

機関番号：12401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010年

課題番号：20570001

研究課題名 (和文)

早期に細胞死をもたらす突然変異のミトコンドリアDNA欠失生成のメカニズム

研究課題名 (英文)

Mechanism of mtDNA deletion in short lived mutant of *Neurospora*.

研究代表者

井上弘一 (Inoue Hirokazu)

埼玉大学・理工学研究科・名誉教授

研究者番号：60114203

研究成果の概要 (和文)：

アカパンカビ *mus-10* 変異株は DNA のアルキル化剤である MMS に対する高感受性株として単離された。変異原に高感受性を示すことから *mus-10* は DNA 修復に関わることが予想されたが、その詳細は明らかではない。解析を進める中でこの株は数回の植継ぎで成長を停止し、それに伴ってミトコンドリア DNA に欠失が生じることが分かった。また、ミトコンドリア形態は野生株が管状であるのに対し *mus-10* 変異株では粒状であった。原因遺伝子は F-box ドメインをもつタンパク質をコードしており、MUS-10 タンパク質の機能に F-box ドメインは必須であることからユビキチン/プロテアソーム系を介したタンパク質分解経路で働くことが示唆された (Kato *et al.* 2010)。

MUS-10 の機能をさらに解析するため、ミトコンドリア形態に注目し研究を行った。*mus-10* 変異株ではミトコンドリアが断片化していたため、ミトコンドリアの融合がうまくいかない、もしくは、分裂が亢進していることが考えられる。ミトコンドリアの分裂に必須な遺伝子である *fis-1* と *mus-10* の二重欠損株を作製した結果、二重欠損株ではミトコンドリア形態が野生株と似た形状を示しただけでなく、変異原高感受性や生育の早期停止もみられなくなった。このことは MUS-10 タンパク質がミトコンドリア形態の維持に機能することにより、変異原高感受性や短寿命を防いでいることを示唆する。

MUS-10 はタンパク質分解経路で働き、分解される標的タンパク質と結合することが予想される。そのため、MUS-10 と既知のミトコンドリア形態制御因子との結合をみた結果、ミトコンドリアの融合に関わる FZO-1 と結合することが明らかとなった。FZO-1 が MUS-10 の分解の標的となっているかを調べるため、二重欠損株の作製を試みたが、*fzo-1* 欠損株を作製することが出来ず、*fzo-1* は生育に必須である可能性が高い。また、*mus-10* 変異株において FZO-1 を構成的に発現させることを試みた。MUS-10 が FZO-1 の分解に働くのであれば、*mus-10* 変異株では FZO-1 が蓄積しており、構成的に発現させることにより表現型の悪化がみられることが予想される。しかし、構成的な FZO-1 の発現により *mus-10* のミトコンドリア形態の異常、変異原高感受性、生育の早期停止がみられなくなった。以上より、MUS-10 のミトコンドリア形態維持機構にはより複雑な仕組みがあることが示唆される。

研究成果の概要 (英文)：

The *mus-10* mutant was isolated which showed highly sensitivity to alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS). It had been forecasted that *mus-10* gene belonged to the some DNA repair pathway, because of it sensitivity to mutagen. This mutant have other unique characteristics; unable to grow after several times sequential inoculation, or stop growing after 2 to 3 weeks culture. Furthermore, these phenotypes are accompanied the deletion of mitochondrial DNA and fragmented mitochondrial feature comparing to the normal (tubular) shape in wild type strain. The responsible gene of *mus-10* was cloned by complementation of its MMS sensitivity. This gene encodes the F-box domain containing polypeptide, and deletion of F-box domain showed identical phenotype with *mus-10* mutant. Since F-box protein is known as a counterpart of SCF (Skp-Cullin-F-box) complex, which have a role for the degradation of some target protein via ubiquitination following degrading in

proteasome.

To uncover the *mus-10* gene function, we focused the feature of mitochondria. We examined whether 1) mitochondrial fusion is inhibited, or 2) mitochondrial fission is stimulated in *mus-10* mutant. Double mutation of *mus-10* and *fis-1*, which was essential for mitochondrial fission, showed quite resemble feature of mitochondria with wild type strain. And also this double mutant suppressed sensitivity to mutagen and short life span. These results suggested that MUS-10 protein prevent from the mutagen sensitivity and short life span according to maintain a mitochondrial feature. MUS-10 protein was considered to have a function of degradation of some target protein. So MUS-10 protein should be bound to that protein. Considering MUS-10 protein was correlated to maintenance of mitochondria feature, one candidate FZO-1 arose which had functions in the mitochondrial fusion. Using immunoprecipitation method, we could show that MUS-10 protein bound to FZO-1. Next, we tried to make *fzo-1* knock out strain, but couldn't. The *fzo-1* gene thought to be essential gene and fusion of mitochondria was important for maintenance of life span in *Neurospora*. Further, we forecasted that constitutive expression of FZO-1 protein in *mus-10* mutant might show eviler phenotype than the *mus-10* single mutant, because FZO-1, target of MUS-10, might be accumulated in that strain by escaping degradation. However, any evil phenotypes were not observed. Above these results, it was suggested that there were complex mechanism to maintain the mitochondrial feature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：遺伝

キーワード：ミトコンドリア、ミトコンドリア DNA、短寿命、変異原感受性、アカパンカビ

#### 1. 研究開始当初の背景

アカパンカビの通常の野生株は、菌糸成長を2年以上継続できる。ところが、幾つかの変異株は数週間で成長を停止し、その菌糸を上継ぐことができない。当初、変異原に対して感受性を示す株として単離された、*mus-10* 変異株は、MMS 感受性、過酸化水素耐性、および、菌糸成長の早期停止という表現型を示した。興味深いことに、この変異株はミトコンドリアが断片化しており、これに伴い、ミトコンドリアゲノムの欠失が生じていた。MMS 感受性を指標として、原因遺伝子をクローニングしたところ、アミノ末端側に F-box ドメインを有するプリペプチドをコードする遺伝子であることが明らかになった。F-box タンパク質は、SCF 複合体を形成し、標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームを介してタンパク質を分解分解する。この系とミトコンドリアの融合についての、

この遺伝子の関与が予想された。

#### 2. 研究の目的

*mus-10* 遺伝子の変異はミトコンドリアの断片化、ミトコンドリアゲノムの欠失に関わる。また、この遺伝子が F-box タンパク質をコードすることから、そのターゲットとなるタンパク質が、ミトコンドリアの異常に関わることが示唆される。本研究において、その標的となるタンパク質を明らかにし、ミトコンドリアゲノム欠失のメカニズムについて考察する。

#### 3. 研究の方法

- ① 免疫沈降法などを用いて MUS-10 タンパク質が会合するタンパク質を同定する。
- ② *mus-10* 変異株の表現型より、ミトコンドリアの融合もしくは分裂に関わ

る因子 (*fis-1*, *fzo-1* など) との遺伝的な関係を、二重変異株の作製を通じて解析する。

- ③ ミトコンドリアの融合もしくは分裂に関わる因子の過剰発現によって、表現型が変化するか否かを、変異原感受性、共焦点レーザー顕微鏡による解析などを通じて行なう。

#### 4. 研究成果

1) ミトコンドリアの融合・分裂に関わる因子との遺伝学的な関係の解析。

図1は、ミトコンドリアを MitoTracker® を用いて染色し、それを共焦点レーザー顕微鏡によって観察したものである。図1に示したように、*mus-10* 変異株はミトコンドリアの形状が野生株 (Wild type) とは異なり、断片化している。このことから、*mus-10* 遺伝子

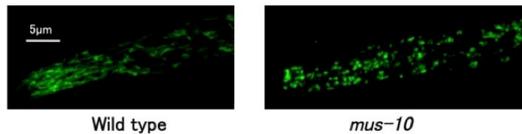


図1 ミトコンドリアの形状(野生株と*mus-10*変異株)

の機能はミトコンドリアの融合に関わっていることが予想される。すでに、出芽酵母におけるミトコンドリアの分裂に関わる因子の一つに、*fis-1* 遺伝子がある。この遺伝子との遺伝学的な関係を解析するために、二重変異株を作製した。

*fis-1* 遺伝子の単独の欠損により、図2に示したように分裂が起りにくくなる。そして

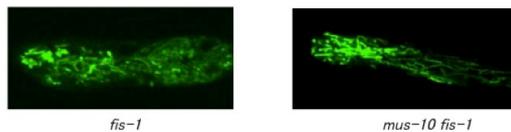


図2 ミトコンドリアの形状(*fis-1*, *mus-10 fis-1*変異株)

*mus-10 fis-1* 二重変異株においては、*mus-10* 変異株で観察された、ミトコンドリアの断片化が抑圧され、野生型と同様の形状を示した。また、変異原感受性も抑圧され (データは示していない)、短寿命を示していた菌糸成長も、野生株と同様になった (図3)。

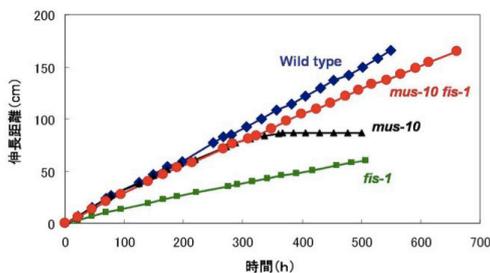


図3 *fis-1*変異は*mus-10*変異を抑圧する

以上の結果により、MUS-10 タンパク質がミトコンドリア形態の維持に機能することにより、変異原高感受性や短寿命を防いでいることを示唆された。

#### 2) MUS-10 と会合するタンパク質

MUS-10 タンパク質はアミノ末端側に F-box ドメインを有していることから、SCF 複合体に含まれる F-box タンパク質であることが考えられ、ユビキチン化を介して、ある標的タンパク質の分解に関わることが予想された。その標的となるタンパク質を予想し、幾つかの候補を探索した。一つの候補として、ミトコンドリアの融合に関わる FZO-1 タンパク質を解析した。出芽酵母の Fzo-1 タンパク質は、F-box タンパク質である Mdm-30 により、ユビキチン化される。なお、Mdm-30 タンパク質と MUS-10 タンパク質は、相同性が全く認められなかった。MUS-10、FZO-1 タンパク質に FLAG および HA タグをそれぞれ付加したタンパク質を発現し、免疫沈降を行なったところ、これらのタンパク質同士の会合が示された (データは示していない)。ウェスタンブロットの高いシグナルが得られなかったが、これは FZO-1 タンパク質の分解が速やかに起っていることに起因すると考えられる。

#### 3) FZO-1 タンパク質の解析

*mus-10* 遺伝子と *fzo-1* 遺伝子の遺伝学的解析を試み、*fzo-1* 遺伝子の破壊を試みた。ところが、この遺伝子の破壊は不可能であった。*fzo-1* 遺伝子は生存に不可欠な遺伝子であることが考えられる。また、*fzo-1* 遺伝子の機能、すなわちミトコンドリアの融合は生存にとって非常に重要である事が、示唆される。

#### 4) *uvs-5* 変異株の解析

*mus-10* と同じ様に、変異原感受性を示し、菌糸成長に異常を有する変異株は幾つか存在している。*uvs-5* 変異株はその一つであるが、クローニングはされていなかった。この変異が、*fzo-1* 遺伝子に究めて近い位置にマッピングされたことから、*uvs-5* が *fzo-1* と同一である可能性を考えた。FZO-1 タンパク質を *uvs-5* 変異株に導入して発現したところ、変異原の感受性が相補され、ミトコンドリアの形状が野生型になった (図4)。現在さらに解析を進めているところである。

一方、*mus-10* 変異株において、FZO-1 タンパク質を過剰発現することも試みた。*mus-10* 変異株では、FZO-1 タンパク質が分解を逃れて蓄積している。さらに、FZO-1 タンパク質を過剰発現することによって、

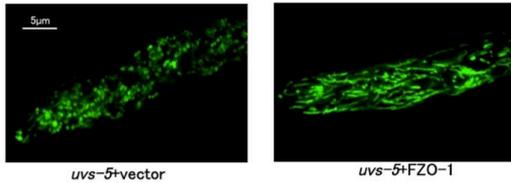


図4 ミトコンドリアの形状(uvs-5変異株)

変異原感受性の増大が考えられたが、予想に反して抑圧された表現型を示した。MUS-10のミトコンドリア形態維持機構にはより複雑な仕組みがあることが示唆された。

#### 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1件)

Kato, A., Kurashima, K., Chae, M., Sawada, S., Hatakeyama, S., Tanaka, S., and Inoue, H. Deletion of a novel F-box protein, MUS-10, in *Neurospora crassa* leads to altered mitochondrial morphology, instability of mtDNA and senescence.

Genetics, 185 p1257-1269 (2010)

[学会発表] (計4件)

1. Kurashima K., Chae M., Tanaka S., and Hatakeyama S. MUS-10, related to mitochondrial fusion and senescence, is associated with yeast Fzo1 homologue UVS-5 in *Neurospora crassa*. 26th Fungal Genetics Conference (2011年3月17日, Asilomar, California)

2. Kurashima K., Kato A., Sawada S., Hatakeyama S., Chae M., Tanaka S., Inoue H. New features of the *mutagen sensitive-10* mutant reveal relationship between mitochondrial morphology and senescence in *Neurospora crassa*, Neurospora 2010 meeting(2010年4月10日, Asilomar,

California)

3. Kinimori Kurashima, The novel F-box protein, MUS-10, regulates mitochondrial morphology, preventing instability of mtDNA and senescence in *Neurospora crassa*.

4. 第32回日本分子生物学会年会(2009年12月10日、パシフィコ横浜)倉島 公憲、アカパンカビ新規 F-box タンパク質 MUS-10の欠損はミトコンドリア形態異常と短寿命を導く、第9回日本ミトコンドリア学会年会 (2009年12月17日、東京医科大学)

[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]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上弘一 (Inoue Hirokazu)

埼玉大学・名誉教授

研究者番号：60114203

(2) 研究分担者

田中秀逸 (Tanaka Shuuitsu)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：90202431

畠山晋 (Hatakeyama Shin)

埼玉大学・科学分析支援センター・講師

研究者番号：00396665

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：