

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06313

研究課題名(和文) 母性遺伝における父方ミトコンドリアDNAの選択的分解に関わる分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analyses of the molecular mechanism involved in the selective degradation of paternal mitochondrial DNA in maternal inheritance

研究代表者

佐々木 成江 (Sasaki, Narie)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：20359699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大型のミトコンドリア核様体を持つ真正粘菌から単離したミトコンドリア内のDNA分解を顕微鏡で観察することでDNase活性を検出するsemi-in vitroアッセイ系を開発し、母性遺伝に関与するDNaseの性質を調べた。その結果、父方ミトコンドリアDNA(mtDNA)分解時にマグネシウムイオン要求性で、かつpH7.7で最大の活性をもつDNaseが検出された。また、父方mtDNA分解時にミトコンドリア内膜の崩壊は起きていなかった。さらに、化学染色試薬を用いて父方と母方のミトコンドリアを識別し、父方mtDNA分解開始直後に母方のミトコンドリアが急速に増加することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母性遺伝のメカニズムは生物によって異なっており、多様性がみられる。有性生殖は、同形配偶子生殖から異形配偶子生殖、そして卵生生殖へと進化してきたと考えられる。同形配偶子である真正粘菌におけるmtDNAの母性遺伝のメカニズムを解明することは、母性遺伝の進化を理解する上で非常に重要であり、本研究で得られた知見は、真正粘菌の母性遺伝における父方mtDNAの選択的分解に関与する分子メカニズムを解明するために役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Physarum polycephalum has large mitochondrial nucleoids, which are mitochondrial DNA (mtDNA)-protein complexes. In this study, we developed a semi-in vitro assay to detect DNase activity by microscopic observation of the digestion of mtDNA in isolated mitochondria from *P. polycephalum* and the DNase involved in maternal inheritance was characterized. When the mitochondria isolated from zygotes were used, the digestion of mtDNA in isolated mitochondria was specifically observed in the presence of Mg<sup>2+</sup> and maximum activity was detected at pH 7.7. During the digestion of mtDNA, mitochondrial membrane integrity was maintained in vivo. Furthermore, we also developed a method to distinguish uniparental mitochondria in zygotes of *P. polycephalum* by chemical staining. Our results showed that the proliferation of maternal mitochondria rapidly occurred after the initiation of digestion of paternal mtDNA.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：母性遺伝 ミトコンドリア 父方選択的分解 ヌクレアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

有性生殖を行う真核生物において、ミトコンドリア DNA(mtDNA)は母方のみから子孫に受け継がれる。この現象を母性遺伝という。母性遺伝のメカニズムとして、受精時に精子のミトコンドリアが卵に入らないという物理的排除機構が長らく提唱されていた。しかし、精子のミトコンドリアも卵に入ることや、真正粘菌のような同じ大きさの配偶子(同形配偶子)の接合においても父方 mtDNA が特異的に分解されることから、父方 mtDNA の物理的な排除機構が母性遺伝の本質的な仕組みではないことが明らかとなった。そして近年、様々な生物において、受精後に父方 mtDNA がヌクレアーゼによって選択的に分解されることや、ユビキチンやオートファジーなどによって父方ミトコンドリアも選択的に分解されることが分かってきた。特に、同形配偶子では、接合子成熟過程において父方由来の mtDNA の分解はミトコンドリア分解の前に必ず生じることから、父方 mtDNA の選択的分解は母性遺伝の引き金となる重要なステップであると考えられる。しかし、受精後、父方・母方のミトコンドリアが混在する中で、父方 mtDNA が選択的に分解される分子メカニズムはよくわかっていない。

母性遺伝における父方 mtDNA の選択的分解の分子メカニズムを明らかにするためには、まず DNA 分解に関与する DNA ヌクレアーゼの同定が必須である。精子や卵などの異形配偶子では、精子形成過程においてミトコンドリアや mtDNA が減少する一方で、卵にはミトコンドリアや mtDNA が大量に存在する。そのため、受精後のミトコンドリアから母性遺伝に関与する父方由来の因子を探索することは非常に困難である。一方、同形配偶子である真正粘菌は、父方と母方の配偶子は同数のミトコンドリアを持ち、高純度のミトコンドリア単離法も確立している。また、真正粘菌のミトコンドリア核様体 (mtDNA-タンパク質複合体) は、長さ 1 - 2  $\mu\text{m}$  の棒状で、他の生物と比べて巨大であり、母性遺伝過程におけるミトコンドリア核様体分解過程の観察に適している。これまでに、我々はそれらの真正粘菌の特徴を生かし、父方 mtDNA の分解が生じている接合子から単離したミトコンドリアを用いたプロテオミクス解析により、エンドヌクレアーゼ G 様タンパク質 (PpEndoG-like) を含む 9 種類の DNase が同定してきた。しかし、これらの DNase は接合子以外の時期でも発現しているため、母性遺伝に関与する DNase はまだ特定できていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、母性遺伝の分子メカニズムを明らかにするために、大型のミトコンドリア核様体をもつ真正粘菌を用いて母性遺伝過程におけるミトコンドリア核様体とミトコンドリアの動態を明らかにし、父方 mtDNA の選択的分解が生じる時期のみに活性化される DNase の性質を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

真正粘菌は、交配型の異なるアメーバ細胞を混合すると一斉に接合し、その後同調して成熟する。父方と母方のミトコンドリアの形態には差がないため、接合子中で父方と母方由来のミトコンドリアを識別するために、片親のアメーバ細胞のミトコンドリアを蛍光染色試薬で生体染色し、接合後の父方 mtDNA 分解をミトコンドリア核様体の長さの変化により調べた。さらに、父方 mtDNA 分解中にミトコンドリア内膜が崩壊しているかどうかを明らかにするために、ミトコンドリアの膜電位感受性色素であるテトラメチルローダミンジエステル (TMRE) を用いて、母性遺伝過程におけるミトコンドリア膜電位の変化についても調べた。また、母性遺伝に関与する DNase の性質 (金属要求性および活性 pH 範囲) を調べるために、父方 mtDNA 分解が生じた接合子から単離したミトコンドリアを様々な条件下でインキュベートし、ミトコンドリア核様体の長さの変化により DNase 活性を検出する *semi-in vitro* アッセイ法を開発した。さらに、検出された DNase がどの時期から活性化されているかを明らかにするために、様々な時期からミトコンドリアを単離し、DNase 活性の有無を *semi-in vitro* アッセイ法で調べた。また、単離ミトコンドリアを用いたプロテオミクス解析により同定された PpEndoG-like が、母性遺伝に関与しているかどうかを検討するために、大腸菌で発現させたリコンビナントタンパク質を用いて DNase の金属要求性および活性 pH 範囲を調べた。

## 4. 研究成果

本研究では、交配型が異なるアメーバ株である AI35 (母方) と DP246 (父方) を用いた。AI35 と DP246 は、それぞれ 1 細胞当たり  $12.3 \pm 3.8$  と  $12.3 \pm 3.3$  (平均値  $\pm$  標準偏差) のミトコンドリアを含んでいた。また、長さが 1.0-1.5  $\mu\text{m}$  のミトコンドリア核様体が最も多く、0.5  $\mu\text{m}$  より短いミトコンドリア核様体は観察されなかった。AI35 と DP246 を混合すると、1 時間以内にアメーバ細胞の約 75% が接合し、接合子当たりのミトコンドリアの数は  $27.6 \pm 2.5$  個に増加した。接合子の成熟はほぼ同調して進行し、交配後 3 時間目から 5 時間目にかけてアメーバ

細胞では観察されなかった 0.5  $\mu\text{m}$  未満のミトコンドリア核様体を持つミトコンドリアが 7% から 30% に急速に増加し、交配後 11 時間目の接合子では 38% にまで達した。これらの結果より、mtDNA の分解が交配後 3 時間目から始まり、少なくとも 11 時間目までは接合子中のミトコンドリア内で DNase 活性が維持されていることが示唆された。

また、線虫では受精後のミトコンドリア内膜の崩壊により、父方のミトコンドリア膜間に存在するエンド G スクレアーゼ がマトリックスに移動することで、父方 mtDNA が分解される可能性が報告されている (Zhongsheng *et al.* 2017)。そこで、真正粘菌において mtDNA 分解中にミトコンドリア内膜の崩壊が生じているか調べるために、ミトコンドリアを膜電位感受性色素である TMRE で生体染色し、膜電位の変化を調べた。その結果、交配後 8 時間目まではミトコンドリア核様体が完全に消失したミトコンドリアにおいても膜電位の低下は見られなかった。また、交配後 11 時間目では、ミトコンドリア核様体が完全に消失したミトコンドリアの一部において膜電位の低下がみられた。よって、真正粘菌においては、mtDNA 分解中でもミトコンドリア内膜は維持されており、完全に mtDNA が分解されたのちにミトコンドリア内膜の崩壊が生じる可能性が示唆された。

次に、接合子内において片親由来のミトコンドリアを可視化するために MitoTracker Red CMXRos (MTR) と MitoTracker Green FM (MTG) を用いて、アメーバ細胞のミトコンドリアを染色する条件を検討した。その結果、MTG の方が MTR よりもより特異的にミトコンドリアを染色し、かつプレート上よりも水中で観察する方が位相差顕微鏡でミトコンドリアが明瞭に観察できることが分かった。また、MTG 染色したアメーバを用いた場合でも、接合率は約 50% と高い値を維持しており、接合子中で片親由来のミトコンドリアを識別することが可能となった。また、mtDNA 分解を調べるために、DNA を特異的に染色する赤色蛍光色素 N-aryl Pyrido Cyanine 3 (PC3) を用いて共染色した。その結果、交配後 3 時間目以降から父方由来のミトコンドリアでのみ 0.5  $\mu\text{m}$  より短いミトコンドリア核様体が出現することが確かめられた。これは、父方ミトコンドリアの mtDNA が選択的に分解されることを示す初めての細胞学的証拠である。さらに、ミトコンドリアの増殖が生じる時期を調べたところ、交配後 3 時間目の接合子では父方と母方のミトコンドリア数に変化はなかったが、交配後 5 時間目において母方のミトコンドリア数のみが急速に増加することが分かった。よって、接合子の成熟課程において、父方と母方由来のミトコンドリアがそれぞれ異なる増殖の制御を受けていることが示唆された。

次に、母性遺伝に関与する DNase の性質を *semi-in vitro* アッセイ法を用いて調べるために、父方 mtDNA の選択的分解が観察され始める交配後 3 時間目の接合子からミトコンドリアを単離した。単離ミトコンドリアは、*in vivo* と同様の長さのミトコンドリア核様体を保持していた。DNase の活性には二価の金属イオンが必要であり、必要となる金属イオンの種類は DNase ごとに異なっていることが知られているため、まず単離ミトコンドリアに 5 種類の 2 価の金属イオン ( $1\text{mM Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) を混合添加し、様々な pH 条件下で 1 時間インキュベートした。その結果、アッセイ前では 0.5  $\mu\text{m}$  より短いミトコンドリア核様体をもつミトコンドリアの割合は 8% であったのに対し、1 時間のインキュベーション後には、それらの割合は pH7.5-9.0 の条件下で増加し、pH7.7 で 27% と最も高くなった。また、金属イオン非存在下ではこのような割合の増加は生じなかった。よって、ミトコンドリア中の DNase は活性 pH 範囲が 7.5-9.0 であり、pH7.7 で最大の活性となることが示唆された。次に、DNase 活性に必要な二価の金属イオンを特定するために、pH7.7 の条件下で、様々な二価の金属イオンを添加し、*semi-in vitro* アッセイを行った。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  を用いた場合は、どの濃度においても 0.5  $\mu\text{m}$  より短いミトコンドリア核様体をもつミトコンドリアの割合は増加しなかったが、 $\text{Mg}^{2+}$  存在下 ( $1\text{mM}$ ,  $10\text{mM}$ ) では 28% まで増加した。よって、交配後 3 時間目の細胞から単離したミトコンドリア内には  $\text{Mg}^{2+}$  要求性の DNase が存在することが示唆された。また、*in vivo* で mtDNA の分解が生じていないアメーバ細胞や変形体、交配後 1、2 時間目の接合子から単離したミトコンドリアでは、 $1\text{mM Mg}^{2+}$  かつ pH7.7 の条件下において DNase 活性が検出されなかったことから、*semi-in vitro* アッセイで検出されている DNase 活性は母性遺伝を反映しており、交配後 2-3 時間目の間に母性遺伝に関与する DNase の活性化機構が存在することが示唆された。

さらに、単離ミトコンドリアを用いたプロテオミクス解析により同定された PpEndoG-like が、母性遺伝に関与しているかどうかを検討するために、大腸菌で発現させたリコンビナントタンパク質を用いて DNase の金属要求性および活性 pH 範囲を調べた。精製したリコンビナントタンパク質と DNA を混合し、様々な二価の金属イオンと pH 範囲の条件下でインキュベートし、アガロースゲル電気泳動により DNA 分解を調べた。その結果、PpEndoG-like の DNase 活性は、 $\text{Mg}^{2+}$  だけではなく、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下でも検出され、活性 pH 範囲は、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  存在下では pH6.0 - 7.0、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下では pH6.0 - 7.0 であった。よって、ENDOG 様スクレアーゼは母性遺伝に関与していない可能性が高い。

このような本研究で得られた知見は、今後、真正粘菌の母性遺伝における父方 mtDNA の選択的分解に関与する分子メカニズムを解明するために大きく役立つことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Urakawa, N., Nakamura, S., Kishimoto, M., Moriyama, Y., Kawano, S., Higashiyama, T. & Sasaki, N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Semi-in vitro detection of Mg <sup>2+</sup> -dependent DNase that specifically digest mitochondrial nucleoids in the zygote of <i>Physarum polycephalum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06920-2	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 Urakawa, N., Uno, K., Sato, Y., Higashiyama, T. & Sasaki, N. -	4. 巻 -
2. 論文標題 Rapid selective proliferation of mitochondria during zygote maturation in the uniparental inheritance of <i>Physarum polycephalum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 -
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 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10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sasaki., N.
2. 発表標題 Dynamics and regulation of mitochondrial nucleoids during the cell cycle in Hela cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asis Conference, Mitochondria & Metabolism in Health & Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦川直希、中村聡、森山陽介、桑田啓子、鈴木孝征、河野重行、東山 哲也、佐々木 成江
2. 発表標題 真正粘菌におけるミトコンドリアDNAの母性遺伝に関与するメカニズムの解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木成江、浦川直希、桑田啓子、由比良子、伊藤喜重、佐々木妙子、東山 哲也
2. 発表標題 真正粘菌の巨大ミトコンドリア核様体を用いたプロテオミクス解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦川直希、中村聡、森山陽介、桑田啓子、鈴木孝征、河野重行、東山 哲也、佐々木 成江
2. 発表標題 真正粘菌の母性遺伝における父方ミトコンドリアの選択的分解に関するメカニズムの解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村聡、浦川直希、東山 哲也、佐々木 成江
2. 発表標題 真正粘菌のミトコンドリア母性遺伝におけるEndoG-likeヌクレアーゼの解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦川直希、中村聡、森山陽介、鈴木孝征、横川大輔、河野重行、桑田啓子、東山哲也、佐々木成江
2. 発表標題 Semi-in vitroアッセイ系を用いた母性遺伝における父方ミトコンドリアDNA分解の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦川直希、中村聡、森山陽介、鈴木孝征、横川大輔、河野重行、桑田啓子、東山哲也、佐々木成江
2. 発表標題 真正粘菌 (Physarum polycephalum) を用いた母性遺伝における父方ミトコンドリアDNA選択的消失に関するヌクレアーゼの探索
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木成江
2. 発表標題 ミトコンドリア核様体の維持機構
3. 学会等名 第18回日本ミトコンドリア学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦川直希、桑田啓子、森山陽介、東山哲也、佐々木成江
2. 発表標題 Analysis of DNase involved in maternal inheritance of mitochondrial DNA in Physarum polycephalum
3. 学会等名 The 1st International mitochondria meeting for young scientist (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦川直希、中村聡、岸本真理子、森山陽介、桑田啓子、鈴木孝征、横川大輔、河野重行、東山哲也、佐々木成江
2. 発表標題 母性遺伝におけるミトコンドリアDNA選択的消失に関するヌクレアーゼの探索
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐々木成江、石原 孝也、前田 真希、石原 直忠 ほか	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 458
3. 書名 ミトコンドリアダイナミクス～機能研究から疾患・老化まで～	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	柳澤 直樹 (YANAGISAWA NAOKI)  (20728282)	名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員  (13901)	
連携研究者	望田(桑田) 啓子 (MOCHIDA-KUWATA KEIKO)  (70624352)	名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任助教  (13901)	
連携研究者	森山 陽介 (MORIYAMA YOSUKE)  (00452532)	藤田保健衛生大学・医学部・助教  (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------