

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17767

研究課題名（和文）加齢に伴うミトコンドリアDNA複製の変容と新規老化制御機構の解明

研究課題名（英文）Changes in mitochondrial DNA replication during aging and new mechanisms to control aging

研究代表者

松田 盛（Matsuda, Shigeru）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：00884272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアゲノムであるmtDNAは1細胞あたり数千コピー存在し、絶えず自己複製を続ける。mtDNAは疾患以外に加齢でも低下が認められ老化による機能低下の一因と考えられている。mtDNA複製酵素POLGとTEFMが結合することとTEFMは加齢により低下することから、TEFMがmtDNA複製との関与が推察された。TEFM欠失細胞の解析から、mtDNAのコピー数低下、複製の中間体の減少、転写産物の著減が観察され、ミトコンドリア機能低下を示すことが示唆された。老化によるTEFM機能低下はmtDNA複製・転写の双方を減少させ、ミトコンドリア機能低下をきたすことが推察される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア機能は細胞のエネルギー供給源であると同時に様々な代謝経路に関与する重要なオルガネラである。老化に伴うミトコンドリア機能低下を適切にコントロールすることが可能となれば、健康寿命延長につながる。今回ミトコンドリア機能維持に必須のmtDNA維持と老化においてTEFMタンパク質が重要な役割を担っていることを示唆する結果を得た。TEFMの発現量をコントロールすることで、ミトコンドリア機能を補助し、QOLを保ったまま老いることができる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：The mitochondrial genome, mtDNA, contains several thousand copies per cell and continuously replicates itself. mtDNA is thought to be one of the causes of functional decline due to aging as well as disease. MtDNA replication enzyme POLG binds to TEFM and TEFM is decreased with aging, suggesting that TEFM is involved in mtDNA replication. Analysis of TEFM-deficient cells revealed a decrease in mtDNA copy number, a reduced volume of replication intermediates, and a severe decrease in transcripts, suggesting that mitochondrial function is impaired. Our results indicate that senescence-induced TEFM function loss reduces mtDNA replication and transcription, resulting in mitochondrial dysfunction.

研究分野：ミトコンドリア

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリアDNA 老化

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物 mtDNA は約 16 キロ塩基対の環状ゲノムで、ATP の産生や代謝に必要なミトコンドリア膜電位の維持に不可欠である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。それ故、mtDNA の正確な複製と適正な維持は一生を通じて必要不可欠であり、その重要性は mtDNA の点変異や mtDNA の欠損がミトコンドリア病に代表される難治性代謝疾患の発症原因となることから明らかである。さらには、健康人において加齢に伴う mtDNA の変異やコピー数の低下が知られ、加齢におけるミトコンドリア機能低下への寄与が示唆されている。mtDNA 複製様式は非常に複雑であり、核 DNA 複製にはない多様性を有する。複製に関わる因子は DNA 構造調節に関わる TWINKLE と TOP1MT、DNA ポリメラーゼ POLG など知られるのみである (図 1)。これらの欠損あるいは変異は、mtDNA コピー数低下を引き起こすことで、神経障害や早老症をきたす。上記以外にどのような制御因子が存在するか、どのように多様な複製様式が使い分けされるかなど、mtDNA 複製機構の全貌は不明であった。

超高齢化社会に突入している現在においては、加齢の分子機構を理解し、老化制御を実現することが喫緊の課題である。その中でミトコンドリア機能低下が個体老化の要因のひとつであることは広く受け入れられており、mtDNA 複製の破綻も個体老化の起因たりうる。我々は mtDNA 複製の核心因子である mtDNA ポリメラーゼに結合する新規因子として TEFM を同定し、さらに TEFM の発現量が加齢で有意に低下することを発見した。これより TEFM の機能として mtDNA 複製に関与することが強く示されていた。

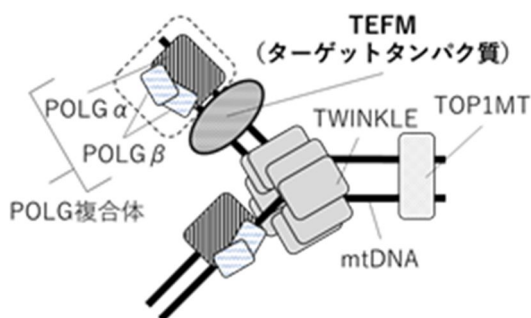


図 1: mtDNA 複製関連タンパク質

2. 研究の目的

申請者が同定した新規 mtDNA 複製制御因子 TEFM に焦点を絞り、同因子が mtDNA 複製における機能と細胞・個体老化での役割を明らかにすることで、新規 mtDNA 複製機構の確立と加齢制御への応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1) TEFM 欠損細胞による複製制御の検証: TEFM 欠損細胞から精製した mtDNA を 2 次元電気泳動とサザンハイブリダイゼーションで解析し、mtDNA 複製の中間体を定量することで TEFM 欠損細胞の mtDNA 複製が実際に低下しているかを検証した。

(2) TEFM の再発現による機能回復と複製制御の検証: TEFM を TEFM 欠損細胞に導入し、mtDNA のコピー数、mtDNA 複製中間体を解析することで、TEFM との結合が mtDNA 複製に必要な十分であることを検証した。

TEFM 欠損細胞と欠損細胞に TEFM を戻した細胞の mtDNA の解析に加え、mtDNA に由来する各 RNA (mt-tRNA、mt-rRNA) を qPCR で、mtDNA にコードされた呼吸鎖複合体タンパク質をウェスタンブロットで解析する。

以上により、TEFM による mtDNA 複製制御が最終的に mt-rRNA の転写量、ミトコンドリアタンパク質の翻訳量、ミトコンドリアの代謝機能に影響するかを検討した。

4. 研究成果

(1) TEFM 欠損細胞では DNA 複製の低下、mtDNA 複製中間体の比率が変化する

TEFM 欠損細胞細胞では mtDNA コピー数が約 50% 低下することを見出していた。これが DNA 複製の低下に直接起因するかを調べるために mtDNA 複製に関与する 7S DNA と呼ばれる複製起点から合成される短い 1 本鎖 DNA の量について測定したサザンハイブリダイゼーションで検出した。その結果、TEFM 欠損細胞 (T1-10, T1-11, T1-14, T4-7, T4-8, T4-10) について 7S DNA の量比が野生型細胞 (Par) と比較して著減していた (図 2)。

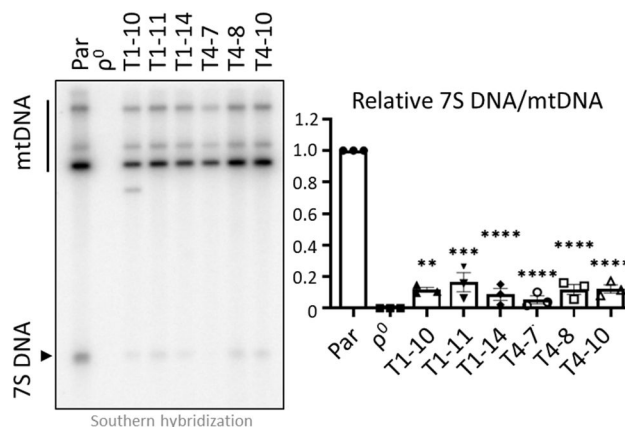


図 2: 7S DNA/mtDNA 比率

更に、mtDNA の複製中間体について検討した。mtDNA は非協調的複製 (SAR) 協調的複製 (SCR) の主な 2 つの様式で維持されている。これらは二次元アガロースゲル電気泳動で分離でき、サザンハイブリダイゼーションで検出可能である。その結果、野生型 (Parental) に比較して TEFM 欠損細胞 (TEFM KO) では SAR の比率が減少し、相対的に SCR が増加していた (図 3)。7S DNA は SAR と同様の複製起点から合成されるので、TEFM は SAR 複製に大きく関与していることが示唆された。

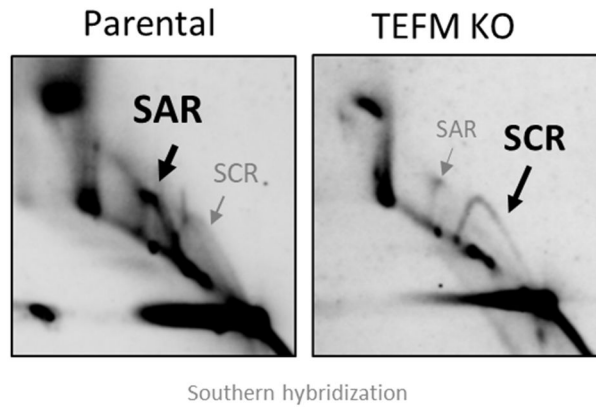


図 3:TEFM 欠損細胞の mtDNA 複製中間体比率

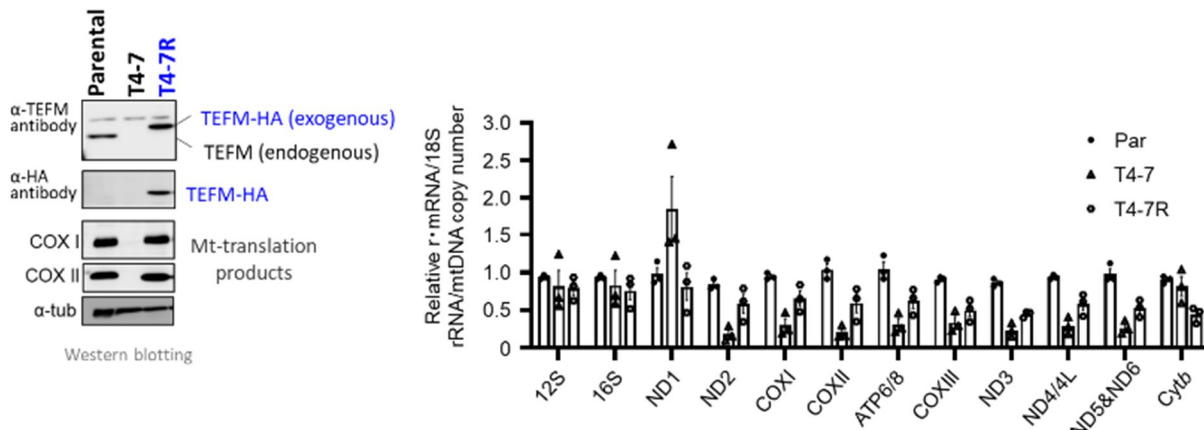


図 4:TEFM の再発現細胞株の mtDNA コード RNA の定量とミトコンドリアタンパク質の定量

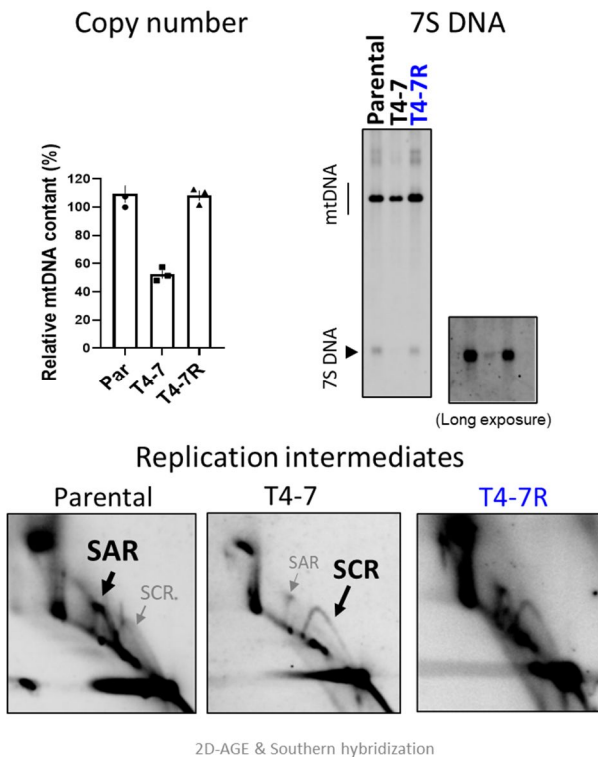


図 5:TEFM 再発現細胞株の mtDNA コピー数、7S DNA、複製中間体の検出

(2)TEFM 欠損細胞に TEFM を再発現させると mtDNA コピー数、複製中間体比率が回復する。TEFM 欠損細胞 (T4-7) に TEFM を恒常再発現させた細胞株 (T4-7R) を樹立し、解析を行った。TEFM はミトコンドリア RNA ポリメラーゼの転写伸長補助因子として同定されており、その機能が T4 - 7R で回復できているかをまず検証した。親株と比較して、T4-7 で低下していた転写産物量が T4-7R で増加していること、T4-7 で検出限界以下であった mtDNA コードタンパク質 COX I と COX II が T4-7R で検出されたことから、TEFM が機能していることを確認した (図 4)。この細胞の mtDNA コピー数、7S DNA 量比、mtDNA 複製中間体について解析したところ、T4-7R ではコピー数、7S DNA が回復し、複製中間体の比率は野生型と同様に SAR の比率が増加していた (図 5)。以上のことから、TEFM は mtDNA の複製に重要な役割を担っており、とくに mtDNA 複製の SAR 様式のプロセスに大きな関与があることが示された。

我々の報告では TEFM は加齢によって低下することを示している。これを踏まえると、TEFM の発現量をコントロールすることで、ミトコンドリア機能を保護しつつ老いる "加齢制御" の可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田 盛、中山 益成、石内 崇土、中田 和人、一柳 健司、佐々木 裕之、安川 武宏、康 東天
2. 発表標題 ミトコンドリア転写伸長因子TEFMIはmtDNA複製開始制御に関与する
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------