

論文審査の結果の要旨

氏名 森山 陽介

本論文は2章からなり、真正粘菌 *Physarum polycephalum* を材料として、第1章は選択的なミトコンドリア DNA (mtDNA) の分解により母性遺伝が生じること、第2章は接合期特異的な DNA 分解酵素活性について述べられている。また、補遺として真正粘菌 *Didymium iridis* においてもミトコンドリア DNA の分解が生じることを示している。

第1章

ミトコンドリアの母性遺伝は多くの真核生物で確かめられているが、どのように母性遺伝するかについては明らかではなかった。本論文の1章では mtDNA の観察に適した材料である真正粘菌 *Physarum polycephalum* を用い、観察のために新規の固定法を開発して接合期の mtDNA の動態を解析している。真正粘菌の配偶子である粘菌アメーバが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ことが顕微鏡観察された。しかし接合から 3.5 時間後に約半数のミトコンドリアで mtDNA が一斉に分解された。この mtDNA の分解が片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とりだし 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、片親由来の mtDNA は接合子から全く検出されなかった。このことから、片親由来 mtDNA の選択的な分解の母性遺伝への関与が考えられる。

mtDNA と結合しているミトコンドリア核タンパクの挙動を調べるため、特異的抗体を用いて蛍光抗体染色をした。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が、さらに 5.5 時間後にミトコンドリア内に拡散しているのが観察された。また、mtDNA をもつミトコンドリアは接合後も分裂を繰り返すが、mtDNA をもたないミトコンドリアは分裂せず、接合後 36 時間以降は減少していった。接合後 36 時間後の接合子を電子顕微鏡観察すると、ミトコンドリア内膜が崩壊したものが観察された。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。

mtDNA の分解が生じなければ母性遺伝しないかを調べるため、由来の異なる 16 株の粘菌アメーバを用いたかけあわせから両性遺伝する個体を探索した。PCR により mtDNA の遺伝を調べたところ、特定の 7 株間のかけあわせにおいて両性遺伝がみられた。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。これらのかけあわせでは mtDNA の不完全な分解と、その後の DNA の複製により、mtDNA の存在比の偏った両性遺伝が生じることを確かめた。

第二章

真正粘菌 mtDNA の選択的分解には、非常に強力かつ選択的な DNase の存在が考えられる。そこで、DNA zymography により mtDNA の分解を担う DNase 活性の探索を行った。加えるイオンと反応液の pH を変えて接合子の DNase 活性と分子量を検討した結果、 Ca^{2+} 要求性の pH6.5 に最適 pH をもつ 50 kDa のものと、 Mn^{2+} 要求性の pH8.5 に最適 pH をもつ 13 kDa の DNase 活性がミトコンドリアに存在し、そのどちらもが巨大な複合体として存在していた。DNase 活性の変化を接合前の粘菌アメーバと、接合後から経時的に調べたところ、 Ca^{2+} 要求性、50 kDa の DNase 活性は接合前後に存在し、 Mn^{2+} 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。これらのヌクレースが母性遺伝における mtDNA 分解に関与する可能性が高いと考えられる。DNase 活性に対して mtDNA が時期特異的に保護されてはいなかったため、ヌクレースが複合体を形成していることで分解活性が制御される可能性がある。

補遺

真正粘菌 *P. polycephalum* の近縁種の *Didymium iridis* でも mtDNA の選択的分解が生じることを報告している。

以上の研究により、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 を失ったことで不要となったミトコンドリアが排除されることを初めて明らかにしている。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。なお、本論文第一章は河野 重行との、第二章と補遺は野村 英雄、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および検証を行ったもので、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（生命科学）の学位を授与できると認める。