

課題番号 55

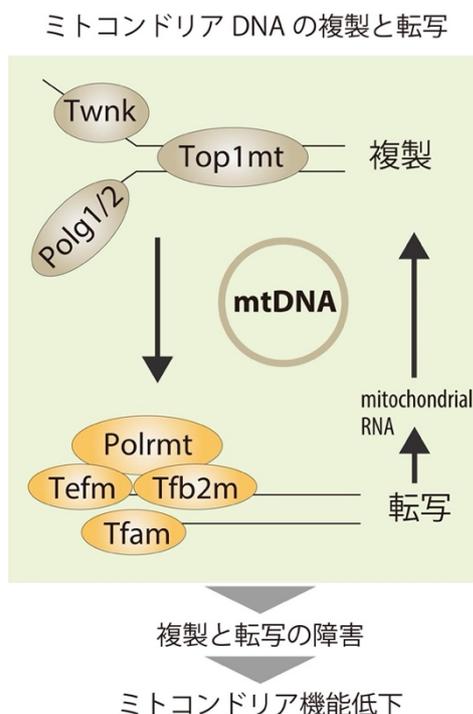
加齢に伴うミトコンドリア DNA 変異蓄積機構の解明

[1] 組織

代表者：安川 武宏
 (九州大学大学院医学研究院)
 対応者：魏 范研
 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 20 万

[2] 研究経過



ミトコンドリアは独自のゲノム、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を持つ。哺乳動物 mtDNA は約 16 キロ塩基対の環状ゲノムで、ヒトでは通常 1 細胞に数千コピー存在し、ATP の産生、そして物質輸送や代謝に必要なミトコンドリア膜電位の維持に重要な役割を果たす呼吸鎖酵素複合体のサブユニット遺伝子をコードしている。そして、核 DNA とは異なり、増殖細胞のみならず細胞分裂を停止した神経や筋肉の細胞でも複製を続けている (ターンオーバーしている)。それ故、mtDNA の正確な複製と適正な維持は一生涯を通じて必要不可欠であり、その重要性は mtDNA に生じたたった 1 塩基の変異や mtDNA のコピー数低

下といった異常がミトコンドリア病の発症原因となったり、様々な疾患と関連していることから明らかである。さらには、健常人において加齢に伴って mtDNA 変異が蓄積していくことが知られており、加齢におけるミトコンドリア機能低下への寄与が推定される。そして、mtDNA 変異の蓄積は、老齢期における mtDNA 複製の正確性の低下によって引き起こされると推定される。

上記の仮説を検証するため、本研究は加齢医学研究所が保有する老齢マウスと若年マウスの mtDNA 複製中間体を比較解析するという新しいアプローチで、一生涯複製を続ける mtDNA 複製メカニズムの老齢期に特徴的な変化を明らかにすることを目的として研究を行なった。

本研究においては、安川と魏の間で、ウェブツールを用いたリモート研究打ち合わせを頻回に実施し、マウス検体の採取と遺伝子発現解析実験の実施についてディスカッションを行なった。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

・加齢マウスの臓器採取と RNA 精製

本年度は、加齢研で飼育中の若齢マウス (3 ヶ月齢) と老齢マウス (24 ヶ月齢) から 1cm 四方の肝臓を摘出し、使用するまでに液体窒素で冷凍保存した。冷凍肝臓に 2 mL の TRIzol を加え、TissueRuptor を用いて均一にホモジナイズした後、Total RNA を抽出した。抽出した RNA は、定量 PCR を実施し、ミトコンドリア DNA の複製と転写に関連する遺伝子 (左図) の発現量を検討した。

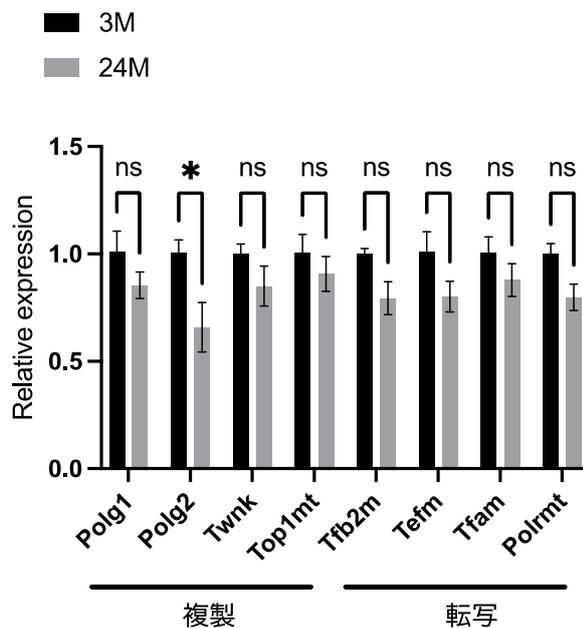
・加齢マウスの臓器採取と RNA 精製

左図に示されているように、ミトコンドリア DNA の複製に重要な因子として、Twink、Top1mt、Polg1/2 が知られている。Twink は DNA ヘリカーゼ、Top1mt は DNA トポイソメラーゼであり、二本鎖 DNA を一本鎖に解くのに必要である。Polg1/2 はミトコンドリア DNA 特異的な DNA ポリメラーゼであり、複製を担う酵素である。

ミトコンドリア DNA からは mRNA、tRNA、rRNA が転写され、電子伝達系を構成するサブユニットの翻訳に使用される。転写に関わる因子のうち、ミトコン

ドリア DNA に結合する転写複合体を構成するのは、Tefm、Tfb2m、Tfam、Polrmt であり、いずれも転写に不可欠である。また、転写産物であるミトコンドリア RNA (mitochondrial RNA) は、タンパク質翻訳に使用される以外に、複製時のプライマーとしても使用されることが知られている。このように、ミトコンドリアの複製と転写は密接にカップリングしている。そこで本研究は、加齢によってこれら複製と転写に関わる因子が遺伝子発現レベルでどのように変動するかを検討した。

定量 PCR の結果は下記の通りである。



上記のグラフが示すように、ミトコンドリア DNA の複製と転写に関わる遺伝子群の発現量は、若齢マウス (3ヶ月齢) に比べて、老齢マウス (24ヶ月齢) の肝臓において低下する傾向が認められ、特に DNA の複製に関わる Polg2 の発現量は、老齢マウスの肝臓で有意に低下した (* $P < 0.05$)。Two-way ANOVA を用いて群間の差を統計解析した結果、若齢マウス群と比べて、老齢マウス群における遺伝子発現量は有意に低下していた ($P < 0.0001$)。

ミトコンドリアの機能低下が老化原因のひとつであるが、その分子機序に不明な点が多い。本研究により、ミトコンドリア DNA の複製と転写に関わる遺伝子群が老化に伴って低下し、ミトコンドリア機能低下の原因になりうることが示唆された。今後は、さらに例数を増やし再現性を検討するとともに、これら遺伝子群の転写に関わる転写調節因子の発現量やミトコンドリア DNA のコピー数についても検討する予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

老齢化に伴って引き起こされる mtDNA 複製中間体の変化を、老齢マウスと若年マウスの mtDNA の直接的な比較によって捉えることから、加齢に伴って mtDNA 複製メカニズムがどのように変動するのかを明らかにすることができれば、加齢に伴う mtDNA 変異の蓄積のメカニズムを明らかにすることができる。また、加齢に伴う mtDNA 変異は、ミトコンドリア病でみられる変異と同じ変異であることもあり、疾患においてどのようにして変異が生じるかという問題にも切り込む糸口となることが期待される。

[4] 成果資料

本研究は進行中であるため、2020 年度における論文発表はなし。