

氏名（本籍）	谷 春菜		
学位の種類	博 士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 9837 号		
学位授与年月日	令和 3 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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Reverse Genetic Studies on Mitochondrial tRNA-related Disorders (ミトコンドリア関連疾患に関する逆遺伝学的研究)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人
副査	筑波大学教授	博士（理学）	中野 賢太郎
副査	筑波大学教授	博士（理学）	石田 健一郎
副査	筑波大学教授	博士（理学）	千葉 親文

論 文 の 要 旨

ミトコンドリアは外膜と内膜によって形成された細胞小器官である。ミトコンドリア内膜には呼吸酵素複合体 I-V が含有され、それらによる酸化的リン酸化反応によって生体活動に必要な大部分のATPが産生されている。ミトコンドリアには独自のゲノムであるミトコンドリアDNA (mtDNA) が細胞あたり数百から数千コピー内在されている。哺乳類のmtDNAには、前述の呼吸酵素複合体 I, III, IV, V を構成する13種の構造遺伝子と、これらの翻訳に必要な22種のtRNA遺伝子および2種のrRNA遺伝子の計37種の遺伝子がコードされている。近年、病原性突然変異型mtDNAの蓄積がミトコンドリア病の原因となることが報告され、さらに、同様の病原性突然変異型mtDNAが、糖尿病、神経変性疾患、不妊症、がんなどの多様な疾患群のほか、老化の原因にもなる可能性が示唆されたことを受け、病原性突然変異型mtDNAによる多様な病態発症機構の存在が注目を集めている。このようなミトコンドリア関連疾患の病態発症機構を理解し、効果的な治療法を探索するためには、ヒトの症例で見られる変異型mtDNA分子種を導入したモデル動物の作出と活用が最も有効な研究戦略となる。しかし、mtDNAは外膜と内膜に閉ざされたミトコンドリアマトリクスに複数コピー存在するため、遺伝子操作は極めて困難である。このような状況の中、著者は、突然変異型mtDNAを有したマウス培養細胞株の単離を発端として、その細胞質体をマウスES細胞に融合するといった斬新な手法を駆使し、世界に先駆けてミトコンドリア *tRNA^{Leu(UUR)}* 遺伝子に病原性点突然変異を有する新規ミトコンドリア関連疾患モデルマウスの樹立に成功した。

著者はまず、ミトコンドリア関連疾患の病原性変異として特に頻度の高いミトコンドリア *tRNA^{Leu(UUR)}* 遺伝子に生じる点突然変異に着目し、同遺伝子領域に A2748G 点突然変異を有したマウス培養細胞株 (B82mt2748) を見出した。マウス A2748G 点突然変異はヒト A3302G 点突然変異と相同であり、A3302G 点突然変異を有するミトコンドリア病の患者例が報告されている。著者は、マウス ES 細胞をローダミン 6G にて処理する事でミトコンドリアを除去し、これらと脱核した B82mt2748 を融合させた。さらに、著者は樹立した ES クローンから A2748G 変異型 mtDNA が検出されることを確認し、8 細胞期の ICR 胚とアグリゲーション法にて雌のキメラマウスを得て、これらの雌のキメラマウスを雄の野生型マウス (C57BL/6J) と交配させることで全身性に A2748G 変異型 mtDNA を含有する F1 世代マウスの作出を試みた。結果として、59 個体の F1 世代のうち 35 個体の尾において 5%-87% の割合で 2748G 変異型 mtDNA が検出された。これらの結果から著者は、全身性に 2748G 変異型 mtDNA を含有するマウス (mito-mice

tRNA^{Leu(UUR)2748}) の樹立に成功したと結論した。

次に著者は、樹立した mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} がマウス系統として維持できるか否かを検証するため、mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} の F1 世代の雌から F2 世代に母性遺伝によって伝達される A2748G 変異型 mtDNA の含有率の変化について調べた。性成熟直後の 7 週齢の雌マウスを交配させることで得た F2 世代の尾に含まれる A2748G 変異型 mtDNA の割合は、母親の有する A2748G 変異型 mtDNA の割合と同程度であった。しかしながら興味深いことに、母親の加齢に伴い、産仔に遺伝する A2748G 変異型 mtDNA の含有率は減少する傾向が見られた。これらの結果から、本研究にて樹立した mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} の系統維持においては、母親の性成熟後早期に子孫を得る必要があることが分かった。

生体内における変異型 mtDNA の組織間分布の差異や加齢に伴う含有率の変化は、変異型 mtDNA に由来する病態や重症度に大きな影響を及ぼすと考えられている。そこで著者は、mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} の詳しい病態解析に先んじて、3ヶ月齢および10ヶ月齢の mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} の12種の組織における A2748G 変異型 mtDNA の含有率の差異と時間依存的な蓄積について調べた。同一個体間において、A2748G 変異型 mtDNA は全ての組織において同程度に蓄積しており、3ヶ月齢および10ヶ月齢でその含有率に差は見られなかった。これらの結果から著者は、mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} に導入した A2748G 変異型 mtDNA は全身にほぼ同程度の含有率で分配され、少なくとも生後3ヶ月から10ヶ月までの間に組織内の含有率は変動しないと結論した。

最後に著者は、mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} 集団を尾に含まれる A2748G 変異型 mtDNA の含有率が < 50% の群 (%Low 群) と ≥ 50% の群 (%High 群) に分け、それぞれ若齢期 (3ヶ月齢) と成熟期 (10ヶ月齢) における詳細な病態解析を実施した。若齢期では病態は見られなかったものの、成熟期の %High 群では血中乳酸値の上昇および骨格筋における異常ミトコンドリアや脂肪滴の蓄積などの症状が認められた。さらに、mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} から摘出した臓器の生化学解析において、%High 群の肝臓および脳ではミトコンドリア呼吸酵素複合体 I の顕著な活性低下が観察された。これらのことから著者は、mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} は成熟期までにミトコンドリア病を発症すると結論した。また、%High 群では若齢期に高血糖状態が確認され、成熟期には耐糖能異常およびインスリン抵抗性が観察された。さらに、成熟期の %High 群の肝臓では脂肪滴の蓄積が確認され、血液生化学解析から %High 群では血中トリグリセリドや ALT の上昇が確認された。これらのことから著者は、mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} は成熟期までにミトコンドリア病、2型糖尿病、肝機能障害の少なくとも3種の病態を加齢依存的に発症させるための病原性を有していると結論した。ミトコンドリア病患者の組織を用いた先行研究において、A3302G 変異がミトコンドリア RNA プロセッシング不全を引き起こし、結果として蓄積したミトコンドリア RNA 前駆体が病原性発揮に関与することが報告されている。そこで著者は、mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} の肝臓におけるミトコンドリア RNA 前駆体の蓄積について解析した。その結果、A2748G 変異型 mtDNA を高率に蓄積した肝臓においてもミトコンドリア RNA 前駆体の蓄積が観察され、mito-mice tRNA^{Leu(UUR)2748} がヒト患者と同様の分子病理を再現していることが分かった。

審 査 の 要 旨

著者は、細胞質移植法を駆使して、ヒトの症例でも見られるミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子に病原性点突然変異を導入した病態モデルマウスの作出に成功している。さらに著者は、樹立したモデルマウスの病態解析から、tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子に病原性点突然変異を有するミトコンドリアゲノムの蓄積がマウス個体の成熟とともにミトコンドリア病、2型糖尿病、脂肪肝による肝機能障害といった少なくとも3種の異なる病態を誘導することを逆遺伝学的に明らかにした。本研究において著者が樹立したマウスはミトコンドリア関連疾患の原因として最も報告例の多い tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子に病原性点突然変異を有する世界初の病態モデルマウスであり、変異型 mtDNA 分子種の組織分配や遺伝、ならびに、ミトコンドリア関連疾患の病態発症機構の解明に関する基礎研究はもとより、ミトコンドリア関連疾患の治療法の探索といった応用研究にも活用されることがおおいに期待される。これらのことから、本研究の成果は生物学領域において独創性に秀でており、学術的な価値が極めて高いと評価された。

令和3年1月26日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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