



| | |
|---------------------|---|
| Title | ウシミトコンドリアDNAの混在がマウス個体発生間の遺伝子発現に及ぼす影響 [全文の要約] |
| Author(s) | 小松, 雅也 |
| Description | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(農学) |
| Dissertation Number | 甲第14817号 |
| Issue Date | 2022-03-24 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/85467 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Komatsu_Masaya_summary.pdf |



学位論文内容の要約

博士の専攻分野の名称： 博士（農学） 氏名 小松 雅也

学位論文題名

ウシミトコンドリア DNA の混在がマウス個体発生間の遺伝子発現に及ぼす影響

背景

ミトコンドリアは、細胞におけるエネルギー分子 ATP の産生やアポトーシスの誘導など、生物に必要な機能を多数有する細胞小器官である。ミトコンドリアの機能は核 DNA とミトコンドリアに内在する mtDNA の両方から発現する遺伝子によって支えられている。mtDNA の変異はミトコンドリア機能に異常を及ぼすため、生物は正常な生理機能を維持し、かつ種を維持していく上で変異 mtDNA の遺伝を阻止する必要がある。

ウシミトコンドリアを混在させたマウス胚である mtB-M 胚の発生能力を検証した過去の研究により、哺乳類では胎盤形成不全によって異種 mtDNA が混在した個体発生を阻止していることが判明した。この発見は、胎盤細胞にしか寄与しない 4 倍体細胞の補助によってウシ mtDNA を保持したマウスである Xenon の誕生により決定的に裏付けられた。分類学的に目のレベルで異なる異種 mtDNA が混在した哺乳類の誕生は、これまでに報告例はない。これまでの研究で、異種 mtDNA の混在が胎盤形成を阻害することが明らかになったが、胎子形成に及ぼす影響については全く調べられていなかった。加えて、異種 mtDNA の混在は胎生致死を誘導するため、胎子形成や胎盤形成にもたらす影響は謎に包まれたままであり、その分子機構の解明が mtDNA の種の独自性を保守する必要性の理解に繋がると考えられる。そこで、本研究では、異種であるウシ mtDNA の混在がマウス細胞の遺伝子発現に影響を及ぼすことで、正常な胎子形成および胎盤形成が阻害されて、結果として胎生致死が誘導されるという仮説のもと、Xenon の表現型解析および遺伝子発現解析を実施した。そして、Xenon 作出系を用いたこれら実験結果を裏付けるために、マウス培養細胞へのウシ血小板 mtDNA を導入する系を構築して、異種 mtDNA 混在による遺伝子発現への影響を確かめた。加えて、これらの解析に基づいて遺伝子発現に直接的に影響を及ぼす miRNA の発現動態および塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構の一種である DNA シトシンのメチル化状態に着目して解析を実施し、一連の研究結果から異種 mtDNA の混在が細胞の遺伝子発現状態に及ぼす機構を分子レベルで解明することを目的とした。

(1) ウシミトコンドリア DNA 混在マウス新生子肺組織における網羅的遺伝子発現

【目的】

Xenon がコントロールと比べて高い頻度で自発呼吸ができなくなった原因を探るべく、Xenon 新生子における脳や心臓、脾臓、肝臓、および肺といった主要臓器の重量測定や組織学的解析を過去に実施したところ、体外受精 (*In vitro fertilization*: IVF) 胚由来マウスの各種臓器と比較して Xenon の主要臓器において重量や組織構造に顕著な違いは観察されなかった。しかし、遺伝子発現レベルの異常が起きている可能性は排除できない。本研究では呼吸器系で最も重要な役割を担っている臓器である肺に着目した。

ヒト培養細胞や初期胚では、異種 mtDNA の混在により遺伝子発現パターンが変化することがいくつかの研究で示されているが、着床後個体において異種 mtDNA の混在による遺伝子発現への影響を調べた例はこれまでにない。Xenon 新生子の肺では正常な遺伝子発現が保てなくなった可能性がある。そこで、本項はウシ mtDNA の混在がマウス肺組織における遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

ウシ mtDNA を保持したマウスである Xenon の作出は、自身の過去の修士課程における研究に従い、二種のマウス胚を顕微操作により組み合わせて行った。Xenon 胎子から肺を摘出し、ウシ mtDNA 中の塩基配列に特異的に反応するプライマーを用いて PCR を行い、ウシ mtDNA の検出を試みた。ウシ mtDNA が検出された肺 (Xenon 肺) について、RNA シーケンスを実施し、49,286 個の遺伝子の発現量を IVF 胚由来マウス肺 (IVF 肺) と比較した。

【結果と考察】

階層的クラスタリングや PCA プロットによりサンプル間の網羅的な遺伝子発現パターンを評価した結果、Xenon 肺における 6 サンプルは IVF 肺における 6 サンプルとは異なるクラスターに分類されたことから、この 2 区の遺伝子発現パターンは明確に異なっていることがわかった。Xenon 肺で変動していた遺伝子群の機能を GO term 解析により調査したところ、肺形成に関与するものが含まれていたことから、Xenon 肺では肺における機能的異常が示唆された。さらに、Xenon 肺ではミトコンドリアの生理機能に関する遺伝子が低発現していること、そして、翻訳性遺伝子の転写制御に関わる miRNA 遺伝子が高発現していることが明らかとなった。

(2) ウシミトコンドリア DNA 混在マウス新生子肺組織におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体構成遺伝子および miRNA 関連遺伝子群の遺伝子発現

【目的】

前項で実施した RNA シーケンスで検出された Xenon 肺組織における遺伝子発現変化は、別の実験手法により確かめることで、確かにウシ mtDNA の導入により引き起こされたことを裏付けることができる。本項では Xenon 肺における低発現遺伝子群の中で、ミトコンドリアの主要な働きの一つである ATP 合成を行う呼吸鎖複合体を構成する 15 種のサブユニット遺伝子に着目した。また、Xenon 肺における高発現遺伝子群については、広範な遺伝子の転写制御に関与する 5 種の miRNA 遺伝子に着目し、RNA シーケンスとは異なる遺伝子発現量の解析手法である定量 PCR によってこれらの遺伝子の発現量を決定することを目的とした。

【材料と方法】

RNA シーケンスに供試した Xenon 肺および IVF 肺の RNA から cDNA を合成し、測定対象の遺伝子の各塩基配列に特異的に反応するプライマーを用いて定量 PCR を行った。

【結果と考察】

RNA シーケンスによって、IVF 肺に対して Xenon 肺で相対的に低発現量であった呼吸鎖複合体のサブユニット遺伝子 15 種の発現量を定量 PCR によって測定した。その結果、Xenon 肺では 12 種のサブユニット遺伝子の発現量が有意に低下することがわかった。また、Xenon 肺で相対的に高発現量であった 5 種の miRNA 遺伝子の発現量を測定したところ、3 種の発現量が Xenon 肺において有意に増加した。発現低下していた 12 種の呼吸鎖複合体サブユニット遺伝子には呼吸鎖複合体 I-V のサブユニットが全て含まれていたことから、Xenon 肺では呼吸鎖複合体全体の活性が低下していることが推測される。また、データベースによると、Xenon 肺で発現増加していた miRNA 遺伝子はいずれもミトコンドリアに関する遺伝子の発現を抑制することが予測された。したがって、これらの miRNA の発現上昇が呼吸鎖複合体サブユニット遺伝子の発現低下の一因である可能性が示唆された。

(3) ウシミトコンドリア DNA の混在がマウス肺株化細胞のミトコンドリア呼吸鎖複合体構成遺伝子および miRNA 遺伝子の発現レベルに及ぼす影響

【目的】

前項までの解析によって、Xenon 肺におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体のサブユニット遺伝子の発現低下と遺伝子の転写制御を行う miRNA 遺伝子の発現上昇が明らかになった。これが、ウシという異種 mtDNA の混在がマウス細胞にもたらした効果であるかどうか、その普遍性を検証するために、本項ではマウス肺由来の培養細胞にウシ血小板由来 mtDNA を導入したサイブリッド細胞を作出し、Xenon 肺と同様の遺伝子発現変化が起こるかを確かめた。

【材料と方法】

ウシミトコンドリアのドナーとしてウシ生体から採取した全血由来の血小板を用いた。マウス肺培養細胞とウシ血小板が混合した細胞浮遊液について、Polyethylene glycol (PEG) 1500 を添加することで、二種の細胞の細胞融合を試みた。ウシ血小板が融合したマウス肺培養細胞由来の均一な細胞集団を得るために、シングルセルクローニングを実施した。十分に増殖した細胞集団について、PCR によるウシ mtDNA の検出を行った後、Xenon 肺で調べた同一の遺伝子の発現量を定量 PCR によって測定した。

【結果と考察】

マウス肺培養細胞とウシ血小板を用いて細胞融合処理し、シングルセルクローニングを行った結果、3 ラインのウシ mtDNA を持つ細胞集団 (サイブリッド細胞)を得ることができた。前項で調べた呼吸鎖複合体サブユニット遺伝子 15 種と miRNA 遺伝子 5 種について、サイブリッド細胞の発現量を定量 PCR によって解析した。その結果、ウシ mtDNA サイブリッド細胞では 12 種の呼吸鎖複合体サブユニット遺伝子の発現量が有意に低下していた。また、サイブリッド細胞では 4 種の miRNA 遺伝子の有意な発現増加がみられた。

このように、呼吸鎖複合体サブユニット遺伝子および miRNA 遺伝子について、サイブリッド細胞では Xenon 肺と同様の発現変動が発生することが明らかとなり、特に miRNA 遺伝子においてはコントロール区と比べてより明確に高発現が検出された。サイブリッド細胞を用いた解析により、ウシ mtDNA の混在によって呼吸鎖複合体遺伝子群および miRNA 群の遺伝子発現が変化したことが裏付けられた。

(4) ウシミトコンドリア DNA 混在がマウス肺細胞における miRNA 遺伝子の転写調節領域の DNA メチル化修飾に与える影響

【目的】

前項までで、異種 mtDNA の混在はマウス細胞のミトコンドリアにおける呼吸鎖複合体のサブユニット遺伝子における発現低下を引き起こすことが示された。ミトコンドリア呼吸鎖複合体はミトコンドリア機能の本態である呼吸活性に直接的に関与し、呼吸鎖複合体の活性は、メチル基やアセチル基といったエピジェネティック制御に必須の化学修飾基の供給に影響を及ぼす。したがって、Xenon 肺における網羅的な遺伝子発現パターンの変化の背景には、転写調節配列におけるメチル化修飾の変化により、同じく転写レベルを調節する miRNA 発現レベルを上昇させた可能性が考えられた。本項では、ウシ mtDNA の混在がもたらした miRNA 発現の変化の原因を探るために、遺伝子発現調節に関与する DNA シンメチル化修飾によるエピジェネティック制御への影響を調べることを目的とした。

【材料と方法】

Xenon 肺およびサイブリッド細胞で発現増加が確かめられた miRNA のプロモーター領域 CpG アイランドにおける DNA のメチル化状態を Methylation Specific-PCR によって解析した。

【結果と考察】

Xenon 肺では 3 種の miRNA 遺伝子の有意な発現増加が認められたため、これらの転写活性を制御する CpG アイランドのメチル化状態を調べた。その結果、Xenon 肺では 1 種の miRNA 遺伝子の CpG アイランドが有意に低メチル化状態であった。また、サイブリッド細胞でも miRNA 遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランドが、有意に低メチル化状態であることが明らかとなった。CpG アイランドにおける低メチル化状態は、遺伝子の転写促進に働くため、Xenon 肺やサイブリッド細胞における miRNA の発現増加には CpG アイランドにおける低メチル化状態の誘導が関与している可能性が示された。

(5) ウシミトコンドリア DNA の混在がマウス胎盤系列細胞の表現型および遺伝子発現に及ぼす影響

【目的】

前項まで、胎子個体発生のうち ICM に由来する胚体の中でも、肺における異種 mtDNA 混在の影響を調べてきた。本項では、ICM とは異なる細胞系列である TE に由来する胎盤系列細胞における異種 mtDNA 混在の影響を調べた。ウシミトコンドリアの混入により

mtB-M 胚は胎盤形成不全を示すため解析を行うことができなかったが、mtB-M 胚を 4 倍体胚と凝集させた Xenon 胚では胎盤形成の解析ができる。これまでの過去の研究で Xenon 胚由来の妊娠満期胎盤の重量がコントロールの胎盤に比較して有意に増加していることが判明した。しかし、組織レベルでの差異や詳しい遺伝子発現解析やエピジェネティック制御に関わる DNA メチル化レベルの解析は行われていない。本項では、胎盤の過大形成に関わる遺伝子に着目し、Xenon 胎子の胎盤巨大化の原因を探ることで、ウシ mtDNA 混在がマウス胎盤形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

HE 染色を実施して妊娠満期で得られた Xenon 胎盤の組織構造を観察し、コントロールと比較解析した。さらに、肺で検出された DNA メチル化状態の変化を検証するために、胎盤肥大化の原因遺伝子と考えられているいくつかの遺伝子の発現量とその遺伝子の CpG アイランドにおけるメチル化状態を調べた。

【結果と考察】

出生時における Xenon 胎盤では、胎盤を構成する海綿栄養芽層が有意に肥大化しており、重量のみならず組織学的にもコントロールとは異なることが明らかとなった。さらに海綿栄養芽層の肥大化に関与することがわかっている遺伝子の発現量を調べたところ、Xenon 胎盤では発現レベルが有意に増加していた。しかし、Xenon 胎盤におけるこの遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランドにおけるメチル化状態に有意な変化はみられなかったことから、有意な遺伝子発現上昇は DNA メチル化以外のエピジェネティック修飾であるヒストンメチル化修飾が原因であることが推察された。

総合考察

ウシ mtDNA の混在により Xenon 肺では呼吸鎖複合体サブユニット遺伝子の発現が低下し、miRNA の発現が増加した。呼吸鎖複合体の活性低下はミトコンドリア内の代謝異常を介して細胞内のメチル化状態を変化させる。Xenon 肺やサイブリッド細胞で発現増加した miRNA における DNA メチル化解析の結果から、ウシ mtDNA の混在によってメチル化状態が変化することが明らかとなった。メチル化状態の変化や miRNA の発現増加は、さらに呼吸鎖複合体サブユニット遺伝子の発現を抑制し、さらに呼吸鎖複合体の活性低下を引き起こして負のスパイラルを形成する可能性がある。この負のスパイラルが繰り返された

結果、広範な遺伝子の発現に影響するメチル化状態および miRNA の発現の変動が助長され、特異な遺伝子発現パターンや自発呼吸不全による致死的表现型を示したと考えられた。過去の研究では、mtB-M 胚の 4 細胞期ではじめて ATP 合成能に異常がみられたため、この時期が呼吸鎖複合体の活性低下の起点となった可能性がある。

肺のみならず Xenon 胎盤においても、異種 mtDNA の混在により遺伝子発現が変化し、胎盤の肥大化という表現型を示した。Xenon 胎盤では DNA のメチル化状態に変化はみられなかったが、ヒストンのメチル化による転写制御を受けている可能性も排除できない。したがって、今後は細胞内におけるヒストンのメチル化修飾を調べることで異種 mtDNA のエピジェネティック修飾への影響をより深く理解することができるかもしれない。

また、今回解析を行っていない臓器に関しても、ウシ mtDNA の混在による網羅的な遺伝子発現パターンの変化により、正常な機能を行うことができなくなる可能性がある。このような致死的影响が、次世代への異種 mtDNA の伝達をより強固に防いでいるのかもしれない。異種 mtDNA と核 DNA 間における相互作用のさらなる理解により、重篤な症状をもたらすヒトのミトコンドリア疾患の病因の解明およびその治療法の開発が可能となるだけでなく、mtDNA を介して核 DNA の遺伝子発現が制御できる可能性を示すことに繋がるため、本研究結果は分子遺伝学および発生生物学を含めた生物学の新たな展開に寄与する重要な知見を与えるものと考えられる。

結論

これまで、異種 mtDNA が個体発生および遺伝子発現に及ぼす影響は全くとっていいほど不明であったが、本研究により異種 mtDNA と核 DNA 間の相互作用の存在が初めて明らかとなり、それは DNA メチル化修飾を介して行われていると結論付けた。