

氏名(本籍)	こばやし まきこ 小林 万希子 (茨城県)			
学位の種類	博士(理学)			
学位記番号	博甲第5714号			
学位授与年月日	平成23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	Studies for Generation of Mitochondrial Disease Model Mice by Introduction of mtDNA from Different Rodent Species (異種 mtDNA の導入によるミトコンドリア病モデルマウスの作製に関する研究)			
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	漆原 秀子	
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	中田 和人	
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治	

論文の内容の要旨

ミトコンドリア独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) には 13 種の呼吸酵素複合体サブユニット遺伝子、2 種の rRNA 遺伝子、22 種の tRNA 遺伝子が存在し、その複製、転写、翻訳は核 DNA 由来の因子によって制御されている。また、呼吸酵素複合体は核 DNA 由来のサブユニットと mtDNA 由来のサブユニットの両方が集合し機能している。つまり、ミトコンドリアは核と mtDNA の二重支配を受けている。

mtDNA に突然変異が生じミトコンドリア機能異常が起こると、ミトコンドリア病(ミトコンドリア脳筋症)を発症することが知られている。しかし実際には mtDNA の突然変異とミトコンドリア病との関係は状況証拠しかなく、ミトコンドリア病の発症機構および治療方法を解明するためには mtDNA に変異をもつミトコンドリア病モデルマウスが必要である。ところが、核 DNA とは異なり mtDNA の遺伝子操作は技術的に未確立であるため、ミトコンドリア病モデルマウスを作製するためには mtDNA 体細胞突然変異を利用する方法と異種 mtDNA を利用する方法しかない。本研究では、後者の異種 mtDNA を利用したミトコンドリア病モデルマウスの作製を試みた。

まず、どの種の mtDNA を用いるかを調べるために、以下のような実験を行った。一般的実験用マウス (*Mus musculus*) の核をもち、同じ *Mus* 属で種の異なる *Mus. spretus* および属の異なるラット (*Rattus norvegicus*) の mtDNA をもつサイブリッド(それぞれ CyMs, CyRn) を作製した。すると、CyMs は、マウス (*Mus. musculus*) の mtDNA をもつサイブリッド (CyMm) と同程度の呼吸活性を示した。一方 CyRn は、CyMm の 20-50% の呼吸活性しか示さなかった。また、さらに遺伝学的に遠い種であるハムスターの mtDNA はマウスの核支配下では安定して存在できないことを確認した。以上のことより、ミトコンドリア病モデルマウスの作製には呼吸活性の低下を引き起こすラット mtDNA を利用することが最適であることが分かった。

ラット mtDNA をもつマウスの作製には、ラット mtDNA をマウス初期胚に導入する方法と、マウス ES 細胞に導入する方法が考えられる。しかし、マウス初期胚にもマウス ES 細胞にもマウス自身の mtDNA が多数存在しており、出生個体に導入したラット mtDNA が存在できるのかは疑問である。そこで、次のような

実験を行った。上記で作製したマウス核とラット mtDNA をもつサイブリッド CyRn にマウスの血小板を融合させマウス mtDNA を導入した。するとラット mtDNA はマウス mtDNA に完全に置き換わってしまった。つまり、マウス核支配下ではマウス mtDNA が優先的に複製され、ラット mtDNA は相対的に排除されてしまうと考えられる。このことから、ラット mtDNA をもつモデルマウスを作製する場合には、ラット mtDNA を導入する初期胚または ES 細胞のマウス mtDNA を完全に排除しておく必要があることが分かった。

これらの結果に基づき、ラット mtDNA をもつモデルマウスの作製手順として以下を提案した。

- ① mtDNA を持たないマウス ES 細胞を作製する（ES 細胞の mtDNA はローダミン 6G 処理により除去されるという報告がある）。
- ② ①で作製した ES 細胞にラット mtDNA を導入し、ラット mtDNA とマウス核をもつ ES 細胞を作製する。
- ③ マウス 8 細胞期胚に②で作製した ES 細胞を導入し、キメラマウスを作製する。
- ④ キメラマウスの交配を重ね、全身にラット mtDNA をもつマウスを作製する。

この研究の後、笠原等は、上記②のラット mtDNA を持つマウス ES 細胞の作製に成功した。そしてキメラマウスの作製が試みられたが、ラット mtDNA による呼吸機能の低下が重篤であったためかキメラマウスは得ることができなかった（Hum. Mol. Genet., 15(6):871-81）。このことより、ラット mtDNA をもつミトコンドリア病モデルマウスの作製は不可能であると考えられる。

したがって、遺伝的距離が *Mus musculus* に対し *Mus spretus* とラットの間にある種が適切である。McKenzie 等は、*Mus caroli* の mtDNA をもつサイブリッドを作製したが、*Mus spretus* 同様、サイブリッドの呼吸機能低下は認められなかった。*Mus caroli* よりさらに遺伝的に遠い種としては、*Apodemus*（アカネズミ属）や *Tokudaia*（トゲネズミ属）があり、これらがモデルマウス作成のための mtDNA 供与種となる可能性が残されている。

審査の結果の要旨

本論文は、異種 mtDNA の導入によるミトコンドリア病モデルマウスの作製について、最新の知見も合わせてまとめられている。著者は、核 DNA と mtDNA とが異種のものであるサイブリッドを作製し、その mtDNA の複製、転写、翻訳活性および呼吸活性を測定した。この結果より、異種 mtDNA を用いたミトコンドリア病モデルマウス作製にはラット mtDNA の利用が適していることを見出した。本研究は、mtDNA の遺伝子操作が不可能である現状においてミトコンドリア病の作製方法を提唱した点、および mtDNA と核 DNA の相互作用に対する新たな考察を得ることができた点において学問的価値が高いと判断できる。

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。