

2006年12月5日

独立行政法人 理化学研究所

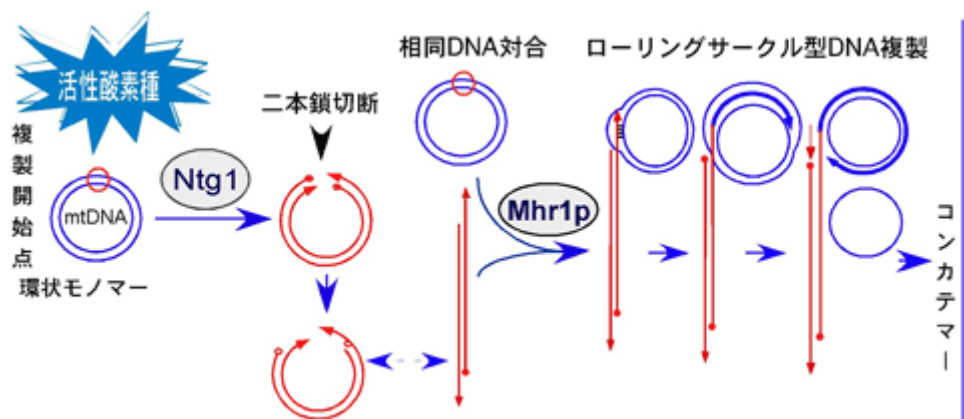
ミトコンドリア DNA 複製の常識の一端が覆る

- ミトコンドリア DNA 複製開始には遺伝的組換え開始と共通の装置がはたらく -

歳とともに神経や運動の機能が衰える原因のひとつといわれているのが、細胞内に存在する小器官「ミトコンドリア」の DNA 複製時に呼吸欠損変異が蓄積し、ミトコンドリア DNA が不均一化することです。ミトコンドリアは、核とは別に独自の DNA を持っている、エネルギー生産工場です。

理研中央研究所柴田武彦上席研究員と凌楓前任研究員らの研究グループは、これらの現象の根幹となるミトコンドリア DNA 複製開始に関して、これまでの生物の教科書を書き換える事実を酵母を使って発見しました。具体的には、ミトコンドリア DNA の複製開始が、これまで言われてきた RNA 合成によるものではなく、DNA 二本鎖切断など遺伝子組換えと同じ反応であることを突き止めました。

この発見により、これまで謎であった、細胞一つ一つに数百個以上も存在するミトコンドリア DNA がすべて同じ塩基配列をもつように短期間にリセットされる理由や、細胞増殖にとって不利なはずの呼吸欠損変異ミトコンドリア DNA の増加が、酵母やヒトで優性になってしまう現象の説明ができることになりました。老化や重篤な疾患の対策に手掛かりが得られることになったわけです。



(図)新たに提唱するミトコンドリア DNA の複製開始過程

2006年12月5日
独立行政法人 理化学研究所

ミトコンドリア DNA 複製の常識の一端が覆る

- ミトコンドリア DNA 複製開始には遺伝的組換え開始と共通の装置がはたらく -

◇ポイント◇

- ・ 謎であった細胞質遺伝の基本問題（ホモプラスミー）を分子の機能で解く
- ・ RNAの合成とされたミトコンドリア DNA 複製開始と、細胞質遺伝の定説を書き換える
- ・ 神経や筋肉などの老化やミトコンドリア症対策について手掛かりに

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、ミトコンドリアDNA^{*1}複製の定説とされていた“RNA合成”ではなく、複製開始配列でのDNA二本鎖切断などの遺伝的組換え開始と共通の反応が、子孫へ伝えられるミトコンドリアDNAの複製で主要な働きをすることを、酵母を使って明らかにしました。この発見で、(1)しばしば変異して不均一になりがちなミトコンドリアDNAが、全て同じ遺伝子組成を持つようにリセットされる仕組みと、(2)多くの遺伝子を失ったある種の変異ミトコンドリアDNAが、極端な優先遺伝をする仕組みについて、分子の機能で合理的に初めて説明できました。これは、理研中央研究所柴田武彦上席研究員と凌 楓（りん ふおん、LING Feng） 前任研究員らの研究成果です。

ミトコンドリアは、生体の活動全てにエネルギーを供給する、細胞のエネルギー生産工場です。また、ミトコンドリアは、核とは別に独自のゲノムDNAを持っており、いわゆる細胞質遺伝（非メンデル型遺伝）を行っています。個々の細胞には、数百から数千個以上ものミトコンドリアゲノムDNAがあり、しばしば突然変異することから、このDNAの組成はかなり不均一になると予測されます。また、歳をとると、一部の組織のミトコンドリアDNAは不均一になっていきます。しかし奇妙なことに、増殖している個々の細胞や新生児では全身で、全てのミトコンドリアDNAが同一の遺伝子型組成（同一のDNA配列）を持っています。この「ホモプラスミー」と呼ばれる状態へ短時間にリセットするという細胞質遺伝の現象は、酵母からヒトまで共通にみられます。このように何故、それぞれの細胞に数百から数千個もあるミトコンドリアDNA集団が均一になるように効率よくリセットされるかは長年の謎でした。さらに、ヒトでは、多くの遺伝子を失った変異ミトコンドリアDNAが増加することによる不均一化は、神経などの老化や重篤な疾患と深く関わっていますが、その理由は分かっていませんでした。今回の発見は、こうした細胞質遺伝の謎を分子の働きで理解し、対策をたてるために、初めての手掛かりを得たと期待されます。

本研究成果は、米国微生物学会が出版する科学雑誌『*Molecular and Cellular Biology*』に近く掲載されます。

1. 背景

ミトコンドリアは、細胞のエネルギー生産工場です。酸素呼吸によって生体の活

動に必要なほぼ全てのエネルギーを供給しています。同時にミトコンドリアは、真核生物の祖先に寄生したバクテリアの子孫といわれ、その名残として核とは別に独自のゲノムDNAを持っています。このミトコンドリアDNA (mtDNA) が、母親からだけ遺伝する (母性遺伝)、いわゆる細胞質遺伝 (非メンデル型遺伝) を行っています。

個々の細胞には、数百から数千個ものミトコンドリアゲノムDNAがあります。ミトコンドリアの機能である酸素呼吸は副産物として活性酸素種を発生し、その結果、ミトコンドリアDNAは、その作用でしばしば突然変異するため、このDNAの組成はかなり不均一になると予測されます。歳をとると、神経や筋肉のミトコンドリアDNAが不均一になり、歳とともに神経や運動の機能が衰える原因ではないかといわれています。しかし奇妙なことに、増殖している個々の細胞や新生児では全身において、全てのミトコンドリアDNAが同一の遺伝子型組成 (同一のDNA配列) を持っています。このようにミトコンドリアDNAが均一になっている状態は、「ホモプラスミー」と呼ばれ、ミトコンドリアDNAの基本状態です。ホモプラスミーへのリセットは、ヒトでは卵母細胞ができる過程の限られた時期に、また、酵母の場合には、十数回の細胞分裂の間で起こります。この細胞質遺伝の原則は、酵母からヒトまで共通となっています (図 1)。

しかし、何故、ミトコンドリアDNA集団が効果的に均一になるようにリセットされるかは永年の謎でした。また、ヒトでは、多くの遺伝子を失った変異ミトコンドリアDNAが増加することによる不均一化が、神経などの老化や重篤な疾患と深く関わっています。細胞集団の中で、ミトコンドリアDNAの変異で呼吸の機能を失った細胞は、増殖にとって不利なはずで、本来ならば淘汰されるはずですが、それが器官の細胞集団で優性になってしまう理由は分かっていませんでした。

これらの現象には、ミトコンドリアDNA複製や複製したミトコンドリアDNAが子孫へ分配することに関わっていると推定はされてきました。ヒトでも酵母でも、ミトコンドリアDNAには、特別なDNA複製開始配列があります。その配列部位の一方の端にある転写開始配列から合成されたRNAの一部がそのまま、プライマー (合成・複製を始めるのに必要な断片)^{*2}となりDNA複製が開始される、というのが教科書にも書かれている定説です (図 2)。ところが、この定説では、それぞれのDNAが複製していくことになり、不均一なミトコンドリアDNAの集団が、ホモプラスミーという均一状態へリセットされる仕組みの説明が容易ではないという問題点がありました。

理研中央研究所の凌 楓 前任研究員と柴田 武彦 上席研究員は、これまでに、ミトコンドリアDNAの組換えに必要なタンパク質“Mhr1”の存在とその組換えや複製でのミトコンドリアDNAへ対する働きを明らかにしています。具体的には、(1)タンパク質Mhr1 が、一本鎖DNAと二重鎖DNAとの間で塩基配列がよく似たところを見つけ出して、分子間の二重鎖を作るという、普遍的な遺伝的組換え (相同DNA組換えともいう) の開始反応 (相同DNA対合) を行なう、(2)Mhr1 はホモプラスミーへリセットするために必要である、(3)いくつもあるミトコンドリアDNAの一つの環状DNAを鋳型にして起こる特殊な型のDNA複製 (ローリングサークル型DNA複製) によってできた単位長さのミトコンドリアDNAがいくつも直列につながった多量体DNA (コンカテマー) だけが選ばれて子供の細胞に伝わり、子供の細胞では、

伝わって来た多量体DNAが、もとの環状型単量体に戻ります。その結果、急速に遺伝的に均一なDNA集団になることです（図3）。この成果から、この特殊な型のミトコンドリアDNA複製開始もまた、遺伝的組換えと同様に、DNA二本鎖切断が働くのではないかと推定して、研究を進めました。

2. 研究手法

酵母では、ヒトと違い、両親のミトコンドリアDNAが子供に伝わるので、正常なミトコンドリアDNAを持つ親と変異ミトコンドリアDNAを持つ親との掛け合わせで、不均一なミトコンドリアDNAを持つ細胞を得ることが容易にできます。さらに、どちらのミトコンドリアDNAが子孫に伝わるかを調べることもできます。正常なミトコンドリアDNAを持つ親と特殊な変異ミトコンドリアDNAを持つ親を掛け合わせるとその子孫が全て、呼吸能力を失ってしまうという、“超抑制的ミトコンドリアDNA”と呼ばれる変異ミトコンドリアDNAがあります。この特殊な変異ミトコンドリアDNAがどのように子孫へ伝わっていくかについて、上記の掛け合わせという遺伝学的手法で解析しました。

この遺伝学の実験と並行して、DNA配列、細胞の中で、DNA二本鎖切断が起きているかどうか、その場所がどこか、細胞内でのミトコンドリアDNA分子種の状態を生化学的な手法で解析し、その結果と、遺伝学的手法で得た結果とあわせて検討しました。

3. 研究成果

酵母の「超抑制ミトコンドリアDNA」と呼ばれるものは、大規模な欠失変異によって正常型ミトコンドリアDNAの数十分の一の部分だけからできており、正常型DNAが持つ複製開始配列のひとつを持つことが知られていました。すなわち、正常型に比べ、複製開始配列の密度を高め、正常型よりも速く複製するために超抑制現象^{*3}が起こる、というのがこれまでの説明でした。

凌 楓 前任研究員、埼玉大学との連携大学院生 堀 晶子と柴田 武彦 上席研究員は、この超抑制ミトコンドリアDNAを新たに得て解析したところ、超抑制ミトコンドリアDNA集団の一部で、その複製開始配列にDNA二本鎖切断が入っていることを見つけました。さらに、そのDNA二本鎖切断を入れる酵素は、酸化によってできたDNAの傷を修復する系に働く、DNA-N-グリコシダーゼ“Ntg1”であることを明らかにしました。この、Ntg1と先に見つけたミトコンドリアDNA組換えに働くMhr1の両方が、掛け合わせによってできた接合体で超抑制現象を引き起こすために必要であったことを明らかにしました（図4）。同時に、ミトコンドリアDNAの単位がいくつも直列につながった多量体を効率的に合成するためには、Mhr1に加えて、Ntg1もまた必要なことがわかりました（図5）。また、意外なことに、試験管内で、単離したNtg1に細胞から単離したDNAを反応させたところ、これだけで、ミトコンドリアDNAの複製開始配列でDNA二本鎖切断が起こりました。DNAを抽出する前に細胞に酸化ストレスを与えるとさらに、DNA二本鎖切断が多く入ったことから、ミトコンドリアDNA複製開始配列に特異的に起こる酸化損傷をNtg1が認識して、DNA二本鎖切断を行うという可能性が支持されました。

以上をまとめると、酸化損傷に対して、ミトコンドリアDNAの複製開始配列が特

に高感受性で、この配列に酸化損傷が起こると、Ntg1 が働き、DNA二本鎖切断が起こり、Mhr1 が、環状の別のミトコンドリアDNAを相手に組換え過程を開始します。その結果できた組換え開始中間体でおこる、本来ならば限られた修復合成で終わるDNA合成がいつまでも続くことによって、直線状多量体（コンカテマー）ミトコンドリアDNAが合成されるという全体像が描かれます。この全体像は、ホモプラスミーへのリセットをミトコンドリアDNA複製開始配列、Ntg1 の酸化損傷を認識してDNA二本鎖切断を行う機能とMhr1 のDNA二本鎖切断端と環状DNAから組換えを開始する機能で説明できます（図6）。

さらに、正常型ミトコンドリアDNAと超抑制ミトコンドリアDNAを比較すると、同じ長さの多量体DNAに載る複製産物の個数は、超抑制ミトコンドリアDNAの方が、数十倍多くなることから、超抑制現象を、複製開始配列の密度に加え、子孫へ送られるDNAの複製産物の個数の違いで説明できました（図7）。このように、ミトコンドリアDNA複製開始配列に起こる特異的なDNA二本鎖切断とその切断に必要なタンパク質（Ntg1）、DNA二本鎖切断の後で遺伝的組換え反応に働くタンパク質（Mhr1）が明らかになったことで、ミトコンドリアDNA遺伝のふたつの謎が解けました。

4. 今後の期待

今回酵母で見つかったミトコンドリアDNA複製と子孫への伝達機構で、ヒトの細胞質遺伝と、変異ミトコンドリアDNA蓄積の機構が説明できます。しかし、その前に、再度、酵母とヒトのミトコンドリアDNAの複製と子孫への伝達機構が共通であるかを改めて検証し、酵母で分かったことが、どこまで、ヒトに適応できるかを明らかにする必要があります。この検証を手掛かりにすると、現在、手の打ちようがないとされている高齢化にともなうミトコンドリアDNAの変異蓄積やミトコンドリア症に対しても何らかの対策が見付かる可能性が出てきました。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

中央研究所 柴田上席研究員研究室

上席研究員 柴田 武彦

Tel : 048-467-5928 / Fax : 048-462-1227

中央研究所 吉田化学遺伝学研究室

前任研究員 凌 楓

Tel : 048-467-9518 / Fax : 048-462-4676

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 ミトコンドリア DNA

遺伝子のほとんどは、細胞の核にあり両親から受け継ぐ染色体の DNA に記されている。しかし、細胞の中にある、細胞内小器官の一つであるミトコンドリアは、ミトコンドリア DNA と呼ばれる独自のゲノム DNA を持っており、ミトコンドリアのタンパク質をコードする遺伝子の一部は、このミトコンドリア DNA に記されている。これは、太古の昔に、細胞の中に細菌が共生したことの名残と考えられている。このミトコンドリア DNA は、染色体 DNA と異なり、ヒトではすべて母親から受け継ぐ。一つの細胞に多数のミトコンドリア DNA 分子が存在するが、異常をもつミトコンドリア DNA が蓄積してくると、ミトコンドリア病と呼ばれる病気が引き起こされる。

※2 プライマー

DNA ポリメラーゼが DNA 合成を始めるためには、鋳型 DNA と二重鎖を作り、さらに、3'OH 型の末端をもった DNA または RNA 断片を必要とする。DNA 複製開始は、一般に、鋳型 DNA 上で、プライマーなしに合成を開始できる、プライマー RNA 合成に特化した DNA プライマーゼか、または、転写 RNA ポリメラーゼが働く。ミトコンドリア DNA 複製開始配列の一端には、RNA 合成開始に必要なプロモーター配列があり、事実、そこで転写 RNA ポリメラーゼによって合成された RNA をプライマーとするミトコンドリア DNA 合成は検出されていたので、それで、ミトコンドリア DNA 複製開始は解明されたとされてきた。ところが、酵母で、ミトコンドリア RNA ポリメラーゼを欠いた細胞でも、ミトコンドリア DNA 複製が起こることと、超抑制ミトコンドリア DNA の優先的な遺伝がおこるといふ未解明の問題があった。遺伝的組換えでは、DNA 二本鎖切断端から、二重鎖の一方が削られてできた一本鎖部分が、塩基配列がよく似た二重鎖 DNA に割り込み、分子間の二重鎖（ヘテロ二重鎖）を作る。その端をプライマーとして、相手の DNA を鋳型とした限定的な DNA 合成が起こる。

※3 超抑制現象

酵母において正常なミトコンドリア DNA の複製開始配列のひとつを持つ欠失変異ミトコンドリア DNA（超抑制ミトコンドリア DNA）が、正常なミトコンドリア DNA より圧倒的に優先的に複製され、子孫へ伝わっていくという細胞質遺伝現象のこと。

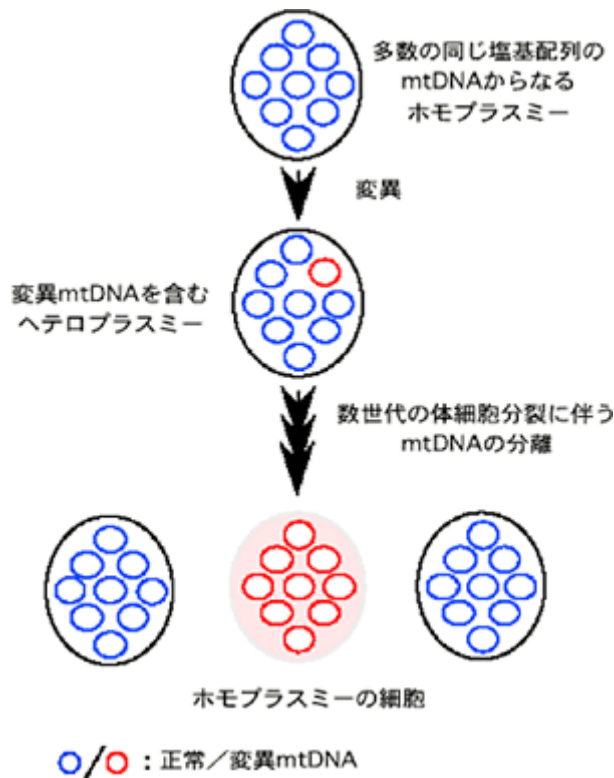


図1 MtDNA の対立遺伝子の分離に伴うホモプラスミーの形成

多数個ある mtDNA は、それぞれの細胞または個体で、全てが同じ塩基配列を持つホモプラスミー状態が基本である。その集団に突然変異した遺伝子を持つ mtDNA が生じ、ヘテロプラスミーの状態になることがあるが、細胞の栄養増殖（体細胞分裂）の間に突然変異でできた突然変異遺伝子と元々の遺伝子という対立遺伝子が分離し、数世代の細胞分裂で、正常な遺伝子を持つ mtDNA しか持たない、あるいは、突然変異遺伝子を持つ mtDNA しか持たないホモプラスミー細胞になる。しかも、ミトコンドリア DNA の突然変異が起こる頻度は、核ゲノム DNA の 10 倍以上と言われており、その頻度で、変異 mtDNA をもつホモプラスミー細胞が現れる。

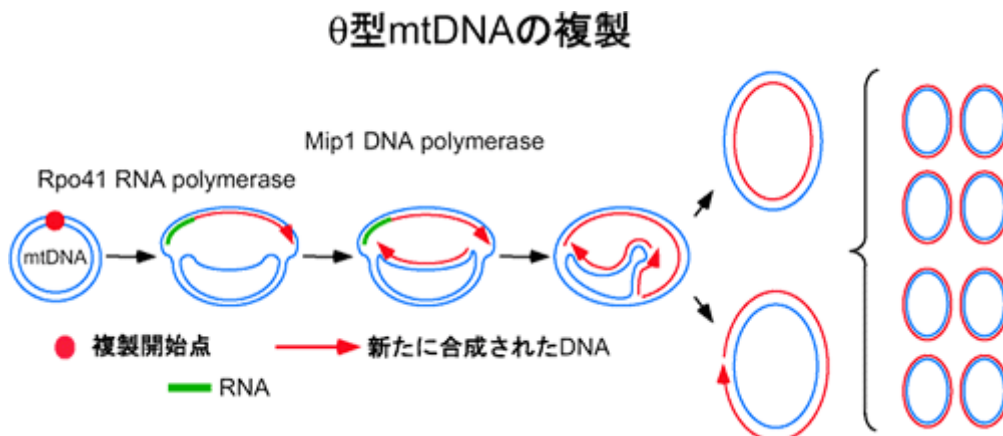


図2 RNA をプライマーとして開始する θ 型 mtDNA 複製のモデル

RNA が DNA 複製開始配列内のプロモーターから合成され、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成のプライマーとなる。出芽酵母では、ミトコンドリア RNA ポリメラーゼ Rpo41 がプライマーの合成に働くとされている。この機構では、同一細胞内に数百個もある mtDNA のひとつにおきた変異が、高頻度で全体に急速に広がるのが容易には説明できない。

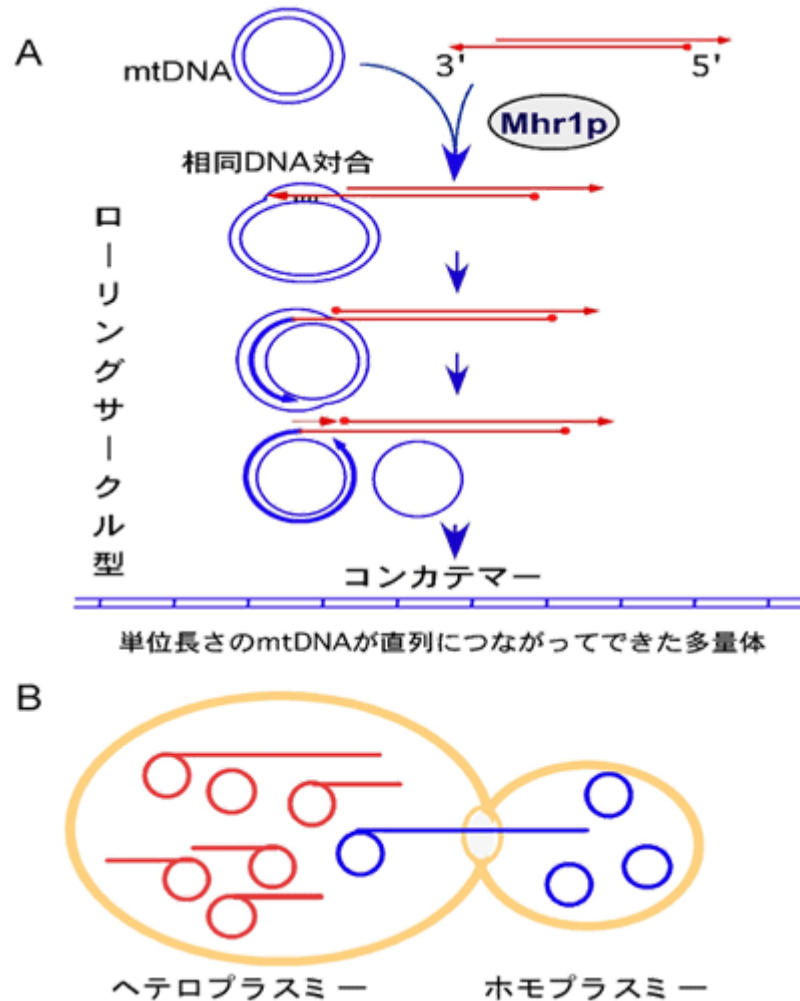


図3 Mhr1 依存型 mtDNA の複製と分配機構

- A. 遺伝的組換え組換えに必須な相同 DNA 対合反応を促進する活性を持つ Mhr1 は、DNA の二本鎖切断部位から生じた 3' 一本鎖 DNA を鋳型となる環状二重鎖 DNA へ対合させ、その 3' 端をプライマーとしてローリングサークル型 DNA 複製を開始させる。その働きにより、mtDNA 分配の中間体であるコンカテマー（単位長さの mtDNA が直列につながってできた直鎖状多量体）ができる。相同 DNA 対合とは、一本鎖 DNA が、よく似た塩基配列を持つ二重鎖 DNA へ割り込み、分子間の二重鎖（ヘテロ二重鎖）を作る遺伝的組換えに普遍的な反応である。ここまでは、凌 楓と柴田が、2004 年までに明らかにしていたが、何が何処に DNA 二本鎖切断を入れるか、また、DNA 複製開始配列から開始される mtDNA 複製との関係が分からなかった。

B. ヘテロプラスミー細胞中の青い線で示す mtDNA が鋳型として選ばれ、ローリングサークル型 DNA 複製によってできたコンカテマーに載った多数個の複製産物が一度に娘細胞へ選択的に送り込まれる。コンカテマーは、娘細胞に移ると同時に環状単量体に分割される。その結果、娘細胞では、その複製産物が大多数を占め、ホモプラスミー細胞となる。

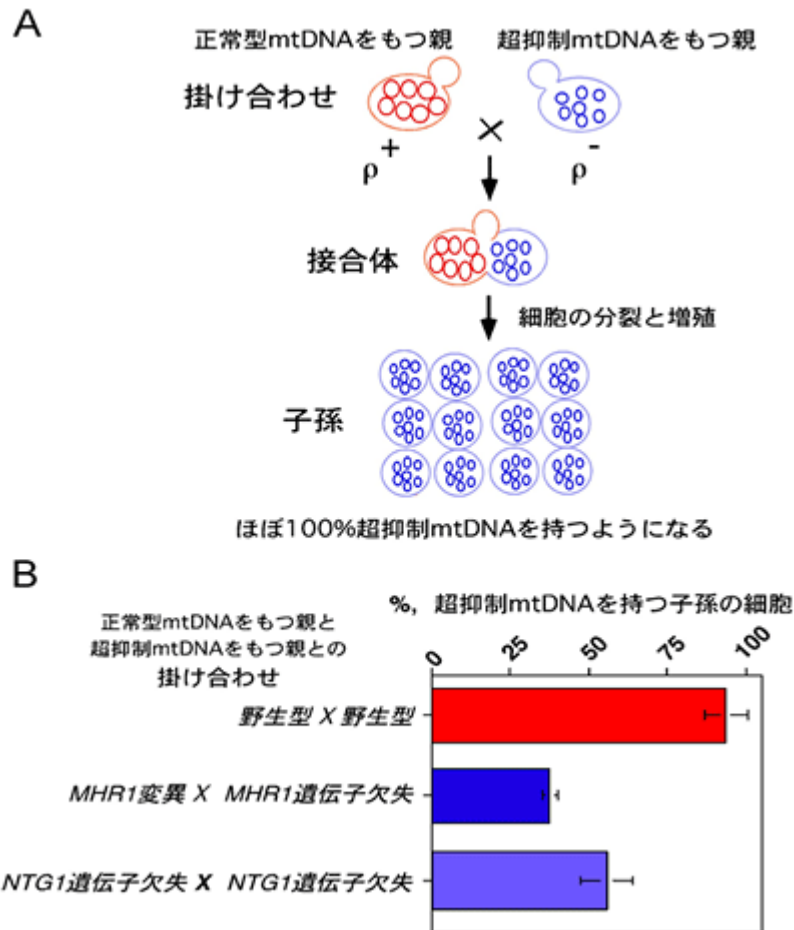


図4 超抑制現象に必要な MHR1 と NTG1 遺伝子

- A. 正常型 mtDNA を持つ親と超抑制 mtDNA を持つ親とを掛け合わせてできた接合体の子孫のほとんど 100% が超抑制 mtDNA だけを持つようになる。青い線は、複製開始配列の一つを有する、大きな欠失変異が生じた超抑制 mtDNA を示す。
- B. 両親の核染色体上の遺伝子 *MHR1* または *NTG1* が変異、あるいは欠失した場合、掛け合わせによって生じた子孫が持つ超抑制 mtDNA の割合は、100%から、それぞれ 35%と 60%に減少した。

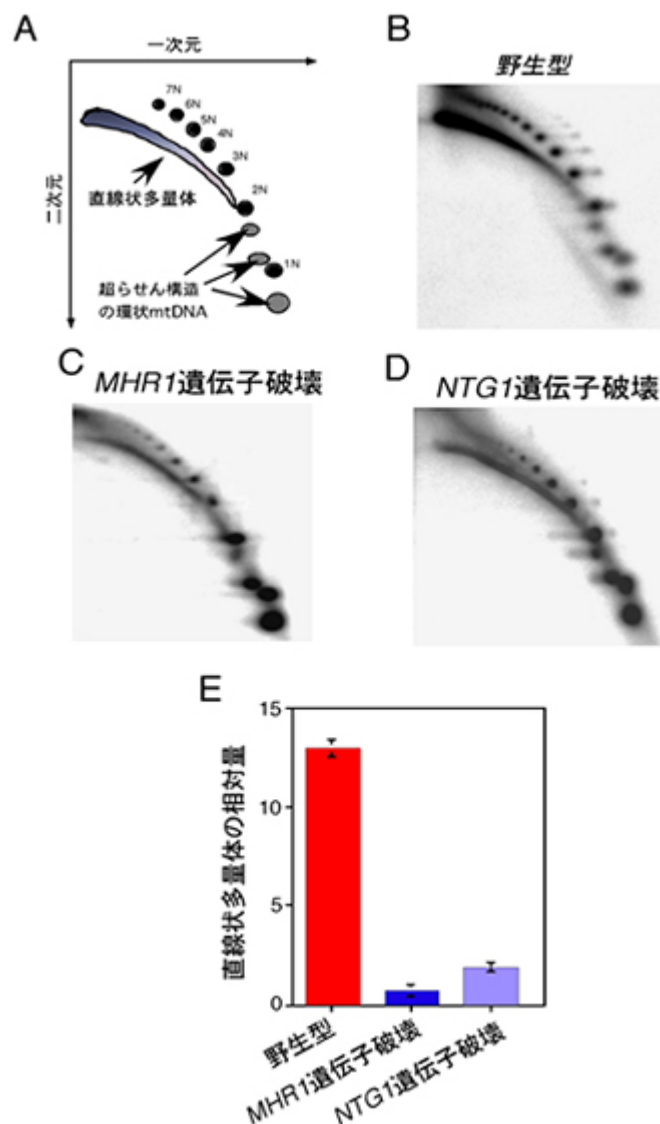


図5 超抑制 mtDNA 分子種の二次元電気泳動のプロフィール

- A. 二次元電気泳動による超抑制 mtDNA 分子種の分離に関する説明図。一次元目は分子量、二次元目は分子量と構造に従って、超抑制 mtDNA の分子種を連続値をもつ不定長の直鎖状多量体（アーチ状の信号；図6を参照）、開環状単量体 DNA（最も右下のドットのすぐ上のドット 1N）、環状多量体 DNA（2N, 3N, 4N 等のラベルを持つドット）、および超ラセン構造の環状 mtDNA（最も右下は単量体、その上が二量体、三量体）に分けることができる。
- B-D. 野生型、*MHR1* 破壊細胞、*NTG1* 破壊細胞の超抑制 mtDNA の分子種のプロフィール
- E. 野生型、*MHR1* 破壊細胞、*NTG1* 破壊細胞の超抑制 mtDNA 分子種に含まれる直鎖状多量体（コンカテマー）の環状単量体との相対量。*mhr1* または *ngt1* に変異をもつ細胞では、直鎖状多量体の生成率が著しく下がっていることに注

意。この実験結果は、これらの正常な遺伝子が直鎖状多量体の生成に必要なことを示す。また、2N, 3N など環状多量体は環状単量体から遺伝的組換えの結果できるが、その生成率も、これらの変異で下がっている（単量体との相対量が下がっている）ので、これらの正常な遺伝子が、mtDNA の組換えに働くことも示していることに注意。

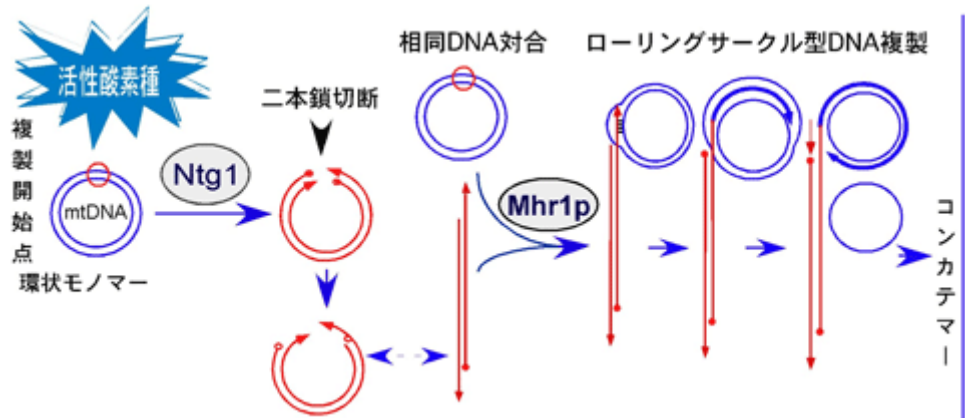


図 6 酸化ストレスに誘起される Ntg1-Mhr1 依存的ローリングサークル型 mtDNA 複製

Ntg1 は活性酸素種による損傷を除去すると同時に、複製開始配列で二本鎖切断を起こす。Mhr1 は、切断端から形成される 3' 末端一本鎖領域を環状二重鎖 DNA へもぐりこませ、もとの相補鎖と置き換わり、ヘテロ二重鎖を作る。この入り込んだ 3' 端をプライマーとして、DNA 合成を開始する。ここまでは、遺伝的組換え修復の開始と共通である。組換えでは、この DNA 合成が限定的にしか起こらない。それに対して、ローリングサークル型 DNA 複製では、DNA 合成が鋳型を一周し、相補鎖を完全に置き換えると、通常のコピフォークができ、ローリングサークル型 DNA 複製が始まり、直鎖状多量体であるコンカテマーが伸張する。ローリングサークル型 DNA 複製とは、鋳型となる環状 DNA が転がりながら、直鎖 DNA テールを伸張していくように見えることから、命名された。この様式の複製でできるコンカテマーは、連続値を持つ不定長となる (図 5 を参照)。

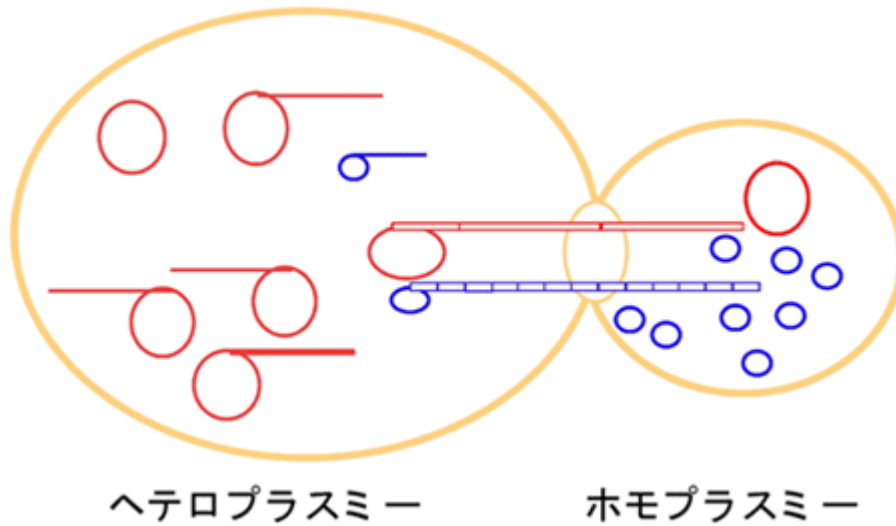


図7 超抑制 mtDNA の分配上での優位

ローリングサークル型複製で合成された超抑制 mtDNA の直鎖状多量体は、同じ長さの正常型 mtDNA と比べて複製開始配列を多く持つだけでなく、mtDNA の単位数も多い。娘細胞に入り、端量体の環状端量体 DNA に加工される際に、正常型 mtDNA に比べて、より多数個の超抑制 mtDNA ができる。