

氏名(国籍)	ちん 陳	ちゅう 柱	せき 石	(台湾)
学位の種類	博士(理学)			
学位記番号	博甲第3527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1項該当			
審査研究科	生物科学研究科			
学位論文題目	<b>Determination of Normal Ranges of Mitochondrial Respiratory Activities by mtDNA Transfer from Human Subjects to mtDNA-less HeLa Cells for Identification of the Pathogenicities of Mutated mtDNAs</b> (突然変異 mtDNA の病原性を特定するためのミトコンドリア呼吸活性正常範囲の決定)			
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	杉田	博昭
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	沼田	治

### 論文の内容の要旨

ミトコンドリアは真核細胞に存在する細胞内小器官で、酸化リン酸化によって生命活動に必要な ATP の大部分を合成している。ミトコンドリアのマトリックスには独自の遺伝情報であるミトコンドリア DNA (mtDNA) が複数コピー存在している。ヒトの mtDNA は 16.5kb の環状二重鎖で、13 種類の呼吸鎖酵素複合体の subunits, 2 種類の rRNAs と 22 種類の tRNAs がコードされている。また、13 種以外の呼吸鎖酵素複合体 subunits や mtDNA の複製、転写、翻訳に関与するタンパク質は核 DNA にコードされている。そのため、ミトコンドリアの呼吸機能は mtDNA と核 DNA の二重の支配を受けていることになる。

ミトコンドリアは細胞内の ATP 生産において重要な役割を果たすため、もし mtDNA に何らかの病原性突然変異が生じ、更にこのような変異型 mtDNA が細胞内に蓄積すると、細胞の ATP 合成に重大な影響を与え、多様な臓器、組織の異常を引き起こす可能性が予想できる。一方、mtDNA の塩基置換速度は核 DNA の 5～10 倍であると算出されていることから、mtDNA には病原性突然変異だけでなく、むしろ多様な多型突然変異が生じていることが知られている。ところが、このような多型突然変異がミトコンドリアの呼吸機能に与える影響はほとんど解析されていないのが現状である。そこで、本研究ではヒトの mtDNA の多型突然変異がミトコンドリア呼吸機能に与える影響について検証するため、健常者集団におけるミトコンドリア呼吸機能の分散の決定を試みた。

まず、54 人の健常者の血小板と mtDNA を完全に欠損させた  $\rho^0$ HeLa 細胞を融合し、健常者由来の mtDNAs を導入した細胞(健常者 cybrids)を作製した。この操作により、ミトコンドリア呼吸機能に対する核 DNA の個体差の影響を完全に排除することができる。

作製した健常者 cybrids のミトコンドリアの呼吸鎖酵素活性 (complex I, complex II + III, complex IV の活性) と酸素消費量を生化学的に定量すると、 $\rho^0$ HeLa 細胞に再び HeLa 細胞の細胞質を融合させた cybrids が示した値を 100% とした時、健常者 cybrids の complex I の活性は 75.5%～128.3%、complex II + III の活性は 75.5%～127.4%、complex IV の活性は 79.3%～127.3%、そして酸素消費量は 70.7%～131.1%

と大きく分散することが分かった。この分散は健常者集団に含まれる mtDNAs の多型突然変異に起因すると考えられる。そして、この分散範囲を下回った場合、その cybrids には病原性突然変異型 mtDNA が存在している可能性を示唆している。この可能性を検証するために、病原性突然変異型 mtDNA を導入した cybrids を作製し、同様の解析を行った。その結果、*tRNA<sup>Leu (UUR)</sup>* 遺伝子と *tRNA<sup>lle</sup>* 遺伝子にそれぞれ突然変異が入った mtDNA を導入した cybrids (cy3243, cy4269) では complex I, complex II + III, complex IV の全ての活性だけでなく、酸素消費量もまた完全に消失していた。complex I の subunits である *ND1* と *ND6* 遺伝子に突然変異が存在している cy3394 と cy14577 では、complex I の活性のみが特異的に低下し、酸素消費量は健常者 cybrids のそれより低い数値 (61.0%と 62.0%) を示した。

前述のように、本研究では数多くの検体から、信頼できる健常者のミトコンドリア呼吸機能の分散範囲を特定することができた。この結果により、mtDNA の多型突然変異により健常者間に呼吸機能の個体差を生じる可能性が示唆されたほか、ミトコンドリア呼吸機能障害をもつ検体の特定やその検体からの病原性突然変異 mtDNA の検出などに応用できると期待される。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

mtDNA の多型突然変異の存在は古くから知られているものの、その生物学的意義についての解析はほとんど行われていなかった。本研究は健常者の mtDNAs の多型突然変異によるミトコンドリア呼吸機能の個体差の範囲を決定したことにより、mtDNA の多型突然変異がこの個体差の原因である可能性を提唱することができた。また、健常者におけるミトコンドリア呼吸機能の下限値を把握できたことは、mtDNA の病原性突然変異によって発症するミトコンドリア遺伝子疾患の診断に際して有用な基準データとなる。

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。