

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 10 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570009

研究課題名（和文）ミトコンドリアの遺伝的ボトルネック形成機構の解析と疾患との関連

研究課題名（英文）Study on mitochondrial bottleneck and diseases

研究代表者

曹 麗琴（SOU REIKIN）

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・研究員

研究者番号：60399475

研究成果の概要（和文）：本研究の目的はヘテロプラスミック（2種の異なるミトコンドリア DNA を持つ）マウス系統を用いてミトコンドリア病の世代間の伝達様式を明らかにすることである。また生体イメージング技術によって、疾病あるいはストレス下における生きたマウス個体の内部臓器細胞のミトコンドリア動態の変化を理解することである。私は2種のヘテロプラスミックマウス系統がミトコンドリアの伝達様式の解析に適することを検証し、単一の細胞において2種のミトコンドリアゲノムの存在比を正確に計測する方法を確立した。さらに生きたマウスの組織の（脈動や拍動に伴う）動きを効果的に抑える安定器具を考案した。これにより様々な内部臓器におけるミトコンドリア動態の観察が可能となった。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the mechanism of mtDNA disease transmission between generations using mouse strains heteroplasmic for two mtDNA variants, and understand alterations of mitochondrial dynamics in live mouse internal organs in disease and stress conditions using intravital imaging technology. We have identified two heteroplasmic mouse strains suitable for mtDNA transmission analysis and established the methods to precisely examine the ratio of two mtDNA variants in single cells. Further, we have invented a stabilization device which effectively suppresses the tissue motion of abdominal organs and monitored mitochondrial dynamics in various intraperitoneal organs in live mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ミトコンドリア、ボトルネック、ミトコンドリア分離、分子遺伝、遺伝病、生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

（1）ミトコンドリアはすべての真核生物の細胞の細胞質に存在し、それ自身のゲノムで

あるミトコンドリア DNA(mtDNA)をもつ。哺乳類のミトコンドリアゲノムは細胞内に多数のコピーとして存在し、母系遺伝する。

ミトコンドリアは細胞の機能のなかでエネルギー生産、細胞死、カルシウム平衡など、重要な役割を担っている。ミトコンドリアゲノムの病理学的な変異は、神経変性疾患や筋疾患、糖尿病、視覚障害などの幅広く重篤な遺伝病を引き起こす。変異型ミトコンドリアゲノムと野生型ミトコンドリアゲノムを合わせもつ母親からは様々な量の変異型ミトコンドリアゲノムが子孫に伝達される。この母親から伝達される変異型ミトコンドリアの割合が疾病の発症や重篤さを決定する。今日までミトコンドリア病の治療法は見つかっていないため、ミトコンドリアゲノムの基本的遺伝原理の理解に重点を置くべきであり、これによって世代間における変異型ミトコンドリアゲノムの伝達を防ぐ視点に基づく方法を探索することができよう。ミトコンドリアゲノム上に変異が生じた場合には、世代間の伝達中に急調分離（個体中のミトコンドリアゲノムがヘテロプラスミー状態からホモプラスミー状態へと速やかに移行する現象）が起こることがいくつかの哺乳類で報告されており、この原因として遺伝的ボトルネックを通過する伝達様式が考えられてきたが、そのメカニズムは完全には明らかになっていない。我々はこれまでに、ボトルネック効果が雌性生殖系列細胞（図1）で起きることを説明する3つのモデルを提唱し、マウスにおける単一の始原生殖細胞(PGCs)と、単一の卵母細胞のミトコンドリアゲノムのコピー数を世界で初めて直接測定した。この測定結果は従来の有力な仮説を否定するものであった（Cao et al. 2007）。

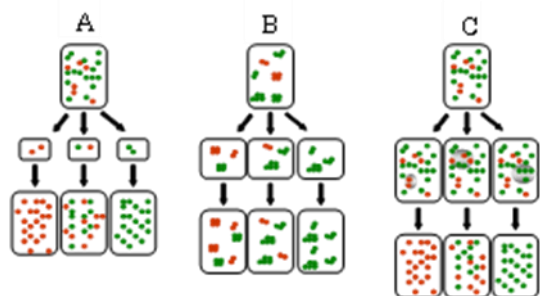


図1. ミトコンドリアボトルネック効果のモデル
A: mtDNA 数減少によるモデル
B: 核様体形成によるモデル
C: 選択的複製によるモデル

その後の研究では、限られたミトコンドリアゲノムのサブグループが複製することに起因する、出生後個体の生殖細胞での急調分離が報告され、モデルC（選択的複製によるモデル）が支持されている(Wai et al. 2008)。しかし、急調分離が初期のPGCsでも起きるのか、また世代間の急調分離が起きる主要なステージがどこなのかはわかっていない。

(2) これまでに蓄積された知見は、ミトコンドリアの形態や、細胞内での分布、運動の変化は多くの疾病の進行過程と関連することを示している。従って、一般状態からストレス環境、病態条件下においてミトコンドリア動態を動物生体内で観察することは、ミトコンドリアが関与する病態の発症・悪化に対して理解し、さらには治療法を開発する上で重要な情報が得られると期待される。マウスの脳におけるミトコンドリアの生体内イメージングは神経変性疾患におけるミトコンドリアの関与についての重要な知見をもたらした(Misgeld et al. 2007)。しかし、生体を用いる場合、呼吸や拍動に伴って組織が動くため、腹部組織のミトコンドリア挙動を直接捉えるなどの生体内イメージングは非常に困難であった。従って、腹部器官の動きを最小限に抑え、生体内においてミトコンドリアや他の細胞内小器官の動態を視覚化することを可能にする技術の開発が非常に重要であり、かつ緊急の課題となっている。

2. 研究の目的

(1) ミトコンドリア変異の世代間の伝達様式を調べるために、ミトコンドリア変異の急調分離の解析に適したヘテロプラスミック（2種の異なるミトコンドリアDNAを持つ）マウス系統を選び、この解析に適するかを検証する。この系統を用いることで、妊娠初期の胎児から成体の様々な発生・成長段階の生殖・体細胞系列におけるmtDNA分離様式を解析することが可能である。これらのヘテロプラスミックマウスを用いた解析を行うことで生殖細胞発生の様々なステージにおけるミトコンドリアDNAの遺伝子型の推移を調べることが可能となり、新知見を得ると同時に世代間におけるmtDNA伝達機構のより深い理解に繋がる。

(2) 本研究ではまず腹部組織の動きを効果的に抑える技術を開発する。ミトコンドリア動態の変化や、疾病の進行過程、ストレス条件への反応を明らかにするために、この技術を用いることで、ミトコンドリアや自食胞など他の細胞内小器官を生きたマウス個体の内部器官内で直接観察することができる。

3. 研究の方法

(1)ヘテロプラスミックマウスモデルの検証
①本研究には B6^{spz}, B6 および B6^{NZB}, B6 マウス系列を用いた。B6^{spz}, B6 系列は通常利用されるマウスである *Mus musculus* の近縁種である *Mus spertus* のミトコンドリアDNAと *Mus musculus* の系列である C57BL6(B6)のミトコンドリアDNAをあわせ持ち、B6由来の核ゲノムを持つ系統である。一方、B6^{NZB}, B6 系列は NZB/NSIc(NZB)系列と C57BL6(B6)

系列のミトコンドリア DNA をあわせ持ち、同じく B6 由来の核ゲノムを持つ系統である。マウス系統の複数の新生仔の肝臓、心臓、卵巣、精巣、筋肉等、および各ペディグリーの若い個体の尾より DNA を抽出し、定量 PCR 法によって各器官内での 2 つの異なるミトコンドリア DNA の比率を測定する。統計学的解析を行い、ある器官中で特定のミトコンドリア DNA の選択が起きているかを評価する。

②単一の生殖系列細胞における 2 つの異なるミトコンドリア DNA の存在比計測方法の確立と、様々な発生段階にある単一の生殖系列細胞における 2 つの異なるミトコンドリア DNA の存在比の推定。

生殖系列細胞を胚と成体から取り出す。各単一の生殖細胞はプロテイナーゼ K で一晩処理して溶解させる。得られた反応液は 95°C でプロテイナーゼ K を失活させ、そのままミトコンドリア DNA のコピー数計測に用いる。

B6^{spr, B6} 系列マウスについては、spr ミトコンドリア DNA と B6 系列のミトコンドリア DNA を増幅させるようにそれぞれのプライマーを設計する。

定量リアルタイム PCR 法を用いて、コントロールコピーの増幅曲線を作成し、spr ミトコンドリア DNA と B6 系列におけるミトコンドリア DNA の生殖系列の単一細胞内におけるそれぞれのコピー数を推定する。またこれにより各ミトコンドリア DNA の割合も決定する。

B6^{NZB, B6} 系列マウスについては、NZB 系列のミトコンドリア DNA と B6 系列のミトコンドリア DNA の両方を増幅させるようにプライマーを設計する。PCR は単一細胞の溶解液について行い、生殖系列の単一の細胞内の各ミトコンドリア DNA の割合は RFLP 解析法によって決定する。

(2) 内臓器官の拍動や脈動による動きを効果的に抑制する安定器具の開発

①各内臓器官のサイズを測定する。安定器具はマウス内臓器諸器官の解剖学的、形態学的特徴に基づき、すべての内臓器官の動きを効果的に抑制できるように考案する。器具の安定効果とマウスに対する安全性については包括的に評価を行う。

②異なる生理的条件下やストレス条件下にある内臓器官内でのミトコンドリアや自食胞など細胞内小器官の高解像度生体イメージング

ミトコンドリアや、自食胞、小胞体などの細胞内小器官をラベルする蛍光たんぱく質を発現するトランスジェニックマウスを用いる。これらの構造の動態変化を異なるストレス条件下にある生きたマウス個体で生体イメージングし、解析する。

4. 研究成果

(1)ヘテロプラスミックマウスモデルの検証

①解析の結果、B6^{spr, B6} および B6^{NZB, B6} マウス系列のいずれも新生仔の内臓諸器官内の 2 つの異なるミトコンドリア DNA の割合の違いは認められなかった。さらに尾部の生体検査においては、母親の異なるミトコンドリア DNA の割合は性的に成熟した子マウスの異なるミトコンドリア DNA の割合の平均に近かった。これらの結果は、2 つのマウス系列の胚から成体までの生殖細胞系列では特定の異なるミトコンドリア DNA の選択的複製は起きていないことを示唆している。従って、この 2 系列はミトコンドリア DNA の分離と世代間の伝達の研究に適したモデルと判断された。

②単一の生殖系列細胞における 2 つの異なるミトコンドリア DNA の存在比計測方法の確立と、様々な発生段階にある単一の生殖系列細胞における 2 つの異なるミトコンドリア DNA の存在比の推定。

spr-mtDNA 用にデザインされたプライマーセットは定量リアルタイム PCR 法によって、B6 系列のミトコンドリア DNA の存在下で spr-mtDNA だけを増幅することが確認された。B6 系列用のプライマーセットについても同様に B6 だけを増幅することが確認された。従って、B6^{spr, B6} 系列のマウスの単一の生殖系列細胞について各異なるミトコンドリア DNA の存在割合を正確に推定することが可能となった。RFLP 解析についても、B6^{NZB, B6} 系列のマウスの単一の生殖系列細胞について各異なるミトコンドリア DNA の存在割合を正しく推定することが可能となった。これにより様々な発生段階にある単一の生殖系列細胞における 2 つの異なるミトコンドリア DNA の存在比の推定した。

(2) 内臓器官の拍動や脈動による動きを効果的に抑制する安定器具の開発

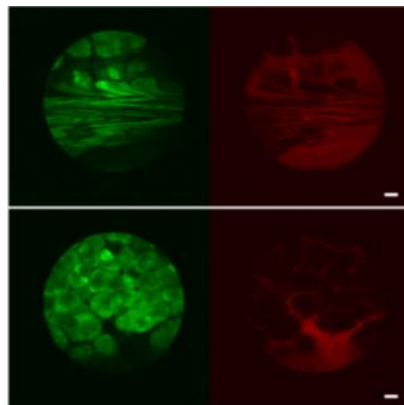


図 2. マウス臓器の生体イメージ

上、マイクロステージなしで撮影した歪んだ画像
下、マイクロステージを用いて撮影した正常な細胞と血管の形態
スケールバー：20 μm

①器官の動きを抑制するために考案し、製作した装置“マイクロステージ”は腹部内臓器官の動きを効果的に抑制している(図2)。この装置によってマウス生体の肝臓と膵臓のミトコンドリアを含む細胞内小器官の動態をイメージングすることが世界で初めて可能となった。この装置が器官に与えるダメージはごく僅かなため、生体イメージを何度も撮影したマウスは正常に行動し、平均的な寿命を保った。

②異なる生理的条件下やストレス条件下にある内臓器官内でのミトコンドリアや自食胞など細胞内小器官の高解像度生体イメージング

4つのトランスジェニックマウスモデル、Mito-DsRed2, GFP-LC3, mRFP-MBD-nls, および ERAI を用いて生体イメージングを行った。これらのマウスの蛍光タンパク質はそれぞれミトコンドリア、自食胞、ヘテロクロマチンの凝集、小胞体をラベルした。マイクロステージを用いてマウス内臓諸器官の生体イメージングを行い、次のような解析を行った。

1) 定量的な解析によって、ミトコンドリアの形態、寿命、分布が組織によって異なり、ストレス条件下で変化の対象となることが分かった。自食や小胞体ストレス、グローブDNAメチレーションについての定量的な解析を行った。

2) 飢餓や化学物質の投与などを含むストレス条件に反応するミトコンドリア動態や自食をリアルタイムで観察した。

3) 生きたマウス個体の腹部内臓器官のオプティカルセクションと、これをもとにした三次元画像構築を行った。

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2件)

①Cao, L., Kobayakawa S., Yoshiki A., and Abe K. 2012. High resolution intravital imaging of subcellular structures of mouse abdominal organs using a microstage device. *PLoS One* 7: e33876. (査読あり)

②Shitara, H., Cao, L., and Yonekawa H. 2010. The mode of mitochondrial DNA transmission in mammals: rapid segregation and bottleneck effect.

Cell Technology 29: 461-465. (査読なし)

[学会発表] (計5件)

①Cao, L. and Abe K. *In vivo* imaging of subcellular structures, mitochondria and autophagosomes, in live mouse abdominal organs using a microstage device. The 12th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine. Tsukuba, Ibaraki, Japan, December 19-21, 2012.

②Cao, L., Kobayakawa S., Yoshiki A., and Abe K. High resolution intravital imaging of subcellular structures of mouse abdominal organs using a microstage device. The 26th Molossinus Symposium. Tokyo, Japan, May 15-16, 2012.

③Cao, L., Shitara H., Sugimoto M., Hayashi J.-I., Abe K., Yonekawa H. Solid evidence proves that the mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mitochondrial DNA molecules in early primordial germ cells of mice. The eighth European Meeting on Mitochondrial Pathology (Euromit 8). Zaragoza, Spain, June 20-23, 2011

④Cao, L., Shitara H., Sugimoto M., Hayashi J.-I., Abe K., and Yonekawa H. (invited speaker). The mitochondrial DNA bottleneck in the germline cells of mammals. Eastern Japanese animal embryo transfer workshop and animal genetics and reproduction seminar. Tsukuba, Japan, December 13, 2010.

⑤Cao, L., and Abe K. (invited speaker). Intravital molecular imaging of cellular processes in live mice. The 4th congress of Asia federation of laboratory animal science. Taipei, Taiwan, November 9-11, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曹麗琴 (SOU REIKIN)

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研究員

研究者番号：60399475

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし