

平成20年4月2日  
筑波大学

## ミトコンドリア DNA の特殊な突然変異が がん細胞の転移能獲得の原因となることを発見

発表者 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 教授 林 純一

このたび、筑波大学大学院・生命環境科学研究科の研究グループ（研究代表者：林 純一）は千葉県がんセンター、島根大学医学部との共同研究により、ミトコンドリア DNA の特殊な病原性突然変異によってがん細胞の転移能が高くなることを明らかにしました。

ミトコンドリアは、細胞内のエネルギー工場として知られる小器官で、食物から得た栄養分と呼吸で取り入れた酸素を用いて生命の維持に必要なエネルギーとなる ATP を合成する役割を担っています。またミトコンドリアには細胞の核にある遺伝情報（核 DNA）とは別に、ミトコンドリア DNA（以下、mtDNA）と呼ばれる独自のゲノムが存在しています。

今回、ミトコンドリア呼吸酵素複合体 I の活性を低下させる病原性突然変異が mtDNA に生じることにより、ミトコンドリアの ATP 合成機能が低下するだけでなく、それに伴って生じる活性酸素種（以下、ROS）の増加によって核 DNA にコードされた幾つかの遺伝子の発現量が増加するという一連の過程を経て、最終的にがん細胞の転移能が可逆的に上昇することをマウスのがん細胞を使うことによって明らかにしました。また同じような現象がヒトのがん細胞に存在することも明らかにしました。

本研究成果の重要性は以下の 2 点にまとめられます。

- ① mtDNA の突然変異が転移能に関わっていることを証明した。これは mtDNA が ATP 合成以外の生命現象に関与することを示した初めての報告である。
- ② 野生型 mtDNA による置換や抗酸化剤の処理によって、一度獲得した転移能が可逆的に抑制されることから、mtDNA の突然変異によって誘導される転移に対する有効な治療法の開発が可能であることを証明した。

なお、これらの研究成果は 4 月 4 日付けで米科学誌サイエンスの Science Express web site に掲載される予定です。

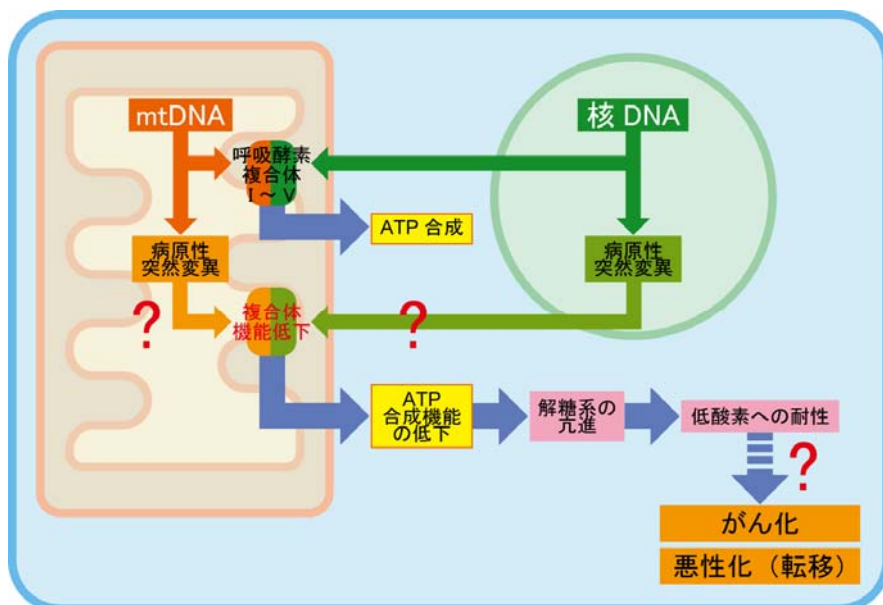
## <研究の背景>

mtDNA の突然変異は、古くからがんとの関わりが指摘されてきました。その理由は、特定の化学発がん剤が核 DNA より mtDNA に結合しやすいことや、がん組織から抽出した mtDNA には、健常組織と比較して高い割合で mtDNA に突然変異が蓄積しているからです。したがってこれまでは、mtDNA の突然変異の蓄積がミトコンドリア呼吸活性の低下と解糖系活性の上昇を誘導し、これが生体内の低酸素状態に適応できる能力の獲得につながり、その結果として細胞のがん化やがん細胞の悪性化（転移）が引き起こされるのではないかと推測されておりました（図 1 参照）。

しかし、特定の mtDNA 突然変異を有する細胞でミトコンドリアの呼吸機能になんらかの異常が認められたとしても、それだけでこの機能異常の原因がこの mtDNA 突然変異にあると断定することはできません。それは、ミトコンドリアの呼吸機能が mtDNA と核 DNA の両方にコードされた遺伝子産物によって支配を受けており、核 DNA の突然変異によってミトコンドリアの呼吸機能が低下する可能性も排除できないからです（図 1 参照）。

このように、mtDNA の突然変異とがん細胞の性質との因果関係を検証する上で、ミトコンドリアの機能に対する核 DNA の影響を排除できないことが大きな障壁となっていました。

図 1 mtDNA と核 DNA によるミトコンドリア機能の二重支配  
及び mtDNA の突然変異とがん細胞の性質に関する従来の推測



ミトコンドリアのエネルギー合成を担う呼吸酵素複合体は、mtDNA と核 DNA 両方にコードされた遺伝子産物が合わさって構成されています。このため、ミトコンドリアの呼吸機能に異常が認められても、その原因が mtDNA にあるのか核 DNA にあるのかを直ちに特定することはできません。

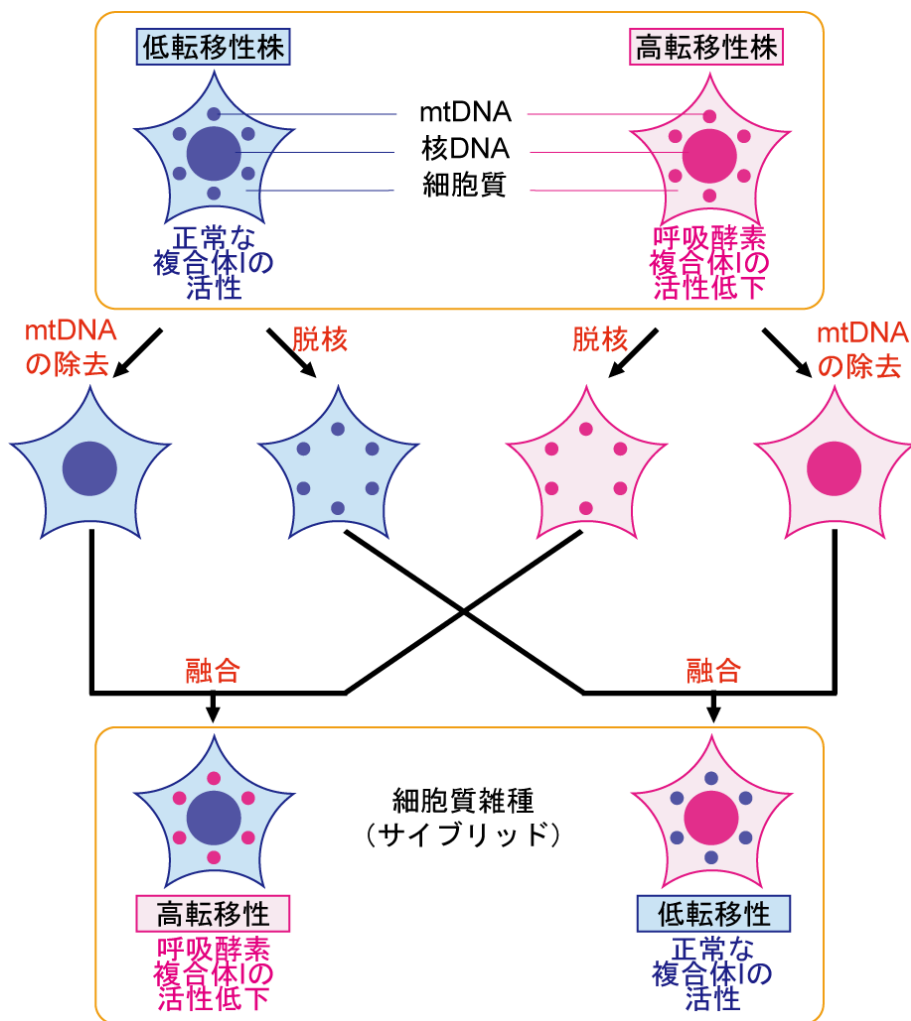
### <研究内容>

本研究では、まず同じマウス肺がん細胞株由来でありながら、高転移性と低転移性という異なる転移能を示す2種類の細胞株に注目しました。両細胞株について、ATP合成を担うミトコンドリアの呼吸酵素複合体の活性を比較したところ、高転移性の細胞でのみ、呼吸酵素複合体Iの活性が低下していることが分かりました。

この高転移性と複合体Iの活性低下が mtDNA の突然変異によるものなのか、核 DNA の突然変異によるものなのかを調べるために、細胞質移植という手法を用いて高転移性株と低転移性株の mtDNA を互いに完全に置換した細胞質雑種 (Cytoplasmic hybrids; サイブリッド) を作製しました (図2参照)。作製したサイブリッドについてその性質を比較したところ、核 DNA の由来にかかわらず、mtDNA が高転移性株由来であれば高転移性と複合体Iの活性低下が引き起こされ、mtDNA が低転移性株由来であれば低転移性と正常な複合体Iの活性が認められることが分かりました (図2参照)。

これらの結果は、今回用いたマウス肺がん細胞における転移能と複合体Iの活性が、いずれも核 DNA ではなく mtDNA によって支配されていることを意味します。

図2 細胞質移植法によるサイブリッドの作製



マウス培養細胞中の mtDNA は、特定の薬剤を長期間処理することで完全に除去することが可能です。また、細胞の核を除くことにより、細胞質のみを得ることもできます。この mtDNA を全くもたない細胞と、除核した細胞質体とを融合することによって、2つの細胞株の核 DNA と mtDNA を互いに完全に置換した細胞質雑種 (サイブリッド) を樹立することができます。サイブリッドの作製は、ミトコンドリアの機能異常の原因が mtDNA にあるのか、核 DNA にあるのかを特定する上で非常に重要な実験手法です。

高転移性株由来の mtDNA には転移能獲得と複合体 I の活性低下の原因となる何らかの突然変異が存在すると考え、高転移性株と低転移性株それぞれの mtDNA の塩基配列を解析・比較しました。その結果、高転移性株の mtDNA にのみ、13997 番目の塩基が G (グアニン) から A (アデニン) に変化する突然変異 (以下、G13997A 突然変異と表記) が見つかりました。

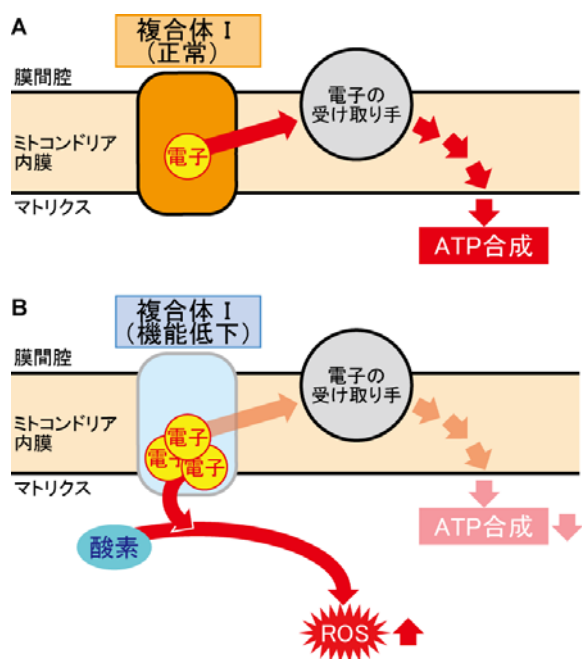
この G13997A 突然変異は、以下の 3 点の理由から今回観察された高転移性株での複合体 I の活性低下と高転移性の原因になっていると考えられます。

- (1) 低転移性株の mtDNA と高転移性株の mtDNA との間で唯一異なる突然変異である。
- (2) 複合体 I を構成するタンパク質の一つをコードする領域の突然変異で、しかもこのタンパク質のアミノ酸を変化させる
- (3) この突然変異の位置は進化的に極めて高く保存されている。

それでは、複合体 I の活性低下がどのようにして細胞の転移能に結びつくのでしょうか?—複合体 I の活性低下は ATP 合成能を抑制するだけでなく、同時に大量の ROS 発生の原因にもなります (図 3 参照)。ROS は、酸素分子に過剰な電子が結合したり、電子の配置が変わったりすることによって生じます。ミトコンドリアは酸素を消費すると同時に ATP を合成するために電子の授受が行われる場でもあり、常に一定の割合で ROS が発生しています。しかし、複合体 I の活性が低下して電子の授受の流れに不具合が生じた場合、より多くの電子がこの複合体から漏出し、ROS の量が増加する可能性が考えられるのです (図 3 参照)。

そこで、作製したサイブリッドについて ROS の量を調べたところ、高転移性株由来の mtDNA を有するサイブリッドでは低転移性株由来の mtDNA を有するサイブリッドと比較して ROS 産生量が増加していることが確かめられました。

図 3 ROS 発生源としての呼吸酵素複合体 I



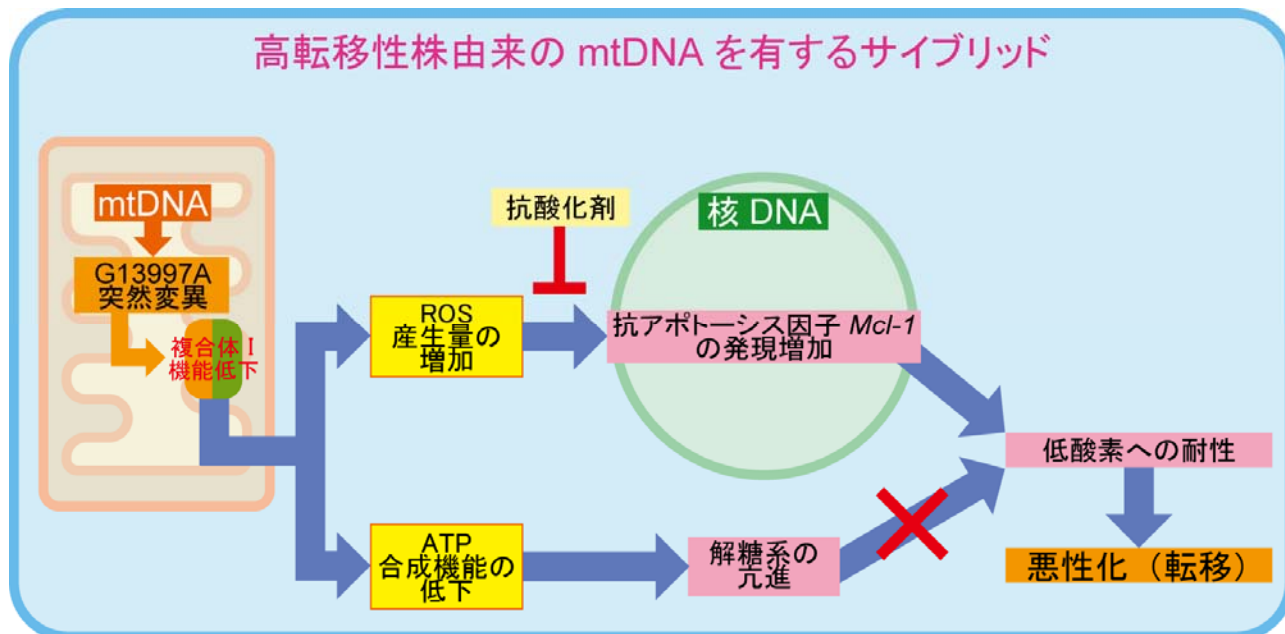
複合体 I は、ミトコンドリアの呼吸酵素複合体の中でも特に ROS の主な発生源として知られる複合体の一つです。通常は、受け取った電子を他のタンパク質へと受け渡し、それが ATP 合成につながります (A)。しかしそのはたりに不具合が生じると、受け取った電子を次に渡すことができず、ATP 産生量が減少すると同時に過剰となった電子が複合体から漏出します。この電子が酸素分子と結びつくと、活性酸素種・ROS が生じます (B)。

次に、核 DNA にコードされた転移関連遺伝子の発現量を比較しました。その結果、高転移性株由来の mtDNA を有するサイブリッドでは、核が低転移性株由来であっても、抗アポトーシス因子である *Mcl-1* の発現量が常に上昇していることが分かりました。この遺伝子のはたらきにより、低酸素条件で誘導されるアポトーシスに耐性となり、最終的に高転移性の獲得に至ると考えられます。

こうした遺伝子発現の上昇と、先に確認した ROS 産生量の増加との直接の因果関係を調べるために、サイブリッドに対する抗酸化剤の処理の効果を検証しました。高転移性株由来の mtDNA を有することで ROS 産生量が増加していたサイブリッドに抗酸化剤を処理すると、ROS 産生が抑制されると同時に、発現が上昇していた *Mcl-1* についてもその発現レベルが低下することが確認されました。さらに、この抗酸化剤処理による *Mcl-1* 発現減少が、転移能の抑制につながることも明らかになりました。これらの結果は、ROS が直接的あるいは間接的に *Mcl-1* の発現を誘導し、細胞の転移能獲得に寄与していることを意味します。それと同時に、ROS の除去によって転移能の抑制が可能であること、すなわちこの転移能は可逆的に制御可能であることを発見しました。

以上本研究によって明らかになった mtDNA の特殊な病原性突然変異に起因する転移能獲得のメカニズムは、図 4 のように模式化されます。

図 4 mtDNA の転移に起因する転移能獲得のメカニズム



ここで示した G13997A 突然変異以外にも、同様のメカニズムで細胞に転移能を誘導する mtDNA 突然変異が存在することが本研究で明らかになっています。



私たちは、**mtDNA** 置換によって **mtDNA** の突然変異が、がん細胞の転移能を誘導するというを直接的に証明することに初めて成功しました。今回は、主にマウスの肺がん細胞を用いてこのメカニズムを解明しましたが、さらに肺がん以外のマウスがん細胞株やヒトのがん細胞株でも同様のメカニズムで転移能獲得に至るということも明らかにしています。がん細胞が悪性化し、転移能を獲得するまでのメカニズムは複雑で、さまざまな要因が考えられますが、今回はその要因の一つを解明したと言えます。したがって、これによって **mtDNA** が **ATP** 合成以外の生命現象にも関与することを初めて明らかにしたことになります。

さらに、私たちは **mtDNA** の突然変異に起因する転移能獲得には **ROS** の介在が重要であること、またその **ROS** を除去することで最終的に転移能の抑制が可能であることも示しました。この成果は、あるがん細胞が潜在的に転移能を獲得しやすいか否かを診断する手法や、今回明らかになったメカニズムによって悪性化しつつあるがん細胞の転移抑制に向けた治療法の開発などにつながると期待されます。