

氏 名 (本籍)	設 ^し 樂 ^{たら} 浩 ^{ひろ} 志 ^し (千葉県)
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	博 乙 第 2024 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Molecular Genetics of Mouse Mitochondrial DNA: Maternal Inheritance and Bottleneck Effect (マウスミトコンドリア DNA の分子遺伝学的研究：母性遺伝とボトルネック効果)
主 査	筑波大学教授 理学博士 林 純 一
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌
副 査	筑波大学教授 理学博士 沼 田 治
副 査	筑波大学客員教授 理学博士 米 川 博 通
	((財)東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所, 副所長)

論 文 の 内 容 の 要 旨

高等動物においてミトコンドリア DNA (mtDNA) は細胞内に多数のコピー (体細胞では 10^3 コピー) として存在しているものの, ほとんどの動物種で驚くほどその同質性が保たれている。この mtDNA の同質性を説明するために, mtDNA 遺伝に特徴的な母性遺伝様式とボトルネック効果 (初期発生過程における極端な mtDNA の減少) が主要な要因として考えられている。

(1) 母性遺伝

mtDNA は核ゲノムとは異なり, 母親からのみ伝達される, いわゆる母性遺伝様式を行うと信じられてきた。1995 年にマウス同種間交雑において精子由来 mtDNA は初期発生過程の 2 細胞期までに消失し, mtDNA の遺伝様式は完全に母性遺伝であることが報告された。一方マウス異種間交雑においては, 約 50% の胚については出生個体まで精子由来 mtDNA が検出されたが, 残りの 50% の胚では 2 細胞期までに消失していた。そこで, さらに詳細な検討を行った結果, 1) 受精時に侵入した精子由来 mtDNA は F_1 個体において雌雄の区別無く各臓器にランダムに伝達していた。2) F_1 個体の卵巣への精子由来 mtDNA の伝達率はわずか 6.6% であり, 未受精卵中からは検出されなかった。3) 戻し交雑の N_2 世代においては精子由来の mtDNA の侵入は起こらない, ことが明らかとなった。これらの結果は, 異種間交雑においても mtDNA の母性遺伝は厳密に保たれていることを意味している。そこで, この初期胚における外来性ミトコンドリアの排除能力について, 精子由来ミトコンドリアに特異的なのか否かを確かめるために, 精子以外の細胞由来ミトコンドリアを初期胚に導入し, これらのミトコンドリアが消失する様子について, その mtDNA を検出することで検討した。その結果, 生殖細胞由来ミトコンドリアは体細胞由来ミトコンドリアよりも排除されやすいことが示された。さらに EGFP によりミトコンドリアを標識したトランスジェニックマウスを作製し, 交雑実験を行った結果, 前核期まで残存していた精子由来ミトコンドリアは, 2 細胞期胚ではほとんど観察されなかった。この結果は, PCR 法によって証明された精子由来 mtDNA が消失する時期とほぼ一致した。

(2) ボトルネック効果

前述のように個体における mtDNA が異質性から同質性の状態へ速やかに移行する要因に、ボトルネック効果が考えられてきた。ボトルネック効果は発生過程に細胞あたりの mtDNA コピー数が減少するために起こることが考えられてきたが、その詳細については不明であった。そこで雌性生殖系列の単一細胞における mtDNA 分子数の定量を行ったところ、mtDNA のコピー数は PGC 11.5 dpc の時期に極小となり、そのコピー数も平均で約 150 コピーであった。これらの結果から、細胞あたりの mtDNA 分子数減少によるボトルネック効果は PGC 移動期に起こると考えられ、これまでに推定されてきた理論値 (segregation unit) の 200 とほぼ同じであることから、ボトルネック効果が生体内で起こっていることを初めて実証できた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、mtDNA の母性遺伝、およびボトルネック効果の観点から解析することにより、単一個体内におけるミトコンドリア DNA (mtDNA) の同質性 (homoplasmy) の原因を、マウス初期胚を主たる材料に用いて明らかにした意欲的な研究である。

まず、mtDNA の母性遺伝についての研究では、以下の 2 点を明らかにした。

1) これまでの報告から、異種間交雑では mtDNA の母性遺伝が破綻すると考えられていたことに対し、設楽浩志は、「異種間交雑の場合においても、父親の mtDNA が残存するのは雑種第 1 代のみで、その後の世代に父親の mtDNA は伝達されず、「種間交雑においても母性遺伝が厳密に維持されている」という結論を確かなものとした。この発見は、「母性遺伝の厳密性」を基礎として発展してきた、mtDNA 多型に基づく様々な動物種の系統進化学に確固たる基礎を与えるものとして、またミトコンドリア病の原因を究明する上でも非常に重要である。

2) 精子 mtDNA の排除が、生殖細胞に特異的な現象であることを証明した。この発見は、今後精子 mtDNA の排除機構を分子遺伝学的に究明する上で、貴重な情報になると期待できる。さらに、ミトコンドリアが EGFP で標識されているトランスジェニックマウス (mtGFP-Tg マウス) 系統を樹立し、精子ミトコンドリアの消失過程を観察した結果、これまで分子生物学的に証明されていた精子 mtDNA の消失時期と EGFP に標識された精子ミトコンドリアの消失時期が一致することを証明した。このことは、精子ミトコンドリア消失時期の詳細な経時的観察を可能にすると共に、この現象に関わる細胞内オルガネラの同定のための研究にも利用できるという点で有用である。

次に、mtDNA の個体内同質性に mtDNA のボトルネックが関わっているということは、理論集団遺伝学の分野では、約 20 年以上以前から予想され、この方面の多くの研究者から仮説として提出され、支持されていたが、その分子遺伝学的事実に基づく実験的根拠は現在までほとんど皆無であった。設楽浩志はこの点に注目し、独自の超微量測定技術を開発することによって、mtDNA のボトルネックが確かに起こること、そしてそのボトルネックは 11.5 日胚の始原生殖細胞で起こっていることを始めて明らかにした。これは、ミトコンドリアゲノムに関する遺伝学の研究において、極めて重要な知見である。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。