

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 三牧 正和

本研究はミトコンドリア病の症状発現にとって重要な役割を演じているミトコンドリア DNA (mtDNA) の病因的変異の割合に関し、その変動に關与する因子を分子遺伝学的に探索するために行われた。代表的な病因的変異である mtDNA A3243G 変異 (3243 変異) を有しながら、生検筋での変異率が経時的に低下し自然緩解した患者の皮膚線維芽細胞を用い、長期継代を行いその変異率の変動を経時的に追跡し、その原因の検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 患者から採取した皮膚を用いて初代培養を樹立し、複数の細胞集団に分割し 120 日間の長期継代を行い、その 3243 変異率をリアルタイム定量 PCR 法で追跡した結果、ほとんどの細胞集団では変異率が 10%から徐々に低下し検出感度以下となることが確認された。患者生検筋と同様に変異率が低下することが示され、本患者特有の性質を示していると考えられた。一方、培養開始 2 ヶ月後から急激に変異率が上昇し、継代前の 10%から継代後には 90%以上に達した細胞集団が唯一発見された。変異率が低下した細胞系列及び上昇した細胞系列につき、培養初期に保存した細胞で再継代を行うことにより、それぞれの変異率の低下と上昇の再現性も確認された。
2. 両細胞系列の継代前後の DNA を抽出し、DNA sequencing により mtDNA の全塩基配列を比較した結果、3243 変異が上昇した細胞系列のみで、健常人では稀な 2 つの新たな点変異の変異率が継代の前後で大きく変化していることが見出された。1 つは mtDNA の重鎖の複製開始点の近傍にある G185A 変異 (185 変異) であり、もう 1 つは電子伝達系酵素の複合体 IV のサブユニットである COI 内に存在しアミノ酸置換をもたらす T7080C 変異 (7080 変異) であった。

3. リアルタイム定量 PCR 法を用い、185 変異率を経時的に追跡することにより、3243 変異率と逆相関していることが示された。185 変異を伴わない mtDNA 鎖の複製の優位性が、同一鎖に存在する 3243 変異の割合の上昇に寄与している可能性、mtDNA の複製に関与する核性因子が同変異に作用している可能性を示唆する興味深い結果である。
4. リアルタイム定量 PCR 法により 7080 変異率を追跡した結果、継代の途中から変異が出現し、3243 変異率と並行して急激に増加することが示された。電子伝達系タンパクのコード領域の変異であることから、細胞機能への影響を介して 3243 変異率の上昇に寄与している可能性が示唆された。
5. 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（ ρ 0 細胞）をポリエチレングリコールの作用で融合させ、核を同一とし様々な mtDNA 変異率をもつ細胞質融合細胞（サイブリッド）を作製した結果、3243 変異を高率に有する細胞の多くは 7080 変異を有していることが明らかになった。サイブリッドをジギトニン処理し呼吸鎖酵素の基質を添加して、ATP 産生能を測定し酵素活性を比較した結果、7080 変異を有する細胞では 3243 変異による呼吸鎖酵素活性の低下が抑制されることが統計学的有意差をもって示された。7080 変異が 3243 変異を高率に維持することに寄与する可能性が明らかにされた。

以上、本論文は mtDNA の 3243 変異率の変動に際し、mtDNA 内の他の変異が連動して変化する現象を明らかにした。これらの変異が mtDNA の複製機構や細胞機能への影響をもたらす可能性を示すものである。ミトコンドリア病の病態理解や治療に向けて、mtDNA の病因的変異に対する他の変異の影響の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。