

氏名	吉谷 綾子		
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 672 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 24 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	Transcriptional regulation of DIN7, a mitochondrial nuclease gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ミトコンドリアヌクレアーゼ遺伝子 DIN7 の転写調節機構の解明とその意義)		
論文審査委員	委員長	客員教授	吉田 稔
	委員	教授	松本 幸次
	委員	准教授	田中 秀逸
	委員	客員教授	長田 裕之

## 論文の内容の要旨

### 序論

出芽酵母のミトコンドリア DNA (mtDNA) は塩基除去修復酵素である Ntg1 が mtDNA 複製開始点で二本鎖切断を導入し、相同 DNA 対合活性をもつ Mhr1 により相同組換えに依存したローリングサークル型複製が開始され、mtDNA モノマーが直線上に連なるコンカテマーを形成する。また、ミトコンドリアの機能を正常に保つためには多コピーで存在する mtDNA がすべて同じ塩基配列の状態であるホモプラスミーになることが必要だが、コンカテマーはホモプラスミー形成の中間体としても重要である。

Mhr1 による相同組換えの過程で二本鎖切断末端のプロセッシングを行うのは、XPG ファミリーに属するヌクレアーゼで唯一ミトコンドリアに局在する Din7 ではないかと考え、Din7 を過剰発現させて mtDNA 複製に影響を与えるか調べた。その結果、mtDNA 複製開始点における二本鎖切断及び mtDNA コピー数が Mhr1 依存的に増加することがわかった。また、DIN7 はヒドロキシウレア (HU) によって発現が誘導されることが知られているが、HU による Din7 の発現誘導時においても mtDNA コピー数の増加がみられた。そこで私は、DIN7 の転写調節は mtDNA 複製に影響するのではないかと考え、DIN7 の転写調節機構について研究を行った。

### 結果と考察

#### 1. DIN7 の転写調節に関わる cis-element の同定

##### 1-1) NTG1 プロモーターと相同性をもつ 19-bp の解析

mtDNA 代謝に関わる遺伝子群の中で、ストレスによって発現が誘導されることが知られているのは DIN7 と NTG1 だけである。そこで、この 2 つの遺伝子には共通の転写調節機構があるのではないかと考え、DIN7 と NTG1 のプロモーターアライメントを行った結果、DIN7 と NTG1 のプロモーターに高い相同性をもつ 19-bp が存在することがわかった。この配列が DIN7 の発現に関与しているか  $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイを行って調べたところ、19-bp を欠損させると HU による DIN7 の発現誘導が著しく

減少した。また、リアルタイム PCR により、DIN7 プロモーターの 19-bp 破壊株では HU 誘導時における内在性 DIN7 の mRNA 転写量が減少することがわかった。さらに、LEU2 遺伝子の basal promoter の 5' 末端に 19-bp を縦列に挿入した人工プロモーターを作成して  $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイを行ったところ、リピート数の増加に応じて HU による発現誘導が著しく増加した。以上の結果から、19-bp は DIN7 の HU によるストレス誘導時において、cis-element として機能していることが示唆された。また、19-bp に結合する転写因子が存在するか調べるために Electrophoresis Mobility Shift Assay(EMSA)を行ったところ、HU によるストレス誘導において 19-bp 特異的に結合する転写因子の存在が示唆された。現在、この転写因子の同定を試みている。

#### 1-2) デカマーコンセンサスシーケンスと一致する 7-bp の解析

核ゲノムの DNA 代謝に関与する遺伝子群のプロモーターに、デカマーコンセンサスシーケンスが存在する。この配列は一部の遺伝子のプロモーターでは Upstream Repressing Sequence (URS) として機能するが、DIN7 と同じ XPG ファミリーに属するヌクレアーゼをコードする RAD2 のプロモーターでは Upstream Activating Sequence (UAS) として機能することが知られている。DIN7 プロモーターにもデカマーコンセンサスシーケンスと一致する 7-bp が存在するため、この配列が cis-element として機能しているか調べたところ、7-bp を欠損させると HU による DIN7 の発現誘導が著しく減少した。ところが興味深いことに、LEU2 遺伝子の basal promoter を用いた人工プロモーター実験では、リピート数に関わらず DIN7 の発現量に影響がみられなかった。以上の結果から、7-bp は HU による DIN7 の発現誘導における cis-element として必要ではあるが十分ではないことが示唆された。

## 2. ミトコンドリアにおける DIN7 の転写調節の役割

Din7 を過剰発現すると mtDNA 変異が増加することが知られている。そこで、 $\Delta$  din7 破壊株と 19-bp 破壊株を用いて調べたところ、これらの株でも mtDNA 変異が増加した。以上のことから、Din7 は多すぎても少なすぎてもミトコンドリアにダメージを与えるため、その発現量は厳密に制御されていると考えられる。また、19-bp は DIN7 の転写調節を通して mtDNA 修復に関与することが示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

学位論文審査委員会は、平成 20 年 1 月 29 日（火）14:30～15:30 に埼玉大学理学部 3 号館（2 階）第三会議室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。

核染色体およびミトコンドリアゲノムへの DNA 損傷を修復することは、生物が様々な細胞機能を正常に保つために不可欠である。核 DNA と同様にミトコンドリア DNA (mtDNA) も酸化的リン酸化を通して細胞に ATP を供給するのに働く蛋白質群をコードしており、mtDNA 変異と老化やミトコンドリア病などの関連性が報告されている。近年では、様々な損傷要因によって引き起こされる mtDNA 変異が、ミトコンドリア病だけでなくアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患、糖尿病、心疾患や老化などを引き起こす一因であると指摘されている。そのため、ストレスに応答する mtDNA 代謝に関わる遺伝子群が転写レベルでどのように発現調節されるのかを理解することは、極めて重要であると考えられる。本論文は、出芽酵母を用いて mtDNA 代謝に関わるストレス応答性遺伝子 *DIN7* の転写調節機構の解明に取り組んだものである。mtDNA 代謝に関わるストレス応答性遺伝子の転写調節を詳細に解析した研究は今までに例がなく、本研究の意義は極めて大きいと考えられる。

本研究では、mtDNA 代謝に関わる遺伝子群の中でストレスによって発現が誘導されることが知られている *DIN7* と *NTG1* に着目し、プロモーターアライメントを行って高い相同性をもつ 19-bp を見出した。この配列が *DIN7* の発現に関与しているかどうかを  $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイを行って調べたところ、19-bp を欠損させるとヒドロキシウレア (HU) による *DIN7* の発現誘導が著しく減少した。また、リアルタイム PCR により、*DIN7* プロモーターの 19-bp 破壊株では HU 誘導時における内在性 *DIN7* の mRNA 転写量が減少することがわかった。さらに、*LEU2* 遺伝子の basal promoter の上流に 19-bp を縦列に挿入した人工プロモーターを作成して  $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイを行ったところ、リピート数の増加に応じて HU による発現誘導が著しく増加した。以上の結果から、*DIN7* の HU によるストレス誘導時において、19-bp は cis-acting element として機能していることが示唆された。また、Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) を行い、HU によるストレス誘導において 19-bp 特異的に結合する転写因子の存在を明らかにした。さらに、*Din7* を過剰発現すると mtDNA 変異が増加することが知られていたため、 $\Delta din7$  破壊株と 19-bp 破壊株を用いて調べたところ、これらの株でも mtDNA 変異が増加した。以上のことから、*Din7* は多すぎても少なすぎてもミトコンドリアにダメージを与えるため、その発現量は厳密に制御されていると考えられる。また、19-bp は *DIN7* の転写調節を通して mtDNA 修復に関与することが示唆された。

さらに、本研究では 19-bp 以外の cis-element についても検討している。核ゲノムの DNA 代謝に関与する遺伝子群のプロモーターにデカマーコンセンサスシーケンスが存在することが知られているが、*DIN7* プロモーターにもデカマーコンセンサスシーケンスと一致する 7-bp が存在するため cis-element として機能しているかどうかを調べたところ、7-bp を欠損させると HU による *DIN7* の発現誘導が著しく減少することがわかった。ところが、*LEU2* 遺伝子の basal promoter を用いた人工プロモーター実験では、リピート数に関わらず *DIN7* の発現量に影響がみられなかった。以上の結果から、7-bp は HU による *DIN7* の発現誘導における cis-element として必要ではあるが十分ではないことが示唆された。これらの成果の一部はすでに Biochemical and Biophysical Research Communications 誌に掲載されている。

また、本研究では *DIN7* の転写抑制についても詳細な検討を行っている。DNA 損傷チェックポイント因子の 1 つである *Dun1* の破壊株では、*DIN7* の発現量が増加することが報告されていたため  $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイを行ったところ、ストレスのない条件下では *dun1* 破壊株における *DIN7* の発現量が野生株

と比較して増加することが確認された。一方、HU によるストレス条件下では野生株と *dun1* 破壊株に差は見られなかった。また、リアルタイム PCR でも同様の結果が得られた。以上の結果から、Dun1 はストレスのない条件下では *DIN7* の転写を抑制するネガティブレギュレーターとして働き、DNA 損傷チェックポイントのエフェクターキナーゼとして働くストレス条件下では、*DIN7* の転写抑制は解除されることが示唆された。さらに、*DIN7* プロモーター中の 120bp (-239/-120) におよぶ比較的長い領域が、ストレスのない条件下で *DIN7* の転写抑制に関与することを明らかにした。

以上、本研究は mtDNA 代謝に関わるストレス応答性遺伝子のシスエレメントを同定し、転写調節機構の解明に大きく貢献した。また、ストレス応答時における機能が注目されていた DNA 損傷チェックポイント因子 Dun1 がストレスのない状態では、転写を抑制する機能を有することを明らかにした点も評価に値する。よって本審査委員会は、本論文を博士（理学）の学位を授与するに十分な内容と判断し、合格と認めた。