

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 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21240044

研究課題名（和文）

ミトコンドリア機能異常による運動失調マウスの開発とその機能イメージング

研究課題名（英文）

Bioimaging of mitochondrial dynamics and generation of model mice

研究代表者

米川 博通 (YONEKAWA HIROMICHI)

財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・センター長

研究者番号：30142110

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ミトコンドリアの品質管理の破綻による機能異常と疾患との関係を明らかにすることを目的とし、ミトコンドリアの機能異常をバイオイメージングで検知する系、およびミトコンドリアの機能異常に起因するモデルマウスの樹立を試みた。ミトコンドリアの機能異常を検知する系については、マウスの各臓器、組織におけるミトコンドリアの動態、すなわちミトコンドリアの融合、分裂、移動等を正確、かつ定量的に測定する系の確立できた。モデルマウスの樹立については、研究を続行中である。

研究成果の概要（英文）：

To disclose the relationships between mitochondrial-dynamics' malfunctions and diseases, we tried to develop a detection systems of the malfunctions by bioimaging and to generated disease model mice caused by the malfunction. The detection systems based on bioimaging have been successfully developed by generating many lines of transgenic mice with mitochondrially expressed fluorescent proteins such as EGFP, DsRed, etc. The generation of disease model mice caused by malfunction of mitochondrial dynamics is still in progress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2010年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2011年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
年度			
年度			
総計	36,400,000	10,920,000	47,320,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：複合領域・実験動物学

キーワード：ミトコンドリア・マウス・バイオイメージング・疾患モデル・運動失調

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは古くから細胞内のエネルギー産生、脂質のβ酸化等、生命維持に必須の化合物生産の場として、そして現在では細胞内 Ca²⁺濃度の調節、アポトーシス等、

細胞内シグナル伝達の中継所としても注目されている。それ故、ミトコンドリアの機能失調は生体にとって深刻な影響を与えるため、ミトコンドリアに対する品質管理のシステムを生体は保有している。

最近では特に、ミトコンドリアに対する品質管理には、ミトコンドリアの融合、分裂、移動といったミトコンドリアの動態 (mitochondria dynamics) が深く関わっていることが明らかになってきている。そして、ミトコンドリアの融合・分裂に関わる *Opa1*、*Mfn1*、*Mfn2*、*Drp1* などの遺伝子が同定されており、これらを破壊した細胞ではミトコンドリアの形態異常、そしてマウス個体ではホモ致死になることが知られている。

一方、ヒトにおいては 2A 型シャルコー・マリー・トゥース病 (CMT type2A) の責任遺伝子として *Mfn2* が、優性視神経萎縮症 (Dominant optic atrophy) では *Opa1* が、劣性視神経萎縮症 (Recessive optic atrophy) では *Opa1* がそれぞれ責任遺伝子として同定されている。これらの遺伝子は全て、ミトコンドリアの融合・分裂に関わる遺伝子で、ミトコンドリアの品質管理に強く関係している。すなわち、上述の疾患は、ミトコンドリアの品質管理の異常により生じた疾患で、新しいタイプのミトコンドリア病と見なすことができる。現在、ミトコンドリアの品質管理に係わる遺伝子は、十数種類が知られているが、ヒト疾患との関連は上記の遺伝子を除き、ほとんど明らかになっていない。これらを明らかにするには、ミトコンドリアの機能異常に起因するモデルマウスの樹立が必要であった。特に、ミトコンドリアの動態が機能失調に陥った場合に、最も強く影響を受けると予想される中枢神経系、神経・筋肉系の顕著でかつ重要な表現型である運動失調を呈する新規のモデルマウスの樹立が必要であった。

さらに現在でも、ミトコンドリアの動態を観察する系は、ほとんど培養細胞に限られており、個体中の各組織を構成する細胞中のミトコンドリアの形態を詳細に観察する系はほとんど樹立されていない。そのため、正常な細胞中のミトコンドリアの形態すらも明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリアの品質管理の破綻による機能異常と疾患との関係を明らかにすることを目的とした。そのためには、(1)マウスの正常個体による、各臓器の細胞中のミトコンドリアの形態、そして融合・分裂・移動などの状態を正確、かつ定量的に測定する系の確立すること、(2)ミトコンドリアの品質管理の破綻による疾患モデルマウスの開発すること、を目的とした。

3. 研究の方法

(1)マウス個体中のミトコンドリアの形態、その動態を観察する系の確立について

マウス個体中の様々な細胞のミトコンドリアの形態を簡便、かつ迅速に観察するために、EGFPやDsRed2などの蛍光蛋白質をミトコンドリアに特異的に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。それらのマウスを用いて、マウス個体中の各臓器のミトコンドリアの形態を観察した (論文番号2および4)。

また、これら2種類のTgマウスより繊維芽細胞を樹立し、細胞融合法を用いてミトコンドリアの融合・分裂・移動等の動態を観察した。

また、上記の動態をより詳細に観察するために、光変換を行なう蛍光蛋白質を導入したTgマウスを作製し、ミトコンドリアの動態を観察する系を開発した。

(2)ミトコンドリアの品質管理の破綻による疾患モデルマウスの開発すること

既存のミトコンドリア病モデルマウスを用いて、各臓器のミトコンドリアの形態、機能等と疾病の重篤さとの関係を調べた (論文番号5)。

4. 研究成果

(1)マウス個体中のミトコンドリアの形態、その動態を観察する系の確立について

EGFPをミトコンドリアに特異的に発現させたTgマウス(mtGFP-Tgマウス)を用いて、マウスの各臓器に存在するミトコンドリアの形態を詳細に観察した。その結果、ミトコンドリアの形態は組織ごとに際立った変化を見せた。例えば、肝臓と膵臓の膵腺房細胞を比較したのが以下の図であるが、ミトコンドリアの形、数等で著しい違いが見られた。

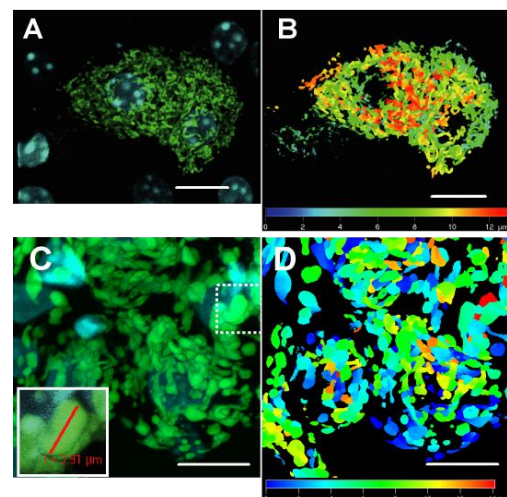


図1: mtGFP-Tgマウスを用いた肝実質細胞と膵臓膵腺房細胞の三次元イメージ図

このような手法により、mtGFP-Tgマウスの各組織の正常なミトコンドリアの形態的特徴を詳細に記録することが可能となった (詳細は論文4参照)。

一方、ミトコンドリア間での融合・分裂・移動等を詳細に観察するためには、蛍光蛋白質の種類を変えた Tg マウスが必要となる。そこで、DsRed2 をミトコンドリアに特異的に発現する Tg マウス(mtDsRed2-Tg マウス)の作製も行なった。mtGFP-Tg マウス同様に、mtDsRed2-Tg マウスの各組織のミトコンドリア像を観察したのが以下の図である(詳細は論文 2 参照)。

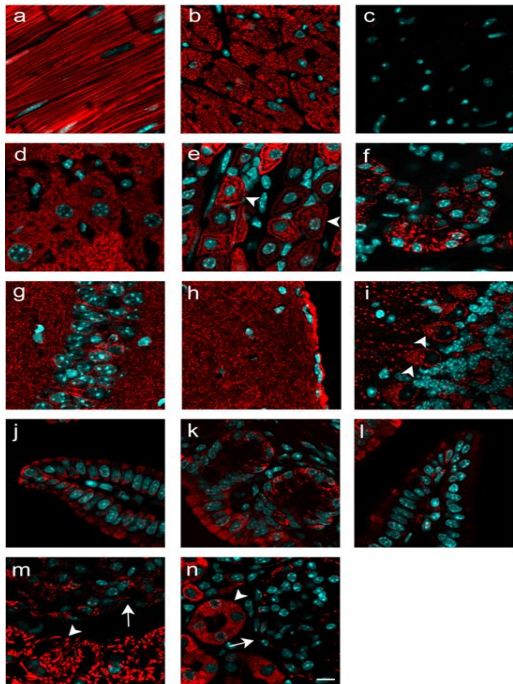


図 2: DsRed2-Tg マウスの各臓器から得られたミトコンドリア像、赤色: DsRed2 の蛍光、青色 (DAPI) 心筋繊維(横 a、および縦 b)、non-Tg マウスの心筋(対象)、肝細胞(d)、胃(e&f)、小脳(g-i)、回腸(j&l)、大腸(k)、膵臓腺房細胞(m)、腎臓(n)

また、バイオイメージングでは、多くの場合 EGFP が利用される。我々の研究もミトコンドリア DNA(mtDNA)と相互作用をする Tfam (EGFP で標識)とミトコンドリアとの共局在を観察するため、DsRed2 で標識した Tg マウスを用い、その局在状態を明らかにできた。

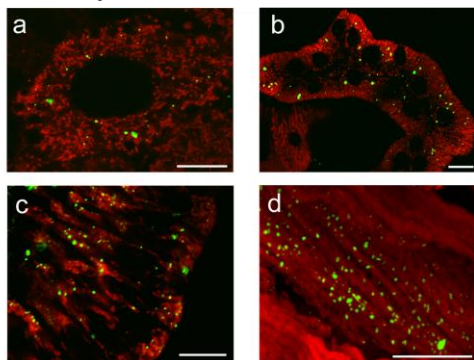


図 3: DsRed2 で標識されたミトコンドリアと EGFP で標識された Tfam との共局在(詳細は論文 2 参照)

また、mtGFP-Tg および mtDsRed2-Tg マウスのそれぞれより、繊維芽細胞を樹立し、それら 2 種類の繊維芽細胞を融合させることによって、赤、緑、2 種類の蛍光色を指標にし、タイムラプス等を併用して、2 種類のミトコンドリアの融合を詳細、かつ定量的に観察する系を開発した。下の図はそのデータの一部である(未発表データ)。

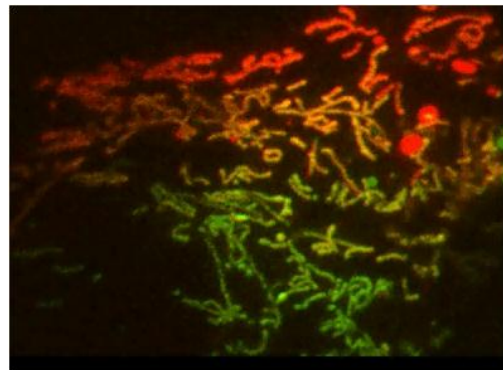


図 4: DsRed2 で標識したミトコンドリア(図の上部分)と EGFP で標識したミトコンドリア(図の下部分)。中間部分が 2 色のミトコンドリアが融合してオレンジ→黄色に変化している部分が確認できる。

また、mtDsRed2-Tg マウスの繊維芽細胞を用いて、ミトコンドリアの膜電位低下とそれに伴う形態変化を詳細に観察する系も開発できた。

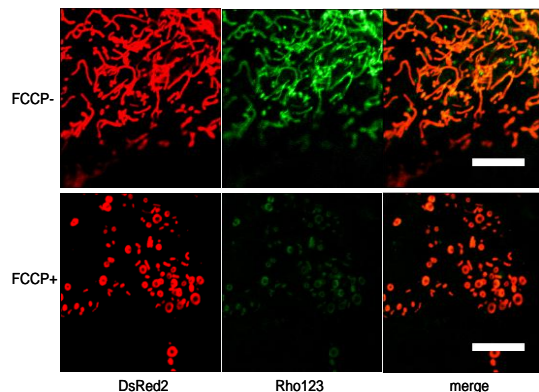


図 5: FCCP 処理によるミトコンドリアの膜電位消失とその後の形態変化

さらに膜電位低下により活性を失ったミトコンドリアを認識する蛋白群の同定とその機能解析等を行なった(詳細については論文 6 を参照)。

(2)ミトコンドリアの品質管理の破綻による疾患モデルマウスの開発すること

これについては、まず既存のミトコンドリア病モデルマウスを用いて、正常なミトコンドリア DNA (mtDNA) と病的変異を持った mtDNA とがヘテロプラズミーの状態にあるときに、正常な mtDNA と病的変異を持つ mtDNA との量比を変化させないまま、細胞全体の mtDNA 量を増加させたときに、病態がどうなるかを検討した。その結果、量比が同じでも細胞中の mtDNA 量を増加させたときには、病状が軽減することが判明した。この病状の軽減は、ミトコンドリアの機能回復を伴っていたため、この病態の軽減はミトコンドリア機能に依存していることが明らかとなった (詳細は論文 5 を参照)。

一方、ミトコンドリアの品質管理の異常による疾患モデルマウスの開発は今のところ成功しておらず、現在も鋭意研究を続行中である。

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 10 件)

- ① Esteves, T.C., Psathaki, O. E., Pfeiffer, M. J., Balbach, S. T., Zeuschner, D., Shitara, H., Yonekawa, H., Siatkowski, M., Fuellen, G., Boiani, M.: Mitochondrial physiology and gene expression analyses reveal metabolic and translational dysregulation in oocyte-induced somatic nuclear reprogramming, PLoS One、査読あり、in press
- ② Yamaguchi, J., Nishiyama, S., Shimanuki, M., Ono, T., Sato, A., Nakada, K., Hayashi, J-I., Yonekawa, H., Shitara, H.: Comprehensive application of an mtDsRed2-Tg mouse strain for mitochondrial imaging, Transgenic Research, 査読有り、21 巻、2012、439-447、DOI: 10.1007/s11248-011-9539-1
- ③ Yokota, M., Shitara, H., Hashizume, O., Ishikawa, K., Nakada, K., Ishii, R., Taya, C., Takenaga, K., Yonekawa, H., Hayashi, J.: Generation of trans-mitochondrial mito-mice by the introduction of a pathogenic G13997A mtDNA from highly metastatic lung carcinoma cells, FEBS letters, 査読有り、584 巻、2010、3943-3948、DOI: 10.1016/j.febslet.2010.07.048
- ④ Shitara, H., Shimanuki, M., Hayashi, J-I., Yonekawa, H.: Global imaging of mitochondrial morphology in tissues using transgenic mice expressing mitochondrially

targeted enhanced green fluorescent protein, Experimental Animals, 査読有り、59 巻、2010、99-103、

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224174>

- ⑤ Nishiyama, S., Shitara, H., Nakada, K., Ono, T., Sato, A., Suzuki, H., Ogawa, T., Masaki, H., Hayashi, J-I., Yonekawa, H.: Over-expression of Tfam improves the mitochondrial disease phenotypes in a mouse model system, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有り、401 巻、2010、26-31

DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.08.143

- ⑥ Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y. S., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Matsuda, N.: p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria, Genes to cells, 査読有り、15 巻、2010、887-900

DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01426.x

- ⑦ Cao, L., Shitara, H., Sugimoto, M., Hayashi, J-I., Abe, K., Yonekawa, H.: New evidence confirms that the mitochondrial bottleneck is generated without reduction of mitochondrial DNA content in early primordial germ cells of mice, PLoS genetics, 査読有り、5 巻、2009、e1000756

DOI: 10.1371/journal.pgen.1000756

[学会発表] (計 15 件)

- ① Yamaguchi, J., Nishiyama, S., Shimanuki, M., Ono, T., Sato, A., Nakada, K., Hayashi, J-I., Yonekawa, H., Shitara, H.: Mitochondrial imaging of in tissues by using mtDsRed2-Tg mouse strain. The 10th Transgenic Technology Meeting (TT2011). 2011.10.24-26. Florida, USA
- ② 設楽浩志、中田和人、林純一、米川博通: 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) 2011.9.21-24. 京都.
- ③ 設楽浩志、西山哲史、中田和人、小野富男、佐藤晃嗣、鈴木英紀、小川哲弘、正木晴彦、林純一、米川博通: 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 2011.5.25-27. 東京.
- ④ 設楽浩志: 遺伝子改変マウスを用いた蛍光タンパク標識によるミトコンドリアの形態学的解析. 第 2 回サンダーバードの会 (招待講演), 2011.2.27, 京都.
- ⑤ Shitara, H.: Rapid segregation and bottleneck effect of mitochondrial DNA

in mice. Korea-Japan Symposium on Protein Metabolism, 2011.1.28, Korea

- ⑥ Shitara, H.: The mtDNA bottleneck without reduction of its content. 174th ENMC International Workshop "Applying Pre-implantation Genetic Diagnosis to mtDNA Diseases", 2010.3.19-22, Naarden, the Netherlands.
- ⑦ 設楽浩志、西山哲史、中田和人、林純一、米川博通: Gene therapy of mitochondrial diseases in a mouse model. 第32回日本分子生物学会年会. ワークショップ. 2009.12.9-12. 横浜
- ⑧ 設楽浩志、佐藤晃嗣、島貫碧、林純一、米川博通: マウス初代培養細胞におけるミトコンドリア速度解析. 第55日本実験動物学会総会 2009.5.14-16. 大宮

[図書] (計4件)

- ① 設楽浩志: 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 編者小幡裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通 pp.652-655, 2011
- ② 林純一、設楽浩志、佐藤晃嗣: 卵子ミトコンドリア DNA. 卵子学 総編集森崇英 pp.338-348, 2011

[その他]

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0002766>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米川 博通 (YONEKAWA HIROMICHI)
財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術
研究センター・センター長
研究者番号: 30142110

(2) 研究分担者

設楽 浩志 (SHITARA HIROSHI)
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

小松 雅明 (KOMATSU MASAOKI)
財団法人東京都医学総合研究所・生体分子
先端研究分野・プロジェクトリーダー
研究者番号: 90356254
(H21-H22:研究分担者)

吉川 欣亮 (KIKKAWA YOSHIAKI)
財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医

科学研究分野・プロジェクトリーダー
研究者番号: 20280787
(H23:研究分担者)

(3) 連携研究者

多屋 長治 (TAYA CHOJI)
財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術
研究センター・室長
研究者番号: 90175456

松岡 邦枝 (MATSUOKA KUNIE)
財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医
科学研究分野・主席研究員
研究者番号: 40291158

石井 里絵 (ISHII RIE)
財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術
研究センター・主任基盤技術研究職員
研究者番号: 00425688

小野 富男 (ONO TAMIO)
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: 60231239