

# 論文審査の結果の要旨

氏名 矢野 隆光

本論文は三章からなっており、第一章では、A3243G変異型mtDNAを効率に持つMELASサイブリッド細胞と正常組織由来繊維芽細胞を融合させることで、変異型mtDNAが消失することを示し、次のことを明らかにし考察した。すなわち、ミトコンドリアの融合が完了する2週間後以降もA3243G変異型mtDNAの減少は進行した。またmtDNAの消失は漸次的であり、受精時に見られるようなミトコンドリアの破壊に伴うmtDNAの急激な消失ではない。以上のことから変異型mtDNAの消失はミトコンドリアの破壊に伴う変異型mtDNAの破壊というより、野生型と変異型mtDNAとの複製機構または維持機構の何らかの差異と考えられた。本研究で扱っているA3243G変異はミトコンドリア転写終結因子mTERFのmtDNAの結合配列内に存在し、この変異はmTERF結合配列への親和性の障害を引き起こすことが*in vitro*の実験で既に示され、またmtDNA複製の課程でmTERFが複製反応に影響する因子であるとする報告もあることから、野生型mtDNAと変異型mtDNAの細胞内選択のデターミネントである可能性が強く示唆された。

第二章では、このmTERFが実際mtDNAのデターミネントとしてA3243G変異型mtDNAの挙動にどのような影響を与えるかどうかを調べるため、mTERF遺伝子を哺乳類細胞発現ベクターに組み込み、サイブリッド細胞に導入し、mTERFを発現亢進させ、変異率の変動に関与している因子であるかを解析した。また正常細胞の内在性mTERFをsiRNAにてノックダウンし、mtDNAの複製機構における制御機能を解析した。実験結果から、mTERFの発現亢進はA3243G変異型mtDNAの増加に関わっていること、またmTERFの機能低下により、細胞内のmtDNAのコピー数が増加することから、mTERFは複製に対して抑制的機能を有すること、これらのことが実験で示され、以上の実験結果を充足する、細胞内でA3243G変異型mtDNAが増加してくる分子機構メカニズムを提唱した。

第三章では、第二章で提唱したA3243G変異型mtDNAとmTERFとの相互作用を説明した分子機構モデルに従って、野生型mtDNAへのmTERFの結合をPIポリアミド (ML1ポリアミド) で選択的に阻害することにより、野生型mtDNAの複製の促進を試みた。その一連の実験で、mTERFの野生型mtDNAの結合配列への結合を阻害するよう分子デザインされたML1ポリアミドは、EMSAにより*in vitro*でターゲットDNAに塩基特異的に結合すること、また*in vivo*でも、ミトコンドリア内に移行し、mtDNAのターゲット配列に結合して、mTERFタンパク質の結合を阻害していることがmIPアッセイの実験結果で示された。また実際、ML1ポリアミドをサイブリッド細胞の生育している培地に加えて培養することで、サイブリッド細胞内の野生型mtDNA量を選択的に細胞内で増加させ、期待された効果を認めた。また効果を持つ濃度範囲内のML1ポリアミドで処理した培養細胞には、通常のDMEM培地で一週間培養しても、何ら変化は認められないことから、ML1ポリアミドによるmTERFの結合阻害が引き起こされても、

mTERFの転写終結機能／ミトコンドリアrRNA合成は他のメカニズムによって代償されているか、ミトコンドリアrRNAの合成の為の転写終結が主要な機能とされているmTERFの本来の役割が別の処にあるの难道うとも言える。このことは、ミトコンドリアrRNAが合成されないことに起因する副作用が現れない理由と考えられた。これはA3243G変異を持つサイブリッド細胞やMELAS患者由来組織でもミトコンドリアrRNAが合成されている報告に合致している。以上のことから、ML1ポリアミドは、現在有効な治療法が存在しないMELASの新たな治療薬に繋がる可能性がある。

なお、本論文は第一章から第三章の論文全般にかけて上田卓也博士の指導の下、東京大学柏キャンパス新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻、分子医科学分野の研究施設を使用し行なわれた研究である。また第一章の一部の実験は田中雅嗣博士が当時所属していた岐阜国際バイオ研究所の研究施設を、第二章の一部の実験は福田昇博士の日本大学医学部細胞再生移植医学分野の研究施設を、そして第三章は永瀬浩喜博士の日本大学医学部癌遺伝学分野の研究施設を使用し行なわれた研究であるが、論文提出者が主体となって発案したアイデアに基づき実験計画を立案、実験分析及び検証を行なったもので、論文提出者の寄与が充分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。