

## プロジェクト名：寿命に関わるミトコンドリアゲノムの不安定化機構の解明

プロジェクト代表者：畠山 晋（科学分析支援センター・講師）

## 1 研究の目的

アカパンカビのような糸状菌は栄養が十分である場合には、数年間にわたって菌糸を伸ばし続けることができる。ところがアカパンカビの変異株の中には、わずかに3週間ほどで成長を停止し、たちどころに寿命を迎えるものがある。この寿命の原因は、生存において重要な役割を有する細胞内の小器官・ミトコンドリアの異常によるものであった。本研究では、ミトコンドリアの異常が生じるメカニズムについて、現在当研究室にて所有する3つの短寿命変異株の性質、およびこれらの原因遺伝子のコードするタンパク質と会合するタンパク質などについて、遺伝学的、分子生物学的なアプローチにより明らかにすることを試みる。

## 2 研究の経過

## 1) 変異株Aは早期に寿命をむかえる

変異株Aは、MMSに対して感受性を示す株として単離されたが、植継ぎの回数に制限があるという特殊な性質を有していた。このことを定量的に評価するために、レースチューブを用いて菌糸の伸長に限界があるかどうかを解析した。その結果、アカパンカビの野生株が数年以上にわたって菌糸成長が可能である性質を有していることに対して、変異株Aは3週間程度で菌糸成長が停止することが観察された（図1）。

菌糸成長の停止、すなわち寿命に関与する生体内の因子には、テロメアや染色体内への異常の蓄積、ミトコンドリアの不全など、さまざまな原因が考えられる。われわれは早期に菌糸の伸長が停止することに関して、ミトコンドリアの形状との関連を観察することにした。アカパンカビの菌糸を寒天培地上で培養しつつ、ミトコンドリアを特異的に蛍光染色したものが図2である。野生型の菌糸は、糸状のミトコンドリアが観察されるのに対して、変異株Aではミトコンドリアの断片化が起こっていることが観察された。さらに、経時的にミトコンドリアのゲノムを抽出して、その大きさを確認したところ、変異株Aにおいては、菌糸の生育とともにゲノムの一部が欠失することが明らかとなった。

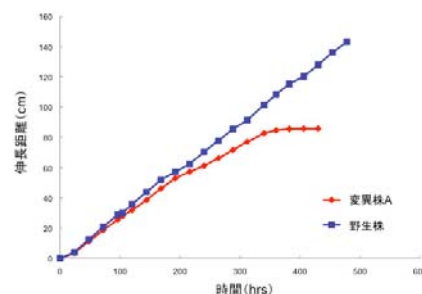


図1. 変異株Aは早期に菌糸成長を停止する

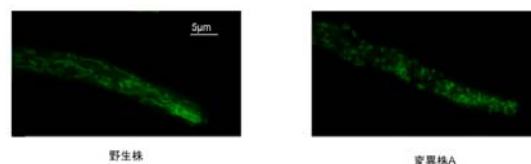


図2. 変異株Aはミトコンドリアの形状に異常を示す

## 2) 変異株Aの原因遺伝子をコードするタンパク質は細胞質に局在する

変異株Aは、第7連鎖群右腕の *met-7* 遺伝子の右 2.4~2.5%、*wc-1* 遺伝子の左 0.9~1.6%の位置に遺伝学的にマッピングされた。さらにこの株のMMS感受性を指標として、コスミドライブラリーを探索した結果、この変異を相補する遺伝子を同定することができた。この遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列をもとに、ゲノムデータベースを探索したところ、これが新規のタンパク質であることを示唆していた。変異株Aの原因遺伝子をコードするタンパク質の細胞内の局在を明らかにするために、ヒスチジンタグを付加した融合タンパク質を大腸菌にて発現した。この大腸菌の溶解画分（疎水性が高い画分を尿素によって可溶化した）より精製した融合タンパク質を抗原として、ウサギに免疫注射し、ポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて、アカパンカビの菌糸の細胞質画分、ミトコンドリア画分のタンパク質についてのウェスタン

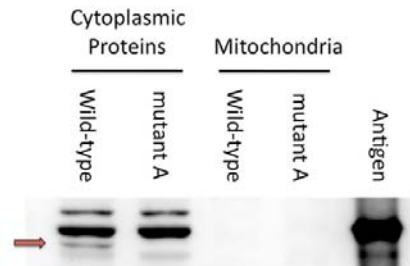


図3. 変異株Aの原因遺伝子をコードするタンパク質の局在

ブロッキングを行なった。その結果、図3に示すように、野生株の細胞質画分においてのみ、このタンパク質の局在が示された。この遺伝子がコードするタンパク質は、変異株Aの性質（短寿命、ミトコンドリア異常）から、ミトコンドリアに局在することが推測されるにも拘らず、ウェスタンブロッキングの結果は、このタンパク質がミトコンドリアには局在しておらず、細胞質に局在していた。我々はこの矛盾を解明するために、このタンパク質と蛍光タンパク質との融合タンパク質を遺伝子工学的手法により、アカパンカビの菌糸内で発現することを試み、蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、このタンパク質はミトコンドリアと共局在することを示すことができた（データは示していない）。図3の結果も併せて考察すると、このタンパク質はミトコンドリアの内部ではなく、外部の細胞質側、すなわちミトコンドリアの表面に局在していることが予想される。

## 3) 今後の解析

変異株Aの原因遺伝子をコードするタンパク質とミトコンドリアの形状に関わる他のタンパク質との物理的な会合を明らかにする。そのために、タグを付加したタンパク質によって細胞内の会合を明らかにする。これにより、ミトコンドリアの形態の異常と短寿命の引き金となる現象の一端が明らかになることが期待される。

さらに我々は他に2つの短寿命変異株についても独自の手法によってクローニングを試みている。このうち、1つの変異株について、この異常を相補するDNA断片のクローニングがほぼ完了した。この遺伝子は機能が未知の新規の遺伝子である。この遺伝子の機能についての解析を今後継続して行なう。もう一つの変異株についても、遺伝子が存在する領域がかなり絞り込めた。よって遺伝子のクローニング完了に近づいている。

本研究を継続し、ミトコンドリアの異常を防ぐ機構が解明されることは、真核生物のミトコンドリア異常による様々な問題（短寿命、ミトコンドリア病など）に対して有益な知見を与えることが出来ると考えられる。