

ミトコンドリアゲノムの維持と疾患

康, 東天
九州大学大学院医学研究院臨床分子医学

<https://doi.org/10.15017/7236921>

出版情報：福岡醫學雑誌. 91 (11), pp.284-290, 2000-11-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：



ミトコンドリアゲノムの維持と疾患

九州大学大学院医学研究院臨床分子医学
康 東 天

(1) はじめに

ヒトミトコンドリアゲノムは13の電子伝達系サブユニットと22のtRNAと2つのrRNAをコードする約16 kbpの環状DNAで、細胞あたり数百から数千コピー存在している。コードしている遺伝子の数は限られているが、全ての遺伝子はミトコンドリアにおける好氣的ATP合成に必須である。ミトコンドリアは細胞におけるATP合成の80%以上を占めていることから、ミトコンドリアゲノム異常は細胞の生存と機能に重大な支障を来す。実際これまで、数多くのミトコンドリアゲノムの変異に起因する、先天的ないわゆるミトコンドリア脳筋症が報告されており、新たな変異の報告は現在もさらに増えつづけている。最近、そのような先天的な特殊な疾患群だけでなく、より一般的な疾患においてミトコンドリアゲノム異常との関連が認識されてきており、ミトコンドリアゲノムの維持機構に対する関心が高まりつつある¹⁾。

(2) ミトコンドリアゲノムの変異と修復

ミトコンドリア電子伝達系は細胞内酸素消費の90%以上を占め、その1~5%は生理的に活性酸素に転換していると考えられている。このようにミトコンドリアは細胞内最大の生理的活性酸素産生オルガネラであることから、ミトコンドリアゲノムは強い活性酸素障害を受けていることが予想されている。実際、代表的活性酸素修飾塩基である酸化型グアニン塩基8-オキシグアニン(8-oxoG)が、ミトコンドリアDNAでは核に比べ数十倍多いとの報告が数多くなされている²⁾。また、少なくともヒトミトコンドリアDNAでは、核DNAのようなヌクレオソーム構造をとっているとの積極的な報告はなく、構造的にも核に比べ障害を受けやすいと考えられている。これに加え、ミトコンドリアの脂溶性陽イオンを蓄積しやすい性質から、細胞がアルキル化剤等の抗がん剤にさらされた際にも、ミトコンドリアDNAは核に比べ数十倍強く化学的修飾を受けることが知られている。

このようにDNA障害を核に比べ受けやすいことを考えても、ミトコンドリアゲノムでは核ゲノムに比べ変異の発生率が高いことが容易に想像される。このことはミトコンドリア遺伝子の進化的な変異速度が核遺伝子より10倍以上速いことや、酵母のミトコンドリア呼吸欠損株の出現頻度の高さから間接的に支持される。しかし、核DNAと違いミトコンドリアゲノムの変異率を直接的に測定する方法がなく、長い間は乳類のミトコンドリアゲノムが核に比べ変異発生率が本当に高いのかは確認されてはいなかった。最近実測法が開発され、実際核に比べ10倍程度変異発生率が高いことが報告されている。

ミトコンドリアゲノムの重要性和障害の受けやすさにもかかわらず、1974年にClaytonらが紫外線DNA障害であるピリミジンダイマーがミトコンドリアでは修復されないと報告して以来、ミトコンドリアにはDNA修復系がないと長い間信じられてきた。DNA修復系は大きく4つに分類できる。(1)ヌクレオチド除去修復系(2)ミスマッチ修復系(3)塩基除去修復系(4)組換え修復系である。紫外線障害DNAは核では主にヌクレオチド除去修復系で修復されるが、紫外線障害ミトコンドリアDNAが修復されないとのClaytonの最初の報告通り、ミトコンドリアにはヌクレオチド除去修復系は存在しない。ミスマッチ修復系も、酵母ではミスマッチ認識関連タンパク質

Dongchon KANG

Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka Japan

MSH1の存在とミトコンドリアゲノム維持におけるその重要性が示されているが、ほ乳類ではこれまで活性も酵素も同定されておらず、少なくともほ乳類にはこの系は存在しないようである。塩基除去修復系は対応する酵素がミトコンドリアに存在し、活性も測定されている。酵母においては組換え反応の存在がはっきりしているが、ほ乳類では組換え反応そのものの存在がまだ議論の分かれるところであり、存在したとしても非常に弱いというのが一致したところであろう。現時点では、ほ乳類ミトコンドリアにおけるDNA修復は主に塩基除去修復に頼っているといえる。

塩基除去修復は活性酸素障害DNAの修復に主たる役割を果たしているため、強い活性酸素発生源であるミトコンドリアにこの修復系が残っていることは意味があるように思われる。そこで特に、代表的活性酸素修飾塩基である酸化型グアニン塩基8-oxoGの修復に関与する酵素についてさらに少し述べる。DNA鎖中の8-oxoGはDNA複製の際、正常なペアであるシトシンとほぼ同じ頻度でアデニンとも対合するために、C:GからA:TあるいはA:TからC:Gといったトランスポージョン変異（ピリミジン塩基からプリン塩基あるいはプリン塩基からピリミジン塩基への変異のこと。ちなみにピリミジン塩基間あるいはプリン塩基間の変異はトランジション変異という）を引き起こす。この8-oxoGによる変異を予防するためのMutM, MutY, MutTという3つの酵素が大腸菌でまず同定された。MutMは8-oxoG DNA glycosylaseであり、C:8-oxoGペアから8-oxoGを切り出す酵素である。MutYはadenine DNA glycosylaseで、A:8-oxoGペアからAを切り出す。MutTは8-oxodGTPase活性を持ち、dGTPが活性酸素で酸化された8-oxodGTPを加水分解する酵素である。8-oxodGTPはDNA複製の際アデニンの対合相手としてチミンのかわりに取り込まれることから、同様にトランスポージョン変異を引き起こす。これら3つの大腸菌酵素のヒトホモログも同定されている。最初に同定されたのは九州大学の関口研でクローニングされたMutTホモログで、hMTH1 (human MutT homolog 1) と名付けられた。核DNA複製のためのヌクレオチドプールは細胞質に存在することから、hMTH1は細胞内では主に細胞質に局在する。一方ミトコンドリアはミトコンドリアDNA複製のためのヌクレオチドプールをミトコンドリアマトリックス内に独自に持っている。そして、hMTH1も細胞質と同程度のレベルでミトコンドリアマトリックスに存在することがわかった⁹⁾。その後、MutMとMutYのヒトホモログとしてhOGG1とhMYHのcDNAがクローニングされた。両酵素とも核だけでなくミトコンドリアにも存在することが確認されている。

このように、ミトコンドリアには核DNAに対するのと同等の8-oxoG変異に対する防御系が存在する。8-oxoGは変異原性があり量的にも多い代表的酸化修飾塩基であるうえ、対する修復酵素群もよく解析されているため、ミトコンドリアにおいても、非常に多くの研究者によって熱心に研究されている。しかし、大半の先天的ミトコンドリアDNA変異はAからGへのトランジション変異であり、最近開発された方法で見いだされる体細胞性の変異も大部分はトランジション変異であって、8-oxoGに起因すれば起こるはずのトランスポージョンではない。意外なことだが、8-oxoGがミトコンドリアゲノムにおけるDNA変異に対して、実際のどの程度重要な寄与をしているのかは実は現在も定かではない。また前述の修復酵素のミトコンドリアゲノム維持における生物学的意義も確立しているわけではない。今のところ、DNA修復酵素異常によるミトコンドリア機能異常例の報告もない。現在、九州大学を含め世界でこれら3つの酵素のノックアウトマウスがすでに樹立されており、その表現型の解析が待たれている。これらのノックアウトマウスの解析から、さきほどの疑問に対するある程度の解答が得られるかもしれない。

(3) ミトコンドリアゲノムの複製

すでに述べたように、ミトコンドリアDNAでコードされる電子伝達系のサブユニットは好氣的ATP産生に不可欠である。培養細胞系ではミトコンドリアDNAを失った ρ^0 細胞も特殊な環境下で生存可能であるが、個体としては、ミトコンドリアDNAの維持は生存にとって必須である。ミトコンドリアゲノムはマルチコピーで存在し、そのコピー数は細胞のエネルギー需要とおおよそ平行している。つまり細胞が要求するレベルのミトコンドリア機能を保持するためには一定のコピー数のミトコンドリアゲノムが維持される必要がある。このため、ミトコンドリアゲ

ノムの維持という場合、遺伝情報そのものの維持に加え、遺伝情報“量”の維持も考える必要がある。遺伝情報“量”の維持に、DNA複製機構が重要な役割を担うであろうことは容易に想像できる。実際、HIVの治療薬であるジドブジンにはミトコンドリアDNA複製ポリメラーゼγに対する阻害作用があり、副作用としてミトコンドリアゲノムのコピー数低下によるミオパチーを起こすことが知られている。

ミトコンドリアDNAは環状2本鎖で、2本のDNA鎖は比重の違いによって、H鎖(heavy strand)とL鎖(light strand)と名付けられている。ミトコンドリアDNAでは、それぞれのDNA鎖に複製開始点が別個に存在し、 O_H (H鎖複製開始点)と O_L (L鎖複製開始点)と呼ばれる(図1)。まず、 O_H よりL鎖を鋳型として新生H鎖が合成され、もとの親H鎖を一本鎖として遊離しながら新生H鎖の合成は進む。合成が約3分の2周進み、親H鎖上の O_L が一本鎖として露出されると、 O_L 領域がstem-loop様の2次構造をとりプライマーゼによって認識され、プライマーRNAが合成されて、新生L鎖の合成が開始される。このように、新生L鎖の合成は新生H鎖合成に依存して

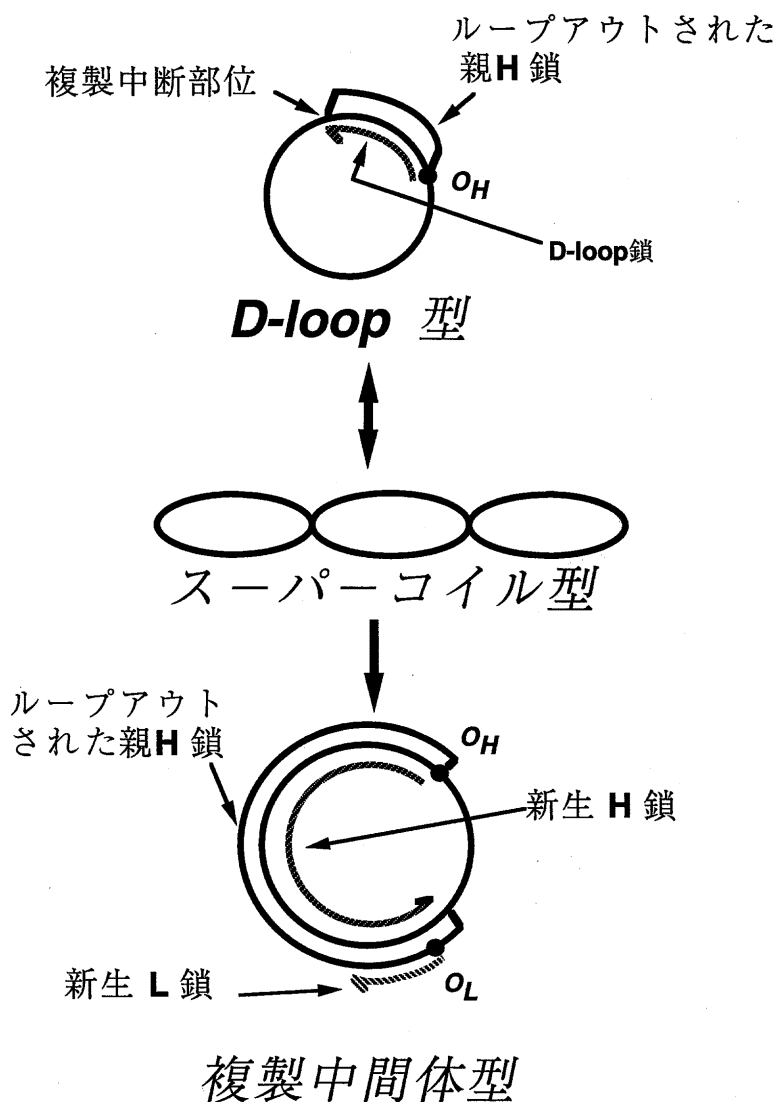


図1 ミトコンドリアゲノム複製模式図

おり、ミトコンドリア DNA 全体の複製は新生 H 鎖合成開始によって制御されていると考えられている。

ミトコンドリア DNA 複製の特徴の一つは、H 鎖の複製が転写と共役していることである。つまり、O_H 領域上流から始まる通常の転写産物が O_H 領域で安定な RNA-DNA ハイブリッドを形成し (R-ループ)、そのまま DNA 合成のプライマーとして用いられる。筆者らはこの H 鎖複製開始点を 1 ヌクレオチドの解像度で決定した²⁾。もう一つの特徴は、いったん始まった新生 H 鎖合成が高頻度に約 700 ヌクレオチド進んだところで中断し D-ループと呼ばれる 3 本鎖構造をとることである。合成中断による D-ループ構造形成の生理的意義はまだはっきりしていないが、複製量の制御の一つの機構として働かせることは確かな様である。

(4) パーキンソン病とミトコンドリアゲノム

先天的なミトコンドリアゲノム異常の体細胞性の蓄積は終末分化細胞である神経や筋に蓄積しやすく、その上これらの細胞はエネルギーをミトコンドリアに強く依存しているため、その機能異常も神経や筋に現れやすい。先天的ミトコンドリアゲノム異常疾患が脳筋症と呼ばれる所以である。ミトコンドリア DNA は障害を受けやすいため、老化にともなうミトコンドリアゲノム障害と変異の蓄積が想像されるが、その場合の標的としても神経細胞は最大の候補である。

最も頻度の高い老化性の神経変成疾患の 1 つであるパーキンソン病は黒質神経細胞の脱落によってもたらされるが、その原因としてミトコンドリア機能低下と酸化ストレスが強く疑われている。パーキンソン病患者脳のマイトコンドリア電子伝達系機能低下は数多く報告されている。脂質過酸化反応のマーカーの HNE に対する抗体による免疫染色で、パーキンソン病患者黒質神経細胞が健常対照脳組織に比べ強く染色される。同じパーキンソン病患者神経細胞でも他の神経組織では染色されないことから、パーキンソン病患者では黒質神経細胞が特に強い酸化ストレス下にあることが示唆される。8-oxoG に対する抗体で免疫染色すると、パーキンソン病患者で黒質神経細胞の細胞質が強く染色され、ミトコンドリア DNA の酸化障害が疑われる (図 2)。興味深いことに、パーキンソン病患者では hMTH1 の発現が強く誘導されており、酸化ストレスに対し神経細胞が防御性に反応しているものと思われる⁷⁾。またパーキンソン病患者黒質細胞のマイトコンドリア DNA には 5 kbp の欠失の存在頻度が対照脳に比べ有意に高いことも報告されている。

1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) は選択的に黒質細胞に蓄積し人工的にパーキンソン病様の症状を起こす。これは最もよく用いられる代表的な実験的パーキンソン病モデルである。その作用機序としてミトコンドリア電子伝達系の複合体 I を阻害し、ATP 産生を障害することが考えられていた。筆者らは、新たな MPP⁺ の作用として、MPP⁺ が核 DNA の合成は阻害せず、選択的にミトコンドリア DNA 複製を阻害することを見出した。このミトコンドリア DNA 複製阻害がミトコンドリア DNA の減少をひき起こし、ミトコンドリア機能異常をひき起こす可能性が考えられる⁵⁾。MPP⁺ はすみやかに、新生 H 鎖の喪失をひき起こし、複製開始の初期の反応に作用していると思われる。ヒト DNA ポリメラーゼ γ に対して MPP⁺ は阻害作用を示さず、新生 H 鎖の喪失は DNA 合成の阻害ではなく複製開始反応の阻害であることが示唆された。実際、MPP⁺ は複製開始の前駆体である R-ループおよび複製中間体である D-ループ構造を直接不安定化させ、新生 RNA および DNA を放出させる作用があり、これが複製阻害反応の本体であった。MPP⁺ はミトコンドリア DNA 複製に特徴的な 3 本鎖構造を不安定化するという、今まで知られていない全く新しい機構でミトコンドリア DNA の複製を阻害していることがわかった⁸⁾。

ミトコンドリアゲノムはパーキンソン患者においても実験モデルにおいても、標的の一つであるようである。

(5) 心筋とミトコンドリアゲノム

もう一つの代表的終末分化細胞であり、ミトコンドリアを豊富に含む心筋でも、当然ミトコンドリアゲノム異常は細胞機能に強く影響する。一方、ミトコンドリア機能の低下はミトコンドリアゲノムの異常を引き起こす。これに関連して Wallace らは興味深い 2 つのノックアウトマウスを作製している。ミトコンドリア型スーパーオキシド

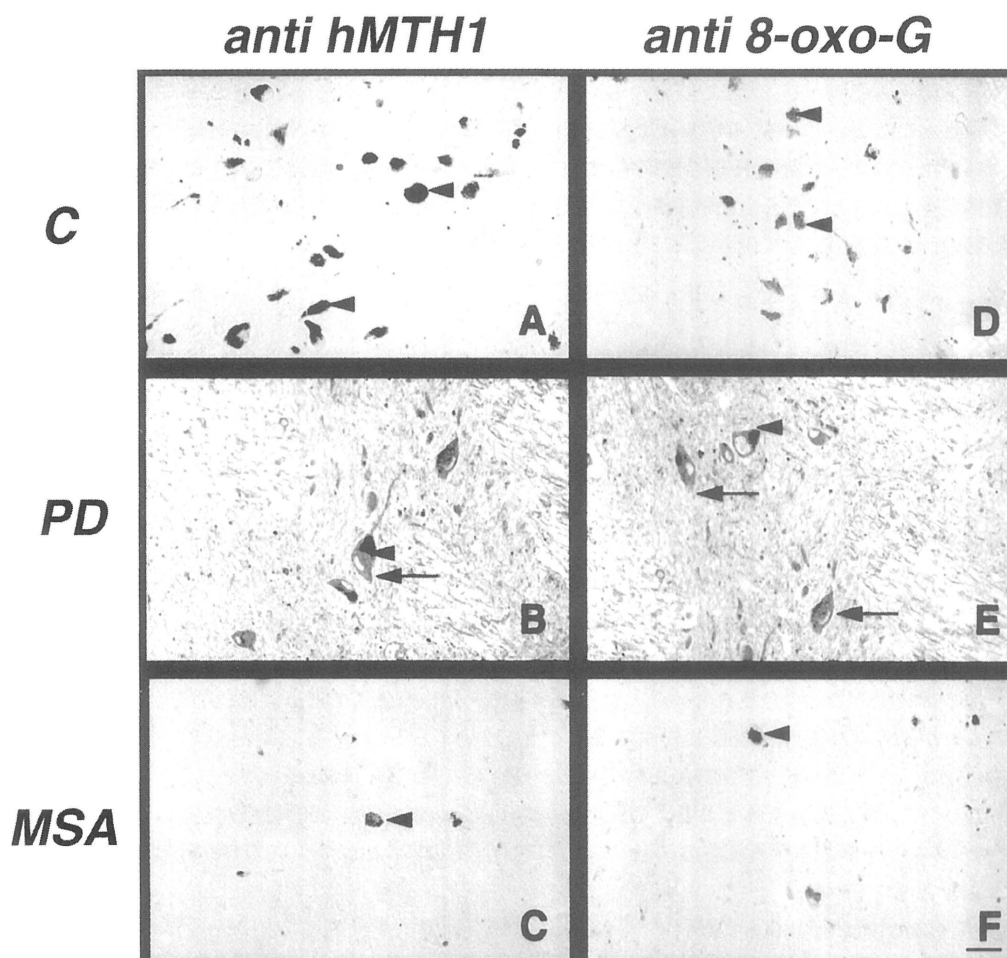


図2 パーキンソン病脳組織免疫染色

対照 C に比べパーキンソン病 PD や多発性萎縮症 MSA 患者脳では矢頭で示されるメラニン色素含有黒質神経細胞が減少している。抗 hMTH1 および抗 8-oxoG 抗体ではパーキンソン病 PD 患者脳で細胞質に染色が認められるが (B と E, 矢印), 黒質神経細胞が同様に減少している多発性萎縮症 MSA 患者脳では染色は認められない (C と F)。

ジスムターゼ (SOD) のノックアウトマウスは、生後数日で拡張型心筋症を起こし死亡する。このことは、ミトコンドリアにおいて生理的に起こっている活性酸素産生が正しく分解除去されなければいかに生体に強い毒性を示すかを如実にあらわしている。ミトコンドリアで産生された ATP を細胞質に輸送する ATP/ADP 交換輸送体のノックアウトは機能的に電子伝達系の障害を引き起こす。このノックアウトマウスは肥大型心筋症を発症するが、活性酸素産生の亢進とそれに由来するミトコンドリアゲノムの強い酸化障害が観察される。電子伝達系の機能的障害は活性酸素の産生増大を通して、ミトコンドリアゲノム障害を引き起こし、結果的にミトコンドリア電子伝達系の器質的障害に至ることが個体レベルで示される。

マウス心筋梗塞モデルでは、非梗塞部が代償的に肥大を起こすが、やがて過剰代償の結果破綻を来することが知られている。非梗塞部では活性酸素の産生増大とミトコンドリアゲノムコピー数の低下が観察される (九大循環器内科との共同研究, 投稿中)。このとき、ミトコンドリアゲノムでコードされる電子伝達系複合体活性のみが低下して

いることから、電子伝達系活性低下は活性酸素による直接的なタンパク質障害ではなく、ミトコンドリアゲノム異常に起因することが推定される。電子伝達系は正常でも活性酸素を産生しているが、代償性肥大による生理的な電子伝達系の活性上昇が活性酸素産生上昇をもたらす、それがミトコンドリアゲノム障害を引き起こして電子伝達系の器質的な障害へとつながり、それはさらなる活性酸素産生増大を引き起こすという悪循環に陥ったと想像される。このような半ば生理的な電子伝達系の活性上昇による活性酸素産生上昇でさえ、ミトコンドリアゲノム障害を引き起こすというのは驚きでもある。慢性心不全モデルにおいても心筋における酸化ストレスが観察され、それもミトコンドリア電子伝達系に依存している¹⁾。どうも過重な負担はミトコンドリアに酸化ストレスを引き起こす様である。

(6) 糖尿病とミトコンドリアゲノム

先天的ミトコンドリアゲノム異常によるいわゆるミトコンドリア脳筋症では、糖尿病を高率に併発することから、ミトコンドリアゲノム異常が糖尿病発症となんらかの関わりがあることが示唆される。膵β細胞のインスリン分泌能にミトコンドリア電子伝達系機能が深く関わっていることはよく知られている事実である。ミトコンドリアDNAのnp 3243のAからGへの変異(A 3243 G)はMELAS (mitochondrial encephalomyelopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) というミトコンドリア病の大部分の原因変異であるが、脳筋症症状を示さない糖尿病患者の1～2%にも見いだされ、全糖尿病患者の1～2%がこのミトコンドリアゲノム変異が原因ではないかと考えられている。

ミトコンドリアDNAはマルチコピーであるため、通常野生型と変異型は同一細胞内で混在しており、これをヘテロプラスミーという。ヘテロプラスミーの程度は細胞間あるいは組織間で異なり、個人によって大きく異なるのが普通である。同一細胞内でその過半のコピーが変異型に置き変わらなると細胞機能障害は出現しない。ミトコンドリアゲノムの変異は心筋や神経細胞で蓄積しやすいが、脳筋症症状を示さないA 3243 G変異をもつ糖尿病患者はこの変異が特に膵β細胞にのみで高いヘテロプラスミーを持つMELASの1亜型と言えるであろう。

A 3243 G変異の検出は集めやすい白血球を用いるのが一般的であるが、白血球は最も変異の蓄積が低い細胞の一つであり、必ずしも膵β細胞での変異の状況を反映しない。そのため、感度の低い検査法では、白血球を用いた場合変異を見逃す可能性がある。筆者らは、従来法の100倍以上の感度の0.01%のヘテロプラスミーも検出できる系を考案し、無作為に糖尿病患者のA 3243 G変異を調べた。結果は、糖尿病患者の約1～2%にしかA 3243 G変異は見つからず、この変異が関係する糖尿病はやはり全糖尿病患者の1～2%程度であろうと思われる⁹⁾。

(7) おわりに

最近ミトコンドリアゲノムの変異とがん化の関連を示唆する報告もあり、ミトコンドリアゲノムの維持の破綻は意外と多くの病態と関係しているかもしれない。すでに20年も前にその全配列が解読されたわずか16 kbpのゲノムではあるが、複製、修復、コピー数の制御といったミトコンドリアゲノム維持機構にはあまりにも未解明な部分が多い。ミトコンドリアゲノムと老化や疾患との関係を明らかにするためにも、維持機構の分子レベルでの解明がもためられている。

文 献

- 1) Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K and Takeshita A: Mitochondrial electron transport complex I is the potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 85: 357-363, 1999.
- 2) Kang D, Miyako K, Kai Y, Irie T and Takeshige K: In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 272: 15275-15279, 1997.

- 3) Kang D, Nishida J, Iyama A, Nakabeppu Y, Furuichi M, Fujiwara T, Sekiguchi M and Takeshige K: Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J Biol Chem* 270: 14659-14665, 1995.
- 4) Kang D, Takeshige K, Sekiguchi M and Singh KK: INTRODUCTION in Mitochondrial DNA Mutations in Aging, Disease and Cancer, (ed. Singh K. K), 1-15, Springer-Verlag, Berlin, 1998.
- 5) Miyako K, Kai Y, Irie T, Takeshige K and Kang D: The content of intracellular mitochondrial DNA is decreased by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (mpp+). *J Biol Chem* 272: 9605-9608, 1997.
- 6) Miyako K, Takamatsu C, Umeda S, Tajiri T, Furuichi M, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Hamasaki N, Takeshige K and Kang D: Accumulation of adenine DNA glycosylase-sensitive sites in human mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 275: 12326-12330, 2000.
- 7) Shimura-Miura H, Hattori N, Kang D, Miyako K, Nakabeppu Y and Mizuo Y: Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 46: 920-924, 1999.
- 8) Umeda S, Muta T, Ohsato T, Takamatsu C, Hamasaki N and Kang D: The D-loop structure of human mitochondrial DNA is destabilized directly by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+), a parkinsonism-causing toxin. *Eur J Biochem* 267: 200-206, 2000.
- 9) Urata M, Wakiyama M, Iwase M, Yoneda M, Kinoshita S, Hamasaki N and Kang D: New sensitive method for the detection of the A3243G mutation of human mitochondrial deoxyribonucleic acid in diabetes mellitus patients by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Clin Chem* 44: 2088-2093, 1998.