

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22570213

研究課題名(和文)ミトコンドリアDNA結合タンパク質Abf2の多様性と進化

研究課題名(英文)Diversity and evolution of mitochondrial DNA-binding protein, Abf2

研究代表者

宮川 勇 (MIYAKAWA, Isamu)

山口大学・理工学研究科・教授

研究者番号：50136165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：酵母*S. cerevisiae*のミトコンドリアDNA結合タンパク質Abf2の進化を明らかにするために、出芽酵母*Y. lipolytica*と分裂酵母*S. pombe*のミトコンドリア核様体から、新規なDNA結合タンパク質として、それぞれMhb1とCmb1を同定した。Mhb1とCmb1は共にC末端側にHMGドメインをひとつ保持するタンパク質であり、本研究で両者のタンパク質のDNA結合性を明らかにした。さらに、Cmb1に対する抗体を作成し、Cmb1がミトコンドリアに局在し、*S. cerevisiae*のAbf2の機能を相補できることを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to reveal the evolution of mitochondrial DNA-binding protein, Abf2 in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, we identified Mhb1 and Cmb1 proteins as novel mitochondrial DNA-binding proteins from the mitochondrial nucleoids of the budding yeast *Y. lipolytica* and the fission yeast *S. pombe*, respectively. Both of Mhb1 and Cmb1 proteins retain one HMG domain at the C-terminal region of the protein. We revealed the DNA-binding characters of both proteins. We raised a polyclonal antibody against Cmb1 and demonstrated that Cmb1 is localized to mitochondria by immunofluorescence microscopy. We also demonstrated that Cmb1 complements the function of Abf2 in *abf2*-deficient cells of *S. cerevisiae*.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：酵母 ミトコンドリア ミトコンドリア核様体 DNA結合タンパク質 Abf2

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア・ゲノムは特異的な DNA 結合タンパク質によって折り畳まれ、ミトコンドリア核様体を形成していることは広く認められている。ミトコンドリア DNA 結合タンパク質の代表として出芽酵母の Abf2 とヒトの TFAM が詳しく研究されている。両者のタンパク質は HMG ドメインを 2 つ保持することから、Abf2 は当初保存性の高いタンパク質と考えられたが、筆者らの解析で、酵母 Abf2 が変異速度の速いタンパク質であることが示唆された。

2. 研究の目的

分子系統樹において、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* から離れた酵母のミトコンドリア核様体を単離する方法を開発し、ミトコンドリア核様体結合タンパク質の中から DNA 結合タンパク質 Abf2 のホモログを同定する。そして、酵母の進化過程で、ミトコンドリア DNA 結合タンパク質 Abf2 がどのように構造と機能を進化させてきたのかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 出芽酵母 *S. cerevisiae* の Abf2 の欠損がミトコンドリア機能にどのような影響を与えるかを解析する。
- (2) 出芽酵母 *S. cerevisiae* 以外でゲノムデータベースを利用できる酵母について、ミトコンドリア核様体の単離方法を開発する。
- (3) 単離したミトコンドリア核様体のタンパク質成分を SDS-DNA PAGE で分離し、筆者らが報告した方法(Miyakawa et al. 2000)で、ゲルをエチジウムブロミド染色することで、Abf2 のような低分子 DNA 結合タンパク質を検出する。
- (4) 検出したタンパク質を PVDF 膜に転写し、N 末端からのアミノ酸配列を調べ、データベースで検索することで、タンパク質をコードする遺伝子を明らかにする。
- (5) 大腸菌での Abf2 ホモログの発現とカラムによる精製を行い、精製タンパク質を用いて DNA 結合性をゲルシフトアッセイなどの方法により明らかにする。
- (6) 精製タンパク質を抗原としてポリクローナル抗体を作成し、イムノプロット法、間接蛍光抗体法により細胞内局在部位を明らかにする。
- (7) ミトコンドリア DNA 結合タンパク質の遺伝子欠損株や過剰発現株を作成して、ミトコンドリア DNA の維持や細胞機能に Abf2 ホモログがどのような役割を果たしているかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 酵母ミトコンドリア DNA 結合タンパク質 Abf2 の欠損がミトコンドリア核様体およびミトコンドリアの形態にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、Abf2 が欠損し

ても、娘細胞へのミトコンドリア自体の伝達は正常に行われるが、娘細胞へのミトコンドリア核様体の伝達量が減少することを明らかにした。また、Abf2 の欠損はミトコンドリア核様体タンパク質組成全体には大きな変化をもたらさないことを明らかにした。

(2) *S. cerevisiae* から分子系統樹で離れた位置にいる炭化水素資化酵母 *Yarrowia lipolytica* の Abf2 ホモログ Mhb1 を同定し、このタンパク質の全長、N 末端側半分、C 末端側半部分をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として大腸菌で発現し、精製することでその機能を調べた。その結果、ゲルシフトアッセイでは HMG ドメインを保持する C 末端側よりも、HMG ドメインを保持しない N 末端側に強い DNA 結合性がみられることを明らかにした。また、N 末端が C 末端側よりも DNA を凝集させる作用が強いことを明らかにした。これらの結果は、Abf2 ホモログ Mhb1 の N 末端側と C 末端側の機能の違いを示唆している。

(3) 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のミトコンドリア核様体単離方法を開発し、26 kDa の新規な DNA 結合タンパク質として Cmb1 を同定した。Cmb1-GFP 融合タンパク質を作成して分裂酵母染色体に挿入し、発現させた結果、Cmb1-GFP は細胞核にはなくミトコンドリアに局在することを明らかにした。Cmb1 の細胞内局在性をさらに確かめるために、大腸菌で発現した Cmb1 を精製し、ウサギでポリクローナル抗体を作成した。得られた抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った結果、Cmb1 はミトコンドリアに局在することを明らかにした。

(4) 大腸菌で Cmb1 の全長、N 末端側半分、C 末端側半部分をそれぞれ GST 融合タンパク質として発現し、精製した。それらのタンパク質を用いてゲルシフトアッセイで DNA 結合性を調べた結果、HMG ドメインを含まない N 末端側半部分が、HMG ドメインを含む C 末端側半部分よりも強い DNA 結合性を示すことを明らかにした。

(5) Cmb1 遺伝子を欠損した分裂酵母株を作成して、ミトコンドリア DNA 維持とミトコンドリア形態に及ぼす影響を調べた。その結果、30 での培養では顕著な影響は見られなかったが、培養温度を 37 にシフトして温度ストレスをかけると、Cmb1 欠損株では野生株と比較して顕著なミトコンドリア核様体の凝集をおこすことを発見した。このことは、分裂酵母では、高温ストレス時のミトコンドリア核様体の維持に Cmb1 が必要であることを示している。

(6) Cmb1 が出芽酵母 *S. cerevisiae* の Abf2 の機能を相補できるかについて調べた。その目的で、ガラクトース培地で発現誘導できる発現ベクター pYES/CT に Cmb1 遺伝子を組み込み、*S. cerevisiae* Abf2 欠損株を形質転換した。Abf2 欠損株をガラクトース培地で培養すると、野生株に比べて細胞当たりのミトコン

ドリア核様体数の顕著な減少がみられた。しかし、Abf2 欠損株で Cmb1 を発現させると、ミトコンドリア核様体数は野生株と同程度まで回復した。この結果から、Cmb1 は Abf2 の機能を相補できることが明らかになった。(7)本研究において、新たなミトコンドリア DNA 結合タンパク質として Mhb1 と Cmb1 が明らかになった。今後、酵母 *Y. lipolytica* は、絶対好気性生物のミトコンドリア DNA の維持機構のモデルとして研究の発展が期待できる。そして、Abf2、Mhb1、Cmb1 の構造と機能を詳しく比較することで、ミトコンドリア DNA 結合タンパク質が進化してきた過程を追跡できることが期待できる。

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) Misonou, Y., Kikuchi, M., Sato, H., Inai, T., Kuroiwa, T., Tanaka, K., Miyakawa, I. Aldehyde dehydrogenase, Ald4p, is a major component of mitochondrial fluorescent inclusion bodies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biology Open*, 査読有, 3, pp.387-396, 2014.
DOI: 10.1242/bio.20147138
- 2) Miyakawa, I., Arata, K., Matsunobu, M., Inai, T. Methods for staining mitochondria and mitochondrial nucleoids of the yeast *Yarrowia lipolytica* grown on a hydrophobic substrate. *Cytologia*, 査読有, 78, pp. 321-326, 2013.
- 3) Murafuji, T., Kitagawa, K., Yoshimatsu, D., Kondo, K., Ishiguro, K., Tsunashima, R., Miyakawa, I., and Mikata, Y. Heterocyclic bismuth carboxylates based on a diphenyl sulfone scaffold: Synthesis and antifungal activity against *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 査読有, 63, pp. 531-535, 2013.
- 4) Miyakawa, I., Nakahara, A., and Ito, K. Morphology of mitochondrial nucleoids, mitochondria, and nuclei during meiosis and sporulation of the yeast *Saccharomyces ludwigii*. *Journal of General and Applied Microbiology*. 査読有, 58, pp. 43-51, 2012.
- 5) Fukodomi, T., Kotani, T., Miyakawa, I. A simple method for culture and stable maintenance of giant spheroplasts from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General and Applied Microbiology*. 査読有, 57, pp. 177-182, 2011.
- 6) Miyakawa, I., Kanayama, M., Fujita, Y.,

Sato, H. Morphology and protein composition of the mitochondrial nucleoids in yeast cells lacking Abf2p, a high mobility group protein. *Journal of General and Applied Microbiology*, 査読有, 56, pp.455-464, 2010.

[学会発表](計 24 件)

- 1) 宮園慶大、井内智美、宮川 勇、分裂酵母のミトコンドリア DNA 結合タンパク質 Cmb1 の機能解析、第 31 回 YEAST WORKSHOP、2013年11月1日～11月2日、鹿児島大学(鹿児島市)
- 2) 岡本 哲、井内智美、宮川 勇、酵母呼吸欠損株のミトコンドリア核様体の形態と単離したミトコンドリア核様体の性質、第 31 回 YEAST WORKSHOP、2013年11月1日～11月2日、鹿児島大学(鹿児島市)
- 3) 出水翔太郎、江口明彦、佐藤 浩、宮園慶大、井内智美、宮川 勇、Cmb1 は分裂酵母のミトコンドリア DNA 結合タンパク質である、日本植物学会第 77 回大会、2013年9月13日～9月15日、北海道大学(札幌市)
- 4) 井内智美、宮川 勇、出芽酵母のアルデヒド脱水素酵素 Ald4p による封入体形成とミトコンドリア機能との関係、日本植物学会第 77 回大会、2013年9月13日～9月15日、北海道大学(札幌市)
- 5) 岡本 哲、井内智美、宮川 勇、酵母呼吸欠損株から単離したミトコンドリア核様体の特徴、日本植物学会第 77 回大会、2013年9月13日～9月15日、北海道大学(札幌市)
- 6) 出来弘多、井内智美、宮川 勇、酵母呼吸欠損株誘導に関わる NUC2 ヌクレアーゼの解析、中国四国地区生物系三学会合同大会、2013年5月11日～5月12日、徳島大学(徳島市)
- 7) 岡本 哲、井内智美、宮川 勇、酵母呼吸欠損株のミトコンドリアおよびミトコンドリア核様体の特徴、中国四国地区

- 生物系三学会合同大会、2013年5月11日～5月12日、徳島大学（徳島市）
- 8) 井内智美、宮川 勇、出芽酵母のアルデヒド脱水素酵素 Ald4p の発現制御とミトコンドリア形態との関係、中国四国地区生物系三学会合同大会、2013年5月11日～5月12日、徳島大学（徳島市）
 - 9) 岡本 哲、宮川 勇、酵母呼吸欠損株のミトコンドリアとミトコンドリア核様体の形態的特徴、第30回 Yeast Workshop、2012年11月16日～11月17日、翠山荘（山口市）
 - 10) 泉田昌彦、宮川 勇、酵母ミトコンドリア核様体 Mnp1p 欠損株の性質、第30回 Yeast Workshop、2012年11月16日～11月17日、翠山荘（山口市）
 - 11) 出水翔太郎、江口明彦、佐藤 浩、宮川 勇、分裂酵母のミトコンドリア DNA 結合タンパク質の同定、日本植物学会第76回大会、2012年9月15日～9月17日、兵庫県立大学（姫路市）
 - 12) 宮川 勇、青木智代、大野文吾、出水翔太郎、酵母 *Yarrowia lipolytica* のミトコンドリア DNA 結合タンパク質 YlAbf2 の解析、中国四国地区生物系三学会合同大会、2012年5月12日～5月13日、島根大学（松江市）
 - 13) 出来弘多、宮川 勇、酵母呼吸欠損誘導に関わる NUC2 ヌクレアーゼの解析、第29回 Yeast Workshop、2011年11月11日～11月12日、徳島文理大学（徳島市）
 - 14) 出水翔太郎、佐藤 浩、宮川 勇、分裂酵母のミトコンドリア DNA パッケージングタンパク質の同定、第29回 Yeast Workshop、2011年11月11日～11月12日、徳島文理大学（徳島市）
 - 15) 柴田康宏、宮川 勇、酵母ミトコンドリアの同調的融合・分裂系を用いたミトコンドリア形態形成の解析、第29回 Yeast Workshop、2011年11月11日～11月12日、徳島文理大学（徳島市）
 - 16) 重松辰典、門脇 祐、宮川 勇、ヌクレアーゼ処理に対する酵母ミトコンドリア DNA の感受性に解析、第29回 Yeast Workshop、2011年11月11日～11月12日、徳島文理大学（徳島市）
 - 17) 宮川 勇、大野文吾、出水翔太郎、酵母ミトコンドリア核様体タンパク質 Abf2p の多様性と DNA 結合性、日本植物学会第75回大会、2011年9月17日～9月19日、東京大学（東京都）
 - 18) 宮川 勇、中原亜友美、伊藤亘平、酵母 *Saccharomyces ludwigii* の減数分裂における核とミトコンドリアの形態、中国四国地区生物系三学会合同大会、2011年5月14日～5月15日、香川大学（高松市）
 - 19) 本多 優、宮川 勇、培養条件が異なる酵母から単離したミトコンドリア核様体の分析、第28回 YEAST WORKSHOP、2010年11月12日～11月13日、ローズイン備後ハイツ（福山市）
 - 20) 中原亜友美、伊藤亘平、宮川 勇、酵母 *Saccharomyces ludwigii* の減数分裂様式、第28回 YEAST WORKSHOP、2010年11月12日～11月13日、ローズイン備後ハイツ（福山市）
 - 21) 出水翔太郎、江口明彦、宮川 勇、分裂酵母のミトコンドリア DNA 結合タンパク質の分析、第28回 YEAST WORKSHOP、2010年11月12日～11月13日、ローズイン備後ハイツ（福山市）
 - 22) 出来弘多、門脇明香、宮川 勇、酵母呼吸欠損株誘導過程に関わるヌクレアーゼの解析、第28回 YEAST WORKSHOP、2010年11月12日～11月13日、ローズイン備後ハイツ（福山市）
 - 23) 門脇 祐、重松辰典、宮川 勇、ヌクレアーゼ処理による酵母ミトコンドリア

核様体の構造解析、日本植物学会第 74
回大会、2010 年 9 月 9 日～9 月 11 日、
中部大学（春日井市）

- 24) 宮川 勇、門脇 明香、青木 美樹、
酵母呼吸欠損株誘導過程におけるミト
コンドリア核様体の形態、中国四国地区
生物系三学会合同大会、2010 年 5 月 15
日～5 月 16 日、山口大学（山口市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 勇 (MIYAKAWA, Isamu)
山口大学・理工学研究科・教授
研究者番号：50136165

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：