

平成23年 4月 30日現在

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20570171

研究課題名(和文)

ミトコンドリアDNAの組換えを介した複製の開始制御の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Analysis of Molecular Mechanism for Regulating Initiation of Recombination-mediated Mitochondrial DNA Replication

研究代表者

凌 楓 (LING FENG)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号： 70281665

研究成果の概要(和文)：

出芽酵母のミトコンドリアでは、組換えを介したミトコンドリアDNA(mtDNA)複製の開始機構が依然不明な点が多い。本研究では、酸化損傷塩基除去酵素 Ntg1 が mtDNA の複製開始領域で露出した一本鎖 DNA 領域の酸化損傷部位を認識し、一本鎖 DNA 切断を導入することで二重鎖切断を形成させること、そしてリラックスした二重鎖 DNA を基質として好む相同 DNA 対合タンパク質 Mhr1 を介した mtDNA 複製に 5'-3'エキソヌクレアーゼ、及び DNA ヘリカーゼが働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

The mechanism for initiation of recombination-mediated mitochondrial DNA (mtDNA) replication is still unclear in budding yeast. We revealed that the oxidative DNA damage-excision repair enzyme Ntg1 recognizes the exposed single-strand region at the sites of oxidative modifications and introduces DNA double-stranded breaks at a replication origin. In addition, the 5'-3' exonuclease and DNA helicases play roles in mtDNA replication-mediated by Mhr1, which *in vitro* prefers relaxed closed circular double-stranded DNA for catalyzing homologous DNA pairing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：1. 遺伝学 2. 遺伝子 3. 核酸 4. ストレス 5. 酵素 6. DNA の組換え 7. ミトコンドリア 8. *Saccharomyces cerevisiae*

1. 研究開始当初の背景

真核生物においてミトコンドリアは、酸素呼吸を通して ATP を供給し、生命活動の恒

常性を維持する。しかし、生物が生きて行く上で環境ストレスや増殖、分化などの生理条件の変化により、しばしば ATP の供給を急増させる必要が

ある。そのためには、ミトコンドリア内膜での酸化リン酸化反応に働くタンパク質群を増やさなければならない。このような条件下で酸化リン酸化反応に必須なタンパク質のサブユニット群をコードする mtDNA は、コピー数を増加させることが知られている。しかし、今のところその意義もどのような機構で応答するかも不明である。

2. 研究の目的

本研究では、酸素呼吸を通して真核細胞が ATP の需要に対応する際に、「どのようにしてミトコンドリア DNA (mtDNA) が複製を開始するのか? これに働く制御機構はどうなっているのか?」という細胞質遺伝の基本的問題を、本申請者が見出した mtDNA の組換えを介した複製と分配機構の研究成果を基にして、遺伝学・生化学・細胞生物学的な手法を用いて出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をモデル生物として解明することを研究目的としている。

3. 研究の方法

- (i) ミトコンドリア DNA (mtDNA) の複製開始点という特異部位における活性酸素種による損傷修飾が、Ntg1 を介して mtDNA の複製開始に直接働くメディエーターとなり、mtDNA の複製の活性化に働くという仮説の検証の一環として、酸化損傷除去修復酵素 Ntg1 による二本鎖切断形成を可能にした複製開始点領域の構造、Ntg1 の生化学的特徴、及び酸化ストレスを強めた条件下での mtDNA コピー数の変化について調べる。
- (ii) 精製した Ntg1 が一本鎖 DNA の酸化損傷部位を認識し、一本鎖 DNA 切断を導入するかどうかを調べる。
- (iii) 単離したミトコンドリアを各濃度の過酸化水素で処理し、mtDNA のコピー数と Ntg1、及び Mhr1 との相関性を調べる。
- (iv) 負の超らせん DNA 構造が Mhr1 による D-loop の形成に必要なかどうかトポイソメラーゼで処理した環状二重鎖 DNA を用いて調べる。
- (v) Mhr1 による閉環状二本鎖 DNA の正味のトポロジー的变化をトポロジー的解析で調べる。
- (vi) ミトコンドリアでは、組換えを誘起する mtDNA の複製開始部位での二重鎖切断の形成に働く因子群を遺伝学的な手法で調べる。

4. 研究成果

- (i) mtDNA の複製開始領域を含む DNA 断片はこの領域を含まない DNA 断片と比べて一本鎖 DNA を特異的に切断する酵素に対する感受性が増え、部位特異的な二本鎖 DNA 切断に対して耐性を示すことを明らかにした。
- (ii) 従来知られていた、二本鎖 DNA の酸化損傷部位にニックを導入するという Ntg1 の活性に加えて、精製した Ntg1 が一本鎖 DNA の酸化損傷部位を認識し、一本鎖 DNA 切断

を導入することを明らかにした。

(iii) 単離したミトコンドリアを低濃度の過酸化水素で処理すると mtDNA のコピー数が Ntg1、及び相同 DNA 対合酵素である Mhr1 の機能に依存して増加することも見出した。これらのことから、mtDNA の複製開始点で、露出した一本鎖 DNA 領域の酸化損傷部位を認識する Ntg1 は、一本鎖 DNA 切断を導入することで二本鎖 DNA 切断を形成させ、組換え酵素 Mhr1 に依存する mtDNA 複製を促進することが示唆された。

(iv) Mhr1 による D-loop の形成について調べた結果、線状二本鎖 DNA が負の超らせん構造の環状二本鎖 DNA より 3 本鎖構造の形成にもっと適した基質であることが判明した。また、環状 DNA を基質として用いた場合、正、或は負の方に捻れた超らせん DNA 構造をリラックスさせるトポイソメラーゼ I を反応液中に添加すると、Mhr1 による相同 DNA 対合から生じた 3 本鎖構造の形成が促進された。

(v) トポロジーの解析から、その間、閉環状二本鎖 DNA の正味のトポロジー的变化が起きていないことを明らかにした。これらの結果から、Mhr1 が負の超らせん DNA 構造を必要とせず、3 本鎖構造の形成を効率的に触媒することで、RecA ファミリーのタンパク質群の機能に類似して相同的 DNA 対合を行なうことが明らかとなった。また、ミトコンドリアにおいて、Mhr1 が相同 DNA 対合反応を行なう際に、正味のトポロジー的变化を引き起こさずに、mtDNA をほどくことが示唆された。

(vi) ミトコンドリアに局在する 5'-3' エキソヌクレアーゼをコードする *DIN7* 遺伝子、*MHR1* 遺伝子の単一変異体、及び二重変異体において、野生型 mtDNA より優位に複製するという超抑制現象 (Hypersuppressiveness) を引き起こす mtDNA の複製開始点での二重鎖切断が顕著に増加することを見出した。これは、DNA の組換え能の低下がもたらした二重鎖切断修復欠損によるものと考えられる。5'-3' ヘリカーゼをコードする *PIF1* 遺伝子、及び ATP 依存型 3'-5' ヘリカーゼをコードする *HMI1* の欠損変異株において mtDNA 複製開始点での二重鎖切断が顕著に減少することから、ヘリカーゼが複製開始点での二重鎖切断部位の形成に働くことが判明した。また、5'-3' ヘリカーゼをコードする *PIF1* 遺伝子、及び ATP 依存型 3'-5' ヘリカーゼをコードする *HMI1* の欠損変異株において mtDNA 複製開始点での二重鎖切断が顕著に減少することから、ヘリカーゼが複製開始点での二重鎖切断部位の形成に働くことが判明した。さらに、mtDNA のコピー数の維持、及び mtDNA の Hypersuppressiveness に Pif1 が必要なこと、及び Hmi1 が Mhr1 に依存するローリングサークル型複製によるコンカテマーの合成に働くことを明らかにした。これらの結果は、ミトコンドリアに局在するヘリカーゼが組換えを介した mtDNA の複製、修復、及び分配に欠かせないことを示唆した。

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 6 件)

1. **Feng Ling**, Tsutomu Mikawa and Takehiko Shibata
Gene conversion through double-strand break-induced DNA replication and mitochondrial homoplasmy,
Genes, (2010), **2**, 169-190 (2011). (査読有)
2. Tokiha Masuda, **Feng Ling**, Takehiko Shibata, and Tsutomu Mikawa.
Analysis of DNA-binding sites on Mhr1, a yeast mitochondrial ATP-independent homologous pairing protein,
FEBS Journal, **277**, 1440-1452 (2010). (査読有)
3. **Feng Ling**, Minoru Yoshida, and Takehiko Shibata
Negative supercoil interference with homologous pairing mediated by Mhr1, an ATP-independent recombinase structurally unrelated to RecA/Rad51
The Journal of Biological Chemistry, **284**, 9341-9353 (2009). (査読有)
4. Akiko Hori, Minoru Yoshida, Takehiko Shibata, and **Feng Ling**
Reactive oxygen species contribute to recombination-mediated replication to regulate the mitochondrial DNA copy number
Nucleic Acids Research, **37**, 749-761, (2009). (査読有)
5. Ayako Yoshitani, **Feng Ling**, Minoru Yoshida
The yeast checkpoint kinase Dun1 down-regulates DIN7 in the absence of DNA damage
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **72**(6): 1630-1634. (2008). (査読有)
6. Ayako Yoshitani, Minoru Yoshida, **Feng Ling**
A novel *cis*-acting element required for DNA damage-inducible expression of yeast DIN7.
Biochemical and Biophysical Research Communications, **365**(1): 183-188 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. **Feng Ling**, Rong Niu, Elliot

Bradshaw, Takehiko Shibata, and Minoru Yoshida

Mitochondrial DNA homoplasmy as gene homogenization of repeated sequences by rolling circle replication.

RIKEN Joint Retreat 2011

January 31, 2011, Yamaha Resort Tsumagi, Kakegawa, Shizuoka

2. Takehiko Shibata, **Feng Ling** and Tsutomu Mikawa

Mitochondrial DNA homoplasmy as gene homogenization of repeated sequences by rolling circle replication.

The 7th conference of Asian Society for mitochondrial research and Medicine and 10th Japanese Society for mitochondrial research and Medicine

December 16, 2011, Fukuoka city.

3. 凌 楓(Feng Ling)、堀晶子、牛栄、柴田武彦、吉田稔

ROSで誘導される組換え依存型ミトコンドリア DNA複製

第9回日本ミトコンドリア学会年会 2009年12月17日、東京大学医学部鉄門記念講堂

4. 堀晶子、吉田稔、凌 楓(Feng Ling)、ミトコンドリア DNA コピー数を増加させるミトコンドリア融合

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

5. 柴田武彦、凌 楓(Feng Ling)

DNA の位相幾何学的変化を伴わない組換え中間体形成

第26回染色体ワークショップ
2008年1月16日、姫路

6. 凌 楓(Feng Ling)、吉田稔、柴田武彦
ミトコンドリアの相同組換え酵素反応への DNA の高次構造の効果

第8回日本ミトコンドリア学会年会
2008年12月14日、神戸

7. 凌 楓(Feng Ling)、堀晶子、柴田武彦、吉田稔

酵母ミトコンドリア DNA 複製開始点での二重鎖切断修復に働く相同 DNA 対合酵素 Mhr1

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会(BMB2008)

2008年12月10日、神戸

8. 堀晶子、柴田武彦、吉田稔、凌 楓(Feng Ling)

出芽酵母のミトコンドリア DNA の複製開始領域に起きる二重鎖切断導入機構

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会(BMB2008)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計1件）

名称：ヘテロプラスミー細胞をホモプラスミー化する方法

発明者：凌楓 (Feng Ling)、柴田武彦、牛栄、吉田稔、後藤雄一

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：特許

番号：特願 2009-285729

出願年月日：2009年12月16日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

凌 楓 (LING FENG)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学
研究室・専任研究員
70281665

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし