

## 論文内容の要旨

### 論文題目 MELAS A3243G 変異型ミトコンドリア DNA と ミトコンドリア転写終結因子 mTERF の機能メカニズム

氏名 矢野 隆光

ミトコンドリアは真核細胞のエネルギー産生を担っている細胞小器官であり、酸化リン酸化により、化学的エネルギー (ATP) を細胞に供給している。成熟赤血球を除く、ヒト細胞のミトコンドリア内には核 DNA とは異なる、マルチコピー性の環状遺伝子であるミトコンドリア DNA (mtDNA) が多数存在している。mtDNA の複製、転写は核遺伝子によって制御されており、mtDNA 自体は、酸化リン酸化に必須な 4 つの呼吸鎖複合体のサブユニットタンパク質合成に必要な 2 種類のリボソーム RNA (rRNA)、22 種類のトランスファーRNA (tRNA) そして 13 種類のミトコンドリアタンパク質の遺伝情報をコードしている。

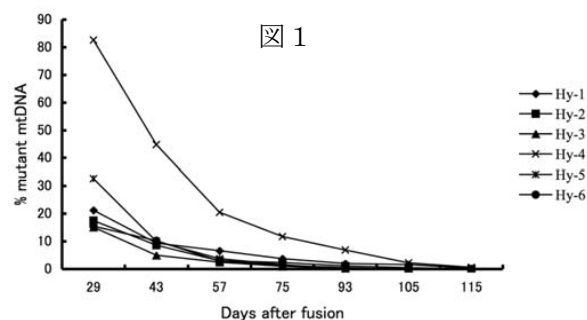
近年、この mtDNA 上の遺伝子変異が様々な疾患を引き起こすことが次々と報告されている。これらを含めたミトコンドリア機能低下によって引き起こされる疾患は広義にミトコンドリア病と言われ、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患などにもミトコンドリア機能異常が関与していることが今日指摘されている。

このミトコンドリア病で頻度が高い疾患は MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) であり、主に幼児期に発症し、多臓器不全を伴う予後不良の疾患である。MELAS の分子遺伝学的病因の約 80% は mtDNA のロイシン tRNA (UUR) 遺伝子上のミトコンドリア・ゲノム塩基番号 3243 番におけるアデニン (A) からグアニン (G) への一塩基置換変異 (A3243G) である。現在のところ MELAS の根本的治療法は存在しない。

細胞あたりの A3243G 変異型 mtDNA 量の増減は、細胞核バックグラウンドに依存することが人工融合細胞であるサイブリッド細胞を使った実験で報告されている。今回、我々は A3243G 変異型 mtDNA を高率に保持するサイブリッド細胞とヒト二倍体繊維芽細胞を融合させたハイブリッド細胞を作成し、細胞融合により導入された細胞核を含む細胞因子が A3243G 変異型 mtDNA の細胞内相対量にどのような影響を与えるか解析した。

我々は、まず予備実験として A3243G 変異型 mtDNA を持つサイブリッド細胞と HPRT (ヒポキサンチントランスフェラーゼ) 活性欠損である Lesch-Nyhan 症候群患者由来繊維芽細胞とを融合させた。そして HAT で選択後に得られたハイブリッド細胞内の A3243G 変異型 mtDNA 量の著しい減少を観察した。

次に、予備実験における X 染色体連鎖の Lesch-Nyhan 変異の実験への影響の可能性を排除するため、正常二倍体繊維芽細胞とハイグロマイシン耐性の A3243G 変異型 mtDNA を持つサイブリッド細胞との細胞融合を行った。ハイグロマイシンと HAT で細胞選択後、細胞クローンを採取し経代を続けた。全てのハイブリッド細胞クローンは 115 日間ウリジンを含む完全培地で経代し、細胞あたりの A3243G 変異型 mtDNA 量を放射性ラベル PCR にて定量した。その結果、ハイブリッド細胞内の A3243G 変異型 mtDNA の割合は減少してゆき、全ての細胞クローンで、細胞培養 15 経代後には放射性ラベル解析で検出限界以下の量まで A3243G 変異型 mtDNA は殆ど消失していることが判明した (図 1)。



我々はこれらの実験から次のような知見を得た。1) 哺乳類の受精において卵細胞による精子ミトコンドリアの破壊に伴う父性 mtDNA の選択的消失が知られているが、このような mtDNA の選択的破壊は受精後数十時間以内に起こる急速なものであるのに対して、本研究で観察された変異型 mtDNA の減少は、少なくとも週単位の長期的なものであった。2) 2 種類の由来の異なるミトコンドリア同士の融合、そしてミトコンドリア内の物質交換は遅くとも 2 週間後には起こることがハイブリッド細胞で既に証明され、報告されている。サイブリッド細胞に導入された繊維芽細胞の核を含む細胞因子が、サイブリッド細胞由来のミトコンドリアを破壊し、A3243G 変異型 mtDNA の減少に寄与するならば、2 週間以上の選択的な変異型 mtDNA の消失は起こらない筈であるが、変異型 mtDNA の減少は 2 週間以上の長期に渡って続いた。

以上から、細胞融合後の A3243G 変異型 mtDNA の減少は、哺乳類における受精で観察される

ような mtDNA の選択的破壊とは別のメカニズムによるものと考えられ、ミトコンドリアの破壊に伴う現象というより寧ろ、ハイブリッド細胞内における野生型 mtDNA と A3243G 変異型 mtDNA での複製機構または維持機構の何らかの差異が繊維芽細胞由来の核を含む細胞因子の導入により齎されたという考えの方が、長期的な A3243G 変異型 mtDNA の減少を説明するのに妥当であろうという仮説を提示するに至った。

野生型 mtDNA と A3243G 変異型 mtDNA の複製機構などの差異を考えるにあたって、ミトコンドリアに局在する mtDNA 結合タンパク質の一つである mitochondrial transcription termination factor (mTERF) のミトコンドリア転写終結に必須な 13 塩基の結合配列内に A3243G 変異が存在することから、mTERF が細胞内での mtDNA ハプロタイプの選択におけるデターミナントとなり得る可能性が考えられた。*In vitro* の実験では A3243G 変異は mTERF タンパク質の結合配列に対する著しい親和性の障害を引き起こすことが既に知られている。

このことを踏まえ、我々は mTERF 遺伝子を哺乳類細胞発現ベクターに組み込み A3243G 変異 mtDNA を持つサイブリッド細胞に導入し、mTERF タンパク質を強制発現させ、A3243G 変異 mtDNA の細胞あたりの相対量にどのような影響を与えるかを調べた。コントロールとして mTERF 遺伝子が組み込まれていない発現ベクターを細胞に導入した。薬剤選択したのち、出現した細胞クローンをコントロールベクター、mTERF 遺伝子を組み込んだベクター (pTER2) とでそれぞれ取得し、クローンごとの変異率を調べた。コントロールの細胞クローンでは変異の減少、増加の何れの方向へのシフトも見られなかったが、pTER2 を組み込んだサイブリッド細胞では高い変異率を持つ細胞クローンが多数、統計学的有意に得られ、mTERF 遺伝子の過剰な発現が細胞内における A3243G 変異型 mtDNA の増加に大きな役割を果たしていることを示した。この結果は mTERF がサイブリッド細胞内において、野生型 mtDNA と A3243G 変異型 mtDNA の細胞内選択におけるデターミナントと成り得る可能性を示している。

次に、mTERF 遺伝子の発現の減少が、mtDNA の細胞内の量にどのような影響を与えるかを調べるため、small interfering RNA (siRNA) による mTERF 遺伝子発現のノックダウンを行なった。mTERF 遺伝子のメッセンジャー RNA (mRNA) に対する siRNA をヒト繊維芽細胞に導入した後、real-time 定量 RCR 法で mtDNA 量の変化を 5 日間モニターした。結果、siRNA を導入することにより、mtDNA の細胞あたりのコピー数は次第に増加し、導入 5 日後では導入前の 3.5 倍以上に増加することが判った。このことから mTERF はヒト mtDNA の複製機構における抑制因子として働いていることが示唆された。

近年、mTERF の従来考えられてきた機能が、*in vitro* と *in vivo* の実験結果の相違から、疑問視されつつある中、新たに見出された mTERF が引き起こすとされる現象に mtDNA の複製停止があるが、この現象と今回我々の mTERF 発現のノックダウンの実験結果から想定した mTERF の機能についての見解は一致している。

以上のことから、野生型 mtDNA と A3243G 変異型 mtDNA の複製機構の相違を説明する分子モデルが考えられた (図 2)。この分子モデルでは A3243G 変異によって mTERF タンパク質と mtDNA との結合の親和性に障害が惹起される為、mTERF による野生型 mtDNA の複製停止に対して A3243G 変異型 mtDNA では複製停止が不十分であり、野生型 mtDNA に比べ多くの run-off 鎖の生成が高頻度にかかることになる。本研究の mTERF 遺伝子発現を亢進させた実験系での A3243G 変異型 mtDNA が細胞内で増加してくる現象は、この分子機構モデルで説明出来るのではないかと考えられた。

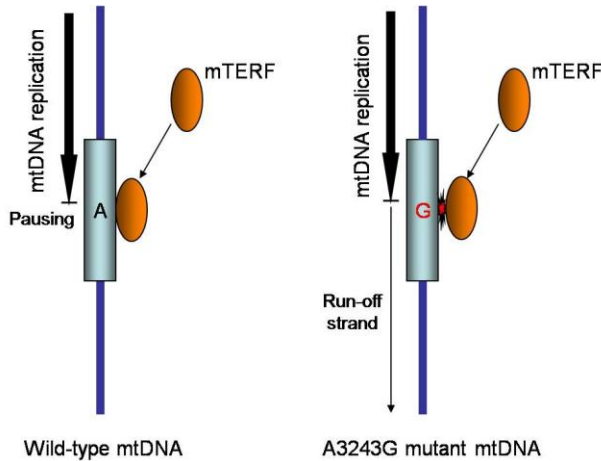


図 2

我々は、この分子モデルに従い、塩基配列特異的に DNA に結合する有機化合物である pyrrole-imidazole polyamide (PI ポリアミド) を分子デザイン・合成し、これによりサイブリッド細胞内における野生型 mtDNA の複製を促進することを試みた。A3243G 変異型 mtDNA を高率に保持するサイブリッド細胞を、実際この PI ポリアミドで処理したところ、野生型 mtDNA の増加を観察した (図 3)。このことから、我々の考えている前述の分子機構モデルは、まだ完全には証明されていない部分もあるが、概ね正しいのではないかと考えている。そして PI ポリアミドによるサイブリッド細胞での野生型 mtDNA を選択的に増加させる戦略は、ミトコンドリア病 MELAS の新たな治療法に繋がる可能性がある。

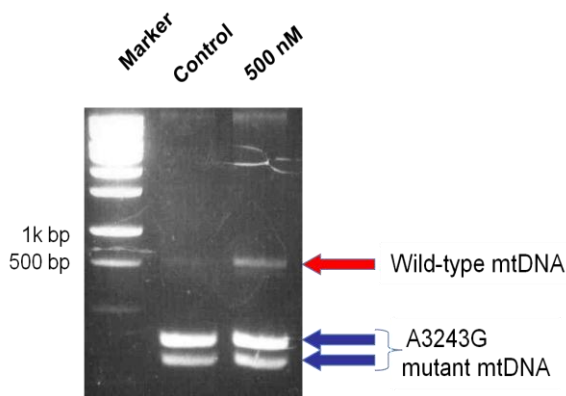


図 3