

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14719

研究課題名(和文)ミトコンドリアゲノム変異の病原性発揮における細胞種特異的な感受・抑制機構の解明

研究課題名(英文)Studies on skeletal muscle fiber-type specific responses to pathogenic mtDNA

研究代表者

中田 和人(NAKADA, Kazuto)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80323244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋繊維におけるglucose transporter 4 (GLUT4)の筋細胞膜直下への移動と蓄積が病原性突然変異型ミトコンドリアDNA(mtDNA)の蓄積に対する抵抗性に重要な役割を果たしていることを実験的に立証することに成功した。この結果は、GLUT4を介したインスリンシグナルの増強が変異型mtDNA分子種によって誘発される多様な病態の治療戦略になり得ることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：To examine mechanisms for cell-type specific sensitivities to mutant mitochondrial DNA (mtDNA), we used model mice heteroplasmic for wild-type mtDNA and pathogenic mtDNA with a deletion (del-mtDNA). In skeletal muscles with a high loads of del-mtDNA, mitochondrial respiration defects observed in slow oxidative type 1 and fast oxido-glycolytic type 2A/2X fibers, but not in fast glycolytic type 2B fibers that the relocation of glucose transporter 4 (GLUT4) to sarcolemma from cytoplasm was accelerated. Chemical deconditioning of the relocation of GLUT4 induced mitochondrial respiration defects in 2B fiber and creation of ragged-red fibers in fast muscle tissues. Our findings indicated that relocation of GLUT4 in skeletal muscle fibers is necessary for tolerance to accumulation of del-mtDNA and also suggested that controls of insulin signaling via GLUT4 would be a target for recovering mitochondrial respiration defects of cells with oxidative property in mtDNA-mediated disorders.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリアDNA 突然変異 骨格筋 インスリンシグナル ミトコンドリア病 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

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) が細胞あたり数百から数千コピー存在し、エネルギー産生に必要な 13 種の機能タンパク質と、これらの翻訳に必須な 22 種の tRNAs と 2 種の rRNAs をコードしている。このため、mtDNA 分子に生じた突然変異の病原性はミトコンドリアのエネルギー産生 (ミトコンドリア呼吸機能) の低下に帰結される。しかし、突然変異が生じた箇所や変異型 mtDNA の含有率によって病原性の程度が異なると考えられる。つまり、複数の遺伝子を喪失する欠失型変異では重症の、特定の tRNA 遺伝子の点変異では中症の、特定の構造遺伝子の点変異では軽症のエネルギー低下を惹起すると想定される。事実、我々の専攻研究において、変異箇所の異なる 3 種の変異型 mtDNA 導入マウスを作出し、このような変異型 mtDNA 分子種による病原性の相違を報告してきた (Nat Genet, 2000; Hum Mol Genet, 2006; Science 2009; PNAS, 2012; PNAS, 2013)。さらに、欠失型 mtDNA を導入したマウスにおいて、臓器間における欠失型 mtDNA の局在の差異と経時的な蓄積動態の変化の差異が少なくとも 2 種の病型の遷移的な発症に重要な役割を果たすことを明らかにしている (Genes Genomes Genetics, 2013)。このように、変異型 mtDNA 分子種による多様な病型誘導は、1) 変異種による相違 (第 1 の病型形成原理)、2) 変異型 mtDNA 分子の臓器間局在と動態の相違 (第 2 の病型形成原理) という 2 つの階層によって説明することができる。

このような状況の中、我々は欠失型 mtDNA を導入したマウスの骨格筋組織を用いた基礎実験において、欠失型 mtDNA の蓄積によって誘導されるエネルギー産生異常が、遅筋では顕著であるが、速筋ではほとんど誘導されないこと、さらに、欠失型 mtDNA の蓄積 (ミトコンドリア機能異常の誘導) によって骨格筋の線維型が速筋型から遅筋型に遷移 (分化転換) する、という興味深い生体现象を見出した。この現象をもとに、変異型 mtDNA の蓄積に対する細胞種間の感受性の差異による病型誘導・抑制機構の存在 (第 3 の病型形成原理) を発想するに至った。

2. 研究の目的

変異型ミトコンドリアゲノム (mtDNA) がミトコンドリア病、神経変性疾患、がん、糖尿病、老化など、多様な病型に関与することが示唆されはじめたことを受け、ミトコンドリア機能の破綻病理が大きな注目を集めている。しかし、ミトコンドリア関連疾患の基礎研究は変異型 mtDNA 分子種の病原性把握に終始し、前述のような多様な病型の形成を担うであろう「変異型 mtDNA の蓄積に対する細胞種間の感受性の差異」についてはその分子機構はおろか、存在すら証明されていない。

本研究では、マウス個体において欠失型

mtDNA の病原性が骨格筋組織間 (速筋と遅筋) で明らかに異なるという現象の発見を契機に、この差異を生み出す生体機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、欠失型 mtDNA の蓄積による病原性として誘導されるエネルギー産生異常は遅筋では顕著であるが、速筋ではほとんど見られないという現象の原因として、1) 解糖系に依存する速筋は欠失型 mtDNA の蓄積によるミトコンドリアエネルギー低下に耐性を示し、2) 逆に、ミトコンドリアでのエネルギー産生に依存する遅筋は欠失型 mtDNA の蓄積に感受性を示すという 2 つの作業仮説を検証することとした。

骨格筋線維は、筋分化の決定を受けた筋芽細胞が機能的・生化学的に速筋と遅筋に最終分化するため、細胞分化の典型として広く用いられてきた材料である。マウスの骨格筋組織はおおむね 2 種の速筋型線維 (Types IIa と IIb 線維) と 1 種の遅筋型線維 (Type I 線維) の混合筋である。本研究では、骨格筋を構成する筋繊維の線維型を ATPase 染色とミオシン重鎖アイソフォームの抗体染色によって識別した。

まず、多様な割合で欠失型 mtDNA を含有するマウス群から前頸骨筋、大腿直筋、腓腹筋、ヒラメ筋などを摘出し、Real-time PCR 法とミトコンドリア呼吸酵素複合体 II と IV の生体組織科学染色を実施し、欠失型 mtDNA の蓄積とミトコンドリア呼吸機能異常の関係を調べた。

これらの結果をもとに、多様な割合で欠失型 mtDNA を含有するマウス群にインスリン グナルを阻害することで糖の取り込みを低下させる Wortmannin を腹腔投与し、速筋線維での異常誘導と遅筋線維での更なる悪性化誘導が起こるか、否かを検証した。この際、骨格筋線維の糖の取り込みに寄与する glucose transporter 4 (GLUT4) の局在を免疫組織化学的に調べた。

本研究は、筑波大学動物実験委員会から承認された実験計画書をもとに、「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減等に関する基準」及び「文部科学省基本指針 (研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針)」等の関連規則に沿って、実験動物マウスの飼育、麻酔、処置、安楽死、さらには実験従事者の健康維持にも配慮した実験体制のもと、実施された。

4. 研究成果

本研究における成果は以下の通りである。

- 1) 欠失型 mtDNA を導入したモデルマウスから摘出した骨格筋組織の詳細解析から、細胞質に存在する GLUT4 の筋細胞膜直下への移動と蓄積が欠失型 mtDNA に対する

抵抗性ならびに感受性と相関することが明らかとなった。

- 2) 欠失型 mtDNA を 80%以上含有する骨格筋組織において、slow oxidative type 1 と fast oxido- glycolytic type 2A/2X 繊維ではミトコンドリア呼吸機能異常が誘導されていたが、fast glycolytic type 2B 繊維では GLUT4 の筋細胞膜直下への移動と蓄積が顕著に観察され、ミトコンドリア呼吸機能が正常に維持されていた。このような結果から、細胞質に存在する GLUT4 の筋細胞膜直下への移動と蓄積が欠失型 mtDNA に対する抵抗性ならびに感受性と相関していた。
- 3) 欠失型 mtDNA を含有するマウスに Wortmannin を腹腔投与し、GLUT4 の筋細胞膜直下への移動と蓄積を阻害したところ、欠失型 mtDNA の蓄積に感受性を示す slow oxidative type 1 線維は、さらに、それらの病理が悪化し、ミトコンドリア病に典型的な赤色ぼろ繊維 (Ragged-red fibers: RRFs) の表現型を呈するようになった。
- 4) 興味深いことに、欠失型 mtDNA の蓄積に抵抗性を示す fast glycolytic type 2B 繊維では、GLUT4 の筋細胞膜直下への移動と蓄積を阻害によってミトコンドリア呼吸機能が低下し、一部の筋繊維が RRFs の病理を呈するようになってしまった。すなわち、これまで欠失型 mtDNA の蓄積に対して抵抗性を示していた筋繊維がインスリンシグナルを化学的に遮断されると、欠失型 mtDNA の蓄積に対して感受性を示すようになり、欠失型 mtDNA の病原性が発揮されるようになることを示している。
- 5) これらの結果は、GLUT4 を介したインスリンシグナルが異なった線維型を呈する骨格筋線維間における変異型 mtDNA の病原性制御に重要な役割を果たしていることを示唆している。

mtDNA にはミトコンドリアでのエネルギー産生 (酸化的リン酸化反応: ミトコンドリア呼吸機能) に関与する遺伝子群のみがコードされているにも関わらず、mtDNA 関連疾患の病型と症度は多岐にわたることが知られている。このパラドックスは、1) 変異部位による病原性の相違、2) 変異型 mtDNA 分子の臓器間局在と動態 (変異型 mtDNA 分子の増加や減少) の相違という、変異型 mtDNA 分子種自体の病原性発揮に着目することによって説明・考察されてきた。本研究では、このような組織特異的な変異型 mtDNA の病原性発揮機構ならびに病態の多様性の構築において、「変異型 mtDNA の蓄積に対する細胞種間の感受性の差異」という新たな病理機構の存在を実験動物学的に立証することに成功した。

変異型 mtDNA 分子種の蓄積によって発症するミトコンドリア病や関連疾患に対する治療戦略は、病原性の突然変異の蓄積によって減弱している電子伝達系を活性化する戦略

や、病原性の突然変異の蓄積によって電子伝達の過程で過剰産生されてしまう活性酸素種を低下または抑制させる戦略が主流である。本研究では活用した欠失型 mtDNA を導入したモデルマウスでは、速筋線維では欠失型 mtDNA の病原性がほぼ発揮されない。この原因である速筋線維における強靱なインスリンシグナルとエネルギー代謝の転換・適応能力を罹患組織に導入 (再現) することが、変異型 mtDNA 分子種の蓄積によって発症するミトコンドリア病や関連疾患に対する有効な治療戦略になるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Tani H, Ohnishi S, Shitara H, Mito T, Yamaguchi M, Yonekawa H, Hashizume O, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI. Mice deficient in the Shmt2 gene have mitochondrial respiration defects and are embryonic lethal. **Scientific Reports**, 8:425 (2018) (査読あり)

Yoshizumi T, Imamura H, Taku T, Kuroki T, Kawaguchi A, Ishikawa K, Nakada K, Koshiba T. RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity. **Scientific Reports**, 7:5379 (2017) (査読あり)

Shimizu A, Tani H, Takibuchi G, Ishikawa K, Sakurazawa R, Inoue T, Hashimoto T, Nakada K, Takenaga K, Hayashi JI. Cytoplasmic transfer of heritable elements other than mtDNA from SAMP1 mice into mouse tumor cells suppresses their ability to form tumors in C57BL6 mice. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, 493:252-257 (2017) (査読あり)

Matsuhashi T, Sato T, Kanno SI, Suzuki T, Matsuo A, Oba Y, Kikusato M, Ogasawara E, Kudo T, Suzuki K, Ohara O, Shimbo H, Nanto F, Yamaguchi H, Saigusa D, Mukaiyama Y, Watabe A, Kikuchi K, Shima H, Mishima E, Akiyama Y, Oikawa Y, Hsin-Jung HO, Akiyama Y, Suzuki C, Uematsu M, Ogata M, Kumagai N, Toyomizu M, Hozawa A, Mano N, Owada Y, Aiba S, Yanagisawa T, Tomioka Y, Kure S, Ito S, Nakada K, Hayashi KI, Osaka H, Abe T. Mitochondrial Acid 5 (MA-5) Facilitates ATP Synthase Oligomerization and Cell Survival in Various Mitochondrial Diseases. **EBioMedicine**, 20:27-38 (2017) (査読あり)

Borna NN, Kishita Y, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI, Tokuzawa Y, Kohda M, Nyuzuki H, Yamashita-Sugahara Y, Nasu T, Takeda A, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. A novel mutation in TAZ causes

mitochondrial respiratory chain disorder without cardiomyopathy. **Journal of Human Genetics**, 62:539-547 (2017) (査読あり)

Lehtonen JM, Forsström S, Bottani E, Viscomi C, Baris OR, Isoniemi H, Höckerstedt K, Österlund P, Hurme M, Jylhävä J, Leppä S, Markkula R, Heliö T, Mombelli G, Uusimaa J, Laaksonen R, Laaksovirta H, Auranen M, Zeviani M, Smeitink J, Wiesner RJ, Nakada K, Isohanni P, Suomalainen A. FGF21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. **Neurology**, 87:2290-2299 (2016) (査読あり)

Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, Hashizume O, Nagatoishi S, Matsuo A, Sato T, Kudo T, Matsubashi T, Murayama K, Ohba Y, Watanabe S, Kanno S, Minaki D, Saigusa D, Shinbo H, Mori N, Yuri A, Yokoro M, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Takeuchi Y, Kikuchi K, Toyohara T, Suzuki C, Ichimura T, Anzai J, Kohzuki M, Mano N, Kure S, Yanagisawa T, Tomioka Y, Toyomizu M, Tsumoto K, Nakada K, Bonventre JV, Ito S, Osaka H, Hayashi K, Abe T. Mitochondrial Acid 5 Binds Mitochondria and Ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage. **Journal of American Society of Nephrology**, 27:1925-32 (2016) (査読あり)

〔学会発表〕(計 3件)

中田和人、ミトコンドリア・セントラルドグマの破綻病理、The 7th Basic Science Seminar of Women's Health Care、2017年

中田和人、変異型ミトコンドリアゲノムによる多階層病理、第39回日本分子生物学会年会、2016年

中田和人、ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理、第16回日本抗加齢医学会総会、2016年

〔図書〕(計 1件)

小笠原絵美、中田和人、突然変異型ミトコンドリアゲノムを含有するモデルマウス、医学のあゆみ、260: 73-79 (2016)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~jih-kzt/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 和人 (NAKADA, Kazuto)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：80323244