

平成 21 年 8 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770149  
 研究課題名 (和文) 細胞内分解系に着目した異常オルガネラ排除機構の解明  
 研究課題名 (英文) Study on removal of abnormal organelle by autophagy  
 研究代表者  
 佐藤 晃嗣 (SATO AKITSUGU)  
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師  
 研究者番号：00419243

研究成果の概要 (和文)：本研究はマウス雌性生殖細胞における病原性欠失突然変異型 mtDNA ( $\Delta$  mtDNA) の加齢に伴う減少がオートファジーによって行われている可能性を検証したものである。オートファジー誘導に必須のタンパク質である Atg7 を欠損したマウスの胎児卵巣を正常個体に移植し、加齢に伴う  $\Delta$  mtDNA の変化を観察したところ、オートファジー欠損卵母細胞では  $\Delta$  mtDNA の減少速度が緩やかになることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Mito-mice (mitochondrial disease model mice) have a characteristic inheritance pattern of deleted mitochondrial DNA ( $\Delta$  mtDNA). When mother mito-mice are young, their offspring have high  $\Delta$  mtDNA, but when mother mito-mice get older, their offspring have lower  $\Delta$  mtDNA than their elder siblings. This study hypothesized that this phenomenon is governed by intra-cellular scavenging organelle, autophagosome, and examined how  $\Delta$  mtDNA changes if mother mito-mice don't have functional autophagosomes. In this study, Atg7 KO mice were used as autophagosome deleted mice. Since homogenous Atg7 KO mice die immediate after birth, ovaries of obtained Atg7 deleted mito-mice with  $\Delta$  mtDNA were transplanted into healthy mice, and time-dependent change of  $\Delta$  mtDNA amount in oocytes was examined. In the homogeneous Atg7 KO mice, the decrease of  $\Delta$  mtDNA were milder than those of wild-type and heterogenous Atg7 KO mice. This result implies that  $\Delta$  mtDNA decrease in oocytes with mother's aging might be controlled by intra-cellular autophagosomes. However, the number of experiments repeated was not enough, and further repetitions will be required to confirm the result.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：タンパク質分解

## 1. 研究開始当初の背景

研究担当者はこれまでミトコンドリア DNA (mtDNA) の変異に起因するミトコンドリア病の研究を行ってきた。mtDNA 上に生じた突然変異はミトコンドリアにおけるエネルギー産生不全を引き起こし、ミトコンドリア病と総称され、脳や筋肉といったエネルギー要求性の高い器官において症候群性の疾患をひきおこすことが知られている。近年、研究担当者は病原性欠失突然変異型 mtDNA ( $\Delta$  mtDNA) を有するミトコンドリア病モデルマウス (ミトマウス) において、 $\Delta$  mtDNA が非常に興味深い次世代伝達パターンを持つことを発見した。母親が若齢時に得られた産仔は母親と同等、あるいはそれよりも高い割合の  $\Delta$  mtDNA を有するのに対し、同じ母親が加齢したときに生まれてくる産仔における  $\Delta$  mtDNA の割合は若齢時のそれよりも有意に低いものであった。このような現象はヒトミトコンドリア患者における病原性突然変異型 mtDNA の遺伝パターンでは確認されておらず、近年異なる研究室で作成された突然変異型 mtDNA を有するマウスにおいても観察されている (Fan *et al.* 2008) マウス特異的な現象である。

申請者のこの発見はこれまでのミトコンドリア病態の常識では説明できない極めて興味深い現象であり、将来的には卵母細胞の品質向上による不妊治療などへの応用の可能性を秘めている現象と考えた。しかし研究担当者はこれまでにこの現象が(1)母親の加齢に伴い卵母細胞における  $\Delta$  mtDNA の割合が低下すること、(2)  $\Delta$  mtDNA を多く有する卵母細胞に対するセレクションではなく、卵母細胞の中で何らかのメカニズムにより  $\Delta$  mtDNA が減少する、ということを確認しているものの、その詳細なメカニズムを解明するには至っていない。

## 2. 研究の目的

研究担当者はマウスにおける  $\Delta$  mtDNA の仔における減少が、細胞内のオルガネラ分解を担う、オートファジーによるものであると仮定した。本研究は雌性生殖細胞特

異的なオートファジーによるミトコンドリアの品質管理機構の存在を検証するものである。

## 3. 研究の方法

(1) 全身で *Atg7* を欠損しているマウスは出生後 1 日以内に死亡してしまう。そのため本研究には卵母細胞特異的に *Atg7* を欠損しているコンディショナル KO マウスを使用する必要がある。組織特異的 *Atg7* 欠損のために lox 配列を *Atg7* に有するマウス (*Atg7<sup>lox</sup>*) と、卵母細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (*Zp3-Cre*) を交配する。さらに mtDNA は母性遺伝するためメスミトマウスと *Atg7<sup>lox</sup>·Zp3-Cre* マウスのオスを交配することで卵母細胞特異的に *Atg7* を欠損し、かつ  $\Delta$  mtDNA を有したマウス ( $\Delta$  mtDNA · *Atg7<sup>lox</sup>·Zp3-Cre*) を得る。得られたメス  $\Delta$  mtDNA · *Atg7<sup>lox</sup>·Zp3-Cre* は野生型オスマウスと交配する。得られた産仔については  $\Delta$  mtDNA の割合を測定し、ミトマウスで観察された母親の加齢に伴う仔における  $\Delta$  mtDNA の減少が観察されるかどうかを判定する。十分な産仔が得られない場合には過排卵処理により卵母細胞を採取する、もしくは卵巣から直接外科的に卵母細胞を採取することで同現象の有無を判定する。 $\Delta$  mtDNA の定量にはサザンブロット法による  $\Delta$  mtDNA と野生型 mtDNA の長さによる識別を行う。卵母細胞等の微量サンプルについては定量 PCR 法により、両 mtDNA の割合を算出する。

(2) (1)における方法は Cre リコンビナーゼによる *Atg7* 遺伝子の欠損だが、Cre リコンビナーゼによる loxP サイトの組み替え効率を考慮すると 100%欠損体が得られない可能性がある。Cre-loxP システムによらず、*Atg7* 欠損卵母細胞を得るため  $\Delta$  mtDNA · *Atg7<sup>lox</sup>·Zp3-Cre* マウスからメス  $\Delta$  mtDNA · *Atg7<sup>lox</sup>* マウス (*Atg7* ヘテロ欠損マウス) を得、オス *Atg7<sup>lox</sup>* マウスと交配する。メンデル遺伝の法則に従い 1/4 の確立で  $\Delta$  mtDNA · *Atg7<sup>lox</sup>* マウス (*Atg7* ホモ欠損マウス) が得られる。このマウスは生後 1 日以内に

オートファジー不全により死亡するため、出生後ただちに卵巣を摘出し、異なる成熟個体（野生型マウス）の卵巣に移植する方法を計画している。出生直後の卵巣を成熟個体に移植した場合でも正常な卵母細胞の成熟は行われ、産仔を得ることも可能である。ドナー  $\Delta$  mtDNA・Atg7<sup>+/+</sup> マウス卵巣由来の卵母細胞とレシピエント野生型マウス由来の卵母細胞を識別するため、両者の mtDNA に塩基配列多型があるマウス系統をレシピエントに使用し、出生個体卵巣移植を行う。

(3) 母親ミトマウスの加齢に伴う仔における  $\Delta$  mtDNA の減少は、卵母細胞中で  $\Delta$  mtDNA が呼吸活性の低下を引き起こし、それをオートファジーが認識しているのではないかと考えられる。実際、近年細胞内で呼吸活性が低下したミトコンドリアがオートファゴソームに捕獲されているという報告もある (Elmore *et al.* 2004)。しかしその現象はごく一部でしか見られないまれな現象である。しかしミトマウスの卵巣における  $\Delta$  mtDNA の劇的な変化を考えると、卵巣卵母細胞においてはオートファジーが頻繁にミトコンドリアを捕食するような特別な経路が存在するのかもしれない。この仮説を証明する方法として、卵巣培養系においてミトコンドリア阻害剤を加え、ミトコンドリアの呼吸活性が低下した状態で、それに対しオートファジーがどのような動態を示すかを観察する。使用する薬剤としては電子伝達系阻害剤ロテノン（複合体 I 阻害剤）、アンチマイシン A（複合体 III 阻害剤）、オリゴマイシン A（ATPase 阻害剤）、FCCP（脱共役剤）、等を使用する。

#### 4. 研究成果

(1) オートファジー誘導に必須のタンパク質である Atg7 を卵特異的に欠損した Atg7 KO マウスと、ミトコンドリア DNA に大規模欠失突然変異を有する  $\Delta$  mtDNA を有するマウスを交配し、 $\Delta$  mtDNA の特異的排除を観察した。しかし KO マウス卵において  $\Delta$  mtDNA の特異的排除は見られなかった。しかしこの実験の問題点は卵特異的に Atg7 を欠損させるのに使用した Zp3 Cre リコンビナーゼである。Zp3 は卵透明帯に発現しているタンパク質である。卵母細胞は通常休止状態にあり、ホルモンサイクルによって活性化され、成熟・成長

を経て排卵されるのだが、このサイクルにおいて、透明帯が生じるのは活性化された後になる。つまり休止状態の卵母細胞において Zp3 は発現しておらず、Zp3 Cre リコンビナーゼも発現しないことになる。そのため Atg7 遺伝子の欠損も卵母細胞休止期にはおこらず、ホルモンサイクルによる活性化がおこって初めて欠損することになる。卵母細胞における  $\Delta$  mtDNA の減少はマウスの場合 4 日であるホルモンサイクルのような短いタイムスパンで起こるのではなく、数ヶ月単位の長い期間で起こることから、休止状態にある卵において何らかの現象が生じていると考えられる。つまり休止状態にある卵母細胞において既に Atg7 を欠損したマウスが必要だったのである。しかしこの目的のために適当な Cre リコンビナーゼ系統マウスを有していなかったため、当初 Cre リコンビナーゼが 100%機能しない場合を想定して準備していた Atg7 ヘテロ欠損の雌雄マウス交配により得られる Atg7 KO マウス胎児を使用することにした。得られた Atg7 KO マウス胎児より未成熟卵巣を採取し、それをレシピエントマウス卵巣中で培養し、 $\Delta$  mtDNA の特異的排除を観察することとした。

(2) Atg7 ヘテロ欠損の雌雄マウス交配によって得られる Atg7 KO マウス胎児の未成熟卵巣移植を行った結果、Atg7 KO 卵巣における  $\Delta$  mtDNA の減少速度は、ヘテロ、又は野生型の卵巣のものより遅いことが示唆された。しかし移植卵巣数、また得られた卵母細胞数は統計的処理を行うには十分な数とはいえ、明確な結論を導き出すには、より多くの検体数が必要だと考えられる。

(3) マウス胎児卵巣の体外培養系におけるオートファジー阻害剤添加実験については、卵巣スライスの体外培養系を試みたものの、長期間の体外培養に成功しておらず、ミトコンドリア呼吸活性とオートファジーによるミトコンドリアの排除の関係を明らかにすることはできなかった。今後はより安定した長期間にわたる卵巣の体外培養法の確立が必要だと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者  
には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Mitochondrial complementation  
preventing respiratory dysfunction  
caused by mutant mtDNA.

Sato A, Nakada K, Hayashi J.

Biofactors. 2009 Mar-Apr;35(2):130-7

査読有り

[学会発表] (計 1 件)

佐藤 晃嗣、千葉 智樹

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本  
生化学会年会・合同大会、「Atg7 KOマウス  
における精子ミトコンドリアの排除」2008  
年12月9日、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 晃嗣 (SATO AKITSUGU)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・  
講師

研究者番号：00419243