

氏名	清水 章文		
学位の種類	博 士 (理学)		
学位記番号	博 甲 第 7739 号		
学位授与年月日	平成 28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	Generation and Characterization of <i>Trans</i> -mitochondrial Mice Carrying mtDNA with a Point Mutation in <i>tRNA^{Lys}</i> Gene (ミトコンドリア <i>tRNA^{Lys}</i> 遺伝子に病原性突然変異を有するミトコンドリア病モデルマウスの作出と病態解析)		
主査	筑波大学教授	博士 (理学)	中田 和人
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	石田 健一郎
副査	筑波大学准教授 (連携大学院)	博士 (理学)	栗崎 晃

論 文 の 要 旨

細胞小器官であるミトコンドリアには核とは異なる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存在している。近年、病原性突然変異型mtDNA分子種の蓄積が多様な疾患の原因になる可能性が示唆されており、その中でもミトコンドリア病はその典型である。そのミトコンドリア病には1) 大規模欠失突然変異型mtDNAを原因とする慢性進行性外眼筋麻痺、2) *tRNA^{Leu(UUR)}*遺伝子における点突然変異を原因とするミトコンドリア脳筋症、高乳酸血症、脳卒中様症状、3) *tRNA^{Lys}*遺伝子における点突然変異を原因とする赤色ぼろ繊維を伴うミオクローヌステんかん (Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers ; MERRF) の三大病型が知られており、これらはその大部分を占めると報告されている。

哺乳類のmtDNAにはミトコンドリア呼吸機能に関与する遺伝子群のみがコードされているため、mtDNAに生じたどのような原因突然変異もATP産生能の低下という病原性に帰結する。しかしながら、前述の三大病型のように各々の原因突然変異に特徴的な病態を示すことが知られている。このような突然変異型mtDNA分子種特異的な病態発症機構の解明には、突然変異型mtDNA分子種を導入した病態モデル動物の作出と活用が必須である。しかし、mtDNAにコードされた遺伝子の改変は確立されていないため、そのような病態モデル動物の作製は不可能であると考えられてきた。このような状況の中、所属研究室では細胞質移植法を駆使して培養細胞中に存在している突然変異型mtDNA分子をマウス初期胚やマウスES細胞に導入し、病原性突然変異型mtDNA分子種を含有する3種のミトコンドリア病モデルマウスの作製に成功している (大規模欠失突然変異型mtDNAを有する *mito-mice Δ* ; 呼吸酵素複合体IVのサブユニットCOIにおける点突然変異を有する *mito-miceCOI^M* ; 呼吸酵素複合体IのサブユニットND6における点突然変異を有する *mito-miceND6^M*)。しかし現状、ミトコンドリア病三大病型の二つに相当する*tRNA^{Leu(UUR)}*遺伝子並びに*tRNA^{Lys}*遺伝子に点突然変異を有する病態モデルマウスの樹立には至っていない。そこで

本研究では、tRNA遺伝子に点突然変異を有する病態モデルマウスの作出と、mtDNAにコードされた突然変異型tRNA遺伝子の病原性発現機構の解析を目的とした。

まず、mtDNAのtRNA遺伝子に病原性突然変異を有するマウス培養細胞を樹立するために、マウス肺がん細胞株P29を用いた。P29からmtDNAを精製し、そのDNAに対しtRNA^{Leu(UUR)}遺伝子とtRNA^{Lys}遺伝子についてPCR及びクローニングを行い、塩基配列データを取得した。これらの塩基配列データを正常マウスから得た塩基配列データと比較した結果、P29細胞のmtDNAにおいてtRNA^{Lys}遺伝子の塩基7731番目のグアニンがアデニンに置換された点突然変異（G7731A）を見出した。これはヒトにおけるG8328A点突然変異と相同であり、G8328A mtDNAを有する患者はミトコンドリア脳筋症と診断されていることが分かった。そのG7731A mtDNAを含有するP29細胞のクローニングを繰り返した結果、G7731A mtDNAを92%で有するP29サブクローンの樹立に成功した。このP29サブクローンの細胞質体をマウスES細胞へと導入し、キメラマウスを作製した。得られたキメラマウスの雌個体の戻し交配を行うことで、G7731A mtDNAを全身に有するマウス（mito-mice-tRNA^{Lys7731}）の樹立に成功した。

mito-mice-tRNA^{Lys7731}の4ヶ月齢個体では、低身長、握力低下が観察された。低身長や握力低下はG8328A mtDNAを有するミトコンドリア脳筋症患者にも見られる症状であった。また、生化学的及び組織化学的解析の結果、骨格筋と腎臓においてミトコンドリア呼吸酵素複合体の活性低下、腎臓における呼吸機能低下が観察された。しかし、その他に顕著な異常は確認できなかった。そこで加齢による影響を評価するために26ヶ月齢個体について解析したところ、剖検において腎臓における虚血が観察された。組織化学的解析の結果、腎臓において呼吸機能低下、尿円柱、糸球体構造異常が観察された。また、血液化学的解析においても血中尿素窒素の上昇及びヘマトクリット値の低下が確認され、糖負荷時における高乳酸血症も観察された。

mito-mice-tRNA^{Lys7731}は変異率56%以下のmito-mice-tRNA^{Lys7731}は病態を示さなかった。このことからG7731A mtDNAの蓄積が低率である卵細胞もしくは初期胚を選別することによりミトコンドリア病の予防が可能であることが示唆された。近年、正常なmtDNAを有する除核卵母細胞に対してミトコンドリア病患者の受精卵の核を移植することで、子供への病原性突然変異型mtDNAの遺伝を予防する出生前治療法が提案されている。しかし、この方法は受精卵の核の異常を引き起こす危険性を有している。それに対し、初期胚の選別では着床前遺伝子診断として初期胚の割球を元に病原性突然変異型mtDNAの変異率を測定し、変異率の低い初期胚を選別し母体内に戻すことにより、受精卵の核の異常を引き起こす危険性がなく、ミトコンドリア病病態を発症しない産子を得ることが可能であることが本研究によって示された。

審 査 の 要 旨

本研究では、マウス培養細胞に内在されていた体細胞突然変異型ミトコンドリアDNA分子種を濃縮し、マウスES細胞を介してミトコンドリア遺伝子病モデルマウス（mito-mice-tRNA^{Lys7731}）の作出に成功している。また、このmito-mice-tRNA^{Lys7731}がミトコンドリア遺伝子病の症例に類似する表現型を呈することを明らかにしている。ミトコンドリアDNAにコードされた遺伝子を改変できない状況の中、ミトコンドリア遺伝子病モデルマウスの作出に成功した点はきわめて独創的である。また、mito-mice-tRNA^{Lys7731}の活用によってミトコンドリア遺伝子病の分子病理の解明だけでなく、出生前診断・治療の提案に至っている点は、基礎生物学研究として学問的価値がきわめて高いと評価された。

平成28年2月2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。