

氏名	ELLIOT C. BRADSHAW		
博士の専攻分野の名称	博士（理学）		
学位記号番号	博理工甲第 1092 号		
学位授与年月日	平成 30 年 9 月 21 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Regulation of deleted mtDNA heteroplasmy in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母において欠失変異ミトコンドリア DNA のヘテロプラスミー状態を制御する機構に関する研究)		
論文審査委員	委員長	連携教授	吉田 稔
	委員	教授	田中 秀逸
	委員	連携教授	眞貝 洋一
	委員	連携教授	鈴木 匡

論文の内容の要旨

Chapter 1: Introduction

Mitochondria contain mtDNA, a genomic unit that exists in multiple copies per cell and encodes genes essential for mitochondrial ATP production. Therefore, faithful replication and maintenance of mtDNA are crucial for cellular respiratory function. MtDNA can incur damage resulting in point-mutations or deletions. Deletion mutations can result in molecules up to several kilobases shorter than wild-type mtDNA and are especially hazardous, as small mtDNA have the potential to replicate faster than wild-type molecules. This replicative advantage can lead to clonal expansion until the proportion of small mtDNA reaches a high level causing mitochondrial dysfunction. Clonal expansion of small mtDNA has been observed in several organisms and, in human tissues the proportion of small mtDNA can increase with age. Therefore, understanding of the mechanisms driving deleted mtDNA mutagenesis and its replicative advantage may hold important clues for treating mitochondrial disease.

In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, mtDNA is packaged into nucleoprotein structures termed nucleoids and is replicated predominantly through recombination following the generation and processing of mtDNA double-stranded breaks. Crosses of two parental strains containing distinct mtDNAs produces a transient state of heteroplasmy that persists for fewer than 20 generations. Suppressiveness is a phenotype that occurs when a parental strain containing wild-type mtDNA (ρ^+) is crossed with another parental strain containing a small mtDNA (ρ^-) containing an origin of replication (*ori*) sequence. In these crosses, only a fraction of the resulting diploid cells possess mitochondrial respiratory function. In hypersuppressive crosses, the proportion of diploid ρ^+ cells is typically less than 5%, due to the strong replicative advantage small mtDNA. Monitoring the loss or gain of respiratory function in yeast therefore provides a rapid and convenient way to obtain clues about the genetic mechanisms of mitochondrial DNA replication and inheritance. Using budding yeast, we describe three mechanisms affecting mtDNA deletion mutagenesis, regulation of heteroplasmy among ρ^+ and ρ^- mtDNA, and the vegetative segregation of mtDNA heteroplasmy towards ρ^+ and ρ^- homoplasmy.

Chapter 2: Regulation of small mitochondrial DNA replicative advantage by ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*

Ribonucleotide reductase (RNR) catalyzes the rate-limiting step in the synthesis of dNTPs, the building blocks of DNA. In *S. cerevisiae*, RNR consists of a large Rnr1-Rnr1 subunit containing the catalytic and allosteric sites, and a small Rnr2-Rnr4 subunit containing the diferric tyrosyl radical cofactor required for the reduction of NDPs to dNDPs. The Mec1/Rad53 nuclear checkpoint was the first pathway discovered to modulate mtDNA copy number, and regulation of RNR activity is an endpoint of this pathway. To investigate effects on mtDNA heteroplasmy, we performed hypersuppressive crossing experiments using several mutant parental strains, including the $\Delta sml1$ background. SML1 encodes a protein inhibitor of RNR that binds and prevents Rnr1 homodimerization. Importantly, Sml1 is degraded in response to DNA damage by checkpoint activation.

In crosses of ρ^+ and HS $\rho^- \Delta sml1$ mutants, we found that the proportional amount of ρ^+ mtDNA and ρ^+ colonies was significantly increased in the resulting diploid cells, suggesting that RNR activity has an important role in the behavior of suppressive mtDNA. To confirm, we cloned and overexpressed RNR1, a known method for increasing cellular dNTP levels. Consistent with $\Delta sml1$ crosses, RNR1 overexpression also yielded a significantly higher amount of ρ^+ mtDNA and ρ^+ colonies, suggesting that increasing cellular dNTP levels improves the ability of large ρ^+ mtDNA to replicate, even in the presence of HS ρ^- mtDNA. We then used an *in vitro* PCR experiment to examine the competitive amplification of small versus large DNA templates at a dNTP concentration range of 0 ~ 20 μ M, reflecting mitochondrial dNTP concentrations in mammalian cells. At 2.5 μ M, the lowest dNTP concentration we tested, we found that the small template was almost exclusively amplified, while higher dNTP concentrations allowed for amplification of both templates. Together, these data support a model wherein RNR activity is inversely proportional to small mtDNA replicative advantage.

Chapter 3: Prevention of mitochondrial DNA instability in *Saccharomyces cerevisiae* by the mitochondrial recombinase Mhr1

MtDNA fragmentation or loss can lead to mitochondrial dysfunction or disease. MHR1 encodes a mitochondrial DNA recombinase that promotes homologous mtDNA pairing, and is required for replication and maintenance of ρ^+ mtDNA, as $\Delta mhr1$ cells completely lose respiratory function. The mitochondrial histone-like protein Abf2 is a key component of the mitochondrial nucleoid and binds to mtDNA via two HMG domains. Abf2 is required for mtDNA stability during non-selective growth in fermentable media, but is dispensable for mtDNA stability and replication in non-fermentable media. Aside from a key role for Mhr1 in mtDNA replication, we hypothesized that the recombination function of Mhr1 may prevent mtDNA instability as well.

We examined the phenotypes of $\Delta abf2$ and $\Delta abf2 mhr1-1$ mutant cells, which can partially or completely lose respiratory function when shifted to fermentable media. Visualization of mitochondrial nucleoids by DAPI staining revealed that the number of mitochondrial nucleoids generally decreases in glucose media compared to glycerol, however $\Delta abf2 mhr1-1$ double-mutant cells displayed the lowest number of nucleoids and in glucose media and some cells lacked DAPI signals altogether. Using an established suppressivity assay and Southern blot analysis, we determined that mtDNA fragmentation occurs in $\rho^- \Delta abf2$ cells, while $\rho^- \Delta abf2 mhr1-1$ cells displayed a higher degree of mtDNA fragmentation or complete mtDNA loss, suggesting a protective role for Mhr1. For further examination, we cloned and overexpressed MHR1 on a high-copy plasmid in $\Delta abf2 mhr1-1$ cells. Surprisingly, overexpression of MHR1 partially rescued loss of respiratory function in $\Delta abf2 mhr1-1$ double-mutant cells under a specific condition

in fermentable media, compared to cells containing an empty vector. Consistent with a previous report in which we showed that increased Mhr1 protein level promotes repair of mtDNA double-stranded breaks, these results indicate that Mhr1-mediated recombination may prevent mtDNA deletion mutagenesis.

Chapter 4: Influence of cytosolic pH on small mitochondrial DNA heteroplasmy in *Saccharomyces cerevisiae*

Glucose is the preferred carbon source of budding yeast and its depletion from media results in a metabolic change known as the diauxic shift, which is characterized by vast changes to the transcriptional landscape. Glucose depletion also causes a drop in cytosolic pH partially due to the disassembly of V-ATPase, which pumps H⁺ ions into the vacuole. We hypothesized that cytosolic acidification may act as a signal affecting mtDNA heteroplasmy. To examine this possibility, we crossed parental ρ⁺ and HS ρ⁻ cells and monitored changes to mtDNA heteroplasmy as the percentage of ρ⁺ colonies produced over several generations of vegetative growth after crossing. We transferred initially heteroplasmic cells into diploid selection media containing 0.5%, 2% or 4% glucose and observed that 0.5% glucose led to a high proportion of ρ⁺ colonies after approximately 25 generations of vegetative growth, while 4% glucose cultures remained largely ρ⁻.

Next, we expressed superecliptic pHluorin, a pH-sensitive GFP variant that increases in ratiometric fluorescence with increasing pH, in the cytosol of yeast and observed that the cytosolic pH of 0.5% glucose-cultivated heteroplasmic diploid cells underwent an early decrease to below pH 6.5 after 24 hours of cultivation. On the other hand, 4% glucose-cultivated cells maintained a constantly high pH of around 7.4. In addition, 0.5% glucose media buffered with Tris-HCl to pH 7.3 or PIPES to pH 7.1 did not show the same increased production of ρ⁺ colonies as unbuffered, Tris-HCl pH 5.6 or PIPES pH 6.1-buffered media, indicating that segregation towards the ρ⁺ phenotype upon glucose depletion requires cytosolic acidification. Finally, quantitative analysis of the ρ⁺ and HS ρ⁻ mtDNA levels of cells cultivated approximately 25 generations in 0.5% glucose with Tris-HCl at pH 5.6 compared to pH 7.3 media confirmed that a significant increase in the relative level of ρ⁺ mtDNA occurred in the pH 5.6 culture.

Mhr1-mediated mtDNA replication in *S. cerevisiae* is responsible for rapid segregation of mtDNA from heteroplasmy to homoplasmy, typically within 10 generations. Cytosolic pH may therefore affect mtDNA segregation, as cytosolic pH level appears causally connected to formation of homoplasmy for ρ⁺ or ρ⁻ mtDNA at low or high pH, respectively.

Chapter 5: Conclusion

MtDNA deletions threaten mitochondrial respiratory function and may increase in proportion to wild-type mtDNA due to the replicative advantage of small replicons. This study reveals three findings about mtDNA deletion mutagenesis and heteroplasmy:

- The activity of ribonucleotide reductase, which controls the dNTP supply within cells, effectively regulates the ability of large, wild-type mtDNA to replicate during heteroplasmy with small, hypersuppressive mtDNA due to the selfish characteristic of small mtDNA at low dNTP concentrations.
- Loss of Abf2 or Mhr1 causes mtDNA deletion mutagenesis and *MHR1* complementation in $\Delta abf2 mhr1-1$ double-mutants can partially rescue mtDNA deletion or loss in cells that rapidly lose respiratory function. This result indicates that Mhr1 function protects against the formation of mtDNA deletions.
- In heteroplasmic cells containing mixtures of wild-type and small, hypersuppressive mtDNA, cytosolic pH has an important influence on the vegetative segregation of mtDNA alleles toward ρ⁺ or ρ⁻ mtDNA homoplasmy in subsequent generations.

論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成 30 年 7 月 6 日（金）14：00～16：00 に埼玉大学工学部講義棟 1 階演習室 2 番で論文発表会を開催した。審査結果の概要は以下の通りである。

本学位論文は出芽酵母におけるミトコンドリア DNA (mtDNA) のヘテロプラスミー状態（野生型と変異型が共存する状態）の制御機構に関する研究の成果を中心にまとめたものであり、序論を含めて以下の 5 章からなっている。

第 1 章序論では、野生型 mtDNA に対して優勢に複製してヘテロプラスミーを形成する欠失型変異 mtDNA の超抑圧性 mtDNA 複製 (hypersuppressiveness) の定義、研究の背景、および本研究の意義を解説している。野生型 mtDNA から数キロベースペア (kb) の脱落によって生じた欠失型変異 mtDNA は、その小さなサイズゆえに野生型 mtDNA に対して複製の優位性をもつ。この小さい欠失型変異 mtDNA 断片の割合が細胞内において顕著に増加する現象は多くの生物において見られ、ヒトの組織においては、加齢と共に増加するなどの知見が紹介されている。その上で、欠失型変異 mtDNA の誘発機構とその優位複製機構を解明するという本研究の目的と、老化防止やミトコンドリア病発症機構の理解や治療に重要であるという本研究の意義について述べている。

第 2 章では、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) において DNA 合成に必要な NDPs から dNDPs への還元を担うリボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) が欠失型変異 mtDNA の優位複製を抑制するという発見について述べている。DNA 複製の根幹となる dNTP 合成反応の律速段階で働く RNR は、活性部位とアロステリック調節部位を持ち、RNR1-RNR1 と呼ばれるラージサブユニットホモ 2 量体と必要な補助因子を含む Rnr2-Rnr4 と呼ばれるスモールサブユニットヘテロ 2 量体から構成される。Sml1 は RNR1-RNR1 のホモ 2 量体形成を阻止することで RNR の活性を阻害するタンパク質である。これまで超抑圧性 mtDNA 複製に対する RNR 活性の影響については不明であったが、本論文において、超抑圧性複製を示す欠失型変異 mtDNA (HS ρ^- の 1 倍体に Sml1 の遺伝子破壊を導入した株 (HS $\rho^- \Delta sml1$) と野生型 mtDNA をもつ ρ^+ 株の 1 倍体との掛け合わせから生じた 2 倍体を解析し、RNR の阻害タンパク質である Sml1 の欠失によって正常な呼吸能を持つ ρ^+ の割合が顕著に増加することを見いだしている。また、RNR 遺伝子を大量発現させて dNTP レベルを高めた場合にも、やはり ρ^+ の 2 倍体子孫の割合が増えることを示した。これらの結果から、細胞内の dNTP の量が超抑圧性 mtDNA 複製に大きな影響を与えることが示唆された。そこで試験管内で長さの異なる DNA を混合し、それをテンプレートとした PCR によって dNTP 存在下の DNA 増幅効率を調べたところ、dNTP 濃度が低い場合、短い DNA が優先的に増幅される一方、dNTP 濃度が高い場合には、両方のテンプレート DNA が同様に増幅されることが明らかになった。これらの結果は高濃度の dNTP が短いテンプレート DNA の優先的な複製を抑制するという掛け合わせ実験の結果を支持するものであった。

第 3 章では、出芽酵母 mtDNA の安定性における mtDNA 相同組換え酵素 Mhr1 の役割について解析している。相同 DNA 対合を促進する Mhr1 は、mtDNA の複製と維持に必要なミトコンドリアの組換え酵素であり、酵母の呼吸機能維持に必須である。一方、ミトコンドリアのヒストン様タンパク質 Abf2 は、ミトコンドリアのヌクレオイドの構成成分であり、発酵性炭素源培地で生育する出芽酵母 mtDNA の複製と安定

維持に必要である。発酵性炭素源培地で培養した *abf2* 単独破壊変異株 ($\Delta abf2$) は、グリセロールのような非発酵性炭素源培地で培養した場合と比較して部分的に呼吸機能を失うのに対し、 $\Delta abf2$ と *mhr1-1* の2重変異株 ($\Delta abf2 mhr1-1$) は、呼吸機能を完全に失っていた。DAPI 染色及びサザンブロット解析等によって、 $\Delta abf2 mhr1-1$ 株ではヌクレオイドの減少と mtDNA の完全な消失が観察された。一方、特定の培養条件において $\Delta abf2 mhr1-1$ 株に Mhr1 を大量発現させると、欠失型変異 mtDNA の生成と mtDNA の消失が抑制され、呼吸能が回復した。これらのことから、Mhr1 は mtDNA の2本鎖切断を修復し、mtDNA の欠失変異を抑制することが示唆された。

第4章では、出芽酵母における欠失型変異 mtDNA のヘテロプラスミー化に対する細胞質 pH の影響を検討している。発酵性炭素源であるグルコースが枯渇すると、 H^+ を液胞に輸送する V-ATPase 複合体が解離し、細胞質に H^+ が蓄積して pH が低下する。そこで、この細胞質 pH の低下がグルコースの枯渇による mtDNA のヘテロプラスミー化を制御する可能性を調べたところ、超抑圧性複製を示す欠失型変異 mtDNA ($HS \rho^-$) 株と野生型 (ρ^+) 株との接合によって生じたヘテロプラスミー細胞は、培地中のグルコース濃度が高くなればなるほど ρ^- になって呼吸機能を失うことがわかった。このとき、pH 感受性の GFP 変異タンパク質 (pHluorin) を pH センサーとして発現させたところ、培地中のグルコース濃度が高ければ高いほど、細胞質の pH は高いままであることが明らかになった。このことから、欠失型変異 mtDNA のヘテロプラスミーの状態からホモプラスミーへの移行には、細胞質 pH が関与することが示唆された。

第5章は本研究の総括であり、これまで得られた研究成果を総合して欠失型変異 mtDNA によるヘテロプラスミー状態のホモプラスミーへの移行の制御機構について議論している。すなわち、本研究によって欠失型変異 mtDNA の優位複製の制御に関する以下の3つの新しい知見が得られた。

- 1) 欠失型変異 mtDNA と野生型 mtDNA からなるヘテロプラスミー状態において、細胞内 dNTP 濃度を調節するリボヌクレオチドレダクターゼ活性が欠失型変異 mtDNA に比べてサイズの大きな野生型 mtDNA の複製効率を決定していること。
- 2) mtDNA 相同組換え酵素 Mhr1 は、mtDNA 修復と複製を促進することにより、Abf2 を持たない細胞において見られる mtDNA の欠失と消失を防いでいること。
- 3) 細胞質の pH が欠失型変異 mtDNA の優位複製によるホモプラスミー化に影響を与えること。

これらの新しい知見に基づき、mtDNA の複製機構と異常 mtDNA の蓄積の関連について議論し、今後の研究の方向性を考察している。

以上、本論文は、老化やミトコンドリア病発症と関連する欠失型変異 mtDNA の誘発機構とその優位複製機構の一部を明らかにしたものであり、依然として全貌が明らかでないミトコンドリアの複製と機能の制御機構を解明する一助となることが大いに期待される。

本研究の成果は査読制のある国際誌に論文 (筆頭著者) として掲載されている。よって本審査員一同は、本論文が博士 (理学) の学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格と認めた。