

別紙 4

報告番 -	※ 甲 第 号
----------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 真正粘菌を用いた同形配偶子におけるミトコンドリア
母性遺伝の制御機構の解析
氏 名 浦川 直希

論 文 内 容 の 要 旨

有性生殖を行う真核生物において、ミトコンドリア DNA (mtDNA) は母性遺伝することが知られている。近年、父方の mtDNA やミトコンドリアの選択的分解が母性遺伝の制御において重要であることが分かってきた。また、それら母性遺伝のメカニズムは生物によって異なっており、多様性がみられる。同形配偶子においては、接合後から父方由来の mtDNA の選択的分解が生じ、その後ミトコンドリア分解が生じる。有性生殖は、同形配偶子生殖から異形配偶子生殖、そして卵生殖へと進化してきたと考えられており、同形配偶子における mtDNA の母性遺伝のメカニズムを解明することは、母性遺伝の進化を理解する上で非常に重要である。

同形配偶子では、接合子成熟過程において父方由来の mtDNA の分解はミトコンドリア分解の前に必ず生じることから、mtDNA の選択的分解は母性遺伝の引き金となる重要なステップであると考えられる。これまでに、異形配偶子であるショウジョウバエや線虫において、母性遺伝に関わる DNase としてエンドヌクレアーゼ G (ENDOG) が報告されているが、同型配偶子であるクリプトコッカスでは ENDOG ホモログである NUC1 は母性遺伝の mtDNA 選択的分解に関与していないことが報告されている。また、真正粘菌において、交配後 5 時間目の接合子から単離したミトコンドリアを用いたプロテオミクス解析により、ENDOG 様ヌクレアーゼ (PpEndoG-like) を含む 9 種類の DNase が同定されているが、これらの DNase は接合子以外の時期でも発現しているため、母性遺伝に関与する DNase はまだ特定できていない。DNase は、それぞれ特有の金属イオン要求性や活性 pH 範囲を持つことが知られており、PpEndoG-like の DNase 活性は、Mg²⁺、Mn²⁺、Co²⁺ 存在下では活性 pH 範囲が pH5.5 - 8.0 であり、Ca²⁺ 存在下では 活性 pH 範囲が pH6.0 - 7.0 である。よって、母性遺伝過程で検出される DNase 活性の性質を調べることは、PpEndoG-like が母性遺伝に関与しているか、また関与していない場合はその他の DNase を同定するための重要な手掛かりとなる。

同形配偶子である真正粘菌のミトコンドリア核様体(mt 核様体:mtDNA-タンパク質複合体)は棒状で1-2 μm と非常に大きく、母性遺伝過程における mt 核様体分解過程の観察に適している。そこで、本研究では、生体染色法を用いた観察により真正粘菌の母性遺伝過程における mt 核様体とミトコンドリアの動態を詳細に解析し、さらに単離ミトコンドリア内の mt 核様体分解を直接観察することにより DNase 活性を検出する *semi-in vitro* アッセイ法を開発し、父方由来の mt 核様体の選択的分解が生じる時期のみに活性化される DNase の性質を調べた。

まず、交配型が異なる AI35 (母方) と DP246 (父方) を混合すると、1 時間以内にアメーバ細胞の約 75% が接合し、その後、接合子の成熟は同調して進行した。mt 核様体の長さを経時的に測定することで mt 核様体の分解を調べたところ、交配後 3 時間目から 5 時間目にかけてアメーバ細胞では観察されない 0.5 μm 未満の mt 核様体が急速に増加し、その後 11 時間目にかけて徐々に mt 核様体が消失することが分かった。また、MitoTracker Green FM を用いて片親のミトコンドリアをラベルし、同時に mtDNA を赤色で生体染色することが可能な N-aryl Pyrido Cyanine 3 を用いて染色することで、接合子内の AI35 と DP246 由来のミトコンドリアを識別しながら mt 核様体の変化を調べた。その結果、交配後 3 時間目から DP246 由来の mt 核様体のみが選択的に分解され始めることが分かった。さらに、AI35 由来の mt 核様体の長さは接合子の成熟過程において変化しなかったが、ミトコンドリアの数は交配後 5 時間目から増加することがわかった。また、このようなミトコンドリアの増殖は、DP246 由来のミトコンドリアで生じなかった。よって、父方由来の mt 核様体の分解が開始された後に、母方由来のミトコンドリアが増殖し始めることが分かった。また、ミトコンドリアを膜電位感受性色素であるテトラメチルローダミンメチルエステルで生体染色し、mt 核様体の分解過程における膜電位の変化を調べた結果、mt 核様体の分解中もミトコンドリア内膜は崩壊せず維持されていることが分かった。

続いて、父方由来の mt 核様体の選択的分解が生じる時期のみに活性化される DNase の性質を調べるために、mt 核様体の分解が生じ始める交配後 3 時間目の接合子からミトコンドリアを単離し、様々な条件下でインキュベートした前後で、0.5 μm 未満の mt 核様体が含まれるミトコンドリアの割合が変化するかどうかを調べることで DNase 活性を評価する *semi-in vitro* アッセイ法を開発した。その結果、 Mg^{2+} 存在下のみで 0.5 μm 未満の mt 核様体をもつミトコンドリアの割合が増加した。また、その時の活性 pH 範囲は pH7.5 - 9.0 であった。さらに、*in vivo* で mt 核様体の分解が生じていないアメーバ細胞や変形体、交配後 1、2 時間目の接合子から単離したミトコンドリアでは DNase 活性は検出されなかった。これらの結果より、真正粘菌の母性遺伝に関与する DNase は Mg^{2+} 要求性で活性 pH 範囲は pH7.5 - 9.0 であり、PpEndoG-like は真正粘菌の母性遺伝に関与していないことが分かった。また、交配後 2 - 3 時間目の間に母性遺伝に関与する DNase 活性化機構の存在も示唆された。これらの知見は、今後、真正粘菌の母性遺伝における父方 mtDNA の選択的分解に関与する分子メカニズムを解明するために役立つことが期待される。