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

【目的】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 複製装置と異なる制御されるが、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。本研究では、ミトコンドリア粗抽出液や精製ミトコンドリア画分を用いた新たな試験管内解析系を構築することで、mtDNA 複製やコピー数の制御機構を解明することを目的とする。

【方法】第一に、過去の報告に倣って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、界面活性剤 Triton X-100 で処理することで *X. laevis* 卵由来ミトコンドリア粗抽出液を調製した。第二に、このミトコンドリア抽出液と全長 *X. laevis* mtDNA を含む DNA を反応させ、DNA 合成活性を解析する試験管内解析系を試行した。さらに並行して、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 コピー数解析についても定量 PCR 法を応用することで検討した。

【結果】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（九州大学の高橋達郎教授との共同研究）。次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解析したところ、ネガティブコントロールではほとんど複製活性を示さなかったのに対し、mtDNA を含む DNA を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。一方で、別の実験では部位非特異的な複製開始である可能性が示唆されており、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。第二に、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に成功した。今後はこれらの新規解析系を基盤として mtDNA 複製やコピー数維持に関する研究がさらに発展することが期待される。

ミトコンドリアゲノム複製を解析するための新たな試験管内解析手法の開発