

平成 31 年 3 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440013

研究課題名(和文) DNA損傷時における酵母ミトコンドリアDNAの組換え依存型複製開始制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism for initiating yeast mitochondrial DNA recombination-driven relication upon nuclear DNA damage

研究代表者

凌 楓 (LING, Feng)

国立研究開発法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：70281665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：核DNA損傷チェックポイントは、細胞周期を一時的に停止させて核DNAの損傷修復を可能にする。ミトコンドリアは生命活動に必要なエネルギー(ATP)のほとんどを供給している。DNA損傷時にチェックポイント機構が活性化されると、ミトコンドリアDNA(mtDNA)のコピー数が転写依存型DNA複製開始に頼らずに増加する。本研究では、チェックポイント活性化の際、活性酸素種(ROS)がより多く発生しミトコンドリアの組換え酵素Mhr1が主導する複製機構が活性化され、mtDNAコピー数を増大しATPを必要とする核DNA組換え酵素の働きを支えるATPを増産することで損傷修復し、細胞の生存率を上げることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアDNAがATP生産に必要なタンパク質サブユニットの一部をコードしている。これらのサブユニットの量がミトコンドリアDNAのコピー数の増減によって調節される。核DNAチェックポイント活性化が起き、ミトコンドリアDNAのコピー数が顕著に増加することが知られている。本研究はその機構と意義を、遺伝学的手法を用いて出芽酵母をモデル生物として解析した。この際、mtDNAコピー数の増加はミトコンドリア組換え酵素Mhr1に依存することと、核DNAの損傷修復と寿命維持に必要であることを明らかにした。健康寿命維持におけるミトコンドリア組換えの重要性が再認識しなくてはならないという社会的意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Activation of the Mec1/Rad53 checkpoint pathway increases mtDNA copy number. The significance of induced mtDNA replication during the checkpoint remains unclear.

In the current project, we found that mtDNA level increase upon checkpoint activation is dependent on Mhr1 and independent of Abf2. We detected lower mitotic recombination rates in rad52-null cells, but not in rad51-null cells. Rho0 or mhr1-1 cells had lower mitotic recombination rates. The increased rate of mitotic recombination in rrm3-null cells was diminished by mhr1-1. MtDNA level in mhr1-1 was half that of wild-type cells, and mhr1-1 also diminished increases in mtDNA level in mhr1-1 rad51-null or mhr1-1 rad52-null cells. Rho0 cells had the lowest survival rates at stationary phase. mhr1-1 cells also had a short lifespan, similar to that of rrm3-null, and a synergistically negative effect was observed in rrm3-null mhr1-1 cells, indicating Mhr1 is required for longevity, particularly upon checkpoint activation.

研究分野：分子生物学

キーワード：組換え チェックポイント ミトコンドリア 活性酸素種(

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DNA損傷等の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、ATP合成酵素を含むミトコンドリア内膜での呼吸鎖複合体(I-V)を構成するタンパク質のサブユニット群を増やさなければならない。このような条件下で呼吸鎖複合体の鍵タンパク質のサブユニット群をコードするミトコンドリアDNA(mtDNA)は、コピー数を増加させることが知られている。

従来のmtDNA複製機構は、mtDNAの複製開始点のプロモーター領域でRNA合成酵素(酵母ではRpo41)によって合成されたRNAをプライマーとして環状の単量体のmtDNAを複製する転写依存型( $\theta$ 型)DNA複製であると考えられてきた。しかし、すべての環状DNAが、それぞれ倍増していくこの機構では、ヘテロプラスミーからホモプラスミーへの迅速な復帰が説明できない。一方、我々は、出芽酵母で世界に先駆けて、相同mtDNA組換え能欠損変異体の取得に成功した<sup>1</sup>。その変異体(*mhr1-1*)の解析の結果、Mhr1が組換え反応の最重要ステップである相同DNA対合を促進する活性を持ち、組換え機能が広くmtDNAの複製・分配に必要であることを明らかにした<sup>2,3</sup>。図1に示すように、ロ

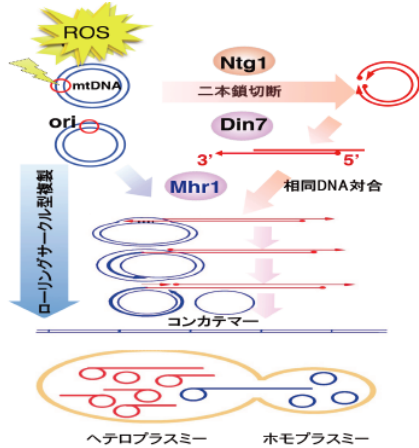


図1 組換え依存型 mtDNA 複製と分配の機構

活性酸素種(ROS)による酸化損傷を除去する修復酵素Ntg1が、複製開始点(ori)特異的に二本鎖切断を導入する。相同対合反応を促進する活性を持つMhr1は、5'-ユニークシクレーゼ活性を持つDin7が二本鎖切断部位を加工し、作った3'端が突出した単鎖DNAを、鋳型となる環状二本鎖DNAへ対合せDNAの組換えにおいても同様に生じるヘテロ二重鎖を作る。その3'端をプライマーとして、DNA合成が鋳型を一周して相補鎖を完全に置き換えると、通常の複製フォークができ、ローリングサークル型複製を開始させる。その働きにより、mtDNA分配の中間体であるコンカテマー(単位長さのmtDNAが直列に連結した直鎖状多量体)ができる。ローリングサークル型複製とは、鋳型となる環状DNAが転がりながら直鎖DNAテールを伸長していくように見えることから、命名された。この様式の複製でできるコンカテマーは、連続鎖を持つ不定長となる。DNAの複製が限定的にしか起こらないDNA組換え中でのDNAの合成とは異なる。

ヘテロプラスミー細胞中の青い線で示すmtDNAが鋳型として選ばれ、ローリングサークル型DNA複製によってできたコンカテマーにのった多数のコピーが一度に娘細胞へ選択的に送り込まれる。その結果、娘細胞ではそのコピーが大多数を占めるホモプラスミー細胞となる。Mhr1がこのヘテロプラスミーからホモプラスミーへの移行過程に必要である。

ローリングサークル型複製の産物であるコンカテマー(単位長さ mtDNA の直鎖状多量体)が mtDNA の娘細胞への伝達に欠かせない中間体であり、それが選択的に娘細胞に送り込まれ環状単量体になる<sup>4</sup>。これは、mtDNA の遺伝学においてはこれまで全く知られていなかった機構である。この

機構を通して、ランダムに選択された環状二本鎖の mtDNA が鋳型となり、全く同じ配列をもつ多数の mtDNA を持つホモプラスミーの娘細胞を形成することが容易に説明された<sup>3,5,6</sup>。また、この機構は活性酸素種(ROS)によって活性化されるという特徴を持っている<sup>6-8</sup>。

遺伝情報の担い手であるゲノム DNA は放射線、紫外線などによって絶えず損傷を受けている。核 DNA 損傷チェックポイントは、細胞周期を一時的に停止させて核 DNA 損傷修復を可能にする。ミトコンドリアは生命活動に必要なエネルギー(ATP)のほとんどを酸化リン酸化反応によって供給している。DNA 損傷時にチェックポイント機構が活性化されると、mtDNA のコピー数が転写依存型( $\theta$ 型)DNA 複製開始に頼らずに増加することは知られている。

2. 研究の目的

本研究では、チェックポイント活性化に伴って mtDNA コピー数調節の機構とその生理学的な意義を、遺伝学的手法を用いて出芽酵母をモデル生物として解析することを研究目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、核 DNA 損傷チェックポイント活性化を引き起こす変異体と核 DNA の損傷修復に関わる変異、*mhr1-1* との二重、或いは多重変異体を構築する。そして、リアルタイム PCR による定量の原理に基づき、mtDNA と核 DNA 由来のシグナルの比率を測定する。野生株の mtDNA のそれに対して異なる条件における mtDNA コピー数の相対量を調べる。また、グルコースを炭素源とする栄養豊富な培地(YPD)において 30°C で定常期までに増殖した酵母の生存率を測定する。

4. 研究成果

(1) rDNA ヘリカーゼをコードする RRM3 遺伝子の破壊株 (*rrm3-null*) においては核 DNA 損傷のチェックポイントが活性化さ

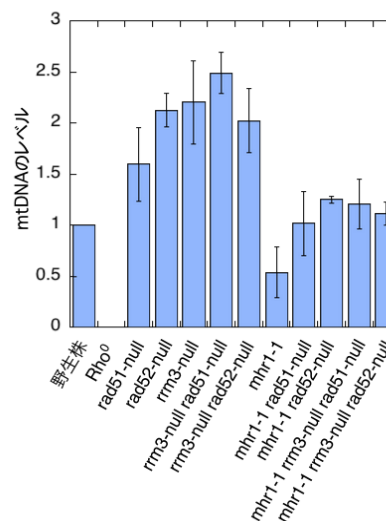


図2. チェックポイント活性化、核DNAの組換え修復欠損、及びミトコンドリアDNA組換え欠損がmtDNAレベルへの影響、mtDNA のコピー数が増加することが

知られている。我々は、*rrm3-null* 株では mtDNA コピー数が増加することを確認し、*rrm3-null mhr1-1* 二重変異株では mtDNA コピー数増加が抑えられたことを見出した (図 2)。従って核 DNA 損傷のチェックポイント活性化による mtDNA コピー数の増加はミトコンドリアで働く相同 DNA 対合タンパク質 Mhr1 に依存することが明らかとなった。また、この際の mtDNA コピー数増加は転写依存型( $\theta$ 型)DNA 複製を主導するミトコンドリアの転写因子 Abf2 に依存しないことも確認した。これらの結果から核 DNA 損傷のチェックポイント活性化の際、Mhr1 が主導する組換え依存型 mtDNA 複製が mtDNA コピー数を増加することが示唆された。

(2) 活性酸素種(ROS)が組換え依存型 mtDNA 複製を活性化することが知られている。我々は *rrm3-null* 細胞において ROS の発生量が増加することを見出した。また、ビタミン C や NAC (N-acetyl-L-cysteine) のような ROS スカベンジャーがこの mtDNA コピー数の増加を抑えることも見出した。これらの結果から核 DNA 損傷チェックポイントが活性化すると ROS が Mhr1 主導の組換え依存型 mtDNA 複製を開始する役割を持つことが示唆された。

(3) 核 DNA 損傷チェックポイント活性化で mtDNA コピー数が増大する生理学的な意義を解明するための一環として Mhr1 の活性部位に *mhr1-1* 変異によるアミノ酸置換部位とは別の点突然変異によるアミノ酸置換を導入した変異株を用いて mtDNA のコピー数と細胞内の ATP 保有量との相関性を調べた。その結果、*mhr1-1* 変異体と同様にこれらの変異株の mtDNA コピー数も減少することを確認した。即ち、細胞内の ATP 保有量が mtDNA レベルの減少に応じて低減することを明らかにした。これらの結果から mtDNA のコピー数が細胞の ATP 保有量とは密接に関係することが示唆された。

(4) 核 DNA 損傷チェックポイント活性化には相同組換えが重要であることが知られている。我々は二倍体酵母細胞のカナビン耐性獲得による突然変異率を測定することで核 DNA の損傷修復の際、体細胞分裂時の組換え(mitotic recombination)に *mhr1-1* 変異が与える影響を調べた。その結果、*rrm3-null* 二倍体細胞においてチェックポイントが活性化すると体細胞分裂時の組換えの率が上昇したが、*rrm3-null mhr1-1* 二重変異を持つ二倍体細胞においてこの上昇が抑えられることを見出した。この結果から、体細胞分裂時の組換えによる核 DNA の損傷修復に Mhr1 が主導する mtDNA 複製が ATP 産生量を調節することで寄与することが示唆された。またまた、チェックポイントでの核 DNA の損傷修復に核 DNA の組換え酵素である Rad52 グループのタンパク質が寄与することから mtDNA のコピー数の

増大は ATP を増加することで核 DNA の修復で働く Rad51 のような ATP を必要とする組換え酵素の活性を促進・維持する役割を持つことが示唆された。

(5) 我々は核 DNA の損傷修復が不完全な場合、細胞の生存にも影響を及ぼすと考え、チェックポイント活性化の際、Mhr1 主導の組換え依存型 mtDNA 複製が酵母の二倍体細胞の生存率に与える影響を調べた。その結果、野生株と比べ、mtDNA が完全に欠けた  $\rho^0$  二倍体細胞の生存率が著しく低下した。また、mtDNA コピー数が半減した *mhr1-1* 変異体の生存率も大きく低下し *rrm3-null* 変異体の生存率とほぼ同じぐらいとなった。*rrm3-null* 細胞の生存率が二倍体 *mhr1-1* 変異株のそれとほぼ同じぐらいであった。さらに *rrm3-null mhr1-1* 二重変異体の生存率がさらに低下するという相乗効果が現れた(図 3)。これらの結果から核 DNA が損傷を受け、チェックポイントが活性化した際、Mhr1 の機能が細胞の生存維持に重要

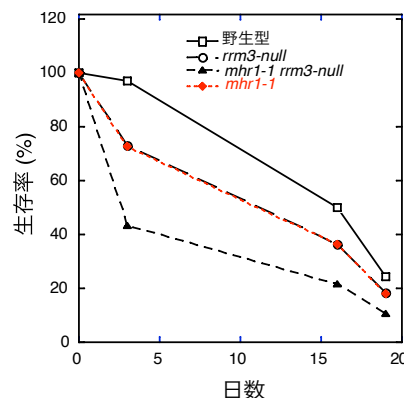


図2. チェックポイント活性化時の細胞生存率に対する *mhr1-1* 変異の影響であることが示唆された。

(6) *rad52-null* 細胞において組換えによる核 DNA 修復の際、Rad51 依存的経路が主要な役割を持つことが考えられる。そこで、我々は、細胞の生存率に対して Rad51 依存的経路と Rad52 依存的経路のどちらに *mhr1-1* がより影響するかについて調べるために *rad51-null* 変異、*rad52-null* 変異、及び *rrm3-null* 変異と *mhr1-1* 変異との二重変異、及び三重変異を持つ二倍体細胞株をそれぞれ

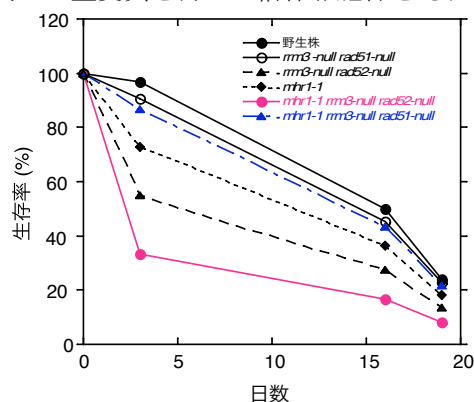


図3. 核DNA損傷チェックポイント活性化における核の時、細胞生存率に対する組換え酵素と *mhr1-1* 変異の影響を構築した。その結果、*rrm3-null* 変異と

*mhr1-1* 変異を持つ二重変異細胞にさらに Rad52 欠損変異(*rad52-null*)を導入して得られた三重変異株の生存率が最も低下することを見出した(図 4)。これらの結果から、チェックポイント活性化の際、Mhr1 の機能が ATP を要求する組換え酵素 Rad51 による細胞の生存維持により大きく寄与することが示唆された。

(7) Rad51 や Rad52 が Rad53 を介したチェックポイントの活性化に寄与しないことが知られている<sup>9</sup>。ところが、我々は *rad51-null* 二倍体株と *rad52-null* 二倍体株においても mtDNA コピー数が増加した。この増加も Mhr1 に依存することを見出した(図 2)。このような結果から、Mec/Rad53 チェックポイント経路の活性化とは異なる Mhr1 依存型 mtDNA 複製活性化機構が核 DNA の組換えによる損傷修復が十分機能しない時、mtDNA コピー数を増加することが示唆された。

(8) 核 DNA 損傷が起き、チェックポイント経路が活性化するとヌクレオチド合成に関わる鍵酵素であるリボヌクレオシド還元酵素の大サブユニット RNR1 を阻害する Sml1 タンパク質が分解され、dNTP プールの濃度が上昇し、mtDNA のコピー数も増加することが知られている<sup>10</sup>。我々はこの mtDNA のコピー数の増加はやはり Mhr1 に依存することを見出した。さらにこの増 dNTP プール濃度の上昇が複製開始点を持つ欠変異 mtDNA 断片が正常型 mtDNA より優位に複製するという超抑圧複製現象(hypersuppressiveness)を弱める作用を持つことを見出した。これらの結果から、チェックポイント活性化の際、欠変異 mtDNA の優勢複製を抑制するシステムが働くことが示唆された。

(9) 本科研費の支援で、我々は適量の ROS がヒトミトコンドリア病患者のヘテロプラスミー細胞においてローリングサークル型 mtDNA 複製を誘導し、合成されたコンカタマーがホモプラスミーに向けた mtDNA の分離を促進することを明らかにした。これらの結果から ROS シグナリングが出芽酵母の場合に酷似してヒト細胞においても mtDNA の複製・分離を活性化することが示唆された。

#### <引用文献>

- ① Ling, F., Makishima, F., Morishima, N. & Shibata, T. A nuclear mutation defective in mitochondrial recombination in yeast. *EMBO J* **14**, 4090-4101 (1995).
- ② Ling, F., Yoshida, M. & Shibata, T. Heteroduplex joint formation free of net topological change by Mhr1, a mitochondrial recombinase. *J Biol Chem* **284**, 9341-9353, doi:10.1074/jbc.M900023200 (2009).
- ③ Ling, F. & Shibata, T. Recombination-dependent mtDNA partitioning: in vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *EMBO J* **21**, 4730-4740 (2002).
- ④ Ling, F. & Shibata, T. Mhr1p-dependent concatemeric mitochondrial DNA formation for generating yeast mitochondrial homoplasmic cells. *Mol Biol Cell* **15**, 310-322, doi:10.1091/mbc.E03-07-0508 (2004).
- ⑤ Ling, F. *et al.* Din7 and Mhr1 expression levels regulate double-strand-break-induced replication and recombination of mtDNA at ori5 in yeast. *Nucleic Acids Res* **41**, 5799-5816, doi:10.1093/nar/gkt273 (2013).
- ⑥ Ling, F. *et al.* Reactive oxygen species stimulate mitochondrial allele segregation toward homoplasmy in human cells. *Mol Biol Cell* **27**, 1684-1693, doi:10.1091/mbc.E15-10-0690 (2016).
- ⑦ Ling, F., Hori, A. & Shibata, T. DNA recombination-initiation plays a role in the extremely biased inheritance of yeast [rho-] mitochondrial DNA that contains the replication origin ori5. *Mol Cell Biol* **27**, 1133-1145, doi:10.1128/MCB.00770-06 (2007).
- ⑧ Hori, A., Yoshida, M., Shibata, T. & Ling, F. Reactive oxygen species regulate DNA copy number in isolated yeast mitochondria by triggering recombination-mediated replication.



*Nucleic Acids Res* **37**, 749-761,

doi:10.1093/nar/gkn993 (2009).

- ⑨ Grenon, M., Gilbert, C. & Lowndes, N. F.  
Checkpoint activation in response to  
double-strand breaks requires the  
Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat Cell  
Biol* **3**, 844-847,  
doi:10.1038/ncb0901-844 (2001).
- ⑩ Taylor, S. D. *et al.* The conserved  
Mec1/Rad53 nuclear checkpoint pathway  
regulates mitochondrial DNA copy  
number in *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Mol Biol Cell* **16**, 3010-3018,  
doi:10.1091/mbc.E05-01-0053 (2005).

#### 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 3 件)

(1) Feng Ling, Rong Niu, Hideyuki

Hatakeyama, Yu-ichi Goto, Takehiko

Shibata and Minoru Yoshida

*Molecular Biology of the Cell*, 査読有、  
27(10)、2016、1684-1693

Reactive oxygen species stimulate  
mitochondrial allele segregation toward  
homoplasmy in human cells

doi:10.1091/mbc. E15-10-0690

(2) Elliot Bradshaw, Minoru Yoshida,

Feng Ling

*G3-Genes Genomes Genetics*, 査読有、  
7(9)、2017、3083-3090

Regulation of Small Mitochondrial DNA  
Replicative Advantage by Ribonucleotide  
Reductase in *Saccharomyces cerevisiae*

doi: 10.1534/g3.117.043851

(3) Feng Ling, Elliot Bradshaw, Minoru  
Yoshida

*Scientific Reports*, 査読有、  
in press、2019

Prevention of mitochondrial genomic  
instability in yeast by the mitochondrial  
recombinase Mhr1

doi: 10.1038/s41598-019-41699-9

[学会発表] (計 2 件)

(1) 凌 楓、牛 栄、柴田武彦、後藤雄一、畠  
山英之、吉田稔

酸化 ストレスによるミトコンドリア DNA  
ホモプラスミー化の促進機構。

第 39 回分子生物学会年会

パシフィコ横浜

2016 年 12 月 2 日

#### Feng LING

(2) A novel mechanism for human  
mitochondrial allele segregation towards  
homoplasmy

Global Conference of Chinese Geneticists,  
Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang  
Province, China,

September 25、2016

[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 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、柴田武彦、牛栄、  
吉田稔、後藤雄一

権利者: 特定研究開発法人理化学研究所

種類: SEQ 23320

番号: 第 8691578 号

取得年月日: 2014 年 4 月 8 日

国内外の別: 国外 (アメリカ)

[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)

国立研究開発法人理化学研究所・吉田化学

遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号: 70281665