

突然変異型ミトコンドリアゲノム分子の病原性発揮に関する研究

研究分担者 中田 和人 筑波大学 生命環境系 教授

研究要旨

本研究では、変異型ミトコンドリアゲノム(mtDNA)を導入したマウス群の作製と活用から、変異型 mtDNA の病原性発揮機構の理解、ならびにこれらのモデルマウスを活用したピルビン酸ナトリウム療法の有用性を検討することを目的としている。今年度は、ヒトのミトコンドリア病である MERRF の症例から検出される mtDNA の tRNA-Lys に点突然変異を有するモデルマウスの作出に成功した。既に研究分担者はヒトのミトコンドリア病の KSS のモデルマウスを作製しているため、この2種のモデルマウスの保有によって、ミトコンドリア病の複数病型の形成機構の理解、ならびにピルビン酸ナトリウム療法の効果を広く検証できる研究環境がようやく整った。

A. 研究目的

ミトコンドリアゲノム(mtDNA)に生じた欠失突然変異や点突然変異が、ミトコンドリア病のみならず、糖尿病や神経変性疾患、さらにはがんや老化など、多様な疾患の遺伝的原因になる可能性が示唆され、変異型mtDNA分子種を起点とした多様な病態発症機構の存在が注目を集めている。このようなmtDNAの突然変異を起点とした病態発症機構の詳細理解、さらにはミトコンドリア病を主体とする疾患群の効果的かつ実践的な治療法の探索には、変異型mtDNA分子種を含有するモデル動物の作製が必須となる。しかし、このようなモデル動物の作製には技術的な限界があるため、変異型mtDNA分子種間の病原性比較はもとより、多様な病型形成に至る分子病理の解明は遅れている。

本研究では、変異型mtDNAを導入したマウス(ミトマウス)群の作製とその解析から、変異型mtDNAの病原性発揮機構の分子基盤とその病理の解明を目指すとともに、これらのモデルマウスを活用したピルビン酸ナトリウム療法の有用性を検討することを目的としている。

B. 研究方法

本研究の実施には、変異型mtDNA分子種を導入したモデルマウスの作出が必須である。しかし、mtDNAは外膜と内膜に閉ざされたマトリクス内に複数コピー存在するため、mtDNAにコードされた遺伝子の機能喪失や減弱は技術的に不可能であった。このようなことから、変異型mtDNAの逆遺伝学を基盤とした研究は展開できない状況が続いていた。このような状況の中、申請者らはマウス培養細胞に体細胞突然変異によって生じていた変異型mtDNAを含有するミトコンドリアを細胞質移植法によりマウス初期胚に導入するという新規視点を駆使して、欠失型mtDNAを含有するマウス(欠失型ミトマウス)の作製に成功している。この方法を応用し、点突然変異型mtDNAを含有するマウス(点変異型ミトマウス)の作製を試みた。(倫理面への配慮)

本研究全般は、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、施行するものである。また、本研究の一部は、筑波大学遺伝子実験委員会から承認された実験計画書もとに実施されるものである。

C. 研究結果

前述のように、ミトマウスの作製には体細胞突然変異によって生じた変異型mtDNA分子種を含有するマウス培養細胞の検索と確保が必須となる。そこで、マウス培養細胞のmtDNA分子種のスクリーニングを行った結果、mtDNAのtRNA-Lys遺伝子に点突然変異を有する培養細胞を見出すことに成功した。この点突然変異の病原性を検証した結果、培養細胞のミトコンドリア呼吸機能を低下させることが分かった。そこで、この細胞の核を脱核し、マウスES細胞に融合させ、mtDNAのtRNA_{Lys}遺伝子に点突然変異を有するマウスES細胞を樹立した。このES細胞からキメラマウスを作製し、さらに交配を重ね、全身の細胞にmtDNAのtRNA-Lys遺伝子に点突然変異を有するマウス(点変異型ミトマウス)の作製に成功した。

現状、点変異型ミトマウスの病態解析では、点変異型mtDNAの含有率がおおよそ70%を超えると握力低下所見と軽度ミトコンドリア呼吸機能異常が観察されている。

D. 考察

今回作製に成功した点変異型ミトマウスには、tRNA-Lys遺伝子に点突然変異が生じた病原性mtDNA分子種が導入されている。この点突然変異型mtDNAはヒトのミトコンドリア病の3大病型の1つであるMERRFの症例から検出される変異型mtDNA分子と類似しているため、点変異型ミトマウスはMERRFのモデルとなる可能性が高いと考えられる。現状、点変異型ミト

マウスに導入されている変異型mtDNA分子の個体濃縮率(含有率)が70%程度と比較的低いため、引き続き、交配を重ねることで、変異型mtDNA分子種をさらに濃縮させるとともに、老化によるMERRF様症状の発症を検討する必要がある。

前述のように、分担研究者は既にヒトのミトコンドリア病の3大病型の1つであるKSSのモデルマウスである欠失型ミトマウスを保持している。このため、今回作製に成功した点変異型ミトマウスとこの欠失型ミトマウスを駆使することで、ミトコンドリア病の少なくとも2つの病型の形成機構の詳細理解に向かえる研究環境がようやく整ったと言える。また、この2種のモデルマウスを用いてビルビン酸ナトリウム療法を検討することで、広くミトコンドリア病の治療法としての効果を検証できると考えている。

E. 結論

ヒトのミトコンドリア病であるMERRFの症例から検出されるmtDNAのtRNA-Lysに点突然変異を有するモデルマウスの作製に着手し、その作出に成功した。

現状、典型的なMERRF様の症状の発症には至っていないが、導入した点変異型mtDNAの交配による濃縮、ならびに老化による影響等を総合的に追跡観察することで、モデルマウスとして価値を明確にしていきたいと考えている。

F. 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, Koba 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

