

課題番号 52

病原性突然変異型 mtDNA を有する新規ミトコンドリア病 モデルマウスの樹立および病態解析

[1] 組織

代表者：谷 春菜

(筑波大学 生命環境科学研究科)

対応者：魏 范研

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

中田 和人 (筑波大学 生命環境系)

研究費：物件費 200,000 円

[2] 研究経過

ミトコンドリアは、エネルギー代謝を司る細胞内小器官であり、独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) を1細胞あたり数百-数千コピー有している。mtDNA は好気呼吸に不可欠な呼吸鎖複合体の構造遺伝子およびそれらの翻訳に必要な tRNA 遺伝子や rRNA 遺伝子をコードするため、病原性突然変異を有する mtDNA の蓄積は、ミトコンドリア呼吸機能不全を誘導し、ミトコンドリア病と総称される全身性の代謝疾患の原因となる。しかしながら、ミトコンドリア病の発症時期や症度は、病原性変異型 mtDNA の蓄積率や組織分布、患者の年齢や生活習慣などの様々な要因によって制御されると考えられており、発症機構には未解明な点が多い。

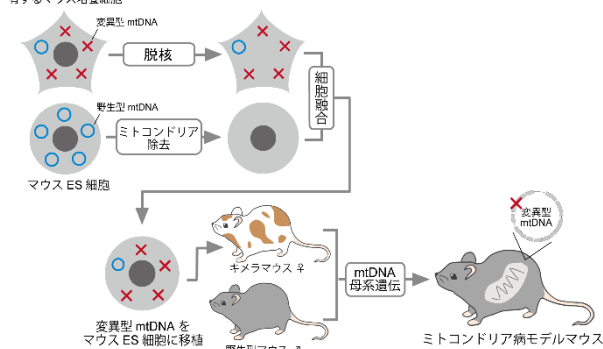
このような生体複雑系によって制御されるミトコンドリア病の多様な病型形成を理解し、治療法の開発へ応用するためには、病原性突然変異型 mtDNA を含有するモデルマウス群の作出と活用が有効な研究戦略となる。しかしながら、1細胞あたり数百-数千コピー存在する mtDNA に対する遺伝子操作は技術的に困難を極め、ミトコンドリア病が報告されてから 50 年以上経つが、変異型 mtDNA を有するモデル動物の報告はごく僅かである。

本研究では、ミトコンドリア病の病原性変異のホットスポットとして知られているミトコンドリア tRNA 遺伝子に着目し、シングルセルクローニングによる変異型 mtDNA の濃縮およびマウス ES 細胞へのミトコ

ンドリア移植を駆使する事で、生体内に点突然変異型 mtDNA と野生型 mtDNA が混在した状態で有する新規モデルマウスを樹立することに成功した。

したがって、2020 年度は、樹立したモデルマウスを用いて表現型解析および病態発症機序の解明を行う事を目的とした。特に変異型 mtDNA の蓄積による病態発症機序を明らかにする上で、ミトコンドリア tRNA の発現量および機能性を解析することは不可欠であり、受入れ研究室 (東北大・魏教授) との共同研究は必須であった。加えて、モデルマウスの表現型解析についても、受入れ研究室との議論および助言を踏まえたうえで遂行した。

(図 ミトコンドリア病モデルマウス作製方法概略)



以下、本共同研究による研究活動状況の概要を記す。

2020 年 7 月に受入れ研究室にて、病原性変異型 mtDNA の動態および病態発症機構についての研究討論を行い、新規研究計画の立案へと至った。加えて、モデルマウスの肝臓より抽出した RNA を用いて LC-MS/MS による tRNA 修飾解析を試みた。

2020 年秋以降は、コロナウイルス感染拡大の影響により、出張が難しくなったため、実施予定であった Northern blotting によるミトコンドリア tRNA の定量およびアミノアシル化 tRNA の定量については、プロトコルおよび実験機器を受入れ研究室より提供して頂き、筑波大学にて実験を行った。

また、本研究の遂行にあたり、リモート会議や電子メール等による頻繁な打ち合わせの機会を設けた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

生体内における変異型 mtDNA の組織間分布の差異や加齢に伴う含有率の変化は、変異型 mtDNA に由来する病態や重症度に大きな影響を及ぼすと考えられている。そこで、当該モデルマウスの主要な組織において変異型 mtDNA の含有率を調べたところ、組織間で含有率に差は見られず、全身に同等の割合で変異型 mtDNA を有することが示された。また、体内の変異型 mtDNA の割合は、年齢とともに変化することはなく、個体内で一定に保たれていた。

以上のモデルマウスの特徴を踏まえたうえで、表現型解析を行った。変異型 mtDNA の含有率が高い個体では、幼若期より高血糖を示し、加齢とともに2型糖尿病を発症する様子が見られた。加えて、成熟期において、高乳酸血症や組織におけるミトコンドリア機能低下など、ミトコンドリア病を再現する表現型が確認された。

また、本共同研究においては、当該モデルマウスの組織より抽出した RNA を用いた解析を重点的に実施した。変異型 mtDNA の含有率の高い一部の組織において、現状、Northern blotting による tRNA 発現量には有意な差は見られていない。しかしながら、組織内に RNA 前駆体が蓄積していることが明らかとなり、この様な RNA 前駆体の過剰な蓄積がミトコンドリア内翻訳を阻害している可能性が示唆された。同様の現象は、相同変異を有するミトコンドリア病患者の組織においても確認されており、ミトコンドリア病の病態発症機序の一部を再現したと結論した。また、ミトコンドリア tRNA に生じる修飾については、現在 tRNA の単離・精製条件を模索中であり、今後の課題である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究において、樹立および解析された変異型 mtDNA を有するモデルマウスは、ミトコンドリア病の発症機構の解明および治療法開発の前進につながる非常に重要な成果であり、生命科学のみならず臨床医学へ大きなインパクトを与えることが期待できる。

また、本共同研究を通じ、実験手法の獲得および学外研究者との活発な交流の機会を得ることができ、来年度以降の新規プロジェクトへの発展に繋がった。

[4] 成果資料

1. 谷 春菜, 石川 香, 林 純一, 中田 和人: 「病原性変異型 mtDNA を有するミトコンドリア関連疾患モデルマウスの樹立および病態解析」 第 67 回日本実験動物学会総会, 2020 年 5 月 (誌上開催)

2. 谷 春菜, 石川 香, 林 純一, 中田 和人: 「病原性変異型 mtDNA を有するミトコンドリア関連疾患モデルマウスの樹立および病態解析」 第 93 回日本生化学会大会, 2020 年 9 月 (オンライン開催)
3. 谷 春菜: 「ミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)}に点突然変異を有する新規モデルマウスの樹立および病態解析」 J-mit 特別オンラインシンポジウム, 2021 年 2 月 (オンライン開催)

本共同研究成果が掲載された原著論文については、現在投稿中である。