

論文内容の要旨

論文題目

Studies on rearrangements of mitochondrial genome and mitochondrial fusion by using *Physarum polycephalum* and *Saccharomyces cerevisiae*

真正粘菌と出芽酵母を用いたミトコンドリアゲノムの再編成とミトコンドリア融合に関する研究

氏名 野村 英雄

序論

ミトコンドリアは細胞内で分裂融合を繰り返す半自律的オルガネラで、核とは別に独自のミトコンドリアゲノムをもつ。それを構成するミトコンドリア DNA(mtDNA)は多くの種で環状分子であり、そのサイズはヒトの約 16kb から高等植物の 2400kb まで多岐に富む。多くの生物で mtDNA は母性遺伝し、その均一性は保たれる。ミトコンドリアのゲノムサイズが大きな高等植物や菌類では、ミトコンドリアプラスミドをもつものが多数報告されている。それらはほとんどが直鎖状、二重鎖 DNA であり、mtDNA と組換えを起こすものも知られている。ミトコンドリアゲノムの再編成にプラスミドの組換えがなんらかの役割を荷っていることが示唆されている。

真正粘菌 *Physarum polycephalum* の mtDNA はバリエーションに富んでいる。*P. polycephalum* には、ミトコンドリアプラスミド mF があり、接合期と胞子形成期にミトコンドリアの融合を促進する。mF は母性遺伝の法則に逆らって、mtDNA に存在する相同領域(ID)で組換える(Sakurai et al. 2004)。mF をもつ変形体から得た子孫アメーバの mtDNA には通常よりも大きな多型があり、mF の mtDNA への挿入が mtDNA の多様性を形成すると予想された。

私は、mF が関与する mtDNA の環状 DNA の線状化と再環状化の過程と、多型の創出メカニズムについて研究した。ミトコンドリア同士は融合によって内容物を交換し、これによりミトコンドリア間の均一性は保たれていることが知られている。ミトコンドリアの研究が進んでいる出芽酵母では、融合に関わる遺伝子の異常は mtDNA の欠失やそれにとまなうミトコンドリア活性の低下を生じることから、ミトコンドリア融合とミトコンドリアゲノムの維持には深い関わりがあることが示唆されている。ミトコンドリア融合を促進する mF にコードされた 9 個の ORF には融合遺伝子があり、ORF640 がそれではないかと期待された。構造的ホモロジーを探ったところ、出芽酵母の遺伝子 *OM45* と構造上の相同性があった。今回はこの *OM45* を用いてミトコンドリアの融合、ミトコンドリアゲノムの維持に関する解析を行った。

結果と考察

1. 接合時に母性遺伝を逃れる mF が関与する mtDNA の線状化

真正粘菌 *Physarum polycephalum* の 36 のアメーバ系統には, mF をもつ株(mF+)が 3 株(JE8, TU111, NG111)ある。これらの 3 株と mF を持たない(mF-)株 KM88 とを接合させ, mtDNA と mF の伝播様式をサザン法により調べた。3 組の mF-(母)と mF+(父)の掛け合わせでは, KM88×JE8 でのみ完全な母性遺伝が示された。しかし, KM88×TU111 と KM88×NG111 では, KM88 由来の mtDNA が伝わる一方, TU111 か NG111 由来の mF も変形体へと伝播した。さらに新たな制限酵素断片も生じていたことから, mF と mtDNA の組換えが推測された。

PCR を用いて mF と mtDNA の動態を詳しく調べた。両親由来の mtDNA は多型を利用してそれぞれ検出した。TU111, NG111 由来の mtDNA は分解されていた一方で, TU111, NG111 由来の mF は分解されずに KM88 由来の mtDNA と組換えを起こした(図 1)。最終的には mtDNA 全体の約 80% が mF と組換えた。また, 3 組の掛け合わせから生じた変形体の mtDNA をパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)で環状 DNA と線状 DNA に分離したところ, mtDNA は mF と組換えること

によって環状分子から線状分子へと構造が変化していることが明らかになった(図 2)。

KM88 と TU111 の接合子では, 融合してミトコンドリア核様体を複数もつ, 巨大化したミトコンドリアが観察された。mF はミトコンドリアを融合させることにより, 父由来のミトコンドリアから母由来のミトコンドリアに乗り換え, 母性遺伝の圧力から逃れたと考えられる。

2. 胞子形成時に観察された mF が関与する mtDNA の再環状化と再編成

ミトコンドリアプラスミドが関与する mtDNA の多様性創出過程を明らかにするため, mF を持たない株(KM88×JE8) と mF を持つ 3 株(KM88×TU111, KM88×NG111 と Je90)から 91 株の子孫アメーバを取った。それらの mtDNA を単離して, RFLP 解析, PCR による特定領域の検出, PFGE による環状分子と線状分子の分離を行った。RFLP 解析と PCR による特定領域の検出によると, mF を持たない KM88×JE8 の子孫ではすべての子孫が親と全く同じパターンを示したのに対し, mF を持つ 3 株の子孫では親とは異なるパターンを示すアメーバが 71 株中 44 株も存在していた(表 1)。PCR で検出で

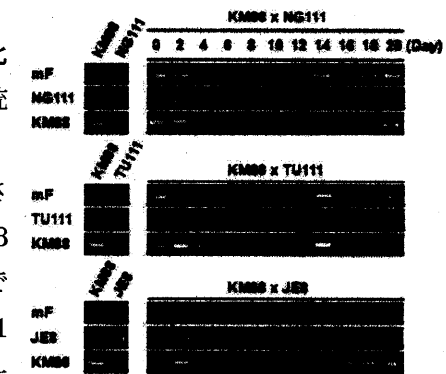


図 1. 両親由来 mtDNA と mF を PCR で検出。左に検出対象を, 上段にサンプル名を示す。左カラムの 2 サンプルは接合前, 右カラムは接合後のサンプルで, 数字は接合からの日数を示す。

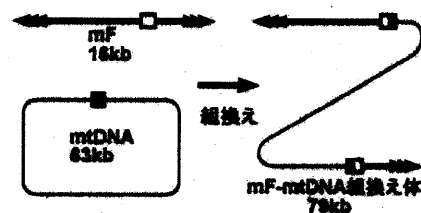


図 2. mF と mtDNA の組換えの模式図。mF との組換えにより環状であった mtDNA は線状化する。組換えは相同領域(ID, mF は□, mtDNA は■)で起こる。

表 1. PCR の結果に基づいた各タイプの出現数。

| Primer Designation | Primer Position | Type | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----------------|------|---|---|----|---|---|----|---|---|----|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| plD | plasmid | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| ter | plasmid | + | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| 646 | plasmid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| plmD | recombinant | + | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| m/pID | recombinant | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| mID | mtDNA | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + |
| nad1 | mtDNA | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| atpA | mtDNA | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| cox1 | mtDNA | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Je90 (n=30) | | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 12 | 3 | 6 | 1 | 0 |
| KM88 x NG111 (n=22) | | 12 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| KM88 x TU111 (n=18) | | 15 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| KM88 x JE8 (n=20) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 |
| Total (n=91) | | 27 | 2 | 1 | 10 | 2 | 3 | 12 | 3 | 6 | 1 | 22 |

上段は各タイプで検出されるフラグメントを表し, 下段は, 親株ごとに子孫を各タイプに分類した。なお, 親株は mF+がタイプ 1, mF-がタイプ 11。親株のカッコ内の n は子孫のサンプル数。

きた断片の種類に従って分類したところ、9タイプの mtDNA 再編成パターンが見つかった。再編成は mF の組換え領域を中心に起こっていた。また、変形体で存在していた線状 mF-mtDNA 組換え体が存在し続けているか PFGE により確認したところ、再編成した mtDNA をもつものでは、線状分子は存在していなかった。サザン法により組換え体の痕跡が環状分子に存在していることがわかり、線状の mF-mtDNA 組換え体が再環状化していることが明らかになった。

再編成が起こった子孫アメーバのタイプ 8 と分類される mtDNA の再編成領域の塩基配列を決定したところ、線状 mF-mtDNA 組換え体の片末端と ID 配列周辺が再び組換えを起こし、再環状化していたことが明らかになった(図 3)。再環状化の結果として一部の配列が欠失し、その欠失する領域の違いにより再編成に多様性が存在していることが示された。また、欠失領域が複数あるタイプの存在により、このような組換えが複数回起きたことも示唆された。これらの結果から、ミトコンドリアプラスミドの関与する mtDNA の多様性を生じる過程のひとつが明らかになったと考えられる。

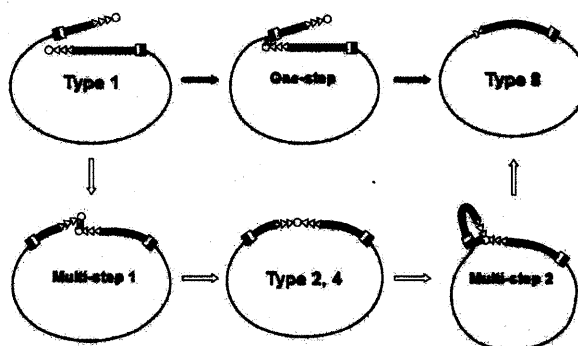


図 3. タイプ 8 で観察された再編成が生じる 2 通りのモデル。線状 mF-mtDNA 組換え体の片末端と ID 配列周辺が直接組換えを起こし再環状化するモデル(黒矢印)と、線状 mF-mtDNA 組換え体の両末端がまず組換え、中間体を介すモデル(白矢印)。

3. ミトコンドリア融合に関わると予想される出芽酵母遺伝子 OM45 の解析

ミトコンドリアプラスミド mF にコードされる ORF のホモロジーサーチでは、ミトコンドリア融合に関わるタンパク質の同定はできなかった。しかし、膜貫通ドメインを持つこと、コイルドコイルドメインを持つことから ORF640 がミトコンドリア融合に関わっているのではないかと期待された。配列上の相同性はなくとも構造上で似たタンパク質がないか検索したところ、出芽酵母の OM45p が局在、細胞質に出ている C 末端の長さ、コイルドコイルドメインの長さで類似していた(図 4)。そこで、OM45 の遺伝子破壊株を作成し、OM45p がミトコンドリアの融合に関わっているか調

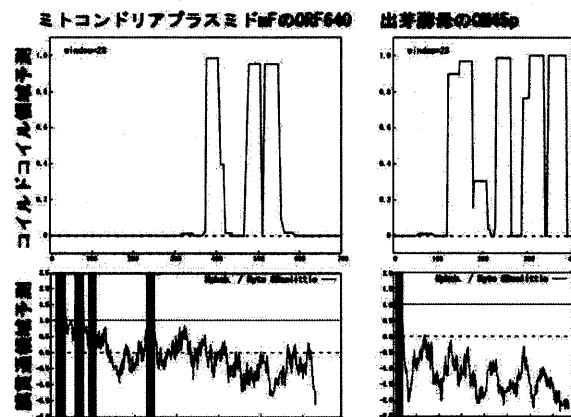


図 4. mF の ORF640(左)と出芽酵母 OM45p(右)の構造上の類似性。上段はコイルドコイル予測、下段は膜貫通領域予測。両者ともミトコンドリア外膜上で C 末端を細胞質に出して存在する。膜貫通領域から C 末端までの長さ、コイルドコイル領域を複数持つなど共通点が多い。

べた。出芽酵母のデータベースにより、定常期、窒素源枯渇時、非発酵性の炭素源で培養した時に OM45 の発現は上昇することが示されていたため、この 3 つの培養条件を中心にミトコンドリアの挙動を観察した。

ミトコンドリアの挙動を生細胞で観察するためにミトコンドリア外膜を GFP [OM70(1-55)-GFP] で、マトリクスを RFP [COX4(1-22)-RFP] でラベルした株を作成した。その上で、OM45 の遺伝子を、Candida の HIS3 遺伝子、または KanMX4 カセットで置き換え遺伝子破壊した。遺伝子破壊株 ($\Delta om45$) と野生型株 (WT) の増殖曲線を異なる培地条件で比較した。発酵性炭素源を用いた場合も非発酵性炭素源を用いた場合でも、WT, $\Delta om45$ ともにほぼ同じ増

殖曲線を示した。また、同時にミトコンドリアの形態も比較したが、発酵性炭素源を用いた培養の定常期で $\Delta om45$ のミトコンドリア形態が若干単純な程度の差であった。しかし、非発酵性炭素源で定常期まで培養した後に新鮮な発酵性炭素源の培地に移したところ、WT と $\Delta om45$ ではミトコンドリアの形態変化に大きな差が生じた。WT では最初顆粒状であったミトコンドリアは、60分で25%ほどの細胞で融合し始め、90分の時点では90%以上の細胞で融合してネットワーク状の大きなミトコンドリアになった。一方 $\Delta om45$ は60分では95%以上の細胞が顆粒状のミトコンドリアをもち、90分経っても顆粒状のミトコンドリアを持つものがまだ多く、融合してネットワーク化したミトコンドリアをもつ細胞は50%弱しかいなかった。定常期に断片化したミトコンドリアが融合し、ネットワーク化するのに遅延が生じていた。そこで、ミトコンドリア分裂融合と密接な関係のある mtDNA が喪失した時の表現型プチの発生率も調べた。若干ではあったが、WT に比べて $\Delta om45$ はプチの発生率が全ての条件で上昇した。このことから、定常期から指数増殖期への移行時のミトコンドリア融合に関わっている可能性が示唆された。*OM45* の破壊はミトコンドリア融合自体を阻害せずに遅延のみを生じたことから、*OM45* は融合に必須なのではなく、融合させやすくする遺伝子だと推測された。

データベースによって *OM45* の発現が上昇すると示された窒素源枯渇条件は、胞子形成を誘導することが知られている。そこで、胞子形成率と胞子形成期のミトコンドリアの挙動についても比較した。胞子形成率では四分子、三分子、二分子の発生率についても考慮したが、WT と $\Delta om45$ の間でまったく差はなかった。次に、核の状態ごとにステージを分け、ミトコンドリアの形態を経時的に観察したが、顕著な差異は見られなかった。胞子へ分配される mtDNA のコピー数もリアルタイムPCRを用いて核のDNAとの相対的な値を出して確認した。胞子に分配される mtDNA の量には大きな差異はなかったが、胞子外に捨てられる mtDNA の量はWT に比べると50%ほど多かった。胞子形成期では *OM45* は、胞子形成率やミトコンドリアと mtDNA の分配にはそれほど重要ではないようだが、破棄される mtDNA の量が増えることから何らかの役割はあるようだ。

結論

接合時と胞子形成期の mF プラスミドの動態と *OM45* を解析し、次のことを明らかにした。

1. mF は、ミトコンドリアを融合させることで、母性遺伝から逃れることができる。
2. mF は、環状 mtDNA と組換えを起こし、線状の mF-mtDNA 組換え体を生じる。
3. 線状の mF-mtDNA 組換え体は、胞子形成期の mtDNA の再編成により、再環状化する。再環状化部位の違いは結果として mtDNA に多様性をもたらす。
4. *OM45* は培養条件が変化したときのミトコンドリア融合に関与している可能性がある。
5. *OM45* は、胞子形成期のミトコンドリア融合に大きく関わってはいないが、胞子形成期に破棄される mtDNA 量には少なからず影響を与える。

発表論文

1. Sakurai, R., Nomura, H., Moriyama, Y., Kawano, S. (2004) The mitochondrial plasmid of the true slime mold *Physarum polycephalum* bypasses uniparental inheritance by promoting mitochondrial fusion. *Curr. Genet.* **46**: 103-114.
2. Nomura, H., Moriyama, Y., Kawano, S. (2004) Rearrangements in the *Physarum polycephalum* mitochondrial genome associated with a transition from linear mF-mtDNA recombinants to circular molecules. *Curr. Genet.*, in press.