

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：37128

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590395

研究課題名(和文) ヒトミトコンドリアDNAの異常に関わる新規因子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Analyses of new genes involved in human mitochondrial DNA abnormality

研究代表者

福應 温 (Fukuoh, Atsushi)

純真学園大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：80363365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアDNAの健全な複製、修復そして伝達は生命にとって必要不可欠である。これらミトコンドリアDNA維持機構に働く因子の異常は様々な病態と関連しているために長年興味深い研究対象となっているにもかかわらず、まだその全貌は明らかになっていない。本研究ではミトコンドリアDNAの量的維持に着目したゲノムワイドRNAiスクリーニングで得られた陽性遺伝子について機能的な解析を行った。その結果、ミトコンドリアDNAの複製フォークの保護機構などミトコンドリアDNAの量的異常に関わる新たな分子機構を解明する端緒となる成果を上げることができた。

研究成果の概要(英文)：The faithful replication, repair and transmission of mitochondrial DNA (mtDNA) are essential for life. The machinery of mtDNA maintenance is only partially characterized despite the wide interest due to its involvement in disease, ranging from neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease through to susceptibility to cardiac ischemia, and perhaps aging. To identify novel components of this machinery, a genome-wide RNAi screen was previously performed, assaying for loss of fluorescence of mtDNA nucleoids stained with the DNA-intercalating agent PicoGreen. In this study, we performed a series of functional analyses on some of the screen positive genes and revealed some of novel pathway that might be involved in human mitochondrial DNA maintenance.

研究分野：ミトコンドリア病の分子生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA DNA維持機構 ATP合成酵素 転写終結因子 複製フォークバリア エクソソーム RNA分解

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアは細胞内にある小器官で、われわれが必要とするエネルギーのほぼすべてを ATP (アデノシン三リン酸) として産生する。ミトコンドリアは約 20 億年前に自律的な生命体であることを捨てて真核細胞と共生したと考えられており、その名残としてその内部に細胞核 DNA とは別個のゲノム情報を今なお保持している。それがミトコンドリア DNA (mtDNA) である。mtDNA の健全な複製、修復そして伝達は生命にとって必要不可欠である。それらの過程の異常は様々な病態と関連している。例えば、特定疾患であるミトコンドリア脳筋症は mtDNA 上の変異によって心臓、骨格筋、脳などに異常を生じる。現在、いわゆるミトコンドリア病患者は国内に約 5~600 万人が存在していると推定されている。また、近年では mtDNA の異常と糖尿病などの生活習慣病や加齢、がんとの関連も注目されている。こうした背景により mtDNA 維持機構の全貌をつかむことはミトコンドリア機能低下に起因する様々な疾患の理解と治療法の開発の為に強く求められている。

(2) 研究代表者はタンペレ大学 (フィンランド) において mtDNA の特異的蛍光染色とゲノムワイド RNAi を組み合わせた機能的スクリーニング法を開発し、mtDNA 維持機構新規関連遺伝子の探索を行った。ショウジョウバエの Schneider 2 (S2) 細胞は RNAi 実験に適しており、ゲノムワイドの遺伝子スクリーニングに広く使われている細胞である。さらに、先行研究からショウジョウバエにおいて mtDNA 維持の基本機構はヒトをはじめとする哺乳動物のそれと非常に類似していることがわかっている。以上のような優位性から、研究代表者は DNA 結合蛍光試薬である PicoGreen を用いて S2 細胞の mtDNA を生細胞内で特異的に染色する条件を確立し、ショウジョウバエ全遺伝子についてそれぞれの RNAi (約 16,000 RNAi) 条件化での mtDNA シグナルを蛍光顕微鏡で観察した。初期スクリーニングの結果、mtDNA シグナルが著しく減少する約 100 の遺伝子を陽性遺伝子として抽出した。

2. 研究の目的

スクリーニング陽性遺伝子の多くはヒトホモログが存在し、ヒトをはじめ哺乳動物においても mtDNA の維持機構に関わることが予想できる。本研究ではショウジョウバエゲノムのスクリーニングで得られた陽性遺伝子のヒトホモログを探索し、それらのヒト mtDNA 維持機構における役割を明らかにすることを目的とする。特に本研究期間においては新規遺伝子のヒトホモログを個々にノックダウンあるいは過剰発現させた培養細胞株を構築し、mtDNA の異常を検出する事を予定している。ショウジョウバエ細胞においてはそれら新規遺伝子を RNAi によって個々にノックダウンすると、多くの場合にそれぞれの細胞内の mtDNA コピー数が減少することを定量的 PCR によって既に確認している。具体的には、本研究期間においてはスクリーニングによって得られた陽性遺伝子のそれぞれにつ

いてヒトホモログを探索し、その細胞内局在を明らかにする。さらにそれらの発現量を増減させた培養細胞株を構築し、mtDNA の異常を検出する事を目標とする。

3. 研究の方法

(1) ノックダウン細胞と過剰発現細胞の作成：本研究では mtDNA の異常を観察する為や mtDNA やヌクレオイドの細胞内局在を観察する為いくつかの培養細胞系を用いる。実験に応じて適宜細胞を選択する事を考えている。ノックダウン細胞を樹立する。本研究では細胞内で siRNA を発現させる系を樹立することも検討する。過剰発現細胞：目的遺伝子の細胞内局在や過剰発現の mtDNA の量的維持への影響を明らかにする為に GFP などの蛍光タンパク質やエピトープタグ付加タンパクの発現を行う。

(2) mtDNA 異常の検出系の構築： mtDNA のコピー数：定量的 PCR によって mtDNA のコピー数を測定する方法が確立しているため、それを用いて測定する。 mtDNA の形態：哺乳動物の mtDNA は環状 DNA であり、その形態 (DNA conformation) は 1 本鎖あるいは 2 本鎖の DNA 切断によって変化する。細胞から調整した totalDNA をアガロースゲルで分離し、Southern blotting による mtDNA の検出を行う。 ミトコンドリアヌクレオイド：ミトコンドリアのヌクレオイドは TFAM や Twinkle helicase などのヌクレオイド局在タンパク質や抗 DNA 抗体、さらに PicoGreen などをもちいて蛍光顕微鏡下で観察できる。その系を用いてミトコンドリアヌクレオイドの変化を観察する。 mtDNA 複製中間体： mtDNA の異常を DNA の複製中間体の検出によく用いられている 2DNAGE により観察する系を用いる。

(3) ミトコンドリア機能解析： mtDNA の異常が検出された場合、それがミトコンドリア機能に与える影響を調べる。具体的には酸素消費、ATP 産生、膜電位活性酸素種の産生などを測定する。

4. 研究成果

(1) 新規遺伝子探索の完成：本研究期間において先行研究として開始していた mtDNA の量的維持に関わる新規遺伝子の探索における再スクリーニングを終了させることができた。その成果は mtDNA の量的維持機構の解明の進展に大きく寄与するものと評価され *Mol Syst Biol* 誌に掲載された (図 1)。スクリーニング陽性遺伝子として抽出された遺伝子には DNA polymerase gamma や Twinkle helicase、mtSSB などの mtDNA の複製や維持に関わると報告されているタンパク質因子をコードする遺伝子のほとんどが含まれていた。しかしながら、これまで mtDNA との関連が示唆されていない遺伝子も多く含まれていた。陽性遺伝子を分類すると以下のようなカテゴリーに分類された。 mtDNA の複製・維持に関わるもの、細胞質翻訳に関わるもの、プロテアソームに関するもの、ATP 合成酵素サブユニット、ミトコンドリアの生合成・ダイナミズムに関与するもの、核の遺伝子発現に関与するもの、その他

(機能未知のものを含む)

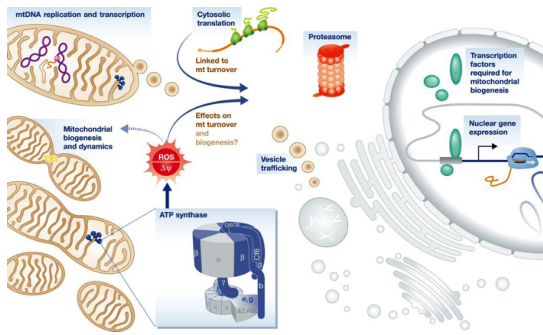


図1 陽性遺伝子のカテゴリー：最終陽性遺伝子を7つのカテゴリーに分類した。陽性遺伝子カテゴリーのうちミトコンドリアで働く遺伝子産物を青色で示す。

(2) MTERF ファミリータンパク質による mtDNA 複製フォーク保護機構：MTERF (mitochondrial transcription termination factor) タンパク質は MTERF モチーフと呼ばれるロイシンジッパー様の保存されたアミノ酸配列を持つ一群のタンパク質で、ほとんどの多細胞生物に保存されている。多くの生物種で MTERF1 から MTERF4 までの4つのサブファミリーを構成している。ヒトではミトコンドリア脳筋症の原因となる mtDNA 上の tRNA 変異 (3243G 変異) が MTERF1 結合領域と重なっているため、その機能との関連が予想されている。一方、ショウジョウバエゲノムにおいても4つの MTERF タンパク質が同定されている。そのうち mTTF タンパク質はショウジョウバエの MTERF ファミリーでもっとも良く研究されている分子であり、mtDNA 上の2か所の結合サイトにおいて転写装置を停止させることが *in vivo* および *in vitro* で証明されている。研究成果(1)に記載したスクリーニングでは mTTF のほかに mTerf5 が陽性遺伝子として抽出されたが、mTerf5 は最近 mTTF と協調して転写終結に働くことが報告された。我々は mTTF および mTerf5 の発現を細胞レベル、あるいは個体レベルで抑制して mtDNA の複製中間体を詳細に解析し、mtDNA の複製フォークが mTTF 結合領域で一時停止すること、mTTF のノックダウンにより複製フォークの部位特異的停止が阻害され、非特異的な複製フォークの停止の増大やラギング鎖合成の阻害されることを見出した。また長時間の発現抑制によって mtDNA コピー数は約 20%まで減少することを明らかにした。一方、mTerf5 のノックダウンでは mTTF 結合領域での複製フォークの停止が増大した。これらの結果から我々は mTTF と mTerf5 とが mtDNA 上の mTTF 結合領域において転写装置と複製フォークとの衝突を回避するためのいわゆる「複製フォークバリア (replication fork barrier: RFB)」として協調的に機能するというモデルを提唱している。この結果は MTERF ファミリータンパク質の機能が直接 mtDNA の量的維持と関連していることを直接的に証明した成果として *PLoS*

Genet 誌に掲載された。この報告に先立ってヒトの MTERF1 の過剰発現細胞を作成したところ、やはり mtDNA コピー数が減少することが分かった(引用文献)。このことから MTERF ファミリータンパク質による mtDNA 複製フォーク保護機構には普遍性が予想できる。現在、mTTF と mTerf5 がどのように協調して働いているか、その分子機序の解明を進めている。

<引用文献>

Hyvärinen AK, Pohjoismäki JL, Holt IJ, Jacobs HT. (2011) Overexpression of MTERFD1 or MTERFD3 impairs the completion of mitochondrial DNA replication. *Mol Biol Rep.* 38: 1321-1328.

(3) 呼吸鎖複合体 V の機能と mtDNA および mtDNA ヌクレオイド構造の安定性：ミトコンドリアの呼吸鎖複合体は電子伝達系とも呼ばれ、電子の流れに伴ってミトコンドリアマトリクスと膜間スペースとの間に発生するプロトン(H⁺)の密度勾配を利用して細胞の活動に必要な ATP を産生する。呼吸鎖複合体 V はミトコンドリア内膜に存在する F1FoATP 合成酵素である。ATP 合成酵素を構成するサブユニットをコードする遺伝子は 2 つが mtDNA にコードされ、14 遺伝子が核にコードされている。研究成果(1)に記載したスクリーニングでは核にコードされている 14 遺伝子のうち 9 つが陽性遺伝子として抽出された。9 遺伝子のそれぞれの遺伝子の発現抑制を行うと mtDNA のコピー数の減少が観察され、そのうち 3 遺伝子では特に顕著であった。これまで酵母やトリパノソーマなどの原虫においては mtDNA の健全な量的維持に ATP 合成酵素が必要であることがいくつも報告されているが、今回の結果からは多細胞生物においても普遍的制御機構があることが予想できる。mtDNA のコピー数の減少が比較的穏やかな ATP 合成酵素サブユニットの発現抑制においてもミトコンドリア膜電位の低下が観察され、呼吸鎖複合体 I 及び IV からの活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)の産生が増大した。ROS の産生増大と mtDNA のコピー数の減少は ATP 合成酵素の阻害剤であるオリゴマイシンの添加によっても再現されたが、mtDNA のコピー数の減少を ROS による mtDNA 損傷だけで説明することは難しかった。スクリーニング陽性遺伝子としては核にコードされる遺伝子の発現制御やタンパク質分解にかかわる遺伝子が多数同定されており、ミトコンドリアの生合成の低下や分解の亢進そのものが mtDNA のコピー数の減少を引き起こしているのかも知れない。実際、ATP 合成酵素サブユニットの発現抑制下では細胞内成分の分解に関わるリソソームが増大し、リソソームとミトコンドリアとが共存することが観察された。mtDNA の量的維持は細胞内の状態にตอบสนองして調節されていると考えられるが、ATP 合成酵素の抑制は mtDNA のコピー数減少をもっとも強く引き起こしていた。この成果は ATP 合成酵素と mtDNA の量的調節に関する新しい研究の端緒として評価され *Mol Syst Biol* 誌に掲載された。

(4) エキソソーム関連タンパク質と mtDNA 維持機構: エキソソームは真核生物において主要な 3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を担う巨大複合体であり、RNA 代謝の様々な局面において中心的な役割を担っている。研究成果(1)に記載したスクリーニングではエキソソームのヌクレアーゼがスクリーニング陽性であり、その発現抑制が mtDNA ヌクレオイドの異常を引き起こした。本研究期間では我々は出芽酵母のホモログが一部ミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア DNA から転写された RNA の分解を行っていることが報告されている。このヌクレアーゼのヒトホモログは3つの遺伝子にコードされており、それぞれの遺伝子に対して RNA 干渉を用いた発現抑制を行ったところ、そのひとつの遺伝子で mtDNA コピー数の減少、mtDNA ヌクレオイドの構造異常、発現抑制細胞の増殖阻害を観察した。研究成果(2)の項に記載したように mtDNA 上では DNA の複製と転写が密接に連携しあっていることが予想でき、この研究成果は mtDNA 内の RNA 分解機構と mtDNA 維持との関連を明らかにするために重要な視点を提供している。現在、ヒト培養細胞を用いて、当該タンパク質の細胞内局在、ミトコンドリア機能への影響など解析を進めている。(未発表)

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)

Fukuoh A, Cannino G, Gerards M, Buckley S, Kazancioglu S, Scialo F, Lihavainen E, Ribeiro A, Dufour E, Jacobs HT. Screen for mitochondrial DNA copy number maintenance genes reveals essential role for ATP synthase. *Mol Syst Biol*. 2014 Jun 21;10:734. doi: 10.15252/msb.20145117.

Mitochondrial transcription terminator family members mTTF and mTerf5 have opposing roles in coordination of mtDNA synthesis. Jöers P, Lewis SC, Fukuoh A, Parhiala M, Ellilä S, Holt JJ, Jacobs HT. *PLoS Genet*. 2013;9(9):e1003800. doi: 10.1371/journal.pgen.1003800.

Effects of DNA lesions on the transcription reaction of mitochondrial RNA polymerase: implications for bypass RNA synthesis on oxidative DNA lesions. Nakanishi N, Fukuoh A, Kang D, Iwai S, Kuraoka I. *Mutagenesis*. 2013 Jan;28(1):117-23. doi: 10.1093/mutage/ges060.

A cytoplasmic suppressor of a nuclear mutation affecting mitochondrial functions in *Drosophila*. Chen S, Oliveira MT, Sanz A, Kempainen E, Fukuoh A, Schlicht B, Kaguni LS, Jacobs HT. *Genetics*. 2012 Oct;192(2):483-93. doi: 10.1534/genetics.112.143719.

〔学会発表〕(計 7 件)

福應 温, AR. Kasmati, Howard T. Jacobs, 康 東天 ミトコンドリア DNA の維持機構に関わる新規因子の探索 第 84 回日本遺伝学会、福岡、2012 年 9 月

福應 温, AR. Kasmati, Howard T. Jacobs, 康 東天 ゲノムワイド RNAi によるミトコンドリアゲノム維持機構に関する新規因子の探索 第 12 回日本ミトコンドリア学会、筑波、2012 年 12 月

Priit Jöers, Samantha C. Lewis, Atsushi Fukuoh, Mikael Parhiala, Simo Ellilä, Ian J. Holt and Howard T. Jacobs. Mitochondrial transcription terminator family members coordinate mtDNA synthesis. International Symposium on Mitochondria 2013/The 13th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit), 東京、2013 年 11 月

福應 温 . ミトコンドリア DNA 維持機構に関わる新規因子の探索(招聘講演)第 19 回「生と生殖」公開シンポジウム「人間科学における生命研究の最前線」早稲田大学人間総合研究センター 東京、2013 年 12 月

Atsushi Fukuoh, Giuseppe Cannino, Mike Gerards, Suzanne Buckley, Selena Kazancioglu, Filippo Scialo, Eero Lihavainen, Andre Ribeiro, Eric Dufour & Howard T. Jacobs. Screen for mitochondrial DNA copy-number maintenance genes International, Tampere (Finland), 2014.6

福應 温 Genome wide screen for mitochondrial DNA copy-number maintenance genes. 第 61 回日本臨床検査医学会 福岡、2014 年 11 月

福應 温 ミトコンドリアゲノム安定性に関わる遺伝子のスクリーニング 第 14 回日本ミトコンドリア学会、福岡、2014 年 12 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福應 温 (FUKUOH, Atsushi)
純真学園大学保健医療学部検査科学科・
准教授
研究者番号: 80363365

(2) 研究協力者

Howard T. Jacobs
タンペレ大学・ヘルシンキ大学
(フィンランド) 教授