were operated with craniotomy, excepted biopsy, with informed consent. The samples were selectively collected from center zone of the tumor, quickly frozen, kept at -80 °C until used, fixed with formalin, and embedded in paraffin. Sections (4 µm) were used for immunohistochemistry and the classification of grades according to WHO guidelines diagnosed by two or more pathologists and neurosurgeons. Clinical data were obtained from the hospital records including age, sex, and survival time from the initial operation. Follow-up was available for all patients.

Immunohistochemistry

For immunostaining with anti-survivin antiserum, the 4-µm sections were stained using the Ventana NexES

Table 1. Characteristics in glioma patients^a

No.	Age	Sex	WHO grade	MIB-1 index (%)	Survivin index (%)	Resection	Location	Depth	Survival days ^b	Out-come
1	30	male	2	5	85	subtotal	Temporal	sup ^d	2618	alive
2	40	female	2	5	75	total	Frontal	sup	2280	alive
3	10	male	2	n.d. ^c	65	total	Cerebellum	sup	2268	alive
4	26	female	2	5	65	total	Frontal	deep	2025	alive
5	27	female	2	25	80	subtotal	Pons	deep	246	dead
6	45	male	2	0	45	total	Frontal	deep	1550	alive
7	55	male	2	10	95	total	Frontal	deep	777	dead
8	29	male	2	n.d.	40	total	Pariental	sup	212	dead
9	50	male	2	5	80	subtotal	Frontal	deep	62	dead
10	46	male	3	5	65	subtotal	Frontal	deep	1505	alive
11	12	female	3	15	90	total	Frontal	deep	825	dead
12	6	female	3	35	90	subtotal	Pons	deep	150	dead
13	64	male	3	n.d.	85	subtotal	Frontal	sup	636	dead
14	64	male	3	0	85	subtotal	Frontal	deep	438	dead
15	21	male	3	5	35	total	Pons	deep	1173	dead
16	58	male	3	n.d.	95	subtotal	Frontal	deep	220	dead
17	23	male	3	15	85	total	Frontal	deep	425	alive
18	69	male	3	20	95	subtotal	Temporal	deep	336	dead
19	74	female	3	5	80	subtotal	Pariental	sup	102	alive
20	54	female	3	5	85	subtotal	Pariental	deep	180	dead
21	46	male	3	5	85	total	Frontal	deep	415	dead
22	54	male	4	n.d.	55	subtotal	Frontal	deep	374	dead
23	31	male	4	n.d.	80	subtotal	Frontal	deep	118	dead
24	78	male	4	n.d.	95	subtotal	Frontal	sup	47	dead
25	54	female	4	20	100	total	Occipital	sup	247	dead
26	80	female	4	55	90	subtotal	Frontal	deep	48	dead
27	79	female	4	55	90	subtotal	Frontal	deep	422	dead
28	11	female	4	n.d.	85	total	Cerebellum	sup	115	dead
29	80	female	4	55	85	subtotal	Frontal	sup	127	dead

^aAll samples were resected with craniotomy, excepted biopsy samples. ^bSurvival days are from the first operation. ^cNot determined. ^dSuperficial.

Staining System (Ventana, Tucson, AZ, USA) and all products without the anti-survivin antiserum needed for subsequent steps were supplied by the manufacture (Ventana). Sections were deparaffinized and heated with CC1 solution (denature buffer; Ventana) for 1 h. After 32-min incubation at 37 °C with the anti-survivin antiserum (1:250), sections were further incubated for another 10 min at 37 °C with a secondary biotinylated antibody and then with avidin-peroxidase for another 10 min; 3', 3-diaminobenzidine was used as the chromogen. Slides were counterstained in Mayer hematoxylin, dehydrated, and mounted. Immunostaining with MIB-1 (1:50 dilution, Immunotech, Westbrook, ME, USA) for detection of Ki-67 antigen was performed as described previously [4,22]. Stained sections were observed under the microscope. Survivin and MIB-1 indexes were determined as the percentage of immunostained cells per 200 cells × 5 fields per section.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Stat View for Macintosh Version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The survivin index, the MIB-1 index, and survival times were subjected to linear regression analysis. Survival was plotted, and survival time was estimated by the Kaplan-Meier method. The survival times and the strength of associations between categories were

compared with the log-rank test (Mantel-Cox) for univariate analysis. For multivariate analysis, tumor location (temporal, frontal, pariental, occipital, pons or cerebellum), depth (deep or superficial), age (young ≤ 20 year-old, 20 < middle < 65, or 65 ≤ old), survivin index (higher 17 samples, or lower 12 samples), and MIB-1 index (higher 10 samples or lower 11 samples) were compared with survival times. A *P* < 0.05 was considered significant.

Results

Antisera specific to the survivin protein

To examine the expression of survivin in patients immunohistochemically, rabbit antisera were raised against GST-survivin fusion protein. The diluted sera (1:10000) specifically stained only major 16.5-kDa and minor 14-kDa bands in Western blots of 3 μg total cell lysate from cultured GBM, SNB-19 (Figure 1a, Lane 1–2). A 16.5-kDa specific band of survivin was also detected in Western blots of 1 μg lysate from other cultured cells (Figure 1a, Lane 3–5). Immunocytochemical staining of HeLa cells with the obtained antiserum revealed that survivin immunoreactivity was associated with the centrosome, mitotic spindle and midbody (Figure 1b), as previously described [13,16,17].

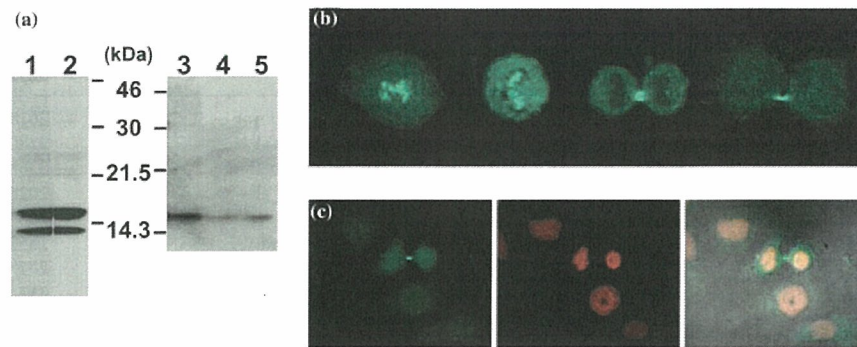


Figure 1. Characterization of anti-survivin antiserum. (a) Western blotting analysis for survivin in each cell lysate from SNB-19 (glioma, Lane 1 and 2), FDCP-1 (mouse bone marrow, Lane 3), Jurkat (Lane 4), and CHO K-1 (Chinese hamster ovary, Lane 5). Three μg per lane (Lane 1 and 2) or 1 μg per lane (Lane 3–5) of lysate was subjected and stained with 1:5000 diluted sera (Lane 1, 3–5) or with 1:10000 diluted sera (Lane 2). (b) HeLa cells in mitosis were immunohistochemically stained with 1:1000 diluted sera. Original magnification, $\times 600$. (c) Human primary fibroblasts were immunohistochemically stained with 1:1000 diluted sera. Left panel; stained with anti-survivin serum, middle; with propidium iodide, and right panel; merge. Original magnification, $\times 600$.

Furthermore, survivin localized in the midbody of primary cultured fibroblast was also detected as shown in Figure 1c, suggesting that the antiserum preparation immunodetects survivin in not only malignant tumors but also normal replicating cells, and is strong enough in immuno-reactivity and purity for further experiments.

Distribution patterns of survivin in glioma

Automated immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded sections prepared from surgical specimens with anti-survivin antiserum (1:250) using the Ventana IHC staining system. Stained sections from glioma patients in various histological grades are shown in Figure 2A, C, and E. No positive immunoreactivity was detected without antiserum, and survivin expression was undetectable around gliosis (Figure 2G) and in normal tissues (Figure 2H). All specimens ($n = 29$) from glioma patients contained positive cells, but the percentage of positive cells (designated as the survivin index) was heterogeneous among grades, which were determined with histopathological diagnosis (Figure 3a). The mean percentage of immunoreactive cells in each specimen was 70.0% in low grade astrocytoma (grade II, 9 specimens), 81.3% in anaplastic astrocytoma (grade III, 12 specimens), and 85.0% in GBM (grade IV, 8 specimens). Thus, the immunoreactivity of survivin is a highly sensitive marker for glioma.

Prognostic value of survivin index for glioma

To evaluate the prognostic value of the survivin index, the correlation of survival time of patients with the survivin index for all grades of glioma was investigated using a scatter plot diagram (Figure 4a). An increasing percentage of survivin-positive cells was reversely associated with the survival time ($P = 0.049$). The patients were further divided in two groups, high (index ≥ 80) and low ($80 > \text{index}$), and then the survival curve of the groups was calculated by the Kaplan-Meier method (Figure 5a). Survival times were significantly shortened ($P = 0.003$) for patients whose survivin index was high

(mean survival time = 349 days) compared with those whose index was low (mean survival time = 953 days).

Lower correlation between survivin and MIB-1 indexes in low-grade gliomas

Ki-67 antigen, which is detected by MIB-1 antibody, is a nuclear protein complex and the percentage of MIB-1-positive cells (MIB-1 index) is widely used for the diagnosis of many malignant tumors including glioma [5,8,23]. Then, we investigated the correlation between survivin and MIB-1 indexes in consecutive sections (Figure 2). A linear positive correlation between them was not significant, but weak correlation was noted essentially (Figure 6, $P = 0.065$), whereas an increasing percentage of MIB-1-positive cells was still associated with worse survival (Figure 4b, $P = 0.037$). However, as shown in Figure 3b, MIB-1 indexes in anaplastic astrocytoma were shown to be as low as those in low grade astrocytoma, whereas survivin indexes in anaplastic astrocytoma were similar to those in GBM, indicating that the survivin index would be a more sensitive marker for low-grade gliomas than the MIB-1 index. Then, patients were divided into two groups based on the MIB-1 index, high (index ≥ 10) and low ($10 > \text{index}$), and then the survival curve of each group was obtained by the Kaplan-Meier method. In total, survival times were significantly shortened (Figure 5b, $P = 0.033$) for patients whose MIB-1 index was high (mean survival time = 398 days) compared with those whose index was low (mean survival time = 821 days). However, in low-grade gliomas, the difference in survival times between the high and low MIB-1 indexes was not significant (Figure 5d, $P = 0.092$). At that time, in low-grade gliomas, the difference in survival times between the high and low survivin indexes was still significant (Figure 5c, $P = 0.007$).

Finally, we compared the difference in survival times among age of patients, tumor location, depth, the survivin index, and the MIB-1 index by a multivariate analysis. The survivin index was significantly associated

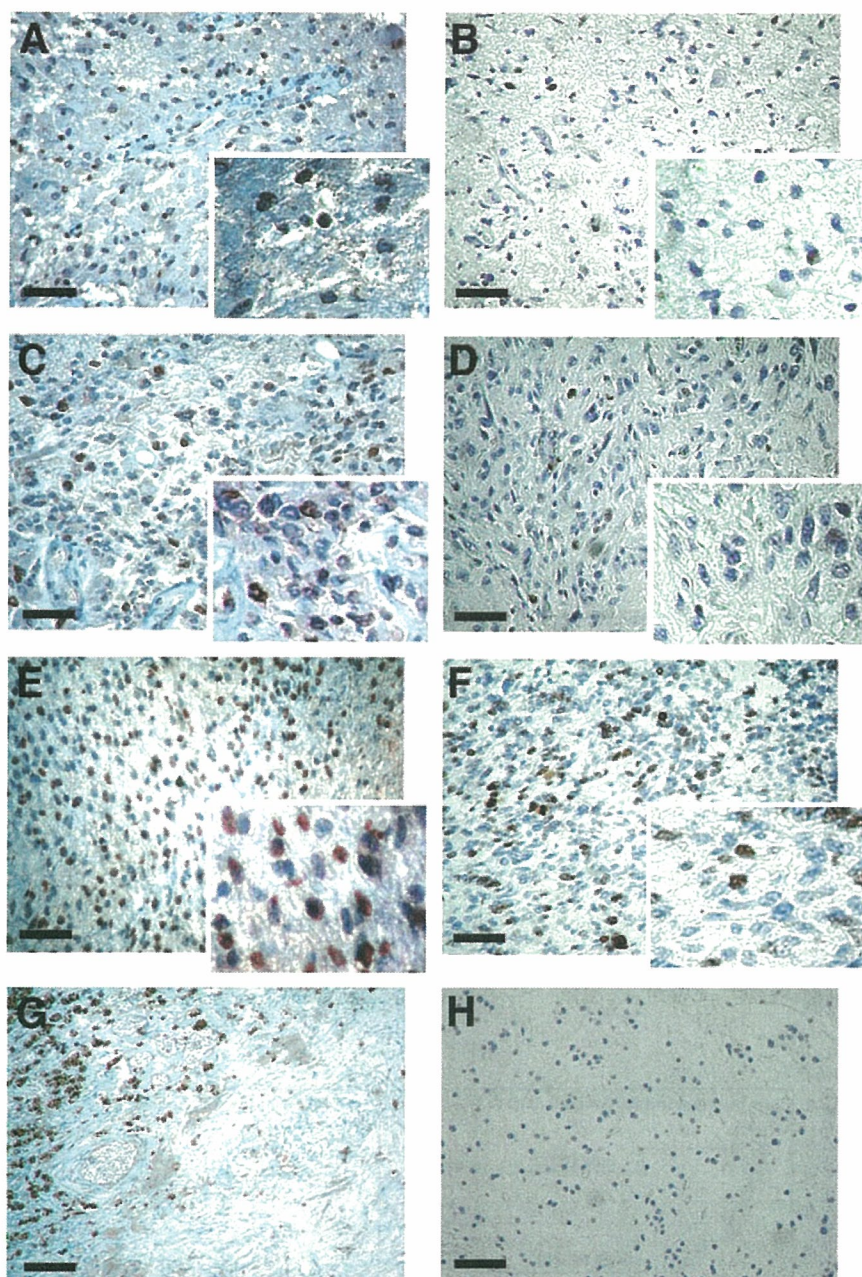


Figure 2. Immunostaining of gliomas. Immunohistochemical staining for surgical sections staining with 1:250 diluted anti-survivin serum (A, C, E, G and H), using the Ventana NexES Staining System (Ventana, Tucson, AZ). Immunohistochemical staining for surgical sections with 1:50 diluted anti-Ki-67 serum (B, D and F). A and B; low grade astrocytoma. C and D; anaplastic astrocytoma. E, F and G; GBM. G; local invasion of GBM and around gliosis. H; normal brain tissue. Original magnification, $\times 200$ and $\times 400$ (insets). Bars are 100 μm .

with the survival times ($P = 0.036$), while other characteristics were not (location: $P = 0.922$, depth: $P = 0.402$, age: $P = 0.866$ and MIB-1 index: $P = 0.404$). Taken together, these findings strongly suggest that the survivin index is a useful tool for the prognosis of histologically low-grade gliomas.

Discussion

In this study, we demonstrated that gliomas highly expressed survivin and that the percentage of

immunoreactive cells (survivin index) had a strong inverse association with the survival of patients. In particular, the survivin index correlated with the survival of low grade gliomas, suggesting that the index would be useful for a clinical prognosis.

Our antiserum raised against the GST-survivin fusion protein was highly specific and sensitive to the survivin protein (Figure 1). Western blotting of cell lysates revealed that both the 16.5-kDa full-length and 14-kDa alternatively spliced products were expressed in cultured GBM SNB-19 (Figure 1a, Lane 1–2). We used a survivin-specific RT-PCR and identified that a 14-kDa band

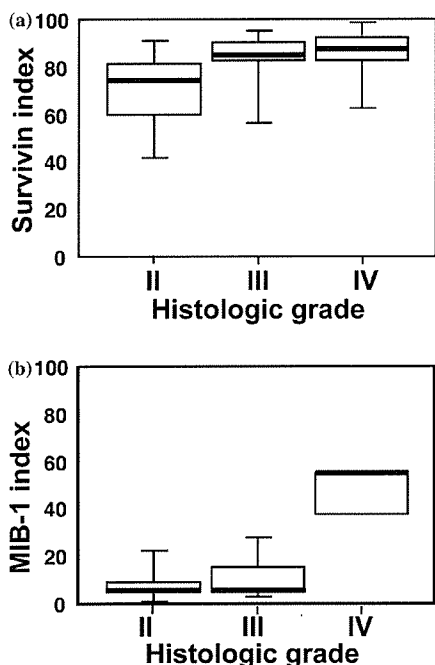


Figure 3. Correlation of histological grade with indexes. Correlations of survivin (a) and MIB-1 (b) indexes vs. histological grade are demonstrated. The difference between grade II and grade III is more obvious in the survivin index than MIB-1 index. Data are presented as the median (solid line), 25th and 75th percentiles (vertical boxes) and 10th and 90th percentiles (error bars).

was survivin-ΔEx3 and 10–40 % of survivin mRNA was survivin-ΔEx3 (unpublished results). However, functions of the regulatory balance between them are un-

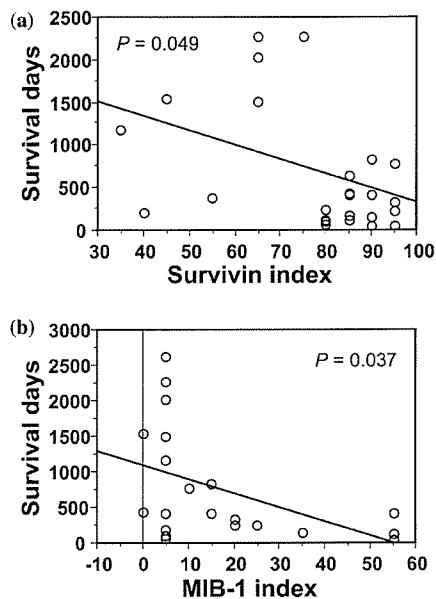


Figure 4. Correlation of survivin and MIB-1 indexes with survival times of patients. Survival time is the period until patients died from the first operation, the index is the percentage of immunoreactive cells in tumor cells in each surgical specimen. Survivin (a) and MIB-1 indexes (b) vs. survival time in each patient (each dot) are demonstrated.

known [21,24]. Immunocytochemistry with anti-survivin antiserum clearly demonstrated that both the immortal cell line and primary cultured fibroblasts expressed survivin in a cell-cycle dependent fashion (Figure 1b and c). However, immunological signals in highly proliferative cells, such as HeLa cells, were stronger than those in

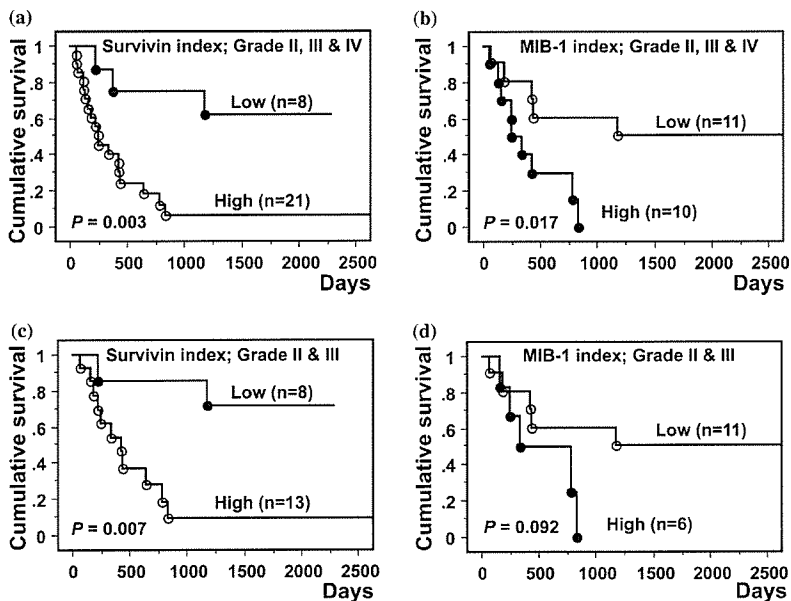


Figure 5. Kaplan-Meier plots in survivin and MIB-1 indexes. (a and c) Cumulative survival rate for survivin index. Patients were separated into two groups, high (index ≥ 80) and low ($80 >$ index). a; patients with all grade gliomas. c; all patients except those with GBM (grade IV). (b and d) Cumulative survival rate for the MIB-1 index. Patients were separated into two groups, high (index ≥ 10) and low ($10 >$ index). b; patients with all grade glioma. d; all patients except those with GBM (grade IV). Note that the survivin index is significant for survival times in glioma patients except those with GBM, but the MIB-1 index is not.

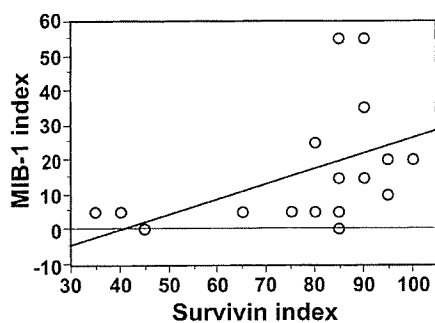


Figure 6. Correlation between the survivin index and MIB-1 index.

primary cells. Then, the anti-survivin antiserum was confirmed for sensitivity and purity in immunohistochemical studies.

Large numbers of cells in gliomas of all grades were survivin- positive by the immunohistochemical staining (Figure 2). Positive cells having weak survivin immunoreactivity in cytosol, but not in the nucleus, were observed. Recent findings of Fortugno et al. have indicated that endogenous survivin exists in strikingly different subcellular pools, comprising a predominant cytosolic fraction and a smaller nuclear pool [13]. Therefore, an immunohistochemically detectable amount of survivin was accumulated not only in the nucleus, but also in cytosol of gliomas. In addition, the immunoreactivity of survivin is a highly sensitive marker for glioma, providing the narrow window of the survivin index compared with the MIB-1. We found that the proportion of gliomas with a high survivin index was greatest in GBM (85.0% (SD 13.6%)) and lowest in low-grade astrocytomas (70.0% (18.2%)). The survivin index in anaplastic astrocytoma (81.3% (16.5%)) was not significantly different from that in GBM. On the other hand, the MIB-1 index in anaplastic astrocytoma (11.0%) was not significantly different from that in low-grade astrocytomas (7.9%), indicating that the survivin index is a more sensitive marker than the MIB-1 index for all grades of gliomas.

It was reported that the survivin expression in neuroblastoma cell lines was strongly down-regulated during the induction of apoptosis and the expression of exogenous survivin prevented cell death. Survivin is thought to inhibit apoptosis by directly inhibiting terminal effectors caspase-3 and -7, and to maintain the normal function of the mitotic apparatus [12,15]. Thus, in glioma, survivin may enhance cell survival and proliferation, and then, its expression is associated reversely with prognostic factors.

Significant numbers of patients with anaplastic astrocytoma and low grade astrocytoma rapidly developed more malignant tumors. Since standard histological techniques do not precisely predict which tumors will undergo rapid malignant progression, it is difficult to give accurate prognostic information to patients. As shown in Figure 4a, the survivin index was associated with a significant decrease in the survival of patients nevertheless the high SD values. When gliomas were

analyzed separately from GBM, the increased survivin index remained an important prognostic variable (Figure 5c). These results suggest that the survivin index is more significant than the histological grading to the prognosis for gliomas. Furthermore, the MIB-1 index has been reported to be clinically useful in the prognosis. However, the MIB-1 index did not predict prognostic reliability in gliomas separated from GBM (Figure 5d). Indeed, in several studies, the MIB-1 index did not correlate with survival in the low grade gliomas [9,10,23]. Finally, the survival index was confirmed to be significantly associated with the survival times by the multivariate analysis. Thus, this study proposed a possibility that the survivin index, which is correlated with the survival of low grade gliomas, will be a powerful tool for a clinical prognosis. It will be required to analyze more samples to reveal its usefulness.

References

1. Tanwar MK, Gilbert MR, Holland EC: Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. *Cancer Res* 62: 4364-4368, 2002
2. Grzybicki DM, Moore SA: Implications of prognostic markers in brain tumors. *Clin Lab Med* 19: 833-847, 1999
3. Heesters MA, Koudstaal J, Go KG, Molenaar WM: Analysis of proliferation and apoptosis in brain gliomas; prognostic and clinical value. *J Neuro-oncol* 44: 255-266, 1999
4. Ralte AM, Sharma MC, Karak AK, Mehta VS, Sarkar C: Clinicopathological features, MIB-1 labeling index and apoptotic index in recurrent astrocytic tumors. *Pathol Oncol Res* 7: 267-278, 2001
5. Schiffer D, Cavalla P, Chio A, Richiardi P, Giordana MT: Proliferative activity and prognosis of low-grade astrocytomas. *J Neuro-oncol* 34: 31-35, 1997
6. Shiraishi S, Tada K, Nakamura H, Kochi M, Saya H, Kuratsu J, Ushio Y: Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. *Cancer* 95: 249-257, 2002
7. Ishii N, Tada M, Hamou MF: Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumors evolve clonally to malignancy and are an unfavorable factor. *Oncogene* 18: 5870-5878, 1999
8. Di X, Nishizaki T, Harada K, Kajiwara K, Nakayama H, Ito H: Proliferative potentials of glioma cells and vascular components determined with monoclonal antibody MIB-1. *J Exp Clin Cancer Res* 16: 153-157, 1997
9. Vaquero J, Zurita M, Coca S, Oya S: Imbalance between apoptosis expression and proliferative index can predict survival in primary glioblastoma. *Acta Neurochir (Wien)*, 144: 151-155, 2002
10. Fisher BJ, Naumova E, Leighton CC, Naumov GN, Kerklviet N, Fortin D, Macdonald DR, Cairncross JG, Bauman GS, Stitt L: Ki-67: a prognostic factor for low-grade glioma? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52: 996-1001, 2002
11. Takahashi H, Herlyn D, Atkinson B, Powe J, Rodeck U, Alavi A, Bruce DA, Koprowski H: Radioimmuno-detection of human glioma xenografts by monoclonal antibody to epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 47: 3847-3850, 1987
12. Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, Kandimalla ER, Agrawal S, Shafit-Zagardo B: Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and-dependent pathways. *J Neurochem* 79: 426-436, 2001
13. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC: Survivin exists in immunohistochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 115: 575-585, 2002
14. Yamamoto T, Tanigawa N: The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc* 34: 207-212, 2001

15. Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A: High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 19: 617–623, 2000
16. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC: Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving. *Nature* 396: 580–584, 1998
17. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC: Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 273: 11177–11182, 1998
18. Chiodino C, Cesinaro AM, Ottani D, Fantini F, Giannetti A, Trentini GP, Pincelli C: Expression of the novel inhibitor of apoptosis survivin in normal and neoplastic skin. *J Invest Dermatol* 113: 415–418, 1999
19. Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S, Yajima A: Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod* 6: 529–534, 2000
20. Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS: Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 20: 1063–1068, 2002
21. Mahotka C, Wenzel M, Soringe E, Gabbert HE, Gerharz CD: Survivin- Δ Ex3 and survivin-2B: Two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 59: 6097–6102, 1999
22. Enestrom S, Vavruch L, Franlund B, Nordenskjold B: Ki-67 antigen expression as a prognostic factor in primary and recurrent astrocytomas. *Neurochirurgie* 44: 25–30, 1998
23. Marie D, Liu Y, Moore SA, Brown HG, Silverman JF, D'Amico F, Raab SS: Interobserver variability associated with the MIB-1 labeling index: high levels suggest limited prognostic usefulness for patients with primary brain tumors. *Cancer* 92: 2720–2726, 2001
24. Conway EM, Pollefeyt S, Cornelissen J, DeBaere I, Steiner-Mosonyi M, Ong K, Baens M, Collen D, Schuh AC: Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions. *Blood* 95: 1435–1442, 2000

Address for offprints: Shigeo Ohta, Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Development and Aging Sciences, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, 1-396 Kosugi-cho, Nakahara-ku, Kawasaki, Kanagawa, Japan 211-8533; Tel.: +81-44-733-9167; Fax: +81-44-733-9168; E-mail: ohta@nms.ac.jp

シンポジウム

ミトコンドリア異常症の治療戦略

太田成男

日本医科大学大学院医学研究科加齢科学専攻
細胞生物学分野

要旨：ミトコンドリア異常症 MELAS と MERRF の原因としてミトコンドリア tRNA 遺伝子変異が同定されたのは 15 年前である。遺伝子変異から、いかに発症するかを分子レベルで明らかにすることによって治療への戦略をたてるのが可能になるはずである。筆者らは変異 tRNA 分子を分離・精製することによって、変異 tRNA ではアンチコドンのタウリン修飾が欠損していることを明らかにした。この tRNA のタウリン修飾を回復することが MELAS、MERRF の根本治療への道となるであろう。

Key Words: サイブリド, 転写後修飾, タウリン, tRNA, ミトコンドリア脳筋症

はじめに

細胞内小器官であるミトコンドリアは好氣的な酸化的リン酸化によってエネルギーを産生し、母系遺伝するミトコンドリア DNA (mtDNA) を持つ^{1,2)}。ヒト mtDNA の長さは 16,568 塩基対であり、環状 2 本鎖 DNA である (図 1)。ミトコンドリアではミトコンドリア独自の蛋白質合成系により、mtDNA 上にコードされている 13 種類の蛋白質を合成される。この蛋白質合成に使われる tRNA は細胞質ゾル (サイトゾル) とは別の tRNA であり、mtDNA に遺伝子がコードされており、22 種類の tRNA からなりたっている。またリボソーム RNA もミトコンドリア特有のものであり、構成する 2 つの 12S、16S リボソーム RNA 遺伝子は mtDNA 上にコードされている。一方、リボソーム蛋白質、その他の複製、転写、翻訳反応関連因子類は全て核ゲノムにコードされ、サイトゾルで合成されミトコンドリアに移入される。mtDNA にコードされている蛋白質はいずれも呼吸鎖酵素複合体と ATP 合成酵素のサブユニットであり、ミトコンドリアが細胞、組織、臓器、そして最終的には個体が活動するために必要なエネルギーの大半を生産するために不可欠な構成成分である。mtDNA は組織、細胞によって異なるが 1 細胞内に数百から数千コピー存在している。核遺伝子とは異なり多コピーなので変異 mtDNA と正常 mtDNA が混在する場合があります、混在の状態をヘテロプラズミーと呼ぶ。ヘテロプラズミーにおける正常 mtDNA と変異 mtDNA の比率は多様であり、ミトコンドリア異常症の多彩な臨床症状の原因のひとつでもある^{1,2)}。

ミトコンドリア異常症の概観

ミトコンドリア異常症、あるいはミトコンドリア病とはミトコンドリア機能異常が第一義的な原因である疾患の総称である³⁾。ミトコンドリアは ATP を合成しており、ATP 合成系と呼吸鎖を構成する蛋白質は mtDNA と核 DNA の双方にコードされていてどちらの遺伝子の変異

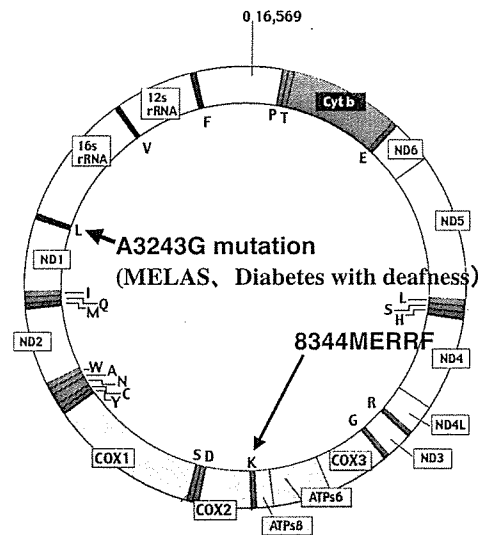


図 1 ヒトミトコンドリア DNA の遺伝子配置
ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6 は複合体 I のサブユニット、Cyt b は複合体 III のサブユニット、CO I、CO II、CO III は複合体 IV のサブユニット、ATPase6、ATPase8 は複合体 V のサブユニットを示す。22 種類の tRNA 遺伝子はそれぞれ一文字表記アミノ酸に対応する。また 12S rRNA、16S rRNA はリボソーム RNA 遺伝子を示す。L (ロイシン)、S (セリン) に対応する tRNA だけは 2 種類存在する。tRNA^{Leu}(UUR) は、UUA と UUG を認識する (R = A and G, Y = C and U)。

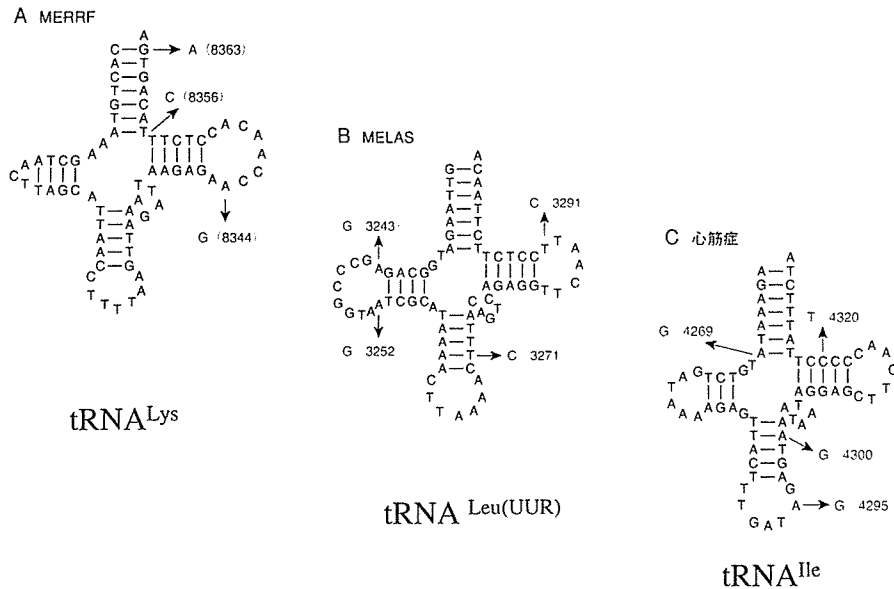


図2 MELAS、MERRF、心筋症患者にみられるミトコンドリア tRNA の変異

A : MERRF は tRNA^{Lys} 遺伝子の点変異、B : MELAS は tRNA^{Leu(UUR)} の点変異、C : 心筋症は tRNA^{Ile} 変異によって発症する。変異の位置に示してある番号は mtDNA の塩基番号。

で起こっていてもミトコンドリアに異常が生じ、いずれの場合もミトコンドリア異常症と呼ぶ。近年では複合の原因の一つであってもミトコンドリア異常が明確である場合にはミトコンドリア病と呼ぶ場合も出てきたように概念が拡張してきている²⁾。

mtDNA の変異によって異常が認められるのは、エネルギー需要が大きい骨格筋や中枢神経が中心である。そのため、ミトコンドリア異常によって筋と中枢神経に主に症状が現われる疾患を総称してミトコンドリア脳筋症と呼び、全身に症状があらわれる時はミトコンドリアサイトパチーと呼ぶ。最近ではまとめてミトコンドリア病とよぶことが多い。ミトコンドリア脳筋症では、筋力低下、易疲労性、小脳失調がおこる。子供の場合は身長が低い。さらに、痙攣、頭痛、神経性の難聴、痴呆などの症状があらわれることが多い。しかし、必ずしも全ての症状がすべての患者に同様に現われるわけではない。また、酸化的リン酸化の障害を補償するために解糖系が亢進され、最終産物である乳酸が高濃度になるため血液が酸性になる。ミトコンドリア脳筋症の3大病型は臨床症状の特徴の頭文字をとって以下のように名付けられている。外眼筋麻痺を特徴とする CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia)、筋肉の痙攣 (ミオクローヌス てんかん) を特徴とする MERRF (myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers)、脳卒中様症状が特徴の MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) が主な病型である。網膜色素変性と心伝導障害を伴う CPEO は Kearns-Sayre 症候群として分類され、KSS は CPEO に含まれる。これらの症候群が提唱されたのはそれほど以前のことでなく MELAS が症候群としてのはじめて記載されたの

は 1984 年のことである。変異遺伝子が同定されたのは 1990 年のことであることを考えれば変異遺伝子の同定は極めて速やかだったといえる^{3,4)}。しかし、変異遺伝子の同定から発症のメカニズムを決定するのにさらに長い時間を要することになった。

CPEO と MERRF の原因遺伝子変異の同定

CPEO は mtDNA の欠失により発症する⁵⁾。その欠失の長さは 0.5 - 8kbp まで様々でその欠失の場所もさまざまであるが、いずれかの tRNA 遺伝子部分を欠失しているのが特徴である。脛が垂れ下がるという眼瞼下垂が病気の特徴であるにもかかわらず、まぶたの筋に欠失 mtDNA が多いわけではなく、その特徴を生じさせる原因は今も不明である⁶⁾。mtDNA は母親の遺伝子のみが伝えられる母系遺伝によって子孫へ伝えられることが判明しているが、欠失 mtDNA は親には認められないにもかかわらず患者の代になって欠失が生じる孤発例がはるかに多い。

MERRF はミオクローヌス癇癇を特徴とし、比較的高齢になって発症する。比較的高齢になってから発症するので遺伝様式は比較的明確にすることができ、母系遺伝である。そのため、mtDNA の変異が原因であることが当初から疑われ、実際、MERRF 患者の mtDNA 塩基配列を決定することで、ミトコンドリア tRNA^{Lys} 遺伝子の点変異が同定された⁷⁾。興味深いことに MERRF 患者からは tRNA^{Lys} の変異は塩基番号 8344 だけでなく、8356、8363 のいずれにも認められたので、tRNA^{Lys} 遺伝子の変異が MERRF の原因である。ただし、8344 変異が患者の大多数を占める。MERRF の変異 tRNA 遺伝子と変異の場所を図 2 左に示す。tRNA^{Lys} の変異によ

って、なぜ、特徴的な痙攣（ミオクローヌス）、が現れるかは不明である。

MELAS、MERRF 以外の症状を示すミトコンドリア病で様々なミトコンドリア tRNA 遺伝子上の変異が見ついている³⁾。詳しくは MITOMAP、<http://infinity.gen.emory.edu/MITOMAP/>を参照。また、心筋症では塩基番号 4269、4295、4300、4320 の tRNAIle 遺伝子上に点変異が多く見ついている（図2右）。

MELAS の原因遺伝子の同定

MELAS は脳卒中様症状を示す疾患で重篤である。MELAS は小児期に発症することが多いので患者の子孫が基本的に存在しないために遺伝様式が明らかではなく、mtDNA の変異によって発症するのかどうか、1980年代当時は予測がつかなかった。mtDNA の塩基配列は個人差が大きく、たとえ mtDNA に塩基置換があったとしてもそれが病因であるかどうかをすぐに結論することはできない。病因であるか単なる個人差なのかを明らかにする必要がある。さらに病因である場合でも、正常 mtDNA と変異 mtDNA が混在していることが多く、変異 mtDNA の塩基配列を決定して原因変異を同定しようとしても、たまたま正常 mtDNA 遺伝子をクローニングしてしまえば変異が見つからない場合もあるかもしれない。

著者らは、自治医科大学小児科桃井真里子教授（現）グループと共同研究で、MELAS 患者の筋生検試料から細胞を培養して、細胞をクローン化することに成功した^{3,4)}。そのために筋細胞の増殖能を増進させるために SV40 DNA で形質転換させた。そのクローンの中には呼吸鎖活性がある細胞クローンと呼吸鎖活性がない細胞クローンの両者が存在した⁴⁾。すなわち、同一患者の同じ組織から得られた細胞にもかかわらず、呼吸鎖酵素活性が欠損していたクローンと正常なクローンが株化できた。そのふたつの細胞は同一の人に由来するので核は共通であり、mtDNA 塩基配列のちがいは個人差に起因しない。このふたつの細胞株から分離した mtDNA に何らかの違いがあればその違いが病因であるはずである。例え変異 mtDNA が存在していても、ヘテロプラズミーによって混在している正常 mtDNA をクローニングしてしまう可能性もあるので、PCR 産物の塩基配列を直接決定した。また、ヘテロプラズミーの程度違いから呼吸鎖活性の違いが生じていないことにも気をつけて、全塩基配列プロファイルを注意深く検討した。以上のような可能性を考えながらそれぞれの株の mtDNA の全塩基配列を決定した。すると、全塩基配列中わずか 1カ所のみ塩基配列が異なっていた。そこで、この塩基置換が遺伝子多型でなく病因となる点変異であると結論した。この塩基変異は tRNA^{Leu}(UUR) 遺伝子上の点変異（塩基番号 3243）であった。その後の様々な報告などから MELAS 患者の約 80% にこの塩基置換が認められた。塩基番号

3271、3252 や 3291 の tRNA^{Leu}(UUR) 遺伝子上の変異をもつ患者もいた。いずれにしてもミトコンドリア tRNA^{Leu}(UUR) 遺伝子上に変異があるのが特徴である（図2中央）。

サイブリドの作製法の開発

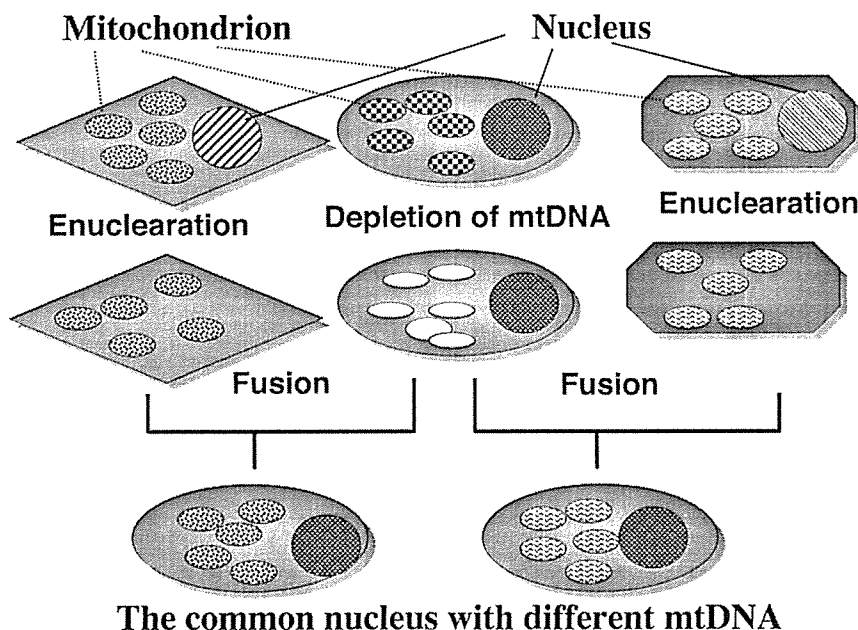
細胞には核ゲノムとミトコンドリアゲノムの二つが共存する。ミトコンドリア遺伝子に変異があり原因であるとしても、必要十分条件ではない。核遺伝子とミトコンドリアゲノムの双方に変異があってはじめて発症する可能性も否定できない。そこで、正常型 mtDNA と変異 mtDNA による違いだけを明確にするためには、共通の核をもつ細胞間で比較しなければならない。すなわち、mtDNA の変異が病気の本質的原因であることを証明するため患者細胞の核の影響を排除しなければならない。つまり患者由来の変異 mtDNA を持ち、かつ患者由来ではない共通の核を持つ細胞を人為的に作成することが必要である。mtDNA が完全に消失した HeLa 細胞（ ρ 0 細胞）と脱核した患者の細胞（細胞質）を融合することによって、核は HeLa 細胞、mtDNA は患者由来の細胞を作成することが可能であると考えた¹⁹⁾。

そこで、筑波大学の林純一教授（現）と共同で、まず mtDNA が完全に消失した HeLa 細胞を分離した。mtDNA の複製には RNA の鋳型が必要であり、その鋳型をつくるのは mtRNA ポリメラーゼである。エチジウムブロマイド (EtBr) は mtRNA ポリメラーゼの強力な阻害剤である。酵母の mtDNA は EtBr で処理することによって容易に mtDNA の欠失 mtDNA がえられることが知られていたので、それをヒントに、HeLa 細胞を長期に EtBr で処理した。ほとんどの細胞は mtDNA の消失によって死滅したが、その中から mtDNA が完全に消失した細胞を分離することができた。

一方、患者の線維芽細胞をサイトカラシンで処理して、細胞骨格のアクチンを脱重合し、遠心によって核を除去した。核は重いので遠心によって細胞からちぎれてしまうのである。核を失った細胞質（サイトプラズム）と mtDNA 消失細胞を融合することによって、核は HeLa で、それぞれの mtDNA をもつ細胞を作製することができた。細胞間の融合 (Hybrid) ではなく、サイトプラズムと細胞の融合であるので、サイブリドと名付けた（図3）。

実際、変異 mtDNA を持つサイブリドを作成すると、欠失 mtDNA の場合は明快に tRNA 量の減少に伴って減少した蛋白合成量の低下して、酵素活性が定量的に減少した。mtDNA の欠失変異によって tRNA が欠乏してミトコンドリア翻訳反応が停止したのがミトコンドリア異常の原因であることが推察された⁹⁾。

一方、点変異が原因である場合も MERRF の 8344 点変異、MELAS の 3243、3271 点変異はそれぞれの変異を持つサイブリドが呼吸鎖酵素活性の異常を示したこと



The common nucleus with different mtDNA

図3 サイブリドの作製法

HeLa 細胞から mtDNA を消失した細胞を分離した (中央)。変異 mtDNA あるいは正常 mtDNA をもつ細胞をサイトカラシン B 処理し、遠心することにより脱核する (右と左)。融合することによって、核は共通で mtDNA だけが異なるサイブリドを分離することができる。実際には 8-アザグアニン耐性 HeLa を用いて、サイブリドを 8-アザグアニン存在下で培養してサイブリドを選択する。mtDNA の消失した細胞にもミトコンドリアは存在する。

で病因遺伝子変異であることが証明されたが¹⁰⁾、具体的にどのようなメカニズムで異常が発生したかは欠失の場合のように簡単には説明がつかなかった。

MERRF 患者由来の tRNA^{Lys} 遺伝子 (A8344G) 変異をもつ場合は、正常のポリペプチドよりも短いポリペプチドが観察されたので、翻訳停止によって premature な蛋白が生じたものと当初考えられた¹¹⁾。しかしながら MELAS や MERRF の原因点変異を持つ tRNA が具体的にいかんして上記したような異常を引き起こしているかは以前不明であった。

これらの現象を分子レベルで解明するには細胞質の tRNA に比べて存在量が 1/100 と非常に少ないミトコンドリア tRNA を精製して *in vitro* で解析することが必要であるが、実際に変異 tRNA を精製するには技術的に困難で、精製した変異 tRNA を用いた解析は長い間行われなかった。

サイブリドは核遺伝子に対する mtDNA の役割を明確にただけでなく、変異 mtDNA の維持を容易にした。例えば患者由来の線維芽細胞が変異 mtDNA を持つ場合、SV40 遺伝子で形質転換しても細胞分裂寿命がある。しかも我々の用いる HeLa 細胞の核をもつサイブリドは細胞寿命がなく無限に増殖させることが可能であるために、大量培養に適している。また、サイブリドを再細胞クローニングすることによって、変異 mtDNA と正常 mtDNA の比率が様々な細胞株を得ることが可能である。こうして、変異 mtDNA に富む細胞株を分離することが容易になり、大量培養も可能になった。また、東大

の渡辺研究室では効率よい tRNA の精製法が確立された¹²⁾。大量培養された細胞からミトコンドリア tRNA を精製することが可能になったのである。点変異を持つ tRNA の異常なふるまいを明解にするには単一に精製された変異 tRNA の解析が必須であり、サイブリドの構築と tRNA の精製法の確立により、精製 tRNA を用いた tRNA 分子解析の前提条件が揃ったのである。

変異 tRNA のアンチコドンの塩基修飾の欠損

一般に RNA の塩基配列は T が U に変わっているだけで鋳型 DNA の塩基配列と同じはずである。しかし、tRNA の場合は、転写後も様々な塩基修飾を受け変化する。これらの tRNA の修飾塩基には様々な役割がある。tRNA の 3 次構造を正しく保つ、各種酵素・因子から正確に認識される、コドンの正確な読み分けなどに必要である。特にアンチコドンの修飾塩基はコドンの正確な読み分けに本質的な役割を果たしているため、変異 tRNA が正常に修飾を受けているかを解析するのは病因を探るうえで重要であると考えた。アンチコドンは mRNA と結合する 3 つの塩基であり、mRNA の翻訳に本質的に重要な領域である。多くの修飾塩基の位置、種類は tRNA 遺伝子の DNA 配列から予測できない。

そこで著者らは東大工学部の渡辺公綱教授 (当時) と共同で、変異 tRNA を精製することにした。変異 tRNA の機能異常を探るため、変異 tRNA^{Leu}(UUR)(A3243G) と tRNA^{Leu}(UUR)(T3271C)¹³⁾、また tRNA^{Lys}(A8344G)¹⁴⁾ をもつサイブリドを大量培養し、それぞれの変異サイブリ

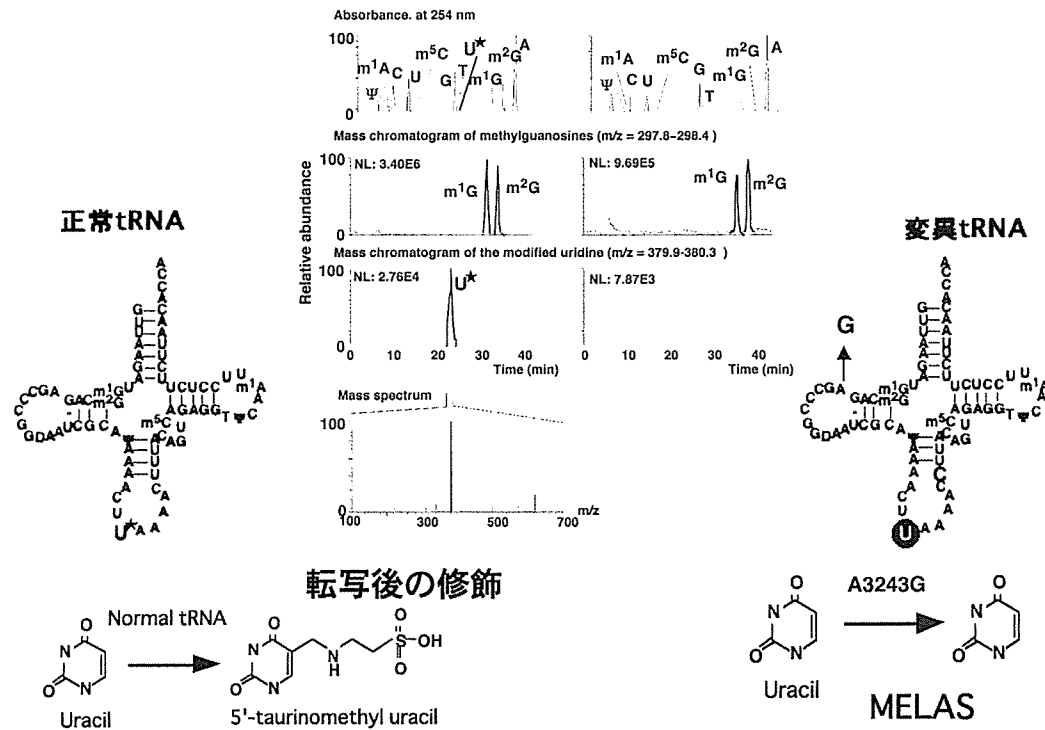


図4 MELAS (A3243G) 変異をもつ変異 tRNA のアンチコドンのタウリン塩基修飾の欠損

正常ヒト tRNA_{Leu}(UUR)と A3243G 変異 tRNA を精製してアンチコドンの解析を行った。中央は TOF-マスペクトルパターン。正常 tRNA には U* (タウリン修飾 U) が検出されるのに対し、変異 tRNA では U* が消失している (中央3段目)。一方、m1G (1-メチル G) と m2G (2-メチル G) の修飾は同じ (中央2段目) であるのでタウリン修飾の欠損は特異的である。正常 tRNA では転写後修飾されるのに対し、変異 tRNA では修飾されず U のままとどまる (下図)。(左右の tRNA 図: m1G; 1-methylguanosine, m2G; 2-methylguanosine, D; dihydrouridine, ψ ; pseudouridine, m5C; 5-methylcytidine, T; ribothymidine m1A 1-methyladenosine U* はタウリン U 誘導体)。

ドから tRNA を精製した。まず、カラムクロマトにより分画し、最終的には固相化したオリゴヌクレオチドニハイブリダイズさせて効率よく精製した。そして、その一次構造を決定した。RNA 配列解析法である Donis-Keller 法、ポストラベル法や精密質量分析機器 LC/MS を用いた核酸分析により、まず野生型の tRNA_{Leu}(UUR) と tRNA_{Lys} の修飾塩基を含む塩基配列を決定した (図4)。すると両方の正常 tRNA のアンチコドンの第一文字の U (ウリジン) は修飾されており、当時未知の修飾塩基であった。ところが、3243、3271、8344 変異をそれぞれ持つ tRNA のアンチコドンの第一文字はいずれも未修飾の U のままで全く修飾されていなかった。他の修飾塩基は変異 tRNA と正常 tRNA の間で違いは認められず、アンチコドンの塩基のみの特異的欠損であった^{13,14)} (図4)。同時に、MERRF の 8344 変異を持つサイブリドでは tRNA_{Leu}(UUR) は正常に塩基が修飾されていた。また、3243 変異をヘテロプラズミー状態で持っているサイブリドでは変異 tRNA_{Leu}(UUR) と正常 tRNA_{Leu}(UUR) が混在しており、変異 tRNA のみの塩基修飾が欠損していた。これらの知見は変異 tRNA における修飾欠損が二次的効果ではなく、病因である点変異そのものがアンチコドン修飾酵素の認識を妨げて tRNA 分子内のアンチコドンが変化していることを意味していた¹³⁾。その後、この修飾塩基にはタウリンが結合している

ことがウシ tRNA の構造解析から明らかとなった¹⁵⁾。3243 変異と 3271 変異の MELAS の代表的な点変異を持つ二つの tRNA_{Leu}(UUR) のどちらにおいてもアンチコドン1文字目はタウリン修飾が欠損していた (図5)。同一 tRNA 内の異なる位置の点変異により同じ病型を示すのはタウリン修飾の欠損が原因であると示唆された。

患者組織の tRNA の解析

以上のように HeLa 核をもつサイブリド細胞では、tRNA 遺伝子の変異によってタウリン修飾が欠損することが明らかとなった。しかし、mtDNA の挙動はしばしば核の影響を受ける。そのため HeLa の核の支配によってタウリン修飾欠損が生じるのではないかという可能性も否定できない。そこで、MERRF、MELAS の患者組織から tRNA を抽出してタウリン修飾が欠損しているかどうかを調べた (東大 鈴木、新潟県犀潟病院福原らとの共同研究)。患者の組織でも、HeLa 以外の核をもつサイブリドでも同じように MELAS、MERRF の原因点変異によってタウリン修飾が欠損することが明らかになった¹⁶⁾。以上の結果より、3243 変異、3271 変異、8344 変異によってタウリン修飾が欠損する現象を普遍化することができた。

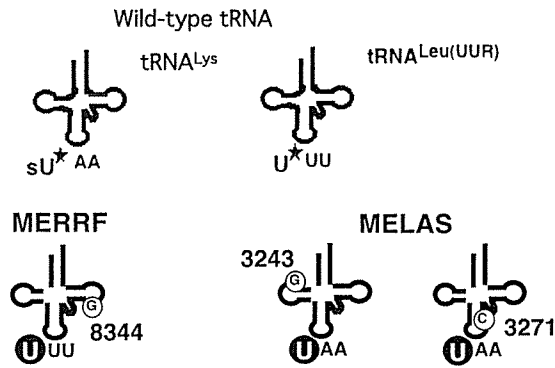


図5 正常 tRNA^{Leu(UUR)}と tRNA^{Lys} ならびに MELAS と MERRF の点変異をもつ tRNA^{Leu(UUR)}と tRNA^{Lys} の塩基修飾

正常 tRNA^{Leu(UUR)}と tRNA^{Lys} のアンチコドンの第一文字の塩基はタウリン修飾され、さらに tRNA^{Lys} ではイオウが結合している。MELAS の 3243 変異、3271 変異、MERRF の 8344 変異をもつ tRNA では共通にアンチコドンの一文字目が未修飾である。

アンチコドンの修飾欠損と蛋白質合成停止

一種類の tRNA 分子が数種類のコドンを認識する機構を一般に wobble (ゆらぎ) 塩基対合と呼び、ごく少数の例外を除けば、アンチコドン 1 文字目に様々な修飾塩基を導入することによって、コドン効率よく正確に読み分けている¹⁷⁾。ミトコンドリア tRNA はわずか 22 種類である。大腸菌の tRNA が 85 種類もあるのに比べてミトコンドリア tRNA の種類はとて少なく大腸菌のようにひとつのコドンに対して複数の tRNA は存在しない。そのため、ひとつの tRNA 種を別の tRNA 種で補償することができない。そしてミトコンドリアでは 22 種類の tRNA 種で 20 種類のコドンを読むためにアンチコドン 3 文字目に未修飾の U を持つ tRNA が 8 種類存在する。アンチコドンの第 1 文字目の U は、mRNA 側のコドン 3 文字目が A、G、C、U いずれでも対合することになる。一方、コドンの第 3 文字が A か G のものとのみ選択的に対合する tRNA のアンチコドンの第一文字の塩基は修飾されている (tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Trp}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Gln}, tRNA^{Glu} の 5 種類は U、tRNA^{Met}

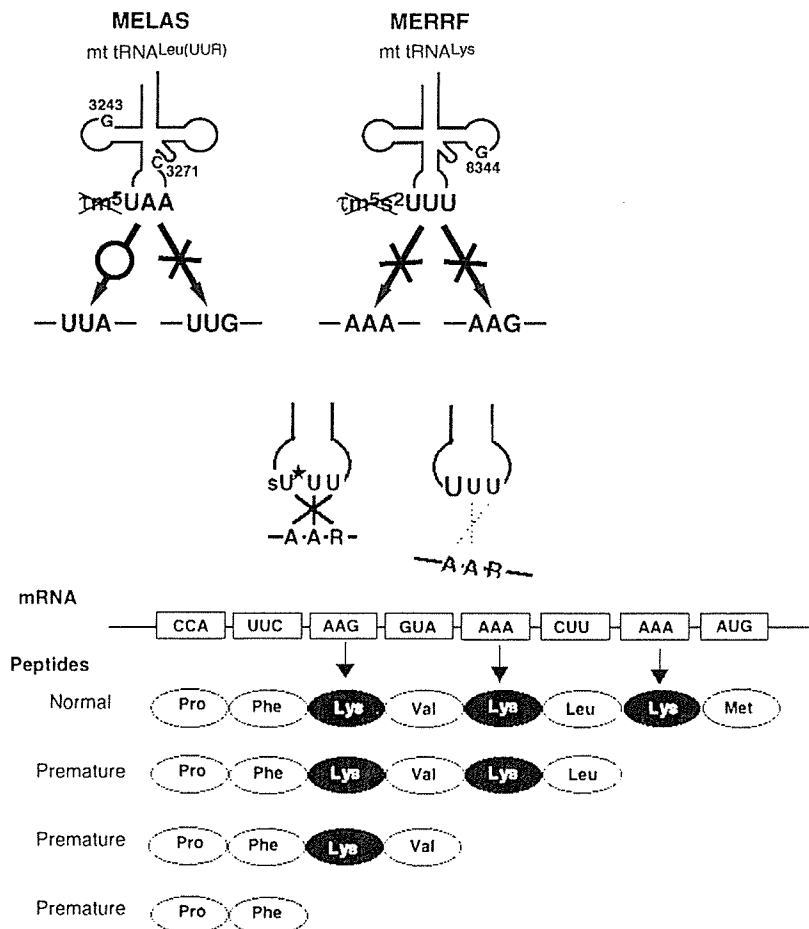


図6 MELAS 変異 tRNA と MEERF 変異 tRNA によるコドンの識別

MELAS 変異 tRNA では mRNA のコドン UUG を読み取ることができず、UUA にのみ結合する。一方、MERRF 変異 tRNA では AAA と AAG を読みとることができない (上図)。もし、変異 tRNA^{Lys} がコドン AAG か AAA のコドンに遭遇すると蛋白質合成はその場で停止して、途中までできた蛋白質 (premature protein) が生成することになる。

はCの誘導体)。これらの塩基認識は、ミトコンドリア wobble ルールとして確立していた¹⁷⁾。

そのため、前述のミトコンドリア wobble ルールに従って考えてアンチコドンの第1文字のUが修飾されていない変異 tRNA^{Leu(UUR)}や変異 tRNA^{Lys}は、mRNA 側のコドンの3文字目がAGUCのいずれにも結合してしまっただけで、アミノ酸を蛋白質合成の際に導入してしまうことが予測された。tRNA^{Leu(UUR)}なら自分のコドン UUA、UUG 以外にフェニルアラニンコドンである UUC、UUU も誤翻訳してしまうことになる。

しかし、さらに研究をすすめると意外にも、変異 tRNA は従来のミトコンドリア wobble 法則には従わないことが判明した^{18,19)}。実際にえられた実験結果は、tRNA^{Leu(UUR)}や tRNA^{Lys} のアンチコドン3文字目のUの修飾がコドンとの正確で効率のよい対合を保証するために不可欠であるというものであった。変異 tRNA^{Lys} では AAA と AAG のコドンを読み取ることができず、蛋白質合成が停止する。そのため、合成途中の蛋白質が出現することになる(図6)。この結果は premature 蛋白質の出現など従来示唆されていた結果と一致するものであった。

分子整形によるタウリン欠損 tRNA の機能解析

tRNA のタウリン修飾欠損は tRNA 機能の消失につながる事が強く示唆されたが、変異 tRNA には変異塩基は存在している。そのため、変異塩基が存在せずに、タウリン修飾だけが欠損している tRNA を用いて tRNA 機能を調べる必要があった。そこで、正常 tRNA のアンチコドン部分だけをタウリン修飾していない合成 RNA と置換した。正常ヒトミトコンドリア tRNA を得るために、ヒト胎盤を用いた。ヒトミトコンドリア tRNA をヒト胎盤より大量に精製して、アンチコドン部を合成 RNA に置換することで、タウリン修飾のみを欠損し、その他は正常 tRNA と全く同一の tRNA を分子整形法によって人工的に作製した。この結果、変異 tRNA の機能不全は変異塩基にあるのではなく、アンチコドンのタウリン修飾の欠損が原因であることが明確になった。さらに tRNA^{Leu(UUR)} にタウリン修飾が欠損した場合には UUA コドンを読み取ることができるが、UUG コドンは読みとることができないことが明らかとなった(図6)¹⁹⁾。一方、変異 tRNA^{Lys} でタウリン修飾を欠損している場合は AAA と AAG の双方を読みとることができない(図6)¹⁹⁾。同じタウリン修飾欠損でも、変異 tRNA が読み取る範囲が異なるのは興味深い。

タウリンによるミトコンドリア機能回復

変異 tRNA のタウリン修飾欠損は MELAS と MERRF の根本原因なら培養液にタウリンを加えるとサイブリドのミトコンドリア機能が回復するのではないかという考えが浮かんだ。3243 変異、3271 変異、8344 変異をもつ

サイブリド細胞(核は HeLa 細胞でそれぞれの変異 mtDNA をもつように作製した人工細胞)に 10mM-60mM のタウリンを加えて 1-4 日間培養して、ミトコンドリアの機能が回復するかどうかを調べた。ミトコンドリア膜電位は MitotrackerRed の蛍光染色の強度をフローサイトメーターで調べた。酸素消費速度は酸素電極により測定し、ミトコンドリアの形態は共焦点顕微鏡により観察した。ミトコンドリア内タンパク質合成はエメチン存在下でアイソトープメチオニンを取り込ませ、ミトコンドリアを分画後電気泳動によって合成タンパク質を測定した。すると、高濃度タウリン存在下で、MELAS、MERRF の点変異 mtDNA をもつサイブリド細胞では、膜電位、酸素消費速度、形態、ミトコンドリア蛋白質合成速度、いずれも改善した。40mM のタウリン存在下で 4 日間培養すると、30% 程度酸素消費速度が回復した。タウリン添加によって分子量の大きい蛋白質の合成が改善させたので、tRNA の機能が回復したことを示唆する。

しかし、以上の結果は、タウリンが 10mM 濃度以上の高濃度で効果が見られたので、現実的にタウリンを飲用した時の効果を示すものではない。そこで、細胞内のタウリン合成を抑制するためにタウリン合成の材料であるメチオニンとシステインを必要最小限の濃度として、4 日間培養し、その後 0.1mM ~ 1 mM の低濃度のタウリンの効果調べた。すると、特に 8344 変異を持つサイブリド細胞では、MitoTracker の蛍光強度が濃度依存的に増加し、形態も糸状になりミトコンドリア機能が回復したことが示唆された(図7)。

タウリン合成を抑制した場合には 0.3mM 程度の低濃度のタウリンでも十分効果があるので、飲用によってミトコンドリア脳筋症の病態改善に有効である可能性がある。どのような条件下でタウリンが有効であるかをさらに明らかにする必要がある。このタウリンの効果は、変異 tRNA にタウリン修飾が回復したためかどうかは現在不明である。別の機構でミトコンドリア機能回復をしている可能性があるが、副作用のないタウリンがミトコンドリア機能回復に一役かってくれば病態改善の方法として利用できる可能性がある。

tRNA 機能回復遺伝子の分離

現在の遺伝子工学の技術では変異 mtDNA を正常 mtDNA に置換して変異遺伝子を正常化することはできない。mtDNA を導入できるのは現在酵母だけである。また、例え正常 mtDNA を導入することができたとしても、ヘテロプラスミー状態になり、変異 mtDNA によって最終的に置き換わってしまいかもかもしれない。理由は不明だが、正常 mtDNA よりも変異 mtDNA が増加する傾向がある。そこで、現段階では mtDNA を正常化させて根本治療するという考えは成り立たない。

バクテリアや酵母の遺伝学手法では revertant (回復株)あるいは suppressor mutant (抑圧変異株)を分離

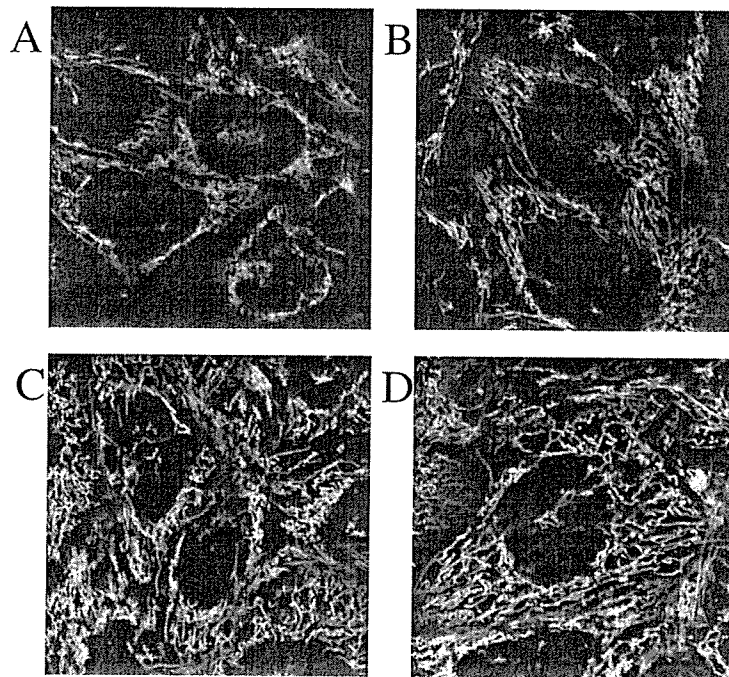


図7 培養液にタウリンを加えたときのMERRFサイブリド細胞のミトコンドリア

MERRF サイブリドを細胞内のタウリン合成を抑制するためにタウリン合成の材料であるメチオニンとシステインを必要最小限の濃度として、4日間培養し、その後0.1mM～1mMの低濃度のタウリンの効果を調べた。ミトコンドリアの膜電位に依存して蛍光を発するMitoTrackerで染色すると、タウリン濃度依存的に蛍光強度が増加し、形態も糸状になりミトコンドリア機能が回復したことが示唆された。異常ミトコンドリアは膨らんだ点状であるのに対し、正常ミトコンドリアは線状である。A：タウリン0mM, B：0.1mM, C：0.3mM, D：1mM。

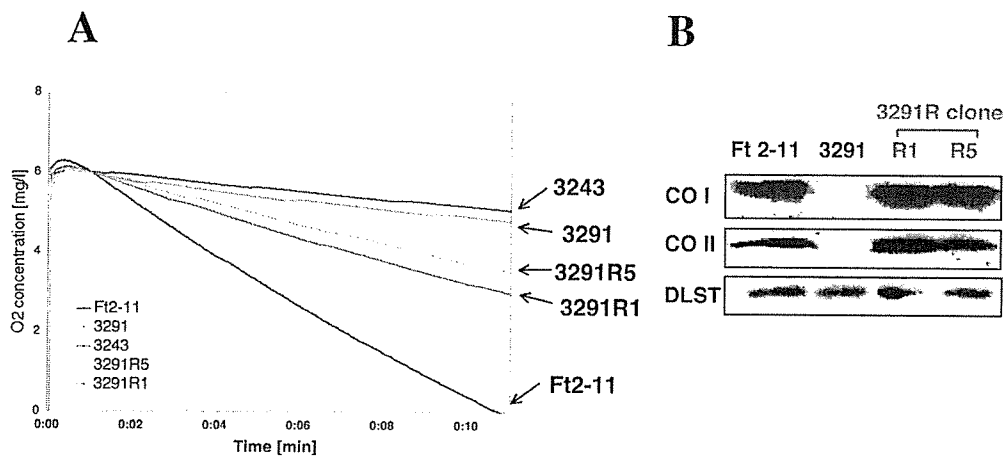


図8 mtDNAに変異を持ちながらミトコンドリア機能回復しているサイブリド株の分離

MELAS3291 変異 mtDNA を95%以上持ちながら、呼吸活性が部分的に回復した細胞株(3291R1と3291R5)を分離した。(A)は酸素電極による酸素消費速度。3243、3291はそれぞれ変異mtDNAをもつサイブリド、Ft2-11は正常株。Western blotによりミトコンドリア内の蛋白質合成を確認すると3291株では蛋白質合成が行われていないのに対し、回復株では蛋白質合成が回復していた(B)。COIとCOIIはmtDNAにコードされており、DLSTは核遺伝子にコードされたミトコンドリア蛋白質。

して変異解析を行うのが一般的である。ある変異によってある機能を失った細胞では別の変異によって正常化する変異株は必ず分離できるはずであるという考えに基づいている。mtDNAに変異があり、tRNAのタウリン修飾が欠損していても、何らかの関連遺伝子の変異によってタウリン修飾が回復してミトコンドリア機能も回復する可能性もあるはずである。幸運にも、MELAS由来の

3291 変異 mtDNA が98%あるサイブリドにおいて、ミトコンドリア機能が回復したサイブリド株を分離することに成功した。このサイブリドでは、mtDNAに変異があるにもかかわらず、tRNA^{Leu}(UUR)のタウリン修飾が部分的に回復し、ミトコンドリア蛋白質合成と呼吸活性も回復していた(図8)。さらに、このサイブリドの核を正常HeLa細胞の核と交換すると再びタウリン修飾は

欠損してミトコンドリア機能は低下した。すなわち、なんらかの核遺伝子変異によって、mtDNAに変異がある場合にも変異 tRNA のタウリン修飾を回復させ、ミトコンドリア機能を回復させることが判明した。この変異遺伝子を分離し、変異 mtDNA をもつ細胞に導入すればミトコンドリア機能を回復させることができる。この方法は基本的に遺伝子治療であるが、この遺伝子をヒントに新しい治療法を開発できる可能性もあると期待している。

おわりに

ミトコンドリア tRNA は細胞質ゾルの tRNA に比べその存在量が極めて少なく解析が困難であった。しかしながら RNA 分子の精製技術の進歩とサイブリド法の確立によりミトコンドリア脳筋症の原因遺伝子変異をもつ tRNA を精製し解析することが可能になった。その結果、変異 tRNA には予想もしなかったようにタウリン修飾が共通に欠損していたのである。RNA 分子の特定の塩基修飾という詳細な解析から高次生命現象であるヒトの疾患の根本原因が見出されたことは意義深いことであり、この知見は RNA の修飾欠損が直接疾患の原因であることを示した初めての例である。MELAS、MERRF に対しては、RNA 修飾酵素やその関連遺伝子の同定と機構の解明・改変といったアプローチからの治療という、今まででは考えなかった発想を我々に与えてくれた。今後、tRNA の塩基修飾関連遺伝子を解析することによって、ミトコンドリア脳筋症の根本的治療法を確立したい。

謝 辞

本研究は、多くの方々との共同研究の集積です。自治医科大学桃井真里子教授、筑波大学林純一教授、東京大学渡辺公綱教授（当時）、鈴木勉助教授、犀潟病院の福原信義先生の諸先生方に感謝します。一連の研究は多大な労力を必要として研究成果であり、1990年当時に mtDNA の全塩基配列を決定した小林葉子さん（当時自治医科大学大学院生）、変異 mtDNA を維持しながらサイブリドを大量培養した石井徳恵さん（日本医科大学）、サイブリドならびに胎盤から tRNA を精製して膨大な研究結果を蓄積した安川武宏さん（当時東大大学院生）、胎盤から tRNA を精製し分子整形をした桐野洋平さん（東大大学院生）らにこの場をもって感謝いたします。

文 献

- 1) 太田成男: ミトコンドリア DNA の変異によって生じるミトコンドリア病とミトコンドリアの形成制御機構. 生化学 67: 15-32, 1995.
- 2) Ohta, S. (2003) A Multi-Functional Organelle Mitochondrion is Involved in Cell Death, Proliferation and Disease. *Curr. Med. Chem.* 10: 2485-2494, 2003.
- 3) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S.: A point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem Biophys Res Commun* 173: 816-822, 1990.
- 4) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Shimoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S.: Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Am J Hum Genet* 49: 590-599, 1991.
- 5) Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S, et al.: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320: 1293-1299, 1989.
- 6) Kawashima S, Ohta S, Kagawa Y, Yoshida M, Nishizawa M. Widespread tissue distribution of multiple mitochondrial DNA deletions in familial mitochondrial myopathy. *Muscle Nerve* 17: 741-746, 1994.
- 7) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, and Wallace DC.: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 61: 931-937, 1990.
- 8) Schon EA, Bonilla E. and DiMauro S.: Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 29: 131-149, 1997.
- 9) Hayashi J, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y, and Nonaka I.: Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:10614-10618, 1991.
- 10) Hayashi J, Ohta S, Takai D, Miyabayashi S, Sakuta R, Goto Y, Nonaka I.: Accumulation of mtDNA with a mutation at position 3271 in tRNA(Leu)(UUR) gene introduced from a MELAS patient to HeLa cells lacking mtDNA results in progressive inhibition of mitochondrial respiratory function. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1049-1055, 1993.
- 11) Enriquez JA, Chomyn A and Attardi G.: MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat Genet* 10: 47-55, 1995.
- 12) Kaneko T, Suzuki T, Kapushoc ST, Rubio MA, Ghazvini J, Watanabe K, Simpson L, and Suzuki T.: Wobble modification differences and subcellular localization of tRNAs in *Leishmania tarentolae*: implication for tRNA sorting mechanism. *EMBO J.* 22:657-667.2003
- 13) Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T, Ohta S and Watanabe K.: Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem* 275: 4251-4257, 2000.
- 14) Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, Ueda T, Ohta S and Watanabe K.: Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA(Lys) with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Lett* 467: 175-178, 2000.
- 15) Suzuki T, Suzuki T, Wada T, Saigo K, and Watanabe K.: Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new

- insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.* 21:6581-6589. 2002
- 16) Yasukawa T, Kirino Y, Ishii N, Lehtinen SK, Jacobs HT, Makifuchi T, Nobuyoshi Fukuhara N, Ohta S, Suzuki T, and Watanabe K. : Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett* in press (2005)
- 17) Barrell BG, Anderson S, Bankier AT, de Bruijn MH, Chen E, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, and Young IG.: Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77:3164-3166. 1980
- 18) Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S. : Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J.* 22: 4794-4802, 2001.
- 19) Kirino Y, Yasukawa T, Ohta S, Akira S, Ishihara K, Watanabe K, and Suzuki T.: Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:15070-15075. 2004
-

MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction

Naomi Nakashima-Kamimura¹, Sadamitsu Asoh¹, Yoshitomo Ishibashi¹, Yuri Mukai^{1,*}, Yujiro Shidara^{1,2}, Hideaki Oda², Kae Munakata³, Yu-ichi Goto³ and Shigeo Ohta^{1,‡}

¹Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Development and Aging Sciences, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, 1-396 Kosugi-cho, Kawasaki, Kanagawa, 211-8533, Japan

²Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8666, Japan

³Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, NCNP, Kodaira, Tokyo, 187-8502, Japan

*Present address: Computational Biology Research Center (CBRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Koutou-ku, Tokyo, 135-0064, Japan

‡Author for correspondence (e-mail: ohta@nms.ac.jp)

Accepted 15 August 2005

Journal of Cell Science 118, 000-000 Published by The Company of Biologists 2005

doi:10.1242/jcs.02645

Summary

To investigate the regulatory system in mitochondrial biogenesis involving crosstalk between the mitochondria and nucleus, we found a factor named MIDAS (mitochondrial DNA absence sensitive factor) whose expression was enhanced by the absence of mitochondrial DNA (mtDNA). In patients with mitochondrial diseases, MIDAS expression was increased only in dysfunctional muscle fibers. A majority of MIDAS localized to mitochondria with a small fraction in the Golgi apparatus in HeLa cells. To investigate the function of MIDAS, we stably transfected HeLa cells with an expression vector carrying *MIDAS* cDNA or siRNA. Cells expressing the MIDAS protein and the siRNA constitutively showed an increase and decrease in the total mass of mitochondria,

respectively, accompanying the regulation of a mitochondria-specific phospholipid, cardiolipin. In contrast, amounts of the mitochondrial DNA, RNA and proteins did not depend upon MIDAS. Thus, MIDAS is involved in the regulation of mitochondrial lipids, leading to increases of total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction.

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/118/22/5357/DC1>

Key words: Mitochondria, Mitochondrial mass, Cardiolipin, Mitochondrial DNA, Mitochondrial disease, Golgi apparatus

Introduction

The mitochondrion is the center of energy metabolism in eukaryotes and has recently been recognized as a multifunctional organelle (Ohta, 2003). It is involved in the regulation of apoptosis as a reservoir of signals, regulators and executioners (Kroemer and Reed, 2000; Green and Kroemer, 2004). In addition, it functions as a source of reactive oxygen species, which are believed to cause many lifestyle-related diseases, neurodegenerative diseases, cancer and aging (Kowaltowski and Vercesi, 1999; Cortopassi and Wong, 1999; Melov, 2000). Thus, mitochondria are essential in many aspects of medicine as well as cell biology.

Depending on cell type, energy demands and physiological conditions, mitochondria vary in number, mass and morphology (Attardi and Schatz, 1988; Yaffe, 1999; Collins et al., 2002; Nisoli et al., 2003). The proliferation of cells usually accompanies an increase in mitochondria. However, an increase in number of mitochondria is not distinctly coordinated with the cell cycle. For example, muscle mitochondria increase in response to exercise, independently of cell division (Brunk, 1981; Moyes et al., 1997). Exposure to a low-temperature environment or cultivation in glucose-deprived medium induces a marked increase in mitochondrial

mass (Klaus et al., 1991; Weber et al., 2002). In addition, mitochondria increase in response to external stimuli with a wide range of substances including benzodiazepine, phorbol esters, calcium fluxes (Bereiter-Hahn and Voth, 1994; Vorobjev and Zorov, 1983; Muller-Hocker et al., 1986; Kawahara et al., 1991), thyroid hormones (Goglia et al., 1999) and nitric oxide (NO) (Nisoli et al., 2004). Mitochondrial numbers also increase in response to internal stimuli, such as the mitochondrial dysfunction caused by pathogenic mtDNA mutations (Schon, 2000; Wallace, 1999; Moraes et al., 1992). An increase in mitochondrial mass was observed in mitochondrial transcription factor A (*Tfam*) knockout mice, which have depleted mtDNA (Hansson et al., 2004).

As nuclear genes encode most mitochondrial proteins, including the enzymes and cofactors required for the transcription and replication of mtDNA, mitochondrial biogenesis depends on a distinct crosstalk between two physically separated genetic systems (Garesse and Vallejo, 2001). Recently, the pathway that links external physiological stimuli to the regulation of mitochondrial biogenesis and function has been studied. Several transcription/replication factors directly regulate mitochondrial genes and the

coordination of these factors into a programmed response to the environment was reported (Scarpulla, 2002).

However, the nature of mitochondrial biogenesis in response to internal stimuli is poorly understood. Mitochondrial stress results in enhanced expression of sarcoplasmic reticular ryanodine receptor-1 and some Ca^{2+} -responsive transcription factors (Biswas et al., 1999). Several tumor-specific markers are overexpressed in cells subjected to mitochondrial genetic as well as metabolic stress (Amuthan et al., 2001). Moreover, we have reported that expression of the apoptosis-mediator Fas is enhanced by dysfunctional mitochondria (Asoh et al., 1996). However, no one has reported on the mammalian factors, in response to a signal from mitochondria to the nucleus, which are involved in the stimulation of mitochondrial growth. Notably, the molecular mechanism regulating the biogenesis of mitochondrial lipids is poorly understood.

In this study, we identified factors whose expression was enhanced by depletion of mtDNA. One of them was found to increase total mitochondrial mass without a pathogenic swelling, when overexpressed. Thus, the factor is involved in the accumulation of mitochondria in response to mitochondrial dysfunction.

Materials and Methods

Cells and culture

EB8 and Ft2-11 were described previously (Hayashi et al., 1991; Hayashi et al., 1994). EB8 is a clone, derived from HeLa cells, completely lacking mtDNA, whereas Ft2-11 was constructed by transferring wild-type mtDNA into EB8 so that Ft-2-11 has the same nucleus as EB8. Stable transfectants expressing MIDAS constitutively were constructed from HeLa cells by transfection with *MIDAS* cDNA under the control of the CMV promoter or its empty vector (pCMV-SPORT; Life Technologies).

Stable transfectants expressing siRNA of *MIDAS* were constructed from HeLa cells by transfection with the pSilencer vector (Ambion) with inserts targeting *MIDAS* (5'-AAGCTTTTCCAAAAAGTGG-AATGTCTGAAGGCCATCTCTTGAATGGCCTTCAGACATTCC-ACGGGATCC-3') or a random sequence.

HeLa cells and stable transfectants were cultured in DMEM/F-12 (1:1) (Gibco-BRL) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (Gibco-BRL).

Construction of Myc-tagged MIDAS

To insert the Myc tag at the N-terminus of MIDAS, an *EcoRI* site was generated at the 5' end of the *MIDAS* coding sequence by PCR and was cloned into the pCMV-SPORT vector. An oligonucleotide encoding MEQKLISEEDLNS (Myc tag sequence underlined) was inserted at the newly generated *EcoRI* site of *MIDAS*. To construct the Myc tag at the C-terminus of MIDAS, a *BamHI* site was generated at the 3' end of the coding sequence and an oligonucleotide encoding DPEQKLISEEDL was inserted.

Differential display

Poly(A)⁺ RNA was purified from Ft2-11 and EB8 and reverse transcribed. Resultant cDNAs were amplified using arbitrary primer sets, followed by 5% PAGE. The gel was stained with *Vistra Green* (Amersham Biosciences) and visualized with a *Fluoro Imager* (Molecular Dynamics) (Liang and Pardee, 1992).

Antibodies

Anti-MIDAS polyclonal rabbit antiserum was raised against His-

tagged MIDAS expressed in *Escherichia coli*. Anti-MIDAS antibody was affinity purified by binding to the MIDAS protein isolated by SDS-PAGE, followed by transfer onto a PVDF membrane. Anti-Tom20 and anti-Tom40 were gifts from K. Mihara, Kyushu University, Japan. Other antibodies were purchased as follows: anti-actin (clone AC-40) and anti- β -tubulin from Sigma; anti-p230 antibody and anti-Syntaxin6 from BD Biosciences; anti-Hsc70 antibody from Santa Cruz; anti-Hsp60 from MBL; anti-cytochrome c antibody and anti-Cox4 from Clontech; and anti-SDH70, anti-SDH30, anti-COX I and anti-COX II antibodies from Molecular Probes.

Immunohistochemical staining of muscle sections

Biopsy samples were obtained from the biceps brachii muscle with informed consent and then frozen in isopentane and liquid nitrogen. Frozen sections 6 μm thick were stained histochemically and immunologically. Activities of SDH and COX were visualized as described previously (Hasegawa et al., 1991; Dubowitz, 1985). The expression of MIDAS was detected with anti-MIDAS antibody. The polyclonal antibody against MIDAS was diluted 500-fold with 10% BSA in PBS and incubated with sections for 5 hours at 37°C and then MIDAS was detected with DAB using an indirect streptavidin-biotin immunohistochemical method, according to the manufacturer's protocol (Histofine, Nichirei, Co. Ltd., Tokyo, Japan). The MIDAS protein expressed was semi-quantified by the density of staining.

Immunocytostaining of cultured cells

Cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 minutes at room temperature. After a wash with PBS, they were treated with 5% acetic acid in ethanol for 10 minutes at -20°C to permeabilize membranes, then incubated in a blocking buffer (3% BSA and 3% goat serum in PBS) and overnight at 4°C in the blocking buffer containing primary antibody. After another wash with PBS, the cells were incubated in the blocking buffer containing labeled secondary antibody and visualized with a confocal laser-scanning microscope (Fluoview FV300, Olympus, Tokyo, Japan). As an alternative, we used another method described (Bell et al., 2001). In brief, cells were fixed for 10 minutes with 4% paraformaldehyde and 4% sucrose without treatment for permeabilization and incubated with primary antibody, followed by secondary antibody.

Subfractionation of HeLa cells

Cells were homogenized as described (Trounce et al., 1996). The homogenate was applied to a 7-35% (w/v) Nycodenz preformed continuous density gradient and centrifuged in a swinging-bucket rotor at 77,000 g_{AV} for 4 hours. The fractions were collected from the top of the gradient. The MIDAS protein was semi-quantified by the density of total bands in western blots. The sub-organellar fractionation of mitochondria (fraction number 15) was performed as described (Kanamori et al., 2003).

Electron microscopy

Cells were cultured on plastic dishes and fixed with 2% glutaraldehyde in PBS. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead nitrate and examined with an H-7000 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

Flow cytometry

Living transfectants were stained with 20 nM MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes) or 100 nM MitoTracker Green (Molecular Probes) for 30 minutes at 37°C, treated with trypsin and subjected to a flow cytometric analysis with an *Epics Elite ESP* (Coulter).