

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570076

研究課題名(和文) RCC1様タンパク質を中心とするミトコンドリア核様体分裂の分子制御機構の解明

研究課題名(英文) The regulation of mitochondrial nucleoid division by a mitochondrial RCC1-like protein

研究代表者

佐々木 成江 (SASAKI, NARIE)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20359699

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)：ミトコンドリアDNA(mtDNA)とタンパク質の複合体であるミトコンドリア核様体の分裂は、ミトコンドリアDNAの次世代への伝達に必須であるが、その制御機構は分かっていない。本研究では、真正粘菌においてミトコンドリア局在型RCC1(Regulator of chromosome condensation 1)様タンパク質が、核様体とクリステ膜との結合を制御することで、核様体の分裂制御に関わっていることを明らかにした。また、ヒトにおけるホモログを同定し、ヒトにおいても核様体の分裂に関与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial DNA (mt-DNA) is packed into a highly organized DNA-protein complex called the mitochondrial nucleoid (mt-nucleoid). Division of mt-nucleoid is necessary for mt-DNA distribution into daughter mitochondria. However, little is understood about the molecular mechanisms that regulate the mt-nucleoid division. In this study, we showed that a mitochondrial RCC1(Regulator of chromosome condensation 1)-like protein of *P. polycephalum* was involved in the mt-nucleoid division by controlling of the association of mt-nucleoids and cristae. We also identified a human mitochondrial RCC1-like protein (hmtRCC1). The down regulation analysis of hmtRCC1 showed that this protein might be involved in the mt-nucleoid division.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：ミトコンドリア核様体 分裂 RCC1様タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

生体内において、ミトコンドリア DNA (mtDNA) は、ミトコンドリア核様体と呼ばれるタンパク質-DNA 複合体として存在する。ミトコンドリア核様体内に含まれる複数の mtDNA は、ミトコンドリア核様体の分裂によって分配され、次世代に伝達される。しかし、ミトコンドリア核様体の分裂に関する分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。

真正粘菌(*Physarum polycephalum*)のミトコンドリア核様体は、非常に大きくヒトの 50 倍以上の mtDNA を含む。このため、核様体の構造と機能に関する形態学的な解析や、核様体の単離による機能分子の同定などに優れた材料である。我々は、真正粘菌における核様体のプロテオミクス解析から、細胞核タンパク質である Ran のグアニンヌクレオチド交換因子 RCC1 (regulator of chromosome condensation 1) と相同性が高い新規ミトコンドリア局在型 RCC1 様タンパク質 pmn67 を同定した。興味深いことに、これまでに確立してきたノックダウン法による予備的な実験から、このタンパク質はミトコンドリア核様体の等分裂に必須であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、真正粘菌から同定した pmn67 の機能解析を行い、ミトコンドリア核様体分裂の分子基盤の解明を目指した。また、他の生物においてもミトコンドリア局在型 RCC1 様タンパク質がミトコンドリア核様体の分裂に関わるのか、ヒト培養細胞を用いて普遍性の検証も行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 真正粘菌における pmn67 の機能解析

細胞内における pmn67 の局在を解析するために抗体を用いた細胞染色を行った。また、pmn67 が mtDNA に直接結合しているかゲルシフトアッセイを用いて調べた。さらに、真正粘菌に pmn67 遺伝子のモルフォリノアンチセンスオリゴをマイクロインジェクションし、pmn67 の発現抑制した際のミトコンドリア核様体分裂の変化を詳細に解析した。ま

た、pmn67 が mtDNA に直接結合しているかゲルシフトアッセイを用いて調べた。

### (2) ヒトにおけるミトコンドリア局在型 RCC1 様タンパク質の解析

ダイナミックに形態変化をするミトコンドリア内での核様体の分配機構を明らかにするために、高速で撮影可能なニポウディスク式共焦点レーザー顕微鏡と超高感度の EMCCD カメラを組み合わせることで、励起光を最小限に抑え、かつ素早い核様体の動態を長時間ライブイメージングすることに成功した。また、ミトコンドリアと核様体の動態を同時に観察するために、ミトコンドリアを DsRed でラベルした HeLa 細胞を SYBR Green I 染色した。また、Pmn67 と相同性の高いヒトタンパク質を探索し、GFP を用いた局在解析や RNAi を用いた遺伝子発現抑制解析を行った。

## 4. 研究の成果

### (1) 真正粘菌における pmn67 の機能解析

細胞核において RCC1 は、染色体に結合し、低分子量 GTPase である Ran の活性を調節することで、核タンパク質輸送、スピンドル形成、核膜の構築などに重要な役割を果たすことが知られている。pmn67 は、ミトコンドリア局在型 RCC1 様タンパク質であるが、抗体を用いた細胞染色により、主にミトコンドリア核様体に局在することが示された。また、pmn67 の DNA 結合能を調べるために、pmn67 を大腸菌で発現させ、精製し、ゲルシフトアッセイをおこなった。その結果、pmn67 は配列非特異的に DNA 結合することが分かった。さらに、モルフォリノアンチセンスオリゴを用いて pmn67 を発現抑制し、その際のミトコンドリアおよびミトコンドリア核様体の分裂を詳細に解析した。真正粘菌では、ミトコンドリア分裂に伴ってミトコンドリア核様体も中央でくびれて分裂し、最終的には娘ミトコンドリアに等分配される。しかし、pmn67 発現抑制細胞においては、ミトコンドリア分裂は正常であるが、核様体の分裂が抑制されていることが分かった。また、最終的には、ミトコンドリア分裂により、核様体がくびり切れ、その結果、核様体が娘

ミトコンドリアに不等分配されることが分かった。さらに、電子顕微鏡観察により、**pmn67** 発現抑制細胞において、ミトコンドリア核様体の不等分配が見られ始める発現抑制後3日目の細胞において、ミトコンドリア核様体とクリステとの結合が著しく減少し始め、5日目ではさらに進行していることが明らかとなった(図1)。バクテリアとの類似性から、ミトコンドリア核様体とクリステ膜との結合は、核様体の分裂に重要であると考えられている。よって、**pmn67** は、核様体とクリステ膜との結合を制御することで核様体の分裂制御に関わっている可能性が示唆された。

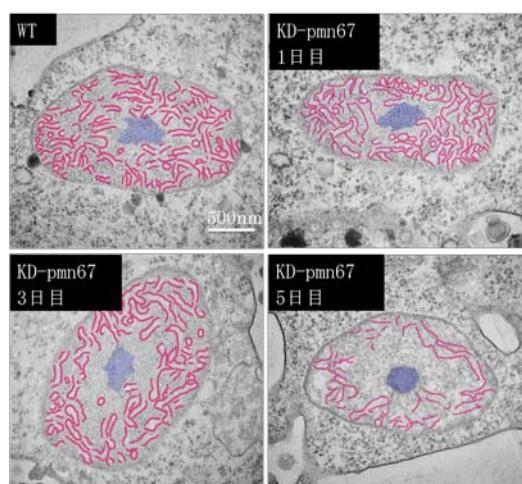


図1:真正粘菌におけるミトコンドリアの電子顕微鏡観察

通常細胞 (WT) と **pmn67** を発現抑制した細胞 (KD-**pmn67**) のミトコンドリアを電子顕微鏡で観察した。KD-**pmn67** の3日目、5日目では、ミトコンドリア核様体(ブルー) 周辺のクリステ膜 (ピンク) の著しい減少が観察できる

## (2) ヒトにおけるミトコンドリア局在型 RCC1 様タンパク質の解析

通常、ミトコンドリア核様体は、非常に小さなスポット状の構造であり、ヒトでは  $0.1\mu\text{m}$  以下の微小な構造である。また、多くの生物のミトコンドリアは、活発に分裂・融合を繰り返しており、そのようにダイナミックに形態変化するミトコンドリア内で微小なミトコンドリア核様体の分裂が

どのように制御されているか全く分かっていない。我々は、まずミトコンドリアを **DsRed** でラベルしたヒト培養細胞 (HeLa 細胞) を用いて **SYBR Green I** 染色によるミトコンドリア核様体の長期ライブイメージング法を開発した。その結果、ミトコンドリア核様体の動きはミトコンドリアの動きとは完全には同調していなかったことから、核様体の動態はミトコンドリアとは別の機構で制御されている可能性が示された。さらに、ミトコンドリアだけではなく、核様体も活発に分裂・融合を繰り返しており、そのバランスによって一定の核様体のサイズを保っていることが分かった。また、ミトコンドリア核様体の分裂はミトコンドリアの分裂と同調していないことも明らかとなった。さらに、**Pmn67** と相同性の高いヒトタンパク質を探索し、ミトコンドリアに局在する **RCC1** タンパク質として **hmtRCC1** ( human mitochondria RCC1-like protein) を同定した。**hmtRCC1** の発現抑制解析を行った結果、非常に短時間でミトコンドリア核様体が巨大化し、同時に核様体数が減少することが分かった (図2)。また、この際、ミトコンドリア核

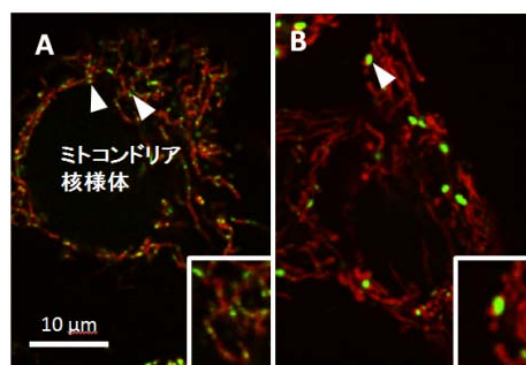


図2:ヒト培養細胞のミトコンドリア核様体の観察

HeLa 細胞を **SYBR Green I** で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(赤:ミトコンドリア、緑: mtDNA) A:通常の細胞。網目状のミトコンドリアの中に、核様体の輝点が多数観察できる (矢頭) B: **hmtRCC1** をノックダウンした細胞。ミトコンドリア核様体の数が減少し、巨大化したミトコンドリア核様体が観察できる

様体の融合頻度に変化はなく、分裂頻度のみが減少していたため、核様体の分裂・融合のバランスが融合側に傾いたために核様体が巨大化が生じたと予想された。よって、ミトコンドリア分裂と核様体分裂との関係は、生物によって異なるものの、RCC1 様タンパク質による核様体の分裂制御機構は、生物普遍的な分子機構である可能性が高い。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Sasaki, N., Mihara, K., Ishihara, N. (2013) Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 29, 11863-11868 査読有 doi: 10.1073/pnas.1301951110
- ② Okuda, S., Suzuki, T., Kanaoka, M.M., Mori, H., Sasaki, N., Higashiyama, T. (2012) Acquisition of LURE-Binding Activity at the Pollen Tube Tip of *Torenia fournieri*. *Molecular Plant*, 6,1074-1090. 査読有 doi:10.1093/mp/sst050
- ③ Itoh, K., Izumi, A., Mori, T., Dohmae, N., Yui, R., Sano, K., Shirai, Y., Kanaoka, M.M., Kuroiwa, T., Higashiyama, T., Sugita, M., Murakami-Murofushi, K., Kawano, S., Sasaki, N. (2011) DNA packaging proteins Glom and Glom2 coordinately organize the mitochondrial nucleoid of *Physarum polycephalum*. *Mitochondrion* 11, 575-586 査読有 doi: 10.1016/j.mito.2011.03.002.
- ④ Akiyama, H., Sasaki, N., Hanazawa, S., Gotoh, M., Kobayashi, S., Murakami-Murofushi, K. (2011) Novel sterol glucosyltransferase in the animal tissue and cultured cells: evidence that glucosylceramide as glucose donor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1811, 314-322 査読有 doi: 10.1016/j.bbaliip.2011.02.005.
- ⑤ Hamamura, Y., Saito, C., Awai, C., Kurihara, D., Miyawaki, A., Nakagawa, T., Kanaoka, M. M., Sasaki, N., Nakano, A., Berger, F., Higashiyama, T. (2011) Live-Cell Imaging Reveals the Dynamics of Two Sperm Cells During Double Fertilization in *Arabidopsis Thaliana*. *Current Biology*. 21: 497-502. 査読有 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.02.013
- ⑥ Kanaoka M.M., Kawano N., Matsubara Y., Susaki D., Okuda S., Sasaki, N. Higashiyama T. (2011) Identification and characterization of TcCRP1, a pollen tube attractant from *Torenia concolor*. *Ann Bot.* 108: 739-747. 査読有 doi: 10.1093/aob/mcr111.
- ⑦ Goto, H., Okuda, S., Mizukami, A., Mori, H., Sasaki, N., Kurihara, D., Higashiyama, T. (2010) Chemical visualization of an attractant peptide, LURE. *Plant Cell Physiol.* 52: 49-58. 査読有 doi: 10.1093/pcp/pcq191.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 佐々木成江 「Mitochondrial nucleoid proteins in slime molds and animals」The 4th International symposium on dynamics of mitochondria (2013 年 10 月 31 日: 沖縄)
- ② 山田佳歩, 由比良子, 佐々木妙子, 鈴木俊哉, 東山哲也, 佐々木成江 「The Regulation of Mitochondrial Nucleoid Division by a Mitochondrial RCC1-like Protein in *Physarum polycephalum*.」The 4th International symposium on dynamics of mitochondria (2013 年 10 月 30 日: 沖縄)
- ③ 佐々木妙子, 山田佳歩, 由比良子, 鈴木俊哉, 石原直忠, 石原玲子, 東山哲也, 佐々木成江 「Identification and Characterization of Mitochondrial RCC1-like Protein in Humans」The 4th International symposium on dynamics of

mitochondria (2013年10月29日:沖縄)

- ④ 佐々木妙子, 山田佳歩, 由比良子, 鈴木俊哉, 石原直忠, 石原玲子, 東山哲也, 佐々木成江「ヒト培養細胞を用いたミトコンドリア核様体分配機構の解析」第36回分子生物学会年会 (2013年12月5日:兵庫)
- ⑤ 山田佳歩, 由比良子, 佐々木妙子, 鈴木俊哉, 東山哲也, 佐々木成江「ミトコンドリア局在型RCC1様タンパク質によるミトコンドリア核様体の分裂制御」日本植物学会第77回大会 (2013年9月14日:北海道)
- ⑥ 山田佳歩, 佐々木妙子, 由比良子, 東山哲也, 佐々木成江「真正粘菌におけるバクテリア分裂因子によるミトコンドリアとミトコンドリア葉緑体の分裂制御」日本植物形態学会第25回大会(2013年9月12日:北海道)
- ⑦ 佐々木成江「粘菌ミトコンドリアの特性～ミトコンドリア核様体の発見から最近の知見まで」日本ミトコンドリア学会第12回年会シンポジウム (2012年12月21日:筑波)
- ⑧ 山田佳歩, 由比良子, 佐々木妙子, 鈴木俊哉, 東山哲也, 佐々木成江「真正粘菌を用いたミトコンドリア核様体分配に関わる新規RCC1様タンパク質の発見」日本ミトコンドリア学会第12回年会シンポジウム (2012年12月20日:筑波)
- ⑨ 佐々木妙子, 山田佳歩, 由比良子, 鈴木俊哉, 石原直忠, 石原玲子, 東山哲也, 佐々木成江「ヒト培養細胞を用いたミトコンドリア核様体分配に関わる新規RCC1様タンパク質の発見」日本ミトコンドリア学会第12回年会シンポジウム (2012年12月20日:筑波)
- ⑩ 佐々木成江, 由比良子「ミトコンドリア核様体のプロテオミクス解析による核様体分配制御因子の同定」日本タンパク質科学会 第11回年会ワークショップ (2011年6月9日:大阪)
- ⑪ 佐々木成江, 前田桂「Identification of a unique mitochondrial DNA polymerase in *Plasmodium falciparum*」International Union

of microbiological Societies 2011 Congress (2011年9月9日:北海道)

[その他]

- ① 日本植物形態学会第25回大会 ポスター賞 (山田佳歩)
- ② The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria Young Investigator Schoiarship (山田佳歩)
- ③ 日本ミトコンドリア学会第12回年会シンポジウム 研究奨励賞 (佐々木妙子)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 成江 (SASAKI, NARIE)  
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 20359699