

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07504

研究課題名(和文) 哺乳動物ミトコンドリアDNAの塩基修飾の解明～その生物学的意義の理解にむけて

研究課題名(英文) Epigenetic features of mammalian mitochondrial DNA

研究代表者

安川 武宏 (Yasukawa, Takehiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90646720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞小器官ミトコンドリアは、核に存在するゲノムとは別の独自のゲノム、ミトコンドリアDNA(mtDNA)をもっている。哺乳動物細胞において核DNAの構成塩基の一つであるシトシンのメチル化修飾は遺伝子発現制御において重要な役割を果たしていることが知られている。一方、mtDNAが同様のメチル化修飾を受けるか否かはよく分かってなかった。そこで本研究でマウス体細胞、胚性幹細胞培養株のmtDNAを3種類の解析手法を用いて徹底的に解析したところ、mtDNAにはユニバーサルに生理的役割を持つようなレベルでの5-メチルシトシンが認められないことが明らかになり、mtDNAに対する我々の理解を大きく前進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、mtDNAはメチル化されているという報告が相次いでいたが、これらの中には互いに異なる内容の主張のものがみられたりと、非常に混迷した状況が続いていた。mtDNAがメチル化修飾を受けるか否かはmtDNAの適切な維持や遺伝子発現を考える上で重要な課題であり、その異常が疾患に関連する可能性も秘めている。今回、メチル化修飾についてmtDNAの真の姿の一端を明らかにしたことで、今後のmtDNA基礎研究・医学研究に有益な情報を提供できたことは本研究の意義といえる。

研究成果の概要(英文)：While cytosine methylation in nuclear DNA in human and other mammals is known to play important roles, whether mitochondrial DNA, which is contained in mitochondria, receives the modification or not remains controversial. It could have profound impact on gene expression and maintenance of mitochondrial DNA, and abnormalities in mitochondrial DNA methylation might well be a cause of disease with mitochondrial dysfunction. Investigation of mitochondrial DNA methylation is thus of pivotal importance. In this research project, thorough analysis of mtDNA from mouse tissues and cultured embryonic stem cells was conducted using three methods. Data from the analysis led to a proposal that the 5-methylcytosine is not present at any specific position(s) in mitochondrial DNA and levels of the methylated cytosine are fairly low, provided the modification occurs. We therefore propose it is unlikely that 5mC plays a universal role in the gene expression or metabolism of mitochondrial DNA.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞小器官ミトコンドリアは、核ゲノムとは別の独自のゲノム、ミトコンドリア DNA (mtDNA) をもつ。mtDNA は ATP 産生をはじめ、様々なミトコンドリア機能に必要とされる呼吸鎖酵素複合体のサブユニットの遺伝子等をコードする約 16 キロ塩基対の環状 2 本鎖ゲノムであり、それぞれの鎖は H 鎖、L 鎖と呼ばれて区別される。ヒトの場合、1 細胞に通常数千コピー存在し、mtDNA に生じた塩基置換や部分欠失、また、コピー数低下といった異常がミトコンドリア病の原因となったり、様々な疾患に関与している。mtDNA の複製や転写はコントロール領域 (CR) とよばれる領域内から開始される (複製は CR の外側から開始される場合もある)。この領域に 7S DNA と呼ばれる約 500 塩基長の DNA 鎖が合成されて 3 本鎖 D-loop 構造が形成されることが古くから知られていた。CR の特徴から 7S DNA が mtDNA の維持に必須の役割を果たしているとは推定されるが、未だに 7S DNA の制御機構や機能はあまりよく分かっていない。

核ゲノムにおいてその構成塩基の 1 つであるシトシンのメチル化が遺伝子発現をエピジェネティックに調節していることは広く知られている。一方、mtDNA にも 5-メチルシトシン (5mC) や、その酸化体である 5-ヒドロキシメチルシトシンが存在するという報告が近年散見されていた。しかし、それらは例えば、mtDNA プレパレーションから核 DNA の混入を厳しく排除した上で行うべき質量分析や ELISA 法によるメチル化シトシン検出が、十分な純度のサンプルを用いて行われていないように読みとれる報告であったり、十分なコントロール実験を伴わずに mtDNA 内のごく限定された領域のメチル化状態を調べるとどまっているように見受けられる報告であったりして、mtDNA のメチル化を明確に確立できるようなデータを示していると判断できる報告ではなかった。また、mtDNA はメチル化されていないとする論文も発表されており、mtDNA がメチル化修飾を受けているかどうかコンセンサスがとれていない混乱した状況であった。核ゲノムやバクテリアゲノムにおける塩基修飾の重要性を鑑みると、mtDNA が修飾を受けているかを明らかにすることは mtDNA の維持や機能発現の機構、そして mtDNA に生じる異常を正しく理解するためにははっきりとさせなければならない重要な課題であり、そのために mtDNA のメチル化修飾を正確に解析し、関連研究分野に正しい情報を提供する研究が待ち望まれていた。

このような中、申請者らは DNA 鎖中のメチル化シトシンを認識して DNA を切断するヌクレアーゼ McrBC によってヒトとマウスの mtDNA が切断されることを見出した。この結果は mtDNA が種を超えてシトシン修飾を受けていることを示唆していたので、mtDNA 修飾の全体像を明らかにするための基盤となるデータと位置づけた。加えて、7S DNA が切断されることも見出していた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、上で指摘したような先行研究の問題点を克服できるように注意深く実験を組み立て、同様の先行研究よりも高いレベルの実験技術で、バイサルファイトシーケンシング法、メチル化シトシン感受性酵素 McrBC による DNA 切断解析法、そして液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) という、5mC を検出するための原理が互いに本質的に異なる 3 つの方法を駆使して、哺乳動物 mtDNA のメチル化修飾を徹底的に解析することを目的とした。

(2) mtDNA がメチル化修飾を受けていれば、mtDNA の修飾塩基を決定し、修飾の状態を詳細に明らかにし、修飾状態の組織・細胞特異性や修飾状態を人為的に変化できる条件を明らかにして、mtDNA のエピジェネティック修飾の全体像をとらえ、mtDNA 修飾という概念を確固として確立することを目指した。加えて、mtDNA ヒストン様タンパク質 TFAM の翻訳後修飾を研究することから mtDNA のエピジェネティック修飾機構をタンパク質レベルに拡げて検討した。

## 3. 研究の方法

(1) **次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンシングによるマウス脳、肝臓、胚性幹細胞培養細胞株の mtDNA 解析** バィサルファイトシーケンシング (BS-seq) は 1 塩基レベルでシトシンのメチル化状態を解析できる方法であり、DNA 鎖中の未修飾シトシンはバイサルファイト (BS) 変換によってウラシルに変換されるが、5mC は影響を受けない (変換されない) 化学的性質の違いを利用する。そして、その後のプライマー伸長反応や DNA 増幅ステップでウラシルの位置はチミン、5mC は未修飾シトシンとなる。そして、生成した DNA をシーケンスし、参照配列上でシトシンの位置にシトシンが見出される (= サンプル DNA 上で 5mC であった) 頻度からそれぞれのシトシン塩基のメチル化の程度を知る。これは DNA メチル化研究で頻繁に使用される解析方法である。本研究では Numts (核 DNA 内に存在するミトコンドリア起源の配列) を除去するため、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 培養株 E14、マウス肝臓、脳組織から高純度に精製したミトコンドリア (精製方法は (3) で解説) から調製した核酸、mitochondrial nucleic acids (mtNA) を出発材料とした。mtNA は mtDNA とミトコンドリア RNA を含んでいる。BS 変換は塩基対を形成していないシトシン塩基におきるので予め DNA を変性させて 1 本鎖にすることが重要である。そこで変性を容易にするため、環状である mtDNA を制限酵素 BglIII で線状化した。そして、mtNA 溶液に 5mC を含まないラムダ DNA ( $\lambda$  DNA<sup>-mC</sup>) を BS 変換が確実に起きたことを確認する

ための内部コントロールとして加え、熱変性処理を行った。そして、サンプルにバイサルファイト溶液を加えて BS 変換を行った。なお、BS 変換効率を観察するために変換反応を経時的に行った (5、15、40、60、90 分)。また、BglII 切断後の mtDNA を模倣した 16291bp の「合成 mtDNA」を mtDNA (16299bp) を鋳型として PCR で作製し、5mC 不含のコントロール mtDNA として組織や細胞から調製した native mtDNA と並行して解析することで偽陽性のデータを排除した。そして、次世代シーケンサーで解析するため PBAT 法を用いて DNA ライブラリーを作製した。そして、Illumina Miseq でシーケンスを行い、得られたリードを Bismark、perl 等を用いて解析した。

**(2) メチル化シトシン感受性制限酵素 McrBC を用いた mtDNA のメチル化状態の解析** McrBC は DNA 上の 2 つの 5'-R mC 認識配列 (R (プリン) A あるいは G; mC、メチル化シトシン) の間で DNA を切断する酵素である。2 つの認識配列の間隔が 40-80bp が至適であるが、効率は低下するが 1kbp を超えても切断はおきる。McrBC の酵素活性は GTP に厳密に依存しているため、本研究では反応系には McrBC を常に加えた状態で、その酵素活性を GTP の有無で制御することにして、mtDNA のメチルを検討するため McrBC 切断アッセイを行った。具体的には、まず ES 細胞、マウス肝臓、脳組織から調製した mtDNA を制限酵素 BlnI で切断して mtDNA を線状化した。そして、mtDNA を McrBC 存在下で、GTP 存在・非存在下でインキュベートし、その後アガロースゲル電気泳動を行い、サザンハイブリダイゼーションで mtDNA を可視化し、バンドの輝度の変化を定量的に解析することから mtDNA のメチル化状態を解析した。

**(3) LC/MS による mtDNA の解析** この解析は 5mC の検出感度が高く、量的な情報も得られる長所がある。一方で、測定を行う前にサンプルをモノヌクレオシドに分解するため、mtDNA 画分に核 DNA が混在していると検出されたモノヌクレオシドが mtDNA 由来か核 DNA 由来かを識別することが不可能なため、核 DNA が少しでも混入していると mtDNA の 5mC 検出や定量が成立しないことが正確な解析をとることも難しくする。すなわち、本解析にはできるだけ高純度の mtDNA 調製が必須である。そこで、低速・高速遠心分離法を用いて得られるミトコンドリア画分を調製後、まず、ショ糖密度勾配超遠心分離法によって精製度を上げ、同画分に混在している核の除去を行った。続いて、ミトコンドリア画分にまだわずかに残留している核 DNA を分解除去するため、ミトコンドリアを壊さないよう穏やかにヌクレアーゼとプロテアーゼでミトコンドリア画分を処理し、その後ミトコンドリアをよく洗浄した後、回収した。このようにできるだけ核 DNA 排除するように精製したミトコンドリアから mtDNA を抽出した(これを(1),(2)で使用した)。さらに、mtDNA 画分を電気泳動してゲルを EtBr 染色して mtDNA を可視化し、mtDNA バンドのゲル切り出しにて mtDNA を最終的に精製し、これをモノヌクレオシドに分解し、LC/MS で解析を行った。なお、LC/MS 解析に十分な mtDNA 量を得るために本解析にはマウス肝臓を材料として用いた。そして、LC/MS による未修飾シトシンと 5mC の定量的な比較を行うため、5-メチルデオキシシチジン (m<sup>5</sup>dC) およびデオキシシチジン (dC) の標品を用いて検量線を作成した。

**(4) mtDNA ヒストン様タンパク質 TFAM の翻訳後修飾アセチル化の効果の解析** mtDNA の全周を覆うタンパク質 TFAM は mtDNA の安定的な維持に必須である。ヒト TFAM タンパク質を大腸菌組換えタンパク質として発現・精製した。そして、in vitro で TFAM を acetyl-coenzyme A (CoA) とアルカリ pH 条件下で非酵素的に反応させてアセチル化し、修飾された複数のリジン残基を LC/MS によって同定した。さらに、3 kb 長さの plasmid DNA を mtDNA (約 16 kb) の縮小モデルとして使用して、DNA 結合アッセイ、そして、環状 DNA 巻き戻しアッセイを行って TFAM、アセチル化 TFAM の DNA に対する結合特性を比較検討した。

#### 4. 研究成果

**(1) BS-seq では、mtDNA に有意なメチル化シグニチャーは見出されなかったが、mtDNA の L 鎖がバイサルファイト変換に抵抗性を示すことが明らかになった** DNA メチル化修飾の研究では次世代シーケンサーでの全ゲノムシーケンスと BS-seq を組み合わせて核ゲノムのメチル化状態を解析する Whole genome bisulfite sequencing (WGBS) が行われており、結果がデータベースに数多く公開されている。WGBS の際には細胞内の全ての DNA が解析されているので、mtDNA のデータも含まれていることに着目し、様々な臓器や細胞から得られた公開データから mtDNA の情報を抽出して mtDNA のメチル化状態を調べた。すると、マウス臓器の組織やヒトサンプルの mtDNA においては事実上メチル化のシグニチャーはみられなかった一方、マウス ES 細胞などの mtDNA では有意な量の未変換シトシンが CpG 配列、非 CpG 配列どちらにもみられ、L 鎖へ強い指向性があった。このような特徴的なパターンを見出したので、マウス ES 細胞から mtDNA を調製し、公開 WGBS データ解析でメチル化シグニチャーがはっきりとみられた mtDNA 上の *cytb* 遺伝子領域のメチル化状態をサイクルシーケンシングを用いた領域限定的な BS-seq で解析したところ、5mC が事実上検出されず、結果が互いに矛盾している状況となった。そこで、マウス ES 細

胞だけでなくマウスの脳と肝臓からも mtDNA を調製し、次世代シーケンサーを用いた BS-seq によって mtDNA 全周のメチル化状態の解析を行った。DNA ライブラリーを 24 サンプル調製し、Illumina Miseq でシーケンスし、合計で 1100 万 read (1 ライブラリーあたり平均約 45 万 read) を得た。そして、それぞれの read でメチル化レベルを解析してみると、反応時間 1 時間、反応温度 70 度の BS 変換の後でも mtDNA の L 鎖にマッピングされた read のおよそ 30% が完全に未変換のままであるという、興味深く、かつ、警鐘的な結果が得られた。この現象は合成 mtDNA の L 鎖でもおきていたが、mtDNA の H 鎖や DNA<sup>mc</sup> の両方の鎖ではみられなかった。そして、完全に未変換のリードをマッピングしてみると native mtDNA、合成 mtDNA でパターンが一致していた。従ってこの現象は L 鎖のメチル化によるものではなく、L 鎖自体の何らかの特性に起因して未修飾シトシンが BS 変換に抵抗性を持っていることを示していることが明らかになった。加えて、mtDNA を BS-seq で解析するには合成 mtDNA のように native mtDNA を正確に模倣した対照サンプルを並行して解析する必要が明瞭になった。そして、我々は mtDNA のメチル化状態を検討するために、read 内の 90% 以上のシトシンが未変換の read を除去したリードを用いてマッピングを行い、10 以上のカバレッジを有するシトシンごとに未変換シトシンの割合を計算し、mtDNA の L 鎖、H 鎖、そして DNA<sup>mc</sup> の両方の鎖それぞれのシトシンの未変換率を算出して解析を進めたところ、mtDNA 内に 5mC が何らかの配列特異性をもって有意な頻度で存在するような領域はないという結論に達した。加えて、CR 領域に注目して native mtDNA と合成 mtDNA のデータを比較したが native mtDNA に共通かつ特徴的であるような著明なシグナルは示唆されなかった。

**(2) McrBC 処理によって mtDNA は分解されなかった** 次に、酵素を利用した 5mC 検出方法を用いて mtDNA のメチル化状態を解析した。上述のように McrBC はメチル化シトシンの認識様式が非常にゆるやかであるため、DNA 鎖中の低レベルの 5mC の検出に適していると考えて本酵素を使用した。さらに、mtDNA を制限酵素 BlnI で線状化したうえで、McrBC 処理をすることで、mtDNA の鎖中のどこか 1 箇所でも切断されれば完全長の mtDNA 量が減少することを定量性に優れた放射性同位体を使用したサザンハイブリダイゼーションで検出するようにして、感度よく 5mC の存在を検出することを目指した。このアッセイ系を用いて、マウス ES 細胞、脳、肝臓の mtDNA を解析したが、結果は完全長 mtDNA の有意な減少はどの mtDNA でも見出されなかったというもので、mtDNA はメチル化を受けていない、あるいは 5mC を含んでいても非常に低レベルであることが示唆され、上の BS-seq の結果と矛盾していなかった。なお、McrBC によって mtDNA が切断されるという結果を得ていたと 1. に記載したが、これは mtDNA を熱変性したうえで McrBC アッセイを行って得た結果であった。その後、研究を進めたところ、McrBC 自体、あるいは McrBC 酵素溶液にごく弱い 1 本鎖 DNA 切断活性があることに気づき、mtDNA が分解されていたのはメチル化修飾によるわけではなく、熱変性処理で mtDNA を 1 本鎖にしたからであるという結論に達した。

**(3) LC/MS による解析で mtDNA から非常に低レベルの 5mC が検出された** 本実験ではできる限り高純度に生成したミトコンドリアから mtDNA を調製し、さらにこれを電気泳動して mtDNA のバンドをゲルから切り出し精製することで、可能な限り核 DNA の混入を排除した。そして、これをサンプルとしてモノヌクレオシドに分解して LC/MS による測定を行った。2 回独立に調製したマウス肝臓由来の mtDNA を解析したところ、未修飾シトシンに対して約 0.4% の 5mC が含まれているという結果が得られた。細胞から抽出した全 DNA では約 6% が 5mC であった。核 DNA は mtDNA よりもはるかに存在量が多いのでこの場合、全 DNA は事実上核 DNA と考えてよい。つまり、mtDNA からは 5mC が検出されはしたものの、核 DNA に比べて非常に低レベルであった。

**(4) mtDNA ではメチル化修飾がその遺伝子発現や維持において普遍的な役割を担っている可能性はおそらくない** 本研究では原理の異なる 3 つの 5mC 検出法を用いて、マウス ES 培養細胞株、脳、肝臓の mtDNA を徹底的に解析した。そして、得られた結果を総合的に考察し、mtDNA は核 DNA のようなメチル化修飾を受けず、従って mtDNA では DNA 修飾によるエピジェネティックな調節というものが組織や細胞で普遍的におきてはいない、ということ提唱する (文献①、②)。BS-seq の結果は 2 つの可能性を示唆した。ひとつはミトコンドリアには DNA シトシンメチル化修飾というものが存在しない、そしてもうひとつは、mtDNA は位置非特異的に 5mC を含み、かつ各々のシトシンにおける 5mC の存在率は我々の BS-seq では検出限界以下である、というものである。McrBC とサザンハイブリダイゼーションによる mtDNA 検出を利用したアッセイでは mtDNA のバンド輝度がこの酵素の作用で有意に減少しなかったことから、mtDNA には 5mC が存在しない、あるいは存在するとしても非常に低レベルで、かつ、mtDNA 中に分散していることが推定された。そして、マウス肝臓から注意深く mtDNA を調製し、これをモノヌクレオシドにして LC/MS で測定をしたところ、非常に低レベルの 5mC ヌクレオシドを検出した。検出した 5mC は mtDNA1 分子につき 24 個の 5mC という計算になる。マウス mtDNA において 46% のシトシンがプリン (R) の前にあることを考えると確率的には 11 個 (24 × 0.46) の 5mC がプリンの後ろ (3 側) に存在し、こ

これは5mCがmtDNA鎖上1.5kbpごとに存在することに等しい。McrBCアッセイとLC/MSの結果をあわせて考えると、以下のシナリオが考えられる。[1] mtDNAの5mCの前(5側)がほとんどプリン塩基ではない場合、McrBCがmtDNAの切断に使用できる5mCの数はmtDNA1分子あたり11個よりもかなり少なく、McrBCアッセイにおいてmtDNAバンドの減少を観察することは難しかった。この場合、LC/MSで検出された5mCは肝臓mtDNAに真に由来していたことになる。[2] LC/MSで検出された5mCは、注意深い精製にもかかわらずmtDNAサンプルに核DNAが微量に混入していたことを反映していた。mtDNAの存在量比は核DNAの1%未満であるためmtDNA精製物から核DNAを完全に除去することは困難であり、LC/MS解析による肝臓mtDNAの5mCレベル(0.4%)は過大評価となっている可能性が考えられる。この考え方はBS-seqによって5mCがmtDNAのどこにあるかを決定できなかったこととMcrBC処理後にmtDNAバンド輝度が有意に減少しなかった結果と合致するようにみえる。[3] 上記2つのシナリオ両方が寄与している可能性がある。いずれのシナリオにおいてもBS-seq解析の結論と考えあわせれば、低レベルの5mCがmtDNAに存在していたとしてもmtDNA遺伝子発現またはミトコンドリア代謝において役割を果たしている可能性は極めて低いと考えられる。従って、本研究の結果から少なくともマウス培養ES細胞、肝臓、脳においては、機能を持ったDNAメチル化修飾のメカニズムはないと考えることができ、これらの細胞・組織におけるmtDNAのメチル化状態を明らかにできたと考えている。そして、今後のmtDNA研究全般に対して重要な指針を与え、また、mtDNAメチル化の解析を行うに際して考慮すべき諸点を関連分野の研究者へ示すことができたと考えている。

**(5) 培養細胞においてmtDNAは複製プロセスによって5mCを取り込むことができる** ここまでの研究でmtDNAに5mCが存在していてもかなり低レベルであることが示唆されたことをふまえてmtDNAに5mCが真に存在する場合のその起源を考察してみると、1つの可能性としてmtDNA複製に特異的なポリメラーゼ、DNA polymerase がdCTPのかわりに5m-dCTPを基質として認識してしまい、複製の際にmtDNA鎖に取り込むことが考えられる。この仮説を検証するため、培養液に5-methyl-deoxy-cytosine(5mdC)を添加してヒト培養細胞を培養し、その後細胞を回収してMcrBCアッセイを用いてmtDNAを観察したところ、mtDNAのバンドの下方の低分子領域のスミアーの変化から5mdCがmtDNAに取り込まれたことが示唆された。ミトコンドリア内にはmtDNAから転写されたRNAが存在し、これらのうち酵素的にメチル化(転写後修飾)を受けるものがある。つまり、ミトコンドリア内のRNAには5mCが修飾塩基として存在するので、これらのRNAが代謝されて5mdCに変換されていれば、本実験の結果から生体内でmtDNAに取り込まれるのではないかという新しい仮説が成り立つ。

**(6) mtDNAの維持をつかさどるTFAMは非酵素的にアセチル化され、アセチル化されたTFAMはDNAのトポロジーを変化させる力が減少する** 核ゲノムのエピジェネティック調節にはDNA塩基修飾だけでなく、核ゲノムに結合しているヒストンの翻訳後修飾が大きな役割を果たしている。一方、mtDNAにはTFAMとよばれるDNA結合タンパク質がゲノム全体に結合しており、ヒストン様タンパク質としてmtDNAの折り畳みや維持に必須である。TFAMはmtDNAの転写開始因子でもある。興味深いことにいくつかの翻訳後修飾がTFAMには報告されている。そこで、そのうちの1つで、ヒストンにもおきているアセチル化修飾に着目した。acetyl-CoAを用いて非酵素的にin vitroでTFAMをアセチル化し、アセチル化部位をLC/MSを用いて同定したところ、培養細胞由来のTFAMで報告されていたアセチル化部位を含んだ部位がアセチル化されていたことが判明し、この結果は生体内でのTFAMのアセチル化が非酵素的アセチル化機構によって起こり得ることを実験的に初めて示唆するものとなった。さらに同修飾によってTFAMがDNAに結合する活性に変化は起きないものの、DNAを巻き戻す能力が低下することをin vitroアッセイを用いて見出した(文献③)。これらは生体内で主要mtDNA結合タンパク質の修飾によってmtDNAの状態が変化し得る可能性を示す興味深い結果であると考えられる。

#### <引用文献>

- Matsuda, S., Yasukawa, T., Sakaguchi, Y., Ichianagi, K., Unoki, M., Gotoh, K., Fukuda, K., Sasaki, H., Suzuki, T., Kang, D. (2018). Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA. *Sci. Rep.* 8(1):5801.
- Yasukawa, T., Matsuda, S., Kang D. Epigenetic features of mitochondrial DNA (Chapter 3). In *The Human Mitochondrial Genome*. Gasparre, G., Porcelli, A. M. (eds.). Academic Press. (Cambridge, USA). In press.
- Fang, Y., Akimoto, M., Mayanagi, K., Hatano, A., Matsumoto, M., Matsuda, S., Yasukawa, T., Kang, D. (2020). Chemical acetylation of mitochondrial transcription factor A occurs on specific lysine residues and affects its ability to change global DNA topology. *Mitochondrion* 53, 99-108.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuan Fang, Masaru Akimoto, Kouta Mayanagi, Atsushi Hatano, Masaki Matsumoto, Shigeru Matsuda, Takehiro Yasukawa, Dongchon Kang	4. 巻 53
2. 論文標題 Chemical acetylation of mitochondrial transcription factor A occurs on specific lysine residues and affects its ability to change global DNA topology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 99-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mito.2020.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yura Do, Shigeru Matsuda, Teppei Inatomi, Kazuto Nakada, Takehiro Yasukawa, Dongchon Kang	4. 巻 53
2. 論文標題 The accessory subunit of human DNA polymerase is required for mitochondrial DNA maintenance and is able to stabilize the catalytic subunit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 133-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.05.008">https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.05.008</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 安川 武宏、康 東天	4. 巻 44
2. 論文標題 ミトコンドリアDNAの維持システム Up-to-Date	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 メディカル・サイエンス・ダイジェスト	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 安川 武宏、康 東天	4. 巻 37
2. 論文標題 ミトコンドリアゲノムの複製・維持機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 24-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigeru Matsuda, Takehiro Yasukawa, Yuriko Sakaguchi, Kenji Ichianagi, Motoko Unoki, Kazuhito Gotoh, Kei Fukuda, Hiroyuki Sasaki, Tsutomu Suzuki, Dongchon Kang	4. 巻 8
2. 論文標題 Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24251-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takehiro Yasukawa, Dongchon Kang	4. 巻 164
2. 論文標題 An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 183-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takehiro Yasukawa, Shigeru Matsuda, Yuriko Sakaguchi, Kenji Ichianagi, Motoko Unoki, Kazuhito Gotoh, Kei Fukuda, Hiroyuki Sasaki, Tsutomu Suzuki, Dongchon Kang
2. 発表標題 Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA
3. 学会等名 YoungMito2018, The 1st International Mitochondrial Meeting for Young Scientists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigeru Matsuda, Takehiro Yasukawa, Yuriko Sakaguchi, Kenji Ichianagi, Motoko Unoki, Kazuhito Gotoh, Kei Fukuda, Hiroyuki Sasaki, Tsutomu Suzuki, Dongchon Kang
2. 発表標題 Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA ~ Does cytosine modification occur to mtDNA?
3. 学会等名 YoungMito2018, The 1st international mitochondrial meeting for Young Scientists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安川 武宏, 康 東天
2. 発表標題 酸化ストレスの起点としてのミトコンドリアとミトコンドリアゲノムの複製
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安川 武宏, 松田 盛, 坂口 裕理子, 一柳 健司, 鷓木 元香, 後藤 和人, 福田 湊, 佐々木 裕之, 鈴木 勉, 康 東天
2. 発表標題 哺乳動物ミトコンドリアゲノムのDNAメチル化修飾の検討
3. 学会等名 第18回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 9. 安川 武宏, 松田 盛, 稲富 鉄平, 都 由羅, 阿部 周策, 石内 崇士, 中田 和人, 一柳 健司, 佐々木 裕之, 康 東天
2. 発表標題 複雑でユニークなミトコンドリアDNA複製メカニズム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehiro Yasukawa, Shigeru Matsuda, Yuri Sakaguchi, Kenji Ichianagi, Motoko Unoki, Kazuhito Gotoh, Kei Fukuda, Hiroyuki Sasaki, Tsutomu Suzuki, Dongchon Kang
2. 発表標題 Epigenetic feature of mitochondrial DNA
3. 学会等名 The 16th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine and The 19th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takehiro Yasukawa, Shigeru Matsuda, Dongchon Kang	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 15
3. 書名 Epigenetic features of mitochondrial DNA (a chapter in The Human Mitochondrial Genome), in press	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004860/index.html">http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K004860/index.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	鈴木 勉  (Suzuki Tsutomu)  (20292782)	東京大学・大学院工学系研究科・教授     (12601)	