

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07294

研究課題名(和文) ヒトミトコンドリアDNAホモプラスミー化の分子基盤に関する研究

研究課題名(英文) The studies on the molecular basis of human mitochondrial DNA homoplasmy formation

研究代表者

凌 楓 (LING, Feng)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：70281665

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)：ミトコンドリアDNA(mtDNA)の相同的組換えの欠損変異mhr1-1は核染色体劣性変異で出芽酵母から初めて単離された。Mhr1は相同的組換えに必須な相同DNA対合を促進し、mhr1-1を相補する。Mhr1のヒトオソログは未同定のみである。Mhr1のアミノ酸配列に類似性を持ち、昆虫から部分的に精製されたヒトのhsMhr1は、相同対合で生じた三重鎖を合成する。また、hsMhr1は出芽酵母においてミトコンドリアに局在し、mhr1-1を部分的に相補した。過剰発現したhsMhr1はヒト細胞においてホモプラスミーへの復帰の促進、ヘテロプラスミー化の阻止、及びミトコンドリア機能の増強に役割を果たす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康なヒト新生児の細胞に存在する多コピーのミトコンドリアDNA(mtDNA)が基本的に全て同じ塩基配列を持つ状態(ホモプラスミー)にある。しかし、加齢に伴い、変異mtDNAが生じヘテロプラスミー化が進むと、ミトコンドリア機能に依存するATP合成量が低下していく。ヘテロプラスミー化は老化、不妊症、発がん、神経疾患、及びミトコンドリア病などの疾患に関わる。そこで、ヘテロプラスミー化を阻止するか、正常型mtDNAのホモプラスミーへの復帰を促進できればヘテロプラスミーによる疾患の治療法につながる。ヒトでは、ホモプラスミー形成と維持機構で働く遺伝子が同定されたのは初めてである。

研究成果の概要(英文)：The first nuclear recessive mutation mhr1-1 causing deficiency in yeast mitochondrial homologous recombination was isolated from budding yeast. Mhr1 promotes homologous DNA pairing, an essential step of homologous recombination, and complements mhr1-1. The identification of the human ortholog of Mhr1 remains incomplete. I found an unknown protein with the amino acid sequence similar to Mhr1, and called hsMhr1. I partially purified hsMhr1 from silkworms overproducing hsMhr1. The hsMhr1 protein can promote the formation of the homologous three-stranded structure. The hsMhr1 localized in yeast mitochondria partially complements the deficiencies in homologous recombination by mhr1-1 at omega and Endo.Sccl loci. The hsMhr1 protein is crucial for homoplasmy restoration promoted by mt-allele segregation, and is essential for preventing common mitochondrial deletion-attributed heteroplasmy formation. Overproduced hsMhr1 can increase oxygen consumption rate representing mitochondrial function.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリアDNA ヘテロプラスミー ホモプラスミー 相同的DNA対合 相同的組換え 欠損変異ミトコンドリアDNA DNA鎖交換体の形成

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

健康なヒト新生児の細胞に存在する多コピーのミトコンドリア DNA (mtDNA) が基本的に全て同じ塩基配列を持つ状態(ホモプラスミー)にある。加齢に伴い、変異 mtDNA が生じヘテロプラスミー化が進む。正常 mtDNA のホモプラスミーへの復帰を促進できればヘテロプラスミーによる疾患の治療法につながるが、ホモプラスミー形成・維持機構で働く遺伝子が同定されていない。出芽酵母でホモプラスミー化を促進する相同 DNA 対合酵素 Mhr1 依存的 mtDNA 複製・分配機構がヒト細胞にも存在することを示唆するデータとヒト Mhr1 機能ホモログ、若しくはオソログ (hsMhr1) の候補を見つけた。

2. 研究の目的

本研究では、hsMhr1 が持つ生化学的特徴、及びヒト mtDNA 複製とホモプラスミー回復における hsMhr1 の働きを明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

本研究では主に遺伝学と生化学的な手法を用いて hsMhr1 が持つ生化学的特徴、及びヒト mtDNA 複製とホモプラスミー回復における hsMhr1 の働きを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 試験管内における hsMhr1 の可能な分子機能

試験管内においては、出芽酵母の Mhr1 が細胞核での DNA 組み換えに必須な RecA 型タンパク

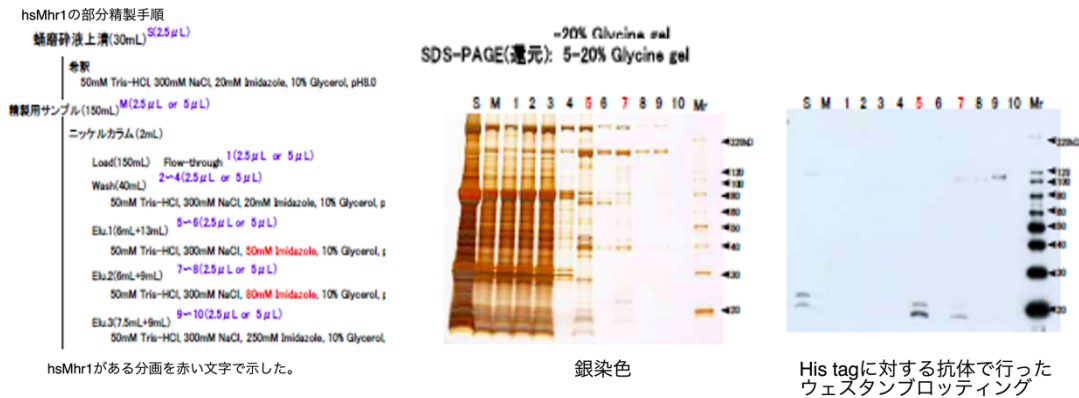


図1. カイコを用いた組換えタンパク質(Hisタグを付与したhsMhr1)の生産と精製

質 (RecA、Rad51、Dmc1) による相同対合で生じた生成物である D ループや三重鎖と考えられる DNA 鎖交換体を合成することができる。報告者は昆虫で発現を誘導した hsMhr1 を部分的に精製した(図1)。

さらに試験管内において hsMhr1 が三重鎖と考えられる DNA 鎖交換体の形成を促進することを

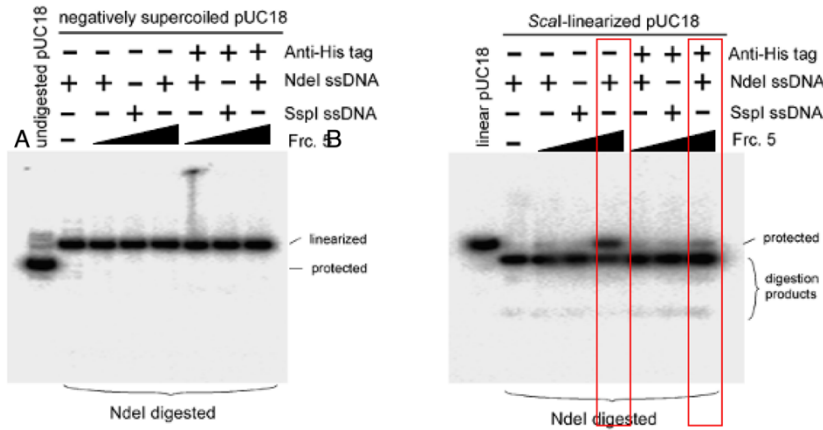


図2. 三重鎖と考えられるDNA鎖交換体の形成を促進するhsMhr1

A. 部分精製したhsMhr1タンパク質を負の超らせんの環状DNAと相同塩基配列を有する単鎖DNAと混ぜると制限酵素による切断に抵抗するDNA鎖交換体の形成を検出できなかった。B. 二本鎖DNAと相同塩基配列を有する単鎖DNAと混ぜると制限酵素による切断に抵抗するDNA鎖交換体の形成を検出できた。しかも、C末端にHisTag付きのhsMhr1に対して特異的に結合するAnti-His tag抗体を加えるとDNA鎖交換体の形成量が顕著に減少し、hsMhr1による相同DNA対合促進反応が阻害された。

見出した。これらの結果から hsMhr1 は試験管内において出芽酵母の Mhr1 と同様な分子機能を持つことが示唆された(図 2)。

(2) 出芽酵母における hsMhr1 の局在

これまでに出芽酵母において出芽酵母の mtDNA 組換え機能について解析を行っ

てきたので実証済みなアッセイ系を持っている。従って、出芽酵母において hsMhr1 が mtDNA 組

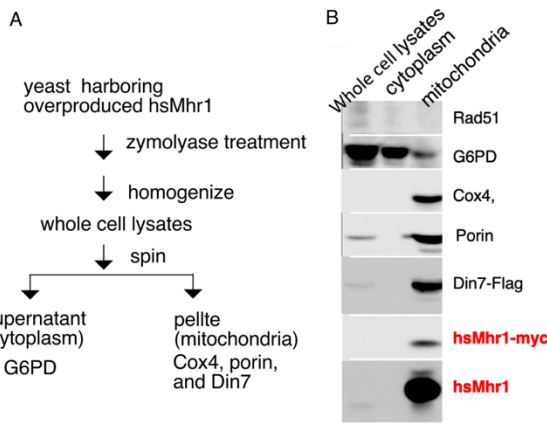


図3. 過剰発現したhsMhr1の出芽酵母におけるの局在。A. ラフィノースとグルコースを炭素源とする培地で培養し、hsMhr1の発現誘導を行った出芽酵母を分画した。B. 局在既知のマーカータンパク質の所在を元にウエスタンブロット法でhsMhr1の局在を検出した。

換えに対する影響を調べることが近道なので hsMhr1 を出芽酵母で高発現させた。大量発現した hsMhr1 が細胞内における局在を調べた結果、酵母細胞のミトコンドリア画分に存在することを明らかにした(図 3)。

予想通り、hsMhr1 は *mhr1-1* 変異が引き起こした Ω と *Endo. SceI* 遺伝子座における mtDNA の組換え(遺伝子交換型)の欠損を部分的に相補した(図 4 と図 5)。これらの結果から、hsMhr1 が少なくとも出芽

酵母 Mhr1 が持つ分子機能を持っていることが示唆された。

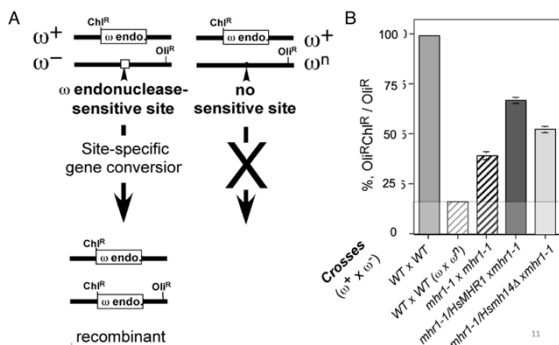


図4. 遺伝子交換型の相等的組換えと hsMhr1 の役割。A. ω 遺伝子座で起こる遺伝子交換型の相等的組換え。B. 過剰発現した hsMhr1 が *mhr1-1* によって引き起こした、 ω 遺伝子座での遺伝子交換型の相等的組換え欠損を部分的に相補したが、欠変異型 Hsmhr1 4 が野生型タンパク質 Hsmhr1 の機能をもっていない。

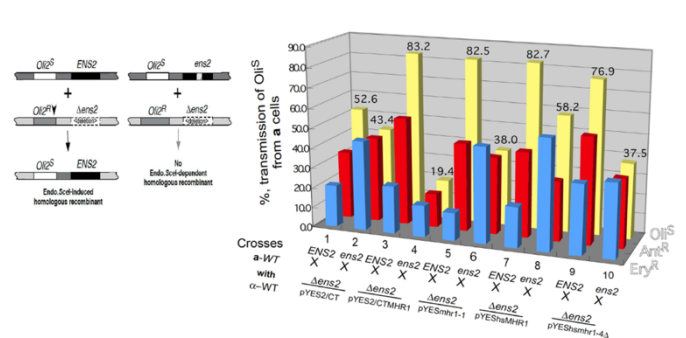


図5. 遺伝子交換型の相等的組換えと Hsmhr1 と欠変異型 Hsmhr1-4D の役割。A. *Endo. SceI* 遺伝子座で起こる遺伝子交換型の相等的組換え。B. 過剰発現した Hsmhr1 が Mhr1 と同様に *mhr1-1* によって引き起こした、 ω 遺伝子座での遺伝子交換型の相等的組換え欠損を部分的に相補したが、欠変異型 hsMhr1 (Hsmhr1-4A) が *mhr1-1* を相補することができなかった。

(3) ヒトミトコンドリアにおける対立遺伝子の分離に必要な hsMhr1

mtDNA 上の点突然変異 (m. 3242A>G 変異) によるミトコンドリア病患者由来の MELAS (ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作) 細胞においては野生型と m. 3242 A>G 変異 mtDNA が混合し、分離せず、ヘテロプラスミーのままに維持されていることが知られている。

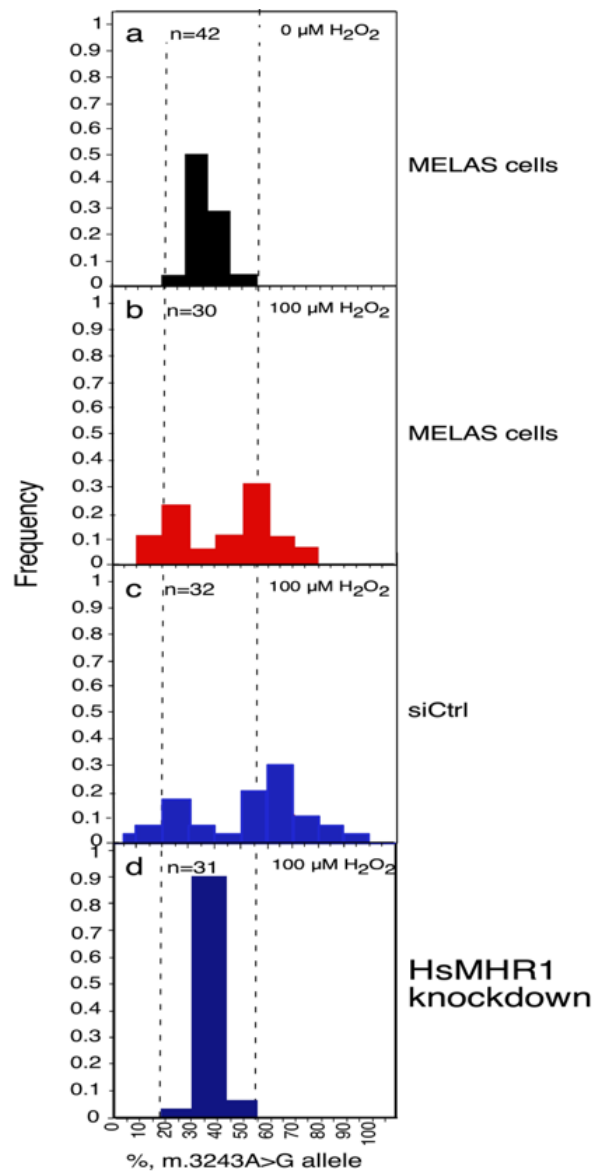


図6. H₂O₂処理によって誘導されるミトコンドリア対立遺伝子の分離にhsMhr1が必要である。H₂O₂無処理(a)、100mMのH₂O₂で処理したヘテロプラスミーのMELAS細胞(b)、ネガティブコントロールsiRNA (c)とHsMHR1をsiRNAでノックダウンしたMELAS細胞(d)におけるm.3243 A>G点突然変異の分布。ヘテロプラスミーのMELAS細胞におけるm.3243 A>G点突然変異の双峰分布はローリングサークル型mtDNA複製によるミトコンドリア対立遺伝子の分離を示す。

報告者は MELAS 細胞に対して過酸化水素 (H₂O₂) で処理するとヒト細胞におけるローリングサークル型複製が活性化され、異なる割合の m. 3242 A>G 変異を持つ細胞が双峰分布 (bimodal) を示し、野生型と m. 3242 A>G 変異の対立遺伝子が分離し、ホモプラスミーの形成に向うことを再度明らかにした。ところが、MELAS 細胞において

hsMHR1 をノックダウン (knockdown) すると H₂O₂ 処理で生じた双峰分布が消失した。従って、hsMhr1 がミトコンドリアにおける対立遺伝子の分離 (mitochondrial allele segregation) に必要であることが明らかとなった (図 6)。

ローリングサークル型 mtDNA 複製がミトコンドリアの対立遺伝子の分離を促進することでホモプラスミーの形成を促進することから、hsMhr1 もヒト mtDNA のローリングサークル型複製で働くことが示唆された。

(4) ヒトミトコンドリア DNA の欠失変異阻止とミトコンドリア機能の増強に必要な hsMhr1

hsMHR1 をノックダウン(knockdown)すると典型的な mtDNA 欠損変異(common mitochondrial

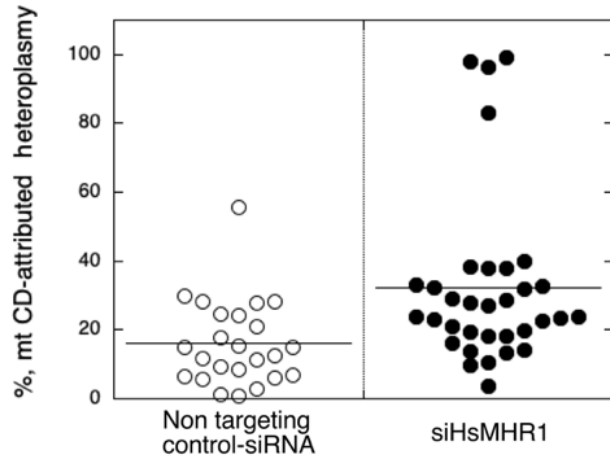


図7. TIG3細胞において典型的なmtDNA欠失変異に起因するヘテロプラスミー化を促進したHsMHR1ノックダウン

deletion)を持つ細胞の割合が増加した(図7)。即ち、典型的な mtDNA 欠損変異に起因するヘテロプラスミー化が進んだことを意味する。hsMhr1 を高発現すると酸素消費速度(OCR)で表すヒト細胞のミトコンドリア機能が増加した(図8)。この結果から mtDNA 欠損を引き起こす DNA の二本鎖切断が hsMhr1 の活性増強で修復されたことが考えられる。

ト細胞の呼吸機能であるミトコンドリア機能を恒常的に維持していることが示唆された。

これらの結果から、ヒト体細胞において hsMhr1 が mtDNA 欠損変異によるヘテロプラスミー化の阻止に役割を果たし、ヒ

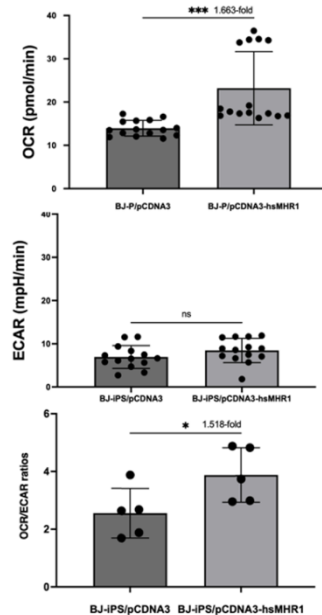


図8. BJ-iPS細胞のミトコンドリア機能を増大するhsMHR1の大量発現 pCDNA3ベクターに載せたhsMHR1をBJ-iPS細胞に導入した。4日後、細胞外フラックスアナライザー(Agilent Technologies社製)を用いて、ミトコンドリアの酸化的リン酸化でATPが産出される過程において酸素消費速度(OCR: Oxygen Consumption Rate)、解糖系の指標として細胞外酸性化速度(Extracellular Acidification Rate: ECAR)、及び解糖からミトコンドリア呼吸へのシフトを示す OCR/ECARの比を測定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 LING Feng, YOSHIDA Minoru	4. 巻 11(5)
2. 論文標題 Rolling-Circle Replication in Mitochondrial DNA Inheritance: Scientific Evidence and Significance from Yeast to Human Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes (Basel)	6. 最初と最後の頁 514-528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11050514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Feng Ling, Minoru Yoshida	4. 巻 11(5)
2. 論文標題 Rolling-Circle Replication in Mitochondrial DNA Inheritance: Scientific Evidence and Significance from Yeast to Human Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes (Basel)	6. 最初と最後の頁 514-526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11050514.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Feng Ling, Eliot Bradshaw, Minoru Yoshida	4. 巻 9 (1)
2. 論文標題 Prevention of mitochondrial genomic instability in yeast by the mitochondrial recombinase Mhr1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5433-5445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41699-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ling Feng, Bradshaw Elliot, Yoshida Minoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Prevention of mitochondrial genomic instability in yeast by the mitochondrial recombinase Mhr1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5433-5445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41699-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Elliot Bradshaw, Minoru Yoshida, *Feng Ling,	4. 巻 7
2. 論文標題 Regulation of Small Mitochondrial DNA Replicative Advantage by Ribonucleotide Reductase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 G3 (Bethesda)	6. 最初と最後の頁 3083-3090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1534/g3.117.043851.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ling Feng, Yoshida Minoru
2. 発表標題 A new paradigm of eukaryotic mitochondrial genetic inheritance revealed from studies on yeast mitochondrial DNA replication
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Feng Ling, Minoru Yoshida
2. 発表標題 The mitochondrial recombinase Mhr1 sustains yeast chronological life span
3. 学会等名 国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センターの中間発表
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、Mohammad Tariq, Tilman Schneider-Poetsch、凌 楓、室井 誠、鈴木健裕、堂前 直、伊藤昭博、長田裕之、吉田 稔
2. 発表標題 Effects of GC7, a potent inhibitor of eIF5A hypusination, on mitochondrial proteins
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 健、黒川留美、凌 楓、鈴木健裕、堂前 直、吉田 稔
2. 発表標題 eIF5A ハイブシン化阻害剤 GC7 によるミトコンドリア制御
3. 学会等名 日本ポリアミン学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Feng LING
2. 発表標題 Mitochondrial DNA recombination is critical for sustaining yeast chronological lifespan
3. 学会等名 Annual Meeting of Aging project 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 凌 楓、吉田稔	4. 発行年 2021年
2. 出版社 New Technology New Science (NTS)	5. 総ページ数 407
3. 書名 ミトコンドリアダイナミクス 機能研究から疾患・老化まで	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ホモプラスミー化促進剤及びその利用	発明者 凌楓、吉田稔、木 藤古孝行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、09374-JP	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------