【168】

氏　名（本籍）	佐藤晃嗣（さとうあきつぐ）（山形県）
学位の種類	博　士（理　学）
学位記番号	博甲第 3715 号
学位授与年月日	平成 17 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	**Mammalian Mitochondrial Genetic Complementation and Recombination.** （哺乳類ミトコンドリアにおける相互作用とミトコンドリア DNA 組換え）

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	沼田　治
副　査	筑波大学客員教授	理学博士	米川博通
副　査	筑波大学助教授	理学博士	中田和人

論文の内容の要旨

1）ミトコンドリア間相互作用

真核生物の細胞中に存在するオルガネラであるミトコンドリアは，その内部に核ゲノムとは独立のゲノムであるミトコンドリア DNA（mtDNA）を保持している。mtDNA には細胞内のエネルギー産生を行うために必要な情報が記されており，mtDNA における変異はミトコンドリア病と総称される様々な症候群性疾患の原因となっていることが知られている。近年ミトコンドリアは，細胞内において活発に融合と分裂を繰り返し，その内容物を交換（ミトコンドリア間相互作用）しているかのような観察結果が得られている。ミトコンドリア間の物質交換が存在すると仮定した場合，mtDNA 変異による病原性は同一細胞内に存在する正常な mtDNA を持つミトコンドリアによって補われ，抑制されることが予想される。本論文ではマウス個体内においてミトコンドリア間相互作用が存在するか否かを明らかにするために，病原性大規模欠失型 mtDNA を異種マウス由来 mtDNA を持つ受精卵に導入したマウスを新たに作製した。このマウスにおいて単一細胞内の個々のミトコンドリアの呼吸活性を観察することで，ミトコンドリア間相互作用による病態発症抑制が機能していることを明らかにした。

2）mtDNA 組換え

哺乳類の mtDNA は完全に母親からしか伝わらないために，一細胞内，一個体内のすべての分子が同一の塩基配列を持っている。そのため核ゲノムに存在するような組換えは意味を持たず，組換えの機構自体が存在しないものと考えられてきた。この組換えが存在しない性質に加えて，核ゲノムより非常に DNA 変異導入率が高い性質を利用し，これまで多くの分子系統樹作製に mtDNA は利用されてきた。しかし近年，mtDNA 塩基配列多型の研究や生化学的酵素活性の研究などから哺乳類 mtDNA における組換えの存在を示唆するような報告がなされている。本論文では mtDNA 組換えの有無を直接的に検証するために，“1）ミトコンドリア間相互作用” の項において作製した病原性大規模欠失型 mtDNA を持つマウス，及び先行研究に

より作製された2種類のmtDNAが混在したヒト培養細胞において，mtDNAのクローニング・シークエンスを行った。その結果，ヒト培養細胞においてはmtDNAの組換えは観察されなかったが，マウス骨格筋において非常に低い確率ではあるものの組換えmtDNA分子を検出した。この結果は“1）ミトコンドリア間相互作用”の項において証明されたミトコンドリア間の物質交換が少なくともmtDNAのレベルでの交換でなされていることを裏付けるものである。非常に低い確率でしか組換えmtDNA分子が存在しないことから，mtDNAの組換えには核DNAに見られるような多様性の獲得などの生物学的な意味はなく，むしろ変異mtDNAの修復の際に生じた痕跡的副産物ではないかと考えられる。本研究の結果により，これまで組換えが存在しないことを前提としてきた分子系統樹の結果に与える影響が懸念されるが，非常に低い確率でしか組換えが存在しないこと，ごく例外的な場合を除いて自然条件下ではmtDNAは母親からしか伝わらないことを考慮すると，mtDNAの組換えが系統樹作製の結果に与える影響はほとんどなく，系統樹の結果を見直す必要はないと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，異種由来のミトコンドリアDNA（mtDNA）を持つマウスを作製することで，ミトコンドリア間相互作用とmtDNAの組換えの存在を明らかにしようとした意欲的な研究である。

まずミトコンドリア間相互作用については以下の点を明らかにした。これまで哺乳類個体レベルにおいて，ミトコンドリア間で物質を交換するような相互作用が行われているか否か，明確な証拠が示されていなかった問題に対し，佐藤晃嗣は先行研究の問題点であった「病原性大規模欠失型mtDNAと同時に混入した野生型mtDNAの呼吸活性回復に与える影響」を異種マウス由来のmtDNAを使用することで解決した。その結果，ミトコンドリア間相互作用がマウス個体レベルで存在しており，mtDNA変異による呼吸活性低下を抑制するように機能していることを明らかにした。現在，変異型mtDNAの蓄積が老化の主な原因である，という「老化ミトコンドリア原因説」が広く受け入れられているが，本論文における発見から，老化に伴い生じた突然変異はミトコンドリア間相互作用により互いに補完され呼吸活性低下を免れていることが予想され，変異型mtDNAの蓄積が老化の直接的な原因とはなりえないことが考えられる。老化という生命に普遍的な現象を明らかにする上でも，本研究は重要な知見を与ええることが期待される。

次にmtDNAの組換えについては以下の点を明らかにした。従来mtDNAの組換え体を検出するために使用されてきたPCR法を介したクローニング・塩基配列決定では，PCR jumpingによるartifactを誤って組換え体として検出してしまう可能性があった。佐藤晃嗣はこの点を回避するためにPCR法を介さないmtDNAの精製・クローニング・塩基配列決定を行うことにより，明確にmtDNAにおいて組換えが存在すること，またその頻度は稀であることを結論づけた。このことはミトコンドリアゲノムに関する遺伝学の研究において極めて重要な知見であるだけでなく，組換えの有無が結果に大きく影響するmtDNAの塩基配列を使用した分子系統樹の作成法にとっても重要な情報である。

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。