

氏名(本籍)	伊藤清香(長野県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第2512号		
学位授与年月日	平成13年3月23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 on Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases (ヒトミトコンドリアDNA突然変異と神経変性疾患との因果関係の解明)		
主査	筑波大学教授	理学博士	林 純一
副査	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	高橋三保子
副査	筑波大学教授	理学博士	小熊 讓

論文の内容の要旨

ミトコンドリアはエネルギーを供給する細胞内小器官であり、その内部には呼吸鎖酵素をコードするミトコンドリアDNA (mtDNA) が存在している。近年、パーキンソン病、アルツハイマー病などの神経変性疾患患者の脳組織における mtDNA 突然変異の蓄積や呼吸鎖酵素活性の低下が報告されている。mtDNA は、突然変異原物質の標的になりやすく、ミトコンドリア内で発生するフリーラジカルにさらされているために、核DNAより体細胞突然変異が蓄積しやすいと考えられている。しかし、呼吸鎖酵素は核DNAとmtDNAの両方にコードされているため、神経変性疾患でみられる呼吸鎖酵素活性低下は、mtDNA突然変異の蓄積の可能性のほかに、核DNAの突然変異、他の外部要因によって引き起こされる可能性も残されている。仮に、神経変性疾患患者脳組織由来のmtDNAのみを導入した培養細胞で脳組織と同様に呼吸鎖酵素活性が低下していた場合、この呼吸鎖酵素活性の低下はmtDNAに原因があるといえる。このようなことを確かめるには、ヒトの脳組織から得たmtDNAをヒト培養細胞に導入する必要があるが、ヒトの脳組織は個体の死後、時間が経過した後にしか得ることが出来ない。そこで本研究では、マウスを実験材料とし、個体の死後、どの程度脳組織のmtDNAが存在し、その機能を培養細胞中で取り戻すことが出来るかを調べた。この結果をもとに、ヒトmtDNA突然変異の蓄積が神経変性疾患の呼吸鎖酵素活性低下の原因となっているかを調べた。

サザンブロット法により、4℃で長期間保存したマウスの組織において、死後4週目までmtDNAを検出することができた。次に、死後0～4週間、4℃で保存したマウスの脳組織からmtDNA供与体として神経細胞のシナプトソームを単離し、mtDNAを持たない培養細胞(ρ0細胞)と融合してCytoplasmic hybrids (Cybrids) を作製した。これらのCybridsでは、コントロールと同様の呼吸鎖酵素活性が観察された。つまり、個体の死後、時間が経過しても、マウスの脳組織mtDNAに呼吸鎖酵素活性低下を引き起こすような突然変異が生じていないことを示している。従って、この手法をヒトに応用し、死後脳組織mtDNAをρ0細胞に移植することによって、神経変性疾患にともなう呼吸鎖酵素活性低下の原因がmtDNA突然変異にあるのか調べることができると結論した。

次に、アルツハイマー病患者の死後脳組織のシナプトソームをρ0細胞と融合し、Cybridsを作製した。死後脳組織のmtDNAは、ρ0細胞に導入することによって、培養細胞の中でその複製と遺伝子発言を再開できることを明らかにした。血液と血小板由来Cybridsは突然変異型mtDNAが全く検出できなかったにも関わらず、脳組織と脳組織由来Cybridsは、PCRで検出可能なレベルの突然変異型mtDNAを検出することができた。しかし、生化学

的解析では、アルツハイマー病患者の脳組織と血小板由来の全てのCybridsが、同じ年齢の健常人のmtDNAを持つCybridsと同様の呼吸鎖酵素活性を持つことを確認した。これらの結果から、アルツハイマー病患者の脳組織に、突然変異型mtDNAは存在するが、呼吸鎖酵素活性を低下させるほどmtDNAの機能が損なわれてはいないことが示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文の特徴は、老化や神経変性疾患で報告されているミトコンドリア呼吸機能低下の原因がmtDNAの突然変異に起因するのかどうかを調べる手法を確立するために、マウス個体の死後、脳組織のmtDNAが死後長期間分解されずに残っており、培養細胞の中でその複製と遺伝子発言を開始しうるとを示した点である。さらに、前述の手法をヒトに応用し、アルツハイマー病患者の死後脳組織または血小板のmtDNAを移植した培養細胞が、健常者のそれと同様の呼吸鎖酵素活性を持つことを示し、アルツハイマー病患者の脳組織や血小板において、mtDNAが機能的に損なわれていないことを明らかにした。

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。