

平成 22年 4月 14日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19100007

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Analysis of entire physiological roles of mammalian mtDNA by generation of mice carrying various pathogenic mutations

研究代表者

林 純一（HAYASHI JUN-ICHI）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：60142113

研究代表者の専門分野：分子細胞生物学

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. 研究計画の概要

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戦略をとる。

## 2. 研究の進捗状況

## (1) 研究成果 1 : Science 2008

マウス肺がん細胞株である P29 細胞（低転移株）と A11 細胞（高転移株）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、様々な変異が存在することが明らかになった。

この中で高転移株 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。そこで P29 細胞と A11 細胞の間で mtDNA のみ完全に置換したところ、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 G13997A 突然変異に起因することが明らかになった。

さらに、この変異が呼吸欠損を誘発することで過剰な活性酸素（ROS）が発生し、核 DNA 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。

## (2) 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。

## (3) 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  $\alpha$  が安定化するために転移が誘発されることを証明した。

## (4) 研究成果 4 (PLoS Genet, 2009)

ボトルネックの起こる時期は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。

## 3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

（理由）研究目的の一つである mtDNA の新規機能（転移能の誘発）を発見し、Science に報告した（5. 代表的な研究成果の⑥を参照）。また、転移能を誘発する G13997A 突然変異 mtDNA を持つミトマウスの作出に成功したためである（論文投稿準備中）。

#### 4. 今後の研究の推進方策

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できたことから、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。

#### 5. 代表的な研究成果

(下線は研究代表者、研究分担者)

(1) 雑誌論文 (計 31 件)

(下記論文は全て査読有)

① Hiroshi Shitara, Midori Shimanuki, Jun-Ichi Hayashi, and Hikomichi 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 Hikomichi Yonekawa (2009) New evidence confirms that the mitochondrial bottleneck is generated without reduction of mitochondrial DNA content in early perinatal 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 $\alpha$  gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway *J. Biol. Chem.* 284: 33185-33194.

④ 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.

⑤ 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.

<https://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/handle/2241/101219>

⑥ 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.

<https://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/handle/2241/101575>

⑦ Akitsugu Sato, Kazuto Nakada, Hiroshi Shitara, Atsuko Kasahara, Hikomichi Yonekawa, and Jun-Ichi Hayashi (2007) Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germ cells with age. *Genetics* 177:2031-2037.

⑧ Shin-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.

[学会発表] (全て招待講演、計 21 件)

① Jun-Ichi Hayashi The 7th European meeting on mitochondrial pathology (EUROMIT VII) -From basic mechanisms to disease and ageing- Role of mtDNA mutations in metastasis. City Conference Centre, Stockholm, Sweden 2008. 6 13.

[図書] (計 8 件)

① Kaori Ishikawa and Jun-Ichi Hayashi (2009) Mitochondrial function, Part B (Edited by W. S. Allison and Anne N. Murphy, Academic Press) Generation of mtDNA-exchanged cybrids for determination of the effects of mtDNA mutations on tumor phenotypes *Methods in Enzymology* 457, pp. 335-346.

[その他]

林研究室HP (特集ページ)

[http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~jih-kz/paper/paper\\_impact\\_science0408J.htm](http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~jih-kz/paper/paper_impact_science0408J.htm)

筑波大学公式HP (プレス用)

[http://www.tsukuba.ac.jp/public/press/080402press\\_mitochondria.pdf](http://www.tsukuba.ac.jp/public/press/080402press_mitochondria.pdf)

筑波大学生物学類 HP

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/cbs/sai/sinjyouhou.html>

筑波大学大学院生命環境科学研究科生物科学専攻HP (トピックス記事)

<http://www.mbs.life.tsukuba.ac.jp/top/ics-log-2.html>

共同通信 / 2008年04月04日

<http://www.47news.jp/CN/200804/CN2008040401000015.html>

日本学術振興会 最近の研究成果

[http://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/3\\_1\\_result/seibutsu/23\\_hayashi.html](http://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/3_1_result/seibutsu/23_hayashi.html)