

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19029

研究課題名(和文) 線虫をモデルとした変異型ミトコンドリアゲノムの分配・蓄積機構の解明

研究課題名(英文) Accumulation mechanism of mutant mitochondrial DNA in *C. elegans*

研究代表者

笠嶋 克巳 (Kasashima, Katsumi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：80382844

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)： 欠失型ミトコンドリアDNA(mtDNA)の蓄積に関わる因子を同定する目的で、欠失型mtDNAと野生型mtDNAをヘテロプラスミックに保持する線虫株、LB138を用い、mtDNAの維持調節に関わる各遺伝子のノックダウンの効果を調べた。その結果、ヒトTFAMのホモログであるHMG-5のノックダウンにより、欠失型mtDNA含有率が有意に低下することが明らかとなった。複製阻害によりmtDNAコピー数を減少させただけでは欠失型mtDNA含有率に大きな影響を与えなかったことから、HMG-5によるコピー数の維持とは異なるmtDNAの維持調節機構が欠失型mtDNAの安定な維持に関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Accumulation of mitochondrial DNA (mtDNA) containing mutation or deletion will be a cause of mitochondrial disease, however, the molecular mechanism and regulating factors in organisms are largely unknown. In this study, we used *C. elegans* strain LB138 that contains wild-type and deleted mtDNA molecules in heteroplasmic as a model, to identify the regulatory factors in the process. We knocked down several genes that are involved in mtDNA maintenance in LB138. As a result, we found that knockdown of HMG-5, a homologue of human TFAM, significantly reduced the rate of content of deleted mtDNA per wild-type. We then reduced the amount of mtDNA copy number in LB138 by using a replication inhibitor, and examined the effect. The reduction of mtDNA copy number did not significantly affect the mutant rate, suggesting that HMG-5 is involved in stable maintenance of deleted mtDNA molecule independently of the mtDNA copy number maintenance.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA 欠失型mtDNAの蓄積 線虫 TFAM

1. 研究開始当初の背景

呼吸に必須な複合体タンパクをコードするミトコンドリアゲノム (mtDNA) の変異や欠失は、ミトコンドリア機能の低下を引き起こし、神経や筋を標的とした難病、ミトコンドリア病の原因となる。mtDNA は一細胞内に数千コピー存在し、変異した mtDNA が正常型 mtDNA を上回って蓄積した場合に病態を表すと考えられている。しかしながら、モデル生物を含めて変異型 mtDNA の蓄積機構や関連因子はこれまでにほとんど明らかでない。

mtDNA は、タンパク質因子とともに核様体 (ヌクレオイド) を形成しており、これらタンパク質が mtDNA の転写や複製、コピー数の維持など多様な維持調節に関わる。我々は最近、ヌクレオイドの主要な構成タンパクである TFAM (mitochondrial transcription factor A) が、培養細胞における均等な mtDNA の分配に必要であることを明らかにした (Kasashima et al. *Exp. Cell Res.* 2011)。したがって、TFAM が個体においても mtDNA の分配に関わることが予想されたが、その検証にはまだ至っていない。

線虫は遺伝学、逆遺伝学が可能なモデル生物であり、遺伝子の機能解析において高等動物の代替としても用いられる多細胞生物である。線虫ミトコンドリアも、線虫のエネルギー産生に重要な役割を果たすオルガネラであり、その機能低下が寿命と関連することなど、その機能は高等動物でもよく保存されている。2002 年に Lemire 博士らによって、欠失を持つ mtDNA (欠失型 mtDNA) と正常型 mtDNA をヘテロプラズミックで安定に保持する線虫株 (LB138 株) が単離された。線虫は TFAM のホモログ遺伝子を持ち、哺乳動物同様に mtDNA のコピー数の維持に働くことを明らかにしている (Sumitani and

Kasashima et al. *J. Biochem.* 2011)。

ヌクレオイド因子はヒトと線虫でよく保存されており、LB138 株におけるこれら因子の網羅的な解析は、個体における変異型 mtDNA の分配および蓄積機構の解明に結びつくと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、線虫 LB138 株を個体における変異型 mtDNA 分配・蓄積機構の解析に有用なモデルであると位置づけ、主に TFAM の線虫ホモログである HMG-5 の機能解析を中心に、変異型 mtDNA 分配関連因子の特定および作用機構の解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 線虫複数個体から NucleoSpin Tissue (タカラバイオ社) を用いてゲノム DNA を精製した。ゲノム DNA1-2 μ g を *Eco* RI で切断し、0.8%アガロースゲルで分離後、Hybond-NX に転写した。野生型、欠失型 mtDNA 双方と相補的なジゴキシンゲン標識プローブによる間接的検出方によって、mtDNA 断片を検出した。

(2) 定量的 PCR はロシュ社の SYBR Green 法によって行なった。欠失型 mtDNA の特異的増幅 (128 bp) には、プライマーセット ; uaDf5-Fnew (5' -TTGTTTCAAAATTTAATTTGAGAC-3')、uaDf5-Rnew (5' -TAAACAAGAGGTATAATTATTAAC-3') を、野生型 mtDNA の特異的増幅 (128 bp) には、プライマーセット ; uaDf5-Fnew、uaDf5-Rnew2 (5' -ATTAATCCTCTAACTAECTCC-3') を用いた。

(3) 線虫における遺伝子のノックダウンは、遺伝子に相当する二本鎖 RNA を発現する大腸菌 (HT115 株) を餌とした Feeding

RNA interference (RNAi)によって行った。HMG-5 のノックダウンには、まず L4440 ベクターに HMG-5 の ORF を導入し、HT115 に形質転換した。その後、室温 1-2 日で 1 mM の IPTG によって二本鎖 RNA の発現を誘導した HT115 を餌とした。アルカリブリーチ法で同調培養した線虫（野生型および LB138 株）の L1 幼虫から Feeding RNAi をスタートさせ、L4 幼虫もしくは成虫まで継続した。世代を超えた RNAi の場合は、親虫から F1 世代を産卵させ、F1 が成虫になるまで RNAi を継続した。各ステージから線虫をサンプリングし、DNA もしくは RNA を調整し、変異型 mtDNA 含有率の定量および遺伝子発現の定量に用いた。

(4) 線虫 Drp-1 のノックアウト株 (tm1108)、ClpX のノックアウト株 (tm2183) をナショナルバイオリソースプロジェクトより入手した。LB138 との 2 重変異体を作製するために、tm1108 および tm2183 を同調培養し、L4 幼虫まで生育した後、37°C で 1 時間熱処理を行い、通常培養条件で 4 日間飼育した。このようにして得られた雄と LB138 を掛け合わせることで、最終的に欠失型 mtDNA を持つ Drp-1 および ClpX 破壊株を得た。これら 2 重変異体について、変異型 mtDNA 含有率の定量を行なった。

4. 研究成果

(1) LB138 株の特性および変異型 mtDNA 分配解析のためのアッセイ系の構築

LB138 は薬剤での変異導入によって他のグループから単離・確立された線虫株であるが、欠失型 mtDNA の存在は PCR 法を用いた証明しなく、欠失型 mtDNA の存在を確証するものではなかった。そこで LB138 から調整したゲノム DNA に対し

てサザンブロッティングを行うことにより、実際に LB138 で約 3000 塩基対を欠失した mtDNA が正常型 mtDNA とヘテロプラズミックに存在していることを証明した (図 1)。これら LB138 由来のゲノム DNA を鋳型とし、欠失型および野生型 mtDNA 断片をリアルタイム PCR で特異的に増幅・定量し、欠失型 mtDNA 含有率 (欠失型 mtDNA 量/野生型 mtDNA 量) を算出した。この定量システムを用いて、少なくとも人工的に比率を変えた PCR 断片含有プラスミドの定量に成功した。Feeding RNAi 法による遺伝子のノックダウンシステムを構築するために、HMG-5 に相当する二本鎖 RNA を発現する大腸菌 (HT115) を餌とした Feeding RNAi を L1 幼虫期から次世代まで連続的に行うことにより、親世代、およびその子 (F1) 世代で HMG-5 のノックダウンを mRNA レベルで確認した。

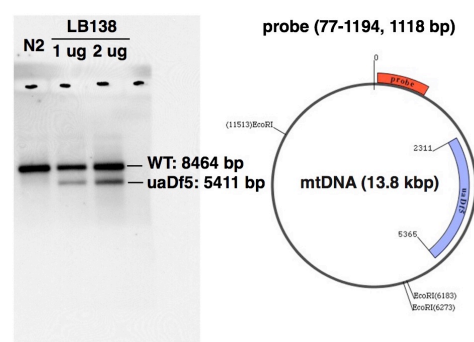


図1 サザンブロッティングによる欠失型mtDNA (uaDf5)の検出

(2) 欠失型 mtDNA の蓄積に関わる遺伝子の同定

まず、HMG-5 が欠失型 mtDNA の分配・蓄積に関わるのか調べるために、LB138 の L1 幼虫ステージからその子 (F1) が成虫に生育するまで HMG-5 の RNAi を続けた後、親虫 (P0) とステージを揃えた F1 成虫から 10 個体ずつサンプリングを行い、リアルタイム PCR による欠失型 mtDNA 含有率の定量を行った。その結果、HMG-5 をノックダウンしても、P0 と F1 間の欠失型 mtDNA 含有率に有意な差は認められなか

った。したがって HMG-5 は世代を超えた mtDNA の分配調節には関与していないと考えられた。mtDNA 分配の性質上、世代を超えた分配は関係ファクターが多岐にわたると考えられ、得られた結果に対する解釈が困難である。また、複数個体による欠失型 mtDNA 含有率の定量では、各個体の mtDNA の分配異常を検出できていない可能性もある。したがって、世代を超えた mtDNA 分配に関しては今後さらなる実験系の改善が必要であると考えられた。

次に、RNAi を L1 から L4 の幼虫世代間で行い、当世代における欠失型 mtDNA 蓄積への影響を調べた。HMG-5 のノックダウンにより、欠失型 mtDNA の含有量に減少傾向はあるものの有意差はないことがわかった。しかしながら RNAi を後期の成虫まで継続した場合、欠失型 mtDNA の含有量が HMG-5 のノックダウンで有意に減少していることがわかった (図 2)。したがって HMG-5 は個体において変異型 mtDNA の蓄積に影響を与えることが明らかになった。この結果は、最近 Nature 誌に報告された、有害型 mtDNA を安定に保持するためにはミトコンドリアストレス応答系の活性化、並びにミトコンドリア生合成系の因子が必要であるという結果と一致していた。詳細な分子メカニズムは不明であるが、HMG-5 による mtDNA の維持が欠失型 mtDNA の安定な保持に働くことが示唆された。

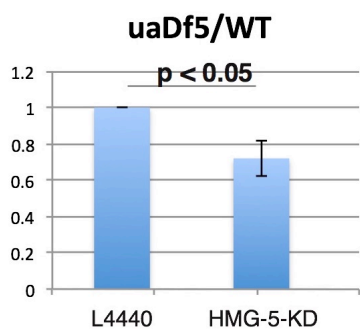


図2 HMG-5のノックダウン (KD) は、欠失型mtDNA (uaDf5)含有率を低下させる

HMG-5のノックダウンはmtDNA コピー数の減少を引き起こす。mtDNA のコピー数減少が欠失型 mtDNA の蓄積に及ぼす影響を調べるために、核酸アナログである 3' -デオキシ-3' -フルオロチミジン (FLT) を用いて、線虫 mtDNA のコピー数を減少させた。L1 幼虫から 100 μ M の FLT を含有させた NGM プレートで培養したところ、mtDNA の複製阻害を介した mtDNA コピー数の減少および成熟卵など生殖細胞の喪失が見られた。LB138 につき L1 から L4 幼虫まで FLT プレートで培養し、mtDNA コピー数を十分に減少させた状態で、欠失型 mtDNA 含有率を定量した。その結果、欠失型 mtDNA 含有率に有意な差は得られなかった (図 3)。

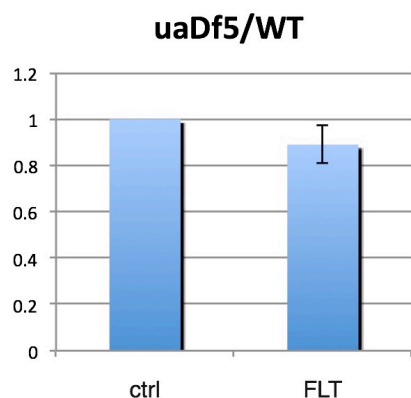


図3 mtDNA複製阻害剤 (FLT) による欠失型mtDNA (uaDf5)含有率への効果

したがって、mtDNA コピー数の減少だけでは欠失型 mtDNA 含有率の減少に関わらないことがわかった。

ヒト培養細胞で TFAM の質的調節に関わる ClpX、ミトコンドリアの分裂に関わりノックダウンで TFAM 同様の mtDNA 凝集を引き起こす Drp-1 について、各ノックアウト変異株が生育でき入手可能であったことから、これら因子のノックアウトが欠失型 mtDNA の蓄積に影響を及ぼすか調べた。mtDNA は母性遺伝するために、LB138 の雌雄同体と各ノックアウト株の雄を掛け合わせることで、核型はノックアウト、

mtDNAはLB138由来のヘテロプラズミーとなる変異体を作製した。その結果、ClpXのノックアウトでは有意な差はなかったが、Drp-1のノックアウトで欠失型mtDNAの含有率が有意に減少していることがわかった。

最後に mtDNAヌクレオイドの構成維持に関わる Prohibitin 1 (PHB1)をノックダウンしたところ、過去の報告通りに成虫は受精卵を持っておらず PHB1のノックダウンが確認できた。しかしながら PHB1のノックダウン LB138では、欠失型 mtDNAの含有量に有意な差は見られなかった。PHB1はミトコンドリアオートファジー(ミトファジー)のレセプターである PHB2の安定化因子であることからミトファジーにも重要である。実際に PHB1のノックダウン個体ではミトファジーの阻害時に見られる mtDNA コピー数の上昇が見られている。したがって、PHB1を介したミトファジーの阻害が欠失型 mtDNAの蓄積へ与える影響は小さいと考えられた。

以上より、複製阻害剤で mtDNAのコピー数を減少させても欠失型 mtDNA含有率に大きな差は見られないことから、詳細な分子メカニズムは不明であるが、HMG-5による欠失型 mtDNAの安定な保持には、mtDNA安定化による mtDNA コピー数維持とは異なる維持機構が関わることを示唆された。また、ミトコンドリア分裂因子である Drp-1も欠失型 mtDNAの安定な維持に必要なことがわかった。詳細なメカニズムは不明であるが、哺乳動物細胞における TFAMと Drp-1の共通点として、これらのノックダウン細胞では mtDNAヌクレオイドが凝集し巨大化することが挙げられる。このようなヌクレオイドの巨大化が線虫でも起こり、欠失型 mtDNAの蓄積に関わる可能性も考えられた。

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 4件)

Sumitani M, Kondo M, Kasashima K, Endo H, Nakamura K, Misawa T, Tanaka H, and Sezutsu H. Characterization of Bombyx mori mitochondrial transcription factor A, a conserved regulator of mitochondrial DNA. *Gene*, 査読有、Vol. 608 (2017) p103-113.

DOI: 10.1016/j.gene.2016.12.021.

Yamamoto DS, Sumitani M, Kasashima K, Sezutsu H, and Matsuoka H. Inhibition of Malaria Infection in Transgenic Anopheline Mosquitoes Lacking Salivary Gland Cells. *PLoS Pathog.*, 査読有、Vol. 12 (2016) e1005872

DOI: 10.1371/journal.ppat.1005872.

Mashiko T, Sakashita E, Kasashima K, Tominaga K, Kuroiwa K, Nozaki Y, Matsuura T, Hamamoto T, and Endo H. Developmentally Regulated RNA-binding Protein 1 (Drb1)/RNA-binding Motif Protein 45 (RBM45), a Nuclear-Cytoplasmic Trafficking Protein, Forms TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43)-mediated Cytoplasmic Aggregates. *J. Biol. Chem.*, 査読有、Vol. 291 (2016) p14996-15007.

DOI: 10.1074/jbc.M115.712232.

Kasashima K and Endo H. Interaction of human mitochondrial transcription factor A in mitochondria: its involvement in the dynamics of

mitochondrial DNA nucleoids. *Genes Cells*, 査読有、Vol. 20 (2015) p1017-1027.

DOI: 10.1111/gtc.12306.

[学会発表] (計 3件)

笠嶋克巳、保存された TFAM の dimer 化とその様式および細胞内の役割について
第 40 回日本分子生物学会年会 平成 29 年 12 月 6 日、神戸ポートアイランド (兵庫・神戸)

Katsumi Kasashima, Property of *C. elegans* HMG-5, a homologue of TFAM, and its implication into mtDNA maintenance, The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine、平成 28 年 10 月 30 日～11 月 1 日、TKP ガーデンシティ Shinagawa (東京・品川)

笠嶋克巳、TFAM によるミトコンドリア DNA 動態調節機構の解析 第 38 回日本分子生物学会年会 平成 27 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド (兵庫・神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠嶋 克巳 (KASASHIMA, Katsumi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 80382844