

|            |   |          |       |
|------------|---|----------|-------|
| 氏名         | おかもと さとし  |          |       |
| 授与学位       | 岡本 哲  |          |       |
| 学位記番号      | 博士 (理学)   |          |       |
| 学位授与年月日    | 理工博甲第734号   |          |       |
| 学位授与の要件    | 平成30年3月16日  |          |       |
| 研究科, 専攻の名称 | 学位規則第4条1項   |          |       |
| 学位論文題目     | 理工学研究科(博士後期課程) 環境共生系専攻  |          |       |
|            | 酵母呼吸欠損株のミトコンドリア核様体形態と核様体構成タンパク質に関する研究   |          |       |
|            | (A study on the morphology and the protein composition of mitochondrial nucleoids in respiratory-deficient yeast cells) |          |       |
| 論文審査委員     | 主査  | 山口大学 教授  | 宮川 勇  |
|            |   | 山口大学 教授  | 岩尾 康宏 |
|            |   | 山口大学 教授  | 祐村 恵彦 |
|            |   | 山口大学 教授  | 明石 真  |
|            |   | 山口大学 准教授 | 三角 修己 |

## 【学位論文内容の要旨】

ミトコンドリアは真核細胞の生存に必要なエネルギーを生産する細胞小器官であり、酸化的リン酸化に必須な遺伝子をコードする独自の DNA (mtDNA) を保持している。ミトコンドリア核様体(mt 核様体)は、mtDNA と複数のタンパク質からなる複合体であり、mtDNA の維持に重要な機能を持っている。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は約 75 kbp のゲノムサイズの mtDNA を保持し、内膜タンパク質、リボソームタンパク質、rRNA、tRNA をコードしている。*S. cerevisiae* は野生株( $\rho^+$ 株)をエチジウムブロミド処理することにより、mtDNA 配列の一部を欠失した呼吸欠損株( $\rho^-$ 株)を容易に誘導できるという特徴をもつ。それぞれの  $\rho^-$ 株は、特定の mtDNA 配列の繰り返しからなる mtDNA ( $\rho^-$  mtDNA) を保持する。また、 $\rho^-$ 株のひとつとして、mtDNA の複製起点 *ori5* を含む短い配列の繰り返しを保持する HS40  $\rho^-$ 株が存在する。 $\rho^+$ 株と HS40  $\rho^-$ 株を接合させると、子孫の二倍体酵母に優先的に  $\rho^-$  mtDNA が伝達される。これまでの研究から、 $\rho^+$ 株と  $\rho^-$ 株で mt 核様体構造に違いがあることが示唆されているが、詳細な研究は行われていない。そこで、本研究では mtDNA の複製や伝達における mt 核様体の役割をさらに明らかにするために、酵母  $\rho^+$ 株と  $\rho^-$ 株を用いて、ミトコンドリアと mt 核様体形態の関連および mt 核様体構成タンパク質について詳細に解析を行った。

第一章では DAPI 染色及びミトコンドリア移行 GFP を用いて、 $\rho^+$ 株と  $\rho^-$ 株で mt 核様体とミトコンドリアの形態を調べた。対数期の  $\rho^+$ 株の mt 核様体は数珠状の形態をしているのに対して、HS40  $\rho^-$ 株では mt 核様体は粒子状に観察された。粒子状の mt 核様体形態が、 $\rho^-$ 株の対数期細胞で共通して観察されるかどうかを調べるために、異なる長さの mtDNA 配列の単位を保持する  $\rho^-$ 株の mt 核様体を観察した。その結果、30 kbp 以上の長い mtDNA 配列の単位を保持する  $\rho^-$ 株では、紐状のミトコンドリア内に数珠状の mt 核様体形態が観察された。対照的に、1 kbp 以下の短い mtDNA 配列の単位を保持する  $\rho^-$ 株では、紐状のミトコンドリア内に粒子状の mt 核様体が観察された。これらの結果から、 $\rho^-$ 株の mt 核様体形態は、保持する mtDNA 配列の単位の長さ依存して変化することを明らかにした。また、HS40  $\rho^-$ 株の単離 mt 核様体の分析から、粒子状の mt 核様体が、DNA 結合タンパク質 Abf2p および他のタンパク質と結合したコンカテマー線状 mtDNA とオリゴマー環状 mtDNA から形成されていることが示唆された。

第二章では  $\rho^+$ 株と HS40  $\rho^-$ 株からそれぞれ mt 核様体を単離し、mt 核様体タンパク質の分析を行った。SDS ポリアクリルアミド電気泳動では、両株の mt 核様体タンパク質組成に明確な違いは検出されなかった。そこで、mt 核様体の構成成分である Abf2p、分子シャペロン Hsp60p、 $\alpha$  ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのサブユニット Kgd1p、Kgd2p に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、Abf2p、Hsp60p、Kgd2p では、両株で mt 核様体の結合量に顕著な差は認められな

ったが、Kgd1pの結合量は $\rho^+$ 株に比べHS40  $\rho^-$ 株で減少が認められた。さらに詳細に mt 核様体タンパク質を分析するために、 $\rho^+$ 株と HS40  $\rho^-$ 株の mt 核様体タンパク質のショットガン質量分析を行った。その結果、これまで mt 核様体タンパク質であると同定されているタンパク質のうち、 $\rho^+$ 株と比べて HS40  $\rho^-$ 株では主に4種類のタンパク質 (Kgd1p, Qcr1p, Qcr2p, Ymh2) の減少と1種類 (Mip1p) のタンパク質の増加が見られた。これらの結果から、 $\rho^+$ 株と HS40  $\rho^-$ 株の mt 核様体構成タンパク質の違いを明らかにした。

## 【論文審査結果の要旨】

真核生物の細胞内小器官であるミトコンドリアは呼吸によるエネルギー生産をおこなう極めて重要な細胞内小器官であり、その内部に固有のミトコンドリア DNA(mtDNA)を保持している。mtDNA は複数のタンパク質と結合して折り畳まれ、ミトコンドリア核様体 (mt 核様体) を形成している。mt 核様体は mtDNA の維持や遺伝のための重要な構造であることが知られている。

まず、本研究は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で mtDNA の欠失をもつ  $\rho^-$ 呼吸欠損株が作成できるという点に着目して、ミトコンドリアと mt 核様体形態が、呼吸活性およびミトコンドリアが保持する mtDNA 配列によってどのように変化するかを蛍光顕微鏡を用いて明らかにした。

酵母栄養成長過程におけるミトコンドリアと mt 核様体形態を、対数期と定常期に分けて観察した。対数期の  $\rho^-$ 呼吸欠損株6株の観察の結果、同じ呼吸欠損の表現型にもかかわらず、菌株によって mt 核様体が数珠状形態を示すものと粒子状形態を示すものがあることを明らかにした。本研究ではその原因を調べ、mt 核様体の形態は、呼吸活性または細胞内の mtDNA コピー数の違いよりも、保持する mtDNA 配列の単位に長さに依存して変化することを明らかにした。短い mtDNA 配列の単位をもつ細胞では、mt 核様体は粒子状の形態を示し、細胞内の mt 核様体数の減少と mt 核様体サイズの増大がおこる。そして、細胞から単離した mt 核様体の分析によって、短い mtDNA 配列単位の繰り返しを保持する株では、ミトコンドリア内で長いコンカテマーmtDNA と短い様々なサイズのオリゴマーmtDNA が形成され、これらの mtDNA が集合して粒子状 mt 核様体を形成していることを示唆する結果を得た。

次に、呼吸が正常な  $\rho^+$ 株と mtDNA 複製起点 *ori5* の繰り返しを保持する HS40  $\rho^-$ 呼吸欠損株から mt 核様体を単離して、ウェスタンブロット法と質量分析法によって mt 核様体を構成するタンパク質を調べた。その結果から、HS40  $\rho^-$ 呼吸欠損株の mt 核様体では、野生株の mt 核様体と比べて5種類の mt 核様体構成タンパク質に量的変化があることを明らかにした。

本研究で得られた知見は新規の研究成果であり、酵母 *S. cerevisiae* の  $\rho^-$ 呼吸欠損株のミトコンドリアと mt 核様体形態および mt 核様体構成タンパク質の特徴を明らかにしている。ヒトのミトコンドリア病においても、mtDNA の欠失が知られており、本研究の成果は他の生物でみられる不完全な mtDNA が、細胞内でどのような挙動をとるかを解析する上でも役立つと考えられる。

公聴会における主な質問内容は、 $\rho^-$ 株のミトコンドリアの微細構造に関すること、mt 核様体に含まれる DNA コピー数に関すること、mt 核様体の凝集のしくみに関すること、 $\rho^+$ 株と  $\rho^-$ 株のミトコンドリア形態の違いに関するものなどであった。いずれの質問に対しても発表者からの的確な回答がなされた。

以上より本研究は独創性、信頼性、有効性ともに優れ、博士(理学)の論文に十分値するものと判断した。

論文内容及び審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。

### 関連論文計1編

1) Satoshi Okamoto, Tomomi Inai and Isamu Miyakawa. (2016) Morphology of mitochondrial nucleoids in respiratory-deficient yeast cells varies depending on the unit length of the mitochondrial DNA sequence. FEMS Yeast Research, 16, Pii: fow055, Doi: 10.1093/femsyr/fow055