

論文審査の結果の要旨

氏名 安部 隆史

本論文は5章からなり、第1章は変形体の成長と呼吸活性からみた真正粘菌の老化、第2章は真正粘菌 mtDNA の *in vitro* での断片化と一本鎖切断頻度、第3章は真正粘菌 mtDNA の全塩基配列とミトコンドリア遺伝子、第4章は真正粘菌 mtDNA の *in vitro* での断片化部位と一本鎖切断部位のマッピング、第5章では変形体の老化と一本鎖切断部位との増加について述べられている。

本論文では、いまだ決定的な結論の得られていない細胞内に内蔵された寿命の本体に迫るために、真正粘菌変形体の老化や短命死と mtDNA の部位特異的な一本鎖切断の関連を明らかにしようと考えている。

第1章

真正粘菌 (*Physarum polycephalum*) の変形体株を作出し、固形培地に植え継ぎ、その増殖速度を長期間にわたって測定した。ほとんどの株は通常約1年で増殖速度が減少し死滅した。こうした結果をもとに、変形体の呼吸活性の変化を単位タンパク質あたりの酸素消費量として調べたところ、若い変形体と比較して、老化した変形体では約 1/2-1/4 以下に低下していた。

第2章

変形体から単離した mtDNA を DW や TE に溶解すると、mtDNA は *in vitro* で部位特異的に断片化する。比較的低塩濃度の条件では α と β の2本のバンドが、極低塩濃度の条件下では最終的に17本のバンドがアガロースゲル電気泳動で検出される。これは mtDNA の極近

接した位置に起こった一本鎖切断が、低塩濃度条件下で解離し始めることによって起こる現象である。mtDNA 上で起こっている一本鎖切断の程度を知るために、各バンドの蛍光強度を定量し、各断片の出現頻度を算定した。その結果、最も出現頻度の高い断片-9 は $85.6 \pm 38.5\%$ もあり、最も頻度の少ない断片-2 でも $18.3 \pm 6.8\%$ であった。一方、 β バンドのプローブを用いて、サザンハイブリダイゼーションで β の出現頻度を調べた。老化した株では最大で7倍の頻度で mtDNA の断片化を起こしていることが明らかになった。

第3章

少なくとも 17 箇所で行われていると推定される mtDNA の一本鎖切断部位を塩基配列レベルで明らかにするために、mtDNA の全塩基配列を決定した。真正粘菌の mtDNA は全長 62,862bp であり、環状であった。真正粘菌のミトコンドリアには、高頻度の RNA エディティングが存在するため、全領域を、BLASTX/BEAUTY を用いて、ホモロジーサーチをした。その結果、タンパク質コード遺伝子 12 個、tRNA5 個、リボゾーム 2 つが存在することがわかった。一方、機能は不明ながら、他にも 20 個の ORF が存在していた。

第4章

低塩濃度条件下で断片化した mtDNA の断片をミトコンドリアゲノム上にマッピングした。また、mtDNA の一本鎖切断がこの断片化に関与する可能性を検証するために、S1 スクレーンを用いて、mtDNA の一本鎖部位をマッピングした。この結果、真正粘菌の mtDNA は低塩濃度条件にすると全領域で断片化が起こっており、その断片化部位は S1 スクレーン感受性部位と完全に一致していた。

第5章

低塩濃度条件下で断片化した mtDNA をゲルから切り出し、その両末端の塩基配列を断片 -6、-4、-9 の末端で調べたところ、LrRNA 遺伝子の末端と *atp1* 遺伝子の先頭部で一本鎖切断が起こっていることが確かめられた。

つぎに、プライマーエクステンション法を応用し、一本鎖切断部位の塩基配列と頻度を決定できるシステムを開発し、R I を用いて断片-4 の末端塩基配列を決定した。その結果、オートシーケンサーによって明らかになった *in vitro* での断片化部位と *in vivo* のミトコンドリア内で起こっている一本鎖切断部位の塩基配列は完全に一致していることが確かめられた。また、この一本鎖切断部位は、株間、培養方法、老化進行の程度などには影響されず常に一定していることが確かめられた。一方、その一本鎖切断の頻度は、変形体の老化進行にともない明らかに 3-5 倍程度高くなっていた。

本論文提出者は、変形体の老化進行にともない mtDNA の部位特異的一本鎖切断の頻度が高まることを明らかにした。若い変形体では、遺伝子内部にある一本鎖切断は、ミトコンドリアの集団内でその頻度が少なく細胞全体では十分な転写産物が生産されうるが、老化した変形体では、部位特異的一本鎖切断の頻度が増加するため、正常な生理機能を果たすだけの転写産物がミトコンドリアで生産されず、このことが細胞の老化の原因になっているのではないかと考えられる。真正粘菌の変形体には、特定のミトコンドリア遺伝子に対して、そのコード領域を一箇所のみ限定して一本鎖切断するという高度に制御された老化と寿命を決定するメカニズムが存在する可能性がある。

なお、本論文第 2 章、第 4 章は、高野博嘉、佐々木成江、森君江、河野重行との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行なったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。