

氏名	堀 晶子
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 708 号
学位授与年月日	平成 21 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	出芽酵母における新規ミトコンドリア DNA コピー数制御機構に関する研究
論文審査委員	委員長 連携教授 吉田 稔 委員 教授 松本 幸次 委員 連携教授 長田 裕之 委員 准教授 田中 秀逸

論文の内容の要旨

細胞小器官であるミトコンドリアは酸素呼吸を通して、細胞にエネルギー源となる ATP を供給する。ミトコンドリアは独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) を多コピーで有しており、mtDNA は核染色体 DNA と共にミトコンドリアにおける ATP 生産を司る酸化的リン酸化反応に必須なタンパク質のサブユニット群をコードしている。この mtDNA は常に酸化的リン酸化反応から生じた代謝の副産物である活性酸素種に曝されているという酸化ストレスの強い環境にある。1つの細胞には1コピーしかない核ゲノム DNA とは異なり、数十から数千コピーもの mtDNA があり、その数も細胞のおかれた生理的状态で大きく変動する。たとえば、酸素呼吸が盛んな細胞ではそのコピー数が増加する。同様の現象は減数分裂期の二倍体酵母細胞や哺乳類の成熟卵母細胞、酸素呼吸が盛んな筋肉、肺、脳神経細胞、さらに低濃度の過酸化水素処理を受けたヒト細胞などで、広く観察される。このように mtDNA のコピー数の増加が mtDNA 上の遺伝子によってコードされるタンパク質発現を増加させることで細胞代謝状況の変動に伴う ATP 需給に適應していると考えられる。しかしながら、どのような機構が mtDNA コピー数の制御に働いているのか、分かっていない。

出芽酵母において mtDNA の複製様式は二つの経路が考えられている。一つは RNA ポリメラーゼにより合成された RNA プライマーにより開始される θ 型複製と呼ばれるものである。この複製産物は環状のモノマーである。もう一つは DNA 断片がプライマーとなり組換え反応に働くタンパク質である Mhr1 が相同 DNA 対合を起こして開始するローリングサークル型複製である。この複製産物は単位長さの mtDNA が直鎖状に連結したコンカテマーと呼ばれる DNA 分子種である。Mhr1 は交差を促進させるため、単位長さの mtDNA が環状に連結したマルチマーと呼ばれる DNA 分子種も形成される。出芽酵母において、mtDNA は主にマルチマーやコンカテマーの分子種で存在するためローリングサークル型複製が主に使われている経路であると考えられる。しかし組換え反応には二本鎖切断が必要とされる。私は初めにこの二本鎖切断を同定し、そしてどのような因子により二本鎖切断が引き起こされるのか解析した。

出芽酵母の呼吸活性を有する正常な mtDNA は 80-kbp であり、複製開始領域が多数存在する。このため、複製開始過程を研究するには困難である。よって私は複製開始領域を一つ有する欠損変異 mtDNA を含む出芽酵母を単離し、その欠損変異 mtDNA (HS mtDNA) を用いて複製開始機構の解析を行った。染色

体の組換えホットスポットにおける二本鎖切断の有無を検出する手法を用いて、mtDNAを一箇所切断する制限酵素で処理したところ、mtDNAの複製開始点に特異的な二本鎖切断を見出した。さらに、酸化損傷塩基除去修復酵素であるNtg1タンパク質がこの二本鎖切断の導入に働くことを明らかにした。これらの結果は、mtDNAの複製開始点に蓄積した酸化損傷を認識するNtg1タンパク質が二本鎖切断を導入することで、Mhr1依存性mtDNA複製を開始するという機構を強く支持した。

酸化損傷を認識するNtg1タンパク質がmtDNAの複製開始点に二本鎖切断を導入することから、活性酸素種が単独でmtDNAの複製に与える影響を調べた。出芽酵母から単離したミトコンドリアを低濃度の過酸化水素で処理したところ無処理の場合と比べ、mtDNAのコピー数とmtDNAの複製開始点での二本鎖切断がNtg1とMhr1に依存して3倍程増加したことを見出した。このことから、活性酸素種はNtg1を介したmtDNAの複製開始点での二本鎖切断を促進し、Mhr1依存性mtDNAの複製を活性化することが明らかとなった。また、今までに核遺伝子の発現調節によるmtDNAのコピー数の制御が知られているが、ミトコンドリアにおいて活性酸素種がmtDNAの「複製開始シグナル」としてmtDNAのコピー数を調節する機構の存在を本研究で初めて明らかにした。

また、mtDNAの維持に影響が出る現象の一つにミトコンドリアのダイナミックなネットワーク形成に関与する融合欠損がある。しかし、細胞内においてミトコンドリアの融合と分裂が常時起こるため、ミトコンドリアの形態とmtDNA複製との相関の解析は極めて困難であった。そこで、BiFC（二分子蛍光補完）を用いて単離ミトコンドリア融合をモニターし、ミトコンドリア融合とmtDNAの量的変動の関係を解析する実験系を構築した。この系を利用して、ミトコンドリアを融合するとMhr1依存性にmtDNAのコピー数が増加することを見いだした。また、ミトコンドリア融合によりミトコンドリアのマトリックス内に活性酸素種の発生が促進されることを見いだした。これらのことから、活性酸素種を介したmtDNA複製機構を通してミトコンドリアの形態変化がmtDNAのコピー数を調節する機能をもつことが示唆された。

様々な生理条件下におけるヒトのmtDNAコピー数の増減は細胞内のATPの需給と密接に関係し、健康維持に関わる細胞代謝活性化制御で重要な働きをされると考えられている。また、ミトコンドリア形態も細胞の環境応答に対し変化するためその機構とmtDNAの関係は重要であると考えられる。この研究を通して、呼吸やミトコンドリア形態変化に応答したmtDNAコピー数の増減はミトコンドリア内において恒常的に発生している活性酸素が「シグナルメディエーター」として働くことで調節する機構が初めて示唆された。

論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成 21 年 2 月 18 日(水)9:00～9:50 に埼玉大学理学部 3 号館(2 階)セミナー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。

真核生物では細胞小器官であるミトコンドリアが酸化的リン酸化を通して細胞内へエネルギーを供給する重要な役割を担っている。その機能に必須な蛋白質群は核とミトコンドリア DNA (mtDNA) の両方にコードされており、mtDNA 上の遺伝子発現量の制御は mtDNA コピー数を増やすことによって行われている。しかし、細胞の生理的な環境の変化に伴いエネルギー要求が高くなり mtDNA コピー数が増加する必要があるが、mtDNA 複製の開始、及び mtDNA のコピー数がどのように調節されているかは不明な点が多い。本論文は (1) Mhr1 に依存した mtDNA 複製に必要な二本鎖切断における Ntg1 蛋白質の機能、(2) 活性酸素種による組換えを介した複製 mtDNA コピー数の調節機構、(3) 新しい単離ミトコンドリア融合の検出系の構築、(4) ミトコンドリア融合と mtDNA コピー数の関係の解析について行い、mtDNA コピー数が調節される新規機構を解析した。学位論文は以下の項目からなっている。

(1) Mhr1 に依存した mtDNA 複製に必要な二本鎖切断における Ntg1 蛋白質の機能解析

組換え反応に働く蛋白質である Mhr1 が相同対合を触媒し、DNA 断片がプライマーとなって開始するローリングサークル型 mtDNA 複製機構が共同研究者である凌らによって提唱されていた。堀氏はこの組換えを介した複製に必要とされる二本鎖切断断片が複製開始点であることを明らかにし、切断導入には塩基除去修復酵素である Ntg1 が関与していることを見いだした。そこで、この Ntg1 が二本鎖切断を導入する機構を検討するため、精製 Ntg1 を用いた二本鎖切断形成の解析を行った。精製 Ntg1 と C 末欠損 Ntg1 における二本鎖切断形成の結果、二本鎖切断は Ntg1 存在下でのみ形成され、さらに酸化損傷において促進されることが示された。一方、酸化損傷は mtDNA 上の至る所に生じ、Ntg1 活性はニック形成のみであることから、複製開始点で特異的に二本鎖切断が生じるためには、複製開始領域が通常と異なる特異的な構造をしていると推測された。そこで、mtDNA の複製開始領域を含む断片と含まない断片に分け、制限酵素や一本鎖 DNA のみを切断する S1 ヌクレアーゼで処理した結果、mtDNA 上の複製開始領域は一本鎖 DNA が露出した特殊な構造をしており、両鎖に生じた酸化損傷塩基を Ntg1 が取り除くことにより二本鎖切断が生じることが示された。

(2) 活性酸素種による組換えを介した複製 mtDNA コピー数の調節機構

酸化損傷を認識する Ntg1 が mtDNA の複製開始領域に二本鎖切断を導入することから、ダメージを残さないレベルの酸化損傷を引き起こす物質が恒常的に mtDNA 複製を調節していることが推測された。ミトコンドリア内には酸化的リン酸化の副産物として恒常的に発生している活性酸素種 (ROS) があり、低量ならば恒常性のシグナルとして蛋白質発現の活性化などに働くことも報告されている。そこで、細胞質中に存在する捕捉酵素の影響を避け、ROS の mtDNA コピー数変化に対する影響を調べるため、出芽酵母細胞から単離したミトコンドリアを過酸化水素で処理した。その結果、低濃度の過酸化水素処理によって mtDNA コピー数増加が引き起こされることを見いだした。さらにその増加した mtDNA コピー数はローリングサークル型複製を介して新規に合成されたものであることも証明された。また、低濃度の過酸化水素処理により、mtDNA 上の酸化損傷の蓄積が生じ、さらに精製 Ntg1 を用いることで複製に必要とされる二本鎖切断量が増加することを明らかにした。以上の結果は ROS が Ntg1 を介した mtDNA の複製開始領域での二本鎖切

断を促進し、Mhr1 依存的 mtDNA の複製を活性化するというを示しており、ROS が mtDNA の「複製開始シグナルメディエーター」として mtDNA のコピー数を調節する機構の存在が示された。

(3) 新しい単離ミトコンドリア融合の検出系の構築

mtDNA の維持に影響する現象の一つに、ミトコンドリアのダイナミックなネットワーク形成に必要なミトコンドリア融合が知られている。そこで細胞内においてミトコンドリアの形態と mtDNA の関係を解析することとした。ところがミトコンドリアの形態は常に変化し、定量解析が困難であるため、新たにミトコンドリアの融合を定量的にモニターする実験系の構築が必要であった。そこで、BiFC(二分子蛍光補完)を用いることとした。BiFC 法では、GFP の N 末半分、C 末半分で発現する単離ミトコンドリアが融合した時にのみ蛍光が発生する。実際、両者の融合が起こるときのみ蛍光が観察され、単離ミトコンドリア融合を蛍光顕微鏡及び蛍光プレートリーダーにてモニターできる実験系を構築することができた。

(4) ミトコンドリア融合と mtDNA コピー数の関係の解析

構築した BiFC を用いた単離ミトコンドリア融合検出系を使用し、ミトコンドリアの融合と mtDNA コピー数の相関性を解析した。その結果、ミトコンドリア融合依存的に mtDNA コピー数が増加することが示され、その mtDNA コピー数増加はローリングサークル型に必要な Ntg1 や Mhr1 に依存的であった。そこで、ROS の発生がミトコンドリア融合依存的に増えるか確認したところ、ミトコンドリアのマトリックス(内部)へ ROS が発生していたため、ミトコンドリア融合依存的な mtDNA コピー数の増加がミトコンドリア内部で生ずる ROS シグナルにより制御されていることが示唆された。またこの ROS の発生はミトコンドリア融合により呼吸鎖の Complex IV のサブユニットが減少し、電子伝達における電子のリークによる可能性が示された。

以上本論文は mtDNA コピー数の制御として以下の点を明らかにした。すなわち、(1)組換えを介した複製における Ntg1 の重要性、(2)ROS が「複製開始シグナル」として働く mtDNA コピー数制御機構、(3)ミトコンドリア融合による mtDNA コピー数制御機構である。これらの発見は、これまで不明であったミトコンドリア自身による mtDNA コピー数制御が存在することを明らかにしたという点で新規であり、さらに元来、害として認識されてきた ROS が低濃度ではミトコンドリア複製のシグナルとして働くという新しい知見をもたらした。本研究は査読制のある国際誌(筆頭著者)に掲載された。よって本審査委員一同は、堀氏の本論文が博士(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。