

博士論文

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)

平成 30 年 3 月

岡本 哲

山口大学理工学研究科

目次

全体の序論	1
第一章 酵母呼吸欠損株が保持する mtDNA 配列の単位の長さ とミトコンドリア核様体形態の関係	
要旨	4
序論	5
材料と方法	6
結果	9
考察	13
図表とその説明	16
第二章 酵母野生株と呼吸欠損株のミトコンドリア核様体タンパク質の解析	
要旨	30
序論	31
材料と方法	32
結果	35
考察	37
図表とその説明	40
全体の考察	46
謝辞	47
参考文献	48

全体の序論

ミトコンドリアは酸化的リン酸化により ATP 生産を行う細胞小器官であり、酸化的リン酸化に必須な遺伝子がコードされている独自の DNA (mtDNA) を保持している。そのため、mtDNA を複製および維持し、安定的に子孫へと伝達する仕組みがミトコンドリア機能の維持のために必須である。真正粘菌 *Physarum polycephalum* の研究は、mtDNA が多数のタンパク質と結合し、ミトコンドリア核様体(mt 核様体)と呼ばれるタンパク質-DNA 複合体内にコンパクトに折りたたまれていることを示した(Kuroiwa 1982)。その後の研究により、mt 核様体は mtDNA のパッケージング、mtDNA の活性酸素からの保護、mtDNA の複製・伝達、転写調節などの機能を持つことが報告されている。このように、mt 核様体は mtDNA の維持および発現に重要な役割を果たしている。

mt 核様体に関する研究は真正粘菌 *P. polycephalum* を始めとして、哺乳類ではヒト細胞とマウス細胞を用いて、また、真菌では出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて詳しく行われている。その中でも、出芽酵母 *S. cerevisiae* は、ミトコンドリア研究および mt 核様体研究を行うための利点を持っている。まず、*S. cerevisiae* はアルコール発酵により生育が可能なため、呼吸能を欠損しても発酵性炭素源の存在下で生育が可能であるという他の生物種にない特徴を持っている。実際、この性質を利用して、呼吸能を失った多数の核遺伝子の突然変異体が作成され、100 以上の核遺伝子が直接的または間接的に mtDNA の維持に関与していることが示されている (Contamine and Picard 2000)。

S. cerevisiae は約 75 kbp の mtDNA を保持しており、mtDNA 上に内膜タンパク質、リボソームタンパク質、rRNA、tRNA をコードしている。完全な mtDNA (ρ^+ mtDNA) を保持する株を ρ^+ 株と呼ぶ。 ρ^+ 株をエチジウムブロミドを添加した培地で培養すると、mtDNA の部分的欠失を持った ρ^- 株や mtDNA を完全に欠失した ρ^0 株を作成することが可能である(Slonimski et al. 1968)。 ρ^- 株は、一部分の mtDNA 配列の繰り返しからなる mtDNA を保持する呼吸欠損株となる。この性質を利用して、*S. cerevisiae* では、特定の mtDNA 配列を保持した株を作成できるという特徴がある。短い繰り返し配列内に mtDNA 複製起点と推定される *ori/rep* 配列を保持する ρ^- 株の中には、*hypersuppressive* と呼ばれる特徴を持つ株が存在する。*hypersuppressive* ρ^- 株と ρ^+ 株を接合させると、子孫の二倍体酵母はすべて ρ^- 株の mtDNA のみを保持する呼吸欠損株となる(Dujon 1981; Blanc and Dujon 1980)。このように、 ρ^- 株が保持する特定の mtDNA 配列によっては、mtDNA が特徴的な遺伝を示す。

S. cerevisiae では、mt 核様体を *in vivo* の形態を保持したまま単離することが可能であり、1 つの mt 核様体には 3~4 コピーの mtDNA が DNA 結合タンパク質により折りたたまれている(Miyakawa et al. 1987, 1995, 2010)。単離 mt 核様体の研究によ

り、mt 核様体タンパク質として現在 35 種類のタンパク質が報告されている(Chen et al. 2005; Miyakawa 2017)。*S. cerevisiae* の mt 核様体タンパク質の中で最も研究が行われているタンパク質のひとつは Abf2p である。Abf2p は mtDNA のパッケージングを行う主要な DNA 結合タンパク質であり、mtDNA の維持、伝達、組換え等に関与している(Diffely and Stillman 1991; Zelenaya-Troitskaya et al. 1998; Miyakawa et al. 2010)。また、培養条件により 1 つの mt 核様体に含まれる mtDNA コピー数および mt 核様体タンパク質の組成が変化することも報告されている(Shiiba et al. 1997; MacAlpine et al. 2000; Miyakawa et al. 2004; Kucej et al. 2008)。

Abf2p 欠損株は、グルコースを含む培地で培養すると mtDNA を消失する(Diffely and Stillman 1991)。しかし、Abf2p を欠損した *rho*⁻株では、同じ条件下でも *rho*⁻ mtDNA を安定して維持することができる(Zelenaya-Troitskaya et al. 1998)。また、mtDNA の維持および修復に関与する Mgm101 の欠損株では、*ori/rep* 配列を保持する *rho*⁻ mtDNA を維持できるが、*rho*⁺ mtDNA および *ori/rep* 配列を保持しない *rho*⁻ mtDNA を維持できない(Zuo et al. 2002)。これらの報告は *rho*⁺株と *rho*⁻株で mt 核様体の構造に違いがあることを示唆する。

これまでの酵母 *S. cerevisiae* の mt 核様体形態および mt 核様体タンパク質に関する多くの研究が、*rho*⁺株を用いて行われてきた(Miyakawa et al. 1984; Chen et al. 2005; Kucej et al. 2008)。対照的に、*rho*⁻株の mt 核様体の形態および mt 核様体タンパク質についての詳細な研究は行われていない。

以前の研究で、*rho*⁺株と *rho*⁻株のミトコンドリアの電子顕微鏡観察が行われ、*rho*⁻株ではクリステが未発達であるなど、微細構造の違いが報告されている(Stevens 1981)。一方、電子顕微鏡による観察では、細胞内のミトコンドリア全体の形態を多数の細胞で観察することは難しい。また、酵母の電子顕微鏡観察では、mt 核様体領域が明確でない。そのため、酵母の様々な培養条件におけるミトコンドリアおよびミトコンドリア核様体の形態を把握するには、蛍光顕微鏡を用いた観察が有効である。

ミトコンドリアおよび mt 核様体は、酵母の生理的条件や生活環のステージにおいて、ダイナミックに形態を変化させることが分かっている。本研究では、*rho*⁺株と様々な mtDNA 配列を保持する呼吸欠損 *rho*⁻株を用いることによって、呼吸活性および保持する特定の mtDNA 配列の違いによって、ミトコンドリアおよび mt 核様体がどのように変化するかを明らかにすることを目的として解析を行った。

第一章では、呼吸活性または保持する mtDNA 配列の違いによって、ミトコンドリア形態と mt 核様体形態がどのように変化するかを明らかにするために、蛍光顕微鏡を用いて 2 株の *rho*⁺株と、異なる mtDNA 配列を保持する 6 株の *rho*⁻株の観察を詳細に行った。第二章では、*rho*⁺株と *rho*⁻株の mt 核様体を構成するタンパク質の違いを明らかにするために、2 つの株から mt 核様体を単離し、mt 核様体タンパク質の分析を詳細に行った。

第一章

酵母呼吸欠損株が保持する mtDNA 配列の単位の長さ
とミトコンドリア核様体形態の
関係

要旨

DAPI 染色及びミトコンドリア移行 GFP を用いて、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の呼吸正常株(rho^+ 株)と呼吸欠損株(rho^- 株)でミトコンドリア核様体(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、hypersuppressive rho^- 株(HS40 rho^- 株)では mt 核様体は粒子状の形態が観察された。粒子状の mt 核様体形態が他の rho^- 株でも同様に観察されるかを調べるために、異なる 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 核様体が観察された。対照的に、1 kbp 以下の短い mtDNA 配列を保持する 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。この結果は、 rho^- 株の mt 核様体形態は mtDNA 配列の単位の長さに依存して変化することが明らかになった。また、HS40 rho^- 株の単離 mt 核様体の分析は、粒子状の mt 核様体が Abf2p および他の mt 核様体タンパク質と結合したコンカタマー線状 mtDNA とオリゴマー環状 mtDNA からなることを示唆された。

序論

ミトコンドリアは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。真正粘菌 *Physarum polycephalum* の研究は、mtDNA が特定のタンパク質群と結合し、ミトコンドリア核様体(mt 核様体)と呼ばれるタンパク質-DNA 複合体内にコンパクトに折りたたまれていることを初めて示した(Kuroiwa 1982)。哺乳類において、mt 核様体の構造が病気を引き起こすミトコンドリアの異常と密接に関係することも明らかにされている(Gilkerson 2009; Bogenhagen 2012)。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、生活環において mt 核様体形態がダイナミックに変化することが DAPI 染色により明らかになっている(Miyakawa et al. 1984)。以前の研究で、*S. cerevisiae* のスフェロプラストから、*in vivo* での構造を維持したまま mt 核様体の単離が可能であり、クロマチン様の構造内には 3~4 コピーの mtDNA が DNA 結合タンパク質により折りたたまれていることが示されている(Miyakawa et al. 1987, 1995, 2010)。加えて、以前の研究で嫌気条件下では *rho*⁺ 株の 1 つの mt 核様体内に 20 コピー程度の mtDNA が存在するが、同じ培地を用いた好気条件下の培養では 1 つの mt 核様体内に 1~2 コピーの mtDNA しか存在しないことも明らかにされている(Miyakawa et al. 2004)。これらの結果は、細胞中の mt 核様体のサイズや数は mtDNA のコピー数と同様に一定ではなく、生活環のステージや培養条件により大きく変化することを示している。

S. cerevisiae の mtDNA は内膜タンパク質、リボソームタンパク質、rRNA、tRNA をコードしており、細胞中には 100 以上の mtDNA コピーが存在している。*S. cerevisiae* をエチジウムブロミド(EtBr)で処理すると、大部分の mtDNA 領域を失い、呼吸欠損株(*rho*⁻株)を容易に誘導できる(Slonimski et al. 1968)。それぞれの *rho*⁻ 株はサイズおよび配列の異なる mtDNA 断片を保持している。*rho*⁻ 株の全 mtDNA 量は *rho*⁺ 株とほぼ同じ量なので、各株の mtDNA は同じ配列が繰り返した形で増幅されていると考えられている(Dujon 1981)。一部の *rho*⁻ 株は hypersuppressive と呼ばれる特徴を持つ。hypersuppressive *rho*⁻ 株と *rho*⁺ 株を接合させると、子孫の接合子はすべて *rho*⁻ 株になる(Dujon 1981)。hypersuppressive *rho*⁻ 株の mtDNA は短い繰り返し配列内に複製起点(*ori/rep*)が存在するという特徴を持つ。同じ接合子内に *rho*⁻ mtDNA と *rho*⁺ mtDNA が混在した時に、hypersuppressive *rho*⁻ 株の mtDNA が優先的に複製または伝達される(MacAlpine et al. 2001)。近年、hypersuppressive の mtDNA の複製及び伝達のメカニズムについての仮説が提唱されている(Ling et al. 2007, 2013)。

主要な mtDNA 結合タンパク質である Abf2p の欠損株は、グルコースを含む培地で培養すると mtDNA を消失する(Diffley and Stillman 1991)。しかし、Abf2p を欠損した *rho*⁻ 株の場合は同じ条件下でも mtDNA を安定して維持することができる(Zelenaya-Troitskaya et al. 1998)。さらに、*rho*⁻ mtDNA は *rho*⁺ mtDNA よりも

EtBr 処理に対して安定的に維持される(Nagley and Mattick 1977)。これらの結果は mt 核様体の構造が ρ^+ 株と ρ^- 株で異なる可能性を示唆している。実際、以前の研究で ρ^+ 株の mt 核様体に検出される 52 kDa と 67 kDa タンパク質の量が、 ρ^- 株の mt 核様体では著しく減少していることが示されている(Shiiba et al. 1997)。

これまでの多くの研究は ρ^+ 株の mt 核様体構造に注目して行われてきた(Chen and Butow 2005; Chen et al. 2005)。対照的に、 ρ^- 株の mt 核様体構造についてはほとんど研究が行われていない。 ρ^- 株間で異なる mtDNA 配列を保持しているため、mt 核様体構造が ρ^- 株間で異なる可能性が考えられる。加えて、mt 核様体及びミトコンドリアの形態は ρ^+ 株と ρ^- 株で詳細に比較されたことがない。本研究ではこれらの基本的な問題を明らかにするために、数種類の ρ^- 株のミトコンドリア形態および mt 核様体形態の特徴を調べ、 ρ^+ 株との比較を行った。

材料と方法

使用菌株と培養方法

本研究で使用した菌株を Table. 1 に示す。 α 14WW HS40 (HS40 ρ^-)株は *ori5* 配列を含む 760 bp の繰り返しからなる mtDNA を保持している。IL8-8C E1 株はミトコンドリアの 21S rRNA 中の 728 bp の繰り返しからなる mtDNA 配列を保持する。MH41-7B/AB83 (CEP2 ρ^-)株, MH41-7B/M726 (CEO2 ρ^-)株, MH41-7B/L712 (O_iP2 ρ^-)株は 30 kbp 以上の mtDNA 配列を保持している。酵母は YPD 斜面培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar)を用いて前培養を行い、OD660 が 0.01 になるように YPD 液体培地(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)に植菌し、30°Cで振とう培養した。

プラスミド作製

pVT100U-mtGFP (Westermann and Neupert 2000)の *URA3* 遺伝子座に *HIS1* 遺伝子を挿入し、pVT100U-mtGFP (*HIS1*)を作製した。pVT100U-mtGFP をフォワードプライマー5'-ATCCTGACTGATTTTCCATGG-3'とリバースプライマー5'-ATCCACATGGTTTTTAGTAAAC-3'を用いた PCR により線状化した。*HIS1* 遺伝子は核 DNA を鋳型とした PCR により増幅した。この PCR にはフォワードプライマー5'-AAAACACATGTGGATATCTGCCTTCGGTGTTCATTGG-3'とリバースプライマー5'-AAAATCAGTCAAGAATATCCACAATAGGCATAGTTGTTCG-3'を用いた。In-Fusion HD Cloning KT (Clontech, CA, USA)を用いて、増幅した *HIS1* 遺伝子を線状化した pVT100U-mtGFP に組み込み、pVT100U-mtGFP (*HIS1*)を作製した。 α 14WW 株および HS40 ρ^- 株には pVT100U-mtGFP を形質転換した。MH41-7B 株と MH41-7B 株由来の ρ^- 株および IL8-8C E1 株には pVT100U-mtGFP (*HIS1*)を形質転換した。

形質転換は one-step 法により行った(Akada et al. 2000)。

蛍光顕微鏡観察

細胞を 5% glutaraldehyde または 3.6% formaldehyde で室温、60min 固定し、NS buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.6), 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.8 mM PMSF, 0.05% β-mercaptoethanol; Miyakawa et al.1987)で 2 回洗浄した。細胞を NS buffer で懸濁し、スライドガラス上で DAPI 染色液(2 μg/ml DAPI 入り NS buffer)と混合した。mt 核様体の観察には UV 励起光を用い、ミトコンドリアの観察に B 励起光を用いて、細胞を観察した。

Fig.5 と Fig.8 の観察では、固定した細胞を Zymolyase 20T (Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan)によりスフェロプラスト化を行った。スフェロプラストをポリリジンコートしたカバーガラスに滴下した後、-20°Cのメタノールに 6 min、-20°Cのアセトンに 30 sec 浸した。この方法により細胞が平たんになり、通常の観察方法よりも多くの mt 核様体を観察することが可能になった。

mtDNA の細胞質への導入

同一遺伝的背景での mt 核様体形態を調べるために、核の融合が行えない *kar1-1* 変異株(Rose and Fink 1987)を用いた細胞質導入により、HS40 mtDNA を MH41-7B 株に移行させた。HS40 *rho*⁻株(*MAT* α, *ade2*, *trp1*, *ura3-52*, *leu2*, *cit1::LEU2*)と MS7573 株(*MAT* α, *kar1-1*, *lue2-3,112*, *ura3-52*, *his3-d200*, *ade2-101*)由来の *rho*⁰細胞を YPD プレート上で接合させ、一晚培養した。細胞を SD+Leu+Ura+His+Ade プレート(0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 2% agar, 20 μg mL⁻¹ leucine, 20 μg mL⁻¹ uracil, 20 μg mL⁻¹ histidine, 20 μg mL⁻¹ adenine)に撒いた。a 型の接合型を示し、mt 核様体を保持している株のみを選択し、*kar1-1* HS40 (*MAT*a)株と名付けた。

MS7573 株に YEp*HO* プラスミドを形質転換し、二倍体を作製した(Jensen et al. 1983)。*kar1-1* (*MAT* α)株を四分分子分析により選別した。*kar1-1* HS40 (*MAT* a)株と *kar1-1* (*MAT* α)株由来の *rho*⁰細胞を YPD プレート上で接合させ、一晚培養した。細胞を SD+Leu+Ura+His+Ade プレートに撒き、α型の接合型を示し、mt 核様体を保持している株を選別した。この操作で得られた株を *kar1-1* HS40 (*MAT* α)株と名付けた。*kar1-1* HS40 (*MAT* α)株と MH41-7B *rho*⁰株を接合させ、一晚培養した。細胞を SD+Ade+His プレート(0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 2% agar, 20 μg mL⁻¹ adenine, 20 μg mL⁻¹ histidine)に撒いた。a 型の接合型と mt 核様体の保持により株を選択した。得られた株を MH41-7B/HS40 株と名付けた。

Hoechst33258-CsCl 密度勾配遠心を用いた mtDNA 精製

各株からの DNA 精製は Hudspeth et al. (1980)の方法にもとづいた Hoechst33258-CsCl 密度勾配遠心法で行った。核 DNA と mtDNA のバンドを分けて回収し、各分画の蛍光強度を励起波長 350 nm, 蛍光波長 450 nm で蛍光分光光度計(Hitachi F-2500, Japan)を用いて測定した。

mtDNA の PCR

各株の保持する mtDNA 領域を調べるために PCR を行った。鋳型としては CsCl 密度勾配遠心により得た mtDNA を用いた。21S rRNA の検出には 5'-GGTGTGAACTCT-GCTCCATG-3' と 5'-GCTTCGCTGCTTATTGTCC-3' の 2 つのプライマーを用いた。15S rRNA の検出には 5'-GGACATGACACATGCGAATC-3' と 5'-CATGCTCCACTGCTTA-AGTCTG-3' の 2 つのプライマーを用いた。COB (シトクロム b 遺伝子)の検出には 5'-CTTCAGAGACTACACGCACAC-3' と 5'-GCGATTTGTCCATTAAGAC-3' の 2 つのプライマーを用いた。

mt 核様体単離

mt 核様体単離の方法は Miyakawa et al. (1987)の方法にもとづき、*rho*⁺および *rho*⁻株の定常期細胞のスフェロプラストから単離した。約 10g の細胞を Zymolyase 20T を添加した SP buffer (0.8 M sorbitol, 50 mM K-phosphate, pH7.5)中でスフェロプラスト化した。ホモジネートしたスフェロプラストを NE1 buffer (0.3 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH7.6), 1 mM EDTA, 0.4 mM spermidine, 7 mM β-mercaptoethanol, 0.4 mM PMSF)に懸濁し、分画遠心によりミトコンドリアを沈殿させた。ミトコンドリア沈殿を NE2 buffer (0.5 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH7.6), 2 mM EDTA, 0.8 mM spermidine, 7 mM β-mercaptoethanol, 0.4 mM PMSF)に懸濁し、等量の DL buffer (0.25 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH7.6), 7 mM β-mercaptoethanol, 0.4 mM PMSF)で希釈した。最終濃度 0.5%になるように Nonidet P-40 を加え、ミトコンドリア膜を溶解し、不溶解物を除去するために 16,000×g, 5min 遠心した。mt 核様体を含む上清を 20%, 40%, 60%スクロース不連続密度勾配に重層し、46,000×g, 1h で遠心にかけた。20%と 40%スクロースの境界から回収した mt 核様体を 100,000×g, 1h の遠心にかき、沈殿させた。mt 核様体タンパク質は SDS-PAGE で分離し、銀染色により検出した。

連続密度勾配遠心により mt 核様体を分離するために、mt 核様体を含む上清を 20~60%連続密度勾配に重層し、71,000×g, 1h 遠心にかけた。遠心チューブから 1mL ずつに分画し、DAPI 染色及び DNA の分析に用いた。DNA の分析では、各分画を 1h、プロテイナーゼ K で処理し、フェノール：クロロホルム(1:1)による抽出とエタノール沈殿により DNA を精製した。

結果

α 14WW *rho*⁺株と α 14WW HS40 株間の mt 核様体形態の違い

α 14WW *rho*⁺株と α 14WW HS40 株(HS40 *rho*⁻株)のミトコンドリアおよび mt 核様体がどのように娘細胞へと伝達されるかを調べるために、DAPI 染色とミトコンドリア移行 GFP を用いて、対数期細胞の mt 核様体形態およびミトコンドリア形態を観察した(Fig.1)。 α 14WW *rho*⁺株では紐状のミトコンドリア内に数珠状の mt 核様体が観察された(Fig.1)。対照的に、HS40 *rho*⁻株では大きく明るく見える粒子状の mt 核様体が観察された。HS40 *rho*⁻株の粒子状の mt 核様体は娘細胞へと確実に伝達され、mtDNA を持たない *rho*⁰細胞は観察されなかった。 α 14WW *rho*⁺株と HS40 *rho*⁻株のミトコンドリアは両株とも紐状の形態をしていた。Fig.1 に示すように、HS40 *rho*⁻株の mt 核様体は紐状のミトコンドリアの一部分に局在していた。これらの結果は α 14WW *rho*⁺株と HS40 *rho*⁻株のミトコンドリアは同様の形態を示すが、mt 核様体の形態は異なることを示している。

呼吸欠損株の mt 核様体形態は mtDNA 配列の単位の長さに依存する

mtDNA 配列の欠失がどのように mt 核様体形態に影響を与えるか調べるために、異なる mtDNA 領域を保持する *rho*⁻株の mt 核様体を観察した。各株が保持する mtDNA の領域を Fig. 2a に示す。各株の mtDNA 領域は PCR を用いて確かめた(Fig. 2b)。 α 14WW *rho*⁺株および MH41-7B 株は COB, 21S rRNA, 15S rRNA 遺伝子が検出された。CEP2 *rho*⁻株は COB 遺伝子が検出されず、CEO2 *rho*⁻株は 15S rRNA 遺伝子が検出されなかった。また、O_iP2 *rho*⁻株は 21S rRNA 遺伝子が検出されなかった。HS40 *rho*⁻株および E1 *rho*⁻株は短い mtDNA のみを保持しているため、3 つの遺伝子すべてが検出されなかった。次に、mtDNA を制限酵素 *Hha* I で処理した。*Hha* I 処理した mtDNA は MH41-7B, CEP2 *rho*⁻, CEO2 *rho*⁻, O_iP2 *rho*⁻株で異なるバンドパターンを示した。また、*Eco*RV 処理した HS40 *rho*⁻株の mtDNA は 760 bp の DNA のみが検出された。*Mbo* I 処理した E1 *rho*⁻株の mtDNA は 700 bp の DNA のみが検出された(Fig. 2c)。

本研究では、CEP2 *rho*⁻, CEO2 *rho*⁻, O_iP2 *rho*⁻株の 3 株を長い mtDNA 配列の単位を保持する *rho*⁻株と定義した。また、HS40 *rho*⁻, MH41-7B/HS40, E1 *rho*⁻株では 1 kbp 以下の短い mtDNA 配列の単位が繰り返しているため、この 3 株を短い mtDNA 配列の単位を保持する *rho*⁻株と定義した。

次に、対数期の各株の mt 核様体を観察した。Fig. 3a は各株の対数期細胞の典型的な mt 核様体形態を示す。mt 核様体の形態を 3 つのタイプ(数珠状、数珠状と粒子状の混在型、粒子状)に分類し、それぞれのタイプの mt 核様体を保持する細胞の割合を測定した(Fig. 3b)。 α 14WW *rho*⁺株および MH41-7B 株は数珠状の mt 核様体が多く観察

された。数珠状の mt 核様体形態の割合は α 14WW rho^+ 株で 57%, MH41-7B 株で 56% となった。対照的に、HS40 rho^- 株, MH41-7B/HS40 株, E1 rho^- 株は粒子状の mt 核様体形態が多く観察された。粒子状の mt 核様体形態の割合は HS40 rho^- 株で 85%, MH41-7B/HS40 株で 80%, E1 rho^- 株で 82% となった。この 3 株での数珠状の mt 核様体形態の割合は HS40 rho^- 株で 3%, MH41-7B/HS40 株で 10%, E1 rho^- 株で 5% となった。対照的に、長い mtDNA 配列の単位を保持している rho^- である CEP2 rho^- , CEO2 rho^- , O₁P2 rho^- 株は数珠状と粒子状の mt 核様体形態の 2 つが多く観察された。3 株の数珠状の mt 核様体形態が観察される割合は約 46% であり、粒子状形態を持つ細胞の割合(約 36%)よりも高かった。3 株の数珠状の mt 核様体形態を Fig. 3a に示している。3 株の mt 核様体は MH41-7B 株とよく似た形態をしており、加えて 3 株間の mt 核様体形態の違いも見られなかった。このことは欠失した mtDNA 領域が mt 核様体形態に影響を与えないことを示している。 α 14WW HS40 rho^- 株と MH41-7B/HS40 株の核の遺伝的背景は異なる。しかし、両株の mt 核様体は同様な粒子状の形態をしていた。このことは、核の遺伝的背景の違いが HS40 rho^- 株でみられる粒子状の mt 核様体形態に影響を与えないことを示している。*ori* 配列を mtDNA 内に持たず、hypersuppressive の性質も持たない E1 rho^- 株でも粒子状の mt 核様体が観察された。これらの結果は、対数期の rho^- 細胞の mt 核様体形態は mtDNA の欠失した領域に依存するのではなく、mtDNA 配列の単位の長さ依存して変化することを示している。

対数期細胞のミトコンドリアは紐状の形態が多く観察される

mt 核様体形態の変化に伴い、ミトコンドリア形態も変化するかどうかを調べるために、ミトコンドリア移行 GFP を用いて 8 株すべてのミトコンドリアを観察した (Fig. 1 and Fig. 4a)。 α 14WW rho^+ 株と MH41-7B 株では、母細胞から娘細胞へとつながる紐状のミトコンドリアが観察された。ミトコンドリア形態を 3 つのタイプ(紐状、断片化、粒子状)に分類した (Fig. 4b)。 α 14WW rho^+ 株と MH41-7B 株の紐状のミトコンドリアの割合はそれぞれ 86% と 85% であった。一方で、6 株の rho^- 細胞のミトコンドリアは少し複雑な形態をしていた。しかし、mtDNA 配列の単位の長さに関係なく、6 株の rho^- 細胞でもミトコンドリア形態は 60% が紐状をしていた。6 株の rho^- 細胞で粒子状のミトコンドリア形態は 20% 以下だった。これらの結果から、呼吸能を持つかどうかに関係なく、調べた株すべてで対数期のミトコンドリアが主に紐状の形態をしていることを明らかにした。

mtDNA 配列の単位の長さは mt 核様体数とサイズに影響する

2 つの rho^+ 株と 3 つの rho^- 株の対数期細胞では mt 核様体は数珠状の形態で観察されたため、mt 核様体数を正確に測定することができない。この問題を解決するために、

Zymolyase 処理により対数期の細胞をスフェロプラスト化した。formaldehyde 固定したスフェロプラストは容易に平らにすることができ、1 焦点面での 1 つひとつの mt 核様体の観察がより容易になる(Fig. 5a)。細胞あたりの mt 核様体数の平均数は α 14WW rho^+ 株で 20.1 個、HS40 rho^- 株で 10.6 個となった(Fig. 5b)。一方で、mt 核様体数の平均数は MH41-7B rho^+ 株で 24.2 個、CEP2 rho^- 株で 18.0 個、CEO2 rho^- 株で 17.4 個、O_iP2 rho^- 株で 16.9 個、MH41-7B/HS40 株で 10.9 個、E1 rho^- 株で 9.3 個となった。これらの結果は短い mtDNA 配列を保持している rho^- 株である HS40 rho^- 株、MH41-7B/HS40 株、E1 rho^- 株の mt 核様体数が、 rho^+ 株や長い mtDNA 配列を保持する rho^- 株の mt 核様体数に比べて減少していることを示している。

Hoechst-CsCl 密度勾配遠心法を用いて mtDNA と核 DNA の分離を行った(Fig. 6)。各分画の DNA の蛍光強度の測定は、核 DNA 量に対する mtDNA 量が α 14WW rho^+ 株と HS40 rho^- 株で約 13% になることを示した。一方で、MH41-7B rho^+ 株、CEP2 rho^- 株、CEO2 rho^- 株、O_iP2 rho^- 株、MH41-7B/HS40 株の核 DNA 量に対する mtDNA 量は 15%~30% であった。MH41-7B 株の mtDNA 量は核 DNA 量の 24% であり、MH41-7B/HS40 株の mtDNA 量は核 DNA 量の 17% だった。これらの結果は、mtDNA 量の違いが mt 核様体形態の変化の直接的な原因ではないことを示している。E1 rho^- 株は Hoechst-CsCl 密度勾配遠心では、mtDNA と核 DNA を十分に分離することはできなかった。

次に、定常期細胞の mt 核様体を観察した(Fig. 7a)。定常期において、すべての株で粒子状の mt 核様体が観察された。次に、1 細胞中の mt 核様体数を数えた。その結果、mt 核様体数の平均数は α 14WW rho^+ 株で 41.8 個、HS40 rho^- 株で 25.8 個となった(Fig. 7b)。また、mt 核様体数の平均数は MH41-7B 株で 39.3 個、CEP2 rho^- 株で 33.4 個、CEO2 rho^- 株で 35.3 個、O_iP2 rho^- 株で 34.6 個、MH41-7B/HS40 株で 16.2 個となった。E1 rho^- 株の mt 核様体平均数は 15.6 個だった。これらの結果は、mtDNA 配列の単位の長さが定常期の mt 核様体数にも影響を与えることを示している。

次に、MH41-7B 株、CEP2 rho^- 株、MH41-7B/HS40 株の対数期と定常期の mt 核様体サイズを測定した(Fig. 8)。直径 0.2-0.25 μ m の mt 核様体に対数期と定常期の両方で 3 株ともに多く存在した。直径 0.3 μ m 以上の mt 核様体数の割合が MH41-7B 株、CEP2 rho^- 株よりも MH41-7B/HS40 株で高い。この結果は短い mtDNA 配列を保持する rho^- 株が rho^+ 株や長い mtDNA 配列を保持する rho^- 株よりも大きいサイズの mt 核様体を保持することを示している。

mt 核様体タンパク質の比較

mt 核様体タンパク質の組成が rho^+ 株と rho^- 株間で異なるかどうか、および異なる mtDNA 配列を保持する rho^- 株間で mt 核様体タンパク質が変わるかどうか調べるために、20%、40%、60% の不連続スクロース密度勾配を用いて、7 株から mt 核様体を単

離した。7株すべてでから同様のサイズと蛍光強度を持つ mt 核様体が 20%と 40%の境界から回収された(Fig. 9a)。SDS-PAGE では複数のタンパク質が mt 核様体分画で検出された(Fig. 9b)。20 kDa の主要な mtDNA 結合タンパク質である Abf2p は抗 Abf2p 抗体を用いたウェスタンブロットで、すべての核様体分画で検出された(Fig. 9c)。E1 *rho*⁻株以外の mt 核様体タンパク質組成には違いが見られず、*rho*⁺株と *rho*⁻株間でも違いは見られなかった。30 kDa タンパク質が E1 *rho*⁻株で濃く検出されたが、この 30 kDa タンパク質は核タンパク質または膜タンパク質の混入している可能性がある。そのため、SDS-PAGE による比較では、調べた株間での mt 核様体のタンパク質組成のバンドに明確な違いは検出されなかった。

mt 核様体内に存在する mtDNA の分析

より詳しく mt 核様体を調べるために、20~60%連続スクロース密度勾配を用いた mt 核様体単離を α 14WW *rho*⁺株、HS40 *rho*⁻株、CEP2 *rho*⁻株で行った。各分画の DNA と mt 核様体の分布を Fig. 10 に示す。 α 14WW *rho*⁺株の mt 核様体では分画 1-6 に粒子状の蛍光が多く見られ、同様の分画に 20 kbp 以上のスメアなバンドが検出された(Fig. 10a)。分画 4 の蛍光像を Fig. 10a に示す。BamH I 処理後 2 つのバンドが分画 1-6 に検出されるが、分画 7-10 には検出されなかった。分画 8 の蛍光像を Fig. 10a に示す。上清である分画 7-10 ではほとんど粒子状の蛍光は観察されなかった。Fig. 10a の 4.6 kbp のバンドは RNase A 処理後消えたことから、4.6 kbp のバンドは二本鎖 RNA からなると考えられる(Data not shown)。

一方で、HS40 *rho*⁻株では分画 3-6 に 20 kbp 以上のスメアなバンドが検出され、上清である分画 7-10 にはラダー状の DNA が検出された(Fig. 10b)。各分画から抽出した DNA を *EcoRV* で処理した。HS40 mtDNA 配列中に *EcoRV* 切断サイトは一カ所しかないため、*EcoRV* 処理により HS40 mtDNA は 760 bp 断片になる。*EcoRV* 処理の結果は遠心後の上清に多くの HS40 mtDNA が残っていることを示している。以前に MacAlpine et al. (2000)は、ラダー状のバンドは 760 bp の単位配列が数回繰り返している環状のオリゴマーmtDNA であり、スメアなバンドは単位配列が十数回以上繰り返している線状のコンカテマーmtDNA であると報告している。分画 4 と 8 の蛍光像を Fig. 10b に示す。各分画の DAPI 染色では粒子状の蛍光は分画 3~6 で多く観察されたが、分画 7~10 では明瞭な粒子状の蛍光は観察されなかった。この結果は、上清の分画には蛍光顕微鏡ではほとんど観察できない小さいサイズの mt 核様体が含まれていることを示している。各分画の RNase A 処理後もオリゴマーmtDNA およびコンカテマー mtDNA は明らかに検出される(Fig. 11)。

CEP2 *rho*⁻株の mt 核様体分画も、分画 1-4 に 20 kbp のスメアなバンドが検出されるが、分画 7-10 には DNA のバンドは検出されなかった(Fig. 10c)。分画 6-10 に検出される 4.6 kbp と 2 kbp のバンドは RNase A 処理後分解されるので、二本鎖 RNA から

なると考えられる(Data not shown)。

考察

本研究では、*rho*⁻株のミトコンドリアと mt 核様体の形態と、保持している mtDNA 配列との関係を初めて調べた。mt 核様体とミトコンドリアの形態の模式図を Fig. 11 に示す。

rho⁺細胞の主な mt 核様体形態は対数期では数珠状である。対照的に、HS40 *rho*⁻株では粒子状の mt 核様体が 85%以上の割合で観察された(Fig. 1 and 3)。まず、呼吸能の違いが mt 核様体形態の変化の原因であると仮定した。しかし、長い mtDNA 配列の単位を保持する 3 株の *rho*⁻細胞においても数珠状の mt 核様体形態が約 40%の細胞で観察された。一方、粒子状の mt 核様体形態を持つ細胞の割合は 40%以下であった(Fig. 3)。対照的に、短い mtDNA 配列を持つ E1 *rho*⁻株の mt 核様体で、粒子状の mt 核様体形態が 82%の細胞で観察された。数珠状の形態を持つ細胞の割合は 10%以下であった。これらの結果は *rho*⁻細胞の mt 核様体形態が、呼吸能の有無よりも mtDNA 配列の単位の長さによる影響を受けることを示している。一方で、主なミトコンドリア形態は *rho*⁺株、*rho*⁻株に関わらず、調べた対数期細胞すべてで紐状の形態であった(Fig. 4)。このことは呼吸能の有無と mtDNA 配列の単位の長さに関係なく、対数期細胞の紐状のミトコンドリア形態は維持されることを意味している。核 DNA に対する mtDNA レベルは α 14WW *rho*⁺株と HS40 *rho*⁻株で約 13%とほぼ等しかった(Fig. 6)。MH41-7B 株と MH41-7B/HS40 株の mtDNA レベルも大きな差はなかった。これらの結果は細胞内の mtDNA 量が mt 核様体形態に与える影響は少ないことを示している。

rho⁻株間の mt 核様体形態が異なる理由として 3 つの可能性が考えられる。まず、mt 核様体タンパク質の違いが mt 核様体形態に影響を与える可能性である。以前の研究で、Shiiba et al. (1997)は *rho*⁺株と *rho*⁻株から mt 核様体を単離し、SDS-PAGE で mt 核様体タンパク質を比較している。それらの研究では、52 kDa と 67 kDa の DNA 結合タンパク質が *rho*⁻株の mt 核様体で著しく減少していることを報告している(Shiiba et al. 1997)。この 2 種類のタンパク質は嫌気条件下で培養した *rho*⁺株の凝集した mt 核様体でも著しく減少していた。嫌気条件下から好気条件下へ移した時に、凝集した形態から小さい粒子状へと mt 核様体形態が変化するにつれて、2 種類のタンパク質も mt 核様体分画で増加した(Shiiba et al. 2005)。これらの結果は、少なくとも 2 種類の mt 核様体タンパク質が mt 核様体の形態変化に関与する可能性を示している。

Newman et al. (1996)は、野生株と $\Delta abf2$ 株から単離したミトコンドリアを用いたオルガネラ内での DNase I 処理を行った。そして、 $\Delta abf2$ 株のミトコンドリアリボソーム小サブユニットタンパク質をコードする *VARI* と、シトクロム C オキシダーゼサブユニット 2 をコードする *COXII* の mtDNA 配列が、野生株よりも DNase I 感受性が

高いことを示した。この結果は、 $\Delta abf2$ 株の mtDNA が保護されておらず、DNase I 感受性が増加しているという考えと一致している。同時に、Newman et al. (1996)は *ori5* 配列の DNase I 感受性は Abf2p の有無により変化しないことを明らかにした。この結果は、他の mtDNA 領域とは異なり、*ori5* 配列に Abf2p 以外のタンパク質が特異的に結合していることを示唆している。しかし、本研究の SDS-PAGE の結果では、HS40 *rho*⁻株から単離した mt 核様体と *rho*⁺株から単離した mt 核様体ではタンパク質の組成は大きな変化がみられなかった(Fig. 9b)。ウェスタンブロットで示したように、Abf2p は HS40 *rho*⁻株でも *rho*⁺株と同様に mtDNA に結合していた(Fig. 9c)。

Abf2p 以外の多くの mt 核様体タンパク質が mt 核様体分画から同定されている(Miyakawa et al. 1995; Kaufman et al. 2000)。同定されたタンパク質の中で、アセトヒドロキシ酸リダクトイソメラーゼ(Ilv5p)は mt 核様体数の制御に関係する構造成分として機能している(MacAlpine et al. 2000)。Abf2p, Hsp60p, Ilv5p のような個々の mt 核様体タンパク質の量は代謝の状態に応答し変化する(Kucej et al. 2008)。これらの結果はともに *rho*⁺株と *rho*⁻株の mt 核様体形態が mt 核様体タンパク質組成と相関することを示唆している。

本研究でも、mt 核様体分画に多数のタンパク質が検出された(Fig. 9)。しかし、SDS-PAGE の比較で、E1 *rho*⁻株を除いて、*rho*⁺株と *rho*⁻株を含む 6 株で明確な mt 核様体タンパク質の違いは見られなかった。質量分析を用いた詳細な分析が、*rho*⁺株と *rho*⁻株間および *rho*⁻株間の mt 核様体タンパク質組成の違いを明らかにするために必要であると考えられる。

第 2 の可能性として、mtDNA の組換えレベルが mt 核様体形態に影響を与えるかもしれない。mtDNA の相同組換えの頻度は、mtDNA 上の同じ配列の繰り返しの数に依存している。したがって、相同組換えは HS40 *rho*⁻ mtDNA や E1 *rho*⁻ mtDNA のような短い mtDNA 配列が繰り返している mtDNA の方が、長い mtDNA 配列を保持している mtDNA よりも生じやすい。*S. cerevisiae* では、Cce1p/Mgt1p は mtDNA の相同組換え結合を切断する十字型 DNA 切断エンドヌクレアーゼとして機能している(Lockshon et al. 1995)。実際、Cce1p 欠損株では、mt 核様体の凝集形態は *rho*⁺株よりも hypersuppressive *rho*⁻株で多く見られる(Lockshon et al. 1995)。この結果は、野生株の mtDNA よりも hypersuppressive の mtDNA の方が相同組換えの頻度が高いことを示唆している。Abf2p 欠損株で、mtDNA 組換え中間体は *rho*⁺細胞では検出されないが、2 kbp の *VARI* 配列が繰り返している mtDNA を保持している *rho*⁻細胞では検出される(MacAlpine et al. 1998)。この結果も、短い DNA 配列が繰り返している mtDNA の方が野生株よりも組換え頻度が高いという考えを支持している。

hypersuppressive *rho*⁻ mtDNA の複製は相同組換えによって行われ、コンカテマー線状 mtDNA とオリゴマー環状 mtDNA の両方を生じるモデルが提案されている(Ling et al. 2013)。それゆえ、mtDNA 複製の結果として、いくつかの長いコンカテマー-HS40

mtDNA と多量のオリゴマーmtDNA が、1 つの凝集した mt 核様体内に共に存在している可能性がある(Fig. 12c)。遠心後、多くのオリゴマーmtDNA は上清に残っている中で、オリゴマーmtDNA と mt 核様体タンパク質から成る小さい mt 核様体は、Nonidet P-40 によるミトコンドリア膜の溶解により、凝集した mt 核様体から容易に遊離するのかもしれない。対照的に、*rho*⁺株と長い mtDNA 配列を保持する *rho*⁻株は、mtDNA の組換えの頻度が少ないために、小さい環状の mtDNA を作ることなく、紐状のミトコンドリア内で数珠状に規則的に並ぶのかもしれない(Fig. 12a and b)。

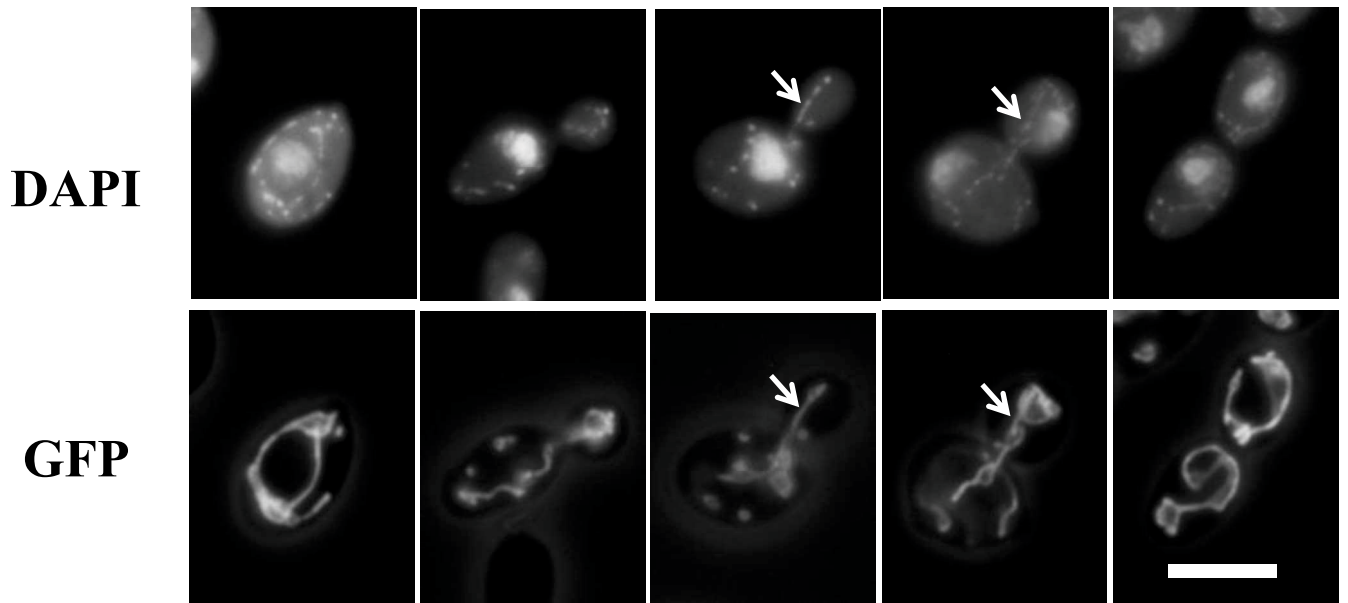
第 3 の可能性として、ミトコンドリア内の構造の違いが mt 核様体の分布に影響を与えるのかもしれない。電子顕微鏡観察から、ミトコンドリアゲノムにコードされている内膜タンパク質のサブユニットの消失に伴い、*rho*⁻株のミトコンドリアが通常のクリステを消失していることが明らかになっている(Stevens 1981)。mt 核様体はミトコンドリア内膜と結合していると仮定されているので、クリステの構造変化は mt 核様体の形態と分布に影響を与えると考えられる(Miyakawa et al. 1987; Prachar 2010)。*rho*⁺株と長い mtDNA 配列の単位を保持する *rho*⁻株間の mt 核様体形態は少し異なる。これらの違いは *rho*⁻株と *rho*⁻株のミトコンドリア内部の構造の違いにより生じるのかもしれない。さらなる研究により、mtDNA 組換え、複製、mt 核様体形態の関係を明らかにできると考えられる。

Table.1 本研究で使用した*Saccharomyces cerevisiae*株

Strain Name	short name	Nuclear genotype	Mitochondrial genotype	Reference
α 14WW rho^+	α 14WW	<i>MATa ade2 trp1 ura3-52 leu2 cit1::LEU2</i>	rho^+	Zelenaya-Troitskaya et al. (1998)
α 14WW HS40	HS40 rho^-	<i>MATa ade2 trp1 ura3-52 leu2 cit1::LEU2</i>	rho^- HS40	Zelenaya-Troitskaya et al. (1998)
MH41-7B/011	MH41-7B	<i>MATa ade2 his1</i>	rho^+ (C^R, E^R, O^R, P^R)	Lewin et al. (1978)
MH41-7B/AB83	CEP2 rho^-	<i>MATa ade2 his1</i>	rho^- (C^R, E^R, O^0, P^R)	Lewin et al. (1978)
MH41-7B/M726	CEO2 rho^-	<i>MATa ade2 his1</i>	rho^- (C^R, E^R, O^R, P^0)	Lewin et al. (1978)
MH41-7B/L721	O _i P2 rho^-	<i>MATa ade2 his1</i>	rho^- (C^0, E^0, O^R, P^R)	Lewin et al. (1978)
MH41-7B/HS40	—	<i>MATa ade2 his1</i>	rho^- HS40	This study
IL8-8C E1	E1 rho^-	<i>MATa trp1 his1</i>	rho^- E1	Sor and Fukuhara (1982)
MS7573	—	<i>MATa kar1-1 leu2-3, 112 ura3-52 his3-d200 ade2-101</i>	rho^+	Rose and Fink (1987)

Mitochondrial genotype; C^R : chloramphenicol resistance, E^R : erythromycin resistance, O^R : oligomycin resistance, P^R : paromycin resistance

(a) α 14WW *rho*⁺



(b) HS40 *rho*⁻

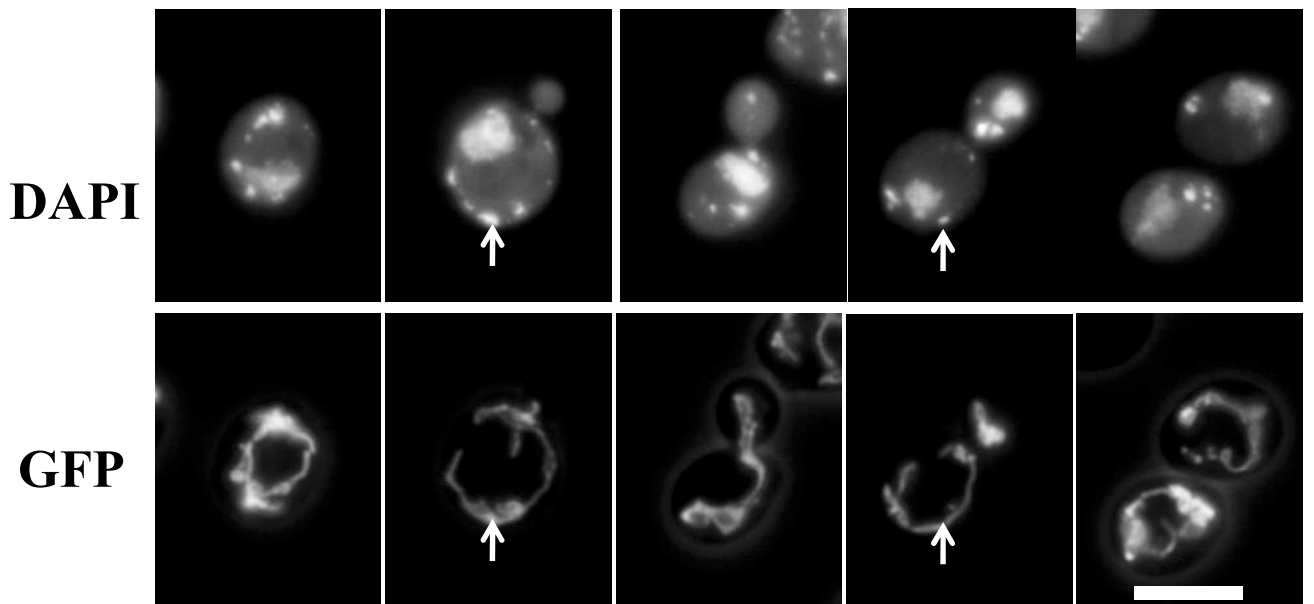


Fig. 1 α 14WW *rho*⁺株とHS40 *rho*⁻株のmt核様体とミトコンドリア形態

細胞周期の各ステージの代表的な画像を示す。対数期細胞を最終濃度3.6% formaldehydeで固定した。mt核様体はDAPI染色し、ミトコンドリアはGFPで標識した。同じ細胞をmt核様体観察時にUV励起光で、ミトコンドリア観察時にB励起光により同焦点で観察した。細胞周期の異なる5ステージの写真は別々の細胞である。矢印はmt核様体と、ミトコンドリアの対応する部位を示す。バーは5 μ mを示す。

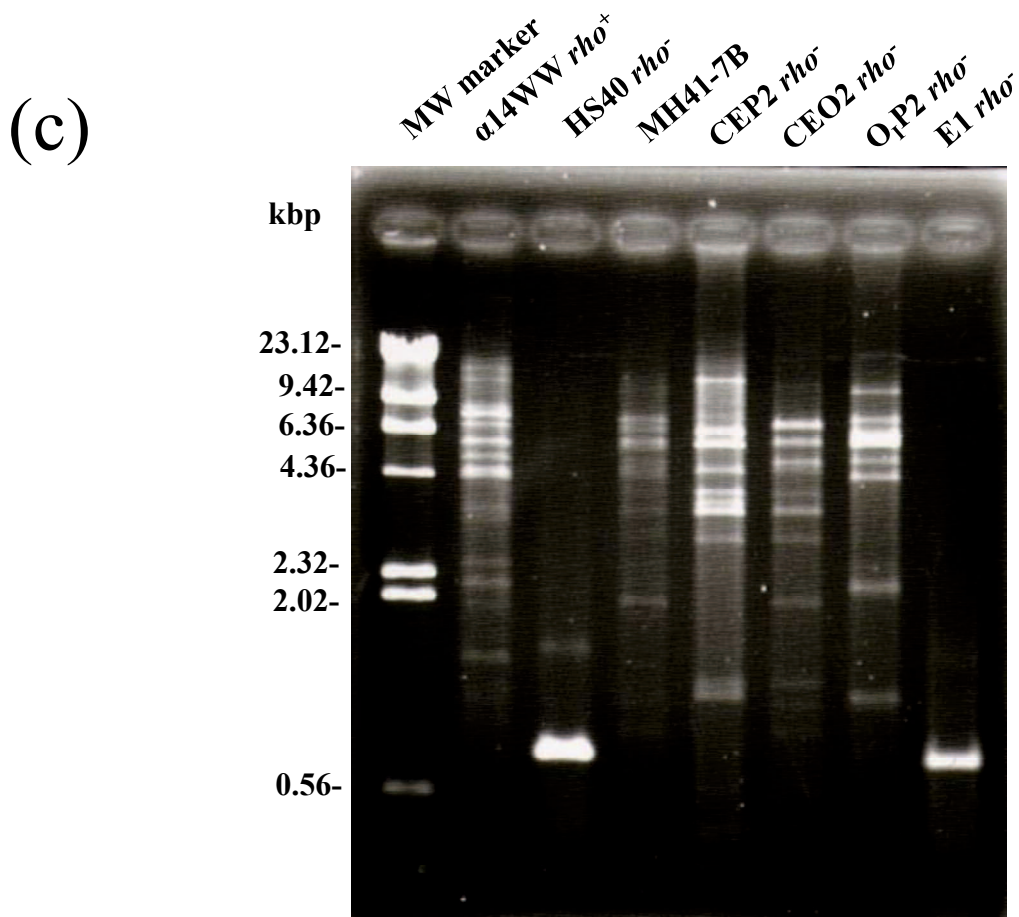
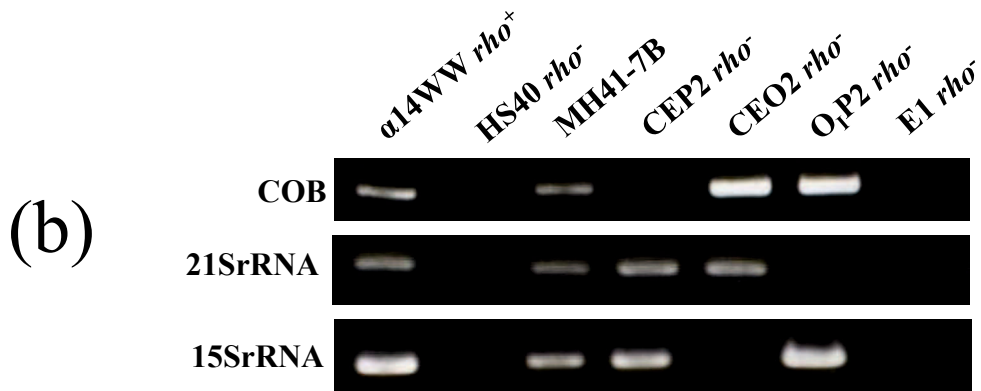
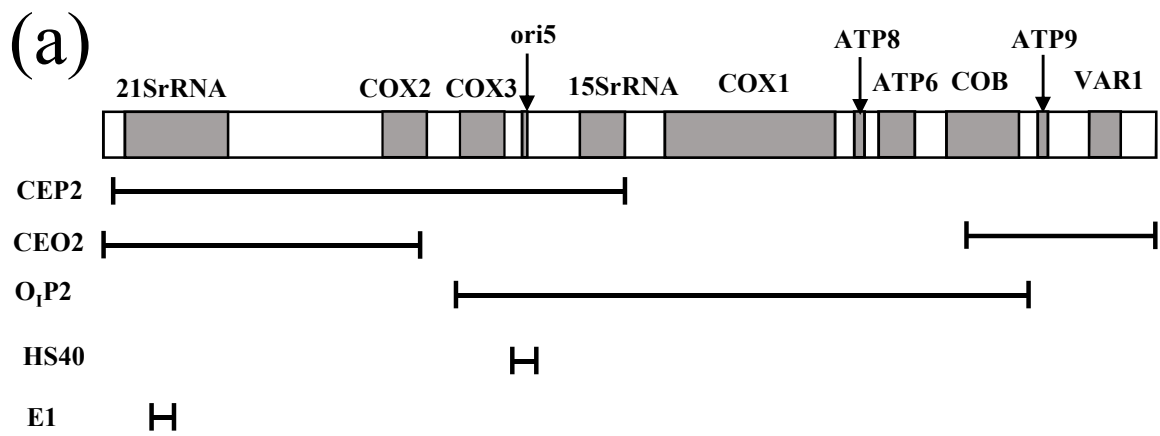


Fig. 2 各株の保持しているmtDNA配列

(a) *S. cerevisiae*のmtDNA遺伝子地図をCEP2, CEO2, O₁P2, HS40, E1株が保持しているmtDNA領域とともに示す。(b) PCRによるCOB, 21S rRNA, 15S rRNA遺伝子配列の検出。(c)制限酵素によるそれぞれmtDNA配列の消化。14WW *rho⁺*, MH41-7B, CEP2, CEO2, O₁P2,株のmtDNAは*Hha* Iで処理した。HS40 *rho⁻* mtDNAとE1 *rho⁻* mtDNAはそれぞれ*EcoRV*と*Mbo* Iで処理した。

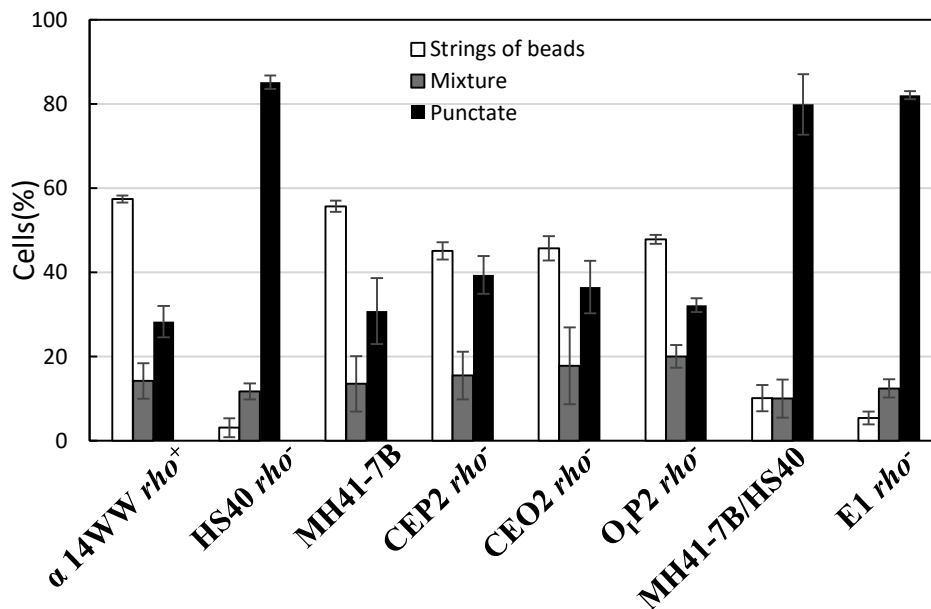
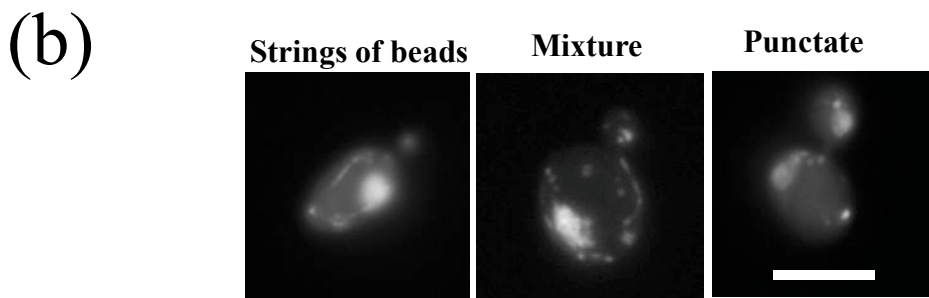
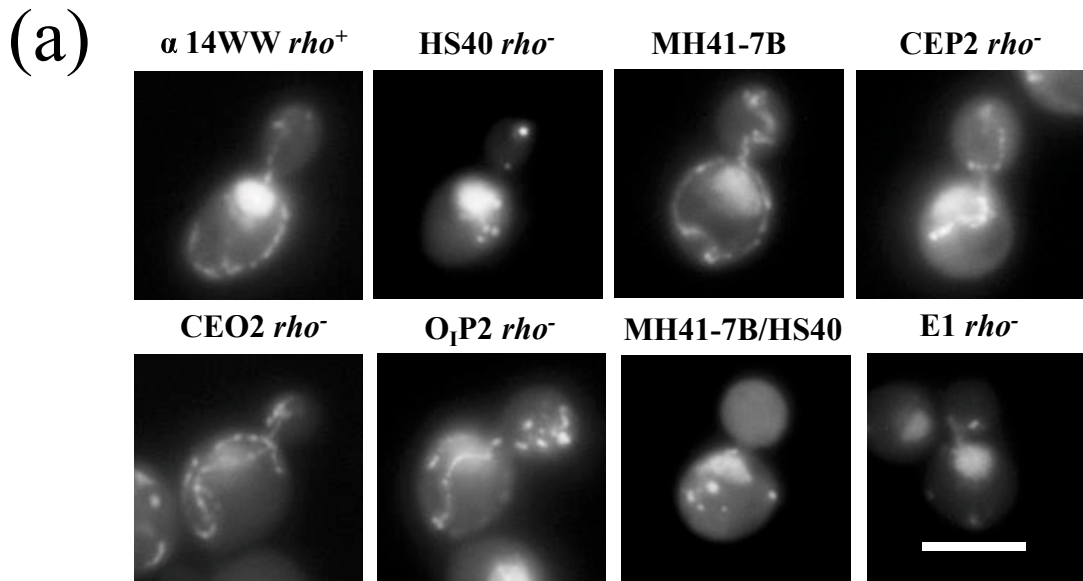


Fig. 3 対数期細胞のmt核様体形態

(a) DAPI染色した対数期細胞の典型的な画像を示す。2種類の ρ^+ 株と6種類の ρ^- 株を含む8株を観察した。細胞は5% glutaraldehydeで固定した。バーは5 μ mを示す。(b) mt核様体形態による細胞の分類。mt核様体形態を(i) 数珠状, (ii)数珠状と粒子状の混在型, (iii)粒子状の3種類に分類した。バーは5 μ mを示す。各株あたり100細胞以上をDAPI染色して観察した。エラーバーは独立した3回の実験の標準偏差を示す。

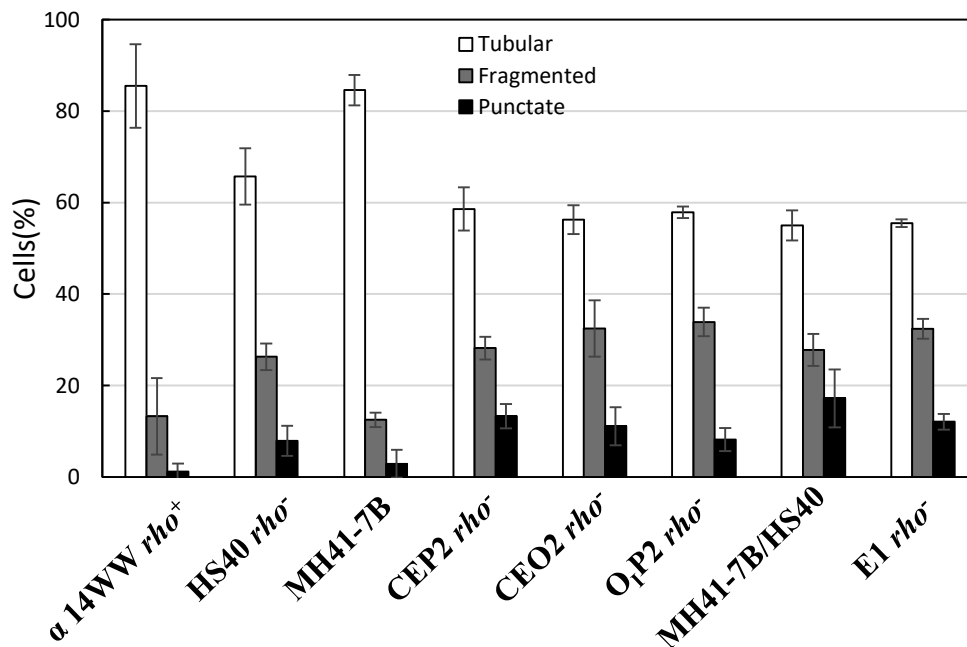
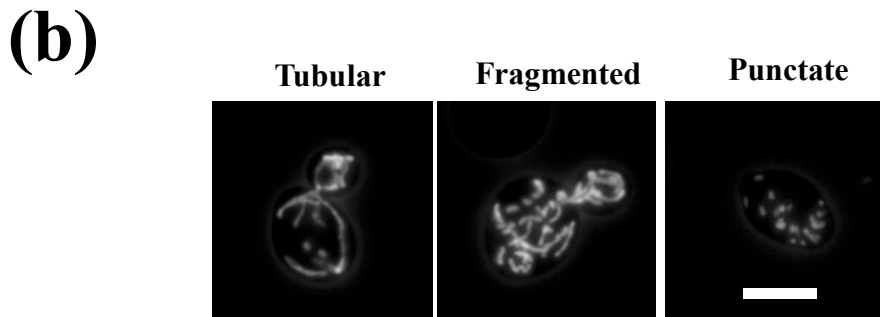
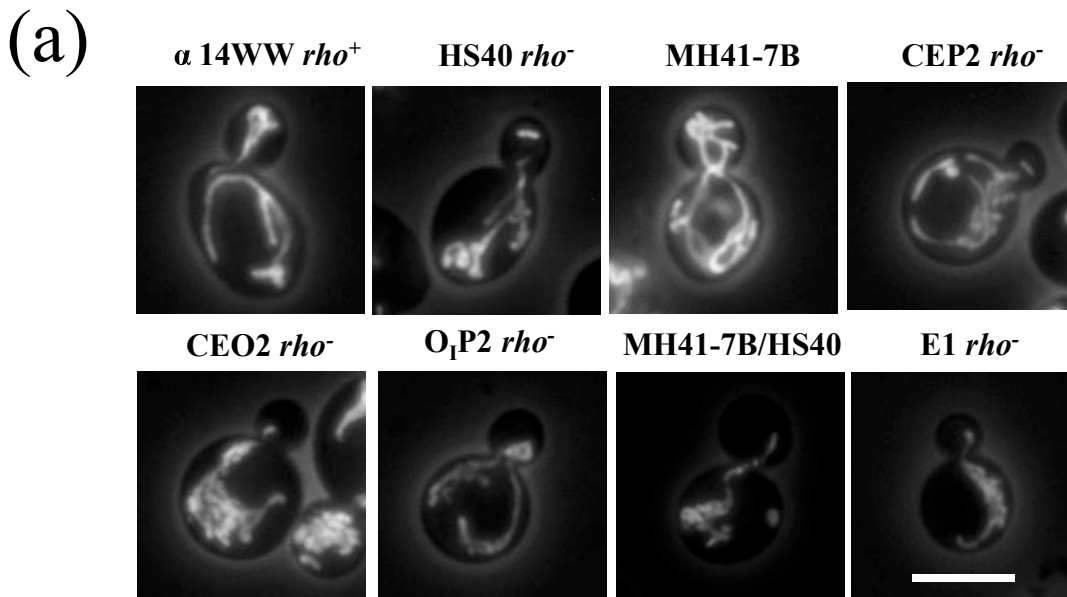


Fig. 4 対数期細胞のミトコンドリア形態

(a) ミトコンドリアをGFPで標識した対数期細胞の典型的な画像を示す。細胞を3.6% formaldehydeで固定した。(b) ミトコンドリア形態による細胞の分類。ミトコンドリアの形態を紐状、断片化、粒子状の3種類のタイプに分類した。バーは5 μ mを示す。100細胞以上を観察した。エラーバーは3回の独立した実験の標準偏差を示す。

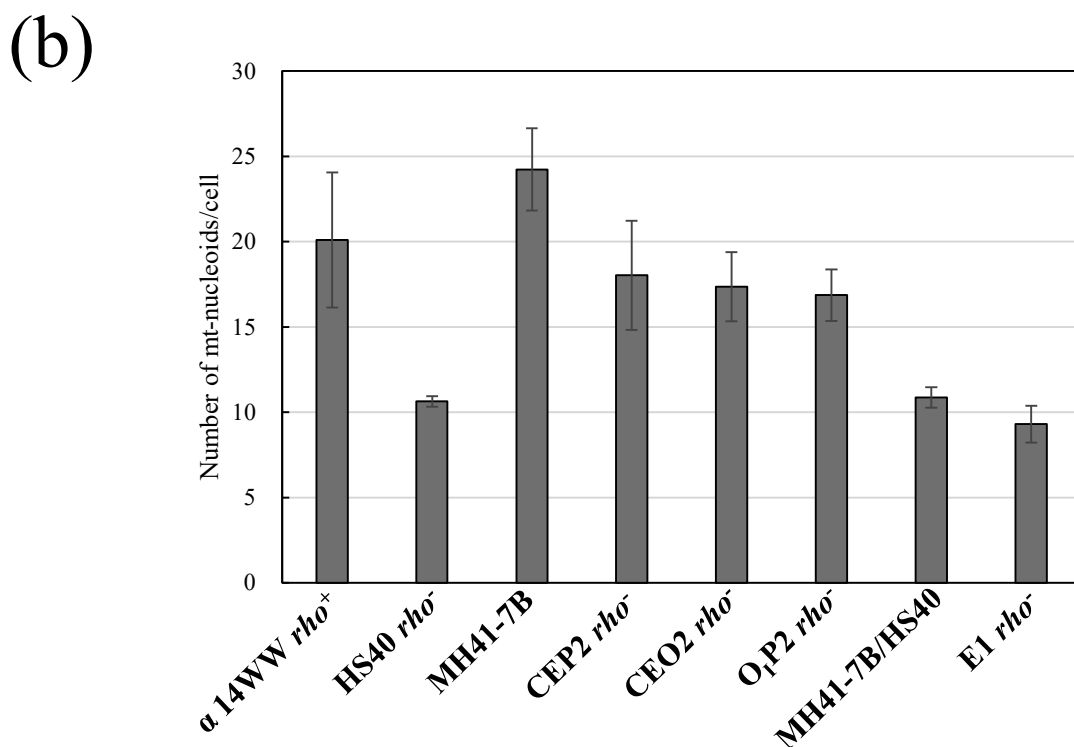
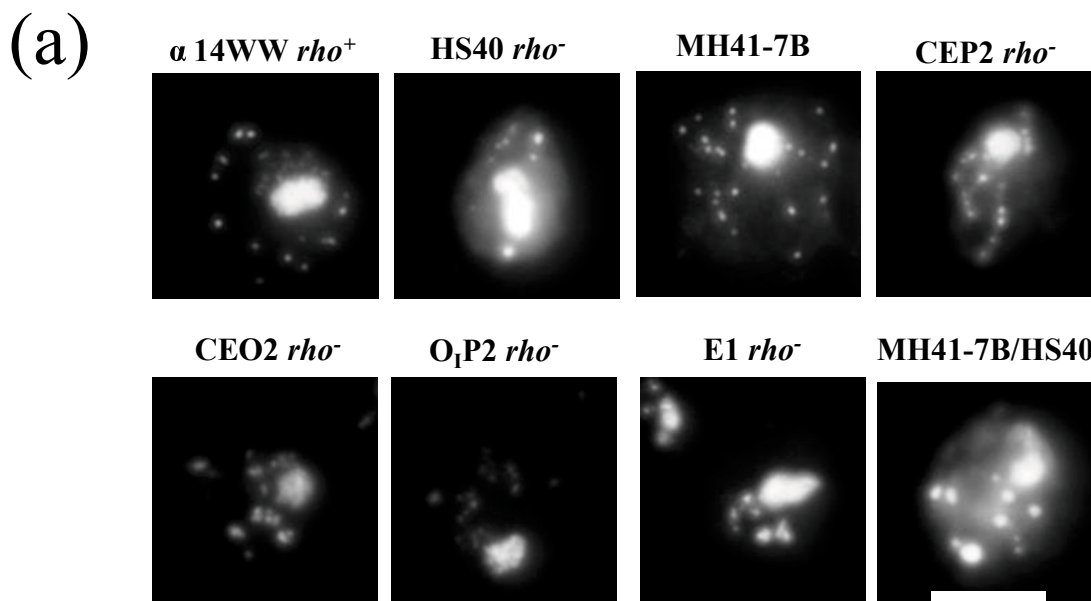


Fig. 5 対数期細胞のmt核様体数

(a) 対数期まで培養した細胞を3.6% formaldehydeで固定し、細胞壁を消化するためにZymolyase 20Tで処理した。この方法により対数期のmt核様体数の計数が容易になる。DAPI染色した代表的な対数期細胞の蛍光像を示す。バーは5 μ mを示す。
 (b) 対数期細胞のmt核様体の平均数。平たんにした細胞の1焦点面のmt核様体数を各株30細胞ずつ数えた。エラーバーは3回の独立した実験の標準偏差を示す。

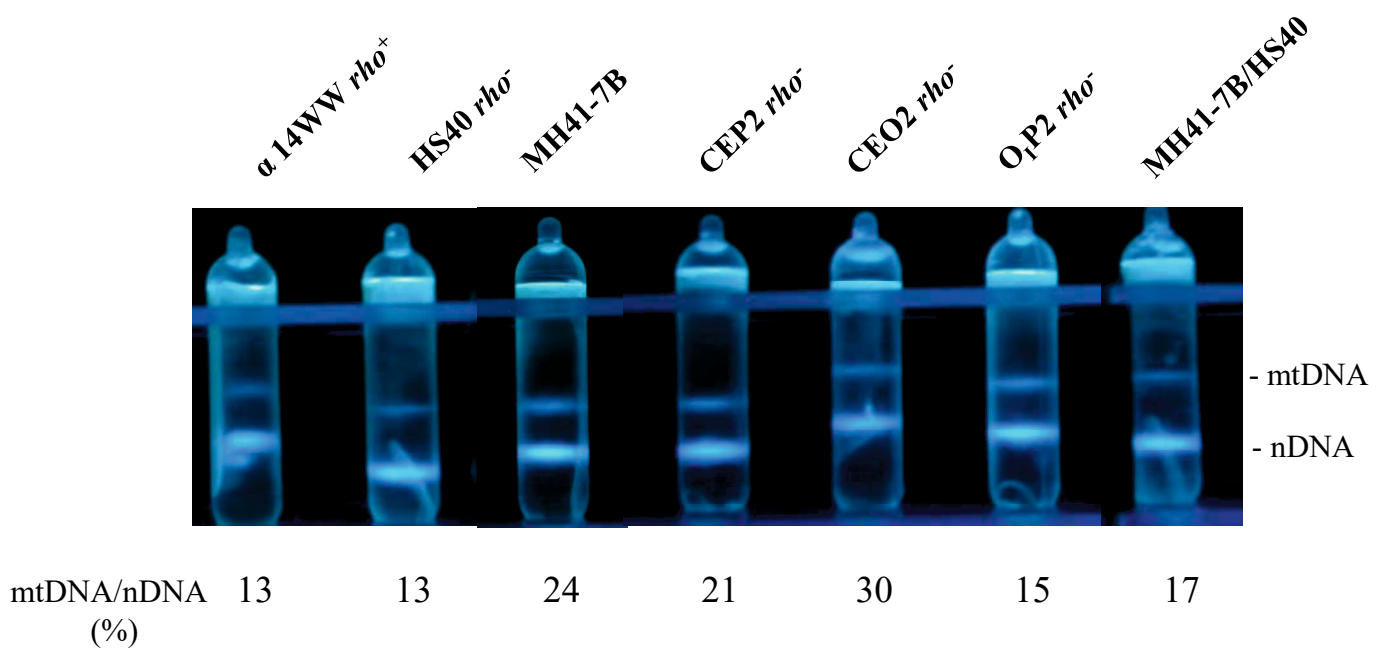
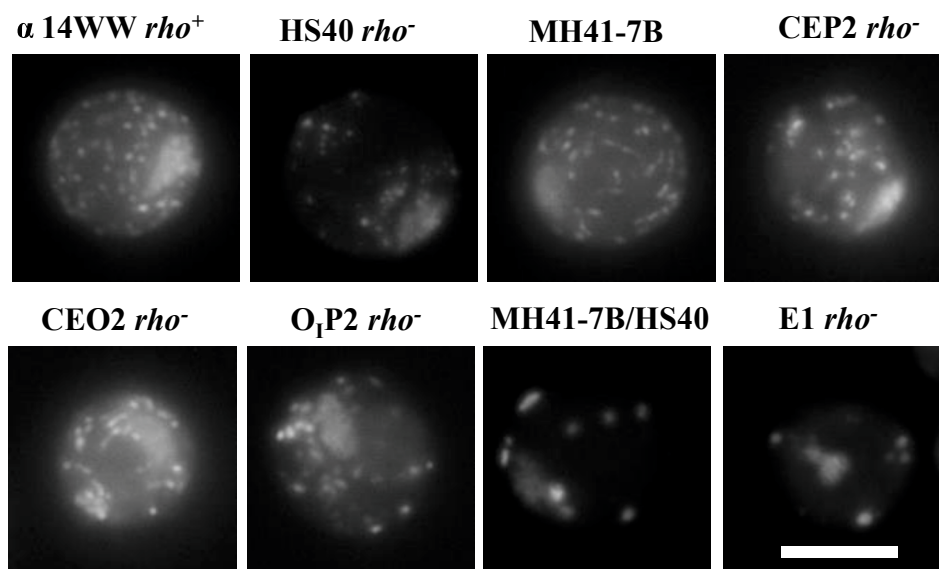


Fig. 6 Hoechst33258-CsCl密度勾配遠心によるmtDNAの分離

遠心チューブの底から回収し、0.25mLずつに分画した。核DNA量とmtDNA量は各分画の蛍光強度により測定した。mtDNA/nDNAのパーセンテージを各チューブの下に示した。

(a)



(b)

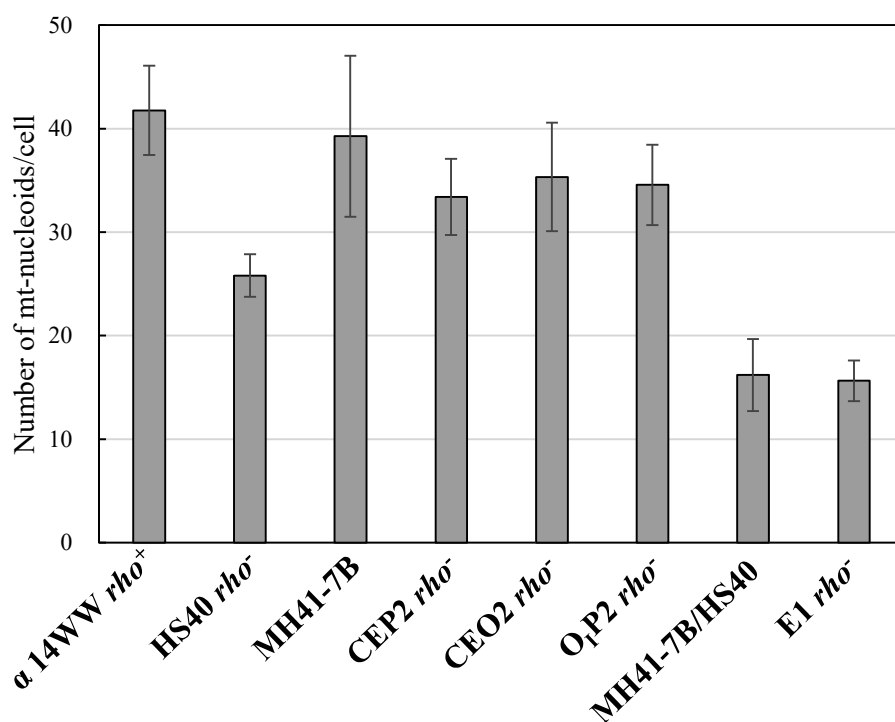
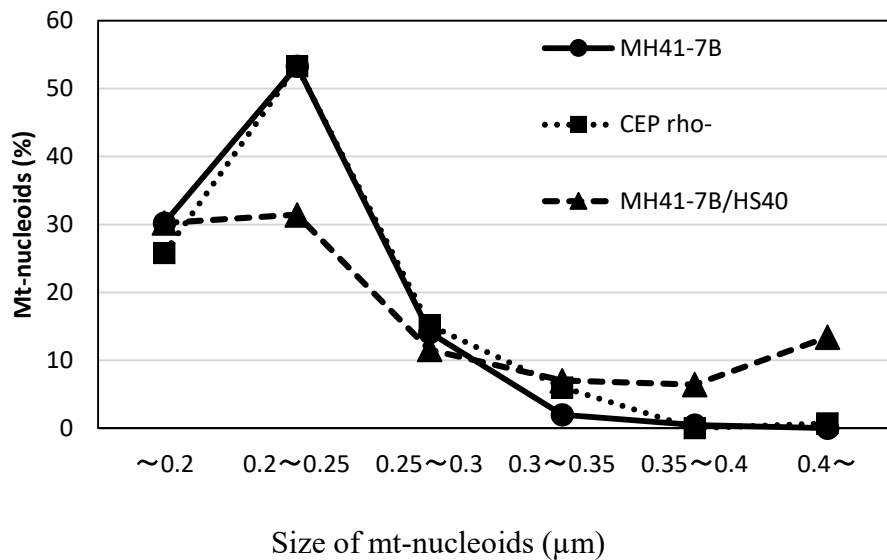


Fig. 7 定常期細胞のmt核様体の形態

(a) DAPI染色した定常期細胞の典型的な画像を示す。細胞を5% glutaraldehydeで固定した。バーは5 μ mを示す。(b) 定常期細胞のmt核様体平均数。押しつぶした細胞の1焦点面のmt核様体数を各株50細胞ずつ数えた。エラーバーは3回の独立した実験の標準偏差を示す。

(a) Log phase



(b) Stationary phase

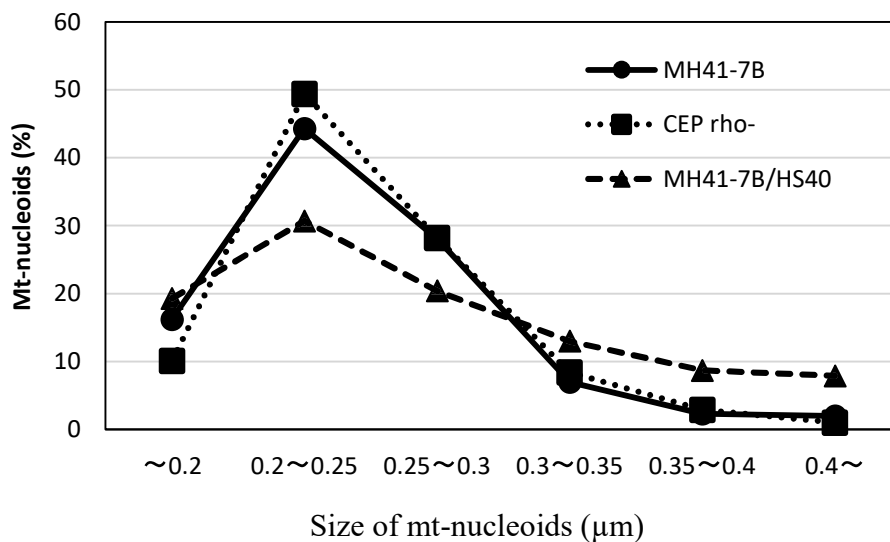


Fig. 8 対数期細胞と定常期細胞のmt核様体サイズの分布

培養した細胞を3.6% formaldehydeで固定し、細胞壁を消化するためにZymolyase 20Tで処理した。MH41-7B, CEP2 *rho*⁻, MH-7B/HS40の細胞をDAPI染色後、100以上のmt核様体の直径をImage J (NIH)を用いてランダムに測定した。

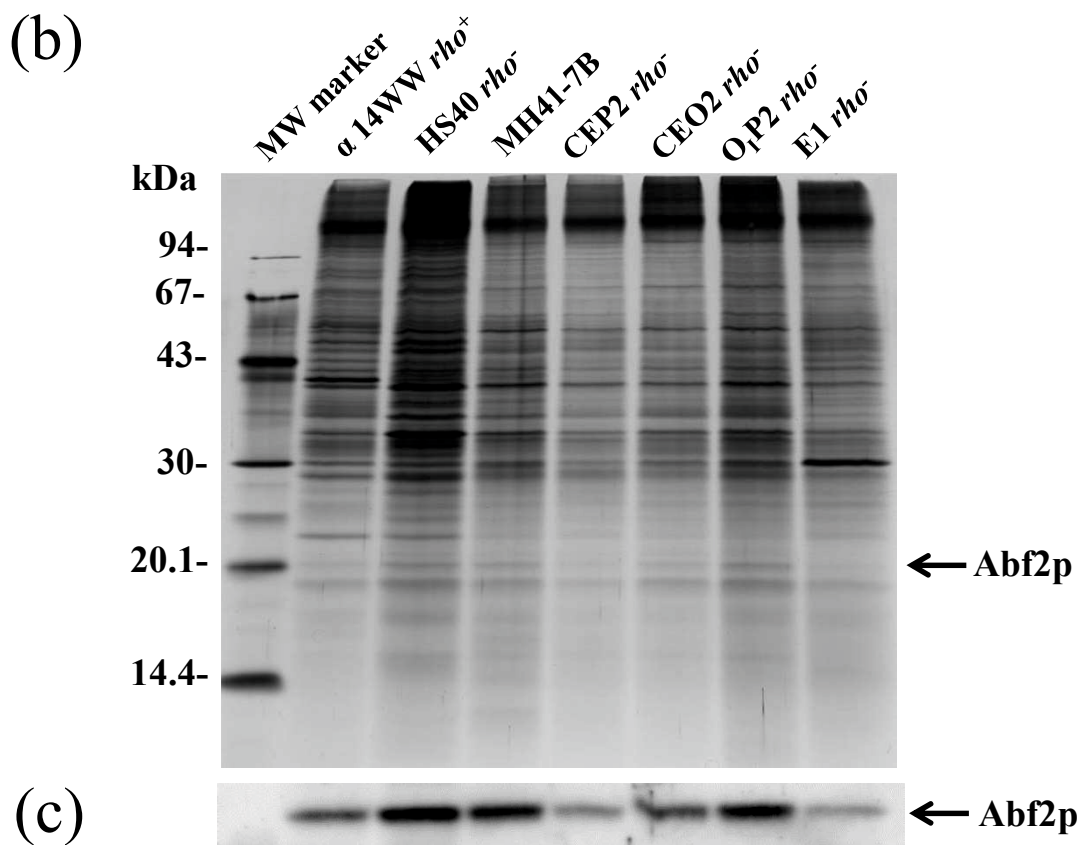
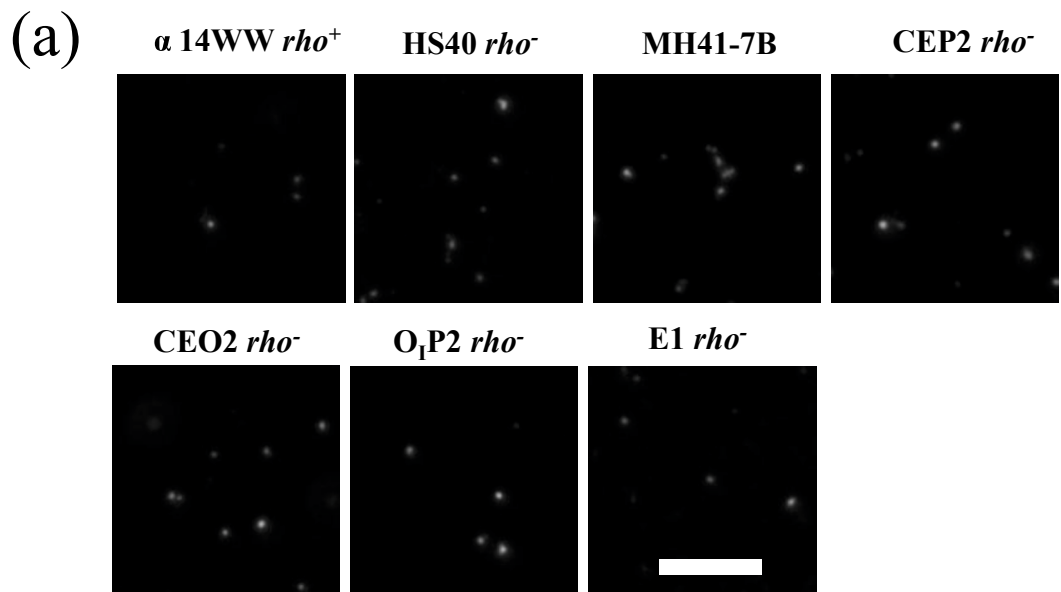


Fig.9 各株から単離したmt核様体

(a) mt核様体分画は各株から単離し、無固定でDAPIにより染色した。(b) mt核様体タンパク質を15% SDS-PAGEにより分離した。(c) mtDNA結合タンパク質であるAbf2pを抗Abf2pポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。

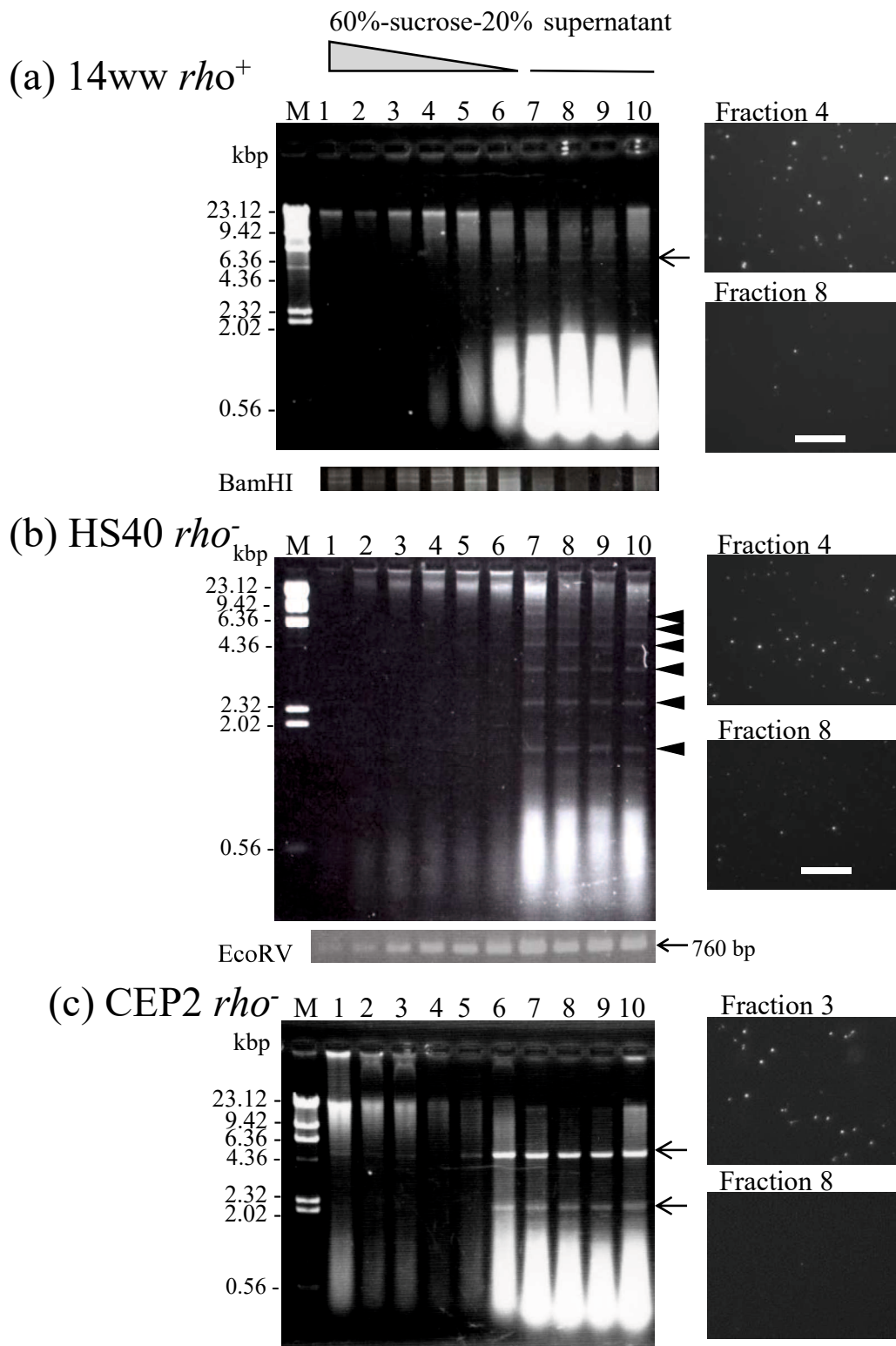


Fig.10 スクローズ連続密度勾配によるmt核様体の分離

α 14WW *rho*⁺株, HS40 *rho*⁻株, CEP2 *rho*⁻株の3株の溶解したミトコンドリアを20%-60 %スクローズ連続密度勾配に重層し、71,000×g, 1h遠心にかけた。遠心チューブの下から1mLずつ分画し、DAPI染色とDNA抽出に用いた。各株の分画から抽出したDNAを1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。(a) α 14WW *rho*⁻株のmt核様体の分離。矢印は二本鎖RNAを示す。*Bam*H1処理後の2つのバンドをゲルの下に示す。DAPI染色による分画4と8の蛍光画像をゲルの右側に示す。(b) HS40 *rho*⁻株のmt核様体の分離。矢頭はHS40株のオリゴマー環状mtDNAのラダー状のDNAを示す。*Eco*RV処理後の1本のバンドをゲルの下に示す。DAPI染色による分画4と8の蛍光画像をゲルの右側に示す。(c) CEP2 *rho*⁻株のmt核様体の分離。矢印は二本鎖RNAを示す。この2つのバンドはRNase A処理後、消失した。DAPI染色による分画3と8の蛍光画像をゲルの右側に示す。バーは5 μ mを示す。

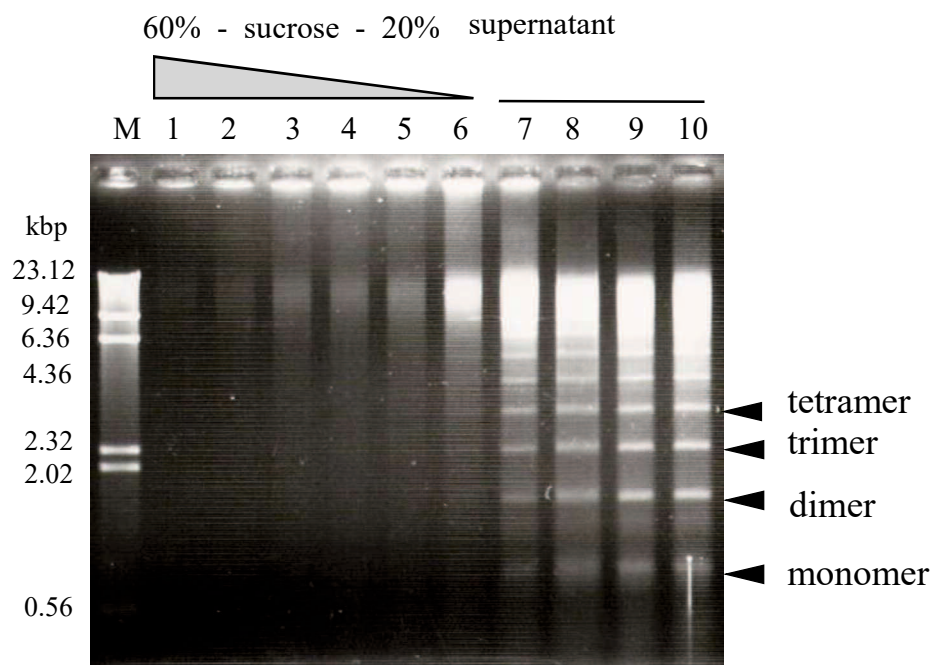
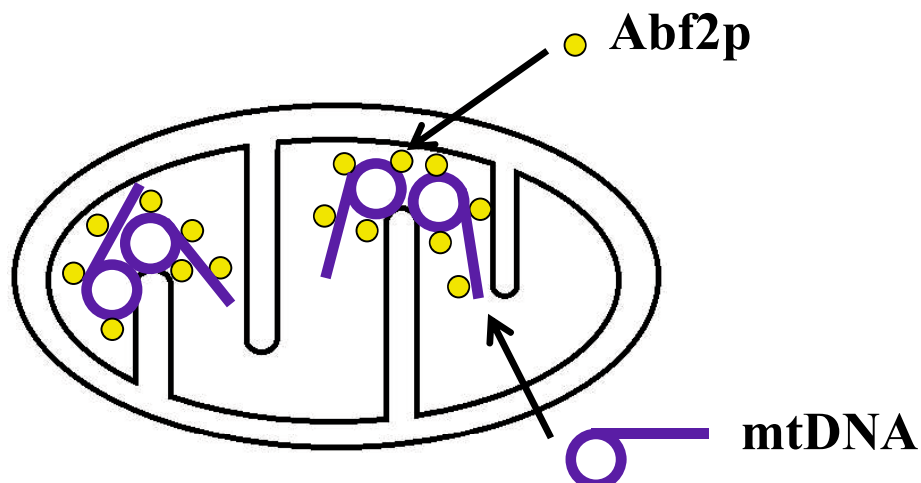


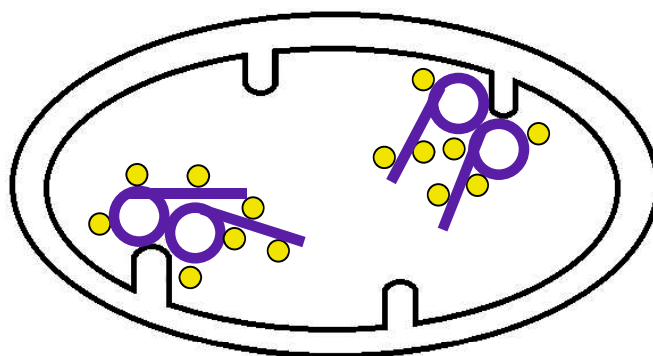
Fig. 11 スクロース連続密度勾配によるHS40 *rho*⁻mt核様体の分離

Fig. 10と同様に、HS40 *rho*⁻株の溶解したミトコンドリアを20%-60 %スクロース連続密度勾配に重層し、71,000×g, 1 h遠心にかけた。DNAを各分画から抽出し、RNase A (100µg/ml)により30°C, 10 minで処理した後、アガロースゲル電気泳動にかけた。Fig. 10に見られるスメアなバンドは完全に消失しており、ラダー状のオリゴマーmtDNAは上清の分画(7-10)で明瞭に検出されるが、分画1-5では検出されなかった。

(a) *rho*⁺ mitochondria



(b) *rho*⁻ mitochondria with long unit of mtDNA



(c) *rho*⁻ mitochondria with short unit of mtDNA

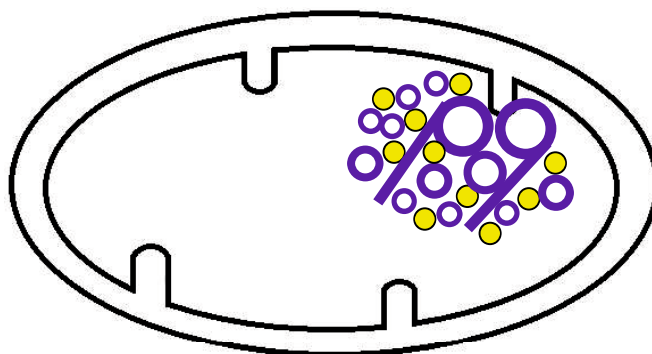


Fig. 12 ミトコンドリアとmt核様体を表す模式図

(a) *rho*⁺細胞のミトコンドリアでは、数個のコンカテマーmtDNAがAbf2pと他のmt核様体タンパク質と結合しmt核様体内に折りたたまれている。mt核様体は内膜の一部または発達したクリステに規則的に結合している。(b)長いmtDNA配列の単位を保持する*rho*⁻細胞のミトコンドリアでは、クリステは十分に発達していない。コンカテマーmtDNAを含むmt核様体は内膜の一部または発達していないクリステに結合している。(c)短いmtDNA配列を保持する*rho*⁻細胞のミトコンドリアもクリステは発達していない。これらのミトコンドリアでは短いmtDNA配列が多数繰り返しているために、mtDNAの相同組換えの頻度は増加している。組換え頻度の増加は環状オリゴマーmtDNAを生じる。コンカテマー型mtDNAと環状オリゴマー型mtDNA両方がAbf2pと他のmt核様体タンパク質と結合し、粒子状のmt核様体内に折りたたまれている。mt核様体は内膜の一部または発達していないクリステに結合している。

第二章

酵母野生株と呼吸欠損株のミトコンドリア核様体タンパク質の解析

要旨

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の野生株(rho^+ 株)と呼吸欠損株(rho^- 株)のミトコンドリア核様体(mt 核様体)を構成するタンパク質の違いは、これまでほとんど調べられていない。本研究では、 rho^+ 株である MH41-7B 株と、ミトコンドリア DNA(mtDNA)の複製起点 *ori5* を含む短い繰り返し配列を保持する MH41-7B/HS40 rho^- 株から、mt 核様体を単離してタンパク質組成を比較した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、両株の mt 核様体タンパク質組成に大きな違いは認められなかった。mt 核様体を構成する主要なタンパク質のひとつである Abf2p、*ori5* 配列に結合すると報告されている Hsp60p、および mt 核様体タンパク質と報告されている α ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのサブユニット Kgd1p, Kgd2p をウェスタンブロッティングにより調べた。その結果、 rho^+ 株に比べ HS40 rho^- 株で Kgd1p の減少が認められたが、その他のタンパク質では両株の mt 核様体でその結合量に大きな差は認められなかった。また、MH41-7B 株と MH41-7B/HS40 rho^- 株の mt 核様体タンパク質を液体クロマトグラフィータンデム質量分析法で比較した。その結果、これまで mt 核様体に結合すると報告されているタンパク質のうち、Kgd1、シトクローム b-c₁ 複合体のサブユニット Qcr1, Qcr2、クエン酸・ α ケトグルタル酸輸送タンパク質 Ymh2 が、MH41-7B 株に比べて MH41-7B/HS40 rho^- 株で減少していた。対照的に、ミトコンドリア DNA ポリメラーゼである Mip1 は MH41-7B 株に比べて MH41-7B/HS40 rho^- 株で増加していた。これらの結果は、 rho^+ 株と rho^- 株間で特定の mt 核様体タンパク質の結合量が異なることを示している。

序論

ミトコンドリアは独自の DNA(mtDNA)を持ち、mtDNA 上には酸化的リン酸化に必要な遺伝子がコードされている。mtDNA はタンパク質と結合し、ミトコンドリア核様体(mt 核様体)と呼ばれる DNA-タンパク質複合体を形成している。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は約 75,000 bp のミトコンドリアゲノムを保持している。完全なミトコンドリアゲノム(ρ^+ mtDNA)を保持する株を ρ^+ 株と呼ぶ。一方、*S. cerevisiae* をエチジウムブロミド(EtBr)で処理することによって、mtDNA を部分的に欠失した ρ^- 株と呼ばれる呼吸欠損株を容易に作製することができる。 ρ^- 株は一部分のミトコンドリアゲノムの領域のみが繰り返している mtDNA (ρ^- mtDNA)を保持している。一部の ρ^- 株は hypersuppressive と呼ばれる特徴を持つ。hypersuppressive ρ^- 株と ρ^+ 株を接合させると、子孫の二倍体細胞はすべて ρ^- 株になる(Dujon 1981)。hypersuppressive ρ^- 株の mtDNA は、短い繰り返し配列内に複製起点(*ori* 配列)を保持するという特徴を持つ。hypersuppressive ρ^- mtDNA が選択的に子孫へと伝達されるのは、*ori* 配列の密度が ρ^+ mtDNA よりも hypersuppressive ρ^- mtDNA で高いため、 ρ^- mtDNA が複製されやすく、娘細胞への伝達も起きやすいためであると考えられている。約 300 bp の *ori* 配列は、ミトコンドリアゲノム中に 7 つまたは 8 つ存在する(Lecrenier and Foury 2000)。*ori* 配列はほとんどが AT 配列で占められているが、*ori* 配列には GC クラスタ A, B, C と呼ばれる数塩基または十数塩基の GC リッチな領域が 3 つ存在する(de Zamaroczy and Bernardi 1986)。8 つの *ori* 配列のうち 4 つ(*ori1*, *ori2*, *ori3*, *ori5*)には GC クラスタ C の上流に転写開始点が存在するが、残りの 4 つの配列(*ori4*, *ori6*, *ori7*, *ori8*)は挿入配列により、転写開始点が破壊されている。hypersuppressive ρ^- 株で見つかる *ori* 配列は転写開始点を持つ *ori1, 2, 3, 5* のみであるので、*ori1, 2, 3, 5* は活性化された *ori* 配列と呼ばれ、*ori4, 6, 7, 8* は不活性な *ori* 配列と呼ばれる(de Zamaroczy et al. 1981)。以前の研究で、*ori5* 配列の転写開始点を人為的に破壊すると、hypersuppressive の性質が失われることが報告されている(MacAlpine et al. 2001)。in vitro において、ミトコンドリア RNA ポリメラーゼ Rpo41p により形成された RNA をプライマーとして用いて、*ori* 配列からミトコンドリア DNA ポリメラーゼ Mip1p による DNA 複製が開始することも報告されている(Xu and Clayton 1995; Sanchez-Sandoval et al. 2015)。

主要な mtDNA 結合タンパク質である Abf2p の欠損株は、グルコースを含む培地で培養すると ρ^+ mtDNA を消失するが、 ρ^- mtDNA を安定して維持することができる(Diffley and Stillman 1991; Zelenaya-Troitskaya et al. 1998)。また、mtDNA の修復・維持に関与する Mgm101p の欠損は ρ^+ mtDNA と *ori* 配列を持たない ρ^- mtDNA を不安定化させるが、*ori* 配列を持つ ρ^- mtDNA は Mgm101p の欠損によっても安定に維持される(Zuo et al. 2002)。これらの結果は mt 核様体の構造が ρ^+ 株と ρ^- 株で異なる可能性を示唆している。しかし、これまで ρ^+ 株と ρ^- 株の mt 核

様体タンパク質の違いを調べた研究はほとんどない。本研究では、*rho*⁺株である MH41-7B 株と、複製起点 *ori5* を含む繰り返し配列を保持する MH41-7B/HS40 *rho*⁻株から、ミトコンドリア核様体を単離してタンパク質組成を比較した。

材料と方法

使用菌株と培養方法

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 2 株、*rho*⁺ mtDNA を保持する MH41-7B 株 (*MATa ade2 his1*) と、HS40 *rho*⁻ mtDNA を保持する MH41-7B/HS40 株 (*MATa ade2 his1*) を用いた。酵母の培養は YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) を用いて好氣的に 30°C で定常期まで行い、定常期まで達した細胞を使用した。

ミトコンドリアおよび mt 核様体の単離

核タンパク質や細胞質のタンパク質の混入をできるだけ防ぐために、ミトコンドリアおよび mt 核様体単離は Shiiba et al (1997) の方法をもとに行った。30 h 培養した細胞 (wet weight 約 25 g) を集菌し、SP buffer (0.8 M sorbitol, 50 mM K-phosphate buffer, pH7.5) を 150 ml 加え懸濁し、0.4 M β-mercaptoethanol で 30°C、30 min 処理した。処理後、細胞を SP buffer で一度洗浄した。細胞を Zymolyase 20T (Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan) を添加した SP buffer 400 ml 中で 30°C、1 h 処理することでスフェロプラスト化を行った。スフェロプラストを NE1 buffer (0.3 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH7.6), 1 mM EDTA, 0.4 mM spermidine, 7 mM β-mercaptoethanol, 0.4 mM PMSF) 400 ml で懸濁し、テフロンホモジナイザーを用いて 950 rpm、10 往復でホモジナイズした。ホモジネートを 600×g, 5 min、1,200×g, 5 min で遠心し、その上清を 12,000×g, 20 min で遠心した。得られた沈殿を NE2 buffer (0.5 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH7.6), 2 mM EDTA, 0.8 mM spermidine, 7 mM β-mercaptoethanol, 0.4 mM PMSF) 400 ml で懸濁し、1,700×g, 5 min で 2 回遠心した。上清を 15,000×g, 20 min 遠心し、ミトコンドリアを沈殿させた。沈殿を NE2 buffer 40 ml で懸濁後、等量の DL buffer (0.25 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH7.6), 7 mM β-mercapto-ethanol, 0.4 mM PMSF) で希釈した。ミトコンドリア膜を溶解するために、20% NP-40 を最終濃度 0.5% になるように加え、5 分間ゆっくりとかくはんした。不溶性の分画を除くために、6,700×g, 5 min で遠心した。上清を 35%, 45%, 55%, 65% (w/v) sucrose 不連続密度勾配に重層し、46,000×g, 1 h 遠心した。35% と 45% sucrose の境界に含まれている mt 核様体を回収し、dilute buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.6), 1 mM EDTA, 0.6 mM spermidine, 7 mM β-mercaptoethanol, 0.4 mM PMSF) 60 ml で希釈し、46,000×g, 1 h で遠心し mt 核様体を沈殿させた。単離した mt 核様体を NE2 buffer 100 μl で懸濁して、回収した。単離 mt 核様体のタンパク質量は Lowry 法により定量した。

SDS-polyacrylamide gel 電気泳動(SDS-PAGE)とウェスタンブロット

SDS-PAGE は Laemmli (1970)の方法に従い、15% polyacrylamide ゲルを用いて行った。SDS-PAGE により分離したタンパク質はセミドライ転写装置を用いて PVDF 膜に転写した。ウェスタンブロットには、Abf2p と Hsp60p、Kgd1p、Kgd2p に対する抗体をそれぞれ 3000 倍と 2500 倍、5000 倍、10000 倍希釈して使用した。抗 Abf2p 抗体(Miyakawa et al. 2000)、抗 Hsp60p 抗体(C. K. Suzuki 博士, University of Medicine and Dentistry of New Jersey より供与)、抗 Kgd1p 抗体(A. Tzagoloff 博士, Columbia University より供与)はウサギポリクローナル抗体を用い、抗 Kgd2p 抗体(Sato et al. 2002)はマウスモノクローナル抗体を用いた。二次抗体は peroxidase 結合抗ウサギ抗体(GE Healthcare)と peroxidase 結合抗マウス抗体(GE Healthcare)を用いた。抗原タンパク質の検出は Luminol を用いた化学発光法により行い、検出には Luminescent Image Analyzer (Fijifilm LAS-3000)を用いた。

mt 核様体の S1 ヌクレアーゼ処理

mt 核様体サンプルに S1 buffer (30 mM sodium acetate (pH4.6), 280 mM NaCl, 10 mM ZnSO₄, 0.4 mM PMSF)を加えた後、S1 ヌクレアーゼを最終濃度 1.7 U/μl になるように添加した。サンプルを 25°C、15 min インキュベートし、16,000×g, 30 min 遠心した。上清を回収後、沈殿に滅菌水を加えた。上清と沈殿にデオキシコール酸ナトリウムを最終濃度 0.015%になるように加えた後に、トリクロロ酢酸(TCA)を最終濃度 6%になるように加えた。16000×g, 10 min 遠心した後に、沈殿を 5%TCA とアセトンでそれぞれ洗浄した。沈殿させたタンパク質を SDS サンプル buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 2.3% SDS)に溶解し、SDS-PAGE とウェスタンブロットを行った。

mtDNA を抽出する場合、サンプルに S1 buffer と最終濃度 1.7 U/μl S1 ヌクレアーゼを加え、25°C、15 min インキュベートした。その後、最終濃度 170μg/ml プロテインアーゼ K を加え、37°C、1 h 処理し、フェノール：クロロホルム(1:1)による抽出とエタノール沈殿により DNA を精製した。精製した DNA を *EcoRV* で処理した後に、RNase A で処理し、2% アガロースゲルで流した。その後、ゲルをサザンブロットに用いた。

サザンブロット

アガロースゲル電気泳動にかけた DNA を Hybond-N⁺(GE Healthcare)に転写した。転写した DNA を UV 照射によりクロスリンクさせた。プローブには塩化セシウム密度勾配遠心法により精製した HS40 mtDNA を用いた。ハイブリダイゼーションおよびプローブのラベリングには ECL Direct Nucleic Acid Labeling System(GE Healthcare)を用い、プロトコールに従い検出操作を行った。

液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC/MS/MS)

(i) トリプシンによるタンパク質の消化

単離 mt 核様体タンパク質を各5 μg ずつ消化した。mt 核様体試料を SDS-PAGE にかき、試料がゲル中に完全に入った時点で泳動を停止し、ゲルを切り出した。切り出したゲルを水洗後、10mM(DTT; Sigma-Aldrich 製) 存在下で 50 °C 15 分間、変性還元した。次に、10 mM ヨードアセトアミド (Sigma-Aldrich 製) を添加し遮光下、室温15分間アルキル化した。そして、プロテアーゼ Trypsin(Sequencing Grade; Promega 製) 400 ng を加え、100mM 重炭酸アンモニウムバッファー内で 37 °C 一晩で消化した。消化産物は、0.2% トリフルオロ酢酸を添加した 2% アセトニトリルに溶解し、LC/MS/MS 測定に供する最終的なサンプルとした。

(ii) LC/MS/MS 測定

LTQ Orbitrap Elite ETD 質量分析器 (Thermo Fisher Scientific 製) を用いて LC/MS/MS 測定を行った。マイクロ高速液体クロマトグラフィー (micro-HPLC) は Paradigm (Michrom BioResources, Inc. 製)、オートサンプラーは HTS PAL (CTC Analytics 製)、イオン源は nanospray ionization (NSI) source (AMR Inc. 製) でそれぞれ構成している。また、全てのデバイスはナノスケール・フェューズドシリカ・キャピラリー (Viper; Thermo Fisher Scientific 製) で接続されている。

消化した mt 核様体試料は、高耐久性シリンジ (AMR Inc. 製) によって自動的に Cheminert PAEK injector valve (CTC 製) 上の micro-precolumn C18 PepMap 100 Peptide Trap cartridge (5 \times 0.3 mm 内径; Thermo Fisher Scientific 製) に注入され、濃縮・脱塩される。0.2% トリフルオロ酢酸 2% アセトニトリルによる脱塩ののち、サンプルは逆相 L-column2 micro C18 column (3 μm , 200 Å , 150 \times 0.2 mm 内径; CERI 製) を通して分離される。移動相 A は 2% アセトニトリル、移動相 B は90% アセトニトリルで、いずれも 0.1% ギ酸を含む。クロマトグラフィーのグラジエント条件設定は、B 3% (0 min) \rightarrow 10% (40 min) \rightarrow 28% (100 min) \rightarrow 95% (102 min) \rightarrow 95% (110 min) \rightarrow 4% (112–120 min) としている。HPLC からの溶出液は流速 1.0–1.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ で質量分析器に導入される。NSI ニードル PicoTip FS360-50-30 (New Objective Inc. 製) は逆相カラムに直接接続し、電圧は 2.0 kV で、キャピラリーは 200 °C に加熱している。加えて、T3 Spray (AMR Inc. 製) を介して補助窒素ガスを流している。

質量分析は、Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific 製) の自動制御下で mass range m/z 420–1600 での MS 取得から data-dependent acquisition mode によって MS/MS に切り替える設定で実施した。MS スキャンは半値幅分解能 240,000 で Orbitrap によって測定し、続く MS/MS スキャンはイオントラップでの測定とした。それぞれ

automated gain control (AGC) mode で測定し、AGC value は MS に対しては 5×10^5 、MS/MS に対しては 1×10^4 である。ペプチドのフラグメント化には、衝突誘起解離 (Collision Induced Dissociation; CID) を用いた。同じイオンを何度も不必要に MS/MS にかけないため、10 秒間のうち 1 回観測されたイオンは除外時間幅 60 秒、除外質量幅 5 ppm の設定で dynamic exclusion 機能で除外した。CID については、normalized collision energy 値を 35 に設定した。

(iii) データベースサーチによるペプチド同定

MS/MS スペクトルは Proteome Discoverer (Thermo fisher scientific 社) によって抽出し、全 MS/MS データセットは Mascot database search (version 2.4.1; Matrix Science Ltd.) によって解析した。検索設定は、Swissprot_2017_08.fasta (Fungi 選択; 32,833 entries) をデータベースとし、fragment-ion mass tolerance は 0.60 Da、parent ion tolerance は 5.0 ppm とした。最大 missed cleavage site 数は 3 に設定した。修飾に関しては、fixed modification としてシステインの Carbamidomethylation (57.021464)、variable modification としてメチオニンの oxidation (15.994915)、リシンとアルギニンの methylation (14.01565)、リシンとペプチド N 末の acetylation (42.010565)、セリンとトレオニンとチロシンの phosphorylation (79.966331)、グルタミンの pyroglutamylation (-17.02655) を設定した。同定基準は、Mascot significance threshold $p < 0.05$ で統一した。また false discovery rate (FDR) を算出するために検索に使用したタンパク質データベースのアミノ酸配列を逆にしたデータベースを Decoy Database として使用した。

(iv) スペクトルカウント法による比較定量

測定データは Scaffold (version 4.8.4; Proteome software 社) を用いてスペクトルカウント法によって解析した。LC-MS の測定データより出力した MS/MS ピークリストから Mascot によって peptide spectrum match (PSM) でアミノ酸配列および修飾を同定し、ペプチド同定リストを Scaffold に取り込み同定されたスペクトル数を比較する事で試料間のタンパク発現量の比較を行った。比較に使用したタンパク質の同定基準は FDR 0.1 以下で、どれかの試料で 1 タンパク質につき異なる 2 ペプチド以上が検出されている事とした。

結果

DAPI 染色によって、MH41-7B 株の定常期細胞では粒子状の mt 核様体が観察されたのに対して、MH41-7B/HS40 株の定常期細胞では不均一のサイズのミトコンドリア核様体が観察された (Fig. 1a)。MH41-7B 株と MH41-7B/HS40 株から単離した mt 核様体を DAPI 染色すると、細胞中に見られる mt 核様体と同様なサイズの粒子状の蛍光が観察された (Fig. 1 a)。次に、SDS-PAGE にかけて mt 核様体タンパク質の比較を行っ

た。同量の mt 核様体タンパク質を泳動した結果、2 株の mt 核様体タンパク質のバンドパターンには明確な違いは見られなかった(Fig.1 b)。主要な mtDNA 結合タンパク質である Abf2p、および *ori5* 配列に in vitro で結合すると報告されている Hsp60p、mt 核様体タンパク質と報告されている α ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのサブユニット Kgd1p と Kgd2p の抗体を用いて、ウェスタンブロットを行った(Fig. 1b)。その結果、MH41-7B 株に比べ MH41-7B/HS40 株の mt 核様体で Kgd1p の結合量が減少していた。しかし、MH41-7B 株と MH41-7B/HS40 株の mt 核様体で、Abf2p と Hsp60p、Kgd2p の結合量に大きな違いは見られなかった。

Hsp60p は in vitro で *ori5* 配列の 1 本鎖 DNA と親和性が高いことが報告されている(Kaufman et al. 2000)。Hori et al. (2009)は一部の *ori5* 配列が 1 本鎖 DNA 構造を形成していることを報告している。したがって、1 本鎖特異的ヌクレアーゼ S1 ヌクレアーゼで HS40 *rho*⁻ mt 核様体を処理すると、*ori*配列の 1 本鎖部分が分解され、Hsp60p が mt 核様体から遊離すると考えられる。そのため、MH41-7B/HS40 株の mt 核様体を S1 ヌクレアーゼ処理し、遠心かけることで、上清に遊離した Hsp60p が検出されるかどうかを調べた。まず、mt 核様体構造を形成している mtDNA を S1 ヌクレアーゼが分解するかどうかを調べるために、mt 核様体を S1 ヌクレアーゼ処理後 mtDNA を精製し、*EcoRV* で切断した後に電気泳動および HS40 mtDNA をプローブとしたサザンブロットを行った(Fig. 2a)。HS40 mtDNA 配列の単位に *EcoRV* 切断サイトは 1 カ所しかないため、*EcoRV* 処理により HS40 mtDNA は 760 bp の DNA 断片になる。S1 ヌクレアーゼ無処理の mt 核様体では HS40 mtDNA を示す 760 bp のバンドが検出された。S1 ヌクレアーゼ処理後の mtDNA では、760 bp のバンドの下にスメア状のバンドが検出された。この結果は、mt 核様体構造を形成している HS40 mtDNA の 1 本鎖部分が、S1 ヌクレアーゼで分解されることを示している。次に、S1 ヌクレアーゼ処理後の mt 核様体を遠心し、その沈殿と上清を SDS-PAGE にかけた(Fig. 2b)。銀染色では、無処理の mt 核様体の上清にはバンドは検出されなかったが、S1 ヌクレアーゼ処理後の上清には、複数のバンドが検出された。抗 Hsp60p 抗体を用いたウェスタンブロットを行うと、S1 ヌクレアーゼ処理後の上清に Hsp60p がわずかに検出された。しかし、無処理のサンプルと S1 ヌクレアーゼ処理したサンプルの沈殿に存在する Hsp60p 量はほぼ変化していなかった。この結果は、少量の Hsp60p が *ori5* 配列の 1 本鎖 DNA に結合していることを示唆している。

mt 核様体タンパク質を詳細に分析し比較するために、ショットガン質量分析により、2 株の mt 核様体タンパク質の同定を行った。その結果、MH41-7B 株で 1300 種類のタンパク質が検出され、MH41-7B/HS40 株で 1082 種類のタンパク質が検出された。そのうち、ミトコンドリア局在と考えられるタンパク質は約 500 であった。これまでの研究で、単離 mt 核様体の分析および DNA クロスリンク実験から約 35 種類のタンパク質が mt 核様体タンパク質として報告されている(Miyakawa 2017)。これらの 35 種

類の mt 核様体タンパク質の質量分析の結果を Table. 1 にまとめた。同時に、スペクトラムカウントを用いた比較定量も行った。本研究では、どちらかの株のスペクトルカウント数が 10 以上であり、 $p < 0.01$ で fold change が 3 倍以上あるタンパク質を量比に差があるとした。35 種類の mt 核様体タンパク質は 2 株で共通に存在しており、MH41-7B 株に比べて MH41-7B/HS40 株では、シトクローム b-c₁ 複合体のサブユニット Qcr1p と Qcr2p および、 α ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのサブユニット Kgd1p、クエン酸・ α ケトグルタル酸輸送タンパク質 Ymh2p の量が減少していた。また、MH41-7B 株に比べて、MH41-7B/HS40 株の mt 核様体ではミトコンドリア DNA ポリメラーゼ(Mip1p)の量が増加していた。しかし、他の 30 種類のタンパク質については、両株の mt 核様体でほぼ同量検出された。これらの結果は、特定の mt 核様体タンパク質の結合量が MH41-7B 株と MH41-7B/HS40 株で異なることを示している。

mt 核様体からは同定されていないが、mtDNA との相互作用が予想されるタンパク質についても Table. 2 に示している。これらのタンパク質の中で MH41-7B 株に比べて MH41-7B/HS40 株では DNA ヘリカーゼである Hmi1p と Irc3p が減少していた。また、ミトコンドリア転写因子 Mtf1p は MH41-7B/HS40 株で減少しているが、検出されたスペクトル数が少ないため、明確な定量はできていない。Cce1p (相同組換え分解酵素)と Msh1p(mtDNA 修復酵素)は MH41-7B/HS40 株で若干減少している。Mhr1p (相同組換え形成に関与するタンパク質), Pim1p (LON プロテアーゼ), Nuc1p (ミトコンドリアの主要なヌクレアーゼ)は両株で変化は認められなかった。Ntg1p (塩基除去修復酵素), Din7p (mtDNA の組換え、修復に関与するヌクレアーゼ), Pif1p (ヘリカーゼ), Nuc2p (ミトコンドリアヌクレアーゼおよび tRNA メチル化転移酵素), Cdc9p (DNA リガーゼ I)は検出されなかった。

Table. 3 は gene ontology によりミトコンドリアに局在するタンパク質で量的変化が見られたタンパク質を示している。その結果、MH41-7B 株に比べて MH41-7B/HS40 株では 5 種類のミトコンドリアリボソームタンパク質が減少していた。また、ユビキノールシトクローム d レダクターゼ複合体の 2 種類のタンパク質(Rip1p, Qcr7p)も MH41-7B/HS40 株で減少していた。また、mtDNA にコードされているタンパク質では MH41-7B 株でのみ Var1p と Cox2p のみが検出された(Table. 4)。

考察

Kaufman et al. (2000)はゲルシフトアッセイにより、Hsp60p と *ori5*, *ori6*, *VARI*(ミトコンドリアリボソームの小サブユニットタンパク質), 14S rRNA の mtDNA 配列との親和性を調べた。その結果、Hsp60p は 4 つの mtDNA 配列すべてで 2 本鎖 DNA よりも 1 本鎖 DNA への親和性が高く、1 本鎖 DNA では *ori5* 配列が他の 3 つの mtDNA 配列よりも Hsp60p との親和性が高いことが示された。75 kbp の野生株の mtDNA 単位

あたりに *ori5* 配列は1カ所であるのに対して、HS40 mtDNA では、繰り返し単位が 760 bp であることから、75 kbp の mtDNA あたり約 100 カ所の *ori5* 配列が存在することになる。もし、*ori5* 配列すべてに Hsp60p が特異的に結合していると仮定すると、同量の mtDNA に対する Hsp60p の結合量は MH41-7B/HS40 株の方が野生株よりもはるかに多いと考えられる。しかし、本研究の抗 Hsp60p 抗体を用いたウェスタンブロットおよびショットガン質量分析の結果は、mt 核様体全タンパク質あたりの Hsp60p 量は MH41-7B 株と MH41-7B/HS40 株でほぼ同じであることを示している (Fig. 1b and Table. 1)。MH41-7B/HS40 株の S1 ヌクレアーゼ処理によって一部分の mtDNA の分解がみられ、わずかな Hsp60p が上清に遊離した (Fig. 2b)。ことから、ごく一部分の *ori5* 配列は1本鎖になっており、その部分に Hsp60p が結合していることが示唆される。mt 核様体タンパク質あたりの Hsp60p 量は、MH41-7B 株と MH41-7B/HS40 株でほぼ同じであることから、多くの *ori5* 配列には Hsp60p は特異的に結合していないと考えられる。mt 核様体における Hsp60p の機能については不明であるが、Hsp60p は mtDNA に配列非選択的に結合しているか、もしくは mtDNA には直接結合しておらず、DNA 結合タンパク質を介して間接的に mtDNA と結合しているのかもしれない。

Newman et al. (1996) は、野生株と $\Delta abf2$ 株から単離したミトコンドリアを用いてオルガネラ内での DNase I 処理を行った。その結果、ミトコンドリアリボソーム小サブユニットタンパク質をコードする *VAR1* の mtDNA 配列と、シトクロム C オキシダーゼサブユニット 2 をコードする *COXII* の mtDNA 配列が、野生株よりも $\Delta abf2$ 株で DNase I 感受性が高いことを示した。一方、*ori5* 配列の DNase I 感受性は、野生株と $\Delta abf2$ 株の間で変化がないことを明らかにした。また、以前の研究で、mtDNA の維持および修復に関与する Mgm101p の欠損が、*rho*⁺ mtDNA および *ori* 配列を持たない *rho*⁻ mtDNA の消失を導くが、*ori* 配列を持つ *rho*⁻ mtDNA は Mgm101p の欠損によっても維持されることを明らかにしている (Zuo et al. 2002)。本研究で、MH41-7B 株と MH41-7B/HS40 株の単離 mt 核様体タンパク質組成を SDS-PAGE 及び質量分析により比較した。その結果、MH41-7B 株に比べて MH41-7B/HS40 株では、Qcr1p、Qcr2p、Kgd1、Ymh2p の量が減少していた。MH41-7B 株に比べて、MH41-7B/HS40 株の mt 核様体では DNA ポリメラーゼ (Mip1p) の量が増加していた。Mip1p の結合量が MH41-7B/HS40 株で増加したことから、Mip1p には *ori5* 配列への親和性があるのかもしれない。*ori5* 配列は、Mip1p だけではなく、RNA ポリメラーゼ (Rpo41p)、転写因子 (Mtf1p)、1本鎖 DNA 結合タンパク質 (Rim1p) などが結合することで複製開始点として機能すると考えられる。質量分析の結果からは、Mtf1p は検出されたが、検出されたスペクトル数が少なかった。また、Rpo41p と Rimp では結合量に差は認められなかった。第1章で述べたように、もし短い *ori5* 配列が繰り返す HS40 mtDNA で相同組換え頻度が高いと仮定すると、相同組換えの促進に関与する Mhr1p と組換え中間体の解離に関与する Cce1p の増加が、MH41-7B/HS40 株 mt 核様体で期待できる。質量分析の結

果では、Mhr1p は検出量が少ないため明確な定量はできないが、MH41-7B 株と MH41-7B/HS40 株であまり差はないと思われる。Cce1p は MH41-7B/HS40 株で若干減少している。mt 核様体タンパク質の組成は、酵母の培養ステージで変化する可能性がある。本研究では、栄養成長定常期に近い細胞から mt 核様体を単離しているため、今後は対数増殖期の mt 核様体の分析も必要であると思われる。

以前の研究で、Shiiba et al. (1997)らは DNA-cellulose カラムを用いて、*rho*⁺ 株と *rho*⁻ 株の単離 mt 核様体から DNA 結合タンパク質を分離して、その組成を比較した。その結果、*rho*⁻ 株の mt 核様体では 67 kDa と 52 kDa のタンパク質が著しく減少していることを示した。その後の研究により、67 kDa タンパク質は carnitine acetyl-CoA transferase (Cat2p)であることが示唆されている (佐藤 浩 2002)。これまで、Cat2p はオルガネラ内ホルムアルデヒド・クロスリンク法を用いた研究では、mt 核様体タンパク質として検出されていない。本研究における質量分析では、Cat2p が両者の mt 核様体で検出され、スペクトルカウントでは HS40 *rho*⁻ mt 核様体で野生株の 1/3 に減少していた。また、これまでの研究から 52 kDa タンパク質は α -ketoglutarate dehydrogenase subunit のひとつ Lpd1p であることが示唆される (Sato et al. 2002)。Lpd1p はオルガネラ内ホルムアルデヒド・クロスリンク法を用いた研究では、mt 核様体タンパク質として検出されている (Chen et al. 2005)。質量分析の結果、スペクトルカウントでは Lpd1p は HS40 *rho*⁺ mt 核様体で野生株の約 1/2 であった。これらのタンパク質の量的変動が、mt 核様体の形態変化に関わっているかは今後の検討課題である。

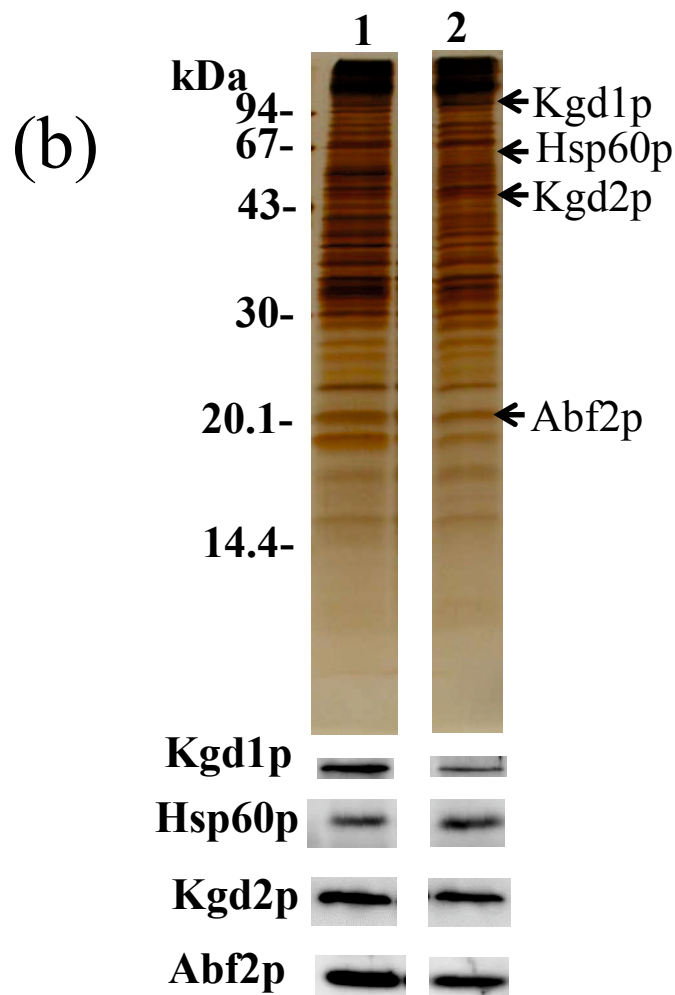
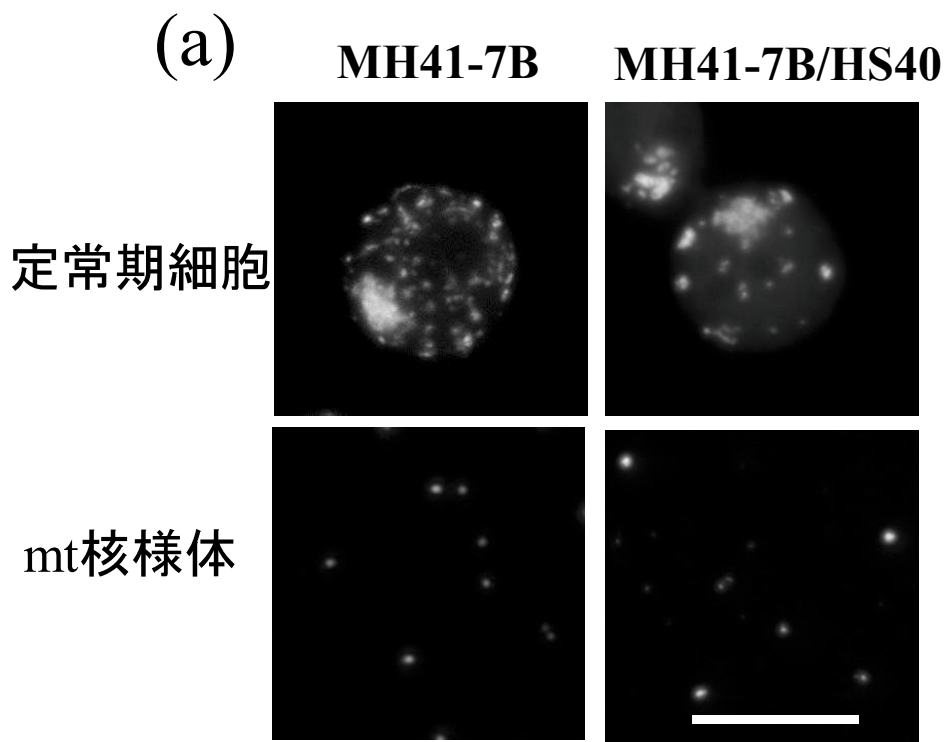


Fig. 1 2株のmt核様体タンパク質の分析

(a)定常期細胞および単離mt核様体のDAPI染色像。上の図が定常期細胞のDAPI染色像であり、下の図が単離mt核様体のDAPI染色像である。バーは5 μ mを示す。(b) 2株のmt核様体タンパク質組成の比較。Lane1はMH41-7B株のmt核様体、Lane2はMH41-7B/HS40株のmt核様体を示し、mt核様体タンパク質を15%SDS-PAGEにより分離した。タンパク質量はLowry法により各レーン5 μ gに合わせた。銀染色像の下に、抗Kgd1抗体、抗Hsp60p抗体、抗Kgd2抗体、抗Abf2p抗体を用いたウェスタンブロットの結果を示す。

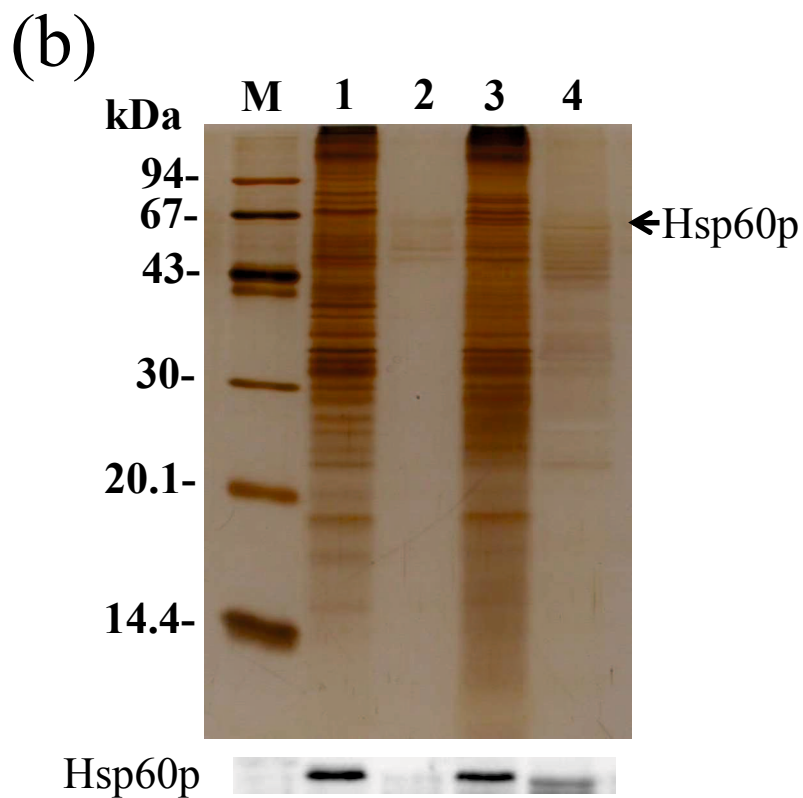
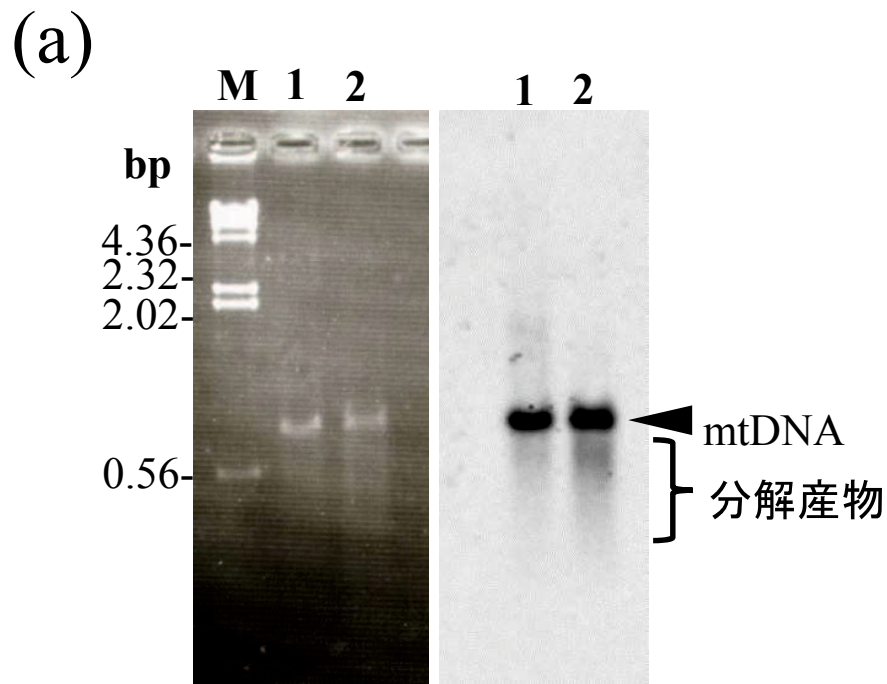


Fig. 2 S1ヌクレアーゼ処理によるmt核様体の解析

(a) S1ヌクレアーゼ処理による単離mt核様体内のmtDNAの分解。 Lane 1はコントロールの試料であり、S1ヌクレアーゼ無添加で同じ処理を行い、その後、EcoRV処理を行った。 Lane 2は、S1ヌクレアーゼ処理後にEcoRV処理を行った。左の図はEtBr染色、右の図はサザンブロット。(b) S1ヌクレアーゼによるmt核様体タンパク質の遊離。 Lane 1,2はS1ヌクレアーゼ無添加で処理を行い、 Lane 3,4はS1ヌクレアーゼ処理した。 Lane 1,3は遠心後の沈殿であり、 Lane 2,4は遠心後の上清である。上の図は銀染色像を示し、下の図は抗Hsp60p抗体を用いたウェスタンブロットを示す。

Table. 1 mt核様体タンパク質として同定されているタンパク質

タンパク質名	タンパク質の機能	HS40		WT		fold change	p値
		1	2	1	2		
Abf2	DNA packaging	41	47	64	66	0.7	0.041
Rim1	Single-stranded DNA binding	26	19	27	26	0.8	0.5
Mgm101	mtDNA maintenance and repair	14	15	25	30	0.5	0.018
Ssc1	Mitochondrial chaperonin	46	44	37	32	1.3	0.0063
Hsp60	Mitochondrial chaperonin	38	34	32	32	1.1	0.075
Ilv5	Acetohydroxy acid reductoisomerase	22	24	26	22	1.0	0.35
Kgd2	α -ketoglutarate dehydrogenase subunits	11	10	15	14	0.7	0.31
Kgd1	α -ketoglutarate dehydrogenase subunits	13	9	33	37	0.3	<0.0001
Lpd1	α -ketoglutarate dehydrogenase subunits	25	26	51	51	0.5	0.00067
Lat1	Pyruvate dehydrogenase subunits	20	22	34	39	0.6	0.02
Pda1	Pyruvate dehydrogenase subunits	24	21	30	35	0.7	0.16
Pdb1	Pyruvate dehydrogenase subunits	19	17	23	22	0.8	0.4
Ald4	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	28	28	24	30	1.0	0.2
Aco1	Aconitase	82	82	42	42	1.5	<0.0001
Atp1	F1-ATPase subunit	42	39	34	36	1.2	0.053
Atp2	F1-ATPase subunit	53	53	40	44	1.3	0.0058
Ndi1	NADH-ubiquinone-6 oxidoreductase	36	42	69	58	0.6	0.0093
Qcr1	Ubiquinol-cytochrome c reductase	2	1	29	32	0.05	<0.0001
Qcr2	Ubiquinol-cytochrome c reductase	9	10	31	35	0.3	<0.0001
Mrp4	Mitochondrial ribosomal protein	25	23	18	19	1.3	0.04
Mrpl17	Mitochondrial ribosomal protein	29	21	22	25	1.1	0.18
Mnp1	Mitochondrial ribosomal protein	12	15	22	18	0.7	0.16
Mdh3	Malate dehydrogenase	38	30	49	46	0.7	0.13
Rpo41	RNA polymerase	35	29	31	31	1.0	0.19
Sls1	Mitochondrial translation	4	5	3	2	1.8	0.14
Mdj1	Mitochondrial chaperonin	83	83	80	92	1.0	0.17
mtHsp10	Mitochondrial chaperonin					0.0	
Ilv6	Acetolactate synthase regulatory subunit	14	16	21	18	0.8	0.36
ldh1	NAD ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase	32	30	30	33	1.0	0.27
ldp1	NAD ⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase	6	7	16	13	0.4	0.03
Cha1	L-serine/L-threonine deaminase			2	3	0.0	0.044
Lsc1	Succinate-CoA ligase α subunit	5	6	3	2	2.2	0.061
Arg5,6	Arginine biosynthesis	26	25	29	32	0.8	0.46
Mip1	DNA polymerase gamma	14	14	2	2	7.0	<0.0001
Yhm2	Citrate and oxoglutarate carrier protein	10	11	34	31	0.3	<0.0001

mt核様体タンパク質とすでに同定されているタンパク質のみのスペクトル数及び fold change, p値を示す。HS40がMH-7B/HS40株を示し、WTがMH41-7B株を示している。黄色で示しているタンパク質がMH41-7B/HS40株で減少している。青色で示しているタンパク質がMH41-7B/HS40株で増加している。

Table. 2 mtDNAと相互作用が予想されるタンパク質

タンパク質名	タンパク質の機能	HS40		WT		fold change	p値
		1	2	1	2		
Ntg1	excision-repair enzyme					0.0	
Mtf1	Transcription factor	2	1	4	6	0.3	0.077
Cce1	cruciform cutting endonuclease	7	7	18	17	0.4	0.0082
Mhr1	homologous recombination	6	6	7	7	0.9	0.54
Msh1	mtDNA repair	10	10	19	22	0.5	0.021
Din7	mtDNA repair and recombination					0.0	
Nuc1	mitochondrial nuclease	20	23	27	32	0.7	0.22
Nuc2	tRNA methyltransferase					0.0	
Pif1	DNA helicase	2	2		1	4.0	0.15
Hmi1	mtDNA helicase	1	1	11	11	0.09	<0.0001
IRC3	DNA helicase	3	1	16	18	0.1	<0.0001
Cdc9	DNA ligase I					0	
Pim1	LON protease	46	52	40	50	1.1	0.077

mtDNAと相互作用が予想されるタンパク質のみのスペクトル数及びfold change, p値を示す。HS40がMH41-7B/HS40株を示し、WTがMH41-7B株を示している。黄色で示しているタンパク質がMH41-7B株で増加している。

Table. 3 ミトコンドリアに局在するタンパク質の中で量比が変化しているタンパク質

タンパク質名	タンパク質の機能	HS40		WT		fold change	p値
		1	2	1	2		
RSM28	Mitochondrial ribosomal protein	0	0	15	15	0.0	<0.0001
MRPS17	Mitochondrial ribosomal protein	2	2	14	14	0.1	<0.0001
IMG1	Mitochondrial ribosomal protein	3	3	11	10	0.3	0.0085
MRPL16	Mitochondrial ribosomal protein	0	0	12	8	0.0	<0.0001
MRPL6	Mitochondrial ribosomal protein	2	1	12	13	0.1	<0.0001
MRX3	Association with mitochondrial ribosome	0	0	10	12	0.0	<0.0001
PET127	processing of mitochondrial RNAs	7	4	24	25	0.2	<0.0001
RPM2	RNase P	2	3	13	13	0.2	0.00041
TRM1	tRNA methyltransferase	3	4	13	12	0.3	0.0037
RIP1	Ubiquinol-cytochrome-c reductase	0	0	11	9	0.0	<0.0001
QCR7	Ubiquinol cytochrome-c reductase	0	0	9	13	0.0	<0.0001
CAT2	Carnitine acetyl-CoA transferase	19	17	59	69	0.3	<0.0001
YAT1	carnitine acetyltransferase	0	0	8	10	0.0	<0.0001
SDH1	succinate dehydrogenase	7	6	24	22	0.3	<0.0001
NDE2	NADH dehydrogenase	0	0	10	11	0.0	<0.0001
APN1	apurinic/aprimidinic endonuclease	0	0	10	10	0.0	<0.0001
PIC2	Mitochondrial copper and phosphate carrier	5	6	16	18	0.3	0.002
YMC1	inner membrane glycine transporter	4	4	15	13	0.3	0.0024
MDL1	half-type ABC transporter	6	8	27	26	0.3	<0.0001
OM45	Mitochondrial outer membrane protein	3	1	26	29	0.07	<0.0001
GEM1	subunit of the ERMES complex	3	4	12	16	0.3	0.0037
YCP4	unknown function	4	5	12	17	0.3	0.0033
RAS2	GTP-binding protein	1	3	11	9	0.2	0.0024

タンパク質名	タンパク質の機能	HS40		WT		fold change	p値
		1	2	1	2		
HXK1	Hexokinase isoenzyme 1	14	18	4	4	4	<0.0001
HXK2	Hexokinase isoenzyme 2	19	16	1	0	35	<0.0001
GUS1	Glutamyl-tRNA synthetase	17	17	4	3	4.9	<0.0001
ALA1	Cytoplasmic and mitochondrial alanyl-tRNA synthetase	12	12	4	2	4	0.00017
ENO2	phosphopyruvate hydratase	12	13	5	3	3.1	0.00059
DLD3	2-hydroxyglutarate transhydrogenase	12	13	0	1	25	<0.0001
PFK2	heterooctameric phosphofructokinase	26	29	8	6	3.9	<0.0001
TMA19	association with ribosomes	12	9	2	3	4.2	0.00036
IML2	clearance of inclusion bodies	11	13	0	1	24	<0.0001
HEM14	Protoporphyrinogen oxidase	14	13	2	2	6.8	<0.0001
HSC82	Chaperonin	13	14	4	4	3.4	0.00021

ミトコンドリアに局在するタンパク質の中で量比が変化しているタンパク質のみのスペクトル数及びfold change, p値を示す。HS40がMH41-7B/HS40株を示し、WTがMH41-7B株を示している。上の表がMH41-7B株で増加しているタンパク質を示し、下の表がMH41-7B/HS40株で増加しているタンパク質を示す。

Table. 4 mtDNAにコードされたタンパク質

タンパク質名	タンパク質の機能	HS40		WT		fold change	p値
		1	2	1	2		
Cox2	cytochrome c oxidase			7	8	0	<0.0001
Cox1	cytochrome c oxidase					0	
Cox3	cytochrome c oxidase					0	
Var1	Mitochondrial ribosomal protein			8	9	0	<0.0001
atp6	F0-ATPase subunit					0	
atp8	F0-ATPase subunit					0	
atp9	F0-ATPase subunit					0	
COB	cytochrome b					0	

mtDNAにコードされたタンパク質のみのスペクトル数及びfold change, p値を示す。HS40がMH41-7B/HS40株を示し、WTがMH41-7B株を示している。

全体の考察

本研究では、DAPI 染色法を用いて、 ρ^+ 株と ρ^- 株の mt 核様体形態を詳細に観察した。その結果、mt 核様体の形態に最も影響を及ぼす要因は、呼吸活性や細胞内の mtDNA コピー数、およびミトコンドリアが保持する特定の mtDNA の塩基配列ではなく、保持する mtDNA 配列の単位の長さであることを明らかにした。そして、複製起点 *ori5* 配列の繰り返しを保持する HS40 ρ^- 株の単離 mt 核様体の分析から、HS40 ρ^- 株で観察される凝集型 mt 核様体は、様々なサイズの環状オリゴマー-mtDNA と直鎖状コンカテマー-mtDNA の集合により形成されていることが示唆された。本研究から推論すると、HS40 ρ^- 株で観察された凝集型 mt 核様体は、mt 核様体の分配が正常に起こらない結果として形成されている可能性がある。

以前の研究から、相同組換え分解酵素 *cce1* 欠損株で mt 核様体の凝集が起きること、mt 核様体の凝集の割合が ρ^+ 株よりも *hypersuppressive* ρ^- 株で高いことが報告されている(Lockshon et al. 1995)。これらの結果は、短い mtDNA 配列を含む mt 核様体の分配には mtDNA の相同組換えが重要であることを示唆している。今後は、mtDNA の相同組換えに関与する様々な遺伝子の変異体の mt 核様体を分析することで、mt 核様体の凝集と mtDNA の相同組換え、および mt 核様体の分配がどのように相互に関連しているかを明らかにする必要がある。ヒト細胞において、ヘリカーゼ Twinkle 変異体の発現が、mt 核様体の凝集と mtDNA の欠失を引き起こすことが報告されている(Goffart et al. 2009)。また、ヒトのミトコンドリア病においても、mtDNA の欠失が認められる場合がある。今後、酵母 ρ^- 株の mt 核様体研究が、mtDNA の欠失が mt 核様体の凝集と分配異常を生じる仕組みの解明に役立つことが期待できる。

本研究での ρ^+ 株と ρ^- 株の単離 mt 核様体のタンパク質の比較分析で、4種類の mt 核様体タンパク質の減少が認められた。現在同定されている 35種類の酵母 mt 核様体タンパク質においても、mt 核様体における機能が不明なものが多く、この4種類のタンパク質もまた mt 核様体における機能は全く不明である。今後、これらのタンパク質の欠損株や過剰発現株における mt 核様体形態を分析することで、mt 核様体の維持や分配における役割を明らかにできると考えられる。

本研究では定常期細胞から mt 核様体を単離し分析した。しかし、ミトコンドリアは極めて動的なオルガネラであり、mt 核様体自体も対数期の数珠状から定常期の粒子状に形態を変化させる。mt 核様体の形態変化に伴い、mt 核様体を構成するタンパク質自体も対数期と定常期では変化していることは十分考えられる。対数期細胞からの mt 核様体の単離方法を開発し、mt 核様体タンパク質を液体クロマトグラフィータンデム分析法により解析することで、mtDNA 複製、転写、翻訳における mt 核様体タンパク質の役割をより明確にできることが期待される。

謝辞

本研究では実験から論文作成にいたるまで、助言およびご指導をいただいた山口大学理学部宮川 勇先生に深く感謝いたします。また、プラスミド作成等の様々な実験で適切な助言を頂いた大阪大学医学系研究科 附属共同研究実習センター 井内智美博士、質量分析において協力を頂いた東京大学アイソトープ総合センター プロテオミクス研究室 川村猛先生に感謝いたします。

参考文献

- Akada, R., Kawahata, M., and Nishizawa, Y. (2000) Elevated temperature greatly improves transformation of fresh and frozen competent cells in yeast. *BioTechniques* **28**: 854-856.
- Blanc, H. and Dujon, B. (1980) Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 3942-3946
- Bogenhagen, D. F. (2012) Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**: 914-920.
- Chen, X. J., Wang, X., Kaufman, B. A. and Butow, R. A. (2005) Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* **307**: 714-717.
- Chen, X. J. and Butow, R. A. (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 815-825.
- Contamine, V. and Picard, M. (2000) Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 281-315
- de Zamaroczy, M. and Bernardi, G. (1986) The GC clusters of mitochondrial genome of yeast and their evolutionary origin. *Gene* **41**: 1-22
- de Zamaroczy, M., Marotta, R., Faugeron-Fonty, G., Goursot, R., Mangin, M., Baldacci, G. and Bernardi, G. (1981) The origins of replication of yeast mitochondrial genome and the phenomenon of suppressivity. *Nature* **292**: 75-78
- Diffley, J. F. and Stillman, B. (1991) A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 7864-7868.
- Dujon, B. (1981) Mitochondrial genetics and functions. In: Strathern J. N., Jones, E. W., and Broach, J. R. (eds). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 505-635.

Gilkerson, R. W. (2009) Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**: 1899-1906.

Goffart S., Cooper H. M., Tynismaa H., Wanrooij S., Suomalainen A. and Spelbrink J. N. (2009) Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling. *Hum. Mol. Genet.* **18**: 328-340

Hori, A., Yoshida, M., Shibata, T. and Ling, F. (2009) Reactive oxygen species regulate DNA copy number in isolated yeast mitochondria by triggering recombination-mediated replication. *Nucleic Acid Res.* **37**: 749-761

Hudspeth, M. E., Shumard, D. S., Tatti, K. M. and Grossman, L. I. (1980) Rapid purification of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) mitochondrial DNA in high yield. *Biochim. Biophys. Acta* **610**: 221-228.

Jensen, R., Sprague, G. F. and Herskowitz, I. (1983) Regulation of yeast mating-type interconversion: feedback control of HO gene expression by the mating-type locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 3035-3039.

Kaufman, B. A., Newman, S. M., Hallberg, R. L., Slaughter, C. A., Perlman, P. S. and Butow, R. A. (2000) *In organello* formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 7772-7777.

Kuroiwa, T. (1982) Mitochondrial nuclei. *Int. Rev. Cytol.* **75**: 1-59.

Kucej, M., Kucejova, B., Subramanian, R., Chen, X. J. and Butow, R. A. (2008) Mitochondrial nucleoids undergo remodeling in response to metabolic cues. *J. Cell Sci.* **121**: 1861-1868.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lecrenier, N. and Foury, F. (2000) New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* **246**: 37-48.

Lewin, A., Morimoto, R., Rabinowitz, M. and Fukuhara, H. (1978) Restriction enzyme analysis

of mitochondrial DNAs of petite mutants of yeast: classification of petites, and deletion mapping of mitochondrial genes. *Mol. Gen. Genet.* **163**: 257-275.

Ling, F., Hori, A. and Shibata, T. (2007) DNA recombination-initiation plays a role in the extremely biased inheritance of yeast *rho*⁻ mitochondrial DNA that contains the replication origin *ori5*. *Mol. Cell Biol.* **27**: 1133-1145.

Ling, F., Hori, A., Yoshitani, A., Niu, R., Yoshida, M. and Shibata, T. (2013) Din7 and Mhr1 expression levels regulate double-strand-break-induced replication and recombination of mtDNA at *ori5* in yeast. *Nucleic Acid Res.* **41**: 5799-5816.

Lockshon, D., Zweifel, S. G., Freeman-Cook, L. L., Lorimer, H. E., Brewer, B. J. and Fangman, W. L. (1995) A role for recombination junctions in the segregation of mitochondrial DNA in yeast. *Cell* **81**: 947-955.

MacAlpine, D. M., Kolesar, J., Okamoto, K., Butow, R. A. and Perlman, P. S. (2001) Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *EMBO J.* **20**:1807-1817.

MacAlpine, D. M., Perlman, P. S. and Butow, R. A. (1998) The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 6739-6743.

MacAlpine, D. M., Perlman, P. S. and Butow, R. A. (2000) The numbers of individual mitochondrial DNA molecules and mitochondrial DNA nucleoids in yeast are co-regulated by the general amino acid control pathway. *EMBO J.* **19**: 767-775.

Miyakawa, I. (2017) Organization and dynamics of yeast mitochondrial nucleoids. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **93**: 339-359.

Miyakawa, I., Aoi, H., Sando, N. and Kuroiwa, T. (1984) Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **66**: 21-38.

Miyakawa, I., Fumoto, S., Kuroiwa, T. and Sando, N. (1995) Characterization of DNA-binding proteins involved in the assembly of mitochondrial nucleoids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell Physiol.* **36**: 1179-1188.

Miyakawa I, Kanayama M, Fujita Y and Sato H (2010) Morphology and protein composition of the mitochondrial nucleoids in yeast cells lacking Abf2p, a high mobility group protein. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**: 455-464.

Miyakawa, I., Miyamoto, M., Kuroiwa, T. and Sando, N. (2004) DNA content of individual mitochondrial nucleoids varies depending on the culture conditions of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytologia* **69**: 101-107.

Miyakawa, I., Sando, N., Kawano, S., Nakamura, S. and Kuriowa, T. (1987) Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **88**: 431-439.

Nagley, P. and Mattick, J. S. (1977) Mitochondrial DNA replication in petite mutants of yeast: resistance to inhibition by ethidium bromide, berenil and euflavine. *Mol. Gen. Genet.* **152**: 277-283.

Newman, S. M., Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P. S. and Butow, R. A. (1996) Analysis of mitochondrial DNA nucleoids in wild-type and a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that lacks the mitochondrial HMG box protein Abf2. *Nucleic Acids Res.* **24**: 386-393.

Prachar, J. (2010) Mouse and human mitochondrial nucleoids – detailed structure in relation to function. *Gen. Physiol. Biophys.* **29**: 160-174.

Rose, M. D. and Fink, G. R. (1987) KAR1, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell* **48**: 1047-1060.

Sanchez-Sandoval, E., Diaz-Quezada, C., Velazquez, G., Arroyo-Navarro, L. F., Almanza, N., Transviña-Arenes, C. H. and Briebe, L. G. (2015) Yeast mitochondrial RNA polymerase primes mitochondrial DNA polymerase at origins of replication and promoter sequences. *Mitochondrion* **24**: 22-31.

佐藤 浩 (2002) 博士論文

Sato, H., Tachifuji, A. Tamura, M. and Miyakawa, I. (2002) Identification of the YMN-1 antigen protein and biochemical analyses of protein components in the mitochondrial nucleoid fraction of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma* **219**: 51-58

Shiiba, D., Fumoto, S. -I., Miyakawa, I. and Sando, N. (1997) Isolation of giant mitochondrial nucleoids from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma* **198**: 177-185.

Shiiba, D., Miyakawa, I. and Sando, N. (2005) Dynamic changes in mitochondrial nucleoids during the transition from anaerobic to aerobic culture in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytologia* **70**: 287-293.

Slonimski, P. P., Perrodin, G. and Croft, J. H. (1968) Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal "petites". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**: 232-239.

Sor, F. and Fukuhara, H. (1982) Identification of two erythromycin resistance mutations in the mitochondrial gene coding for the large ribosomal RNA in yeast. *Nucleic Acid Res.* **10**: 6571-6577.

Stevens, B. (1981) Mitochondrial structure. In: Strathern, J. N., Jones, E. W., and Broach, J. R. (eds). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 471-504.

Westermann, B. and Neupert, W. (2000) Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: Convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 1421-1427.

Xu, B. and Clayton, D. A. (1995) A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Mol. Cell Biol.* **15**: 580-589

Zelenaya-Troitskaya, O., Newman, S. M., Okamoto, K., Perlman, P. S. and Butow, R. A. (1998) Functions of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **148**: 1763-1776.

Zuo, X. M., Clark-Walker, G. D and Chen, X. J. (2002) The mitochondrial nucleoid protein, Mgm101p, of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the maintenance of rho^+ and *ori/rep*-devoid petite genomes but is not required for hypersuppressive rho^- mtDNA. *Genetics* **160**: 1389-1400.