

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22680035

研究課題名（和文） ミトコンドリアDNA量の制御因子の探索と生理的機能の解明

研究課題名（英文） Investigation and physiological analysis of the quantity control factor of mitochondrial DNA

研究代表者

設楽 浩志 (SHITARA HIROSHI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・基盤技術研究職員

研究者番号：90321885

研究成果の概要（和文）：哺乳類ミトコンドリアDNA (mtDNA) は細胞内に複数コピーとして存在し、その数は遺伝的、環境的要因による影響を受けるとされる。本研究では、これらの因子の探索を行った。また遺伝的因子としてmtDNA量制御に関与する遺伝子の一つを過剰発現させたときの効果をマウスモデルにより検討した結果、欠失型mtDNA変異によるミトコンドリア機能低下や症状を抑制・防止する一定の効果が示された。

研究成果の概要（英文）： Mitochondrial DNA (mtDNA) in mammalian cells exists as multiple copies, which are regulated by various genetic and environmental factors. In this study, we analyzed the regulatory effect of mitochondrial transcription factor A (*Tfam*) and observed that its overexpression improves the symptoms of mitochondrial deficiency in a mouse model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：遺伝学、ミトコンドリア、ミトコンドリアDNA、ミトコンドリアDNA量

1. 研究開始当初の背景

高等動物には核DNAとmtDNAが存在しており、ともに遺伝情報の担い手であるが、この両者の遺伝的特徴および遺伝様式は大きく異なる。核DNAは母親と父親の双方から受け継がれるが、mtDNAは一般的に母親からのみ受け継がれる。また、mtDNAは細胞1つあたり多くの分子が存在しており、mtDNA遺伝には“量”の概念を認識しておく必要があると考えられる。一方、mtDNAは核DNAと比較すると突然変異率が

十数倍程度高いことが報告されており、特にヒトにおいてmtDNA上に生じた変異がミトコンドリア機能に影響を与える場合には、重篤な症状を示すミトコンドリア病を引き起こすとされている。こうした病的変異型mtDNAが生体に与える影響については、変異そのものの側面から生物学的・臨床医学的に多くの解析が行われているものの、mtDNA量が及ぼす影響についてはそれほど理解が進んでいない。一般に生体において、細胞あたりの（また

は核DNAを基準とした) mtDNA 量は組織・細胞種ごとに異なることが知られている。体細胞ではmtDNAコピー数は1000-10000コピー程度とされているが、例えば前核期受精卵のmtDNAコピー数は100000 コピー以上が存在する。これまでに、mtDNA 量を制御する遺伝的因子として、ミトコンドリア転写因子A (*Tfam*) などが報告されている。また他の報告では、体温調整システムなどが、mtDNA コピー数の制御に関与していることが示されている。ミトコンドリアはエネルギー産生の役割を担っていることから、ミトコンドリア機能を維持するのに、一定のmtDNA コピー数を保持することが必要であると思われ、そのためmtDNA コピー数変動が生理条件に影響を与える可能性が強く想定される。特にヒトミトコンドリア病における発症・症状のメカニズムとして、mtDNA 上の変異の他に、mtDNA 量あるいはその制御因子が直接・間接的に関わっている可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、mtDNAコピー数を制御している遺伝的・環境的要因についてマウス個体を用いて探索・検討し、その変化が生体へ与える生理的影響についての解析を目的とした。特に、組織間におけるmtDNA量の測定・比較検討を行うことで基本的な情報を収集し、これらのmtDNA量やその制御因子、特に*Tfam*の過剰発現がミトコンドリア活性、さらに生体へ与える生理的影響を検討し、これらが関わる疾患へアプローチすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組織におけるmtDNA量の相対定量解析

各組織におけるmtDNA量の相対定量解析を行うために、組織より総DNAを調整し、リアルタイムPCR法によって核DNAおよびmtDNA量を測定することで、核DNAに対するmtDNA量の相対定量を行った。

(2) ミトコンドリア形態学的解析

各組織・細胞におけるミトコンドリアの形態学的解析を行うために、蛍光タンパクでミトコンドリアを標識したトランスジェニック (Tg) マウスの組織においてミトコンドリアの蛍光観察を行った。また、電子顕微鏡による観察によって、ミトコンドリアの詳細な形態学的解析を行った。

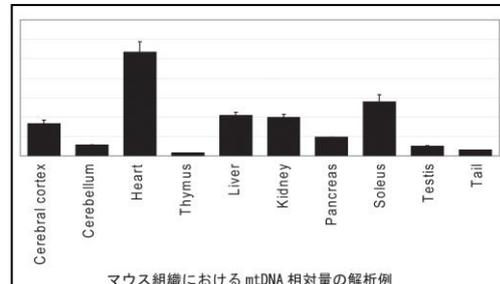
(3) *Tfam*/EGFP過剰発現によるミトコンドリア機能と生体機能の解析

*Tfam*過剰発現がミトコンドリア機能や生体へ与える影響について解析を行うために、*Tfam*/EGFPを過剰発現させたTgマウスを用いて、mtDNAの相対定量、RT-PCR、ノーザンブロッ

ト法、免疫染色法、ミトコンドリア活性染色法によって解析を行った。また、病的変異型mtDNAを有するモデルマウスとの交雑により、ミトコンドリア機能不全条件下における*Tfam*/EGFP過剰発現の効果についても、同様の手法を用いて検討を行った。

4. 研究成果

(1) 組織における mtDNA 量の相対定量解析
マウス各組織における mtDNA/核DNA 量を測定し、さらに組織間における比較解析を行った。マウスにおいて、mtDNA 量は週齢や食餌を含め飼育条件などによる影響を受ける可能性があるが、当施設における飼育環境下における mtDNA 量に関する基礎的データの取得を目指し測定を実施した。現在のところ、調べた組織のうちでは胸腺の mtDNA/核DNA 量が最も低いことが示された。そこで、胸腺 mtDNA



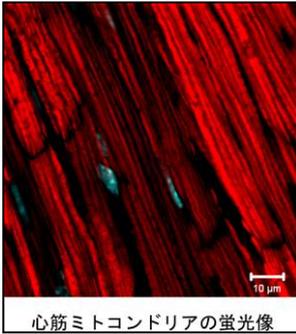
量を基準として、他組織における mtDNA 量を解析した結果、心臓や骨格筋など筋組織における mtDNA/核DNA 量が高い様子が観察された。

以上の結果から、mtDNA は各組織に応じてその量がほぼ規定されていることが推定される。現在、これらのデータを元に、週齢、系統、飼育環境による mtDNA 量の変化についてさらなる検討を行っている。

(2) ミトコンドリア形態学的解析

生体内においてミトコンドリアの形態を解析するため、ミトコンドリア局在型 DsRed2 の融合遺伝子が導入された Tg マウスを用いた解析を行った。本 Tg マウス由来の初代接着性培養細胞を、ミトコンドリア特異的染色色素である MitoTracker Green によって染色し、蛍光観察を行ったところ、DsRed2 と MitoTracker の蛍光像が一致したことから、DsRed2 によってミトコンドリアが標識されていることが示された。また、同系統同ラインのマウス個体間における蛍光強度についても大きな差は認められなかった。さらに、COX/SDH 染色を行ったところ、Tg マウスと野生型マウスとの間で大きな差は認められず、同等の活性があることが示された。

生体におけるミトコンドリア形態について、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。心筋では心筋線維に沿ってミトコンドリアが配置する様子や、肝臓の細胞では細胞質全体に分布する様子が観察された。膵臓では、腺房細胞に



おいて膵島細胞よりもサイズの大きいミトコンドリアが観察され、同じ組織においても細胞種が異なる場合には、ミトコンドリア形態が異なるケースもあることが示された。以上の結果から、ミトコンドリア形態や存在様式は組織・細胞種によって大きく異なり、おそらくは分化した細胞の機能に応じた多様性を示しているものと考えられる。

(3) *Tfam*/EGFP 過剰発現によるミトコンドリア機能と生体機能の解析

Tfam は mtDNA の複製・転写・安定化などに関わる遺伝子であり、過剰発現させたときには mtDNA 量が増加することが知られている。生体における *Tfam* 過剰発現の影響を調べるために、*Tfam*/EGFP の融合遺伝子を過剰発現させた Tg マウスを用いた解析を行った。

本 Tg マウスにおける導入遺伝子の発現を、リアルタイム RT-PCR によって確認した。また、ウエスタンブロット法や免疫電子顕微鏡法によって、ミトコンドリア内において EGFP のシグナルが検出されることを観察した。mtDNA 量に対する効果を確認するために、野生型との比較を、mtDNA 相対定量解析によって、各組織において実施した。その結果、多くの組織において mtDNA 量が増加している様子が観察された。ミトコンドリア活性について検討するため COX/SDH 染色を行った結果、野生型との比較で大きな差は認められなかった。

一方で、大規模欠失変異型 mtDNA を有するミトコンドリア疾患モデルマウスにおいて *Tfam* を過剰発現させたときには、野生型のと看同様に mtDNA 量が増加する様子を観察した。また COX/SDH 染色を行った結果、通常であれば病的表現型が示される変異型 mtDNA の割合の状態においてもミトコンドリア活性が野生型と比較し維持されていることが示された。さらに生理学的解析を行った結果、疾患モデルマウスと比較すると血中尿素窒素値の上昇が抑えられており、また腎臓では尿細管の拡張などの異常な形態が観察されず、症状の改善がみられた。生存率の解析結果では、生存期間の延長効果も観察された。

本知見から、変異型 mtDNA が原因となる機能障害には、変異型 mtDNA 割合だけではなく、ミトコンドリア機能を維持するための何らかの戦略が関与していると推測される。本実験におけるマウス系統では mtDNA 量が増加しており、発症抑制効果との関連についてさらなる解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① T. C. Esteves, O. E. Psathak, M. J. Pfeiffer, S. T. Balbach, D. Zeuschner, H. Shitara, H. Yonekawa, M. Boiani: Mitochondrial physiology and gene expression analyses reveal metabolic and translational dysregulation in oocyte-induced somatic nuclear reprogramming. PLoS One 7:e36850, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0036850. (査読有)
- ② J. Yamaguchi, S. Nishiyama, M. Shimanuki, T. Ono, A. Sato, K. Nakada, J.-I. Hayashi, H. Yonekawa, H. Shitara: Comprehensive application of an mtDsRed2-Tg mouse strain for mitochondrial imaging. Transgenic Res. 21:439-447, 2012. DOI: 10.1007/s11248-011-9539-1. (査読有)
- ③ 設楽浩志、米川博通: マウスにおける mtDNA 遺伝様式: 母性遺伝と急調分離. Plant Morphology 23:35-40, 2011. (査読無)
- ④ S. Nishiyama, H. Shitara, K. Nakada, T. Ono, A. Sato, H. Suzuki, T. Ogawa, H. Masaki, J.-I. Hayashi, H. Yonekawa: Over-expression of *Tfam* improves the mitochondrial disease phenotypes in a mouse model system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 401:26-31, 2010. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.08.143. (査読有)
- ⑤ M. Yokota, H. Shitara, O. Hashizume, K. Ishikawa, K. Nakada, R. Ishii, C. Taya, K. Takenaga, H. Yonekawa, J.-I. Hayashi: Generation of trans-mitochondrial mito-mice by the introduction of a pathogenic G13997A mtDNA from highly metastatic lung carcinoma cells. FEBS Lett. 584:3943-3948, 2010. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.07.048. (査読有)

- ⑥ 設楽浩志、曹麗琴、米川博通：哺乳動物におけるミトコンドリア DNA の遺伝様式：急調分離とボトルネック効果. 細胞工学 29:461-465, 2010. (査読無)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 島貫碧：マウス組織におけるミトコンドリア DNA 量の相対定量解析. 日本ミトコンドリア学会第12回年会 2012年12月19-21日. つくば.
- ② 島貫碧：マウス組織におけるmtDNA量およびミトコンドリアの転写と複製に関わる遺伝子群の発現量解析. 第59日本実験動物学会総会 2012年5月24-26日. 大分.
- ③ 山口潤也：Tfam/EGFP過剰発現マウスにおける異質性ミトコンドリアDNA分離様式の解析. 第59日本実験動物学会総会 2012年5月24-26日. 大分.
- ④ 設楽浩志：ミトコンドリア転写因子A過剰発現によるミトコンドリア機能低下の抑制効果. 第84回日本生化学会大会 (シンポジウム) 2011年9月21-24日. 京都.
- ⑤ J. Yamaguchi: mtDsRed2 transgenic mice contribute to studies on mitochondrial morphology. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia) & 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) & 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-Mit), Kagoshima, August 31 - September 4, 2011.
- ⑥ 設楽浩志：Tfam過剰発現によるミトコンドリア疾患の発症抑制効果モデル. 第25回モロシナス研究会 2011年7月8-9日. 新潟.
- ⑦ 山口潤也：mtDsRed2-Tgシステムを用いたミトコンドリア形態解析. 第25回モロシナス研究会 2011年7月8-9日. 新潟.
- ⑧ J. Yamaguchi: Mouse strain mtDsRed2-Tg strain: A powerful tool for mitochondrial imaging. The 8th European Meeting on Mitochondrial Pathology (Euromit 8), Zaragoza, Spain, June 20-23, 2011.
- ⑨ H. Shitara: Over-expression of mitochondrial transcription factor A prevents effectively the onset of mitochondrial disease in a mouse model system. The 8th European Meeting on

Mitochondrial Pathology (Euromit 8), Zaragoza, Spain, June 20-23, 2011.

- ⑩ 島貫碧：C57BL/6J-mtsprコンプラステック系統における組織mtDNA量の相対定量解析. 第58日本実験動物学会総会 2011年5月25-27日. 東京.
- ⑪ 設楽浩志：マウスモデルを用いたTfam過剰発現によるミトコンドリア機能低下の抑制効果の解析. 第58日本実験動物学会総会 2011年5月25-27日. 東京.
- ⑫ 山口潤也：ミトコンドリア形態解析法としてのmtDsRed2-Tgシステムの有用性. 第58日本実験動物学会総会 2011年5月25-27日. 東京.
- ⑬ S. Nishiyama: Mitochondrial Disease Therapy by *Tfam* Over-expression in a Mouse Model System. Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (7th ASMRM) and Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (10th J-mit), Fukuoka, December 16-18, 2010.
- ⑭ 設楽浩志：マウスにおけるmtDNA遺伝様式. 日本植物学会第74回大会 (シンポジウム) 2010年9月9-11日. 春日井.
- ⑮ 設楽浩志：ミトコンドリアボトルネック効果はmtDNAコピー数の減少が原因ではないことの新たな証拠. 第57日本実験動物学会総会 2010年5月12-14日. 京都.

[図書] (計 2 件)

- ① 設楽浩志、エル・アイ・シー、外来性ミトコンドリア導入によるミトコンドリアDNAヘテロプラズミーマウス系統の樹立、生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール、2011、652-655.
- ② 林純一、設楽浩志、佐藤晃嗣、京都大学学術出版会、卵子ミトコンドリアDNA、卵子学、2011、338-348.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

設楽 浩志 (SHITARA HIROSHI)
公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・基盤技術研究職員
研究者番号：90321885

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし