

令和元年6月10日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07168

研究課題名(和文) 分裂酵母ミトコンドリアDNA結合タンパク質の機能解析と進化的考察

研究課題名(英文) Function and evolution of mitochondrial DNA-binding protein in the fission yeast

研究代表者

宮川 勇 (MIYAKAWA, Isamu)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：50136165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：酵母のミトコンドリアDNA(mtDNA)結合タンパク質の進化を明らかにするために、分裂酵母*S. pombe*から同定したCmb1の機能を、出芽酵母*S. cerevisiae*のAbf2pと比較して解析した。Cmb1とAbf2pの発現量を変えて、*S. cerevisiae* abf2欠損株が示すmtDNAの不安定性を相補できるかを調べた。その結果、abf2欠損株が示すミトコンドリア核様体の形態異常、呼吸活性の高温感受性、エチジウムブロミド感受性の相補性に関して、Cmb1とAbf2pの違いが認められた。この結果は、酵母の進化の過程でmtDNA結合タンパク質の機能が多様化したことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは、細胞が必要とするエネルギーの大部分を生産する重要な細胞小器官である。近年、ミトコンドリア遺伝子の突然変異や欠失がミトコンドリアの機能低下をもたらし、ヒトの疾病、老化、寿命に関与することが明らかになるとともに、ミトコンドリアに対する社会的関心が高まっている。そして、ミトコンドリアDNAを毒性のある活性酸素から保護するミトコンドリア核様体構造の重要性も理解され始めている。本研究の成果は、ミトコンドリア核様体を構成する主要なDNAタンパク質によるミトコンドリアDNAの安定化の仕組みの一端を解明するものであり、ヒトのミトコンドリア研究への貢献も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)： We identified Cmb1 as a mitochondrial DNA-binding protein in the fission yeast, *S. pombe*. In order to reveal the evolution of the mitochondrial DNA-binding protein, we compared the function of Cmb1 to that of Abf2p, a major mitochondrial DNA-binding protein of the budding yeast, *S. cerevisiae*. We examined whether Cmb1 at the different expression levels can complement the instability of mitochondrial DNA in the abf2-deficient cells of *S. cerevisiae*. As a result, we demonstrated that Cmb1 and Abf2p show different complementation against the abnormal morphology of mitochondrial nucleoids, loss of respiratory activity in high temperature, and high sensitivity against ethidium bromide of abf2-deficient cells. These results indicate that the function of the mitochondrial DNA-proteins diverged during evolution of the yeasts.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分裂酵母 ミトコンドリア ミトコンドリア核様体 Cmb1 Abf2p ミトコンドリアゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア・ゲノムは細胞内では特異的な DNA 結合タンパク質によって折り畳まれて、ミトコンドリア核様体 (mt 核様体) 構造を形成している。mt 核様体研究は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で詳しく行われており、mt 核様体の主要な構成タンパク質である Abf2p は、HMG box ドメインを 2 つ保持する DNA 結合タンパク質であることが分かっている。筆者らは他種の出芽酵母を用いた mt 核様体タンパク質の解析から、Abf2p ホモログはミトコンドリアタンパク質の中でも非常に変異速度が速いタンパク質であることを明らかにしていた。筆者らはさらに解析範囲を広げ、*S. cerevisiae* とは分子系統樹で遠く離れた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* から Abf2p ホモログとして Cmb1 を同定することに成功した。Cmb1 はすでに核 DNA の修復に働くタンパク質として報告されていたが、筆者らはミトコンドリア DNA (mtDNA) 結合タンパク質の進化を考える上で Cmb1 と Abf2p の両者の機能解析が重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

出芽酵母の mtDNA は主として DNA 結合タンパク質 Abf2p によって折り畳まれ、mt 核様体を形成している。ミトコンドリアは呼吸にともなう活性酸素発生の主要な場であるため、mt 核様体タンパク質の結合によって mtDNA を保護する機構は極めて重要である。筆者らは、これまで出芽酵母の mt 核様体を研究していたが、分裂酵母 mt 核様体研究に着手し、mtDNA 結合タンパク質 Cmb1 を同定した。本研究では、Cmb1 の機能を解析し、その機能を Abf2p で得られた知見と比較することで、mtDNA 結合タンパク質の進化過程を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 分裂酵母 *S. pombe* の栄養成長定常期細胞から、分画遠心法と sucrose 密度勾配遠心法によって mt 核様体を単離し、mt 核様体に結合している Cmb1 の分析を行った。

(2) Cmb1 と Abf2p の機能の共通性と多様性を調べるために、出芽酵母の *abf2* 欠損株 (*abf2* 株) に Cmb1 を形質転換により導入して発現させ、mt 核様体形態の異常、高温培養による mtDNA の不安定性、mtDNA の欠損により呼吸欠損を誘導する薬剤エチジウムプロミドに対する感受性の 3 点について、Abf2p の発現と比較して、DAPI 染色による蛍光顕微鏡観察およびスポットアッセイ法により詳しく解析した。

(3) その目的のために、Cmb1 と Abf2p を通常量発現させた場合と過剰発現させた場合の両方の条件での比較を行った。通常量の発現のためには、シングルコピープラスミド pRS316 に Abf2 のプロモーターとミトコンドリア輸送シグナルをもった Cmb1 を組み込んだプラスミドを作成した。また、過剰発現株の作成には、Gal1 プロモーターによって、培地へのガラクトース添加で遺伝子の発現誘導ができる pYES2/CT プラスミドを用いた。Abf2p と Cmb1 の検出は、筆者らが作成した抗 Abf2p および抗 Cmb1 ポリクローナル抗体を用いた Western blotting により行った。

(4) 分裂酵母 *S. pombe* の野生株と、筆者らが作成した *cmb1* 遺伝子破壊株 (*cmb1* 株) の違いを、栄養成長、呼吸活性、mt 核様体の形態、ミトコンドリアの形態、シスプラチンおよびエチジウムプロミドに対する感受性の比較によって詳細に調べた。

(5) *S. pombe* 野生株と *cmb1* 株のミトコンドリア遺伝子の転写活性の違いを、それぞれの細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により測定した。

(6) 分裂酵母 4 種のうち、*Schizosaccharomyces japonicus* の生活環全般における mt 核様体の形態を DAPI 染色法により観察した。次に、新規に Abf2p 様の mtDNA 結合タンパク質を同定するために、栄養成長定常期細胞より分画遠心法と sucrose 密度勾配遠心法により mt 核様体を単離した。そして、mt 核様体の酸抽出によって得られたタンパク質の中から SDS-DNA-PAGE 法によって DNA 結合タンパク質を検出し、質量分析法によって分析した。

## 4. 研究成果

(1) 単離した mt 核様体を用いて Cmb1 の性質を明らかにした。mt 核様体分画に Cmb1 が濃縮されていること、0.4 M 以上の NaCl 濃度で Cmb1 が mt 核様体から遊離すること、mt 核様体の DNase I 処理によって Cmb1 が mt 核様体から遊離することを明らかにした。

(2) Cmb1 を過剰発現した *S. cerevisiae abf2* 欠損株 (*abf2* 株) から mt 核様体を単離して、Cmb1 が mt 核様体に結合していることを Western blotting により明らかにした。また、蛍光抗体法を用いても、Cmb1 が *S. cerevisiae* の mt 核様体に局在することを示した。

(3) Cmb1 と Abf2p は相同性が非常に低く、両者のアミノ酸配列の一致度は 18%しかない。Cmb1 は HMG box を 1 つ保持し、Abf2p は 2 つ保持するという違いがある。Cmb1 と Abf2p には機能的な違いを明らかにするため、Cmb1 と Abf2p の発現量を変えて、*S. cerevisiae* *abf2* 株の表現型に対する相補性を調べた。作成したシングルコピープラスミド pRS316 には *ABF2* 遺伝子のプロモーターと *ABF2* のミトコンドリア輸送配列をもった *Cmb1* ORF もしくは *ABF2* ORF が組み込まれているので、もし、両者の相補性に違いが出れば、それは発現量や輸送シグナルの問題ではなく、タンパク質の機能的違いを反映していると考えられる。

(4) その結果、シングルコピーでの遺伝子発現では、*abf2* 株が示す 37 での mt 核様体の異常形態、呼吸活性の高温感受性、エチジウムプロミド感受性の増加を Cmb1 の発現は相補しなかったが、Abf2p の発現は相補した。この結果は、*S. cerevisiae* の mtDNA 安定性に対する Cmb1 と Abf2p の機能が異なることを示唆する。

(5) 一方、Cmb1 の過剰発現は、mt 核様体の形態異常、呼吸能の高温感受性、エチジウムプロミド感受性の増加を相補したが、Abf2p の過剰発現はいずれの表現型も相補しなかった。このように *S. cerevisiae* における Cmb1 と Abf2p の機能的違いを明確に示すことができた。

(6) Cmb1 の機能を解析するために、*S. pombe* の野生株と *cmb1* 遺伝子破壊株 (*cmb1* 株) を用いて、Cmb1 欠損による影響を調べた。*S. pombe* の野生株と *cmb1* 株では、30 での培養では成長曲線、mt 核様体の形態、呼吸活性に差はなかった。一方、シスプラチン感受性は、*cmb1* 株は野生株より 2 倍高いことが分かった。Cmb1 の欠損により 1 細胞あたりの mt 核様体数が有意に減少していることを明らかにした。

(7) 35 または 37 の高温培養で、*S. pombe* 野生株よりも *cmb1* 株で mt 核様体の凝集が顕著であることを定量的に明確にした。しかし、野生株と *cmb1* 株では細胞の成長と呼吸活性に顕著な差はなかった。*cmb1* 株では、凝集した mt 核様体がミトコンドリアの一部に偏って局在しており、mt 核様体の分配異常が示唆された。

(8) *S. pombe* の mtDNA にコードされている *cox2*, *atp6*, 21SrRNA 遺伝子の転写量を RT-PCR により比較した結果、Cmb1 の有無はミトコンドリア遺伝子の転写量に影響しないことが示唆された。

(9) 出芽酵母 *S. cerevisiae* では、Abf2p の N 末端側半分あるいは C 末端側半分の *abf2* 欠損株 (*abf2* 株) で発現させると、*abf2* 株の呼吸依存的な成長と温度ストレス感受性を相補することが知られている。一方、Cmb1 タンパク質の N 末端側半分あるいは C 末端側半分の発現では、*abf2* 株の性質を相補するかは調べられていない。そのために、Abf2p の輸送シグナルをもつ Cmb1N 末端側と C 末端側を組み込んだプラスミドをそれぞれ作成し、*abf2* 株で発現させた。その結果、Cmb1 の N 末端側および C 末端側ともに、*abf2* 株の表現型を相補しなかったことから、Abf2p と Cmb1 の機能的違いが示された。

(10) 分裂酵母 4 種の 1 種 *Schizosaccharomyces japonicus* の生活環での mt 核様体の動態を DAPI 染色による蛍光顕微鏡観察により明らかにした。その結果、*S. japonicus* の mt 核様体は、*S. pombe* の mt 核様体よりも染色性に優れていることを明らかにした。

(11) *S. japonicus* から mt 核様体を単離し、単離 mt 核様体の DNA 結合タンパク質の分析から、*S. japonicus* の Abf2p ホモログを初めて同定することに成功した。このタンパク質はミトコンドリア輸送シグナルを N 末端に保持し、HMG box ドメインを 2 つ保持すること、およびこのタンパク質をコードする遺伝子にはイントロンが存在することを明らかにした。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 6 件 )

(1) 宮川 勇 酵母生活環におけるミトコンドリア核様体の形態およびミトコンドリア核様体の組織化 *Plant Morphology*, 査読無, 30, 2018, pp.65-72.

DOI: doi.org/10.5685/plmorphol.30.65

(2) Miyakawa, I. Organization and dynamics of yeast mitochondrial nucleoids. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 査読有, 93, 2017, pp. 339-358. DOI: 10.2183/pjab.93.021

(3) Okamoto, S., Inai, T., Miyakawa, I. Morphology of mitochondrial nucleoids in respiratory-deficient yeast cells varies depending on the unit length of the mitochondrial

DNA sequence. FEMS Yeast Research, 査読有, 16, 2016, fow055  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fow055>

(4) Kuroiwa, T., Ohnuma, M., Imoto, Y., Misumi, O., Nagata, N., Miyakawa, I., Fujishima, M., Yagisawa, F., and Kuroiwa, H. Genome size of the ultrasmall unicellular freshwater green alga, *Medakamo hakoo* 311, as determined by staining with 4', 6-diamidino-2-phenylindole after microwave oven treatments: II Comparison with *Cyanidioschyzon merolae*, *Saccharomyces cerevisiae* (n, 2n), and *Chlorella variabilis*. Cytologia, 査読有, 81, 2016, pp. 69-76. DOI: 10.1508/cytologia.81.69

(5) Miyakawa, I., Yagi, R., Sugihara, K., Inai, T. Sporulation culture of spheroplasts disturbs the formation of normal spore pairs in *Saccharomycodes ludwigii*. Cytologia, 査読有, 81, 2016, pp. 47-52. DOI: 10.1508/cytologia.81.47

(6) Pontieri, P., Stefano, M. D., Massardo, zD. R., Gunge, N., Miyakawa, I., Sando, N., Pignone, D., Pizzolante, G., Romano, R., Alifano, P., Del Guidice, L. Tellurium as valuable tool for studying the prokaryotic origins of mitochondria. Gene, 査読有, 559, 2015, pp. 177-183. DOI: 10.1016/j.gene.2015.01.060

〔学会発表〕(計 26 件)

(1) 川合正士、宮川 勇、分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* ミトコンドリア核様体からの DNA 結合タンパク質の同定、日本植物学会第 82 回大会、2018

(2) 宮川 勇、松原健人、林 翔太、川合正士、分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* の生活環におけるミトコンドリア核様体の動態、日本植物形態学会第 30 回大会、2018

(3) 市來芙美、宮川 勇、グルコース抑制と酵母ミトコンドリア形態変化の関連、第 35 回 YEAST WORKSHOP、2017

(4) 河野智行、宮川 勇、酵母 *Yarrowia lipolytica* のミトコンドリア DNA 結合タンパク質 Mhb1 の機能解析、第 35 回 YEAST WORKSHOP、2017

(5) 川合正士、宮川 勇、分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* ミトコンドリア核様体構成タンパク質の同定、第 35 回 YEAST WORKSHOP、2017

(6) 田浦 花、宮川 勇、出芽酵母の呼吸欠損に関わるタンパク質の同定、日本植物学会第 81 回大会、2017

(7) 岡本 哲、宮川 勇、酵母ミトコンドリア DNA の複製起点に結合するミトコンドリア核様体タンパク質の解析、日本植物学会第 81 回大会、2017

(8) 宮川 勇、酵母生活環におけるミトコンドリアとミトコンドリア核様体の動態およびミトコンドリア核様体の組織化、日本植物形態学会第 29 回大会、2017

(9) 河野智行、宮川 勇、酵母 *Yarrowia lipolytica* のミトコンドリア DNA 結合タンパク質欠損株の表現型、中国四国地区生物系三学会合同大会高知大会、2017

(10) 市來芙美、宮川 勇、グルコース枯渇による酵母ミトコンドリアの形態変化、中国四国地区生物系三学会合同大会高知大会、2017

(11) 宮崎 章、井内智美、宮川 勇、分裂酵母ミトコンドリア HMG-box protein, Cmb1 の機能解析、第 34 回 YEAST WORKSHOP、2016

(12) 原口 明、井内智美、宮川 勇、出芽酵母におけるミトコンドリア核様体タンパク質の高発現の影響、第 34 回 YEAST WORKSHOP、2016

(13) 宮川 勇、柴田康宏、井内智美、ミトコンドリアを同調的に融合・分裂させるための酵母の培養方法とその解析、日本植物学会第 80 回大会、2016

(14) 宮崎 章、井内智美、宮川 勇、分裂酵母ミトコンドリア核様体タンパク質 Cmb1 欠損株の表現型、中国四国地区生物系三学会合同大会鳥取大会、2016

(15) 原口 明、井内智美、宮川 勇、酵母 abf2 欠損株におけるミトコンドリア核様体タンパク質の高発現の影響、中国四国地区生物系三学会合同大会鳥取大会、2016

(16) 岡本 哲、井内智美、宮川 勇、酵母呼吸欠損株から単離した二種類のミトコンドリア核様体の解析、第 33 回 YEAST WORKSHOP、2015

(17) 田浦 花、井内智美、宮川 勇、出芽酵母 Nuc2p の細胞内局在とヌクレアーゼ活性の解析、第 33 回 YEAST WORKSHOP、2015

(18) 窪田沙世、井内智美、宮川 勇、ヒト・アルデヒド脱水素酵素 ALDH2 の出芽酵母での発現とミトコンドリア封入体形成の解析、第 33 回 YEAST WORKSHOP、2015

(19) 宮川 勇、松尾英理香、八木瞭太郎、井内智美、出芽酵母 *Saccharomycodes ludwigii* から単離した孢子対接着構造の性質、日本植物学会第 79 回大会、2015

(20) 井内智美、宮川 勇、出芽酵母の変異型アルデヒド脱水素酵素を用いたミトコンドリア封入体形成機構の解析、日本植物学会第 79 回大会、2015

(21) 田浦 花、井内智美、宮川 勇、NUC2 高発現株のミトコンドリア形態と Nuc2p の細胞内局在の解析、日本植物学会第 79 回大会、2015

(22) 岡本 哲、井内智美、宮川 勇、酵母呼吸欠損株から単離した二種類のミトコンドリア核

様体の性質、日本植物学会第 79 回大会、2015

(23) 田浦 花、井内智美、宮川 勇、酵母 *NUC2* 高発現株のミトコンドリア形態とエチジウムプロミド感受性変化、中国四国地区生物系三学会合同大会愛媛大会、2015

(24) 岡本 哲、井内智美、宮川 勇、酵母呼吸欠損株の単離ミトコンドリア核様体の解析、中国四国地区生物系三学会合同大会愛媛大会、2015

(25) 井内智美、宮川 勇、出芽酵母におけるミトコンドリア封入体の構成因子の解析、中国四国地区生物系三学会合同大会愛媛大会、2015

(26) 宮川 勇、松尾英理香、八木瞭太郎、井内智美 酵母 *Saccharomyces ludwigii* の胞子対接着構造の単離、中国四国地区生物系三学会合同大会愛媛大会、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。