【32】

氏　名(本　籍)	高井大策(福岡県)
学位の種類	博　士(理　学)
学位記番号	博甲第 1,464 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Role of Mitochondrial DNA Mutations in Age-Associated Mitochondrial Dysfunction in Mammals (老化に伴ったミトコンドリア機能低下におけるミトコンドリア DNA 突然変異の役割)
主　査	筑波大学教授　理学博士　平林民雄
副　査	筑波大学教授　理学博士　小熊　譲
副　査	筑波大学教授　農学博士　田仲可昌
副　査	筑波大学助教授　理学博士　林　純一

論　文　の　要　旨

近年，ミトコンドリア病を引き起こすことが証明されたミトコンドリア DNA（mtDNA）中の突然変異な健康な人の組織からも検出され，その量が老化に伴って有意に上昇していることが示された。このことから，老化に伴ったミトコンドリア呼吸機能低下の原因が mtDNA 中に生じた体細胞突然変異の蓄積にあるのではないかと推察され大きな注目を集めるようになったが，この可能性を直接証明する証拠は得られていない。そこでこの問題を解決するため，以下に示す 3 つの別々の角度から行った研究結果について報告する。第一部はヒトの皮膚繊維芽細胞を材料として老化と mtDNA との関係について明らかになったこと；第二部は老化に伴った mtDNA 中の突然変異の蓄積が最も顕著に報告されている脳についての研究の結果；第三部は老化に伴って検出されている mtDNA 突然変異の量が PCR で検出できる程度の微量なものであることに着目し，この少量の突然変異がミトコンドリア機能に影響を及ぼしうるかどうかに関する研究結果である。

第一部：まず 0 歳から97歳までのヒト由来の皮膚繊維芽細胞について，そのミトコンドリア内電子伝達系の酵素複合体の一つチトクロム c オキシダーゼ（COX）の活性を調べたところ，その活性は加齢に従って明らかに低下していることがわかった。この低下の原因が mtDNA にあるのか核 DNA にあるのか明らかにするために，これらの繊維芽細胞の mtDNA 欠損 HeLa 細胞（ρ^0細胞）へ導入し，この細胞（cybrid）の COX 活性を解析した。その結果 mtDNA の移植によってミトコンドリアの機能低下は伝えられず，この機能低下が mtDNA により引き起こされていないことがわかった。更にこの活性低下の原因が核 DNA の変異にあるということを明らかにするため，HeLa 細胞の核 DNA のみを老化したヒト由来の繊維芽細胞に移植しこの細胞の COX 活性を調べたところ活性が完全に回復していた。これらの事実からヒト繊維芽細胞で発見した老化に伴う COX 活性低下の原因は mtDNA ではなく，核 DNA の劣性突然変異であることがわかる。

第二部：上記の結論が繊維芽細胞のような分裂細胞ではなく，mtDNA の突然変異が蓄積しやすいと考えられている脳細胞にも一般化できるかどうかを明らかにしなければならない。しかしながら，健康なヒトからの，これらの組織は入手不可能であることから，この研究では様々な週齢のマウスを用いて脳のミトコンドリアの呼吸機能を測定した。その結果 COX 活性は出生後96週目までわずかずつではあるが常に増加し続けた。この原因を探るためまず COX 活性に直接影響があると考えられるミトコンドリア内でのタンパク質合成活性の加齢に伴っ

た変化を調べたところ，出生後のすぐの一時的な低下に続いて，週20週を中心としたピークを示し，以後老化に従って次第に低下することがわかった。この老化に伴ったミトコンドリア内でのタンパク質の合成活性の変化の原因を明らかにするためサザンブロット法やPCR法を用いて調べたところ，老化に伴うmtDNAのコピー数の減少や欠失突然変異の蓄積は認められなかった。この問題に明確な結論を与えるためには，マウス脳細胞のmtDNAのみをマウスのρ^0細胞に導入し解析する必要があり，現在検討中である。

第三部：老化に伴って様々なmtDNA突然変異のごく微量な蓄積がミトコンドリアの呼吸機能の低下を引き起こすには細胞内のミトコンドリア間に相互物質変換が存在してはならない。そこで，ミトコンドリア間に物質交換があるのかどうかを明らかにするために，異なったmtDNA突然変異を持つ細胞間で細胞融合を行い，両者が同一細胞内に共存する状況を人工的に作り出して解析を行っているところである。

審　査　の　要　旨

本研究の特徴は，最近大きな注目を集めつつある老化に伴うミトコンドリア呼吸機能低下の問題について一部の組織でその原因を明らかにした点である。ヒトの細胞では，線維芽細胞を用いたミトコンドリア移植を行うことにより，核ゲノムに存在する遺伝子の劣性突然変異が原因であること，またヒトでは研究不可能な脳組織ではマウスを用いることにより，少なくともミトコンドリアゲノムの遺伝子の突然変異は原因とはならないことを明らかにした。このような本研究の成果は老化や老化に伴う疾患の研究領域に貴重な基礎資料をもたらすものと評価できる。

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。