

論文審査の結果の要旨

氏名 伊藤 喜重

本論文は 3 章から構成され、第 1 章では、ミトコンドリア核様体の構築に関わる構造タンパク質候補の探索、第 2 章では 3 種類の新規構造タンパク質 (Pmn56/Glom2、Pmn38/Glom3、Pmn34) の同定、第 3 章では主要構造タンパク質 Glom1 と Glom2 の核様体構築への協調的な関与について述べられている。

真核細胞のもつミトコンドリア DNA (mtDNA) は、生体内でタンパク質によって折りたたまれ凝縮した「核様体」として存在する。核様体の内部で、mtDNA の転写、複製、修復といった機能発現制御が行われるが、その基盤となる核様体の分子構築については殆ど明らかでなかった。本研究は、発達した巨大ミトコンドリア核様体をもつ原生生物の真正粘菌 (*Physarum polycephalum*) をモデルとし、核様体構築の解明を目標として進められた。

これまで、ヒトを含む高等生物や酵母、真正粘菌での解析から、ミトコンドリア核様体を構築する構造タンパク質として、各生物で 1 種類の HMG タンパク質が同定されていた。しかし、それだけでは核様体構築に不十分であり、依然として核様体の分子構築の全体像は不明確であった。

第 1 章では、構造解体法と DNA 結合能解析を用いることで、単離核様体を構成しているタンパク質からの更なる構造タンパク質候補の絞り込みが行われた。結果を比較することで、既知の構造タンパク質 Glom1 (HMG タンパク質) と同様の性質をもつ 3 種類のタンパク質の特定に成功した。それらのタンパク質は、核様体に占める量も多く、構造タンパク質として機能する可能性を強く示唆するものだった。

第 2 章では、構造タンパク質候補として見出した 3 種類のタンパク質 (Pmn56、Pmn38、Pmn34) について、遺伝子配列の決定と機能解析が行われた。真正粘菌のゲノム情報はまだ解読されておらず、遺伝子配列の決定は困難であるが、ペプチドシーケンス法、Degenerate PCR 法、RACE 法を用いることで、3 種類のタンパク質の配列決定に成功した。さらに細胞内局在と生化学的性質が詳細に解析された結果、Pmn56 と Pmn38 は mtDNA 全体の構築に関わる新規構造タンパク質であり、Pmn34 はミトコンドリア核様体の表層領域で機能するリボヌクレースであることが明らかにされた。これらは、HMG タンパク質以外の構造タンパク質として初めて同定されたものであり、さらには核様体の内部構造が機能的に区画化されていることを初めて示唆するものであった。

第 3 章では、複数の構造タンパク質が核様体を構築していることの意義を見出すため、特に存在量の多い Glom1 と Glom2 に着目して核様体への関与について詳細に解析された。In vitro での mtDNA 凝縮能解析の結果、両タンパク質が共存す

ることで、mtDNA を相乗的に凝縮させることが明らかにされた。さらに、in vivo での機能を解析するため、真正粘菌における標的遺伝子の発現抑制法の新規開発が行われた。開発された発現抑制法は、DNA 類似体である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による方法で、その DNase 耐性から MO は生体内で安定に存在し、従来の方法より効率的で持続的な発現抑制を可能にした。また、巨大多核単細胞という真正粘菌のユニークな特性から単一細胞からの経時的サンプリングも可能であり、開発された方法は大変魅力的な実験系であった。この手法を用いた発現抑制解析によって、Glom1 は単独で、Glom2 は Glom1 と協調して、核様体の形態と mtDNA コピー数維持に重要に機能することが示された。さらに、Glom2 は mRNA 蓄積量の維持と DNA 修復への関与も示唆された。これらは、ミトコンドリア核様体が独自の機能をもつ複数の構造タンパク質により協調的に構築されていることを初めて示すものである。今後、mtDNA の複製、転写、修復、翻訳といった様々な機能に関わる個々のタンパク質の解析と、それらの相互作用解析を通して、mtDNA の機能と関連した核様体の分子構築の全貌を明らかにしていけるものと考えられる。

さらに、本研究の対象とされた真正粘菌のミトコンドリア核様体は、高等生物や菌類と、主要構造タンパク質 (HMG タンパク質) が共通しているだけでなく、mtDNA の転写・複製・修復を担う重要な酵素類についても高く保存されている。また、真正粘菌は進化的に全真核生物の基部に位置することからも、本研究によって得られた核様体構築に関する知見は、真核生物全般の核様体構築を理解していくうえでも重要であると考えられる。

なお、本論文は、泉亜紀子、森稔幸、堂前直、由比良子、佐野桂、金岡雅浩、黒岩晴子、黒岩常祥、東山哲也、室伏きみ子、佐々木成江、河野重行との共同研究であるが、本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あり、本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。