

令和元年6月18日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04678

研究課題名(和文)ミトコンドリアゲノム変異のマウス逆遺伝学

研究課題名(英文) Reverse genetic studies on mitochondrial DNA with pathogenic mutations in mice

研究代表者

中田 和人 (NAKADA, Kazuto)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：80323244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：突然変異型ミトコンドリアゲノム(mtDNA)の優位な蓄積がミトコンドリア病、糖尿病、神経変性疾患、がんなどの原因になる可能性が示唆されているものの、「変異型mtDNA分子がどのようにしてこれほどまでに多様な病型を誘導するのか？」といった根源的な命題は未だに解明されていない。本研究では、ミトコンドリアtRNA-Lue(UUR)に病原性点突然変異が生じた新たなモデルマウスの作出に成功し、さらに、マウス逆遺伝学的手法を駆使してミトコンドリア分裂や糖尿病環境が変異型mtDNA分子種の病原性や蓄積動態を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mtDNAの突然変異が多様な病気の原因になるのか？という根源的な問いに答えるには、変異型mtDNAを導入したモデルマウスの作製が極めて有効な研究戦略となる。しかし、二重の生体膜に完全に閉ざされたミトコンドリアマトリックスに、それも複数コピー存在するmtDNAに人為的な突然変異を導入することは不可能である。本研究では、変異型mtDNAを含有するミトコンドリアをそのままES細胞に導入することで変異型mtDNAを有するマウスを作製し、さらにこれらを活用することで、変異型mtDNAの病原性制御や多様な病態発症との関連を解明した。このmtDNA変異のマウス逆遺伝学的な解析自体が学術的な価値となる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that a predominant accumulation of mutated mitochondrial DNA (mtDNA) in affected cells and tissues is responsible for multiple disorders, such as mitochondrial diseases, diabetes, neurodegenerative diseases, and cancer. However, little is known about a precise pathogenesis for understanding how mutated mitochondrial DNAs induce these multiple disorders. In this work, I have succeeded in generating a novel model mouse harboring a point mutation in tRNA-Lue(UUR). In human cases, mtDNA with a point mutation in tRNA-Lue(UUR) is frequently observed in mitochondrial diseases and diabetes, so that the novel model mouse generated in this work would be an important for understanding mtDNA-based disorders. Moreover, this work showed mitochondrial fission and diabetic vital condition could regulate pathogenicity and accumulation dynamics of mutated mtDNAs in affected tissues.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリアゲノム 突然変異 エネルギー代謝 ミトコンドリア病 モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の生命現象は「核セントラルドグマ」を中心として制御されていることは周知の事実である。一方、ミトコンドリアにも独自のゲノム (mtDNA) を起点とした「ミトコンドリアセントラルドグマ」が存在し、細胞のエネルギー代謝、カルシウム代謝、細胞死制御といった重要な生命現象を制御している。哺乳類の mtDNA 分子にはミトコンドリア呼吸機能に関与する 13 種の呼吸酵素複合体遺伝子とそれらを翻訳するために必要な 22 種の tRNA と 2 種の rRNA がコードされている。このため、例えば、どの遺伝子に病原性突然変異が生じたとしてもミトコンドリア呼吸機能異常という表現型に帰結され、それらを原因とする病型もミトコンドリア呼吸機能異常の症度には依存するものの、比較的単一であろうと予想されてきた。

しかし、近年、mtDNA の病原性突然変異が、全身性のミトコンドリア呼吸不全を伴うミトコンドリア病だけでなく、パーキンソン病やアルツハイマー病といった神経変性疾患、我々に最も身近な生活習慣病である糖尿病、さらには老化個体やがん組織からも散見されることをうけ、変異型 mtDNA 分子種によるエネルギー代謝の破綻が多種多様な疾患群の原因となるとして、広く注目を集めるようになった。しかし、ミトコンドリアの呼吸機能は核セントラルドグマによっても制御されていることから、mtDNA 分子に何らかの病原性突然変異が生じていることだけを根拠にそれが多様な疾患群の原因となるとは結論できない。一方、例えば、同一の変異型 mtDNA 分子種を含有する患者群であっても、各組織に含有される変異型 mtDNA 分子種の蓄積は患者間でそれぞれ異なっていることが報告されており、さらには、患者間の核の遺伝的背景も異なっている。これらが変異型 mtDNA 分子種による病態の発症時期、症度、さらには病型の多様性を生み出していると推測されている。しかし、変異型 mtDNA 分子種と多様な病態との因果関係を説明できる分子機構はもとより、mtDNA 変異種の病原性すら十分に理解されていないのが現状である。

変異型 mtDNA 分子種を原因とした多様な病型の分子病理を詳細理解するためには、1) 変異型 mtDNA 分子種の違いによるエネルギー代謝不全の症度や活性酸素種の漏出の差異による多様な病型形成 (変異分子種の階層)、2) 変異型 mtDNA 分子の蓄積に対する組織や細胞種特異的な感受性・抵抗性の違いによる多様な病型形成 (組織・細胞種の階層)、3) 核セントラルドグマとの協調的な病原性制御による多様な病型形成 (核-ミトコンドリアの協調階層) といった、多階層からなる複合的な病理として研究戦略を立案する必要がある。事実、がん化やがんの悪性化には特定の変異型 mtDNA 分子種の蓄積が見られ、ミトコンドリア呼吸機能異常のみならず、ミトコンドリアから漏出した ROS の関与が示唆されている。また、個々のミトコンドリアの融合・分裂といった動的性格の分子基盤の理解が進み、組織・細胞種特異的なミトコンドリアの品質管理機構の破綻 (機能異常ミトコンドリアの分解異常による変異型 mtDNA 分子種の蓄積) が神経変性疾患や老化に関与している可能性も提案されている。

ミトコンドリアセントラルドグマの機能発揮基盤やその破綻病理を理解するには、変異型 mtDNA 分子種を導入したモデル動物の起用が最も効果的な研究戦略である。しかし、mtDNA 分子は外膜と内膜に閉ざされたミトコンドリアマトリクス内に、複数コピー存在するため、mtDNA にコードされた遺伝子の機能喪失や減弱は技術的に不可能であった。このような状況の中、研究代表者らは細胞質移植法により変異型 mtDNA 分子種をマウス初期胚やマウス ES 細胞に導入するというユニークな方法を駆使して、欠失型 mtDNA を含有するマウス (呼吸不全重症型ミトマウス) や 3 種の点変異型 mtDNA 分子種を導入したマウス群 (呼吸不全中型ミトマウス、呼吸不全軽症型ミトマウス、ROS 発生型ミトマウス) の作製に成功している。

2. 研究の目的

ミトコンドリアゲノム (mtDNA) の突然変異がミトコンドリア病、糖尿病、神経変性疾患、がんなどの遺伝的原因になる可能性が示唆されているものの、「変異型 mtDNA 分子がどのようにしてこれほどまでに多様な病型を誘導するのか？」といった根源的な命題は未だに解明されていない。本研究では、変異型 mtDNA 分子種を導入したマウス群を活用して、変異型 mtDNA 分子種による多様な病型形成機構を、1) 変異型 mtDNA 分子種間の差異による制御 (変異分子種の階層)、2) 組織特異的な変異型 mtDNA 分子種の蓄積動態の差異による制御 (組織・細胞種の階層)、3) 核ゲノム背景やストレス環境下での高次病原性制御 (核-ミトコンドリアの協調階層) という多階層病理として捉え、ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理の解明を目指した。

3. 研究の方法

前述のように、mtDNA はミトコンドリアのエネルギー産生に寄与する遺伝子群しかコードしていないにも関わらず、それらの遺伝子群の突然変異は多様な病態の原因になる可能性が示唆されている。このような mtDNA 変異の遺伝子型と病態表現型の複雑な関係を逆遺伝学的に理解するためには、多種多様な変異型 mtDNA 分子種を導入したモデルマウス群の作製とその活用が最も有効な研究戦略となる。そこで本研究では、変異型 mtDNA 分子種を導入したミトマウス群を活用し、(1) 変異型 mtDNA 分子種の病原性と病型誘導の関係を理解するための実験 (変異分子種の階層)、(2) ミトコンドリア分裂を破壊し、組織特異的に変異型 mtDNA 分子種を蓄積させたミトマウス群を作出し、組織・細胞種特異的な病型形成機構を検証するための実験 (組織・

細胞種の階層) (3) 糖尿病状態のミトマウス群 (db/db 核背景への置換、STZ 投与、高脂肪食摂取) を作出することで、核セントラルドグマとの協調的な病原性制御 (核-ミトコンドリアの協調階層) を理解するための実験を行なった。

4. 研究成果

本研究の実施により、以下の成果を得た。

(1) 変異分子種の階層

本項目の遂行においては、既存の4種のミトマウスに加え、新たな変異型 mtDNA 分子を導入したミトマウスの作出と活用による実験フローが重要となる。変異型 mtDNA 分子を導入したモデルマウスの作製を考えた場合、二重の生体膜に完全に閉ざされたミトコンドリアマトリックスに、それも複数コピー存在する mtDNA に人為的な突然変異を導入しなくてはならない。しかし、このようなことは既存の発生工学技術をもってしても極めて困難である。そこで、変異型 mtDNA 分子種を含有するミトコンドリアをそのままマウス ES 細胞に導入することで、変異型 mtDNA を有するミトマウスの作製を行なった。

ミトコンドリア *tRNA-Lue (UUR)* 遺伝子に病原性点突然変異 (A3302G) を有するキメラマウスの作製を経て、キメラマウスの交配から全身性に変異型 mtDNA 分子種 (A3302G) を含有するミトマウスの作出に成功した。現在、このミトマウスの系統維持と継続的な病態解析を実施している。ミトコンドリア病では、*tRNA-Lue (UUR)* 遺伝子に病原性点突然変異を有する症例が多いことが知られている。本研究では *tRNA-Lue (UUR)* 遺伝子変異のモデルマウスを世界に先駆けて樹立できたことになる。

一方、前述のように、ミトコンドリア病では *tRNA-Lue (UUR)* 遺伝子に病原性点突然変異を有する症例が多い。とりわけ、*tRNA-Lue (UUR)* 遺伝子における A3243G の変異部位の症例が圧倒的に多い。そこで、A3243G の突然変異を有する mtDNA 分子種を含有するマウス培養細胞のスクリーニングを継続実施した。その結果、A3243G の突然変異を有する mtDNA 分子種をおよそ 10,000 分子中 1 分子の割合で含有するマウス培養細胞の確保に成功した。このマウス培養細胞を出発材料として、ミトコンドリア病のモデルになり得る新たなミトマウスの作製に向かう予定である。

(2) 組織・細胞種の階層

ミトコンドリア分裂の生物学的な意義をその破綻病理として理解するため、欠失型 mtDNA を含有するマウス (呼吸不全重症型ミトマウス) と組織特異的にミトコンドリア分裂因子 (Drp1) を破壊可能なマウスを交配させ、肝臓や血液細胞でミトコンドリア分裂を抑制し、かつ、欠失型 mtDNA を含有する新たなモデルマウスを樹立した。このマウスの詳細解析から、ミトコンドリア分裂は欠失型 mtDNA の動態制御、ならびに、病原性制御に重要な役割を果たしていることがわかった。特に、後者の知見においては、ミトコンドリア分裂が抑制された状態の肝臓では、欠失型 mtDNA の蓄積が低い状態であっても、ミトコンドリア呼吸機能不全や肝機能異常、糖新生の増強/グリコーゲン蓄積の低下が観察され、このようなマウスでは高血糖が誘導されていた。これらの結果は、ミトコンドリア分裂 (融合とのバランス制御) は、変異型 mtDNA の病原性を抑制するために寄与しており、その破綻や機能低下は新たな病態を誘発していることを示唆している。

ミトコンドリア融合による変異型 mtDNA の病原性制御を解明するため、ミトコンドリアの融合因子 MFN2 の変異体を臓器特異的に発現させることが可能なマウスを樹立した。樹立したマウスの有用性を検討するために、神経細胞特異的に任意の時期に MFN2 の変異体を発現させると、出生時から発現させると短期間で致死性を示したが、成熟後から発現させると緩徐に進行する神経変性が誘導され、行動異常や認知機能の低下等を呈した。これらに結果は、同一遺伝子の同一変異体が発現時期によって症度の異なる病態を誘導することを示唆している。今後、このマウスとミトマウス群を交配させる予定である。

(3) 核-ミトコンドリアの協調階層

ミトコンドリア病の症例では糖尿病の発症頻度が高いことが知られている。しかし、既に作出しているミトマウス群4種のうち、3種は糖尿病を発症しない (1種では老化依存的な高血糖を見るが、インスリン感受性は正常である)。このような先行事象を受け、変異型 mtDNA 分子種が糖尿病を誘導するのではなく、糖尿病 (核ゲノム背景) が変異型 mtDNA 分子種の病原性を悪化させているのではないかと、という既存概念を覆す着想に至った。欠失型 mtDNA を含有するマウス (呼吸不全重症型ミトマウス) と糖尿病を発症する核背景を有する db/db マウスを交配させ、糖尿病を発症し、かつ、欠失型 mtDNA を含有する新たなモデルマウスを樹立した。このマウスの詳細解析から、糖尿病という生体環境はミトコンドリア生合成体系を抑制し、欠失型 mtDNA の病原性を増強することが分かった。また、興味深いことに、糖尿病環境下では、臓器特異的に欠失型 mtDNA の蓄積が誘発されることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- Ishikawa K, Kobayashi K, Yamada A, Umehara M, Oka T, Nakada K. Concentration of mitochondrial DNA mutations by cytoplasmic transfer from platelets to cultured mouse cells. *PLoS ONE*.14, e0213283 (2019) (査読あり).
doi: 10.1371/journal.pone.0213283.
- Ishikawa K, Yamamoto S, Hattori S, Nishimura N, Tani H, Mito T, Matsumoto H, Miyakawa T, Nakada K. Acquired expression of mutant *Mitofusin 2* causes progressive neurodegeneration and abnormal behavior. *J Neurosci*. 39, 1588-1604 (2019) (査読あり).
doi: 10.1523/JNEUROSCI.2139-18.2018.
- Mito T, Tani H, Suzuki M, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi J. Mito-mice Δ and mitochondrial DNA mutator mice as models of human osteoporosis caused not by aging but by hyperparathyroidism. *Exp Anim*. 67, 509-516 (2018) (査読あり).
doi: 10.1538/expanim.18-0060.
- Tani H, Ohnishi S, Shitara H, Mito T, Yamaguchi M, Yonekawa H, Hashizume O, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi J. Mice deficient in the *Shmt2* gene have mitochondrial respiration defects and are embryonic lethal. *Sci Rep*. 8, 425 (2018) (査読あり).
doi: 10.1038/s41598-017-18828-3.
- Shimizu A, Tani H, Takibuchi G, Ishikawa K, Sakurazawa R, Inoue T, Hashimoto T, Nakada K, Takenaga K, Hayashi J. Cytoplasmic transfer of heritable elements other than mtDNA from SAMP1 mice into mouse tumor cells suppresses their ability to form tumors in C57BL6 mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 493, 252-257 (2017) (査読あり).
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.035.
- Yoshizumi T, Imamura H, Taku T, Kuroki T, Kawaguchi A, Ishikawa K, Nakada K, Koshiba T. RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity. *Sci Rep*. 7, 5379 (2017) (査読あり).
doi: 10.1038/s41598-017-05808-w.
- Borna NN, Kishita Y, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI, Tokuzawa Y, Kohda M, Nyuzuki H, Yamashita-Sugahara Y, Nasu T, Takeda A, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. A novel mutation in TAZ causes mitochondrial respiratory chain disorder without cardiomyopathy. *J Hum Genet*. 62, 539-547 (2017) (査読あり).
doi: 10.1038/jhg.2016.165.
- Lehtonen JM, et al. (Nakada K は 24 名中 22 番目の著者). FGF21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. *Neurology*, 87, 2290-2299 (2016) (査読あり).
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003374>.
- Suzuki T, et al. (Nakada K は 41 名中 36 番目の著者). Mitochondrial Acid 5 Binds Mitochondria and Ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage. *J Am Soc Nephrol*, 27, 1925-1932 (2016) (査読あり).
doi: 10.1681/ASN.2015060623.

〔学会発表〕(計6件)

- 中田和人、変異型ミトコンドリアゲノムの逆遺伝学:多様な病態形成機構の理解に向けて、第19回日本生殖工学会学術講演会(招待講演)、2019年。
- 中田和人、モデルマウスから探るミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理、第56回日本神経眼科学会総会(招待講演)、2018年。
- Nakada K, Reverse genetic studies on mammalian mitochondrial DNA with pathogenic mutations, Asian Society for Mitochondrial and Medicine (ASMRM2018)(招待講演)(国際学会), 2018年。
- 中田和人、マウス逆遺伝学から理解するミトコンドリアゲノム変異の多階層病理、第91回日本生化学会大会(招待講演)、2018年。
- 中田和人、ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理、第16回日本抗加齢医学会総会(招待講演)、2016年。
- 中田和人、変異型 mtDNA による多階層病理、第39回日本分子生物学会(招待講演)、2016年。

〔その他〕

ホームページ

http://www.biol.tsukuba.ac.jp/nakada_ishikawa/

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。