

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21370076

研究課題名（和文） 核とミトコンドリア複製の連携機構に関する研究

研究課題名（英文） Study of molecular coordination between nuclear and mitochondrial replications.

研究代表者

東谷 篤志 (Higashitani Atsushi)

東北大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：40212162

研究成果の概要（和文）：

核のチェックポイント制御機構に関わる ATR 遺伝子は、酵母からヒトに至るすべての真核生物に広く保存している。近年、ヒト遺伝病の 1 つ Seckel syndrome が本遺伝子の発現低下に起因し、その症状は多面的であるが核以外での機能については未知であった。本研究では、線虫 ATR *Ce-atl-1* の欠損変異により mtDNA のコピー数が低下すること、さらに抗酸化酵素の転写が活性化し過酸化脂質の蓄積も抑えられること、寿命が延長することを見出した。また、ヒト培養細胞で ATR を過剰発現することでオートファジー細胞死が誘導されることも明らかにし、生物種を越えて ATR が核以外でも多面的な働きを担うことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

ATR is highly conserved in all eukaryotes and functions as a cell-cycle nuclear checkpoint kinase. In mammals, ATR hypomorphic mutation causes a complex disease known as Seckel syndrome. However, molecular mechanisms that cause a wide variety of symptoms including accelerated aging have remained unclear. We here found that in the nematode *Caenorhabditis elegans*, a deletion mutant of ATR *atl-1* achieved longevity. Transcription levels of certain superoxide dismutase genes significantly increased in the mutant. In addition, mammalian ATR over-expression induced autophagic cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：オルガネラ、チェックポイント制御、複製、ミトコンドリア、ATR

1. 研究開始当初の背景

近年、様々なガン細胞においてミトコンドリア DNA (mtDNA) のコピー数の低下がみ

られるという現象が報告されてきた。さらに、ガン細胞におけるこの mtDNA のコピー数の低下は複製開始調節領域 D-loop に変異があ

る際に、より顕著に生じることが明らかになってきた。また、発ガン以外にも加齢と mtDNA の変異との関連性が強く示唆されている。さらに、ミトコンドリアシンドロームなどにみられる多面的な病状の解析も進められてきた。一方で、mtDNA のコピー数は正常な細胞においても組織や器官によって大きく異なり、これらの制御機構に関しては不明な点が多い。このように様々な局面で mtDNA 複製の障害や変異が観察されてきたが、それらによる細胞内シグナル伝達系の有無や、分子応答メカニズム、また細胞周期や細胞核の複製と mtDNA の複製の連携などの分子解明は、まさに重要な今後の課題といえる。

2. 研究の目的

本研究は、核とミトコンドリアの連携機構に関する分子解明を目指すものである。具体的には、モデル生物の1つである線虫ならびにヒト培養細胞を用いて、(I) 核のチェックポイント制御機構に関わる因子による mtDNA の複製制御に関わる新規な「アンテログレードシグナル機構」とともに、(II) 逆に mtDNA の複製障害から、核遺伝子で低酸素応答を含む一連の転写制御に至る分子機構「レトログレードシグナル機構」の両方向における核とミトコンドリアとの連携機構について分子レベルで解明することを研究目的としている。

これまで、私たちはモデル生物の1つである線虫 *C. elegans* を主に用いて、mtDNA 複製の制御に関わる遺伝子群の解析を行ってきた。その1つの結果として、核のチェックポイント制御機構に関わる ataxia-telangiectasia ファミリーの ATR 遺伝子 (*Ce-ATL-1*) の欠損により、mtDNA のコピー数が顕著に低下することを見出した (Mori et al. 2008 Genetics)。一方で、ATM や p53 の線虫 ortholog の CEP-1 の変異ではこの低下現象は観察されなかった。出芽酵母において、ATR タイプの Mec1 が DNA 合成のための基質生合成に関わる Ribonucleotide reductase (RNR) のインヒビターを介して制御することで、間接的に mtDNA のコピー数を調節していたが、今回の線虫のケースでは、dNTPs のプールの変化や rnr の RNAi を組合わせた実験等により、チェックポイント制御因子による RNR を介さない新たな mtDNA の維持機構が存在することを多細胞真核生物において、今回、初めて明らかにした。

また、同じく線虫を用いて、mtDNA 複製に必須なミトコンドリア一本鎖 DNA 結合タンパク質 (MTSS-1) を特定し、さらにその RNAi による発現抑制で mtDNA の複製阻害を行った。その結果、mtDNA のコピー数の

低下した線虫個体において、寿命の変化、アポトーシス活性への影響、ならびに、解糖系および糖新生に関わる遺伝子群の発現の亢進、一方、TCA 回路など酸化リン酸化反応に関わる遺伝子群の発現抑制が観察された。また、活性酸素種の除去にあたる SOD や catalase などの遺伝子群の発現誘導が観察され、mtDNA の複製障害により酸化ストレス障害が生じている可能性が強く示唆された。さらに、20%の定常酸素分圧下においても、これら RNAi 個体においては低酸素応答が誘導されることを見出した。これら一連の応答は、臭化エチジウムの処理による mtDNA の複製や転写を阻害した際にも、同様に観察されることを明らかにした (Sugimoto et al. 2008 Exp Cell Res)。これまでに、様々なガン細胞では、上述の mtDNA の異常に加えて、低酸素応答が誘導されることも独立に報告されてきたが、今回の線虫での発見は mtDNA の複製障害が、直接、低酸素応答を誘発することを実験的に証明したもので、その意義が高く評価され同発表誌の "Highlights" に取り上げられた。

そこで、本研究では線虫ならびにヒトをはじめとする哺乳類の培養細胞を用いて、(I) 核のチェックポイント制御機構に関わる ATM/ATR ファイミリーによる mtDNA の複製制御ならびに mtDNA の損傷修復に関わる新規な「アンテログレードシグナル機構と相互作用する関連分子の同定」とともに、(II) 逆に mtDNA の複製障害から、核遺伝子における低酸素応答を含む一連の転写制御に至る分子機構「レトログレードシグナル機構に関わる因子の同定」のそれぞれについて分子レベルでの解明を行う。それらを通して、多細胞真核生物に保存された核とミトコンドリアとの相互間での連携機構と、それらが破綻した際にみられる個体ならびに細胞レベルでの影響についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 線虫の ATR *atl-1* の RNAi ならびに欠損突然変異体を用いて、ミトコンドリアはじめ個体に及ぼす各種影響を調べる。

(2) ヒト培養細胞における ATR の細胞内局在性を解析する。

(3) ヒト ATR の過剰発現による影響をヒト培養細胞により解析する。

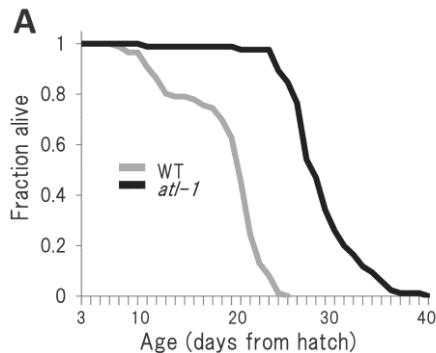
(4) 線虫を用いて、EtBr 処理によりミトコンドリアの転写や DNA 複製を阻害した際、また、ロテノンやアンチマイシン A の処理によりミトコンドリア電子伝達系を阻害した際、それぞれにおいて発現変動する遺伝子群の解析を行う。なかでも低酸素応答 *hif-1* の活性化の生理的意義について突然変異系統を用いて明らかにする。

(5) 植物 (オオムギやシロイヌナズナ) の

高温障害時にみられる花粉形成の阻害において、核ならびにミトコンドリア、要録体のDNA複製、分化などの影響について解析する。

4. 研究成果

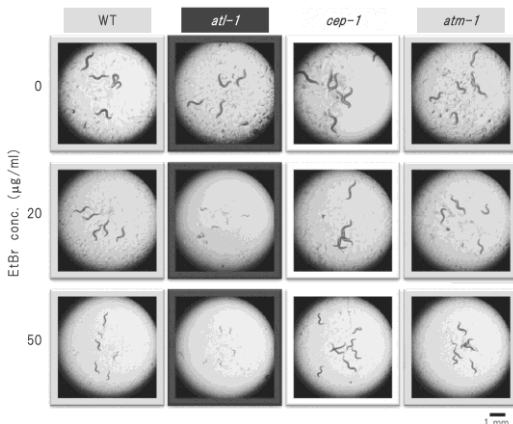
(1) 線虫 ATR ortholog *Ce-atl-1* の欠損変異体はヘテロ接合体で維持し、ホモ接合体の完全に欠損変異体は見かけ正常な雌雄同体の成虫にまで成長し、野生型と同数の卵を産卵する。一方で、その卵は胚発生初期で致死となり孵化することはない。そこで、本研究では見かけ正常な欠損変異体の成虫と野生型成虫の比較解析を行った。その結果、欠損変異体では、ヒト *Seckel syndrome* と逆に有意に寿命が延びることが確認された (図1)。



(図1) 野生型と *atl-1* 欠損変異体の寿命

さらに、*Ce-atl-1* の欠損変異体では、*sod-3*、*sod-5* など抗酸化酵素の転写が活性化し、過酸化脂質の加齢に伴う蓄積も抑えられることが明らかになった。

一方、*atl-1* 欠損変異体は、EtBr に対しては超感受性となり、低濃度の処理においても顕著な生育阻害が生じた。線虫の p53 ortholog *cep-1* 変異体においては、逆に、EtBr に抵抗性を示した (図2)。ミトコンドリアの電子伝達系の阻害剤であるロテノンに対しても、同欠損変異体では野生型と比較して、顕著な生育阻害が観察された。



(図2) *atl-1* 欠損変異体における EtBr 超感受性

sod-3 や *sod-5* の *atl-1* 欠損変異体における

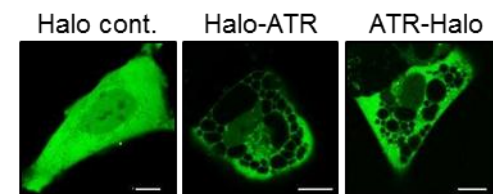
転写活性化には、DAF-16/FOXO 転写因子の活性化が関与していることが、その他 DAF-16/FOXO に制御される遺伝子群の発現解析から明らかになった。線虫においては、比較的マイルドな酸化ストレスなどが生じた際に、DAF-16/FOXO が活性化することが知られている。また、その活性化は抗酸化酵素の発現誘導などをもたらす、寿命の延長効果が生じることが報告されている。また、より強い酸化ストレスは寿命の短縮が生じ、ヒトやマウスなどと比較して、延長効果が示される閾値がかなり高いといえる。

今回の線虫における結果は、ヒト ATR の変異により *Seckel syndrome* が生じ、成長遅延や早老症など寿命が短縮する症状と類似し、ヒトにおいても ATR がミトコンドリアの制御に関わる可能性を強く示唆した。

(2) ヒト培養細胞における ATR の細胞内局在を明らかにするために、細胞分画を行い、核、ミトコンドリア分画、細胞質分画にそれぞれ分けて、抗 ATR 抗体による western blotting 解析を行った。その結果、ATR はいずれの分画にも検出され、核からミトコンドリア、細胞質まで広く局在することが確認された。

(3) ヒト培養細胞の Ad-cre lox により ATR 遺伝子が破壊されるシステムを用いて、ATR の KO 時のミトコンドリア影響を調べたが、Ad ウイルス感染から2日間程度で、細胞増殖が停止することで、実験系を構築することができなかった。

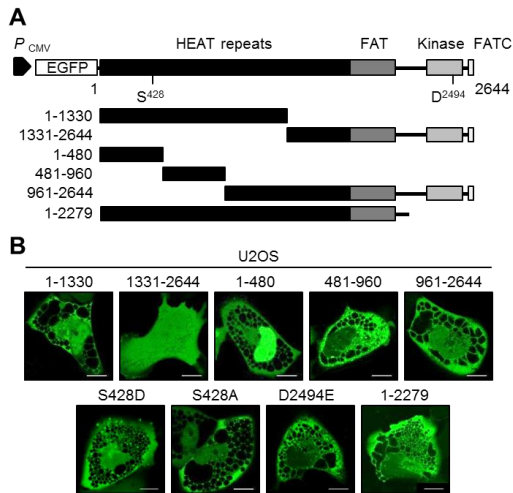
そこで、過剰発現体を作成することとして、Halo-tag や GFP と ATR の完全長 cDNA を融合させた組換え体をヒト培養細胞に形質導入した。その結果、過剰発現した細胞においては、12時間後から異常な空胞化が観察され、24時間後にはピークをむかえ、その



後、細胞死が観察された (図3)。

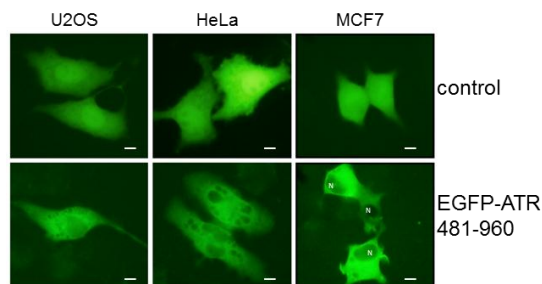
(図3) N 末ならびに C 末側に Halo tag を融合した完全長 ATR の過剰発現による細胞の異常な空胞化

この空胞化を引き起こすのに必要な ATR の各種 deletion 変異体を作成して調べた。その結果、ATR の C 末端に存在する PI-3K ドメインの酵素活性中心は必要なく、N 末端側に存在する HEAT repeat ドメインの過剰発現で生じることが明らかになった (図4)。



(図4) ヒト ATR の N 末に存在する HEAT repeat ドメインの過剰発現が空胞化を生じる

また、この空胞化が生じる際に、オートファジーの実行マーカーとなる LC3 の翻訳後修飾が起きていること、さらには、オートファジー欠損細胞 MCF7 に過剰発現させた際は、空胞化が顕著に抑制されることをみいだした (図5)。以上の結果から、ATR の過剰発現による異常な空胞化から細胞死に至る機構は、オートファジーを伴う細胞死が生



じていることが明らかになった。

(図5) MCF7 細胞においては ATR の過剰発現によっても空胞化は生じない

さらに、この空胞化は Ras 活性の阻害剤である FTS の添加により抑制されることから、Ras の活性化経路を介して、オートファジーが誘導されることが確認された。

一方、mTOR の不活化による細胞飢餓応答によってもオートファジーが誘導されることから、過剰発現により mTOR 活性が低下するか調べたが、mTOR の活性には変化がみられず、さらに ATR の下流の Chk1 の活性化にも変化がみられず、飢餓応答や細胞周期のチェックポイント制御機構とは全く異なることが明らかになった。

同様に、p53 欠損細胞においても ATR の過剰発現は空胞化を促し、また、ATM や mTOR、SMG1 などの他の PI-3K family の

過剰発現において空胞化は生じず、p53 の過剰発現においても同様であった。

以上のことから、これまで核のチェックポイント制御機構に関わる ATR が、ミトコンドリアや細胞質において、量的に発現が厳密に調整されていることを示す結果といえる。

さらに、線虫の結果からは、ATR は核のみならずミトコンドリアの複製制御にも深く関与し、両オルガネラをつなぐ役割があることが明らかになった。

(4) 線虫を EtBr により処理すると、ミトコンドリアの転写や DNA 複製が阻害され、また、ロテノンやアンチマイシン A の処理によりミトコンドリア電子伝達系が阻害される。これら阻害した際には、共通に低酸素応答 HIF-1 の活性化が、通常酸素分圧下においても生じることをみいだした。

一方で、HIF-1 の欠損変異体においても、ロテノンやアンチマイシン A 処理により *sod-3* の発現が誘導されることから、ミトコンドリア障害により生じた活性酸素に対して、はじめに DAF-16/FOXO が活性化され、抗酸化応答が生じると考えられる。また、並行して、もしくは DAF-16 の制御下において、HIF-1 が活性化し、低酸素応答が生じるものと思われる。さらに、*hif-1* 欠損変異体においては、アンチマイシン A に対して超感受性となり、より低濃度のアンチマイシン A 処理により麻痺がみとめられた。

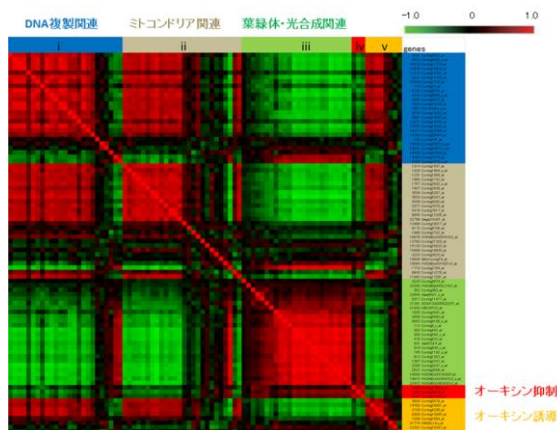
以上の結果から、ミトコンドリア障害による低酸素応答 HIF-1 の活性化が麻痺を抑える働きがあることが明らかになった。

(5) 植物は固着性を示すので動物と比べて様々な環境変化に対する高い適応能力や可塑性を有している。それらの高い能力は栄養成長において顕著であるが、一方、生殖成長においてはより脆弱であることも知られている。オオムギやコムギにおいては、平均気温が 25°C を越えると高温障害 (不稔) が生じやすいことが一般的に知られている。

オオムギのゲノムプロジェクトならびに cDNA プロジェクトは日本はじめ各国の協力下で進められ、約 2 万遺伝子の DNA マイクロアレイチップ (Affymetrix BarleyChip1) を数年前から利用できる状況にある。これを利用した網羅的な遺伝子発現の解析から、昼 30°C/夜 25°C の高温条件では、芽生えの栄養成長期においても幼穂のサンプルと同様かそれ以上に、熱ショック遺伝子の発現誘導がみられた。従って、生殖組織が栄養組織と比較して高温をより過敏に感受したためとは考えにくく、今回の常温から 10°C 上昇させた高温処理条件では全ての組織器官において、分子レベルでの熱ショック応答が生じてい

るものといえる。一方で、細胞の分裂増殖に不可欠なヒストンやリボソームタンパク質などの遺伝子群、DNAポリメラーゼやDNA複製のライセンス因子などの遺伝子群の発現は、高温条件下の幼穂で特異的に抑制がみられ、さらに *in situ* での解析の結果、幼穂のなかでも雄蕊始原細胞において特異的に生じていることが示された。すなわち、これら複製関連遺伝子群の発現抑制が前述の葯内での細胞分裂の早期停止につながり、葯の初期発生段階で特異的に生じていることが強く示唆された。

さらに、幼穂あたりの DNA 量を定量したところ、核、ミトコンドリア、葉緑体のいずれの DNA コピー数も、高温下で増加が顕著に阻害されることが示されたが、特に、ミトコンドリアや葉緑体のオルガネラ DNA の複製がより早期に停止していた。オオムギ *BarleyChip1* を用いて行われた DNA マイクロアレイ解析の公開されているデータ約 600 実験分を集めて、チップ上にスポットされている 2 万の遺伝子間の共発現の相関解析を行ったところ、DNA 複製に関わる遺伝子群はミトコンドリアに関わる遺伝子群ならびにオーキシン誘導性・応答遺伝子群と、発現に正の相関がみられること、一方、これらのグループと光合成・葉緑体関連遺伝子群ならびにオーキシン抑制タンパク質遺伝子群とは、発現に負の相関がみられることが明らかになった (図 6)。そして、前者のグループはオオムギの葯における高温障害時に発現が抑制され、後者のグループは発現が増加して



いた。

(図 6) 核、ミトコンドリア、葉緑体、オーキシン関連遺伝子群の発現相関の解析

以上の結果から、核とミトコンドリア、葉緑体の DNA 複製の連携機構が、一方、葉緑体の分化は逆に、高温障害に応答する形で、みいだすことができ、その際、植物ホルモンのオーキシンなどがシグナルとして機能することがわかった。

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 9 件)

(1) Higashitani A.

High temperature injury and auxin biosynthesis in microsporogenesis.

Front Plant Sci. 2013;4:47. Doi: 10.3389/fpls.2013.00047. (査読有)

(2) Suetomi K, Mereiter S, Mori C, Takanami T, Higashitani A.

Caenorhabditis elegans ATR checkpoint kinase ATL-1 influences life span through mitochondrial maintenance.

Mitochondrion. 2013 Feb 19. Doi:pii: S1567-7249(13)00028-7. 10.1016/j.mito.2013.02.004. (査読有)

(3) Mori C, Yamaguchi Y, Teranishi M, Takanami T, Nagase T, Kanno S, Yasui A, Higashitani A.

Over-expression of ATR causes autophagic cell death.

Genes to Cells 2013;18:278-287. Doi: 10.1111/gtc.12034. (査読有)

(4) Kimura T, Takanami T, Sakashita T, Wada S, Kobayashi Y, Higashitani A.

Innate immune genes including a mucin-like gene, *mul-1*, induced by ionizing radiation in *Caenorhabditis elegans*.

Radiat Res. 2012;178(4):313-20. Doi: 10.1667/RR2989.1 (査読有)

(5) Honda Y, Higashibata A, Matsunaga Y, Yonezawa Y, Kawano T, Higashitani A, Kuriyama K, Shimazu T, Tanaka M, Szewczyk NJ, Ishioka N, Honda S.

Genes down-regulated in spaceflight are involved in the control of longevity in *Caenorhabditis elegans*.

Sci Rep. 2012;2:487. Doi: 10.1038/srep00487. (査読有)

(6) Etheridge T, Nemoto K, Hashizume T, Mori C, Sugimoto T, Suzuki H, Fukui K, Yamazaki T, Higashibata A, Szewczyk NJ, Higashitani A.

The effectiveness of RNAi in *Caenorhabditis elegans* is maintained during spaceflight.

PLoS One. 2011;6(6):e20459. Doi: 10.1371/journal.pone.0020459. (査読有)

(7) Sakata T, Yagihashi N, Higashitani A.

Tissue-specific auxin signaling in response to temperature fluctuation.

Plant Signal Behav. 2010 Nov;5(11):1510-2. Doi: 10.4161/psb.5.11.13706 (査読有)

(8) Oshino T, Miura S, Kikuchi S, Hamada K,

Yano K, Watanabe M, Higashitani A.
Auxin depletion in barley plants under high-temperature conditions represses DNA proliferation in organelles and nuclei via transcriptional alterations.
Plant Cell Environ. 2011 Feb;34(2):284-90. Doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02242.x. (査読有)

(9) Sakata T, Oshino T, Miura S, Tomabeche M, Tsunaga Y, Higashitani N, Miyazawa Y, Takahashi H, Watanabe M, Higashitani A.
Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 May 11;107(19):8569-74. Doi: 10.1073/pnas.1000869107. (査読有)

[学会発表] (計4件)

(1) 2012 10 21-26 International Congress on Plant Molecular Biology (IPMB) Jeju, Korea
Trade-off between spikelet number and cool temperature tolerance in rice *Oryza sativa* L.
S. Oda, Y. Tsunaga, T. Sakata, T. Fujioka, K. Suwabe, M. Watanabe, K. Nagano and A. Higashitani

(2) 2012 10 21-26 International Congress on Plant Molecular Biology (IPMB) Jeju, Korea
Beware of a gene contributing to the Green Revolution in global climate change – Gibberellin signaling is essential to sustain pollen formation under lower temperature conditions in rice plant
T. Sakata, Y. Tsunaga, S. Oda, M. Kawagishi-Kobayashi, K. Aya, M. Watanabe, M. Matsuoka and A. Higashitani

(3) 2012 9 6-8 放射線影響学会ワークショップ
仙台
Biological responses to ionizing radiation in the nematode *C. elegans*
東谷篤志

(4) 2012 7 21 日本動物学会関東支部会 公開講演会 東京 東京医科歯科大
「驚異の生命—宇宙を目指す動物たち—」
小さな宇宙飛行士「線虫」の活躍
東谷篤志

[図書] (計1件)

(1) 東谷篤志
植物の高温障害にみられる雄性不稔の発生メカニズムとオーキシン
植調 (2013) 46: 525-533.

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

(1) 名称: イネ用低温雄性不稔抑制剤
発明者: 東谷篤志、小田晋、渡辺正夫
権利者: 東谷篤志、小田晋、渡辺正夫
種類: 特願
番号: JP2012-261518
出願年月日: 2012.11.29
国内外の別: 国内

(2) 名称: METHOD TO RESTORE MALE STERILITY IN GRAMINEOUS PLANTS AND MALE STERILITY RESTORATIVE AGENT
発明者: Higashitani A., Watanabe M, Sakata T.
権利者 Higashitani A., Watanabe M, Sakata T. :
種類: PCT/JP2010/50101
番号: WO2010079805
出願年月日: 2010.07.15
国内外の別: 国外

(3) 名称: イネ科植物の雄性不稔を回復させる方法および雄性不稔回復剤
発明者: 東谷篤志、渡辺正夫、阪田忠
権利者: 東谷篤志、渡辺正夫、阪田忠
種類: 特願
番号: 2009-002354
出願年月日: 2009.01.08.
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/genomic_reproductive_bio/

<http://www.ige.tohoku.ac.jp/genome/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東谷 篤志 (Higashitani Atsushi)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号: 40212162