

変異型ミトコンドリア DNA の蓄積におけるオートファジーの生物学的意義の検証

照井 一葵（筑波大学生物学類）

指導教員：石川 香（筑波大学生命環境系）

【背景・目的】

ミトコンドリアは細胞内に存在する極めて重要な小器官であり、生体エネルギーの主な供給源となる ATP を産生している。その ATP 産生は、ミトコンドリア内膜に存在する呼吸酵素複合体が担う酸化的リン酸化によって行われることが知られている。さらに、ミトコンドリアには独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) が存在し、哺乳類の1細胞あたりには数百から数千コピーもの mtDNA が含まれるとされる。mtDNA は、呼吸酵素複合体を構成する 13 種類のサブユニットをコードする構造遺伝子に加え、2 種類の rRNA 遺伝子および 22 種類の tRNA 遺伝子をもつため、その変異は呼吸機能をはじめとする多様な細胞機能に直接的な影響を及ぼす可能性があると考えられる。こうした影響の顕著な例として、病原性の突然変異が一定以上蓄積することで発症するミトコンドリア病が挙げられる。ミトコンドリア病では、低体重や腎不全、心伝導障害といったさまざまな症状が報告されており、その分子病態解明や治療法の確立が強く望まれている。

一方で、ミトコンドリア病の原因の一つとして、mtDNA に生じる大規模欠失突然変異 (Δ mtDNA) が知られている。ヒトにおいては、 Δ mtDNA が蓄積することで CPEO (Chronic progressive external ophthalmoplegia) や KSS (Keams-Sayre syndrome) などの深刻な症状を示すことが明らかになっている。また、所属研究室ではこのヒト Δ mtDNA と非常によく似た欠失領域をもつ Δ mtDNA を蓄積するモデルマウス (mito-mice Δ) の樹立に成功している。mito-mice Δ では、臓器ごとに Δ mtDNA の含有率 (Δ 率) が異なっており、心臓や腎臓では Δ 率が高く蓄積する場合が多いのに対し、膵臓や肝臓では Δ 率が 60% を超えることは少なく、顕著な障害が起りにくいという臓器間の差異が観察されている。この「臓器によって Δ mtDNA の蓄積の程度が異なる」という事実は、組織特異的なミトコンドリア病症状の発現メカニズムを理解する上で極めて重要であるが、その調節機構は依然として十分に解明されていない。

近年、細胞内において機能不全に陥ったミトコンドリアを選択的に分解するオートファジー機構、特にマイトファジーが注目を集めている。マイトファジーは、質的に損傷を受けたミトコンドリアを除去することで細胞環境の恒常性維持に貢献していると考えられる。この過程が各臓器でどの程度活性化されているかによって、 Δ mtDNA の蓄積パターンが変化し、結果として臓器ごとの病態発現に大きな影響を及ぼす可能性が示唆される。しかしながら、心臓や腎臓が高い Δ 率を示して重篤化しやすい一方、膵臓や肝臓では Δ 率があまり上昇せず顕著な障害を呈しにくいという現象が、具体的にどのようにマイトファジー（あるいはその他の機構）と関連しているのかは十分に理解されていない。

そこで本研究では、同一個体においても比較的 Δ 率が蓄積しにくい傾向を示す可能性がある臓器として「膵臓」に着目した。膵臓は、インスリンやグルカゴンなどのホルモン分泌を司る内分泌機能や、消化酵素を分泌する外分泌機能を同時に担っており、生体の代謝バランスを維持する上で重要な役割を果たしている。もし膵臓の Δ mtDNA の蓄積抑制メカニズムがマイトファジーと関連し

ていれば、それがミトコンドリア病の臓器特異的発現を理解する新たな手がかりとなる可能性が高い。本研究の目的は、mito-mice Δ を用いて膵臓における Δ 率やオートファジー活性を中心に解析し、心臓や腎臓とは異なる蓄積抑制様式の有無を明らかにすることである。さらに、これらの知見をもとに、肝臓・膵臓に共通する臓器特異的なマイトファジー活性やその他の調節経路について検証し、ミトコンドリア病の多様な病態発現メカニズムの解明に貢献することを目指す。

【材料】

5-7 か月齢の GFP-LC3/mito-mice Δ から摘出した膵臓を用いた。摘出した膵臓の Δ 率を定量し、その値に基づいて 0%、0~29% (low)、30~49% (middle)、50%以上 (high) の 4 群に分類した。続いて、GFP で標識した LC3 トランスジェニックマウスと mito-mice Δ マウスを交配し、GFP-LC3/mito-mice Δ 二重トランスジェニックマウスを樹立して各群の解析に用いた。

【方法】

マウスの膵臓から作製した組織切片において、オートファジーに関与する LC3 の局在を GFP の蛍光として、かつ、ミトコンドリア外膜受容体 Tom20 を免疫染色による蛍光として、それぞれ検出することで、オートファジーおよびマイトファジーの発生頻度を腺房細胞とランゲルハンス島において評価した。

【結果・考察】

腺房細胞では、 Δ 率が 50% 以上 (High 群) の場合、他の群と比較してオートファジーおよびマイトファジーの蛍光シグナル（発生頻度）が有意に亢進していた。一方、ランゲルハンス島では、 Δ 率によるそれらの有意な差は認められなかった。これらの結果から、腺房細胞では Δ 率が 50% を超えるとオートファジーおよびマイトファジーの活性が増強され、 Δ mtDNA を多含するミトコンドリアが分解されることで、 Δ 率の更なる上昇（蓄積）が抑制されている可能性が示唆された。

【展望】

腺房細胞とランゲルハンス島でオートファジーやマイトファジーの活性に差が認められたことから、両者における Δ 率を比較しつつ、これらの機構がどの程度関与しているかを検討したい。また、各群におけるオートファジー関連タンパク質 (LC3, p62) およびマイトファジー関連タンパク質 (BNIP3, NIX, PINK1, PARKIN) の発現量をウェスタンブロッティングにより定量し、比較解析する計画である。