

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700442

研究課題名(和文)ミトコンドリアDNAの代謝制御機構の解明およびその解析方法の確立

研究課題名(英文)Studies on turnover regulation of mitochondrial DNA in mice and methodological improvements for its quantitative analysis

研究代表者

島貫 碧 (SHIMANUKI, Midori)

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：20593643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではミトコンドリアDNA(mtDNA)量の調節機構および責任因子を解明することを目的とし、マウスを絶食等の生理的な環境変化に一時的に曝すことで、mtDNA量への影響と分子メカニズムの理解を目指した。その結果、一部の組織でmtDNA量が減少する様子を観察し、さらに同組織において細胞内分解機構の活性化が示された。一方で、mtDNA量の減少が示された一部の組織において、一時的な絶食後にmtDNAのバイオジェネシスに関する多くの遺伝子の発現量が上昇していた。このことからmtDNA量の減少は複製機構の変化によるものではなく分解機構の影響が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand the mechanism that regulates the turnover of mitochondrial DNA (mtDNA), an extra-nuclear genome. First, we demonstrated that the quantity of mtDNA differs among mouse tissues that differ in metabolic properties using real-time PCR. To investigate the factors regulating mtDNA copy number, we temporarily fasted mice to alter the physiological environment. Following fasting, the quantity of mtDNA decreased in some tissues. However, expression of several genes that positively regulate mtDNA copy number increased in most tissues, and the intracellular degradation machinery was activated in the fasted state. These observations indicate that autophagy may be associated with turnover of mtDNA.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリアDNA mtDNA コピー数 遺伝学

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは哺乳類細胞のオルガネラの中では唯一核とは独立した独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) 分子を保有しており、複数の mtDNA 分子が細胞内に存在している。そして、この mtDNA 分子には呼吸鎖酵素複合体の構造遺伝子の一部がコードされている。mtDNA 量と細胞のエネルギー需要はおおよそ並行していると考えられており、例えば、代謝特性の異なる組織間で mtDNA 量は異なること、運動などのエネルギーの欠乏などに応じて変動することが示されている。このことから、mtDNA の「量」の概念も生物機能上の重要な要素となる。

細胞内において適切な mtDNA 量を維持するために、mtDNA の代謝回転、すなわち複製と分解のバランスが適正に制御されていることが理解されている。mtDNA の複製においては、核 DNA と独立に行われ、有糸分裂後も独自に複製を続けてその量を維持していると考えられている。一方で、肝細胞のような静止期の細胞においても、mtDNA の複製・分解が頻繁かつランダムに行われていることが示唆されている。しかしながら、mtDNA の日常的な量の維持および代謝回転の観点から分解機構に注目した例は少なく、その因子やメカニズムに関する知見は乏しいのが背景にある。

そこで本研究では、mtDNA の分解因子の1つとして、細胞内大規模分解系オートファジーに注目した。この過程は、主に飢餓等のエネルギー欠乏により活性化されるが、飢餓適応としてのタンパク質異化およびアミノ酸供給という役割だけでなく、日常的なタンパク質の品質管理という機能が存在すると考えられている。つまりオートファジーがいわゆる特異性を有していなくてもミトコンドリアおよび mtDNA の代謝回転に貢献している可能性が考えられる。また、この飢餓誘導型オートファジーはオルガネラなどの巨大なタンパク質を丸ごと分解できることが明らかとなっており、実際に飢餓

時にオートファゴソーム膜およびオートリソソーム膜によりミトコンドリアが隔離された様子が検出されている。以上のことから、オートファジーは、栄養条件や運動によるエネルギー欠乏などの日常的に起こりうる様々な生理的環境要因によって引き起こされることが想定され、恒常的あるいは一過的に、大規模かつ非特異的に細胞質成分とともにミトコンドリアを分解しミトコンドリアおよび mtDNA の恒常的な品質管理に働いているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類における mtDNA の代謝回転機構への飢餓誘導型オートファジーの関与を解明することに主眼を置いた。そのため、オートファジーが誘導される一時的な絶食条件にマウス個体を曝すことによりオートファジーによる mtDNA の分解が行われているか否かを解析した。具体的には、一時的絶食マウスの組織を用いて、1) mtDNA 量の減少の有無をリアルタイム PCR 法および Ct 法により解析し、2) オートファゴソーム膜またはオートリソソーム膜によりミトコンドリアが隔離されている像を捉えることで、オートファジーによる mtDNA 分解を組織形態学的に解析した。

3. 研究の方法

(1) mtDNA 量の相対定量法

本研究では、mtDNA 量の相対定量解析のためにリアルタイム PCR 法および Ct 法を用いた。本研究における Ct 法では、PCR 反応において標的遺伝子 (ミトコンドリア) の増幅量に対する対照となる遺伝子 (核) の増幅量の比を求め、摂食マウス (コントロール) に対する一時的絶食マウスの mtDNA 量を算出することを可能とした。

(2) 一時的絶食マウスにおける体重変動

マウスの体重測定には C57BL/6J 等の近交系マウスを用い、絶食条件は摂食 (コントロー

ル)、絶食、再摂食とする(いずれも自由飲水条件下)。絶食開始日から終了日までの期間、同一時刻に体重測定を行った。

(3) 一時的絶食マウス組織の mtDNA 量の相対定量解析

摂食、絶食、再摂食条件で飼育した(2)について、体重測定後のマウスの多様な組織を採取し、総 DNA 抽出を行った。mtDNA 量の測定をリアルタイム PCR 法および Ct 法は(1)で決定した条件に基づいて実施し、得られたデータについては統計的解析を行った。

(4) オートファジーおよびミトコンドリア可視化トランスジェニックマウスを用いた一時的絶食による組織形態学的解析

絶食マウスの各組織において、オートファジーによるミトコンドリアの分解を組織形態学的に解析し、mtDNA 分解への関連性を検証した。オートファジーにおける、隔離膜の出現からリソソームに分解されるまでを特異的にモニターする目的で、膜に特異的に存在する LC3 に GFP を標識したトランスジェニック(Tg)マウス(GFP LC3 Tg マウス)を用いた(Mol. Biol. Cell, 15(3): 1101-1011, 2004)。さらに、オートファジーとミトコンドリアを同時検出するため、ミトコンドリアに DsRed2 を標識した Tg マウスを用いた(Transgenic Res., 13(2): 191-194, 2004)。上記 2 系統の Tg マウスを交雑させた GFP LC3 × mtDsRed2 double Tg マウスは、前述のように自由飲水条件下で摂食および一時的な絶食等の条件下で飼育した。組織サンプルから凍結切片を作製し、解析に使用した。ミトコンドリアを隔離するオートファゴソームおよびオートリソソームを探索し、2D および 3D 画像を取得し、形態学的解析を行った。

(5) 組織特異的オートファジー欠損マウスにおける一時的絶食による mtDNA 量の解析

一時的な絶食時の mtDNA 量の変化が飢餓誘導型オートファジーに起因する現象であるか検証するために、組織特異的オートファジー欠損マウスを一時的絶食条件下で飼育し、mtDNA 量の解析を行った。条件的・組織特異的オートファジーノックアウト(KO)マウスである *Atg7^{Flox/Flox}; Cre* マウス(J Cell Biol., 169(3):425-434, 2005)を用いて、*Atg7* が完全に機能欠損となる条件をサザンハイブリダイゼーション法およびウエスタンブロットング法を用いて決定した。

mtDNA 量の減少が飢餓誘導型オートファジーに起因するものであるかを検討するために、*Atg7^{Flox/Flox}; Cre* マウスにおいてオートファジー欠損を誘導し、摂食および絶食条件下で飼育管理した後に、KO マウス組織由来の mtDNA 量をリアルタイム PCR 法および Ct 法にて解析した。

(6) 一時的絶食マウス組織におけるミトコンドリアバイオジェネシスに関する遺伝子群の発現定量解析

一時的な絶食時の mtDNA 量の変動についてさらなる詳細な解析を行うために、絶食時のマウス組織における mtDNA 複製活性を解析した。(2)と同様の一時的な絶食条件にマウスを曝し、組織から総 RNA 量を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法によりミトコンドリアバイオジェネシスに関する遺伝子の発現定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) mtDNA 量の相対定量法

5 倍希釈系列のコントロール DNA を用いたりアルタイム PCR 反応により、各プライマーの Ct 値から作製した標準曲線の傾き(増幅効率)がほぼ等しいこと、また理論値に近いことを確認した。さらに、5 倍希釈系列のコントロール DNA 毎の Ct 値(Ct 値 = mtDNA の Ct 値 - 核 DNA の Ct 値)を対数グラフにプロットし、その近似直線の傾きを解析した結果、両

プライマーを用いた時の反応効率の差が < 10.1% であったため、各プライマーの増幅効率はほぼ等しいことが示され、Ct 値の差が正確に初期鋳型 mtDNA 量の差を反映していることを確認した (User Bulletin 2, 1997, Life Technologies)。以上の結果から、この両プライマーセットを用いて Ct 法により mtDNA の定量解析が可能であることが確認された。

(2) 一時的絶食マウスにおける体重変動

絶食および再摂食によるマウスの体重への影響を解析した結果、絶食条件下のマウスは、コントロール個体と比べて有意に減少した ($P < 0.001$)。また、再摂食によりコントロールとの有意差は検出されなくなるまでに体重が回復する様子を観察した。

(3) 一時的絶食マウス組織の mtDNA 量の相対定量解析

まず定常状態のマウス組織における mtDNA の測定を行った。組織間で最も mtDNA 量の少なかった胸腺の mtDNA 量を基準とし、各組織の mtDNA 量の相対値について Ct 法を用いて算出した。その結果、心筋の mtDNA 量が最も多く、順に骨格筋、肝臓、腎臓、大脳皮質において mtDNA 量が多い結果が示され、この結果は、過去の報告とおおよそ一致した (Nucleic Acids Research, 40(20): 10124-10138, 2012)。また、最も mtDNA 量の少ない胸腺と上記組織の mtDNA 量の差は 10 倍以上であることが示された。

さらに、絶食および再摂食条件下のマウス組織の mtDNA 量の変化について解析した結果、一部の組織において mtDNA 量の著しい減少が示された。同組織における mtDNA 量は絶食後の再摂食において摂食個体 (コントロール) と有為差が認められなくなる程度までに増加した。

(4) オートファジーおよびミトコンドリア可視化

Tg マウスを用いた一時的絶食による組織形態学的解析

予てより、飢餓適応により活性化されたオートファジーがミトコンドリアを分解対象とすることが報告されている。本研究で示された現象は、一時的絶食により誘導されたオートファジーによって mtDNA が分解された可能性がある。そこで本仮説の検証のため、mtDNA 分解におけるオートファジーの関与を視覚的に捉えることを目的とし、オートファジーおよびミトコンドリアの可視化 Tg マウスを用いて形態学的解析を行った。その結果、一時的絶食状態のマウスの特定組織において、ミトコンドリアがオートファゴソームまたはオートリソソーム様の膜により覆われていることを観察した。また、この傾向は著しい mtDNA 量の変化が認められた組織において強く示された。

(5) 組織特異的オートファジー欠損マウスにおける絶食による mtDNA 量の解析

条件的・組織特異的オートファジー KO マウスである *Atg7^{Flox/Flox}; Cre* マウスを用いて、現時点では最適な KO 誘導条件を検討し、解析を実施している。

(6) 絶食マウス組織におけるミトコンドリアバイオジェネシスに関する遺伝子群の発現定量解析

本項目においても Ct 解析を行うため、(1) の原理に基づいて、各標的遺伝子および内在性コントロール遺伝子に対するプライマーの反応効率等がほぼ一致する条件を設定し、RT-PCR を行った。その結果、mtDNA 量の減少が示された一部の組織において、絶食後に mtDNA のバイオジェネシスに関する多くの遺伝子の発現量の上昇が認められた。過去の報告においても一部の遺伝子については同様の結果が示されており、(Nature, 434: 113-118, 2005)、これらのことから、mtDNA 量の減少は複製機構の活性低下によるものではなく、分解機構の活性化による影響が示唆

され、絶食により誘導されたオートファジーによって mtDNA が分解されるとした仮説を支持する結果が示された。

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 3 件)

Yamaguchi J, Nishiyama S, Shimanuki M, Ono T, Sato A, Nakada K, Hayashi J, Yonekawa H, and Shitara H, Comprehensive application of an mtDsRed2-Tg mouse strain for mitochondrial imaging. *Transgenic Research* 2012; 21 (2): 439-447 (査読有)

Okatsu K, Saisho K, Shimanuki M, Nakada K, Shitara H, Sou YS, Kimura M, Sato S, Hattori N, Komatsu M, Tanaka K, and Matsuda N, p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes to Cells* 2010; 15 (8): 887-900 (査読有)

Shitara H, Shimanuki M, Hayashi J, and Yonekawa H, Global imaging of mitochondrial morphology in tissues using transgenic mice expressing mitochondrially targeted enhanced green fluorescent protein. *Experimental Animals* 2010; 59 (1): 99-103 (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

Midori Shimanuki, Junya Yamaguchi, Choji Taya, Hiromichi Yonekawa, Jun-Ichi Hayashi, Hiroshi Shitara. Proportion of large deleted mitochondrial DNA in single primary adherent cells from mouse tail. International Symposium on Mitochondria 2013, 2013.11.6-7, 六本木アカデミーヒルズ

山口潤也, 島貫碧, 米川博通, 設楽浩志. マウス初代接着性細胞におけるミトコンドリア核様体の挙動解析. 第 60 回日本実験動物学会

総会. 2013.5.15-17, つくば国際会議場

島貫碧, 米川博通, 設楽浩志. 1 日の時間変化による組織ミトコンドリア DNA 量の解析. 第 60 回日本実験動物学会総会. 2013.5.15-17, つくば国際会議場

島貫碧, 米川博通, 設楽浩志. 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.

2012.12.19-21, 筑波大学

島貫碧, 米川博通, 設楽浩志. 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の発現定量解析. 第 26 回モロシヌス研究会. 2012.6.15-16, 東京大学

山口潤也, 島貫碧, 西山哲史, 林純一, 米川博通, 設楽浩志. *Tfam/EGFP* 過剰発現による異質性ミトコンドリア DNA の分離への影響. 第 26 回モロシヌス研究会. 2012.6.15-16, 東京大学

島貫碧, 米川博通, 設楽浩志. 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定量解析. 第 59 回日本実験動物学会総会. 2012.5.24-26, 別府国際コンベンションセンター

6. 研究組織

(1)研究代表者 島貫碧 (SHIMANUKI, Midori)
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:20593643

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし