

# 論文審査の結果の要旨

氏名 野村 英雄

本論文は3章からなり、第一章では接合時の mF と mtDNA の挙動、第二章では孢子形成時の mtDNA の再編成、第三章では出芽酵母の *OM45* の解析について述べられている。

第一章では、接合時に母性遺伝を逃れる mF が関与する mtDNA の線状化について解析している。真正粘菌 *Physarum polycephalum* のアメーバの mF をもつ3株(mF+; JE8、TU111、NG111)と mF を持たない株(mF-; KM88)とを接合させ、mtDNA と mF の伝播様式をまずサザン法により調べている。母(mF-)と父(mF+)の掛け合わせでは、KM88×JE8 は正常な母性遺伝を示した。一方、KM88×TU111 と KM88×NG111 では、母方由来の mtDNA が伝わったが、父方由来の mF も変形体へと伝播し、さらに新たな制限酵素断片も生じた。このことから、mF と mtDNA の組換えを推測し、PCR を用いて mF と mtDNA の動態を調べ、父方由来の mtDNA は分解される一方、父方由来の mF は残存して母方由来の mtDNA と組換えを起すことを示した。次に、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)により環状 DNA と線状 DNA に分離し、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することを明らかにしている。さらに、KM88×TU111 の接合子で、融合したミトコンドリアを観察している。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ると結論している。

第二章では、孢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について解析している。mF を持たない変形体 (KM88×JE8)と mF を持つ変形体3株(KM88×TU111、KM88×NG111 と Je90)から91株の子孫アメーバを取り、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ている。RFLP 解析と PCR による特定領域の検出により、mF を持たない KM88×JE8 の子孫はすべて親と全く同じパターンを示す一方、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 株も存在することを見出した。PCR で検出した断片の種類に従って分類し、9 タイプの mtDNA 再編成パターンを見つけ、再編成は mF の組換え領域を中心に起きることを示した。また、PFGE により、再編成した mtDNA をもつものでは、線状 mF·mtDNA 組換え体分子は存在していないことを示した。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を示し、線状の mF·mtDNA 組換え体が再環状化していることを明らかにした。その上で、再編成が起こった子孫アメーバの mtDNA の再編成領域の塩基配列を決定し、実際に組換えが起こり再環状化していたことを示した。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生じたと結論している。

第三章では、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* を解析している。膜貫通ドメインを持つことや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と期待し、構造上で似たタンパク質である出芽酵母の *OM45p* を解析した。*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、定常期、窒素源枯渇時、非発酵性の炭素源で培養した時を中心にミトコンドリアの挙動を観察した。まず、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、 $\Delta om45$  とともにほぼ同じ増殖曲線を示すが、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単純であることを観察した。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時のミトコンドリアの形態変化を比較し、定常期に断片化したミトコンドリアが融合してネットワーク化するのに遅延が生じることを明らかにした。さらに、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、WT に比べて  $\Delta om45$  はプチの発生率が全ての条件で上昇することを示した。これらのことから、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ことを示唆した。また、*OM45* の破壊が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、融合を促進する遺伝子だと結論した。さらに、窒素源枯渇条件は孢子形成を誘導することが知られていることから、孢子形成率と孢子形成期のミトコンドリアの挙動についても比較

している。胞子形成率では WT と  $\Delta om45$  の間で差は見出していない。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、顕著な差異を見出していない。胞子形成期の 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、胞子外に捨てられる mtDNA の量が WT に比べ最大 50% 上昇することを示した。最終的に、*OM45* はミトコンドリアの融合を促進する遺伝子だとし、*ORF640* も融合促進遺伝子だと結論している。

なお、本論文第 1 章は桜井 楽生、森山 陽介、河野 重行との共同研究であり、第 2 章は、森山 陽介、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。