

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510237

研究課題名(和文)ミトコンドリアDNAコピー数による呼吸鎖複合体タンパク質の同時発現制御機構の解明

研究課題名(英文) A Mechanism for Mitochondrial DNA Copy Number-regulated Simultaneous Expression of P proteins in Respiratory Complexes.

研究代表者

凌 楓 (LING, Feng)

独立行政法人理化学研究所・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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 出芽酵母においてミトコンドリア融合に伴ってミトコンドリア内膜での呼吸鎖複合体Vの解離が起きることで、ROSが誘発されることを見出した。(2)この際、融合が相同DNA対合促進タンパク質Mhr1依存的にmtDNAコピー数を増加することと、mtDNAにコードされる呼吸鎖タンパク質複合体Vの構成サブユニットも増加することから、組換え依存型複製の活性化がmtDNAを持たないミトコンドリアの生成を防ぐことでミトコンドリアゲノムの安定維持と品質管理に重要であると考えられる。(3)DNA損傷によって誘導されるDin7とMhr1の相対的発現レベルが複製か修復のどちらかの選択を決定する機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：We found that mitochondrial fusion induces dissociation of Complex V of the respiratory chain and ROS generation, which increases mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in a manner dependent on the homologous DNA pairing protein Mhr1 and also increases in the mtDNA-encoded subunits of Complex V. These results suggested that activation of recombination-dependent replication during mitochondrial fusion plays important roles in maintenance of mitochondrial genomes by preventing generation of mitochondria lacking mtDNA. We further uncovered a mechanism in which relative expression levels of the DNA damage inducible protein Din7 to Mhr1 determine the choice of replication or repair after pairing of homologous DNA by Mhr1.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：ゲノム生物学

キーワード：出芽酵母 DNA組換え ミトコンドリアDNA ミトコンドリア融合 酸化ストレス応答 ローリングサークル型複製 DNA損傷 Mhr1タンパク質

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。しかし、その意義もどのような機構で応答するかも不明である。

一般的に mtDNA の組換えは、二本鎖の切断から始まり、二本鎖切断を修復する。活性酸素種(ROS)による酸化損傷を除去する修復酵素 Ntg1 が、複製開始点特異的に二本鎖切断を導入することを見出した [Ling *et al.*(2007) *Mol. Cell. Biol.*, 27(3), 1133]。そして、単離したミトコンドリアを過酸化水素で処理すると核の影響の受けない条件下においても Mhr1 依存的複製が誘起されることを明らかにした [Hori *et al.*(2009) *Nucleic Acids Res.*,37, 749]。

しかし、細胞内においてどこから発生した活性酸素種(ROS)が mtDNA 複製開始のシグナルとして働く化についてまだわかっていない。また、相同 DNA 対合を促進する Mhr1 タンパク質依存的に mtDNA のコピー数が増加する際、ミトコンドリア内膜での呼吸鎖複合体を構成するタンパク質のサブユニット群を増やすかどうかについて不明である。さらにどのような機構が Mhr1 による相同 DNA 対合の後、組換えによる二本鎖切断修復か組換え依存型複製のどちらかへ進む経路を決定するかに関しても謎でした。

2. 研究の目的

本研究は、出芽酵母において組換え依存型 mtDNA 複製を誘起する ROS の発生場所の同定、組換え依存型複製による mtDNA コピー数の増加とそれがもつ生理学的な意義の究明、及び組換えによる複製か組換えによる修復のどちらが行われるかを選択する、組換え依存型複製の内在的調節機構を解明することを研究目的とする。

3. 研究の方法

試験管内でミトコンドリアの融合過程を追跡するために蛍光蛋白質再構成法 (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC)を用いた。

呼吸鎖複合体を構成するタンパク質のサブユニット群の量的変動を調べるために各種の抗体を用いてウェスタンブロット法で解析を行った。

各種の条件下で mtDNA コピー数の変動を捉え解析するために核 DNA と mtDNA を特異的に検出するプローブを用いてサザンブロットティングを行い、核 DNA のシグナルに対する mtDNA のそのの比を mtDNA の相対量とした。

4. 研究成果

ミトコンドリアネットワークが繰り返して起きる融合と分裂によって形成され、ダイナミックである。ミトコンドリアダイナミクスが mtDNA の複製に与える影響を調べるために出芽酵母から単離したミトコンドリアを用いて試験管内でミトコンドリアの融合過程を観察する実験系を構築した。そして、ミトコンドリア融合が mtDNA の複製に与える影響について調べたところ、ミトコンドリア融合に伴ってミトコンドリア内膜での呼吸鎖複合体 V の解離が起き、YME1 という内膜に局在するタンパク質

分解酵素によって解離したタンパク質サブユニットが分解されたため、ROS が誘発されることを見出した。この際、融合が Mhr1 依存的に mtDNA コピー数を増加することと、増加したコピー数に呼応して呼吸鎖複合体 V の構成タンパク質サブユニットも増加することを明らかにした。これらの結果から、ミトコンドリア融合に伴う組換え依存型複製の活性化がもたらした mtDNA のコピー数増加は呼吸鎖複合体 V の構成タンパク質サブユニットの品質管理、及び mtDNA を持たないミトコンドリアの生成を防ぐことでミトコンドリアゲノムの安定維持に重要であると考えられる。

出芽酵母のミトコンドリアの分裂が mtDNA の分配に与える影響を調べるためにミトコンドリア分裂に必要なタンパク質である Fis1、Mdv1、および Dnm1 の欠失変異体を構築した。その結果、Fis1 と Mdv1 の欠失が、接合体でのミトコンドリアゲノムの対立遺伝子の分離に働き、ホモプラスミーの形成を促進するが Dnm1 の欠失がこのような影響を示さないことを見出した。これらのことから、特定のミトコンドリア分裂タンパク質活性を阻害することでミトコンドリア対立遺伝子の分離を促進することが可能であることが示唆された。

出芽酵母において mtDNA の組換えを介した複製と修復のどちらが行われるかを決定する制御仕組みの解明を試みました。その結果としてまず、DNA 損傷によってその発現が誘導されるヌクレアーゼとして同定された Din7 が実は 5'-エキソヌクレアーゼを持つことを明らかにした。そして、mDin7 の発現量が相同 DNA 対合促進タンパク質 Mhr1 のそれより一定レベル以上に高くなると、ローリングサークル型複製を通してコンカテマー、及び mtDNA コピー数を増加するが、Mhr1 も同時に過剰発現させると組換え機能によって複製開始点で

の二本鎖切断が修復され、環状 mtDNA の多量体が合成されることを見出した。また、Din7 を単独で過剰発現させると、二本鎖切断部位をもつ複製開始点領域の喪失に伴い大量の呼吸機能欠損細胞が生じた。ところが、Mhr1 も同時に過剰発現させると呼吸機能欠損細胞の生成が抑制された。さらに Din7 と Mhr1 の単独、もしくは同時発現が mtDNA にコードされるヌクレアーゼである Endo.SceI によって誘発される遺伝子変換型相同的組換えを顕著に促進することを見出した。これらの結果から、Mhr1 が細胞内において Din7 と協調して組換えに働くことと、Din7 と Mhr1 の相対的発現レベルが組換えによる mtDNA の複製か組換えによる mtDNA の修復のどちらかへの進行を決定することが示唆された。

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 5 件)

(* , Corresponding author)

1. ***Feng Ling**, Akiko Hori, Ayako Yoshitani, Rong Niu, Minoru Yoshida, and Takehiko Shibata

Din7 and Mhr1 expression levels regulate double-strand-break-induced replication and recombination of mtDNA at *ori5* in yeast

Nucleic Acids Research, 5799-5816 (2013). Referee reading.

2. Elliot Bradshaw, Minoru Yoshida and ***Feng Ling**

Mitochondrial fission proteins Fis1 and Mdv1, but not Dnm1, play a role in maintenance of heteroplasmy in budding yeast

FEBS Letters, 586(8), 1245-1251 (2012).

Referee reading.

3. Rong Niu, Minoru Yoshida and
***Feng Ling**

Increased 4977-bp deletion in
mitochondrial DNA upon ATM/Chk2
checkpoint activation in HeLa cells
PLoS One, 7, e40572 (2012). Referee
reading.

4. Akiko Hori, Minoru Yoshida and
***Feng Ling**

Mitochondrial fusion increases the
mitochondrial DNA copy number
in budding yeast
Genes to Cells, 16, 527-544 (2011).
Referee reading.

5. **Feng Ling**, Tsutomu Mikawa
and Takehiko Shibata

Gene conversion through double-strand
break-induced DNA replication and
mitochondrial homoplasmy
Genes, 2, 169-190 (2011). Referee
reading.

{学会発表}(計 5件)

1. **凌楓**、牛栄、柴田武彦、吉田稔、
畠山英之、後藤雄一

健全な iPS 細胞樹立に向けたミトコ
ンドリア病患者細胞の mtDNA ホモプラス
ミー化促進法の開発

CREST/さきがけ/JST-CIRM 合同シン
ポジウム 2014年 1月 15日 東京都江東
区青海 2-3-6 日本科学未来館

2. **Feng Ling**, Rong Niu, Eliot
Bradshaw, Minoru Yoshida,
Recombination-mediated Replication in

Mitochondrial DNA Inheritance, Global
Conference of Chinese Geneticists,
Zhejiang University in Hangzhou,
Zhejiang Province, China, July 6-9, 2012.

3. **Feng Ling**,

Role of Recombination-mediated
Replication in Mitochondrial
Inheritance,

The Glycobiology Forum at Jiang Nan
University, School of Biotechnology,
Jiangnan University, No. 188800 Lihu
Avenue, Wuxi, Jiangsu, P.C. 214122,
China, July 10, 2012.

4. **Feng Ling**,

A Novel Mechanism for Mitochondrial
DNA Inheritance and its Medical
Significance,

Mitochondrial Genetics Forum at Peking
University, Peking University First
Hospital, Xi-shi-ku St, Beijing 100034,
China, August 29, 2012.

5. **Feng Ling**,

A Novel Mechanism for Mitochondrial
Inheritance & Its Biomedical
Importance,

Symposium of Mitochondrial Biomedicine,
Zhejiang University in Hangzhou,
Zhejiang Province, China, December
12-14, 2012.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

凌 楓 (LING FENG)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝
学研究室・専任研究員
研究者番号 : 70281665

