

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Molecular genetic study on change in proportion of the mitochondrial DNA A3243G mutation.

和訳 ミトコンドリア DNA A3243G 変異率の変動に関する分子遺伝学的研究

指導教官 五十嵐 隆 教授 (生殖・発達・加齢医学専攻、小児科学)

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月 1 日入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

No. 41-07444

氏名 三牧 正和

背景

ミトコンドリアはエネルギー産生を司る重要な細胞内小器官で、核DNAとは独立した発現系を持つミトコンドリアDNA (mtDNA) を有している。mtDNA は16568塩基対よりなる環状DNAであり、1細胞内に数百から数千コピー存在している。近年、変異mtDNAによる様々な疾患が臨床的に知られるようになってきているが、1細胞内に変異型と正常型が混在する状態で存在している(これをヘテロプラスミーという)場合と、全てのミトコンドリアDNAが変異型である(これをホモプラスミーという)場合があり、それぞれ病的変異が数多く見いだされている。しかし、表現型と遺伝子型が1対1に対応しないことが多く、mtDNA内の別の変異や多型の役割が病態を考える上で重要な課題となっている。

変異型 mtDNA がヘテロプラスミーの状態が存在する場合、その全体に占める比率が臨床症状や患者細胞の機能に影響を与えることが知られている。ミトコンドリア DNA の A3243G 変異 (以下 3243 変異) は、変異型 mtDNA がヘテロプラスミックに存在する代表的疾患である脳卒中様症状を伴うミトコンドリア異常症 (MELAS) の原因として最頻の遺伝子変異であるが、糖尿病、難聴、

心筋症、腎不全などの多臓器にわたる症状を呈することが知られている。組織特異的な症状の発現において、細胞や組織における 3243 変異率が重要な要因となることが、患者由来の細胞を用いた機能解析や組織を用いた病理学・分子遺伝学的検討で明らかにされている。しかしその変異率を制御する機構の詳細については不明である。

そこで、3243 変異を有するミトコンドリア病患者由来の線維芽細胞の長期継代を行い、3243 変異率の変動を追跡し、その原因について検討した。

対象と方法

骨格筋において3243変異が経時的に減少し、臨床症状や筋病理所見も改善したミトコンドリア病患者より、インフォームドコンセントのもとに皮膚から線維芽細胞培養を樹立し長期継代を行った。初期の段階で細胞を4つのdishに分割し、3-4日毎に培養液を交換し、80%コンフルエントに達した時点で細胞を回収し、1/2をDNA抽出、1/4を細胞保存に利用し、1/4を継続培養した。抽出したDNAから正確に変異率を求めるため、リアルタイム定量PCR法を用いた。また、3243変異以外の変異の検索のために、mtDNAの全塩基配列を決定した。核DNA上の偽遺伝子の影響を排除するために、まずmtDNAをlong PCRにて増幅し、得られたPCR産物を用いて塩基配列決定を行った。

また、見出されたmtDNA内の多型の細胞機能への影響を検討する目的で、脱核した患者由来線維芽細胞と、mtDNAを欠損した骨肉腫培養細胞（ $\rho 0$ 細胞）をポリエチレングリコールを用いて融合させ、細胞質融合細胞（サイブリッド）を作製した。これにより、核を同一とする、様々なmtDNA変異率をもつ細胞を得た。これらの細胞機能を調べるために、ジギトニン処理を行った細胞に、呼吸鎖酵素の基質を加えてATPの再生量を測定し、酵素活性を比較した。

結果

培養開始から2ヶ月後から急激に3243変異率が上昇する系列Aが見出され、他の系列では逆に3243変異率が減少した。この結果は、再現性も確認した。

3243変異以外のmtDNA上のシス変異が3243変異率の変化に関与する可能性を考え、異なった動きを示した2つの系列の継代前後、合計4ポイントの全塩基配列を決定したところ、正常人では認められない3つの変異が明らかになった。A系列のみに3243変異の上昇中にG185A変異とT7080C変異の変異率の変化を認めた。その他の系列には継代前後で大きな変化を認めなかった。また全ての

系列でホモプラスミックにT5775C変異を認めたが、継代前後で変化を認めなかった。

リアルタイム定量PCR法でこれらの変異の経時的変化を詳細に検討したところ、A系列の継代の全経過において3243変異型と185野生型の比率の変化が連動し、継代途中から7080変異型が出現し、3243変異型の比率と並行して変化していることが明らかになった。

そこで、A、B両系列を用いてサイブリッドを作製し、様々なmtDNA変異率を有する細胞をそれぞれ30クローンずつ得た。185野生型が高率な細胞は3243変異率が高率であり、両者は個々の細胞レベルでも相関していた。また、7080変異を有する細胞は3243変異率が高率であることが明らかになった。さらに、3243変異率がほぼ100%であり、7080変異を持たない細胞と、7080変異を80%で有する細胞が得られ、両者の呼吸鎖酵素活性を測定したところ、7080変異を有する細胞の活性が有意に高いことが確認された。

考察

mtDNAのシス変異の検討により見いだされたG185A変異はmtDNAの D-loop内の重鎖の複製開始点の近傍に、T5775C変異は軽鎖の複製開始点の近傍に位置しており、これらの変異がmtDNAの複製機構に影響を与えている可能性がある。変異率の変化の検討より、系列Aにおいて3243変異型が185野生型と、3243野生型が185変異型と連動していると考えられ、サイブリッドを用いた実験結果から個々の細胞レベルでも両者が相関していることが確認された。G185A変異がmtDNAの複製系に影響を与えた結果、3243変異率の変動をもたらしている可能性が示唆される。G185A変異とT5775C変異の両者がmtDNAの複製に対して相対的影響を与えているか否かは今後の検討課題である。

7080変異は電子伝達系酵素の複合体IVのサブユニットであるCO I内に存在し、フェニルアラニンからロイシンへのアミノ酸置換をもたらすため、タンパク機能に影響を与える可能性のある変異である。細胞継代の途中から3243変異と並行して変化していること、7080変異を有するサイブリッドが3243変異を高率に有していたこと、7080変異を有する細胞の呼吸鎖酵素活性が有意に高かったことから、細胞機能の変化を介して3243変異を高率に保持するのに寄与していると考えられる。

ミトコンドリア病の病態を考えるうえで重要なA3243G変異率の変動に、mtDNA上の他のシス変異が関与している可能性が示された。

おわりに

近年、mtDNAの維持や複製に関わる核性の因子がミトコンドリア病の原因になることが明らかにされている。また、mtDNAの変化が加齢や腫瘍、神経変性疾患等の様々な疾患に関与しているという報告も相次ぎ、ミトコンドリアがヒトの病態に与える影響が、過去に想定されていたよりもはるかに多彩であることが明らかになってきた。今回の研究結果は、mtDNA内の病的変異とその効果を調節するシス変異の存在、及びそれらの機能発現に関与する核性因子の重要性を示すものである。今後このようなミトコンドリア-核相互作用の研究によって、ミトコンドリアがヒト疾患の種々の病態に及ぼす影響をより深く理解できることが期待される。