

氏 名 (本籍)	山 口 潤 也 (千葉県)
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 6487 号
学位授与年月日	平成 25 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	<i>In Vivo</i> Imaging of Mitochondria and Mitochondrial Nucleoids Using Transgenic Mouse Strains (遺伝子改変マウスによるミトコンドリアとミトコンドリア核様体の生体内イメージング)
主 査	筑波大学准教授 (連携大学院) 博士 (理学) 設 楽 浩 志
副 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 沼 田 治
副 査	筑波大学教授 博士 (理学) 中 田 和 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

ミトコンドリアは生体エネルギーとなる ATP 産生を中心とした機能を担う細胞小器官である。哺乳動物ミトコンドリアは、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) を有しており、体細胞あたり 1000-10000 コピーが存在している。また、mtDNA と結合する複数タンパク質 (ミトコンドリア転写因子 A (*Tfam*) など) と集合体を形成し、いわゆるミトコンドリア核様体 (mt 核様体) としてミトコンドリアマトリクス内に存在することが知られている。

ミトコンドリアの形態について、生細胞では融合と分裂を繰り返し、環境条件によって多様な形態を示すことが主に培養細胞において観察されている。mt 核様体についてもその動態が培養細胞を材料として解析が進められており、mt 核様体可視化技術が重要な開発要素となりつつある。申請者の所属研究室において、mt 核様体を可視化するために *Tfam* と EGFP の cDNA を結合した融合遺伝子を全身で発現するトランスジェニック (Tg) マウス (*Tfam*/EGFP-Tg マウス) が作製されており、細胞内に複数コピーとして存在する mtDNA の細胞分裂時における伝達様式など、mtDNA 遺伝学上の新たな解析ツールとなる可能性を秘めている。

本研究では、ミトコンドリアと mt 核様体のイメージングを生体内で実施可能な技術開発のために、ミトコンドリアを赤色蛍光タンパク質である DsRed2 により標識した Tg マウス (mtDsRed2-Tg マウス) を作製し、生体内におけるミトコンドリア形態・動態の解析を行った。また *Tfam*/EGFP-Tg マウスを用いた mt 核様体の生体内イメージングによりその形態・動態解析を行い、さらに mtDsRed2-Tg マウスとの交雑により、ミトコンドリアと mt 核様体の同時検出の技術開発を目的としイメージングを実施した。

mtDsRed2-Tg マウス系統を樹立するため、ミトコンドリア移行シグナルと DsRed2 の cDNA を結合した融合遺伝子を全身性発現ベクターに組み込むことで導入用遺伝子を作製し、制限酵素処理を施した外来性遺伝子をマイクロインジェクション法によってマウス受精卵へ導入し、Tg マウスを作製した。組織のミトコンドリア活性染色を行った結果、本系統におけるミトコンドリア活性への影響については認められなかった。脳、

肝臓、心臓等の各組織を用いた凍結切片の蛍光像からミトコンドリアの形態学的解析を行ったところ、ミトコンドリアの形態やその配置パターンが組織ごとに大きく異なる様子が観察されたが、これらは組織における生理環境条件やエネルギー要求性などに応じたものと考察された。さらに、生体内においてタイムラプスイメージングを実施した結果、ミトコンドリアの挙動を捉えることに成功し、一部ミトコンドリアについては約 0.1 $\mu\text{m/s}$ の速度で輸送されている様子が観察された。ミトコンドリア核様体についても、*Tfam*/EGFP-Tg マウスを用いた生体内タイムラプスイメージング解析を実施し、細胞中において複数の輝点として検出された mt 核様体の動態を捉えた。さらに、これら 2 系統の交雑個体からの細胞においてミトコンドリアと mt 核様体の同時イメージングを行った結果、ミトコンドリアの融合、分裂および輸送に伴った mt 核様体の挙動が観察され、こうした動態が生命機能を維持するのに必要な要素であることが考察された。

近年、生体内でミトコンドリア以外の細胞小器官あるいは生理活性物質を EGFP で標識した Tg マウスが樹立されている。mtDsRed2-Tg マウス系統は、これらのマウス系統群と交雑することによって、生体内におけるミトコンドリアと EGFP 標識の細胞小器官、生理活性物質との相互作用を、動態を含めて形態学的に解析することが可能でありその汎用性・応用性に優れている。また、*Tfam*/EGFP-Tg マウスは核様体を生体内にて観察可能な数少ない解析法としてその有用性が認められ、これらのマウス系統は新規バイオリソースとしての役割も期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、蛍光タンパク質による標識技術を応用した 2 種類のトランスジェニックマウス系統を用いて、生体内のミトコンドリアとミトコンドリア核様体を可視化することに成功しており、これらの解析システムは生体内イメージングの新規解析技術としてミトコンドリアとミトコンドリア核様体が関与する生命現象の研究分野において貢献するものであり、バイオリソースの観点からも評価が高い。また、マウス生体内およびこれらの系統由来培養細胞種においてミトコンドリアおよびミトコンドリア核様体の動態を捉え、その移動・輸送速度を解析しており、一連の結果は当該研究分野における動態解析の基本的知見として寄与するものである。

平成 25 年 2 月 6 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）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。