

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23240058

研究課題名(和文)モデルマウスを用いたミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理の解明

研究課題名(英文)Studies on pathogenesises of mitochondrial DNA-based disorders

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) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、変異型ミトコンドリアDNA(mtDNA)を導入したマウス群の作製と活用から、1) mtDNAのtRNA-Lysに点突然変異を有する新たなモデルマウスの作製に成功し、このマウスが筋疾患を発症することを明らかにし、2) mtDNAのND6に生じた点突然変異が老化依存的なリンパ腫の発症に寄与することを見出し、3) 糖尿病という生体環境は変異型mtDNAの病原性を増強することを立証し、ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clear multiple pathogenesises of mitochondrial DNA (mtDNA)-related disorders by using model mice carrying mutant mtDNAs. As results, 1) we succeeded in generating novel model mice carrying mtDNA with a point mutation in tRNA-Lys gene, and the mice expressed myopathy due to the accumulation of mtDNA with a point mutation in tRNA-Lys gene; 2) we showed that mtDNA with a point mutation in ND6 gene was responsible for age-related lymphoma in mice; 3) the diabetic condition was a possible modifier to enhance the pathogenicity of mutant mtDNAs.

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 ミトコンドリア呼吸機能異常 ミトコンドリア病 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

我々の細胞の機能は「核セントラルドグマ」によって制御されているが、ミトコンドリアにも mtDNA を起点とした「ミトコンドリアセントラルドグマ」が存在し、細胞のエネルギー代謝（ミトコンドリア呼吸機能）・カルシウム代謝・細胞死制御などの重要な生命現象に寄与している。近年、mtDNA の病原性突然変異が全身性のミトコンドリア呼吸不全を伴うミトコンドリア病だけでなく、パーキンソン病やアルツハイマー病といった神経変性疾患、我々に最も身近な生活習慣病である糖尿病、さらには老化個体やがん組織からも散見されることを発端に、mtDNA の突然変異によるエネルギー代謝の破綻が多種多様な疾患群の原因となるとして、広く注目を集めるようになった。しかし、ミトコンドリアの呼吸機能は核セントラルドグマによっても制御されていることから、mtDNA に何らかの病原性突然変異が生じていることだけを根拠にそれが多様な疾患群の原因であるとは結論できない。

さらに、mtDNA にはミトコンドリアの呼吸機能にのみ関与する 13 種の呼吸酵素複合体遺伝子とそれらを翻訳するための 22 種の tRNA と 2 種の rRNA がコードされているため、どの遺伝子に病原性突然変異が生じててもミトコンドリア呼吸機能異常という表現型に帰結され、それらを原因とする病型もミトコンドリア機能異常の症度に依存するものの、比較的単一であると予想できる。しかし、各々の遺伝子の突然変異はそれぞれ特異的な臨床症状をとることが知られている。このような変異種による病態多様性の理解には、1) 変異型 mtDNA によって誘導される電子伝達系から過剰に漏出する活性酸素種 (ROS) の関与、2) 機能不全ミトコンドリアの品質管理の関与、3) ミトコンドリア不全に対する核セントラルドグマの代謝適応調節の差異など、新たな病態発症機構の想定が必要となる。しかし、多様な病態との因果関係を説明できる分子機構はもとより、mtDNA の変異種の病原性すら詳細理解されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

ミトコンドリアゲノム (mtDNA) の突然変異が、ミトコンドリア病のみならず、糖尿病や神経変性疾患、さらにはがんや老化など、多様な疾患の遺伝的原因になる可能性が示唆され、変異型 mtDNA 分子種を起点とした多様な病態発症機構の存在が注目されている。mtDNA の突然変異を起点とした病理理解や効果的な治療法の探索には、変異型 mtDNA 分子種を含有するモデル動物の作製が必須となる。しかし、このようなモデル動物の作製には技術的な限界があるため、変異型 mtDNA 分子種間の病原性比較はもとより、多様な病型形成に至る分子病理の解明は遅れている。

本研究では、変異型 mtDNA を導入したマウ

ス (ミトマウス) 群の作製とその活用から、ミトコンドリアセントラルドグマの機能基盤とその破綻病理の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、既存の変異型 mtDNA を含有する 3 種のミトマウス群 (呼吸不全重症型ミトマウス、呼吸不全軽症型ミトマウス、ROS 発生型ミトマウス) に加え、多様な変異型 mtDNA 分子種を蓄積する老化モデルマウスを活用して新たなミトマウスを随時作製する。また、糖尿病モデルマウス (db/db マウス) の核セントラルドグマを有するミトマウス群を得ることで変異型 mtDNA 分子の病原性を変化させた新たなミトマウス群を樹立する。樹立に成功したミトマウス群の大規模な生理・病態解析を実施し、変異型 mtDNA 分子種によって誘発される病態多様性の形成基盤を解明する。

4. 研究成果

(1) 新たなミトマウスの作製

前述のように、mtDNA はミトコンドリアのエネルギー産生に寄与する遺伝子群しかコードしていないにも関わらず、それらの遺伝子群の突然変異は多様な病態の原因になる可能性が示唆されている。このような mtDNA 変異の遺伝子型と病態表現型の複雑な関係を明確に理解し、それらを調節・制御するような新たな治療法の探索には、多種多様な変異型 mtDNA を導入したモデルマウス (ミトマウス) 群の作製とその活用が最も有効な研究戦略となる。

ミトマウスの作製には体細胞突然変異によって生じた変異型 mtDNA 分子種を含有するマウス培養細胞の検索と確保が必須となる。そこで、マウス培養細胞の mtDNA 分子種のスクリーニングを行った結果、mtDNA の *tRNA-Lys* 遺伝子に点突然変異を有する培養細胞を見出すことに成功した。この点突然変異型 mtDNA の病原性を検証した結果、培養細胞のミトコンドリア呼吸機能を低下させることが分かった。そこで、この培養細胞の核を脱核し、マウス ES 細胞に融合させ、mtDNA の *tRNA-Lys* 遺伝子に点突然変異を有するマウス ES 細胞を樹立した。この ES 細胞からキメラマウスを作製し、さらに交配を重ね、全身の細胞に mtDNA の *tRNA-Lys* 遺伝子に点突然変異を有する新たなマウス (*tRNA-Lys* 点変異型ミトマウス) の作製に成功した。このマウスに導入されている点突然変異型 mtDNA 分子はヒトのミトコンドリア病の 3 大病型の 1 つである MERRF の症例から検出される変異型 mtDNA 分子と類似しているため、*tRNA-Lys* 点変異型ミトマウスは MERRF のモデルとなる可能性が高い。

さらに、マウス培養細胞の mtDNA 分子種のスクリーニングを行った結果、mtDNA の *Cytb* 遺伝子に点突然変異を有する培養細胞を見出すことができた。現状、この突然変異型

mtDNA を含有するマウス ES 細胞の作製に成功しているものの、モデルマウスの樹立にまでは至っていない。

(2) ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理の解明

作製に成功した *tRNA-Lys* 点変異型ミトマウスの大規模な病態解析を実施した結果、*tRNA-Lys* 点変異型 mtDNA の含有率がおおよそ 70% を超えた個体では握力の低下と軽度のミトコンドリア呼吸機能低下が観察されたものの、MERRF の症例を再現するには至っていないのが現状である。*tRNA-Lys* 点変異型ミトマウスに導入されている点変異型 mtDNA 分子の個体濃縮率 (含有率) が 70% 程度と比較的低いため (MERRF の症例では変異型 mtDNA は 90% 以上含有されていることが多い)、引き続き、交配を重ねることで、*tRNA-Lys* 点変異型 mtDNA 分子をさらに濃縮させるとともに、老化による MERRF 様症状の発症を検討する必要がある。

既にその作製に成功していた ROS 発生型ミトマウスの大規模な病態解析を実施した結果、ROS 発生型ミトマウスと同一の核 DNA 背景 (B6 マウス) を有し、野生型 mtDNA のみを含有するコントロールマウスでも少なからず老化依存的にリンパ腫を自然発症するが、ROS 発生型ミトマウスの老化依存的なリンパ腫の発症頻度は顕著に高かった。これらの結果は、ROS 発生型ミトマウスに導入されている *ND6* 遺伝子の *G13997A* 点変異がリンパ腫を発症しやすい核背景と協調して、リンパ腫の発症頻度を上昇させることを示唆している。

変異型 mtDNA を含有する培養細胞の生化学的な解析から、変異型 mtDNA の蓄積とともに、ミトコンドリアのクリステ構造の維持・発達に寄与するミトフィリンの発現が低下する傾向にあることがわかった。そこで、ミトフィリンに結合し、その機能活性を増強すると報告されている化合物を呼吸不全重症型ミトマウスに投与した結果、一定の治療効果 (寿命延長と腎臓と心臓におけるミトコンドリア呼吸機能不全の緩和) が観察された。この結果はミトフィリンの安定化が変異型 mtDNA によって誘発される病態の治療ターゲットになる可能性を示唆している。

(3) 核とミトコンドリア両ゲノムによる病態発症機構の解明

ヒトのミトコンドリア病では糖尿病を合併する症例が極めて多いことから、変異型 mtDNA は糖尿病発症の遺伝的要因になると考えられてきた。ところが、作製したミトマウス群は糖尿病を発症しない。このような状況の中、呼吸不全重症型ミトマウスを糖尿病状態にすると (糖尿病モデルマウス db/db の核背景に置換する、または、ストレプトゾトシン投与によって I 型糖尿病化する)、呼吸不全重症型ミトマウスに導入されている欠失

型 mtDNA の病原性が増強されることを見出した。この結果は、ミトコンドリア異常にて糖尿病が発症するのではなく、糖尿病が発症した状態ではミトコンドリア病を発症しやすいという新たな可能性を示唆している。

呼吸不全重症型ミトマウスから抽出した肝臓組織の詳細解析から、欠失型 mtDNA の蓄積と共に、ミトコンドリア分裂に関与する因子群 (*Mff*, *Drp1*, *Mid51* など) の発現やミトコンドリア外膜への局在が増強されていることが分かった。そこで、このミトコンドリア分裂の増強状態の生物学な意義を解明するために、肝臓特異的に *Drp1* を破壊した呼吸不全重症型ミトマウスを樹立した。その結果、野生型の核を有する呼吸不全重症型ミトマウスでは欠失型 mtDNA 分子種を 50% 程度蓄積した肝臓のミトコンドリア機能は正常に保たれているが、肝臓の *Drp1* を破壊した呼吸不全重症型ミトマウスでは欠失型 mtDNA が有意に蓄積するようになり、ミトコンドリア呼吸機能の低下と高血糖が誘導された。これらの結果は、少なくとも肝臓におけるミトコンドリア分裂は欠失型 mtDNA の蓄積そのもの、ならびに、欠失型 mtDNA の蓄積による病原性発症を抑制するために重要な役割を果たしていることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

- 1) Shimizu A, Enoki S, Mito T, Obata K, Yonekawa H, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI (2015) A mouse somatic mutation orthologous to a MELAS A3302G mutation in the mitochondrial *tRNA^{Leu(UUR)}* gene confers the respiration defects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 467: 1097-1102. (査読有り) doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.072.
- 2) Hayashi C, Takibuchi G, Shimizu A, Mito T, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI (2015) A somatic T15091C in the *Cytb* gene of mouse mitochondrial DNA dominantly induces respiration defects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 463: 1021-1027. (査読有り) doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.052.
- 3) Ishihara T, Ban-Ishihara R, Maeda M, Matsunaga Y, Ichimura A, Kyogoku S, Aoki H, Katada S, Nakada K, Nomura M, Mizushima N, Mihara K, Ishihara N (2015) Dynamics of mtDNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. *Mol. Cell. Biol.*, 35: 211-223. (査読有り) doi: 10.1128/MCB.01054-14.
- 4) Hashizume O, Ohnishi S, Mito T, Shimizu A, Ishikawa K, Nakada K, Soda M, Mano H, Togayachi S, Miyoshi H, Okita K, Hayashi JI (2015) Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human

- age-associated mitochondrial respiration defects. *Sci. Rep.*, 5: 10434. (査読有り)
doi: 10.1038/srep10434.
- 5) Shimizu A, Mito T, Hashizume O, Yonekawa H, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI (2015) G7731A mutation in mouse mitochondrial tRNA^{Lys} regulates late-onset disorders in transmitochondrial mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 459: 66-70. (査読有り)
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.070.
 - 6) Hashizume O, Yamanashi H, Taketo MM, Nakada K, Hayashi JI (2015) A specific nuclear DNA background is required for high frequency lymphoma development in transmitochondrial mice with G13997A mtDNA. *PLOS ONE*, 10: e0118561. (査読有り)
doi: 10.1371/journal.pone.0118561.
 - 7) Mito T, Ishizaki H, Suzuki M, Morishima H, Ota A, Ishikawa K, Nakada K, Maeno A, Shiroishi T, Hayashi JI (2015) Transmitochondrial mito-mice Δ and mtDNA mutator mice, but not aged mice, share the same spectrum of musculoskeletal disorders. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 456: 933-937. (査読有り)
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.009.
 - 8) Takahashi T, Yamamoto M, Amikura K, Kato K, Serizawa T, Serizawa K, Akazawa D, Aoki T, Kawai K, Ogasawara E, Hayashi J-I, Nakada K, Kainoh M (2015) A novel mitoNEET ligand, TT01001, improves diabetes and ameliorates mitochondrial function in db/db mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 352: 338-345. (査読有り)
doi: 10.1124/jpet.114.220673.
 - 9) Shimizu A, Mito T, Hayashi C, Ogasawara E, Koba R, Negishi I, Takenaga K, Nakada K, Hayashi JI (2014) Transmitochondrial mice as models for primary prevention of diseases caused by mutation in the tRNA^{Lys} gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 111: 3104-3109. (査読有り)
doi: 10.1073/pnas.1318109111.
 - 10) Yamanashi H, Hashizume O, Yonekawa H, Nakada K, Hayashi JI (2014) Administration of an antioxidant prevents lymphoma development in transmitochondrial mice overproducing reactive oxygen species. *Exp. Anim.*, 63: 459-466. (査読有り)
 - 11) Enoki S, Shimizu A, Hayashi C, Imanishi H, Hashizume O, Mekada K, Suzuki H, Hashimoto T, Nakada K, Hayashi JI (2014) Selection of rodent species appropriate for mtDNA transfer to generate transmitochondrial mito-mice expressing mitochondrial respiration defects. *Exp. Anim.*, 63: 21-30. (査読有り)
 - 12) Katada S, Mito T, Ogasawara E, Hayashi JI, Nakada K (2013) Mitochondrial DNA with a large-scale deletion causes two distinct mitochondrial disease phenotypes in mice. *Genes Genomes Genetics*, 3: 1545-1552. (査読有り) (表紙採択) doi: 10.1534/g3.113.007245.
 - 13) Takibuchi G, Imanishi H, Morimoto M, Ishikawa K, Nakada K, Toyama-Sorimachi N, Kikkawa Y, Takenaga K, Hayashi JI (2013) Polymorphic mutations in mouse mitochondrial DNA regulate a tumor phenotype. *Mitochondrion*, 13: 881-887. (査読有り)
doi: 10.1016/j.mito.2013.07.117.
 - 14) Imanishi H, Takibuchi G, Kobayashi T, Ishikawa K, Nakada K, Mori M, Kikkawa Y, Takenaga K, Toyama-Sorimachi N, Hayashi JI (2013) Specific mtDNA mutations in mouse carcinoma cells suppress their tumor formation via activation of the host innate immune system. *PLOS ONE*, 8: e75981. (査読有り)
doi: 10.1371/journal.pone.0075981.
 - 15) Mito T, Shimizu A, Hashizume O, Katada S, Imanishi H, Ohta A, Kato Y, Nakada K, Hayashi JI (2013) Mitochondrial DNA mutations in mutator mice confer respiration defects and B-lymphoma development. *PLOS ONE*, 8: e55789. (査読有り)
doi: 10.1371/journal.pone.0055789.
 - 16) Hashizume O, Shimizu A, Yokota M, Sugiyama A, Nakada K, Miyoshi H, Itami M, Ohira M, Nagase H, Takenaga K, Hayashi JI (2012) A specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109: 10528-10533. (査読有り)
doi: 10.1073/pnas.1202367109.
 - 17) Yamaguchi J, Nishiyama S, Shimanuki M, Ono T, Sato A, Nakada K, Hayashi JI, Yonekawa H, Shitara H (2012) Comprehensive application of an mtDsRed2-Tg mouse strain for mitochondrial imaging. *Transgenic Res.*, 21: 439-447. (査読有り)
doi: 10.1007/s11248-011-9539-1.
 - 18) Inami K, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Ando J, Iwadate M, Yamamoto M, Lee MS, Tanaka K, Komatsu M (2011) Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J. Cell Biol.*, 193: 275-284. (査読有り)
doi: 10.1083/jcb.201102031.
 - 19) Imanishi H, Hattori K, Wada R, Ishikawa K, Fukuda S, Takenaga K, Nakada K, Hayashi JI (2011) Mitochondrial DNA

mutations regulate metastasis of human breast cancer cells. PLOS ONE, 6: e23401. (査読有り)
doi: 10.1371/journal.pone.0023401.

- 20) Imanishi H, Yokota M, Mori M, Shimizu A, Nakada K, Jun-Ichi Hayashi (2011) Nuclear but not mitochondrial DNA involvement in respiratory complex I defects found in a senescence-accelerated mouse strain, SAMP8. *Exp. Anim.*, 60: 397-404. (査読有り)
- 21) Nakada K and Hayashi JI (2011) Transmitochondrial mice as models for mitochondrial DNA-based diseases. *Exp. Anim.*, 60: 421-431. (査読有り) (表紙採択)

[学会発表] (計15件)

- 1) 中田和人「ミトコンドリアゲノム変異のマウス逆遺伝学～ミトコンドリアダイナミクスと病態発症調節」第15回日本ミトコンドリア学会年会 2015年11月20日. 福井県国際交流会館(福井県福井市)(招待講演)
- 2) 中田和人「突然変異型ミトコンドリアゲノムのマウス逆遺伝学」日本遺伝学会第87回大会 2015年9月24日. 東北大学(宮城県仙台市)(招待講演)
- 3) 中田和人「ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理～多様な病態形成の理解に向けて」第119回日本眼科学会総会 2015年4月17日. ロイトン札幌(北海道札幌市)(招待講演)
- 4) 中田和人「ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理に関する基礎研究」国立遺伝学研究所研究集会: オルガネラゲノムに支配される生命現象 2014年11月7日. 国立遺伝学研究所(静岡県三島市)(招待講演)
- 5) 中田和人、石原直忠、林純一「突然変異型ミトコンドリアゲノムの病原性制御～ミトコンドリア・ダイナミクスの関与～」第87回日本生化学会大会 4S04a-5 細胞と個体におけるミトコンドリアの形成と機能維持 2014年10月. 国立京都国際会館(京都府京都市)(招待講演)
- 6) 中田和人「ミトコンドリア遺伝子疾患の病態発現機構」第19回アディポサイエンス・シンポジウム 2014年8月23日. 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)(招待講演)
- 7) 中田和人「ミトコンドリアと配偶子」日本生殖再生医学会第9回学術集会「生殖細胞とミトコンドリア」2014年3月. 大阪国際会議場(大阪府大阪市)(招待講演)
- 8) Nakada K Model mouse studies: Regulation of threshold effects on pathogenesis of mitochondrial DNA-based diseases. European Meeting on Mitochondrial Pathology (EUROMIT 9), 2014年6月. Tampere Convention Bureau

(Tampere, Finland) (当該分野の世界の4名に選出) (招待講演)

- 9) 中田和人「ミトコンドリアゲノム変異病理と治療戦略」第6回循環・代謝・老化研究会 2012年2月10日. 芝蘭会館(京都府京都市)(招待講演)
- 10) 中田和人「ミトコンドリアゲノム突然変異のマウス逆遺伝学」Advanced Research Group of CardioVascular, Organ Network, and Diabetes 2012年12月16日. ホテルグランドパレス(東京都千代田区)(招待講演)
- 11) 中田和人、林純一「ミトコンドリアゲノム糖尿病のマウス逆遺伝学」第85回日本生化学会大会 1S17 ミトコンドリアの動的な構造・機能変換と生理機能 2012年12月14日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)(招待講演)
- 12) Nakada K Pathogenisities of mutant mitochondrial genomes in mammals. The 2nd UCL-JSPS International Symposium Mitochondria from the fundamental aspects to medical importance. London, UK, 2012年6月26日. University College of London (London, UK)(招待講演)
- 13) 中田和人、林純一「病原性ミトコンドリアゲノム変異のマウス逆遺伝学」第55回日本腎臓学会学術総会 2012年6月2日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)(招待講演)
- 14) Nakada K and Hayashi JI. Reverse genetic studies on mammalian mtDNA mutations. European Meeting on Mitochondrial Pathology (EUROMIT 8), 2011年6月21日. Universidad de Zaragoza (Zaragoza, Spain)(招待講演)
- 15) 中田和人「ミトコンドリアゲノム変異病態と治療戦略」Molecular Cardiovascular Conference II, S IV パネルディスカッション2 心不全とミトコンドリア 2011年9月3日. キロロ(北海道小樽市)(招待講演)

[図書] (計1件)

- 1) 中田和人、林純一(2011)ミトコンドリアモデル動物利用マニュアル(小幡裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通編)株式会社エル・アイ・シー pp. 277-287.

[その他]

ホームページ:

<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