

突然変異導入マウス作製による哺乳類ミトコンドリア ゲノムの生理的役割の全貌解明

Analysis of entire physiological roles of mammalian mtDNA
by generation of mice carrying various pathogenic mutations

林 純一 (HAYASHI JUN-ICHI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授



研究の概要

核外ゲノムである mtDNA の生理的役割の全貌解明のためには、mtDNA がコードする様々な遺伝子に様々な突然変異を導入したマウスを作出しなければならないが、その方法は確立されていない。本研究は培養細胞の mtDNA 集団に微量に存在する様々な体細胞突然変異の中から、病原性を持つ変異型 mtDNA を ES 細胞内に濃縮しこの変異型 mtDNA を導入した病態モデルマウスを作出する。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：病態モデル、ミトコンドリアゲノム変異、ミトコンドリア遺伝子疾患

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた我が国にとって老化、がん、生活習慣病、神経変性疾患は重大な社会問題である。近年、哺乳類では唯一の核外ゲノムであるミトコンドリアゲノム (mtDNA) のさまざまな病原性突然変異がこれら老化関連疾患で高頻度に観察されることからその原因になるという仮説 (老化ミトコンドリア原因説) が提出され大きな注目を集めるようになってきている。

しかしこの仮説は全て状況証拠に基づくもので、多くの未解決の問題がある。この仮説の検証のためには核ゲノムが同一で、mtDNA にのみ様々な突然変異を導入したモデルマウスの作出が有効であるが、現在までのところそのための手法は確立されていない。

2. 研究の目的

mtDNA の様々な突然変異が、老化と老化関連疾患 (がん、生活習慣病、神経編成疾患) の原因になるか否かを明確にすること、さらに、哺乳類 mtDNA がはたしている生理的役割の全貌を解明することを研究目的とする。

3. 研究の方法

本研究の目的達成のためには、mtDNA がコードする様々な遺伝子に様々な突然変異を導入したマウスを作出しなければならないが、その方法は確立されていない。

そこで本研究は培養細胞の mtDNA 集団に微量に存在する様々な体細胞突然変異の中か

ら、病原性を持つ変異型 mtDNA を ES 細胞内に濃縮しこの変異型 mtDNA を導入した病態モデルマウスを作出する戦略を立てた。

4. これまでの成果

研究成果 1 (Science 2008)

マウス肺がん細胞株である P29 細胞 (低転移性) と A11 細胞 (高転移性) のそれぞれの mtDNA 約 50 分子の全塩基配列を決定し、体細胞突然変異型 mtDNA の探索した結果、割合は少ないが様々な突然変異が存在することが明らかになった。

これらの中で、高転移性株である A11 細胞の mtDNA にのみ G13997A 突然変異が存在しており、A11 細胞は呼吸活性が低下していたことから、この体細胞突然変異が呼吸欠損と高転移性の原因である可能性があった。そこで P29 細胞と A11 細胞の間で mtDNA のみ完全に置換したサイブリッドを作製したところ、A11 細胞にのみ表現されていた呼吸欠損と高転移性は、A11 細胞の mtDNA に存在する G13997A 突然変異に起因することが明らかになった。

さらに活性酸素 (ROS) の産生量や核遺伝子の発現パターンの変化から、この体細胞突然変異が呼吸欠損を誘発することで過剰な ROS が発生し、その結果、核 DNA に存在する遺伝子の発現量が変化し低酸素でも生存できるような状態になるため高転移性を獲得することが証明された。この場合、ROS を除去する抗酸化剤を使用することにより、

転移が抑制されることから、転移の治療には抗酸化剤が有効であることも証明できた。
研究成果 2 (FEBS Lett. 2008)

上記 G13997A 突然変異型 mtDNA によって転移が誘発されるのは、呼吸欠損に伴う ROS の過剰産生以外に、解糖系の上昇 (Warburg 効果) の可能性が残されていた。この問題を解決するため、呼吸欠損による解糖系の上昇を伴うが、ROS を過剰産生しない大規模欠失突然変異型 mtDNA を導入したマウス肺がん細胞で転移能を調べた。その結果、この場合は転移能を誘発しなかったことから、Warburg 効果ではないことが証明された。

研究成果 3 (J. Biol. Chem. 2009)

上記の G13997A 突然変異型 mtDNA によって転移が誘発されるのは、呼吸欠損に伴う ROS の過剰産生であることが明確になったが、ROS がいかにして転移能を誘発するのかは不明であった。今回の結果から、PI3Kinase と AKT のシグナル経路を使って、低酸素誘導因子である HIF-1 α が安定化するために転移が誘発されることを証明した。

研究成果 4 (PLoS Genet, 2009)

これまで、ボトルネックは 1 つの細胞中に存在する mtDNA のコピー数が初期発生のある段階で急速に減少することによって生じるといわれてきた。この時期を特定するため、雌の生殖系列の細胞を対象に 1 個の細胞中の mtDNA のコピー数を定量した。

特に、このボトルネックの起こる時期はこれまでの発表された文献から、始原生殖細胞内で起こる可能性が高かったので、特に始原生殖細胞を重点的に調べた。その結果、予想に反して、いかなる時期の始原生殖細胞も 1,500 コピー/細胞以上のコピー数を有することから、コピー数の減少によるボトルネックは起こっていないことが明らかになった。

5. 今後の計画

研究成果 1 で述べた G13997A 突然変異型 mtDNA を 100% 持つミトマウスを作出し、この新しいミトマウスの生後の時間経過とともに病態を詳細に解析し、その成果を公表する予定である。

一方、マウス培養細胞に多数の体細胞突然変異型 mtDNA の存在を確認することができた。今後は G13997A 突然変異型 mtDNA と同様の手法を用いて、これらを 100% 持つミトマウスを樹立し、病態の多様性の有無を明らかにする予定である。

6. これまでの発表論文等

原著論文

1) Hiroshi Shitara, Midori Shimanuki, Jun-Ichi Hayashi, and Hiromichi

Yonekawa (2010) Global imaging of mitochondrial morphology in tissues using transgenic mice expressing mitochondrially targeted enhanced green fluorescent protein.

Exp. Anim. 59: 99-103.

2) Liqin Cao, Hiroshi Shitara, Michihiko Sugimoto, Kuniya Abe, Jun-Ichi Hayashi, and Hiromichi Yonekawa (2009) New evidence confirms that the mitochondrial bottleneck is generated without reduction of mitochondrial DNA content in early peimordial germ cells of mice.

PLoS Genet. 5: e1000756.

3) Nobuko Koshikawa, Jun-Ichi Hayashi, Akira Nakagawara and Keizo Takenaga (2009) Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway

J. Biol. Chem. 284: 33185-33194.

4) Kaori Ishikawa, Osamu Hashizume, Nobuko Koshikawa, Sayaka Fukuda, Kazuto Nakada, Keizo Takenaga, and Jun-Ichi Hayashi (2008). Enhanced glycolysis induced by mtDNA mutations does not regulate metastasis. FEBS Lett. 582: 3525-3530.

5) Kaori Ishikawa, Keizo Takenaga, Miho Akimoto, Nobuko Koshikawa, Aya Yamaguchi, Hirotake Imanishi, Kazuto Nakada, Yoshio Honma, and Jun-Ichi Hayashi (2008) ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. Science 320: 661-664.

6) Akitsugu Sato, Kazuto Nakada, Hiroshi Shitara, Atsuko Kasahara, Hiromichi Yonekawa, and Jun-Ichi Hayashi (2007) Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germcells with age.

Genetics 177:2031-2037.

7) Sin-Ichi Inoue, Mutsumi Yokota, Kazuto Nakada, Hiroyuki Miyoshi, and Jun-Ichi Hayashi (2007) Pathogenic mitochondrial DNA-induced respiration defects in hematopoietic cells result in anemia by suppressing erythroid differentiation.

FEBS Lett. 581:1910-1916.

総説

1) 石川 香、林 純一 (2009) がん転移ミトコンドリア原因説

蛋白質 核酸 酵素 54: 40-48.

ホームページ等

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~jih-kzt/>