

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25250011

研究課題名(和文)ミトコンドリア移植による哺乳類ミトコンドリアゲノムのパラダイム変換

研究課題名(英文)Paradigm shift of mammalian mitochondrial genome using intercellular transfer technology

研究代表者

林 純一 (HAYASHI, Jun-Ichi)

筑波大学・生命環境系・特命教授

研究者番号：60142113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究申請は以下の2つのパラダイム(パラダイムA及びB)の変換を目的とした。パラダイムA：ミトコンドリアゲノムの遺伝子産物は全て内膜に局在する。パラダイムB：呼吸欠損を誘発する突然変異は老化やがん等の原因になる。

今回の研究成果として、パラダイムAでは、ミトコンドリアゲノムの遺伝子産物が細胞表面にも存在すると予測したが、それがミトコンドリアゲノム以外の未知の細胞質因子であるという結論を得た。パラダイムBに関しては、突然変異により誘発された「呼吸欠損」ではなく「活性酸素」がリンパ腫の原因になることと、さらに老化は突然変異ではなく核遺伝子のエピジェネティックな変化が原因であることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of current proposal is to show the paradigm shift of two conventional concepts (paradigms A and B) regarding the roles of mammalian mitochondrial genome (mtDNA). Paradigm A is that the products of mtDNA are localized into mitochondrial inner membranes but not into cell membranes. The results of current study propose that the products of unknown cytoplasmic genetic factors but not the products of mtDNA are localized into cell membrane. Paradigm B is that the mutations in mtDNA are responsible not only for mitochondrial diseases, but also for aging and age-related disorders including tumor development. With respect to Paradigm B shift, we have proposed that aging phenotypes observed in elderly human fibroblasts are not caused by mtDNA mutations but by the reversible epigenetic regulations of nuclear-coded genes.

研究分野：分子細胞生物学、哺乳類ミトコンドリアゲノム生物学

キーワード：ミトコンドリアゲノム ミトコンドリア移植 哺乳類 生理的役割 突然変異 ミトコンドリア病 がん化 老化関連疾患

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた我国においては、老化や老化関連疾患の問題解決が急務であり、特に老化に伴うミトコンドリアの呼吸機能の低下(呼吸欠損)がこれらの問題の根源に存在している。このミトコンドリア呼吸欠損に係る哺乳類ミトコンドリアゲノムのパラダイムである老化ミトコンドリア原因説(文献 a, b)の骨子は以下の2点(A, B)である:

**パラダイム(A):** ミトコンドリアゲノムに存在する遺伝子の遺伝子産物は全てミトコンドリア内膜に局在し、酸素呼吸による ATP 合成に関与する;

**パラダイム(B):** ミトコンドリアゲノムに呼吸欠損を誘発する突然変異が生じるとミトコンドリア病のみならず、老化やがん化などの老化関連疾患も誘発する。

しかし、国内外の多くの研究者の支持を得ているこれらのパラダイム、とりわけ(B)はその大部分が状況証拠をベースに構築されたており、さらなる注意深い検証が必要である。確かに老化にともないミトコンドリアゲノムに後天的突然変異は蓄積する。しかし必ずしもこの突然変異が原因で呼吸欠損になるとは限らないし、仮に呼吸欠損を誘発したとしてもそれが本当に老化やがん化の原因になるという直接的な証拠は得られていない。また酸素呼吸は核ゲノムに存在する遺伝子群によっても支配されており、核ゲノム遺伝子群の突然変異が呼吸欠損を引き起こし老化等の原因になるという可能性も十分に残されている。

### 文献:

a Wallace DC, Science 1999, 283:1482-1488.  
b Koppenol WH, Nat Rev Cancer 2011, 11: 325- 337.

### 2. 研究の目的

以上の問題点を解決するためには、核ゲノムを同一にした上でミトコンドリアゲノムにだけ病原性突然変異を導入しなければならないが、その手法は確立されておらずこの分野の進展に大きな障害となっている。申請者は次善の策としてマウス培養細胞のミトコンドリアゲノムに多様な突然変異が存在することに着目し、これらを濃縮してから細胞間移植することでこの問題を解決した。その結果、世界で初めて様々な病原性突然変異型ミトコンドリアゲノムを導入したマウス(ミトマウス)や培養細胞(サイブリッド)の作製に成功し、これらを用いることで哺乳類ミトコンドリアゲノムの生理機能の研究で世界をリードしてきた(1-6)だけでなく、パラダイム(B)の再編成を示唆する結果も得た(4, 5, 7, 9)。

さらに最近、パラダイム(A)を大きく変換させうる発見、すなわちミトコンドリアゲ

ノムの病原性突然変異(呼吸活性を低下させる変異)ではなく、多型突然変異(呼吸活性に影響を与えない変異)をもつ細胞を自然免疫系が非自己と認識し、その細胞を除去する仕組みの存在を示唆する発見をした(8)。

本申請の研究目的は以下の通りである。

### パラダイム(A)のパラダイムシフト

「ミトコンドリアゲノムの遺伝子産物はすべて内膜に局在し ATP 合成にのみ関与する」というパラダイム A に対し、細胞表面にも局在し自然免疫系から非自己として認識・殺傷を受けるという新機能をミトコンドリア移植細胞(サイブリッド)を用いて解明する。

### パラダイム(B)のパラダイムシフト

「老化に伴うミトコンドリアゲノムの突然変異の蓄積は、老化やがん化等の老化関連疾患の原因となる」というパラダイム B に対し、直接的証拠を提示できるサイブリッドと既存と新奇のミトコンドリア移植マウス(ミトマウス)を活用して検証する。この場合、特に突然変異がミトコンドリアの呼吸欠損に加え活性酸素(ROS)が出るか否かの差に注目する。

### 過去の申請者の文献

- 1 Nature Genet 2000 (新聞報道)
- 2 Nature Med 2001
- 3 Nature Genet 2001
- 4 PNAS 2005a
- 5 PNAS 2005b (新聞報道)
- 6 PNAS 2006 (新聞報道)
- 7 Science 2008 (新聞報道)
- 8 J Exp Med 2010 (新聞報道)
- 9 PNAS 2012 (新聞報道)

### 3. 研究の方法

#### パラダイム(A)のパラダイムシフト

この研究に用いるミトコンドリア移植細胞(サイブリッド):

\*P29mtB6 = ミトコンドリアゲノムを除去した B6 系統由来の肺がん細胞(P29 細胞)に B6 系統のミトコンドリアゲノムを再度導入したサイブリッド。この細胞は核ゲノムもミトコンドリアゲノムも B6 系統由来であるため移植拒絶は発生しないためコントロールとして使用。

\*P29mtNZB = マウス NZB 系統由来のミトコンドリアゲノムを移植したサイブリッド。このサイブリッドの核ゲノムは B6 系統マウス由来であるがミトコンドリアゲノムは NZB 系統由来であるため、自然免疫系によって非自己として認識・拒絶される(申請者の先行研究: 研究業績 4 参照)。

\*P29mtSAMP = 老化促進マウスである SAMP 系統由来のミトコンドリアゲノムを移植したサイブリッド。このサイブリッドの核ゲノムは B6 系統マウス由来であるがミトコンドリアゲノムは SAMP 系統由来である。ごく最近、申請者はこのサイブリッドも自然免疫系によって非自己として認識・拒絶されることを

見つけた。しかも P29mtSAMP は B6 系統に比べ 3 カ所しか多型突然変異がない (P29mtNZB は 30 カ所以上ある) ため、ミトコンドリア抗原の同定に極めて有効である。

細胞表面にも局在するミトコンドリア抗原の同定

(1) P29mtNZB と P29mtSAMP を B6 マウスに免疫し脾臓の抗体産生細胞をミエローマと融合してハイブリドーマクローンを樹立する。

(2) 各ハイブリドーマクローンから産生される抗体と P29mtNZB または P29mtSAMP をそれぞれ混合し、蛍光標識抗 IgG 抗体を加えてフローサイトメトリーにかけ、細胞表面のみを蛍光色素で染色するクローンを選別することでミトコンドリア抗原に対する抗体産生ハイブリドーマクローンを得る。

(3) 上記ハイブリドーマクローンから精製抗体を作り、細胞表面抗原と免疫沈降し、共沈してきた抗原抗体複合体から抗原部分を TOF-MS 解析し、ミトコンドリア抗原の本体 (DNA か RNA かタンパク質か) とその配列を決定する。

(4) 精製抗体と共焦点顕微鏡を用いた免疫組織学的解析によって、ミトコンドリア抗原の細胞膜での局在を確かめる。また本来の局在場所であるミトコンドリア内膜での局在も確かめる。

(5) 自然免疫系による P29mtNZB の移植拒絶がこの抗体投与によって阻害されることを確認する。

#### パラダイム (B) のパラダイムシフト

これらの研究に用いるサイブリッドとミトマウス

既存のサイブリッド: 少なくとも以下の 3 種類の遺伝子に病原性突然変異を有している。

\* P29mt□ミトコンドリアゲノムに大規模欠失突然変異を持つため重篤な呼吸欠損になっている。

\* P29mtCO1M COX1 遺伝子に病原性点変異を持つため軽度の呼吸欠損になっている。

\* P29mtND1M ND1 遺伝子に病原性点変異を持つため軽度の呼吸欠損に加え ROS を過剰産生する。

\* 上記サイブリッドと同じミトコンドリア変異を持つ 3 種類のミトマウス (ミトマウス □; ミトマウス CO1M; ミトマウス ND1M)

(1) これらサイブリッドの呼吸酵素活性が低下していることを再確認する。

(2) それに伴い酸素消費量の低下、ATP 量低下、乳酸値上昇、ROS 上昇、解糖系の亢進の有無を調べ、ワールブルグ効果を確認する。

(3) その結果腫瘍の表現型として低酸素耐性、低栄養耐性、高浸潤性、高転移性の有無を明らかにすることでワールブルグ効果を検証する。

(4) 上記の実験は全てがん細胞を使用しているので、腫瘍の表現型への影響を明らかにすることはできるが、正常細胞からがん細胞への形質転換に必須な不死化とがん化に対する影響を評価することはできない。この欠落

部分を補強するため、ミトマウスの胎児から繊維芽細胞 (MEFs) を樹立し、呼吸欠損、乳酸値、ROS 産生量などの変化が細胞老化、不死化、がん化、悪性化など、がんに関連する表現型に与える影響の有無を調べる。

以上の結果から、がん化の原因が呼吸欠損に有るのか ROS 過剰産生に有るのかを明らかにする。

ミトマウスを長期間飼育して、がんやその他の異常の発症率を比較し、がん化の原因が呼吸欠損にあるのか ROS 過剰産生にあるのかを明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### パラダイム (A) のパラダイムシフト

###### 研究成果 1

\* 発表論文 PLOS ONE 8: e75981, 2013

\* 発表論文 Mitochondrion 2013

ミトコンドリア移植法を用いてマウス B6 系統由来のがん細胞のミトコンドリアゲノムのみを他の系統 (C3H; AKR; SAMP1; NZB) 由来のものと置換したサイブリッドを樹立し、その細胞を B6 マウスに注入した。その結果、C3H 以外の系統のミトコンドリアゲノムを導入すると腫瘍形成が抑制されることを明らかにした。このことは特殊な系統由来のミトコンドリアゲノムの遺伝子産物が細胞表面に局在し、B6 マウスの免疫系に認識され排除されたと推察される。

ミトコンドリアゲノムの塩基配列を比較すると B5 系統と SAMP1 系統は 4 カ所しか変わらず、アミノ酸置換を伴うのは 2 カ所に限定される。このため人工的に突然変異を導入した合成ペプチドで阻害実験を行ったがいずれも影響がなかった。

そこで本当に SAMP1 系統のミトコンドリアゲノムのせいなのかを立証する為に、この細胞のミトコンドリアゲノムを完全に除去し、そこに B6 系統のミトコンドリアゲノムを導入した細胞、つまり核もミトコンドリアゲノムも B6 系統由来の細胞を再度樹立したが、この細胞を B6 マウスに注入しても依然として腫瘍形成は抑制されたままであった。この結果はミトコンドリアゲノム以外の細胞質遺伝因子の存在を示唆している (論文準備中)。平成 28 年度よりスタートする基盤研究 A で再度この問題を探求する予定である。

##### パラダイム (B) のパラダイムシフト

###### 研究成果 2

ミトコンドリアゲノムの突然変異とがん化の関係

\* 発表論文 PLOS ONE 8: e55789, 2013.

\* 発表論文 Proc Natl Acad Sci USA 2014.

###### (新聞報道)

\* 発表論文 7)Exp Anim 2014.

\* 発表論文 11)PLOS ONE, 2015.

新たなミトマウスや、複製酵素の校正機能破壊マウス (ミューターマウス) を作製して解析したところ、これらのマウスではミト

コンドリア病の症状を発症すること、さらに高血糖とリンパ腫発症の頻度が高いことを証明した(新聞報道)。ただし、核ゲノムをB6系統以外の系統(今回はA/J系統)で置き換えるとこのような病態を発症しないことから、これらの原因がミトコンドリアゲノムの突然変異単独ではなくB6系統の核ゲノムが持つ突然変異の両方にあることを示した。

### 研究成果3

#### ミトコンドリアゲノムの突然変異と老化の関係

\* 発表論文 Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015.

\* 発表論文 Sci. Rep. 2015. (新聞報道)

老化に関する従来のパラダイムはミトコンドリアゲノムの体細胞突然変異が加齢に伴い蓄積し、呼吸活性低下と活性酸素(ROS)の漏出をきたし、これが更なるミトコンドリアゲノムの突然変異を誘発し、結果として重大な呼吸欠損に陥るとしている。

本研究では次世代シーケンサーを活用することで、若年者と高齢者由来の繊維芽細胞間で体細胞突然変異の頻度の差を比較したが、結果として有意差はなかった。

そこで更にこれらの細胞から一旦iPS細胞を樹立し、再度繊維芽細胞に細分化させて呼吸活性を比較したところ、高齢者由来の繊維芽細胞の呼吸活性は若年者レベルに戻っていることを突き止めた。

これらの結果は、ヒトの繊維芽細胞の場合、老化に伴って呼吸活性は低下するが、その原因がミトコンドリアゲノムの後天的体細胞突然変異の蓄積にあるのではなく、特定の核遺伝子(すでにグリシン代謝に関係する遺伝子であることが判明)のエピジェネティックな変化にあることを示すことで、パラダイムシフトを達成した(新聞報道)。

#### これらの研究成果の集大成を以下の英文総説(査読有)にまとめた。

発表論文 Jun-Ichi Hayashi, et al. (2016) Mutations in mitochondrial DNA regulate mitochondrial diseases and metastasis but do not regulate aging. Current Opinion in Genetics and Development (ELSEVIER), in press.

#### 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 19件)

#### ORIGINAL ARTICLES (全て査読有)

Akimoto M, Hayashi J-I, et al. (5人中2番目)(2016) Interleukin-33 enhances programmed oncogenesis of ST2L-positive low-metastatic cells in the tumour microenvironment of lung cancer. Cell Death Disease 7: e2057. doi:

10.1038/cddis.2015.418.

Akinori Shimizu, Hironomichi Yonekawa, Jun-Ichi Hayashi (9人中9番目)(2015) Mouse somatic mutation orthologous to MELAS A3302G mutation in the mitochondrial *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* gene confers respiration defects. Biochem. Biophys. Res. Commun. 467:1097-1102. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.072.

Chisato Hayashi, ..., Jun-Ichi Hayashi (7人中7番目)(2015) A somatic T15091C mutation in the *Cytb* gene of mouse mitochondrial DNA dominantly induces respiration defects. Biochem. Biophys. Res. Commun. 463: 1021-1027. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.052.

Osamu Hashizume, ..., Jun-Ichi Hayashi (12人中12人目)(2015) Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects. Sci. Rep. 5: 10434. doi: 10.1038/srep10434.

#### 新聞報道有り

<http://mainichi.jp/articles/20150609/041/040/045000c> (毎日新聞)

<https://yomidr.yomiuri.co.jp/article/20150609-OYTEW50478/> (読売新聞)

Akinori Shimizu, Takayuki Mito, ..., Jun-Ichi Hayashi (7人中7番目)(2015) G7731A mutation in mouse mitochondrial *tRNA<sup>Lys</sup>* regulates late-onset disorders in trans-mitochondrial mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 459: 66-70. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.070.

Osamu Hashizume, ..., Jun-Ichi Hayashi (5人中5番目)(2015) A specific nuclear DNA background is required for high frequency lymphoma development in trans-mitochondrial mice with G13997A mtDNA. PLOS ONE 10: e0118561. doi: 10.1371/journal.pone.0118561.

Takayuki Mito, ..., Jun-Ichi Hayashi (10人中10番目)(2015) Trans-mitochondrial mito-mice and mtDNA mutator mice, but not aged mice, share the same spectrum of musculo-skeletal disorders. Biochem. Biophys. Res. Commun. 456: 933-937. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.009.

Takehiro Takahashi, ..., Jun-Ichi Hayashi, ..., Mie Kainoh (13人中11番目)(2015) A novel mitoNEET ligand, TT01001, improves diabetes and ameliorates mitochondrial function in db/db mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 352: 338-345. doi: 10.1124/jpet.114.220673.

Natsumi Uehara, ..., Jun-Ichi Hayashi, ..., Yasushi Okazaki (22人中15番目)(2014) New *MT-ND6* and *NDUFA1* mutations in mitochondrial respiratory chain disorders. Annals of Clinical and Translational

Neurology 1: 361-369. doi: 10.1002/acn3.59.

Haruka Yamanashi, ..., Jun-Ichi Hayashi (5人中5番目)(2014) Administration of an antioxidant prevents lymphoma development in transmitochondrial mice overproducing reactive oxygen species. Exp. Anim.63: 459-466.

Akinori Shimizu, ..., Jun-Ichi Hayashi (9人中9番目)(2014) Transmitochondrial mice as models for primary prevention of diseases caused by mutation in the *tRNA<sup>Lys</sup>* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111: 3104-3109. doi: 10.1073/pnas.1318109111. **新聞報道有り**

[http://www.nikkei.com/article/DGXNASDGO3050\\_T00C14A2CR8000/](http://www.nikkei.com/article/DGXNASDGO3050_T00C14A2CR8000/) (日本経済新聞)  
[http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~jih-kzt/img/shimizu\\_2.pdf#search='http%3A%2F%2Fwww.biol.tsukuba.ac.jp%2F%7Ejihkzt%2Fimg%2Fshimizu\\_2.pdfsearch'](http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~jih-kzt/img/shimizu_2.pdf#search='http%3A%2F%2Fwww.biol.tsukuba.ac.jp%2F%7Ejihkzt%2Fimg%2Fshimizu_2.pdfsearch') (茨城新聞)

Shunkei Enoki, ..., Jun-Ichi Hayashi (10人中10番目)(2014) Selection of rodent species appropriate for mtDNA transfer to generate transmitochondrial mito-mice expressing mitochondrial respiration defects. Exp. Anim. 63: 21-30.

Gaku Takibuchi, ..., Jun-Ichi Hayashi (9人中9番目)(2013) Polymorphic mutations in mouse mitochondrial DNA regulate a tumor phenotype. Mitochondrion 13: 881-887. doi: 10.1016/j.mito.2013.07.117.

Hirotake Imanishi, ..., Jun-Ichi Hayashi (10人中10番目)(2013) Specific mtDNA mutations in mouse carcinoma cells suppress their tumor formation via activation of the host innate immune system. PLOS ONE 8: e75981. doi: 10.1371/journal.pone.0075981.

Shun Katada, ..., Jun-Ichi Hayashi, Kazuto Nakada (5人中4番目)(2013) Mitochondrial DNA with a large-scale deletion causes two distinct mitochondrial disease phenotypes in mice. Genes Genomes Genetics 3: 1545-1552. doi: 10.1534/g3.113.007245.

Takayuki Mito, ..., Jun-Ichi Hayashi (10人中10番目)(2013) Mitochondrial DNA mutations in mutator mice confer respiration defects and B-lymphoma development. PLOS ONE 8: e55789. doi: 10.1371/journal.pone.0055789.

#### REVIEW ARTICLES

Jun-Ichi Hayashi, et al. (4人中1番目)(2016) Mutations in mitochondrial DNA regulate mitochondrial diseases and metastasis but do not regulate aging. Current Opinion in Genetics and

Development (ELSEVIER), in press.

清水章文、橋爪脩、三藤崇行、林純一 (2015) GRAPHIC HOT PRESS 核コードの GCAT 遺伝子と SHMT2 遺伝子のエピジェネティック制御がヒトの加齢にともなうミトコンドリア呼吸欠損を誘発する. 細胞工学 34: 1078-1079.

三藤崇行、林純一 (2014) 特集:がんと脂質 II. がんと脂質 分子メカニズムへ 5. ミトコンドリア活性酸素とがん. The Lipid (メディカルレビュー社) 25:407-411.

〔学会発表〕(計 5件)

石川香、橋爪脩、清水章文、三藤崇行、中田和人、林純一. マウスミトコンドリア DNA の突然変異がコントロールする表現型~核外ゲノムの変異によるインパクト~. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015), 2015/12/3. 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市 (口頭発表)

三藤崇行、橋爪脩、大西彩紀子、清水章文、石川香、中田和人、林純一. 老化ミトコンドリア原因説の検証とその再構築. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015), 2015/12/3-4. 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市 (口頭発表、ポスター発表)

清水章文、三藤崇行、榎俊慧、小笠原絵美、橋爪脩、長島瑠子、石川香、中田和人、林純一. ミトコンドリアコードの tRNA 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及び病態解析. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015), 2015/12/3-4. 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市 (口頭発表、ポスター発表)

清水章文、三藤崇行、林千彩音、小笠原絵美、竹永啓三、石川香、中田和人、林純一. ミトコンドリア tRNA 遺伝子に突然変異を有する新奇ミトコンドリア病モデルマウスの樹立. 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会、2014/12/3-5. 九州大学、福岡県福岡市 (口頭発表)

三藤崇行、鈴木美智子、石川香、中田和人、林純一. Mito-micemice における骨粗鬆症の病態解析. 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会、2014/12/3-5. 九州大学、福岡県福岡市 (口頭発表)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 1件)

名称: 変異型ミトコンドリア DNA の生殖細胞への導入方法

発明者: 林純一

権利者: 林純一

種類: 特願

番号: 2000-9194

取得年月日：平成 12 年 1 月 18 日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等  
研究室 HP

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~jih-kzt/>

第 24 回つくば賞 受賞 平成 25 年 11 月 26 日

<http://www.tsukuba.ac.jp/news/n201311271732.html>

<http://www.science-academy.jp/news.cgi?mode=detail&num=20130905100456>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

林 純一 (HAYASHI, Jun-Ichi)

筑波大学・生命環境系・特命教授

研究者番号：60142113

### (2)研究分担者

米川 博通 (YONEKAWA, Hiromichi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・客員

研究員

研究者番号：30142110