

## 論文内容の要旨

論文題目 The mechanism of maternal inheritance of mitochondria and analyses of DNase that is involved in the digestion of mtDNA

ミトコンドリア母性遺伝の機構と mtDNA 分解に関与する DNase の解析

氏名 森山 陽介

### 序論

ミトコンドリアは母性遺伝することが多くの真核生物で確かめられている。その機構は精子に対し卵のもつミトコンドリアの数が圧倒的に多いためと説明されてきた。しかし PCR 法を用いて父親由来のミトコンドリア DNA (mtDNA) の有無が受精卵や子孫で調べられ、マウスの場合、種内交配では mtDNA は厳密に母性遺伝するが、マウスの同一属内での異種交配ではこれが寛容で父親由来の mtDNA も遺伝していることがわかった(Gyllensten et al., 1991; Kaneda et al., 1995)。ミトコンドリアが同一種の父親由来であることを認識し厳密に母性遺伝させる機構の存在が示唆される。また、アカゲザル・ウシ・マウスなどで受精卵の精子ミトコンドリアにユビキチンが結合していることが示されたため、母性遺伝機構としてユビキチンが関与するミトコンドリアの排除の可能性も考えられている(Sutovsky et al., 1999; Sutovsky et al., 2000)。

葉緑体の母性遺伝に関しては、雄由来の葉緑体 DNA の選択的分解がその原因であることがわかっている(Kuroiwa et al., 1982)。ミトコンドリアの母性遺伝に関しても、ミトコンドリアの排除に先立って mtDNA が分解される可能性が考えられている。しかし、高等動物ではミトコンドリアあたりの mtDNA のコピー数が少なく、mtDNA の選択分解の顕微鏡観察による実証は困難であった。私は、修士課程で、ミトコンドリアが大きく、mtDNA のコピー数が多く、発達した核様体をもっている真正粘菌 *Physarum polycephalum* を用いて、接合後すぐに父親由来 mtDNA の選択的な分解が生じることを明らかにした。真正粘菌の配偶子である粘菌アメーバ(n)を異なる接合型同士で接合すると、接合子内で両親由来のほぼ同数のミトコンドリアはすぐに混ざり合うが、接合後 3.5 時間後に約半数のミトコンドリアで mtDNA が一斉に分解されることが顕微鏡観察される(図 1)。この mtDNA の分解が、父親由来のものに限定されているかどうかを解析するため、接合子の細胞一個を顕微鏡下でマイクロマニピレーターを用いて回収し、PCR 法で両親由来の mtDNA を検出した。すると、mtDNA の分解が観察される時期から後は、父親由来の mtDNA は接合子からまったく検出されなかった(図 2)。このことから、父親由来 mtDNA の選択的な分解

の母性遺伝への関与が考えられる。

博士課程では、mtDNA 分解後のミトコンドリアの挙動を解析した。その結果、父親由来 mtDNA が選択的に分解されることでミトコンドリアが母性遺伝し、mtDNA を失ったことで父親由来のミトコンドリアが排除されることを明らかにした (Moriyama and Kawano, 2003)。また、ミトコンドリア母性遺伝に関与する可能性の高い接合期特異的な DNase 活性を同定している。

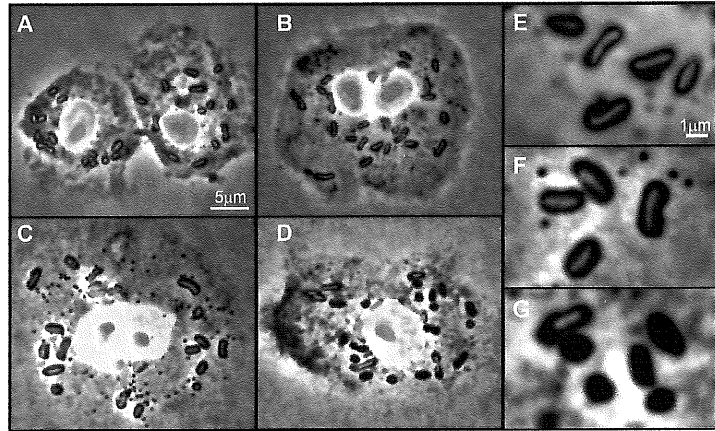


図1. 真正粘菌の接合過程におけるmtDNAの分解

アルカリ固定法により真正粘菌の接合過程を観察した(A-D)。一倍体の粘菌アメーバ(A)が、接合型の異なるもの同士で接合する(B)。接合から2時間後には細胞核が融合する(C)。接合から3.5時間後に約半数のミトコンドリアでmtDNAが分解される。粘菌アメーバ(E)、接合直後(F)、mtDNA分解直後(G)のミトコンドリアに形態的な差異はない。

## 結果と考察

### 1. 接合子における mtDNA 分解後のミトコンドリアの挙動

mtDNA 分解後のミトコンドリアの挙動を解析した。接合後の真正粘菌は細胞分裂をしないため、接合時にもっていたミトコンドリアは接合後も一細胞内に保持される。そこで細胞内の DNA をもつミトコンドリアとまたないミトコンドリアを、接合後 8-60 時間の間で数えた。mtDNA をもつミトコンドリアは分裂を繰り返してその数が細胞当たり 400 個程度まで増加する。これに対し、mtDNA をもたないミトコンドリアの数は接合後 36 時間まで変わらず細胞あたり 15 個程度であり、接合後 36 時間以降は減少していった(図 3A, B)。接合後 36 時間後の接合子を電子顕微鏡観察すると、ミトコンドリア核の存在する通常のミトコンドリアが存在する一方で、ミトコンドリア核をもたず、ミトコンドリア内膜が崩壊したものが観察された(図 3C)。接合直後に mtDNA を分解されたミトコンドリアはゆっくりと分解・排除されるものと考えられる。

mtDNA は、ミトコンドリア内で DNA 結合タンパク質と結合し、ミトコンドリア核あるいは核様体と呼ばれる一種の DNA・タンパク質複合体を形成する。接合後 36 時間後にはミトコンドリア核をもたないミトコンドリアが観察されることから、ミトコンドリアの

ヒストン H1 様 DNA 結合タンパク質に対する抗体を用い、接合期のミトコンドリア核の挙動を解析した。抗体のシグナルは接合直後では mtDNA と共局在しており、また、mtDNA の分解直後ではミトコンドリア核としての大きさを保っていた。接合後 8 時間後にはミトコンドリア内に拡散しているのが観察された。これらの結果から、ミトコンドリアの母性遺伝は、接合後の父親

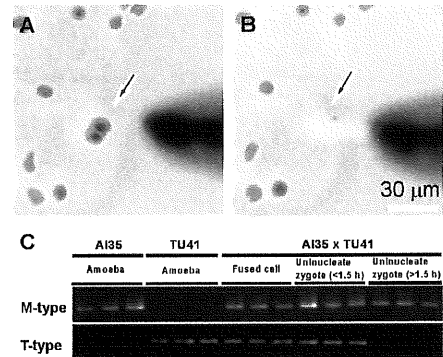


図2. 一接合子から検出された父親由来mtDNAの分解  
顕微鏡下からマイクロマニピュレーターにより一細胞を回収した(A, B)。両親mtDNAの多型を識別できるPCRプライマーによりsemi-nested PCRを行い、一細胞から接合前後の両親由来のmtDNAの存在を解析した(C)。mtDNAの分解と同時に父親由来mtDNA(TU41: T-type)が検出されなくなる。

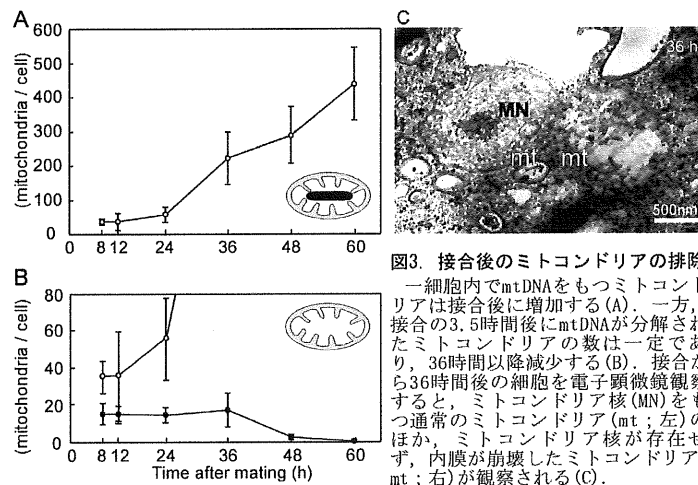


図3. 接合後のミトコンドリアの排除  
一細胞内でmtDNAをもつミトコンドリアは接合後に増加する(A)。一方、接合の3.5時間後にmtDNAが分解されたミトコンドリアの数は一定であり、36時間以降減少する(B)。接合から36時間後の細胞を電子顕微鏡観察すると、ミトコンドリア核(MN)をもつ通常のミトコンドリア(mt; 左)のほか、ミトコンドリア核が存在せず、内膜が崩壊したミトコンドリア(mt; 右)が観察される(C)。

由来 mtDNA の選択的分解→ミトコンドリア核構造の崩壊→ミトコンドリア膜構造の崩壊の順に進行すると考えられる。

## 2. 不完全な mtDNA 分解と両性遺伝

mtDNA の分解がミトコンドリアの母性遺伝を決定付けているのか、それとも mtDNA の分解とは別にミトコンドリアの排除の機構が存在していて、mtDNA が分解されなくとも母性遺伝するのかを解析した。

真正粘菌の交配型はオスとメスの 2 つに収斂していない。交配型の異なる粘菌アメーバ 16 株をもちいて、60 通りのかけあわせ（交配型の組み合わせは 8 通り）を行い、接合後すぐに mtDNA 分解が見られないものを探索した。その結果、ほとんどのかけあわせでは mtDNA が選択的かつ完全に分解されていたが、接合後すぐに mtDNA の選択的な分解が始まるが完全には分解しきらずミトコンドリア内に mtDNA の小さな輝点が残る交配型の組み合わせが 3 通り存在した。残される輝点の大きさはかけあわせにより様々であった。

これら交配型の組み合わせの中から、特に小さな輝点が残るかけあわせ（AI5 × DP246）を選び、DAPI の蛍光輝度により mtDNA の挙動を解析した。このかけあわせでは、接合後すぐの DNA 分解により、接合後 24 時間では粘菌アメーバのもつミトコンドリアあたりの mtDNA の輝度に対して 1/4 以下の輝度の mtDNA しかもたないミトコンドリアが複数存在していた。しかし、接合後 36 時間後では、1/4 以下のものが減る代わりに 1/2 程度のものが増えていき、成熟した変形体のミトコンドリアはすべて通常の mtDNA 輝度をもっていた。

mtDNA の DAPI 染色による蛍光輝度は mtDNA 量に比例する。不完全な分解を受ける mtDNA が父親由来のものであり、父親由来ミトコンドリアの排除が生じないならば、これらのかけあわせでは両性遺伝すると考えられる。そこで、これら 60 通りのかけあわせから得た変形体から DNA を抽出し、PCR によりミトコンドリアの遺伝を調べた。すると、不完全な mtDNA の分解が見られた 3 通りの交配型の組み合わせのみで両性遺伝が確認された。PCR により両親由来の mtDNA の存在比を推定したところ、観察に用いた AI5 × DP246 では  $1:10^4$  であり、その他の不完全な mtDNA の分解が見られた変形体では 1:1 から  $1:10^4$  まで様々であった。

交配型の組み合わせによっては mtDNA の分解が不完全なものが存在し、それらでは mtDNA は両性遺伝することになる。mtDNA 分解とは独立した父親由来ミトコンドリアの排除機構は存在しないものと考えられる。なぜ mtDNA の分解が不完全な段階で止まるのかについては、父親由来 mtDNA を完全に分解する前に、分解に対する保護の機構が働いたか、ミトコンドリア内での mtDNA の分解活性が失われたためではないかと考えられる。

## 3. mtDNA の分解を担う DNase 活性の探索

真正粘菌の 1 つの接合子には総量でおよそ 50Mb の父親由来 mtDNA が存在し、それが速やかに分解されることを考えると、選択的かつ非常に強力な DNase の存在が考えられる。そこで、mtDNA の分解を担う DNase 活性の探索を DNA zymography により行った。この手法では、サケ精子 DNA を混ぜたポリアクリルアミドゲルで接合子の可溶性タンパク質を泳動後、DNase の活性に必要と考えられる二価イオンを加えた反応バッファー中でインキュベートする。DNase 活

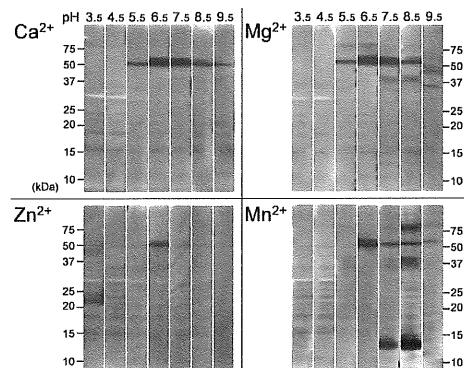


図4. 接合子内のDNase活性の検出  
SDS-PAGE/ゲル内アッセイ法によりCa<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>のいずれかの存在下、pH3.5-9.5の条件下で接合子の可溶性タンパク質中のDNase活性を検出した。Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>要求性の、pH6.5で強い活性を持つ50kDaに相当するDNase活性と、Mn<sup>2+</sup>要求性の13kDaのDNase活性が存在した。

性をもつ分子は周辺の DNA を分解するため、ゲルを EtBr 染色し、UV 照射すると DNase に相当するバンドが検出されることになる。そこで、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>のいずれかを加え、pH は 3.5 から 9.5 の間の 7 段階とする 28 通りの条件下で、接合子のもつ DNase 活性と分子量を解析した(図 4)。

その結果をもとに DNase 活性の変化を接合前の粘菌アメーバと、接合の誘導から 2 時間ごとの細胞から調べた。Ca<sup>2+</sup>要求性、50 kDa の DNase 活性は接合前後に存在し、Mn<sup>2+</sup>要求性、13 kDa の DNase 活性は接合直後に mtDNA が分解される時期から上昇していた(図 5)。また、接合子からミトコンドリアを経時的に単離し同様の解析をすることで、これらの活性が実際にミトコンドリア内に存在することが確かめられた。ゲル濾過カラムによりタンパク質を分子量ごとに分画すると、これらの DNase は高分子量複合体として存在することが明らかになった。

ミトコンドリアへの局在や、活性が上昇する時期から考えて、これらの DNase がミトコンドリア母性遺伝における mtDNA 分解に関与する可能性が高いと考えられる。DNase 活性が父親由来 mtDNA のみに働く機構は現在のところ不明であるが、高分子量複合体を形成することが、mtDNA 分解の選択性をもたらす可能性があると考えられる。

## 結論

本研究では、真正粘菌を用いて、接合期の mtDNA、ミトコンドリアのそれぞれの挙動に注目し、ミトコンドリアの母性遺伝機構について以下のことを明らかにした。

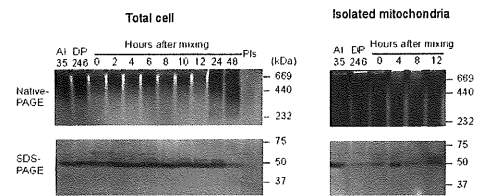
1. 真正粘菌においてミトコンドリアの母性遺伝は、接合から 3.5 時間後に父親由来の mtDNA が一斉に、かつ完全に分解されるためである。
2. mtDNA の分解を経て、接合後少なくとも 8 時間後にはミトコンドリア核構造が崩壊する。
3. ミトコンドリア核構造の崩壊を経て、接合後少なくとも 36 時間後にはミトコンドリア内膜が崩壊し、接合後 48 時間後には父親由来のミトコンドリアが排除される。
4. mtDNA が不完全にしか分解されない交配型の組み合わせが存在し、それらではミトコンドリアが両性遺伝する。
5. ミトコンドリアに局在し、高分子量複合体を形成する DNase 活性を 2 種類同定した。特に Mn<sup>2+</sup>要求性の DNase は mtDNA が分解される時期に活性化されるため、母性遺伝との関わりが強く示唆される。

これらは、ミトコンドリアの母性遺伝を決定付けるのは、父親由来ミトコンドリアの排除ではなく、父親由来 mtDNA の選択的分解であることを示すと考えられる。

## 発表論文

1. Moriyama, Y. and Kawano, S. (2003) *Genetics* 164 (3) 963-975. Rapid, selective digestion of mitochondrial DNA in accordance with the *matA* hierarchy of multiallelic mating types in the mitochondrial inheritance of *Physarum polycephalum*.
2. Takano, H., Abe, T., Sakurai, R., Moriyama, Y., Miyazawa, Y., Nozaki, H., Kawano, S., Sasaki, N. and Kuroiwa, T. (2001) *Mol. Gen. Genet.* 264 (5) 539-45. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Physarum polycephalum*.

### A DNase activity in the presence of Ca<sup>2+</sup> at pH6.5



### B DNase activity in the presence of Mn<sup>2+</sup> at pH8.5

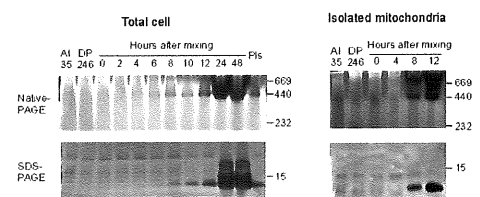


図5. 接合期特異的なDNase活性の検出

mtDNAが選択的に分解される時期(粘菌アメーバを混ぜ合わせて6-8時間後)に細胞内に存在するDNase活性を検出した。(A)Ca<sup>2+</sup>存在下、pH6.5。(B)Mn<sup>2+</sup>存在下、pH8.5。Pis: 変形体