

第 11 回 麻布大学 生殖・発生工学セミナー

講演要旨集

日時：2009 年 2 月 15 日（日）午後 2 時 開演

場所：麻布大学 獣医学部棟 7 F 大会議室



主催 麻布大学

事務局：麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室
柏崎 直巳・伊藤 潤哉

目次

ご挨拶

「第11回麻布大学生殖・発生工学セミナー」 にあたって

柏崎 直巳・伊藤 潤哉（麻布大学 獣医学部）

----- 2

講演

「ミトコンドリア DNA の遺伝学：母性遺伝とボトルネック効果」

米川博通・設楽浩志

（（財）東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 疾患モデル開発センター）

----- 3

「ミトコンドリアゲノム変異の逆遺伝学：

ミトコンドリア呼吸機能の破綻による病態病理」

中田 和人（筑波大学大学院 生命環境科学研究科）

----- 5

ご挨拶

第11回 麻布大学 生殖・発生工学セミナー： 「生殖とミトコンドリア」にあたって

柏崎 直巳・伊藤 潤哉
麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室

ミトコンドリアは、細胞のエネルギー産生の中核をなし、核ゲノムとは異なる mtDNA を有し、母性遺伝によって受け継がれている。生殖系列細胞におけるミトコンドリアの役割も注目されております。精子においてはその中片部に局在して精子運動性に関与し、受精の際に卵母細胞に精子のミトコンドリアが持ち込まれるが、その後に排除されます。胚の初期発生、卵母細胞の老化、活性酸素種、ミトコンドリアに起因する病気など、その新しい機能が注目されております。さらに、動物生殖工学においては核移植によって作出された再構築胚（クローン胚）は、mtDNA がヘテロプラスミーの状態になり、その後の発生やその状態がいつまで維持されるのか、などたいへん興味深い点があります。本年度の本セミナーでは、生殖系列におけるミトコンドリアに着目することにいたしました。

本セミナーの講演Ⅰでは、この分野の第一人者である米川先生に「ミトコンドリア DNA の遺伝学：母性遺伝とボトルネック効果」をご講演していただきます。通常、細胞内のミトコンドリアは1種の mtDNA しか存在しません。この現象は「ホモプラスミー」あるいは「同質性」とよばれ、この現象を維持する機構として生殖系列における「ボトルネック効果」の存在が論争（1）されています。米川先生の研究グループは、マウス生殖系列における細胞あたりのミトコンドリア数の推移を発生時系列的に丹念に調べられております。

講演Ⅱでは、中田先生に「ミトコンドリアゲノム変異の逆遺伝学：ミトコンドリア呼吸機能の破綻による病態病理」を、ご講演していただきます。このなかで、異常なミトコンドリアのモデルマウス「ミトマウス」（2）は、生殖工学的な手法によって作出されたもので、この研究から多様な病態の発症機構精について興味深いお話がうかがえるものと期待しております。さらにこの「ミトマウス」の雄性不妊もこのセミナーに参加される皆様にとってたいへん興味深いものであると思います。

今後とも、益々のご指導、ご鞭撻を賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。

参考文献

- 1) Cree, L.M. *et al.*, (2008) Nat Genet 40, 249-54.
- 2) Inoue, K. *et al.*, (2000) Nat Genet, 26: 176-181.

ミトコンドリア DNA の遺伝学：母性遺伝とボトルネック効果

米川博通・設楽浩志

(財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 疾患モデル開発センター

ミトコンドリアは主にエネルギー産生の役割を担う細胞小器官である。高等動物のミトコンドリアには、核 DNA とは異なるミトコンドリア独自の DNA (mtDNA) が存在している。どちらも遺伝情報の担い手であるが、その遺伝様式は大きく異なり、mtDNA の代表的な遺伝様式の特徴として母性遺伝と急調分離（ボトルネック効果）が挙げられる。これらの遺伝様式およびそのメカニズムについては古くからモデルが提唱されているが、様々な動物種、あるいは mtDNA 突然変異が原因のヒトミトコンドリア病を巻き込んで、その遺伝様式について議論が再燃している。

○母性遺伝

古くから mtDNA は母性遺伝様式を行うと信じられてきたが、1991 年にマウスの異種間交雑においてごく少量の父親由来 mtDNA を子孫の組織より検出されたことが報告されると、mtDNA の母性遺伝に関して様々な論議が起こることとなった。とくに母性遺伝様式を基盤として確立してきた分子系統進化学や、ミトコンドリア疾患等の医学分野に大きな影響を与えることが想定された。しかし、我々がマウス同種間交雑によって検証したところ、精子由来 mtDNA が初期発生過程の 2 細胞期までに消失し、mtDNA の遺伝様式は完全に母性遺伝であり、異種間交雑においては、次世代における精子由来 mtDNA の伝達率は約半数であることが報告された[1]。さらにこの異種間交雑における精子由来 mtDNA は、雌性生殖系を通じて次世代へ伝達されることがないことが証明され、異種間交雑においても mtDNA の母性遺伝は厳密に保たれていることが示された[2]。MtDNA の片親遺伝は多くの動植物で報告されており、保存された遺伝様式であることが伺える。その後、mtDNA 遺伝様式だけではなく、その遺伝メカニズムの解明も行われており、ユビキチン-プロテアソーム分解系による精子由来ミトコンドリアの消失[3]、あるいは DNA 分解酵素による精子由来 mtDNA の消失が報告されている[4]。

○ ボトルネック効果

mtDNA は体細胞あたり 10^{3-4} コピーが存在しており、核 DNA の約 5-20 倍も変異を起こしやすいと考えられている。それにもかかわらず一つの細胞には 1 種類の mtDNA 分子種しか存在しない（同質性、ホモプラスミー）と考えられており、細胞内に複数の mtDNA 分子種が存在する（異質性、ヘテロプラスミー）ことは極めて稀であると考えられている。いかにして mtDNA の均一性が保たれる

のか？この同質性を維持するための遺伝機構が「ミトコンドリアボトルネック（ボトルネック＝絞り込み現象）仮説」であり、「動物が受精卵から成体になる間のある時期に 1 つの細胞中の mtDNA の数が極端に少なくなる」としたモデルが広く受入れられてきた。ところが意外なことに、この遺伝モデルは広く受けられてきたにもかかわらず、mtDNA 分子数を直接測定した報告は無かった。そこで、我々は mtDNA 分子数の測定を行ない、その結果、予想に大きく反して mtDNA のコピー数が極端に減少しないことが明らかとなった。これらの結果は、従来から唱えられてきた mtDNA コピー数の減少によるミトコンドリアボトルネック説を棄却するものであり、mtDNA 同質性の維持はコピー数減少以外の機構によって mtDNA の分離単位の実効数が小さくなることに起因すると結論した [5]。一方で、PGC 特異的に EGFP を発現するトランスジェニック (Tg) マウス (*Stella-EGFP*) を用いた解析により、7.5 dpc の PGC のみで mtDNA コピー数が 200 程度にまで減少し、このときに急調分離が起こることが報告されている [6]。最近になって、急調分離が mtDNA コピー数の減少を伴わないとする、我々のモデルの一つを指示する結果が報告されている [7] が、急調分離とボトルネック効果の全容を解明するためにはさらに詳細な検証が必要である。そのメカニズムの解明がミトコンドリア病の発症原因の解明にもつながるものと期待されており、我々の最近の知見を含めて報告したい。

キーワード：ミトコンドリア DNA (mtDNA)、母性遺伝、ボトルネック効果、急調分離、同質性と異質性

参考文献

- [1] Kaneda, H. *et al.* (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4542-6.
- [2] Shitara, H. *et al.* (1998) *Genetics* 148, 851-7.
- [3] Sutovsky, P. *et al.* (1999) *Nature* 402, 371-2.
- [4] Nishimura, Y. *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1382-7.
- [5] Cao, L. *et al.* (2007) *Nat Genet* 39, 386-90.
- [6] Cree, L.M. *et al.* (2008) *Nat Genet* 40, 249-54.
- [7] Wai, T. *et al.* (2008) *Nat Genet* 40, 1484-8.

ミトコンドリアゲノム変異の逆遺伝学： ミトコンドリア呼吸機能の破綻による病態病理

中田 和人

筑波大学大学院 生命環境科学研究科

E-mail: knakada@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

哺乳類におけるミトコンドリアゲノム変異の逆遺伝学の展開

これまで健康に生活してきた夫婦であっても、その 15%程度が不妊という状況にあると言われている。そのおよそ半分の原因である男性不妊では精子数の減少と精子運動能の低下が主要な症状で、これらはホルモン異常や過度のストレス、精子鞭毛運動の異常などによって起ると考えられている。先行研究において、運動能の低下した精子サンプルからは突然変異型のミトコンドリアゲノム (mtDNA) が検出されたことを発端に (1、2)、mtDNA の突然変異により精子のエネルギー代謝が低下し、精子運動能の低下による男性不妊状態を引き起こす可能性が考えられるようになってきた。

ミトコンドリアは、酸素呼吸により生命活動で必要とされる ATP の大部分を産生する細胞小器官である。ミトコンドリアには核外ゲノムである mtDNA を複数コピー (細胞あたり数百から数千コピー) 含有し、この mtDNA は独自のセントラル・ドグマによって発現調節されている。哺乳類の mtDNA には、酸素呼吸や ATP 合成に必要な 13 種のタンパク質遺伝子、これらを翻訳するための 22 種の tRNA 遺伝子と 2 種の rRNA 遺伝子がコードされている。近年、全身性のミトコンドリア機能異常を伴うミトコンドリア病 (脳筋症) の患者組織から特定の欠失突然変異 mtDNA や点突然変異 mtDNA が検出され、最近では同様の変異型 mtDNA が糖尿病や神経変性疾患の患者組織、さらに老化個体からも検出されるに至っている (3)。このようなことから、mtDNA の突然変異に起因するミトコンドリア呼吸機能異常が広く、そして多様な病気の原因になる可能性が周知されはじめている。このような可能性を検証し、詳細な病態発症機構を解明するためには、変異型 mtDNA を導入した逆遺伝学的なモデルマウスの活用がもっとも有効な戦略となる。ところが、ミトコンドリア外膜と内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極めて困難であることから、変異型 mtDNA を含有したモデルマウスの作出は不可能であると考えられてきた。

先行研究において、我々は、体細胞突然変異によって生じたマウスの大規模欠失突然変異型 mtDNA (欠失型 mtDNA) を細胞内で濃縮し、この細胞質体をマウス初期胚に電気融合することで、すなわち、欠失型 mtDNA をミトコンドリアごとマウス個体に導入することで、欠失型 mtDNA 含有マウス (ミトマウス) の作製に成功した (4)。このミトマウスの登場によって、mtDNA の突然変異を起点とした多様な病態の発症機構の解明に着手できる環境がようやく整ったのである。そして、ミトマウスの活用を通して、ミトコンドリア間相互作用によっ

てミトコンドリア呼吸機能不全病態が制御されていることや出生前治療法の確立に至っている（５、６）。

ミトコンドリア男性不妊症の発症機構の解明

前述のように、男性不妊患者を発端とした順遺伝学的研究から mtDNA の突然変異が男性不妊の原因になる可能性が考えられていた。この可能性を逆遺伝学的に検証するためにミトマウスの雄性生殖機能の解析を行った。その結果、導入された欠失型 mtDNA を大量に蓄積したミトマウスでは、精子数の減少と精子運動能の低下が起り、重度の雄性不妊を発症することが明らかとなった（７）。

精子数減少の原因は、欠失型 mtDNA の蓄積によってエネルギー欠乏状態となった精細胞が減数分裂過程のパキテン期で停止してしまうことに起因していた。通常、パキテン期では相同染色体の対合が起るが、雄性不妊を呈しているミトマウスではこの相同染色体の対合に異常が生じていた。また、結果としてこのようなパキテン期で停止してしまった細胞は細胞死を起こしてしまうことも分かった。これらの結果は、哺乳類の精子形成における減数分裂過程にはエネルギー依存的なチェックポイントが存在している可能性を示唆している。このようなチェック機構を逃れて分化・成熟できた精子であってもその運動能は顕著に低下していた。また、このような精子の大部分はミトコンドリアが存在する中片部だけでなく、核の形態異常も伴っていた。もちろん、このような精子のエネルギー産生能は明らかに低下していた。つまり、不妊ミトマウスの精子運動能の低下は、エネルギー欠乏だけでなく、精子形成時に起る形態異常にも原因があると考えられる。これらの結果は、ミトコンドリアからのエネルギー供給が哺乳類の精細胞の分化に必要不可欠で、その異常が男性不妊の直接的な原因になることを示している。

今後、このミトマウスを活用することで、ミトコンドリア呼吸機能異常に起因する男性不妊症の詳細な発症メカニズムの解明はもとより、効果的な治療法の開発や低下した精子の運動能を改善するための新規薬剤・物質の検索が可能になると思われる。また、低下した精子運動能を改善できる薬剤・物質はミトコンドリアのエネルギー産生能を増強する可能性があるため、ミトコンドリア病をはじめ、ミトコンドリアのエネルギー欠乏に起因する多様な病気の治療や症状緩和に応用できる可能性があることも最後に追記しておきたい。

参考文献

- 1) Kao *et al.*: Biol. Reprod., 52: 729-721, 1993.
- 2) Carra, E *et al.*: Biochem. Biophys. Res. Commun., 322: 333-339, 2004.
- 3) Wallace, D. C.: Science, 283: 1482-1488, 1999.
- 4) Inoue, K. *et al.*: Nature Genet., 26: 176-181, 2000.
- 5) Nakada, K. *et al.*: Nature Med., 7: 934-940, 2001.
- 6) Sato, A. *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102: 16765-16770, 2005.
- 7) Nakada, K. *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 15148-15153, 2006.