119. ミトコンドリアゲノムを正確に複製する制御機構の解析

加生　和寿

九州大学 大学院薬学研究院 分子生物薬学分野

Key words：ミトコンドリア，mtDNA，複製，コピー数制御，試験管内再構成

緒　言

真核生物において、ミトコンドリアは細胞活動に必要なエネルギーである ATP の産生を担う細胞内小器官である。ミトコンドリア独自のゲノム mtDNA は 1 細胞当たり数千コピー存在し、ATP 産生に必須の電子伝達系の酵素群を発現する。従って mtDNA のコピー数や遺伝情報の安定維持は健康な生命活動において重要である。mtDNA 複製は核 DNA 複製装置と異なる因子で構成され、リーディング鎖-ラギング鎖共役型あるいは非共役型の複製モードが適切に使い分けられる（図 1）［1，2］。このように mtDNA 複製機構の全容が明らかにありつつある一方で、mtDNA コピー数と遺伝情報の維持やラギング鎖共役型複製の分子機構など未解明な点が多い。さらに、mtDNA 複製制御の破綻は mtDNA の大規模欠損を誘導し、細胞のエネルギー産生の阻害、ひいてはミトコンドリア病を含む種々の疾患が誘発される。しかしながら mtDNA 欠損を回避するための分子機構は未解明である。問題点として、ラギング鎖共役型 mtDNA 複製や mtDNA 欠損反応が試験管内再構成されておらず、その制御機構を解析する手段がないことが挙げられる。本研究の目的は、ミトコンドリア粗抽出液を用いてラギング鎖共役型 mtDNA 複製と mtDNA 欠損反応を再構成し、mtDNA のコピー数制御と遺伝情報の維持がいかにして達成されているか解明することにある。

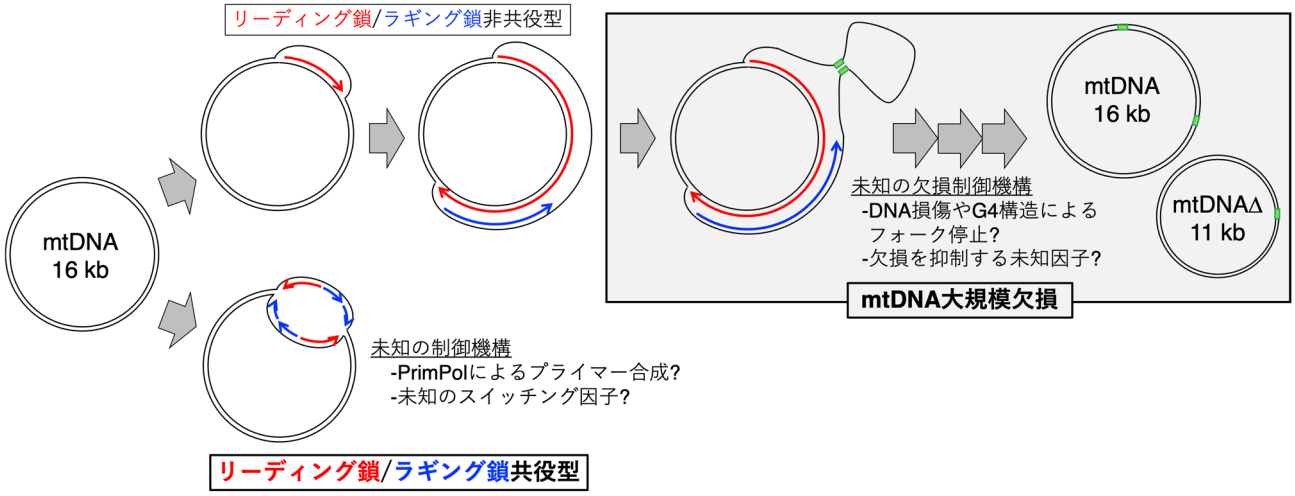

図 1. 高等真核生物 mtDNA 複製モードと mtDNA 大規模欠損の概要
mtDNA はリーディング鎖とラギング鎖合成が同時に起こらない『非共役型』、あるいは並行して合成される『共役型』のモードにより複製される。mtDNA 複製の異常は mtDNA コピー数低下や大規模欠損し得る。現在のところ、ラギング鎖共役型 mtDNA 複製や mtDNA-D 産生の分子機構は未解明である。

試験管内での mtDNA 複製解析ではヒト mtDNA 複製装置のリコンビナント蛋白質を用いた解析が主流である。しかしながら、ヒトを材料に用いた場合には試験管内での制御因子の探索に十分なミトコンドリア画分を得ることが困難である。実際、これまでに行われてきた制御因子の探索は mtDNA 複製装置の相互作用因子など非常に限定的であり、活性制御因子はほとんど未同定であると推察される。これらの背景から本研究では、ヒトと類似の mtDNA、及び mtDNA 複製装置を有し、かつミトコンドリア画分の大量調製が比較的容易なアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）を材料に用いる［3，4］。本研究では mtDNA 複製の制御因子を解析するための新たな試験管内実験系の確立に挑んだ。第一に、過去の報告に倣って *X. laevis* 卵由来ミトコンドリア粗抽出液を調製し、mtDNA 複製の試験管内再構成を確立すべく検討を行った。第二に、*X. laevis* 卵由来精製ミトコンドリア画分を用いた試験管内でのミトコンドリア内 mtDNA コピー数解析系の構築を新たに試みた。

方　法

1. アフリカツメガエル卵ミトコンドリア抽出液の調製

過去の報告に倣い以下の方法で *X. laevis* 卵由来ミトコンドリア粗抽出液を調製した［3，4］。*X. laevis* 卵を遠心処理により細胞内小器官などを分離させ、パスツールピペットを用いてミトコンドリアを含む脂質層を回収した。次に 15%スクロースを含むバッファーで複数回洗浄し、2 層のスクロースグラジエント法により高純度のミトコンドリア画分を回収した。その後、必要に応じてマイルドな界面活性剤であるジギトニンで処理することでミトコンドリア外膜を除去した。これら高純度のミトコンドリア溶液を界面活性剤 Triton X-100 で処理することで内膜を破壊し、遠心することでミトコンドリア抽出液を得た。

2. ミトコンドリア抽出液を用いた試験管内 mtDNA 複製

鋳型 DNA には pBR322 プラスミドに全長 *X. laevis* mtDNA をクローニングしたものを使用した。鋳型 DNA と上記の要領で調製した *X. laevis* 卵由来ミトコンドリア粗抽出液を混合させた後、^{32}P 放射標識した dATP を含むヌクレオチド含有反応バッファーにおいて 37℃で加温した。複製量や複製産物の解析は、①フィルターバインディング法、②アルカリアガロースゲル電気泳動法、③制限酵素を用いた複製部位の特定の 3 種類の解析により行った。

① フィルターバインディング法 : 反応後速やかに 10%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させ、ガラスフィルターを用いて DNA を回収する。液体シンチレーションカウンターによりガラスフィルター上の^{32}P 量を測定することで *X. laevis* 卵由来ミトコンドリア粗抽出液の複製活性を測定した。

② アルカリアガロースゲル電気泳動法 : 反応後速やかに SDS 入りの反応停止液を加えて反応を停止させ、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈澱により DNA を回収する。その後、DNA を NaOH 入りアガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、複製産物を解析した。

③ 制限酵素を用いた複製部位の特定 : 過去の報告に倣い、反応後の DNA を制限酵素処理、電気泳動することで複製開始部位の特定を試みた［3，4］。

3. 精製ミトコンドリア画分を用いた試験管内 mtDNA コピー数解析

上記の方法で精製した高純度のミトコンドリア画分をヌクレオチド含有反応バッファーにおいて 37℃で 1～3 日加温した。その後、mtDNA コピー数を定量 PCR 法により解析した。

結果および考察

1. アフリカツメガエル卵ミトコンドリア抽出液による mtDNA 複製の試験管内再構成を試みた

本研究では第一に、*X. laevis* 卵由来ミトコンドリア画分を材料とし試験管内での mtDNA 複製再構成系の確立を試みた。現在までに私は、過去の報告［3，4］に倣い *X. laevis* 卵由来ミトコンドリア画分の調製、および粗抽出液の調製に成功した（図 2a；九州大学高橋達郎教授との共同研究）。次に私は、ミトコンドリア抽出液を用いて mtDNA 複製の試験管内再構成に向けた実験条件の最適化を試みた。鋳型には pBR322 プラスミド（高コピー、大腸菌細胞から精製）に *X. laevis* 由来全長 mtDNA（*X. laevis* 卵由来ミトコンドリア画分から精製）をクローニングすることで作製した pBR322-XmtDNA を使用することとした。始めにミトコンドリア抽出液が試験管内で複製活性を有するかフィルターバインディング法により解析したところ、pBR322（ネガティブコントロール）を鋳型として用いた実験ではほとんど複製活性を示さなかったのに対し、pBR322-XmtDNA を鋳型として用いた実験ではミトコンドリア抽出液の添加量に応じて複製活性を示した（未発表データ）。次に、このミトコンドリア抽出液による試験管内 mtDNA 複製系で複製開始部位 OriH を含む非コード領域からの特異的な複製開始反応を見ているか否かアルカリアガロースゲル電気泳動法により解析した。その結果、反応開始 3～10 分という非常に短い時間で pBR322-XmtDNA 全体で一様なシグナルが得られた（未発表データ）。この結果は特定の部位からの複製開始ではなく部位に依らない非特異的な複製開始を見ていることを示唆している。制限酵素を用いた複製部位の特定［3］による解析も同様の結論を示唆していた（未発表データ）。これらの結果は今回調製したミトコンドリア抽出液が活性のある複製装置群を有していることを示しているが、一方で mtDNA 複製開始には転写との共役が必要である点などを考慮すると今後もさらなる条件検討を重ねることで複製開始の部位特異性を向上させる必要がある。

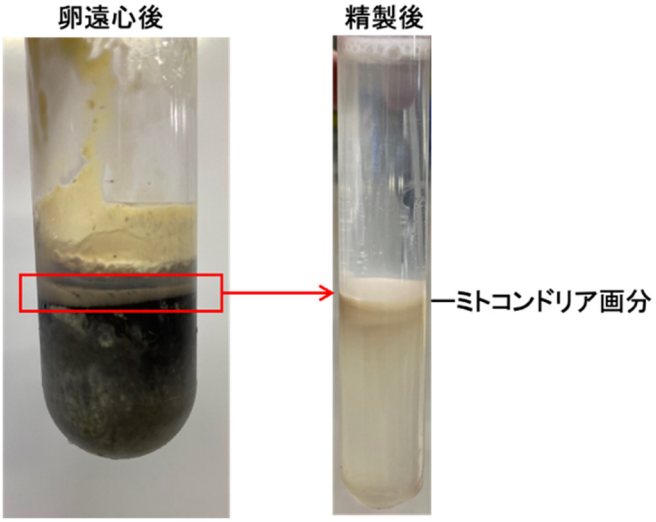

図2. アフリカツメガエル卵からのミトコンドリア画分の精製
過去の論文にしたがって *X. laevis* 卵の遠心処理により得たミトコンドリアを含む脂質層から、スクロースグラジエント法により高純度のミトコンドリア画分を精製した。

2. アフリカツメガエル卵由来精製ミトコンドリア画分を用いた mtDNA コピー数解析系の検討を行った

上述の通り、ミトコンドリア抽出液による試験管内 mtDNA 複製系と並行して精製ミトコンドリア画分を用いた試験管内でのミトコンドリア内 mtDNA コピー数解析系を新たに構築することを試みた。その結果、1～3 日の加温により mtDNA コピー数が 2～3 倍に増加している様子が観察された（未発表データ）。この値はヒト培

養細胞を用いた実験結果と一致するものであり、細胞内での mtDNA 複製と同様の反応を試験管内でも解析できる可能性が示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院理学研究院染色体機能学研究室の高橋達郎教授である。

文　献

1) Yasukawa T, Kang D. An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms. *J Biochem.* 2018 Sep 1;164(3):183-193. doi: 10.1093/jb/mvy058. PMID: 29931097; PMCID: PMC6094444.

2) Falkenberg M, Gustafsson CM. Mammalian mitochondrial DNA replication and mechanisms of deletion formation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2020 Dec;55(6):509-524. doi: 10.1080/10409238.2020.1818684. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32972254.

3) Dunon-Bluteau D, Cordonnier A, Brun G. DNA synthesis in a mitochondrial lysate of *Xenopus laevis* oocytes. H strand replication *in vitro. J Mol Biol.* 1987 Sep 20;197(2):175-85. doi: 10.1016/0022-2836(87)90116-1. PMID: 3119861.

4) Brun G, Vannier P, Scovassi I, Callen JC. DNA topoisomerase I from mitochondria of *Xenopus laevis* oocytes. *Eur J Biochem.* 1981 Aug;118(2):407-15. doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06417.x. PMID: 6269855.