

## 論文内容の要旨

### 論文題目 **Studies on architectural proteins involved in organization and functional regulation of the mitochondrial nucleoid in *Physarum polycephalum***

(真正粘菌ミトコンドリア核様体の構築と機能発現制御に関わる構造タンパク質群の解析)

氏名 伊藤 喜重

#### 序論

生体内において、ミトコンドリア DNA (mtDNA) はタンパク質によって折りたたまれ、凝縮した核様体構造をとる。ミトコンドリア核様体は、mtDNA の複製・転写・修復を行う場であり、そういった mtDNA の機能発現を支える構造基盤となる。しかしながら、ミトコンドリア核様体は多くの真核生物において微小な構造であるため、どのように構築され機能しているのか依然として明らかではない。

原生生物である真正粘菌 *Physarum polycephalum* のミトコンドリア核様体は、ヒトや出芽酵母と比較して 10-50 倍の DNA を含み、巨大な棒状の構造をとる。その形態的特徴から、真正粘菌はミトコンドリア核様体研究のモデル生物とされ、生体内での構造と機能を保持した高純度のミトコンドリア核様体が単離されている (Sasaki *et al.*, 1998)。これまでに真正粘菌において、ミトコンドリア核様体の構築に関与するタンパク質 (構造タンパク質) として Glom (A protein inducing agglomeration of mitochondrial chromosomes) が同定された (Sasaki *et al.*, 2003)。Glom は、2 つの HMG-box ドメインを含む塩基性タンパク質 (HMG タンパク質) であり、ミトコンドリア核様体の中で最も含有量が多く、機能を妨げずに mtDNA を効率良く凝縮させる。同様の HMG タンパク質は、高等動物や酵母でもミトコンドリア核様体の構造タンパク質として同定され、複製・転写・組換え・メンテナンスなどの mtDNA 機能発現制御にも関与することが報告されている。このようなミトコンドリア核様体の構築を担う構造タンパク質は、複数存在していると予測されているにもかかわらず、各生物でまだ 1 種類しか同定されていない。

本研究では、真正粘菌から単離した高純度のミトコンドリア核様体を用いて、新規の構造タンパク質群の同定を目指した。そして、それらのタンパク質群がどのようにミトコンドリア核様体の構築や mtDNA の機能発現に関わるのか明らかにすることを目的とした。そのために、これまで真正粘菌では困難であった遺伝子発現抑制法の開発も試みた。

## 結果と考察

### 1. ミトコンドリア核様体を構築する DNA 結合タンパク質の探索

ミトコンドリア核様体の構築に関与するタンパク質の候補を得るために、高純度に単離したミトコンドリア核様体を NaCl または DNase で処理し、構造を解体させた。その結果、解体に伴って数種類のタンパク質が遊離した。次に、ミトコンドリア核様体の総タンパク質を DNA セルロースアフィニティークロマトグラフィーで解析し、数種類のタンパク質が高い DNA 結合能をもつことがわかった。これらの結果を比較したところ、56-、38-、34-kDa タンパク質が Glom と同様の挙動を示したため、ミトコンドリア核様体の構築に関わる可能性の高いタンパク質として着目し解析することにした (表 1、図 1)。

それぞれを Pmn56、Pmn38、Pmn34 (*Physarum polycephalum* mitochondrial nucleoid protein 56, 38, 34) と名付けた。

表1. ミトコンドリア核様体の構築に関わるDNA結合タンパク質の候補

解析方法	ミトコンドリア核様体タンパク質 (kDa)
NaCl 処理	Glom (41), 38, 56, 60, 68, 70, 90, 130, 170
DNase処理	Glom (41), 20, 31, 34, 38, 40, 40.5, 52, 56, 90
DNA セルロースアフィニティークロマトグラフィー (0.3M NaCl)	Glom (41), 34, 38, 56, 70, 95
(0.4M NaCl)	Glom (41), 56

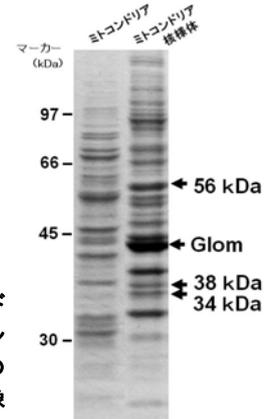


図1 単離ミトコンドリアと単離ミトコンドリア核様体の SDS-PAGE 泳動像

### 2. 新規ミトコンドリア核様体タンパク質 Pmn56、Pmn38、Pmn34 の機能解析

#### 1) 一次構造の決定

各遺伝子を同定するため、アミノ酸シーケンス法により N 末端と内部アミノ酸配列を決定した。それを基に cDNA を鋳型として degenerate PCR、5'-RACE、3'-RACE を行い、全長塩基配列を決定した。BLAST 検索の結果、Pmn56 の N 末端側半分は Mgm101 ドメインに高い相同性を持ち、C 末端側半分には特徴的なポリプロリン配列 (PPPP) をもっていた。Mgm101 ドメインは、酵母や粘菌、一部の動物、細菌に広く保存されるタンパク質で、酵母での解析では mtDNA 複製や修復への関与が示唆されている。Pmn38 は機能未知であり、Pmn34 は 3'-5' エキソヌクレースに広く保存される DEDD (DnaQ-like) モチーフをもつタンパク質であった (図 2)。

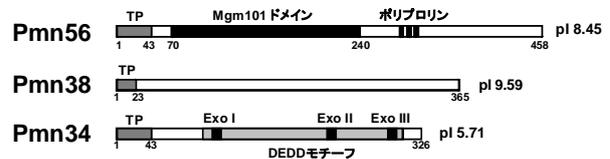


図2 Pmn56, Pmn38, Pmn34 の一次構造  
TP, ミトコンドリア移行シグナル

#### 2) 細胞内局在解析

細胞分画を行い、各タンパク質に対する抗体を作製してウェスタンブロット解析を行ったところ、Pmn56 と Pmn38 は、ミトコンドリア核様体画分に特異的に検出された。一方、Pmn34 はミトコンドリア内の核様体以外の画分にも検出された。細胞免疫染色を行ったところ、Pmn56 と Pmn38 は、Glom と同様にミトコンドリア核様体全体に均質に局在し、さらに Pmn38 は細胞核にも局在していた。Pmn34 は、RNA の局在が示唆されるミトコンドリア核様体の表層領域に特異的に局在していた (図 3)。

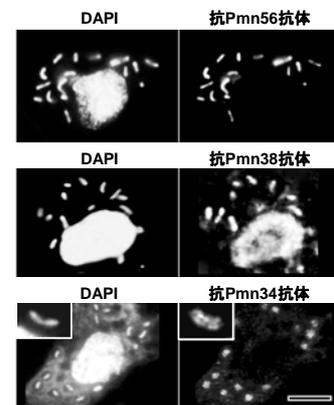


図3 抗 Pmn56, Pmn38, Pmn34 抗体を用いた細胞免疫染色像 Scale bar, 5μm.

### 3) DNA 結合能・DNA 凝縮能解析

大腸菌で強制発現させ精製した各タンパク質と、mtDNA または  $\lambda$ DNA を用いてゲルシフト解析を行ったところ、3 種類のタンパク質全てが配列非特異的に DNA に結合した。各タンパク質と DNA の混合液を蛍光顕微鏡で観察したところ、Pmn56、Pmn38 を添加した時に、DNA の凝縮が観察された。このように、Pmn56 と Pmn38 は、Glom と同様に mtDNA 全体に結合し凝縮させる能力をもっていたことから、それぞれ Glom2、Glom3 と名付けた。それにともない Glom を Glom1 とした。

### 3. ミトコンドリア核様体の主要構成タンパク質 Glom1 と Glom2 の機能解析

Glom1 と Glom2 は、ミトコンドリア核様体の主要構成成分であり、生体内での存在量は、それぞれ mtDNA20bp、100bp あたり 1 分子に相当する。両者がどのようにミトコンドリア核様体の構築や mtDNA の機能発現制御に関わっているか解析を行った。

#### 1) Glom1 と Glom2 による DNA 凝縮能解析

精製した両タンパク質を、生体内での存在量比となるように mtDNA に添加し、蛍光顕微鏡により観察した。興味深いことに、両者が共存することで相乗的に DNA 凝縮が強まった。

#### 2) アンチセンスオリゴによる遺伝子発現抑制法の開発

生体内での機能を解析するために、遺伝子発現抑制法の検討を行った。以前に報告のあった siRNA のインジェクションによる RNA 干渉法を試みたが、明瞭な発現抑制効果が認められなかった。そこで、DNase 耐性をもつ DNA 類似体のモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) のマイクロインジェクションを行った。真正粘菌の二倍体の変形体は、巨大な多核単細胞であるため、実顕微鏡下で変形体の一部に容易に MO を導入でき、導入した MO は、2 時間以内に細胞全体に行き渡った (図 4A)。また、変形体の一部を採取しても生育に影響しないため、単一の変形体からの経時的サンプリングを行い、ウエスタンブロット解析により標的遺伝子の発現量変化を調べた。その結果、MO 導入後 1 日目から 7 日目まで発現抑制効果がみられ (図 4B)、5.5 日目に再度 MO 導入を行うことで、その効果は延長され、12 日目で十分な発現抑制効果を維持していた (図 4C,D)。また MO を混合して導入することで、複数の標的遺伝子の同時発現抑制にも効果があった (図 4D)。

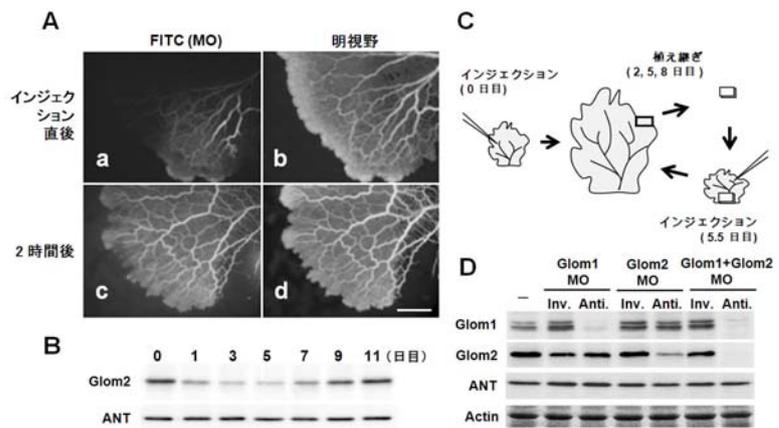


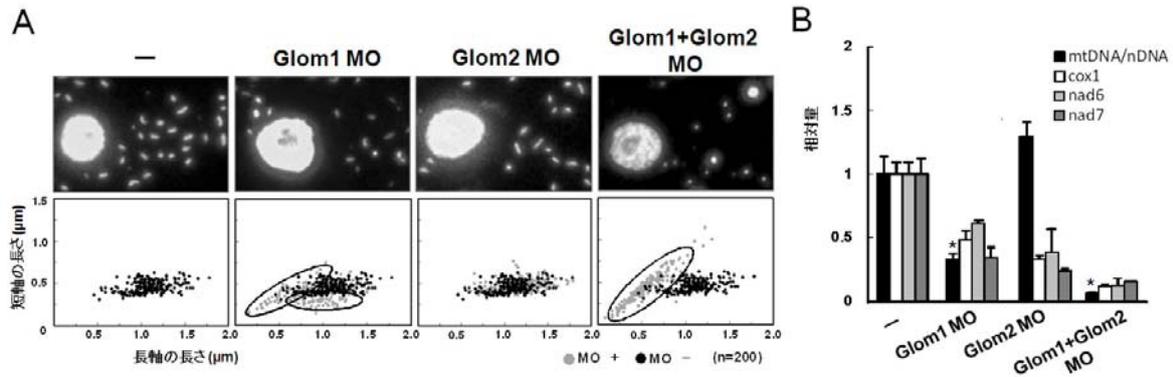
図4 MO のマイクロインジェクションによる標的遺伝子の発現抑制

(A) MO 導入直後(a,b)と 2 時間後(c,d)の変形体 Scale bar, 1cm.  
(B) MO 導入後 0-11 日目の Glom2 の発現抑制効果 (C) タイムコース  
(D) MO 導入後 12 日目の Glom1 と Glom2 の発現抑制効果

### 3) Glom1 と Glom2 の発現抑制解析

細胞を DAPI 染色し、蛍光観察したところ、Glom1 の発現抑制細胞では、ミトコンドリア核様体の形態が細くまたは短く変化する傾向がみられた。Glom1 と Glom2 を同時に発現抑制した細胞では、ほぼ全てのミトコンドリア核様体が顕著に小さくなり、ドット状へと変化した (図 5A)。この時の mtDNA コピー数を定量的 PCR によって計測したところ、Glom1 の発現抑制細胞では 33%、Glom1 と Glom2 の同時発現抑制細胞では 5.5%まで有意に減少していた。一方で、mRNA

蓄積量を定量的 RT-PCR によって計測したところ、Glom2 の発現抑制細胞において、mtDNA 量あたりの mRNA 量が顕著に減少していた(図 5B)。また、Glom2 の発現抑制細胞において mtDNA 修復酵素 RecA の発現量が増加した。そこで Glom2 の mtDNA 修復への関与を解析するため、細胞を過酸化水素で処理し、酸化ストレスを与えたところ、細胞の増殖速度の低下にともなって Glom2 の細胞内存在量が約 2 倍に増加することがわかった。



**図5 Glom1 と Glom2 の発現抑制がミトコンドリア核様体に及ぼす影響**

(A) ミトコンドリア核様体の形態変化 (B) mtDNA コピー数の変化とミトコンドリア mRNA (cox1, nad6, nad7) の蓄積量の変化 (\*未処理細胞に対して有意差あり)

## 結論

ミトコンドリア核様体は、mtDNAの転写・複製・修復などの機能発現を支える重要な構造基盤であるが、その構築や、mtDNAの機能発現への関与についてほとんどわかっていなかった。今回、高度に発達したミトコンドリア核様体をもつ真正粘菌を用いてミトコンドリア核様体の新規構造タンパク質Glom2、Glom3、Pmn34を同定し、以下のことを明らかにした。

1. Glom2、Glom3、Pmn34は、mtDNAに対して配列非特異的に結合する。
2. Glom2とGlom3は、DNA凝縮能をもち、ミトコンドリア核様体全体に局在することから、mtDNA全体の構築に関わる構造タンパク質である。
3. Pmn34は、ミトコンドリア核様体表層に特異的に局在することから、特定の領域で機能する構造タンパク質である。
4. 真正粘菌の変形体において、モルフォリノアンチセンスオリゴをマイクロインジェクションすることにより、効率的に標的遺伝子を発現抑制できる。
5. Glom1は、単独でミトコンドリア核様体構造の構築とmtDNAの維持に関与する。
6. Glom2は、Glom1と協調して、ミトコンドリア核様体構造の構築とmtDNA量の維持に関与する。さらに単独で、mRNA量の維持に関与する。