

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14559

研究課題名(和文)オルガネラソート技術開発によるミトコンドリア母性遺伝の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of maternal inheritance of mitochondrial DNA using developed organelle sorter system

研究代表者

佐々木 成江 (SASAKI, NARIE)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：20359699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの母性遺伝は、様々な真核生物に共通に見られる現象である。本研究では、母性遺伝の鍵分子であるDNAヌクレアーゼを同定するために、大型のミトコンドリア核様体を持つ真正粘菌を用い、セルソーターを応用した「オルガネラソーター」の技術を開発し、接合子内でDNAが消去されつつある父方由来のミトコンドリア分画を目指した。しかし、回収段階でミトコンドリアが破壊されてしまうため、分画せずにミトコンドリア内のタンパク質をnanoLC-MS/MSを用いたショットガンプロテオミクスにより解析した。その結果、エンドヌクレアーゼGを含む9種類のDNAヌクレアーゼを同定することができた。

研究成果の概要(英文)：In many eukaryotes, mitochondrial DNA (mtDNA) is inherited maternally, which is called maternal inheritance. For maternal inheritance, selective digestion of mtDNA in paternal mitochondria is essential. However, it is unknown how mtDNA in paternal mitochondria is selectively digested by DNase after zygosis or fertilization. In this study, to identify DNase involved in maternal inheritance of mtDNA, we tried to fractionate paternal mitochondria which had no mtDNA from zygote of *Physarum polycephalum* using cell sorter. Since mitochondria were destroyed in the cell sorter, we couldn't fractionate. Then, we performed proteome analysis of isolated mitochondria from zygote by nanoLC-MS/MS. We identified nine DNases in isolated mitochondria from zygotes that had mitochondria without mtDNA.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：母性遺伝 ミトコンドリア ヌクレアーゼ

1. 研究開始当初の背景

多くの真核生物においてミトコンドリア DNA (mtDNA) は、母方のみから子孫に受け継がれる。この現象を母性遺伝という。近年、様々な生物において、母性遺伝にはヌクレアーゼによる父方 mtDNA の選択的分解や、ユビキチンやオートファジーなどによる父方ミトコンドリアの選択的分解が重要な働きをしていることが示されている。特に、父方 mtDNA の選択的分解は、ミトコンドリア分解よりも必ず先立って生じており、母性遺伝の引き金となる重要なステップであると予想される。しかし、父方 mtDNA の選択的分解の分子メカニズムについては解明されておらず、母性遺伝に必要なヌクレアーゼは未だに同定されていない。

真正粘菌では、接合後に父方由来のミトコンドリア内の核様体のみが一斉に消失することから、この時期の父方ミトコンドリア内に母性遺伝に関わるヌクレアーゼが存在すると考えられる。これまでに、光ピンセットを用いて顕微鏡下で核様体が消失している父方ミトコンドリアのみを回収できることは報告されている (Moriyama et al., 2003)。しかし、この方法では大量回収ができないために生化学的手法によりヌクレアーゼを同定することは不可能である。

2. 研究の目的

本研究では、母性遺伝における父方 mtDNA の選択的分解の分子メカニズムを明らかにするために、フローサイトメーターを用いてミトコンドリア内の微量な DNA を高感度に定量し回収するオルガネラソーターシステムを構築し、母性遺伝に関するヌクレアーゼの同定を目指した。

3. 研究の方法

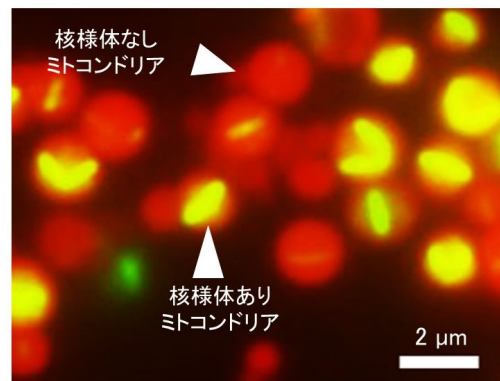
本研究では、生化学的アプローチにより母性遺伝に関するヌクレアーゼを同定するために、大型のミトコンドリア核様体 (mtDNA-タンパク質複合体) を持つ真正粘菌を材料として用いた。真正粘菌のミトコンドリア核様体は、他の生物と比較して 50 - 100 倍の mtDNA 量を含み、タンパク質も大量に含まれている。実際、これまでに申請者は、真正粘菌から高純度のミトコンドリア核様体単離法を確立し、プロテオミクス解析することにより、複製・転写・翻訳・修復・組換えに関わる 60 種類以上のタンパク質の同定に成功している。これは、ヒトや酵母を用いたミトコンドリア核様体のプロテオミクス解析で同定されたタンパク質よりも 3 - 5 倍多い。まず、真正粘菌の配偶子 (アメーバ) を高効率で接合させ、父方由来のミトコンドリア核様体が分解している時期からミトコンドリアを単離し、フローサイトメーターで DNA を定量することで、mtDNA が著しく減少している父方のミトコンドリアのみを分画を試みた。さらに、候補となる DNA ヌクレアーゼを同定する

ために、質量分析による単離ミトコンドリアのプロテオミクス解析を行った。

4. 研究成果

まず、母性遺伝における父方 mtDNA の消失時期を詳細に調べた。そのために、あらかじめアメーバのミトコンドリア核様体を生体染色し、接合過程を経時観察した。様々な DNA 生体染色試薬を用いたところ、Hoechst33342 では、核様体を可視化することができなかったが、SYTO11、SYTO64、SYBR Green I では核様体を特異的に可視化することができた。また、SYBR Green I は、SYTO11 よりも輝度が高く、SYTO64 よりも退色が遅かったため、SYBR Green I を用いて解析を行うことにした。経時観察の結果、アメーバを混合して 1-2 時間目で細胞融合が生じ、2.5-4.5 時間目で核膜の融合が生じ、3.5 - 5 時間目で核小体の融合が生じていることが分かった。また、核様体の消失は、核小体融合期に観察された。

次に、セルソーターを用いてミトコンドリアを分画するために、ミトコンドリア単離法の改良を行った。すでに報告された単離法では、単離バッファー内で細胞が急速にシストと呼ばれる固い壁をもつ状態になるため、単離が困難であった。単離バッファーを検討した結果、浸透圧調整のためのスクロースをマンニトールに変更し、4 に冷却することでシスト形成を大幅に遅らせることに成功した。その結果、ミトコンドリアを効率よく単離できるようになった。アメーバを混合して、5 時間目の細胞からミトコンドリアを単離し、単離ミトコンドリアを SYBR Green I とミトコンドリア染色試薬である Mito Tracker Red で染色すると、下記のような核様体なしのミトコンドリアと核様体ありのミトコンドリアを観察することができた。



これらのサンプルをセルソーターに用いた。セルソーターのレーザーパワーやサンプルプレッシャーを検討することで、核様体が消失した父方のミトコンドリアと消失していないミトコンドリアとを区別して検出することができた。しかし、ソーティングの過程で、ミトコンドリアが破壊され回収することができなかった。今回使用しているセルソーターは、液滴を作成する際に超音波を利用しており、その衝撃によりミトコンドリアの破壊が生じている可能性が考えられる。よっ

て、現在、液滴形成することなく、よりマイルドに分画できるマイクロ流体デバイスを用いたミトコンドリア分画法の開発を目指している。

核様体が消失した父方のミトコンドリアをオルガネラソーターにより分画することができなかったため、単離したミトコンドリアを分画せずに、そのまま nanoLC-MS/MS を用いてショットガンプロテオミクス解析を行った。その結果、エンドヌクレアーゼ G を含む 9 種類の DNA ヌクレアーゼを同定した。エンドヌクレアーゼ G は、ミトコンドリアの膜間に存在し、アポトーシス時に細胞核に移行し核 DNA を分解することが知られているが、最近、線虫において受精後に父方ミトコンドリア内膜が崩壊することにより mtDNA 分解にも関与する可能性も示唆された (Zhou et al., 2016)。しかし、真正粘菌では父方 mtDNA 分解時には、まだミトコンドリアの内膜崩壊は生じておらず、エンドヌクレアーゼ G が母性遺伝に関わる普遍的な DNA ヌクレアーゼであるかどうかは不明である。今後、抗体を作成し、詳細な局在解析を行う予定である。

さらに、接合前の父方と母方のアメーバからもミトコンドリアを単離し、比較プロテオミクス解析を行った。その結果、接合前のアメーバにも接合子と同様の DNA ヌクレアーゼが含まれていることが分かった。この結果は、接合前の配偶子のミトコンドリアにも母性遺伝に関与する DNA ヌクレアーゼが存在するが、何らかの制御により mtDNA の分解が抑制されており、接合後に父方ミトコンドリアのみで mtDNA の分解の抑制が解除され、父方 mtDNA の選択的消失が生じる可能性を示唆している。よって、母性遺伝における父方 mtDNA の選択的分解の分子メカニズムの全貌を明らかにするためには、父方 mtDNA の選択的分解に関わる DNA ヌクレアーゼを同定するだけでなく、接合後に DNA ヌクレアーゼが父方ミトコンドリアのみで働くための制御機構を明らかにする必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Sasaki, T., Sato, Y., Higashiyama, T., Sasaki, N. (2017) Live imaging reveals the dynamics and regulation of mitochondrial nucleoids during the cell cycle in Fucci2-HeLa cells. *Sci. Rep.* 11, 11257 査読あり

Koyama, M., Sasaki, T., Sasaki, N., Matsuura, Y. (2017) Crystal structure of human WBSCR16, an RCC1-like protein in mitochondria. *Protein Sci.* 26, 1870-1877 査読あり

Uno, K., Sasaki, T., Sugimoto, N., Ito, H., Nishihara, T., Hagihara, S., Higashiyama, T., Sasaki, N., Sato, Y., and Itami, K. (2017) Key Structural Elements of Unsymmetrical Cyanine Dyes for Highly Sensitive Fluorescence Turn-On DNA Probes. *Chem. Asian J.* 12, 233-238 査読あり

Schaap, P., Barrantes, I., Minx P., Sasaki, N., et al. (2015) The *Physarum polycephalum* Genome Reveals Extensive Use of Prokaryotic Two-component and Metazoan-type Tyrosine Kinase Signaling. *Genome Bio. and Evo.* 8, 109-125 査読あり

Yamaguchi, E., Wang, C., Fukazawa, A., Taki M., Sato, Y., Sasaki, T., Ueda, M., Sasaki, N., Higashiyama, T., and Yamaguchi, S. (2015) Environment-Sensitive Fluorescent Probe: A Benzophosphole Oxide with an Electron-Donating Substituent. *Angewandte Chemie* 54, 4539-4543 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

浦川直希、森山 陽介、東山 哲也、佐々木成江 (2017) 「母性遺伝におけるミトコンドリア DNA 選択的消失に関わる因子の同定にむけて」日本植物学会第 81 回大会 (千葉)

佐々木妙子、山田佳歩、佐藤良勝、東山哲也、佐々木成江 (2016) 「細胞周期におけるミトコンドリア核様体の分裂と mtDNA 複製」ミトコンドリアサイエンスワークショップ (福岡)

T. Sasaki, K. Yamada, Y. Sato, T. Higashiyama, N. Sasaki (2016) 「Coordinated Regulation of Mitochondrial Nucleoid Segregation and Mitochondrial DNA Replication during the Cell Cycle」第 39 回日本分子生物学会大会(神奈川)

佐々木妙子、山田佳歩、東山哲也、佐々木成江 (2015) 「細胞周期におけるミトコンドリア核様体の分裂およびミトコンドリア DNA の複製の制御」(東京) 第 67 回日本細胞生物学会大会

Taeko Sasaki, Kaho Yamada, Tetsuya Higashiyama, Narie Sasaki (2015) 「Regulation of mitochondrial DNA replication and segregation of mitochondrial nucleoid during the cell cycle」YoungMito (千葉)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.higashiyama-lab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木成江 (SASAKI, Narie)

名古屋大学大学院理学研究科 准教授

研究者番号：20359699

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

森山陽介 (MORIYAMA, Yosuke)

藤田保健衛生大学医学部 助教

研究者番号：00452532

伊丹健一郎 (ITAMI, Kenichirou)

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 教授

研究者番号：80311728

伊藤英人 (ITOU, Hideto)

名古屋大学教養教育院 講師

研究者番号：00452532

(4) 研究協力者

浦川直樹 (URAKAWA, Naoki)

中村聡 (NAKAMURA, Satoru)

佐々木妙子 (SASAKI, Taeko)

田中頼子 (TANAKA, Yoriko)