

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840011

研究課題名(和文) 哺乳動物ミトコンドリアゲノムの複製に関するタンパク質因子の探索

研究課題名(英文) Search for protein factors involved in mammalian mtDNA replication

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞小器官ミトコンドリアは、核ゲノムとは異なる独自のゲノム、ミトコンドリアDNA(mtDNA)を持つ。mtDNAは細胞のエネルギー産生に深く関わり、mtDNAに生じた異常は様々な疾患に関与することが知られている。それ故、mtDNAがどのように複製・維持されているのかをより深く理解することは生命医学の進展に重要である。本研究はmtDNA複製に関わる新規のタンパク質を見出すことを目的として行われた。培養細胞等からタンパク質 mtDNAを複合体の状態で見出す方法を構築し、この複合体に含まれるタンパク質の同定を行った。そしてこれらのタンパク質がmtDNA複製・維持に関わるかを検討した。

研究成果の概要(英文)：Most of a cell's energy is generated in the compartment of the cell called mitochondria. Mitochondria contain a small circle of DNA, called mitochondrial DNA (mtDNA), that is essential for energy production to maintain life. The significance of mtDNA maintenance can be recognized by the fact that abnormalities in mtDNA are associated with human pathology. A deeper understanding of how mtDNA is replicated and maintained is thus important for the progress of bioscience and medicine. This research project was aimed at finding a new protein factor(s) that are involved in the replication and/or maintenance of mtDNA. To this end, methods for purifying mtDNA-protein complexes were constructed. Then attempts were made to capture proteins that were contained in the complexes, followed by determination of the identity of the proteins. Further, whether the proteins are involved in mtDNA replication or maintenance were examined.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA

1. 研究開始当初の背景

細胞小器官ミトコンドリアは、核ゲノムとは異なる独自のゲノム、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を持つ。mtDNA は ATP の産生、代謝や物質輸送に必要なミトコンドリア膜電位の維持に重要な役割を果たす呼吸鎖酵素複合体のサブユニットタンパク質遺伝子をコードしている。mtDNA に生じる異常 (例えば塩基置換変異) がミトコンドリア病の発症原因となったり様々な疾患と関連している。mtDNA は多コピーゲノムであり、ヒトでは通常一細胞あたり数千コピー存在している。核 DNA とは異なり、分裂を停止した細胞でも mtDNA は複製しており、mtDNA はターンオーバーしていると考えられる。これらのことから、mtDNA の正確な複製と適正なコピー数の維持はミトコンドリア機能の維持に不可欠であり、mtDNA の複製・維持の理解の深化は生命科学・医学の進展に重要である。

近年の一連の研究から哺乳動物において 2 つの θ (シータ) 型複製機構に由来する mtDNA の複製中間体 (複製途上の DNA 分子) が存在することが提唱されて、約 30 年間信じられていた mtDNA 複製モデルは大幅な修正を迫られ、現在 mtDNA 複製の研究は高い関心を集めている。そのうちの一方は、mtDNA 独自の複製メカニズムと考えられ、RITOLS (Ribonucleotide incorporation through-out the lagging strand) 複製と命名された [1]。この複製メカニズムでは、一方の親鎖を鋳型としてリーディング DNA 鎖が連続的に合成されていくときに、ラギング DNA 鎖は同時に合成されず、代わりにもう一方の親鎖が 1 本鎖の状態に放置されることを防ぐかのように RNA (mitochondrial transcripts) がハイブリダイズしていく。そして後にこれが DNA 鎖で置き換えられる (図 1)。もう一方の複製メカニズムは、核 DNA の複製のときと同様に、リーディング DNA 鎖が合成されると協調してラギング DNA 鎖が不連続的に合成されていくと考えられており、COSCOFA (conventional, strand-coupled Okazaki fragment-associated) 複製と呼ぶ (図 1)。さらに、これら 2 つの複製メカニズムでは複製の伸長段階だけでなく、開始段階も異なっていることが強く示唆されており、すなわち RITOLS 複製は mtDNA のごく限定された位置から開始されて 1 方向へ複製が進んでいくのに対し、COSCOFA 複製は mtDNA の広い領域から開始されて両方向へ進行するという顕著な違いがあると提唱されている。

核 DNA の複製においては複製を運用・制御するために働いている数多くのタンパク質が知られている。一方、哺乳動物 mtDNA の

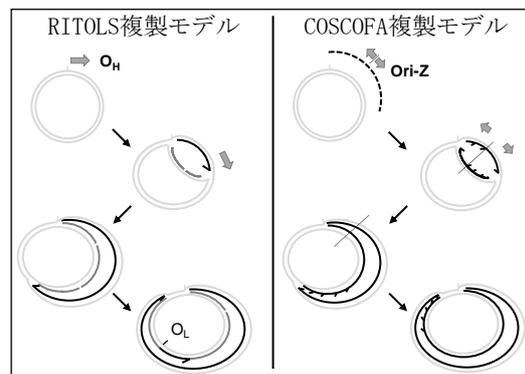


図 1 哺乳動物において提唱された 2 つの mtDNA 複製メカニズム [RITOLS 複製モード (左) と COSCOFA 複製モード (右)] の概略。親 DNA 鎖を薄灰色、新生 DNA 鎖を黒色、RNA 鎖を灰色で示している。

複製においては、DNA ポリメラーゼ、DNA ヘリケース、1 本鎖 DNA 結合タンパク質、加えていくつかのタンパク質が知られているに過ぎず、上述のように明らかになってきた mtDNA 複製の伸長段階、そして開始段階の複雑さを考えると、現在知られているよりも多くのタンパク質が mtDNA の複製、その制御に働いているのではないかと予測される。

2. 研究の目的

上述のように、哺乳動物 mtDNA の複製に対する理解は大きく前進したが、未だに多くの不明点がある。特に、以下の 2 点が挙げられる。

- DNA 複製においてその開始段階は複製をするかしないかを決定する重要な調節段階である。mtDNA 複製中間体の解析から RITOLS 複製と COSCOFA 複製は複製開始に関して顕著な違いが見出されたがその理由は未解明であり、mtDNA 複製開始の制御機構はほとんど分かっていないといえる状況である。
- 複製伸長段階において、RITOLS 複製でラギング鎖として RNA がハイブリダイズする機構は未解明であり、また、COSCOFA 複製の DNA ラギング鎖がどのように合成されるのかはよく分かっていない状況である。

そこで本研究は、mtDNA 複製中間体の詳細な解析から得られた数多くの知見に立脚し、mtDNA 複製において複製開始段階と伸長段階に注目して、mtDNA 複製に関与するタンパク質を探索して新規因子を同定し、mtDNA 複製をより深く理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) mtDNA 複製フォークをタンパク質が結合した状態で細胞から特異的に調製する方法の構築

DNA複製がおきているDNA上の場所である複製フォークに必ず1分子存在するタンパク質は、新生鎖の合成に先立って親2本鎖をほどきながらDNA上を移動していくDNAヘリケースである。ミトコンドリアにのみ存在するDNAヘリケースTwinkleを利用して、mtDNAの複製フォーク断片を複製フォークに集まっているタンパク質が結合したタンパク質-DNA複合体の状態ですべて的に精製してくる実験系の構築を試みた。

① まず、ヒトTwinkleヘリケースのC末端に免疫沈降のためのペプチドタグを連結した融合タンパク質(Twinkle^{tag})遺伝子をpcDNA5/FRT/TOベクターにクローニングし、これをFlp-In TRex systemを用いて薬剤(ドキシサイクリン)誘導的にFlp-In TRex 293細胞(ヒト培養細胞)において発現できるような細胞の作製をおこなった。このとき、野生型のTwinkleヘリケースだけでなく、培養細胞内で発現するとmtDNA複製中間体が蓄積する2種類のTwinkleヘリケース変異体(アミノ酸置換:K421A、G575D)[2]でもそれぞれ同様の誘導発現細胞の作製を行った。

② mtDNA複製フォーク精製の至適条件を求めるために、まずTwinkle^{tag}タンパク質誘導発現のために細胞培養液に加えるドキシサイクリン濃度や発現の時間的推移を検討し、発現タンパク質の細胞内局在を確認した。さらに、Twinkle^{tag}が誘導発現されることによるmtDNAへの影響をmtDNAコピー数の定量と2次元アガロースゲルDNA電気泳動法(2D-AGE)によるmtDNA複製中間体の直接的観察によって解析した。

③ 次に、タンパク質-mtDNA複製フォーク複合体を特異的に精製してくるため、mtDNAに結合しているタンパク質をmtDNAに固定するクロスリンク処理、mtDNAを適切な大きさに断片化、さらに誘導発現したTwinkle^{tag}のペプチドタグを利用したタンパク質-mtDNA複製フォーク複合体の免疫沈降などの諸条件の検討を行い、タンパク質-mtDNA複製フォーク複合体を調製した。

(2) mtDNA複製開始領域に結合するタンパク質を調製する方法の構築

2D-AGEによるmtDNA複製中間体の解析の際、通常は確実な除タンパク質処理のためにプロテアーゼKによる処理を行い、さらに有機溶媒抽出をしたうえでアルコール沈殿によるmtDNAの精製を行うが、この過程でプロテアーゼ処理を省くとmtDNA複製開始領域にタンパク質が結合したままmtDNAが精製されてくること示唆されていた[3]。そこで、上記の方法に依れば、複製開始機構に関連するタンパク質がmtDNAに結合したまま精製されるのではないかと考え、そのようなタンパク

質を特異的に調製してくる方法の構築を試みた。

① 培養細胞を大量培養し、ショ糖密度勾配超遠心法を用いて精製したミトコンドリア画分を得た。そしてこの画分からプロテアーゼ処理をすることなくミトコンドリア核酸画分を調製した。

② アナリティカルスケールでmtDNAを適切な制限酵素で切断して2D-AGEで展開し、タンパク質が結合したと考えられる複製開始領域を含むmtDNA断片の泳動位置をサザンハイブリダイゼーション法で決定した。そして、プレパラティブスケールで調製したmtDNAを2D-AGEで展開し、目的のmtDNA断片を含むアガロースゲル片を得た。

(3) 質量分析装置によるタンパク質の解析

(1)、(2)で調製したサンプルをSDS-PAGEで展開してタンパク質のバンドを切り出し、質量分析装置を用いて解析し、含まれているタンパク質を同定した。

(4) 同定した候補タンパク質の発現抑制のmtDNAに対する効果の検討

(3)で得られたタンパク質のうち測定の信頼度やタンパク質の性質等を考慮したうえで、mtDNAの複製や維持に関わっていると推定したものを候補タンパク質として機能解析を行った。培養細胞において、siRNAを用いて候補タンパク質の発現を抑制したときに、mtDNAに起きる変化をとらえるための解析を行った。

4. 研究成果

(1)の方法では、作製した培養細胞において、免疫沈降用のペプチドタグを連結した野生型、変異型のTwinkleタンパク質(Twinkle^{tag})がドキシサイクリンで誘導的に発現することを確認した。そして同タンパク質がミトコンドリアに局在し(図2)、変異型Twinkle^{tag}がmtDNA複製中間体のパターンに影響を与えたことから(図3)、誘導発現したTwinkle^{tag}がmtDNAの複製フォーク上に存在して機能していると考えられる結果を得たと結論した。

そして、Twinkle^{tag}を誘導発現後、細胞からミトコンドリア画分を調製してクロスリンク処理を施したのち、ソニケーションによりmtDNAを断片化後、免疫沈降の操作を行い、Twinkle^{tag}を介してタンパク質-mtDNA複製フォーク複合体を得て、この画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEによって展開した。そして、タンパク質のバンドをゲルから切り出し、質量分析装置を用いて含まれるタンパク質を探索し、候補タンパク質を得た(図5A)。

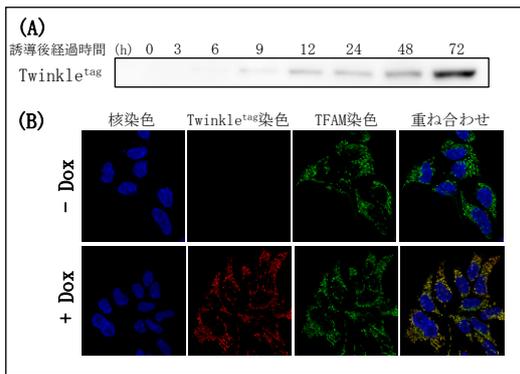


図2 Twinkle^{tag}の発現の確認 (A) ドキシサイクリン (Dox) 添加後のTwinkle^{tag}の経時的な発現をウエスタンブロッティング法により観察した。(B) 免疫染色によるTwinkle^{tag}の細胞内局在の確認。mtDNA結合タンパク質TFAMの染色と重なった。

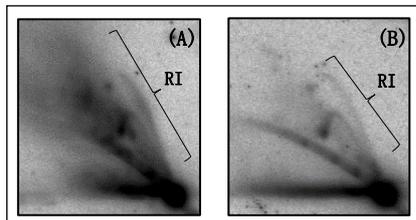


図3 2D-AGEによるmtDNA複製中間体の観察。Doxにより変異型Twinkle^{tag}を誘導しない場合 (A) と誘導 (3日) した場合 (B) の比較。複製中間体 (RI) のパターンに差異がみられた。

(2)の方法では、ミトコンドリア画分からプロテアーゼ処理をせずに調製したmtDNAを2D-AGEで展開したところ、タンパク質が結合していると考えられる複製開始領域を含むmtDNA断片と、タンパク質が結合していないと考えられる同mtDNA断片の分離が確認されたので (図4)、プレパラティブな量のmtDNAを用いて同様の実験を行い、目的の領域 (図4の★) をアガロースゲルから抽出し、これをSDS-PAGEにて展開し (図5B)、検出されたバンドをゲル片から抽出して質量分析装置を用いて含まれるタンパク質を探索し、候補タンパク質を得た。

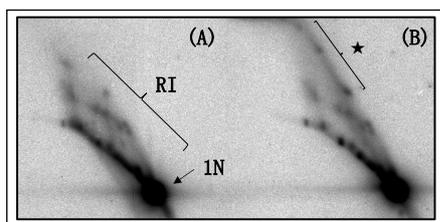


図4 2D-AGEによる複製開始領域を含むmtDNA断片の解析。プロテアーゼ処理を行って (A)、あるいは省いて (B) 調製したDNAを用いた。複製していないmtDNA断片 (IN)、複製中間体 (RI) はA, B両方でみられたが、タンパク質が結合していると考えられるmtDNA断片 (★)

はプロテアーゼ処理を省いた場合にのみ検出された。

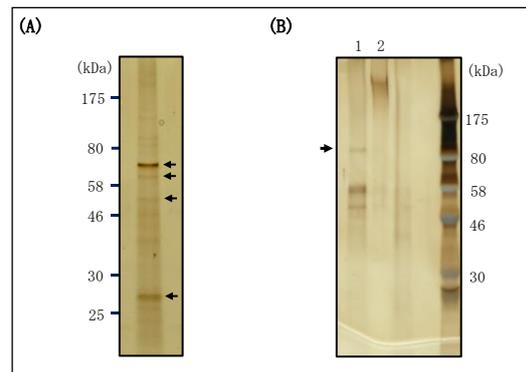


図5 (1)の方法 (A)、(2)の方法 (B)で得られたサンプルをSDS-PAGEで展開後、銀染色によって含まれるタンパク質を可視化した結果。(B)におけるレーン1は2D-AGEの★領域由来のサンプル、レーン2は1N領域由来のサンプル。矢印で示したバンドを切り出して質量分析装置にて分析した。

図5A, 5Bのタンパク質バンドの質量分析解析からそれぞれ得られた候補タンパク質は、ミトコンドリアに局在することが知られるHSP60タンパク質と、小胞体に局在するタンパク質として知られている分子量が90 kDa台のタンパク質であった。後者については、mtDNAと結合していることが示唆されたことは興味深い知見であると考えている。これらのタンパク質がmtDNAの複製・維持に関わっているのかを検討するため、培養細胞においてタンパク質の発現量を抑制するsiRNAトランスフェクションを行った (図6)。

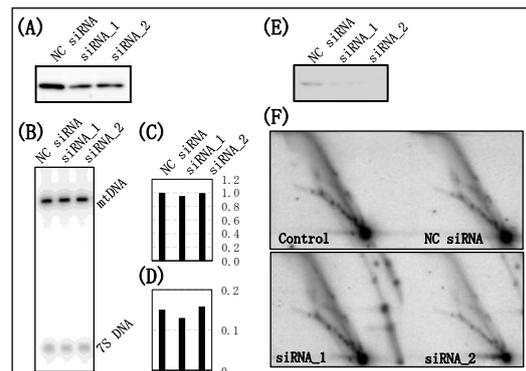


図6 HSP60 (A-D)、分子量90 kDa台のタンパク質 (E, F) のmtDNA複製への関与の検討。(A, E) ウエスタンブロッティング法によるタンパク質の発現量の解析。それぞれレーン1はネガティブコントロールsiRNA (NC siRNA)、レーン2, 3はそれぞれのタンパク質遺伝子に特異的な各2種類のsiRNAをトランスフェクションした細胞由来のライセートを泳動した。(B-D) HSP60の発現抑制下でのmtDNA, 7S DNAの解析 (B) と定量 [(C) mtDNA, (D) 7S DNA]。

それぞれの細胞由来の核酸を泳動し、サザンハイブリダイゼーションでmtDNA, 7S DNAを検出した。(F) 分子量90 kDa台のタンパク質の発現抑制下でのmtDNA複製中間体の解析。それぞれの細胞から核酸を精製して2D-AGEを行った。

HSP60タンパク質の場合、発現抑制が難しく条件検討の末、トランスフェクション後3日目で約50%の抑制をかけることに成功した。このような条件下で、mtDNAのコピー数の変化、また、mtDNAの複製開始領域に形成され、複製の制御に関与していると考えられている7S DNAの存在量の変化を検討したが、いずれも変化を認めなかった。分子量が90 kDa台のタンパク質はトランスフェクションによる発現抑制が効率よくおきた。そのような条件下でmtDNA複製中間体のパターンを解析したが変化はみられなかった。

今回同定した2つのmtDNA複製因子候補タンパク質について、siRNAによる発現抑制による検討ではmtDNA複製や維持への明白な関連性を認めなかったため、遺伝子発現抑制の効率・期間の改善や、mtDNA複製を薬剤で阻害するようなストレスを一過的にかけた後に発現抑制をするなどの実験方法の改良を行ってさらに解析を行う必要がある。また、本研究でmtDNA複製フォークや複製開始領域にタンパク質が結合したままmtDNAを調製する方法を構築したので、細胞やミトコンドリアの状態が異なる時(例えば細胞のATP産生が解糖系側、あるいはミトコンドリア酸化リン酸化側にシフトしている場合)にmtDNAに結合するタンパク質を探索・比較するなど、将来の発展的な研究に応用できる可能性が開けたと考えている。

<引用文献>

- [1] Yasukawa, T., Reyes, A., Cluett, T. J., Yang, M. Y., Bowmaker, M., Jacobs, H. T., Holt, I. J. (2006) Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO J.* 25(22), 5358-5371.
- [2] Wanrooij, S., Goffart, S., Pohjoismäki, J. L. O., Yasukawa, T., Spelbrink, J. N. (2007) Expression of catalytic mutants of the mtDNA helicase Twinkle and polymerase POLG causes distinct replication stalling phenotypes. *Nucleic Acids Res.* 35(10), 3238-3251.
- [3] He, J., Mao, C. C., Reyes, A., Sembongi, H., Di Re, M., Granycome, C., Clippingdale, A. B., Fearnley, I. M.,

Harbour, M., Robinson, A. J., Reichelt, S., Spelbrink, J. N., Walker, J. E., Holt, I. J. (2007) The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *J Cell Biol.* 176(2), 141-146.

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 安川 武宏 (2017) ミトコンドリア DNA のユニークな複製メカニズム. 医学のあゆみ 第260巻1号 5-10. 医歯薬出版株式会社, 査読無
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiBookDetail.aspx?BC=926001>
- ② Akman, G., Desai, R., Bailey, L. J., Yasukawa, T., Dalla Rosa, I., Durigon, R., Holmes, J. B., Moss, C. F., Mennuni, M., Houlden, H., Crouch, R. J., Hanna, M. G., Pitceathly, R. D., Spinazzola, A., Holt, I. J. (2016) Pathological ribonuclease H1 causes R-loop depletion and aberrant DNA segregation in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113(30), E4276-4285., 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1600537113
- ③ Qu, J., Yasukawa, T.*, Kang, D. (2016) Suppression of mitochondrial transcription initiation complexes changes the balance of replication intermediates of mitochondrial DNA and reduces 7S DNA in cultured human cells. *J. Biochem.* 160(1), 49-57., 査読有 (*corresponding author)
DOI:<https://doi.org/10.1093/jb/mvw010>

[学会発表] (計2件)

- ① 安川 武宏、高等脊椎動物ミトコンドリア DNA の複製機構、日本遺伝学会第88回大会、2016年9月7日、日本大学国際関係学部三島駅北口校舎、静岡県三島市(ワークショップにて招待講演)
- ② 曲 建華、小森田 祐二、安川 武宏、康東天、ミトコンドリアゲノムトポロジーの重要性、第14回ミトコンドリア学会年会、2014年12月3日、九州大学医学部百年講堂、福岡県福岡市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.cclm2.med.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 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