

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

モデルマウスを用いた変異型ミトコンドリアゲノムの病原性発揮に関する研究

分担研究者 中田 和人 筑波大学生命環境系教授

研究要旨 ミトコンドリア病では、病原性突然変異型ミトコンドリアゲノム(変異型mtDNA)が優位に蓄積した臓器にのみミトコンドリア ATP 合成不全とそれによる病態が誘導される。この閾値効果は個々のミトコンドリアの分裂と融合による遺伝子産物の交換(ミトコンドリア間相互作用)によって形成されると考えられている。本研究では、この閾値効果の分子機構の一端を解明するため、病原性欠失突然変異型(欠失型)mtDNA を導入したモデルマウスの組織におけるミトコンドリアの分裂と融合に関わる因子群の発現と局在を詳細に調べた。その結果、欠失型 mtDNA の蓄積に応じてミトコンドリアの分裂が増強する可能性を見出した。

A . 研究目的

哺乳類の mtDNA には酸化的リン酸化に關与する 13 種の呼吸酵素複合体遺伝子とそれらを翻訳するための 22 種の tRNA と 2 種の rRNA がコードされているため、変異型 mtDNA の病原性はミトコンドリアのエネルギー産生不全に歸結される。しかし、この病原性の発揮には閾値効果が働くことが知られている。例えば、欠失型 mtDNA は細胞または組織に 80%以上蓄積した時にのみ、病原性を発揮する。分担研究者らは、細胞内の個々のミトコンドリアは分裂と融合を介して遺伝子産物の交換(ミトコンドリア間相互作用)が可能で、例えば、1) 欠失型 mtDNA の蓄積が 80%以下であれば、変異によって失われた遺伝子産物を野生型 mtDNA が相補できること、逆に 2) 欠失型 mtDNA が 80%以上蓄積した場合は野生型 mtDNA からの遺伝子産物を競合することで細胞内の全てのミトコンドリアが異常になってしまうという 2 つの相反する表現型(閾値効果)を形成する可能性を見出している。現在までに、このミトコンドリア間相互作用を担保する分裂・融合因子群(分裂は Mff, Drp1、融合は Mfn1, Mfn2, OPA1) が相次いで報告され、変異型 mtDNA の病原性発揮の分子基盤を解析できる状況がようやく整ってきた。

このような状況の中、欠失型 mtDNA を導入したモデルマウスの解析から(G3, 2013) 1) 50%程度の欠失型 mtDNA を蓄積する後期胚や出生後早期の個体の肝臓では正常なミトコンドリアと異常なミトコンドリアがモザイクに存在しており(ミトコンドリア間相互作用が不完全)結果的にエネル

ギー産生異常が誘導される(既知の病原性閾値以下で病態が発症してしまう) 2) 一方、50%程度の欠失型 mtDNA を蓄積する成体の肝臓では正常なミトコンドリアのみが存在していることを見出した。両者において欠失型 mtDNA の含有率は同程度であるため、2 つの表現型の差異は閾値効果の制御の違い(ミトコンドリアの分裂と融合による相互作用の違い)に由来すると考えられた。そこで、肝臓をモデル臓器として、欠失型 mtDNA の蓄積によるミトコンドリアの分裂・融合に關与する因子群の変化を探索した。

B . 研究方法

欠失型 mtDNA を 0-60%程度含有するマウス群(生後 4-6 ヶ月齡)から肝臓を単離し、タンパク質を抽出した。これらのタンパク質サンプルを電気泳動後、ミトコンドリアの分裂と融合に寄与する因子群に対する特異抗体を用いてウェスタンブロッティング法を行った。特に、ミトコンドリア分裂に寄与する Drp1 は分裂制御のためミトコンドリア外膜に局在することが知られているため、提出した肝臓サンプルの一部からミトコンドリアを分画し、サンプルとして用いた。

(倫理面への配慮)

本研究で実施した動物実験は、筑波大学動物実験委員会から承認された実験計画書をもとに、「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減等に関する基準」及び「文部科学省基本指針(研究機関等における動

物実験等の実施に関する基本指針)」等の関連規則に沿って、実験動物マウスの飼育、麻酔、処置、安楽死、さらには実験従事者の健康維持にも配慮した実験体制を実現し、施行したものである。

C . 研究結果

欠失型 mtDNA を含有するマウスから抽出した肝臓のミトコンドリアの分裂・融合に関する因子群の発現変化を探索すると、欠失型 mtDNA の蓄積に関わらず、分裂因子の Drp1 と融合因子の Mfn1, Mfn2, OPA1 の発現量は変化していなかった。しかし、分裂因子の Mff の発現量は欠失型 mtDNA の蓄積に依存して増加していた。Mff はミトコンドリア外膜に局在し、Drp1 のアクセプターとして分裂面を決定するため、肝臓組織からミトコンドリア画分を調整し、Drp1 の局在量を解析したところ(Drp1 は外膜に輸送後、分裂を惹起する) 欠失型 mtDNA の蓄積に依存して Drp1 のミトコンドリアへの局在が増加していることが分かった。

D . 考察

成体の肝臓では、ミトコンドリアの融合に関する因子群の発現量は欠失型 mtDNA の蓄積に関わらず一定であった。一方、欠失型 mtDNA の蓄積と相関して、Mff の発現増強、ならびに、Drp1 のミトコンドリア外膜への局在が増強されていた。Mff は Drp1 のアクセプターであり、Drp1 はミトコンドリア外膜に局在することでミトコンドリアの分裂を誘導するため、欠失型 mtDNA の蓄積による病原性制御にミトコンドリアの分裂が根源的な役割を果たしている可能性が想定できる。

そこで、現在、欠失型 mtDNA を含有するマウスの肝臓特異的に Drp1 を欠損させたマウスを作製し、その解析に着手している。このマウスを解析することで、閾値効果の形成におけるミトコンドリア分裂の生物学的重要性を解明できると考えている。

E . 結論

成体の肝臓では欠失型 mtDNA の蓄積と相関して、ミトコンドリア分裂が増強されることが分かった。この結果は、変異型 mtDNA 分子種の病原性発揮(閾値制御) にミトコンドリアの分裂が重要であることを示唆している。

F . 健康危険情報

なし。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Enoki S, Shimizu A, Hayashi C, Imanishi H, Hashizume O, Mekada K, Suzuki H, Hashimoto T, Nakada K, Hayashi JI. Selection of Rodent Species Appropriate for mtDNA Transfer to Generate Transmitochondrial Mito-Mice Expressing Mitochondrial Respiration Defects. *Exp Anim.* 2014; 63(1): 21-30.
- 2) Shimizu A, Mito T, Hayashi C, Ogasawara E, Kobayashi R, Negishi I, Takenaga K, Nakada K, Hayashi JI. Transmitochondrial mice as models for primary prevention of diseases caused by mutation in the *tRNA^{Lys}* gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111(8): 3104-9.
- 3) Takibuchi G, Imanishi H, Morimoto M, Ishikawa K, Nakada K, Toyama-Sorimachi N, Kikkawa Y, Takenaga K, Hayashi JI. Polymorphic mutations in mouse mitochondrial DNA regulate a tumor phenotype. *Mitochondrion.* 2013; pii: S1567-7249 (13) 00216-X.
- 4) Katada S, Mito T, Ogasawara E, Hayashi J, Nakada K. Mitochondrial DNA with a large-scale deletion causes two distinct mitochondrial disease phenotypes in mice. *G3 (Bethesda).* 2013 Sep 4;3(9):1545-52.
- 5) Mito T, Kikkawa Y, Shimizu A, Hashizume O, Katada S, Imanishi H, Ota A, Kato Y, Nakada K, Hayashi JI. Mitochondrial DNA mutations in mutator mice confer respiration defects and B-cell lymphoma development. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e55789.

2. 学会発表

- 1) Nakada K. Reverse genetic studies on mutant mitochondrial genomes in mice. The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria (Dynamito 2013). Oct 28-Nov 1, 2013, Okinawa, Japan.

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。