

主論文

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

名古屋大学大学院

理学研究科 生命理学専攻

浦川 直希

目次

序章	4
第一章 真正粘菌の接合子成熟過程におけるミトコンドリア核様体及び ミトコンドリアの動態解析	11
1-1. 要旨	12
1-2. 序論	14
1-3. 実験材料および方法	17
1-4. 結果	21
1-5. 考察	30
1-6. 図表	37
第二章 単離ミトコンドリアを用いた母性遺伝における選択的な mtDNA 分解 に關与する DNase の解析	50
2-1. 要旨	51
2-2. 序論	53
2-3. 実験材料および方法	57

2-4. 結果	60
2-5. 考察	64
2-6. 図表	70
謝辞	77
参考文献	81

序章

真核生物において、ミトコンドリアはエネルギー生産に関与する重要な細胞内小器官である。ミトコンドリアは、 α -プロテオバクテリアが細胞内共生したことにより誕生したと考えられており、核DNAとは異なる独自のゲノム（ミトコンドリア DNA；mtDNA）を持つ（Patrick 2010）。進化の過程で mtDNA のゲノムサイズは著しく縮小した一方で、細胞内に存在する mtDNA のコピー数は増加した。ヒトの場合では、約 16.6 kb の mtDNA 分子が数千コピー存在する（Anderson *et al.* 1981、Frederica *et al.* 2004）。生体内では、これらの mtDNA はミトコンドリア核様体（mt 核様体）という DNA-タンパク質複合体として存在しており、mtDNA の複製や分配の単位として機能している（Kuroiwa 1973、1974、1982）。興味深いことに、動物や植物、菌類、原生生物など、ほとんどすべての有性生殖を行う真核生物において、mtDNA は片親、主に母親からのみ遺伝することが知られている（Kuroiwa 2010）。この現象は母性遺伝と呼ばれている。

ミトコンドリアの母性遺伝は、まずアカパンカビや酵母において呼吸欠損変異が非メンデル遺伝をするという研究により見つかった（Mary and Herschel 1952、Elizabeth S. G *et al.* 1971）。その後、アフリカツメガエル *Xenopus laevis*（Dawid and Blackler 1972）やロバ *Equus asinus*（Hutchison *et al.* 1974）、ラット（Hayashi *et al.* 1978、Kroon *et al.* 1978）ショウジョウバエ *Drosophila*

melanogaster (Reilly and Thomas 1980)、ヒト *Homo sapiens* (Giles *et al.* 1980) など多くの生物において mtDNA の母性遺伝が報告された。精子や卵子のような配偶子の形が異なる異形配偶子の母性遺伝では、まず精子形成過程において精子に含まれるミトコンドリアや mtDNA が極端に減少する。ショウジョウバエでは精子形成時に mtDNA が完全に除去されることが報告されている (Steven and Patrick 2012) が、一般に精子中のミトコンドリアでは mtDNA は完全に分解されず少量の mtDNA を持ち、受精時に卵子の中に入る。そのため、母性遺伝のメカニズムを説明する説として、卵子には母性ミトコンドリアが非常に多く存在しているため、量的に少ない父方ミトコンドリアは希釈されてしまうという希釈モデルが提唱されていた (Dawid and Blackler 1972, Hutchison *et al.* 1974、Birky 1995、Ankel-Simons and Cummins 1996)。しかし、母性遺伝は、配偶子間でミトコドリアの数や mtDNA 量に差がみられない雌雄同型の配偶子 (同形配偶子) を持つ真正粘菌 *Physarum polycephalum* (Kawano 1987) や細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* (Mirfakhrai *et al.* 1990)、黒穂菌 *Microbotryum violaceum* (Wilch *et al.* 1992)、ヒトヨタケ *Schizophyllum commune* (Specht *et al.* 1992) でも生じることから、希釈モデルだけでは説明できないことが分かってきた。そして、アカゲザルやウシにおいて、受精卵内の精子由来のミトコンドリアがユビキチン化されており、ユビキチン化されたミトコンドリアが受精後に積極的

に分解されること (Sutovsky *et al.* 1999、Sutovsky *et al.* 2000) や、線虫 *Caenorhabditis elegans* やマウスにおいて、精子ミトコンドリアがマイトファジーにより、受精後に選択的に分解されること (Sato and Sato 2011、Rawi *et al.* 2011) が報告され、受精後に父方ミトコンドリアが選択的に分解されることが分かってきた。

さらに、同形配偶子である真正粘菌やクリプトコッカス *Cryptococcus neoformans* においては、ミトコンドリアが分解される前に父方由来の mtDNA が選択的に分解され、その後、mtDNA が分解されたミトコンドリアが選択的に除去されることが分かった (Moriyama and Kawano 2003、Nishimura *et al.* 2020)。また、メダカにおいても、受精後に精子由来のミトコンドリアの中で mtDNA が完全に分解されることが報告された (Nishimura *et al.* 2006)。よって、母性遺伝のメカニズムにおいて、受精/接合後にミトコンドリアや mtDNA が積極的に分解されること (選択的分解モデル) も重要であると考えられる。

これまでに、母性遺伝における父方ミトコンドリアの選択的分解に関与する因子として、マウスでは PARKIN/PINK1、MUL1、P62、FIS1 が報告されている (Rebecca *et al.* 2016)。それらの因子は、オートファジーによる不良ミトコンドリアの分解 (マイトファジー) に関わることが知られており、マイトファジーのトリガーでもある膜電位の喪失も父方ミトコンドリアで観察されている。

また、線虫では、マイトファジーにおけるミトコンドリアのユビキチン化に関わる PARKIN/PINK1 は関与していないが、父方ミトコンドリアはユビキチン化され、オートファジー受容体である ALLO-1 により認識される。そして、ALLO-1 がオートファゴソーム膜形成に関与する Atg8 のホモログ (LGG-1) と直接結合することでマイトファジーが生じる (Sato *et al.* 2018)。また、ALLO-1 をリン酸化し、LGG-1 との結合を増強するキナーゼである IKKE-1 も線虫で同定されている。このようなオートファジー受容体やリン酸化による制御機構は、PINK1/PARKIN 依存的マイトファジー経路と共通しているが、線虫では異なったタンパク質が使われている。一方、母性遺伝における mtDNA の分解に関与する DNase としては、ショウジョウバエや線虫において、エンドヌクレアーゼ G (ENDOG) が報告されている (Steven and Patrick 2012、Qinghua *et al.* 2016)。しかし、クリプトコッカスにおいては、ENDOG のホモログである NUC1 の欠損変異体においても mtDNA の分解が生じることから、別の DNase が母性遺伝に関与していると考えられる (Nishimura *et al.* 2020)。

このように、mtDNA の母性遺伝という現象は有性生殖を行う生物において広く保存されているが、ミトコンドリアや mtDNA の選択的な分解が生じるメカニズムは生物種ごとに多様性がある。有性生殖は、同形配偶子生殖から異形配偶子生殖、そして卵子と精子による卵生生殖へと進化してきたと考えられてお

り、同形配偶子生殖における 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重要である。

そこで、本研究では真正粘菌に着目した。原生生物である真正粘菌では、一倍体であるアメーバ細胞が同形の配偶子として機能する。2 種類の異なる交配型のアメーバ細胞を混合すると接合子を形成し、その後、細胞分裂を伴わない核分裂を繰り返し、単細胞多核体の変形体となる (図 1)。真正粘菌の接合は、連鎖しない 3 つの遺伝子座 (*matA*、*matB*、*matC*) によって制御されており

(Dee 1966、Shinnick *et al.* 1978、Youngman *et al.* 1979、Kirouac-Brunet *et al.* 1981、Kawano *et al.* 1987b)、これまでに、*matA*、*matB*、*matC* 遺伝子座には少なくとも 15、15、3 の複対立遺伝子がそれぞれ見つかっていることから、交配型は少なくとも 675 種類以上存在すると考えられる。mtDNA の遺伝様式は *matA* 遺伝子座によって決定され (Kawano *et al.* 1987a、Kawano and Kuroiwa 1989)、交配における mtDNA のドナー株は母方として定義される (Moriyama and Kawano 2010)。たとえば、AI35 (*matA2*) と TU41 (*matA12*) の交配では、AI35 が母方であり、交配後 3 時間目において TU41 由来の mtDNA が完全に分解されていることが PCR 解析により証明されている (Moriyama and Kawano 2003)。

真正粘菌のアメーバ細胞は、1 細胞当たり約 15 個程度のシンプルな楕円形のミトコンドリアを持つ。各ミトコンドリアには巨大な mt 核様体の一つずつ含ま

れており、mt核様体あたり 62.9 kb の mtDNA が 40 - 80 コピー存在する (Kuroiwa 1982、 Takano *et al.* 2001、 Sasaki *et al.* 1994)。一般的に、mt核様体は非常に微小であり、例えばヒトでは、16.6 kb の mtDNA が数コピーしか含まれておらず、0.1 μm 以下の点状の構造として観察される (Sasaki *et al.* 2017)。一方、真正粘菌の mt 核様体は、1 - 2 μm の棒状の構造を取っており、母性遺伝における mtDNA の分解過程を mt 核様体の長さの変化として容易に解析することが可能である。さらに、真正粘菌では高純度でかつ mtDNA 複製などの機能を保持したミトコンドリアを大量に単離することも可能である (Sasaki *et al.* 2003)。

第一章では、真正粘菌における mt 核様体の分解過程を詳細に観察し、化学染色試薬を用いてミトコンドリアの生体染色による父方と母方由来のミトコンドリアの識別法を開発した。さらに、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 (TMRE) を用いて、mt 核様体分解過程におけるミトコンドリア膜電位の保持についても調べた。その結果、交配後 3 時間目から父方由来の mt 核様体の分解が生じ始め、交配後 5 時間目から母方由来のミトコンドリアが急速に増加することが示された。さらに mt 核様体の分解時にはミトコンドリアの膜電位が保持されており、mt 核様体が完全に消失した後、膜電位が低下することが分かった。

第二章では、真正粘菌における mtDNA の選択的分解に関与する DNase の性

質を調べるために、単離したミトコンドリアを様々な条件下でインキュベートし、mt 核様体の長さを測定することで DNase の活性を評価する *semi-in vitro* アッセイ法の開発を行った。その結果、*in vivo* で mt 核様体の分解が観察され始める交配後 3 時間目の接合子から単離したミトコンドリアにおいて Mg^{2+} 要求性で、活性 pH 範囲が pH7.5 - 9.0 である DNase が存在することが分かった。さらに、この DNase 活性は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検出されなかった。よって、母性遺伝における mt 核様体の分解に関与する DNase は Mg^{2+} 要求性である可能性が示唆された。

以上の結果は、母性遺伝における接合後の mtDNA 分解メカニズムに関する重要な知見であり、真正粘菌における母性遺伝に関与する DNase を同定するための重要な手掛かりとなることが期待される。

第一章

真正粘菌の接合子成熟過程における

ミトコンドリア核様体及び

ミトコンドリアの動態解析

1-1. 要旨

有性生殖を行う真核生物において、mtDNA は母性遺伝することが知られている。近年、母性遺伝の制御において、ミトコンドリアや mtDNA の父方選択的な分解が重要であることが分かってきた。特に、同形配偶子においては、mtDNA 分解はミトコンドリア分解の前に生じることから、母性遺伝の引き金となる重要なステップであることが予想される。同形配偶子である真正粘菌の mt 核様体は棒状で 1 - 2 μm と非常に大きく、配偶子であるアメーバ細胞は一斉に接合子を形成し、その後、同調して成熟する。さらに、ミトコンドリアにミトコンドリア融合プラスミドが含まれない限り、ミトコンドリアの融合が生じない。よって、真正粘菌は母性遺伝における mtDNA 分解の解析に適している。しかし、これまでに真正粘菌においてミトコンドリアの蛍光ラベリング法は確立されておらず、母性遺伝過程における父方と母方由来の mt 核様体およびミトコンドリアの動態はよくわかっていない。

本章では、様々な生体染色法を用い、真正粘菌の接合子の成熟過程における mt 核様体の分解やミトコンドリアの増殖を、父方と母方由来のミトコンドリアを区別しながら解析し、さらに、mt 核様体の分解時期におけるミトコンドリア膜電位の低下が生じる時期を解析した。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。接合子成熟過程における 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 時間目にかけてミトコンドリア核様体の分解は急速に進行し、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、同時に赤色で生体染色することが可能な N-aryl Pyrido Cyanine 3 を用いることで、接合子内における AI35 と DP246 のミトコンドリアを識別しながらミトコンドリア核様体を観察する方法を確立した。その結果、交配後 3 時間目から DP246 由来の mt 核様体が選択的に分解されることを初めて細胞学的に示した。また、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 時間目から増加した。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。さらに、ミトコンドリアをテトラローダミンメチルエステル (TMRE) 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。その結果、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た。これらの結果は、真正粘菌の母性遺伝において、接合後に父方と母方由来のミトコンドリアおよび mt 核様体がそれぞれ異なる制御をされており、かつ mt 核様体が完全に分解された後に、ミトコンドリアの膜電位の低下が生じることを示唆している。

1-2. 序論

有性生殖を行う真核生物において、mtDNA は母性遺伝することが知られている。近年、そのメカニズムとして、受精／接合後にミトコンドリアや mtDNA が積極的に分解されることが重要であることが分かってきた。精子や卵子などの異形配偶子では、精子形成過程において精子ミトコンドリアや mtDNA が極端に減少するが、同形配偶子では、ミトコンドリアや mtDNA の量に差が見られず、接合後に父方由来のミトコンドリアや mtDNA が分解される。また、同形配偶子である真正粘菌 (Moriyama and Kawano 2003) やクリプトコッカス (Nishimura *et al.* 2020) においては、母方由来のミトコンドリアの分解の前に mtDNA 分解が生じることから、mtDNA 分解は母性遺伝の引き金となる重要なステップであることが予想される。

真正粘菌はクリプトコッカスと比較して、母性遺伝における mtDNA 分解の解析に適している。生体内で mtDNA は、タンパク質と共に複合体を形成し、mt 核様体として存在しているが、一般に mt 核様体は非常に小さく、クリプトコッカスの mt 核様体のサイズは 0.1 - 0.5 μm しかない。一方、真正粘菌の mt 核様体は、非常に大きく、1 - 2 μm の棒状の構造を取る。また、mt 核様体の長さは、mtDNA のコピー数に比例しているため (Sasaki *et al.* 1994)、母性遺伝における mtDNA の分解過程を mt 核様体の長さの変化として容易に解析することが可能

である。また、クリプトコッカスでは 2 種類の異なる交配型である α -細胞（父方）と a-細胞（母方）を混合すると、a-細胞より放出されたフェロモンに応答して α -細胞が伸長し、接合子を形成するが、その接合率は 5-10%程度と低く、さらに、接合子の成熟過程を同調させることも困難である（Nisimura *et al.* 2020）。一方、真正粘菌では、2 種類の異なる交配型である AI35（母方）と DP246（父方）を混合すると、交配後 1 時間目で約 75%の細胞が一斉に接合子を形成し、その後同調して成熟する（浦川 修士論文 2019）。そのため、真正粘菌では接合子成熟過程における mt 核様体やミトコンドリアを経時的に解析することが可能である。さらに、一般に、ミトコンドリアの形態は複雑で融合と分裂を繰り返すが、真正粘菌ではミトコンドリアにミトコンドリア融合プラスミドが含まれない限り、ミトコンドリアの融合は生じない（Kawano *et al.* 1993）。よって、接合子内で父方と母方由来のミトコンドリアを識別することが可能となれば、母性遺伝過程における父方と母方由来の mt 核様体およびミトコンドリアの動態をそれぞれ区別して解析することができる。

これまでに真正粘菌を用いた解析により、交配型が異なるアメーバ細胞である AI35 と TU41 を交配させると、交配後 3 時間目では接合子内の約半数のミトコンドリア内で mt 核様体が消失している様子が観察された。そして、PCR 解析により、AI35 由来の mtDNA のみが増幅され、DP246 由来の mtDNA は増幅され

なかったことから、ミトコンドリアの母性遺伝がミトコンドリア内の父方 mtDNA の完全な分解により生じることがわかった (Moriyama and Kawano 2003)。このように、接合後における mtDNA の選択的分解が母性遺伝に重要であることは真正粘菌で初めて示され、その後、メダカにおいても受精後に同様のメカニズムが報告された (Nishimura *et al.* 2006) しかし、これまでに真正粘菌においてミトコンドリアの蛍光ラベリング法は確立されておらず、母性遺伝過程における父方と母方由来の mt 核様体およびミトコンドリアの動態はよくわかっていない。

本章では、化学染色を用いたミトコンドリアの生体染色、および観察条件の検討を行い、真正粘菌の成熟過程における父方と母方由来の mt 核様体の分解およびミトコンドリアの増殖を解析した。さらに、ミトコンドリア膜電位感受性の高い染色試薬である TMRE を用いて、mt 核様体の分解時期におけるミトコンドリア膜電位の変化を調べた。

1-3. 実験材料および方法

1-3-1. 実験に用いたアメーバ細胞株およびその培養法

本研究では、真正粘菌の交配型が異なる 2 種類のアメーバ細胞株、AI35 と DP246 を用いた。アメーバ細胞は PGY リッチプレート(32.3 mM KH_2PO_4 、11.5 mM K_2HPO_4 、4 mM MgSO_4 、0.75 % グルコース、1 % BactoTM Peptone、0.1 % BactoTM yeast extract、1.5 % アガロース)上で、餌となるバクテリア(*Aerobacter aerogenes*)と共に、24°Cインキュベーター内で二員培養した。

1-3-2. 接合子の形成

本研究では、接合子を形成するために AI35 と DP246 を用いた。アメーバ細胞を培養したプレートに 10 ml の水(DW)を加え、スプレッターを用いてアメーバ細胞をかきとった。回収した細胞懸濁液を 1,600 ×g で 5 秒間遠心し、上清を捨てた。10 ml の DW を加え、細胞懸濁液を 1,600 ×g で 5 秒間遠心し、上清を捨て、この操作をもう一度行い、1 ml の DW を加えた。AI35 と DP246 それぞれの細胞数を、血球計算版を用いて測定した。AI35 および DP246 の細胞濃度が (1.4×10^6 cells / ml) となるよう希釈し、AI35 と DP246 の細胞懸濁液を混合した。細胞懸濁液を SM30 プレート(10.5 mM クエン酸一水和物、19.5 mM クエン酸三ナトリウム、10.0 mM MgSO_4 、2.5 % アガロース)にまき、24°Cインキュベーター

ー内で培養した。

1-3-3. 固定細胞における mtDNA の染色

細胞を固定するために、細胞を培養した SM30 プレート を 1 cm 角に切り出し、細胞が培養されている面を下にし、カバーガラスへのせた。ゲルの上から固定液（8%ホルムアルデヒド、1%グルタルアルデヒド/10xPBS）を滴下し、3分間静置した。その後、ゲルの側面から界面活性剤（0.5% Triton100 /10xPBS）を添加し、5分間静置した。その後、PBS 中でカバーガラスからゲルをはがし、カバーガラスに 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を滴下した。

1-3-4. MitoTracker を用いたアメーバ細胞中のミトコンドリアの生体染色

プレートで培養していたアメーバ細胞を、上記に記した方法で回収した。ジメチルスルフォキシド(DMSO)を溶媒とした 2 mM MitoTrackerTM Red CMXRos (MTR; Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA)もしくは MitoTrackerTM Green FM (MTG; Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA)を、終濃度が 1 μM となるよう細胞懸濁液に加え、24°Cインキュベーター内で 30 分培養した。その後、細胞懸濁液を SM30 プレートにまき、24°Cインキュベーター内で 4 時間培養した。

1-3-5. TMRE を用いたミトコンドリアの生体染色

プレートで培養していたアメーバ細胞を、上記に記した方法で回収した。

DMSO を溶媒とした 4 mg/ml のテトラメチルローダミンジエステル(TMRE; Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)を、終濃度が 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう AI35、DP246 もしくはそれらを混合した細胞懸濁液に加え、24°Cインキュベーター内で 30 分培養した。その後、細胞懸濁液を SM30 プレートにまき、24°Cインキュベーター内で培養した。

1-3-6. mtDNA の生体染色

プレートで培養していたアメーバ細胞を、上記に記した方法で回収した。

DMSO を溶媒とした SYBR Green I (S7585; Thermo Fisher Scientific)もしくは 1 mM N-aryl Pyrido Cyanine 3 (PC3)を細胞懸濁液にそれぞれ終濃度が 5000 倍希釈もしくは 1 μM となるよう加えた。

1-3-7. 細胞の観察

本実験では、細胞の観察に位相差蛍光顕微鏡 BX51N-34FL (Olympus、Tokyo、Japan)を用い、6 メガピクセルカラーカメラ Axiocam506 (Zeiss、Oberkochen、

Germany)を用いて撮影した。観察では 100 倍のシリコーン浸対物レンズ (UPLSAPO100XS、WD = 0.2 mm、NA = 1.40、Olympus) を使用し蛍光観察時には励起用フィルター (WU、WIB または WIG)を用いた。

1-3-8. 画像解析

画像解析には ImageJ (National Institutes of Health <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)を用いた。核様体の長さの測定および蛍光強度の測定には ImageJ の Measure ツールを用いた。

1-4. 結果

1.4.1 真正粘菌における接合子成熟過程の観察

本研究では、交配型の異なる 2 種類のアメーバ細胞として、ミトコンドリア融合プラスミドを持たない AI35 と DP246 を用いた。真正粘菌のアメーバ細胞では、シンプルな楕円形のミトコンドリア内に棒状の長い mt 核様体が観察された (図 2A a - f)。AI35 と DP246 は、それぞれ 1 細胞当たり 12.3 ± 3.8 と 12.3 ± 3.3 (平均値 \pm 標準偏差) のミトコンドリアを持っていた (図 2B)。AI35 と DP246 を交配すると、アメーバ細胞の約 75% が融合し、接合子を形成した。接合子の成熟過程は、細胞融合直後の核が 2 つ存在する第一ステージ (図 3A a - c)、核が融合して核小体が 2 つ存在する第二ステージ (図 3A d - f)、核小体が融合して 1 つの核の中に 1 つの大きな核小体が存在する第三ステージ (図 3A g - i) に区別できる。交配後 1 時間目においては、接合子の 95% は第一ステージであり、ミトコンドリアの数は 27.6 ± 2.5 個であった (図 2B) 第二ステージの接合子は交配後 1 時間目では 5% しか存在していなかったが、交配後 2 - 3 時間目には増加した (図 3B)。第三ステージの接合子は交配後 2 時間目から現れ始め、5 時間目では 80% の接合子を占めた (図 3B)。このように、AI35 と DP246 の交配では細胞は同調して接合し、成熟することが分かった。

また、第三ステージの接合子では、長さが短くなった mt 核様体を持つミトコ

ンドリアや mt 核様体を含まないミトコンドリアが観察された (図 3A g - i)。真正粘菌では、mt 核様体の長さは mtDNA 量に比例するため (Sasaki *et al.* 1994)、接合後の mt 核様体の長さを経時的に測定し、接合子成熟過程における mtDNA 量の変化を調べた。アメーバ細胞では、長さが 1.0 - 1.5 μm の mt 核様体が最も多く、0.5 μm より短い mt 核様体は観察されなかった (図 4)。また、交配後 1 時間目の接合子でも同様の傾向を示した。しかし、交配後 3 時間目の接合子では 0.5 μm 以上の長さの mt 核様体の数が減少し始め、0.5 μm より短い mt 核様体が現れ始めた (図 4)。このような短い核様体の割合は交配後 3 時間目から 5 時間目までに 7% から 30% へと急速に増加し、交配後 11 時間目の接合子では 38% にまで達した。また mt 核様体を含まないミトコンドリアの比率も、交配後 5 - 11 時間目の接合体で徐々に増加した (図 4)。これらの結果は、mt 核様体の分解が交配後 3 時間目から始まり、少なくとも 11 時間目までは接合子中のミトコンドリア内でヌクレアーゼ活性が維持されていることを示唆している。さらに、母性遺伝の mt 核様体の分解過程におけるミトコンドリアヒストン様タンパク質 Glom の局在を調べるために、免疫染色を行った。Glom は、mt 核様体の主要タンパク質であり、mtDNA20 bp あたり 1 分子が結合していると計算される (Sasaki *et al.* 2003)。核様体構成タンパク質の 1 つである Glom の抗体免疫染色を行い、mt 核様体を構成するタンパク質の局在変化についても調べた (図 5)。

その結果、DAPI 染色において 0.5 μm 以上の mt 核様体では、DAPI 染色像と免疫染色像の長さに差はなかった (図 5A a - f, j, 5B)。しかし、DAPI 染色において 0.5 μm 未満の mt 核様体では、DAPI 染色像よりも免疫染色像の方が長いことが示された。(図 5A a - c, g - j, 5B)。よって、よって、Glom の局在変化よりも前に mtDNA の分解が生じていることが示唆された。

1.4.2 真正粘菌におけるミトコンドリアの生体染色

真正粘菌のミトコンドリアは、交配型が異なるアメーバ同士で形態的な差が見られず (図 2A a - f)、接合子内で父方と母方由来のミトコンドリアを識別することは不可能である。そのため、接合子内で観察された mt 核様体の短縮が父方由来のミトコンドリア内のみで特異的に生じているのかはわかっていない。そこで、本研究では化学染色によるミトコンドリアの生体染色を行うことで接合子内の片親由来のミトコンドリアの可視化を目指した。アメーバ細胞のミトコンドリアを生体染色するために、本研究では MitoTracker Red CMXRos (MTR) と MitoTracker Green FM (MTG) を試した (図6)。アメーバ細胞を 1 μM の MTR で染色し、SM30 プレート上で観察した場合、アガロースの影響でミトコンドリアの位相差のかかり方が弱く、また染色過程で破碎された細胞片がアガロース上に吸着してしまい、蛍光シグナルのバックグラウンドが高く、はっきりと

ミトコンドリアを観察することができなかった (図 6 a - c)。一方で、染色したアメーバ細胞をプレートから回収し、DW 中で観察した場合、浸透圧によりミトコンドリアの形が丸くなってしまいが、ミトコンドリアは位相差により黒く丸いオルガネラとして観察され、さらに蛍光シグナルのバックも抑えられ、ミトコンドリアが明瞭に観察できるようになった (図 6 d - i)。また、MTR と MTG いずれの染色試薬を用いた場合も細胞中のミトコンドリアを可視化することができたが、これらの染色試薬はミトコンドリア以外の小さく丸い構造も染色された (図 6 e, h : 矢じり)。MTR で染色したアメーバ細胞は MTG で染色した細胞よりも多くの小さく丸い構造が存在していたため、本研究では今後の実験で $1 \mu\text{M}$ の MTG を用いることとした。

次に、MTG 染色による接合子形成への影響を調べた。どちらか一方のアメーバ細胞のみを染色し、接合子を形成した場合、染色していないアメーバ細胞を接合させた時と比べて接合率は少し低下したが、全細胞中の接合子の割合は約 50% と高い接合率を維持していた (図 7A)。また、交配後 1 時間目の接合子を観察したところ、接合子中の約半数のミトコンドリアは MTG の蛍光を持っていた (図 7B)。よって、この手法を用いることで、接合子中で DP246 と AI35 由来のミトコンドリアを識別することが可能となった。

1.4.3 母性遺伝における父方由来の mt 核様体分解の観察

これまでに、AI35 と DP246 を交配した接合子を成熟させた変形体のミトコンドリアを用いた PCR 法によって AI35 由来の mtDNA のみが遺伝することが報告されてきた (Moriyama and Kawano 2003) が、接合子中で DP246 由来のミトコンドリアでのみ mtDNA の分解が生じているかは確かめられていない。そこで本研究では、DNA を赤色で生体染色することが可能な N-aryl Pyrido Cyanine 3 (PC3) を用いて、MTG 染色により接合子内の片親由来のミトコンドリアを識別しながら mt 核様体を可視化した。Hela 細胞では 10 nM の PC3 で染色した場合、核 DNA のみが染色されるが、PC3 の濃度を下げると核 DNA だけでなく mtDNA も染色され、100 pM の PC3 を用いた場合では、mtDNA が優位に染色される (Uno *et al.* 2021)。真正粘菌のアメーバ細胞を PC3 で染色したところ、1 μ M の PC3 で染色した時、mtDNA が核 DNA よりも優位に染色された。AI35 と MTG で染色した DP246 を交配させた接合子 (AI35 \times MTG-stained DP246) では、1 μ M PC3 で DNA 染色したところ、交配後 1 時間目では、すべてのミトコンドリアに長い棒状の mt 核様体が観察された (図 8 a-e)。一方で、交配後 5 時間目では、染色されていないミトコンドリアには長い棒状の mt 核様体が観察されたが、MTG で染色されたミトコンドリアには短くなった mt 核様体も観察された (図 8 f-j)。

さらに、交配後 1、3、5 時間目の接合子における AI35 由来の mt 核様体と DP246 由来の mt 核様体の長さをそれぞれ測定した (図 9、10)。交配後 1 時間目の接合子 (AI35×MTG-stained DP246) では、AI35 および DP246 由来の mt 核様体は長さが 1.0 - 1.5 μm の mt 核様体が最も多く、0.5 μm より短い mt 核様体は観察されなかった (図 9 a、b)。また mt 核様体の長さの平均もそれぞれ、 $1.50 \pm 0.50 \mu\text{m}$ と $1.56 \pm 0.47 \mu\text{m}$ と差はなかった (図 10 a)。交配後 3、5 時間目において、AI35 由来の mt 核様体の長さは交配後 3、5 時間目でも変化しなかったが (図 9 a、図 10 a)、DP246 由来の mt 核様体は交配後 3 時間目から短くなり始め、0.5 μm より短い mt 核様体が観察され始めた (図 9 b)。そして、5 時間目では DP246 由来の mt 核様体の長さの平均は $0.57 \pm 0.28 \mu\text{m}$ となった (図 10 a)。また、MTG-stained AI35×DP246 を用いた場合でも同様に、3 時間目から DP246 由来の mt 核様体のみが短くなり始めたことから (図 9 c、d、図 10 b)、MTG 染色は mt 核様体の分解に影響を与えていないことも示唆された。以上の結果から、AI35 と DP246 を交配させた場合、DP246 由来の mt 核様体が交配後 3 時間目から選択的に分解され始めることが分かった。

1.4.4 母性遺伝における母方由来のミトコンドリアの増殖

次に、ミトコンドリアの増殖が生じる時期を特定するために、片親由来の

ミトコンドリアを染色した接合子を用いて、交配後 1、3、5 時間目における AI35 および DP246 由来のミトコンドリアの数をそれぞれ測定した (図 11)。交配後 1 時間目の接合子 (AI35×MTG-stained DP246) では、AI35 由来と DP246 由来のミトコンドリアは、1 細胞当たりそれぞれ 12.6 ± 1.2 と 12.5 ± 3.0 個ずつ観察され (図 11 a)、これらはアメーバ細胞中に存在しているミトコンドリアの数と同程度であった (図 2 B)。また、交配後 3 時間目の接合子においても、AI35 および DP246 由来のミトコンドリアどちらも数に変化はなかった。しかし、交配後 5 時間目では DP246 由来のミトコンドリアの数は変化しなかったが、AI35 由来のミトコンドリアの数のみが増加し、1 細胞当たり 20.8 ± 1.6 個となった (図 11 a)。MTG-stained AI35×DP246 を用いた場合でも同様に、交配後 5 時間目で AI35 由来のミトコンドリアのみが増加したことから (図 11 b)、MTG 染色によるミトコンドリアの増加への影響はないと考えられる。これらの結果は、接合子の成熟過程において、AI35 由来のミトコンドリアと DP246 由来のミトコンドリアがそれぞれ異なる増殖の制御を受けている可能性を示唆している。

1.4.5 TMRE 染色による接合子成熟過程のミトコンドリア膜電位の変化の解析

次に、mt 核様体分解中のミトコンドリア内膜の状態を調べるために、TMRE を用いて、接合子成熟過程におけるミトコンドリアの膜電位の変化を調べた。

ミトコンドリア内膜の崩壊によるミトコンドリアの膜電位の低下は、TMRE の蛍光シグナルを低下させることが知られている (Qinghua *et al.* 2016)。AI35 と DP246 を混合し、TMRE で 30 分染色したのち、プレート上で細胞を交配させた。mt 核様体を同時に可視化するために SYBR Green I を用いて細胞を染色し、交配後 5、8、11 時間目の接合子内のミトコンドリアと mt 核様体を観察した (図 12)。各細胞の最も明るい TMRE の蛍光シグナルの強度を 100%とした場合、交配後 5 時間目の接合子では、長さが 0.5 μm より短い mt 核様体を持つミトコンドリアを含む、全てのミトコンドリアにおいて TMRE の蛍光シグナルの強度は 55-100%であった (図 12A)。また、この時期の TMRE の蛍光シグナルの強度とミトコンドリア内の mt 核様体の長さに相関がないことから、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と考えられる。また、交配後 8 時間目と 11 時間目の接合子では、mt 核様体が消失したミトコンドリアが多数観察されているが、交配後 8 時間目の接合子では mt 核様体が消失したミトコンドリアも、他の mt 核様体をもつミトコンドリアと同程度の TMRE の蛍光シグナルの強度を有していた (図 12B)。したがって、mt 核様体が消失した後も内膜が維持されていると考えられる。しかし、交配後 11 時間目の接合子では、mt 核様体が消失したミトコンドリアの一部において、TMRE の蛍光シグナルの強度が 20%まで低下した (図 12C)。このことから、mt 核様体が完全に分解され

た後に、ミトコンドリアの膜電位の低下が生じることが示唆された。

1-5. 考察

同形配偶子の母性遺伝における父方 mtDNA の選択的分解は、接合子の成熟過程においてのみ生じる。これまでに、真正粘菌の AI35 と TU41 を交配させた場合、交配後 3 時間目で約半数のミトコンドリアにおいて、mt 核様体が DAPI 染色で観察されなくなり、その時期の接合子を用いたシングルセル PCR では母方に相当する AI35 由来の mtDNA は増幅されるが、TU41 由来の mtDNA は増幅されない (Moriyama and Kawano 2003)。よって、TU41 由来 mtDNA の分解により、mt 核様体が観察されなくなったと考えられる。本研究では、母性遺伝過程における父方と母方由来のミトコンドリアおよび mt 核様体の詳細な動態解析を行うために、まず真正粘菌の接合子成熟過程における mt 核様体の長さを測定することで mt 核様体分解が始まる時期を調べた。真正粘菌の mt 核様体は、1 - 2 μm の棒状であり、mt 核様体の長さ と mtDNA 量は比例しており (Sasaki *et al.* 1994)、mt 核様体の長さの変化から mtDNA の分解の程度を調べることができる。交配型が異なる AI35 と DP246 を混合すると、1 時間以内に同調して接合が生じ、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見られなかった 0.5 μm 未満の mt 核様体をもつミトコンドリアが急速に増加した。また、5 時間目から 11 時間目にかけて徐々に mt 核様体が DAPI 染色で観察されないミトコンドリアが徐々に増加した (図 4)。AI35 と TU41 を交配させた場合と異なり、AI35 と

DP2464 の交配では、交配後 11 時間目でも分解途中の mt 核様体が観察されることから、真正粘菌では、交配する株の種類によって mtDNA の分解が生じる時期や分解の速度が異なることが示唆された。また、AI35 と DP246 の交配では、交配後 3 時間目から mt 核様体の分解が開始されることが分かった。さらに、MTG 染色を用いて、接合子内の AI35 および DP246 由来のミトコンドリアの識別する方法を確立し、交配後 3 時間目から生じる mt 核様体の分解は DP246 由来のミトコンドリアのみで生じていることを明らかにした (図 8、9、10)。この結果は、これまでの PCR 法による父方選択的な mtDNA 分解のデータと一致しているだけでなく、真正粘菌における父方由来のミトコンドリアでのみ mt 核様体が選択的に分解されることに対する初めての細胞学的証拠でもある。また、今回開発した接合子内の片親由来のミトコンドリア識別法を用いることで、接合子成熟過程において DP246 由来のミトコンドリアの数は変化しないが、AI35 由来のミトコンドリアのみが増加することを明らかにした (図 11)。AI35 由来のミトコンドリアの数は、交配後 3 時間目までは変化しないが、交配後 5 時間目では 1.7 - 1.8 倍に増殖した。よって、AI35 由来のミトコンドリアの増殖は、DP246 由来の mt 核様体の選択的分解の開始後に生じていることが示された (図 10、11)。また、これまでに、真正粘菌の 2 倍体である変形体では、ミトコンドリア数の倍化には 14 時間かかることが報告されており (Kuroiwa *et al.*

1978)、2時間で1.7 - 1.8倍という母方由来のミトコンドリアの増殖速度は、変形体のミトコンドリアの増殖速度と比較して非常に速い。真正粘菌の mtDNA には、呼吸複合体の必須サブユニットがコードされており (Takano *et al.*2001)、細胞内における半分の mtDNA が分解されるとエネルギー生産が著しく低下する可能性がある。したがって、AI35 由来のミトコンドリアの急速な増殖は、接合子のエネルギー生産を補うために重要かもしれない。また、多くの生物では、ミトコンドリアは分裂・融合を繰り返すために数の変化を捉えることは困難であり、母性遺伝における母方ミトコンドリアの増殖に関する知見はこれまで報告されていなかった。よって、真正粘菌は父方 mt 核様体の選択的分解だけでなく、母方ミトコンドリアの選択的増殖を解析する上でも非常に適した材料といえる。

AI35 由来のミトコンドリアはそれぞれ mt 核様体 を含んでいるため、交配後 3 時間目から 5 時間目にかけて mt 核様体 の数も同時に急速に増殖していることになる (図 11)。このような母方 mt 核様体の増殖は、クリプトコッカスにおいても接合子成熟時に観察されている (Nishimura *et al.*2020)。さらに、交配後 5 時間目の接合子において、AI35 由来の mt 核様体の長さは、交配後 3 時間目の接合子と同程度だったことから (図 10)、mtDNA の複製も交配後 3 時間目から

5 時間目にかけて急速に生じることが予想される。一方、卵生生殖を行う種では、卵形成期にミトコンドリアと mtDNA が増殖し、成熟卵子では mtDNA のコピー数が 100 倍にもなる (Jansen and De Boer 1998、El Meziane *et al.* 1989、Cree *et al.* 2008)。胚発生の初期卵割期には、mtDNA の複製は起こらないことが知られており (Cree *et al.* 2008)、ミトコンドリアの増殖も生じていない可能性がある。父方の mtDNA やミトコンドリアが除去される仕組みは、生物種によって異なる。したがって、母性遺伝の際に母方のミトコンドリアの増殖を制御する多様なメカニズムが存在すると考えられる。

これまでに、本研究では真正粘菌のアメーバ細胞、接合子、および変形体から高純度に単離したミトコンドリアを用いてショットガンプロテオミクス解析を行ってきた (表 1)。その結果、ミトコンドリア分裂に関与する因子の候補として、FtsZ、ダイナミン様タンパク質、ダイナミン B、OPA3、FIS1 が同定された。FtsZ は一部の生物においてミトコンドリアや葉緑体の分裂に必要であることが報告されている (Gilson *et al.* 2003、Beech *et al.* 2000、Strepp *et al.* 1998)。また、真正粘菌においてミトコンドリアの分裂時に、FtsZ が分裂面に局在することが抗体免疫染色法により示されている (山田 修士論文 2015)。ダイナミン様タンパク質およびダイナミン B は Dynamin related protein (Drp) の 1 つであ

り、Drp は様々な生物においてミトコンドリアの分裂に関与していることが報告されている。OPA3 はミトコンドリアの外膜に局在し、OPA3 の過剰発現はミトコンドリアの断片化を促進し、OPA3 のノックダウンはミトコンドリアを伸長させることから、ミトコンドリア分裂に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている (Seung-Wook *et al.* 2010)。FIS1 は酵母において、ミトコンドリア分裂に関与する Drp1 ホモログの Dnm1 をミトコンドリアにリクルートすることが報告されている (Rong *et al.* 2019)。今後、母方ミトコンドリアの選択的増殖の分子メカニズムを解明するために、接合子の成熟過程におけるこれらタンパク質の局在変化やタンパク質量の変化などを解析する必要がある。

同形配偶子生殖を行うクリプトコッカスでは、a-細胞と α -細胞を交配すると、 α -細胞由来の mtDNA (α -mtDNA) は除去され、a-mtDNA のみが継承される。ダブル型の初期接合子では、 α -ミトコンドリアの膜電位が維持され、 α -mtDNA と a-mtDNA の両方が存在する。 α -mtDNA の除去は、液胞内で α -ミトコンドリアが分解される前に行われる。液胞内では α -ミトコンドリアの膜電位の低下が観察されるが、クリプトコッカスでは膜電位が低下する正確なタイミングは不明である (Nishimura *et al.* 2020)。一方、線虫では、受精後速やかに父方ミトコンドリアの膜電位の消失と内膜の崩壊が起こる。このような内膜の崩壊は、

ENDOG のホモログである CPS-6 を膜内からマトリックスへと局在変化させ、父方 mtDNA の選択的分解やマイトファジーによる父方ミトコンドリアの選択的分解を引き起こす (Qinghua *et al.* 2016)。真正粘菌では、mt 核様体の分解が生じている交配後 5 時間目の接合子においても、ミトコンドリアの膜電位が維持されていた (図 12A)。さらに、mt 核様体を持たないミトコンドリアの膜電位の低下は、交配後 8 時間目の接合子では観察されなかったが、交配後 11 時間目に観察された (図 12B、C)。ヒト培養細胞を用いた解析により、mtDNA を持たない Rho0 細胞では、ミトコンドリアの膜電位を著しく低下させることが知られている (Domenico *et al.* 2016)。よって、mt 核様体の完全な分解は膜電位の低下を誘発している可能性がある。また、ミトコンドリア膜電位の低下により、マイトファジーが引き起こされることが知られている。マウスでは、脱分極した父方のミトコンドリアは PARKIN や MUL1 を介したマイトファジーにより分解される (Rebecca *et al.* 2016)。真正粘菌では、mt 核様体を持たないミトコンドリアの除去が交配後 60 時間目までに達成されることが報告されている (Moriyama and Kawano 2003)。したがって、交配後 11 時間目の接合子で見られた、ミトコンドリアの膜電位の低下もマイトファジーを介した父方ミトコンドリアの除去に関与する可能性がある。真正粘菌におけるマイトファジーを含むオートファジーの経路は不明であるが、BLAST 解析により真正粘菌は ATG 遺

伝子と類似した遺伝子をいくつか見つけた。今後、真正粘菌の母性遺伝においても、ミトコンドリアの選択的除去にマイトファジーが関与しているかどうかを調べる必要がある。

1.6. 図表

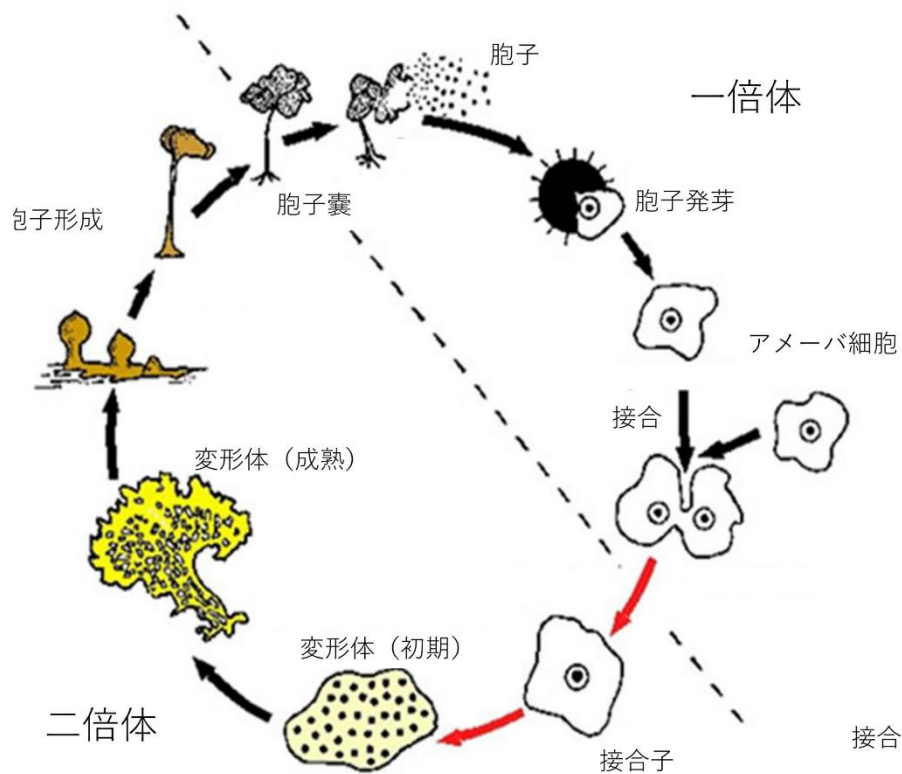


図 1. 真正粘菌の生活環

真正粘菌の生活環は、一倍体のアメーバ細胞の時期と二倍体の変形体の時期からなる。孢子から発芽したアメーバ細胞は異なる交配型のアメーバ細胞と接合する。接合子は細胞分裂を伴わない細胞核分裂を繰り返し、多核の変形体となる。変形体は、飢餓などの生育条件が悪くなると、減数分裂を行い孢子を形成して、生活環がまわる。図は「研究紹介 2.母性遺伝：性の起源とオルガネラの遺伝様式（http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pls/research_2.html）」より引用し、改訂した。

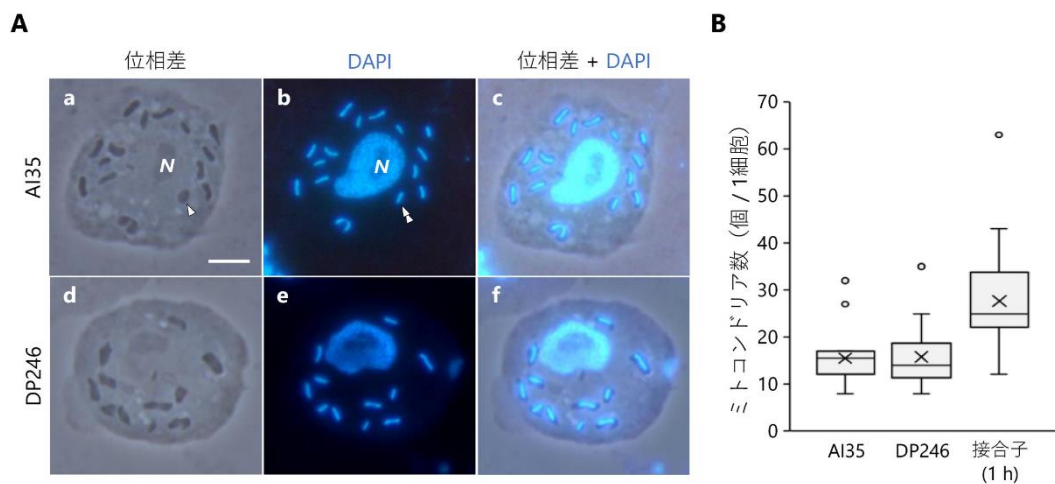


図 2. 真正粘菌のアメーバ細胞の観察

(A) アメーバ細胞の顕微鏡観察像

アメーバ細胞である AI35 (a-c) と DP246 (d-f) を、DAPI を用いて DNA 染色した。(a、d) 位相差像、(b、e) DAPI 染色像、および (c、f) 重ね合わせ像。矢じりはミトコンドリアを、二重矢じりは mt 核様体を、N は細胞核を示す。スケールバーは 5 μm 。

(B) アメーバ細胞と接合子の 1 細胞当たりのミトコンドリアの数

AI35、DP246 および交配後 1 時間目の接合子中に存在するミトコンドリアの数を測定した。箱ひげ図は AI35、DP246 および交配後 1 時間目の接合子における 1 細胞当たりのミトコンドリアの数を示している。n = 20。

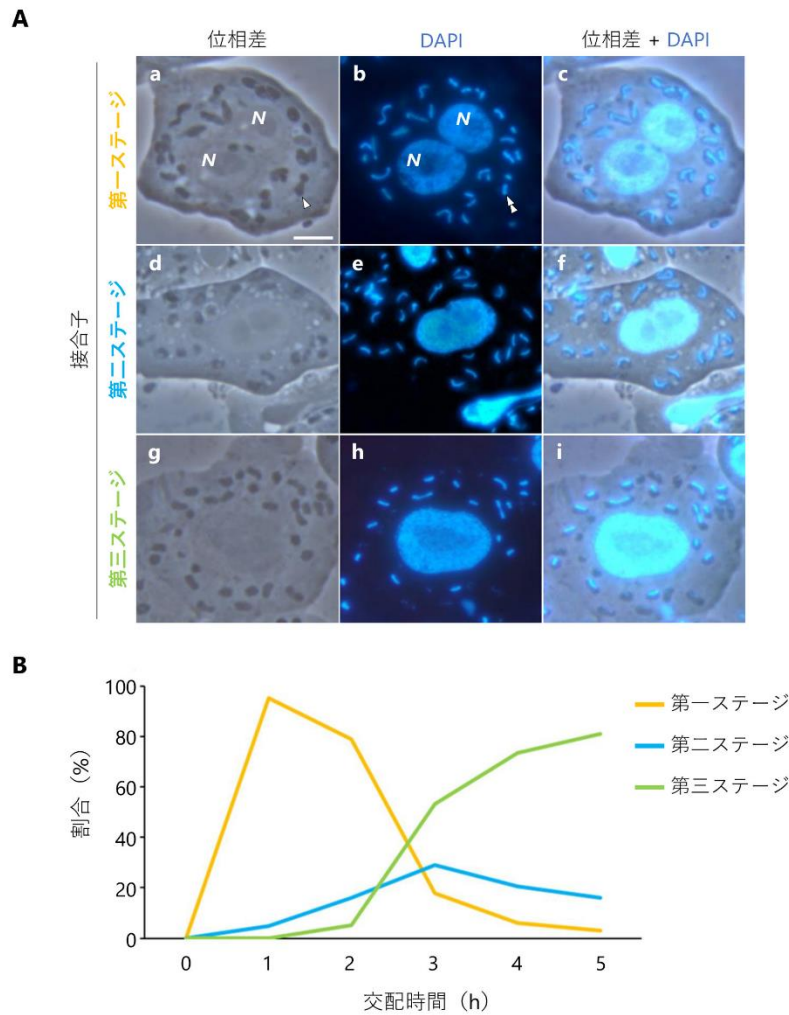


図 3. 真正粘菌の接合子成熟過程

(A) 各ステージの接合子の顕微鏡観察像

第一ステージ (a – c)、第二ステージ (d – f) およびの第三ステージ (g – i) の接合子を、DAPIを用いてDNAを染色した。(a, d, g) 位相差像、(b, e, h) DAPI染色像、および (c, f, i) 重ね合わせ像。第一ステージの接合子は (a – c)、2つの細胞核を有している。第二ステージの接合子 (d – f) では核膜が融合し、二つの核小体を有している。第三ステージの接合子 (g – i) では、2つの核小体が融合し、1つの核に1つの核小体を有している。矢じりはミトコンドリアを、二重矢じりは mt 核様体を、N は細胞核を示す。スケールバーは 5 μm 。

(B) 接合子成熟過程における各ステージの割合

交配後 0、1、2、3、4、5 時間目における第一ステージ (オレンジ)、第二ステージ (青)、および第三ステージ (緑) の接合子中の割合を示している。n > 160。

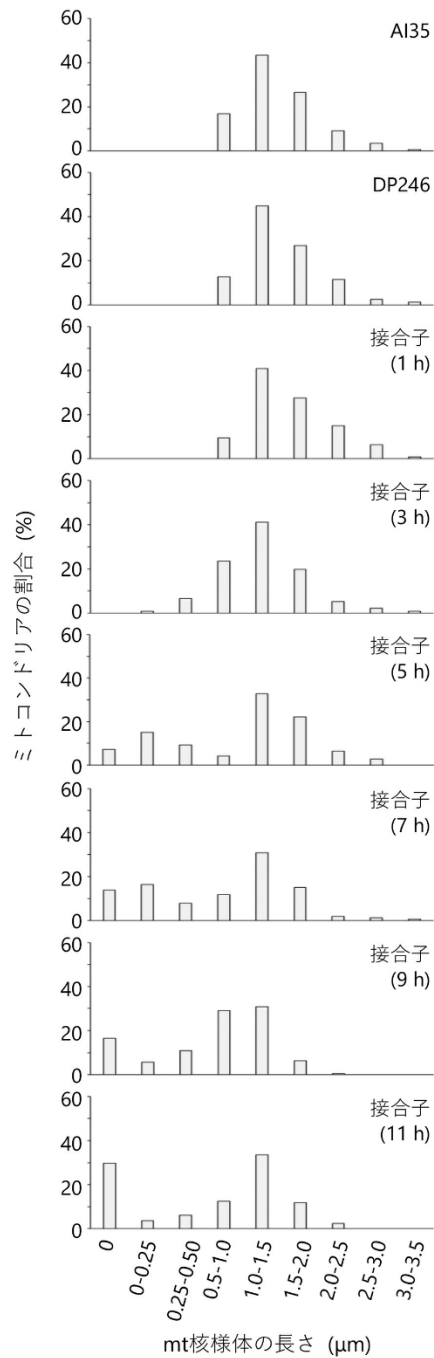


図 4. 接合子成熟過程における mt 核様体の長さの変化

AI35、DP246、および交配後 1、3、5、7、9、11 時間目の接合子を、DAPI を用いて DNA を染色し、mt 核様体の長さを測定した。ヒストグラムはそれぞれの長さの mt 核様体を持つミトコンドリアの割合を示している。AI35: n = 143、DP246: n = 156、接合子 (1 h) : n = 127、接合子 (3 h) : n = 136、接合子 (5 h) : n = 140、接合子 (7 h) : n = 152、接合子 (9 h) : n = 175、接合子 (11 h) : n = 161。

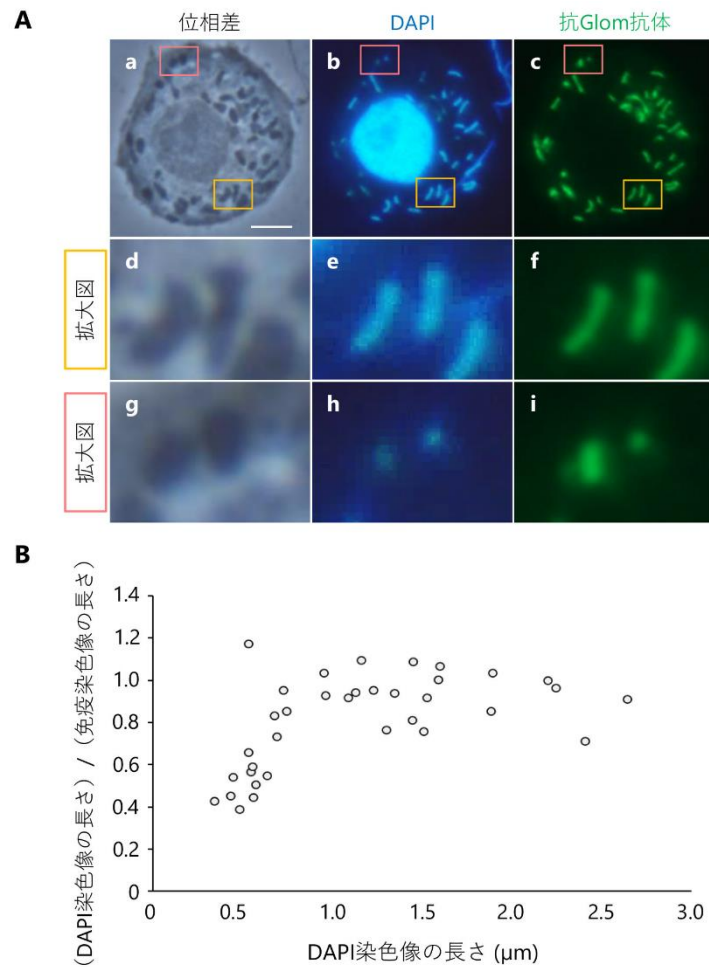


図 5. mt 核様体の分解過程におけるミトコンドリアヒストン様タンパク質 Glom の局在

(A) 交配後 5 時間目の接合子の顕微鏡観察

交配後 5 時間目の接合子 を、抗 Glom 抗体を用いて免疫染色を行い、DAPI を用いて DNA を同時染色した。(a – c) 接合子、(d – f) オレンジで囲った範囲の拡大図、および (g–i) 赤色で囲った範囲の拡大図。(a、d、g) 位相差像、(a、d、g) DAPI 染色像、および(a、d、g) 免疫染色像。スケールバーは 5 μm。

(B) DAPI 染色と抗 Glom 免疫染色における mt 核様体の長さの比較

DAPI 染色像の長さ と抗 Glom 抗体を用いた免疫染色像の長さを測定し、それぞれの DAPI 染色像の長さにおける (DAPI 染色像の長さ) / (免疫染色像の長さ) の値をプロットした。DAPI 染色像の長さが 0.5μm より長い場合は、免疫染色像の長さと同程度であり、その値は 1 に近いが、0.5μm より短い場合は、免疫染色像の長さが長いため、その値は小さくなった。

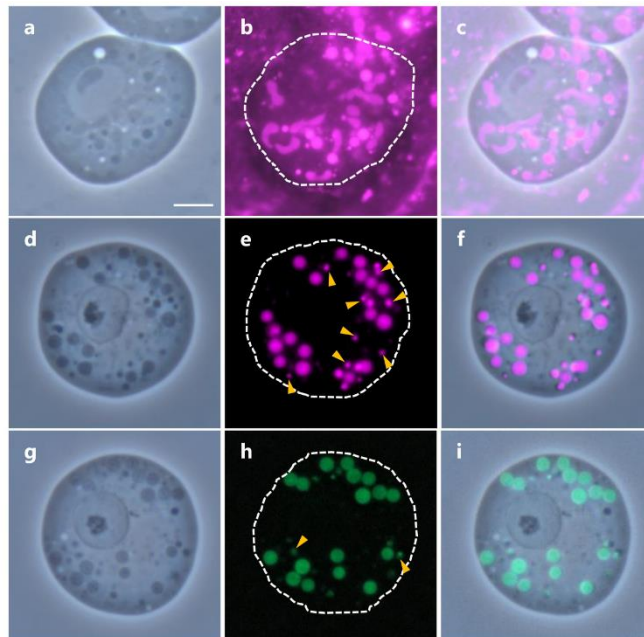


図 6. アメーバ細胞を用いたミトコンドリアの生体染色

ミトコンドリアを MTR (a - f) および MTG (g - i) で生体染色した AI35 をプレート上 (a - c) および DW 中 (d - i) で観察した。(a, d, g) 位相差像、(b, e) MTR 蛍光像、(h) MTG 蛍光像、および (c, f, i) 重ね合わせ像。プレート上の細胞では、位相差がかかりにくく、ミトコンドリアがはっきりと観察できず、染色された細胞破片による蛍光も多く観察された。DW 中の細胞では、ミトコンドリアが黒く丸いオルガネラとして観察された。MTR および MTG どちらで染色した場合もミトコンドリアが鮮明に染色された。MTR で染色した細胞では、MTG で染色した細胞よりも多くの小さな丸い構造 (矢じり) が観察された。白破線は細胞の位置を示す。スケールバーは 5 μm 。

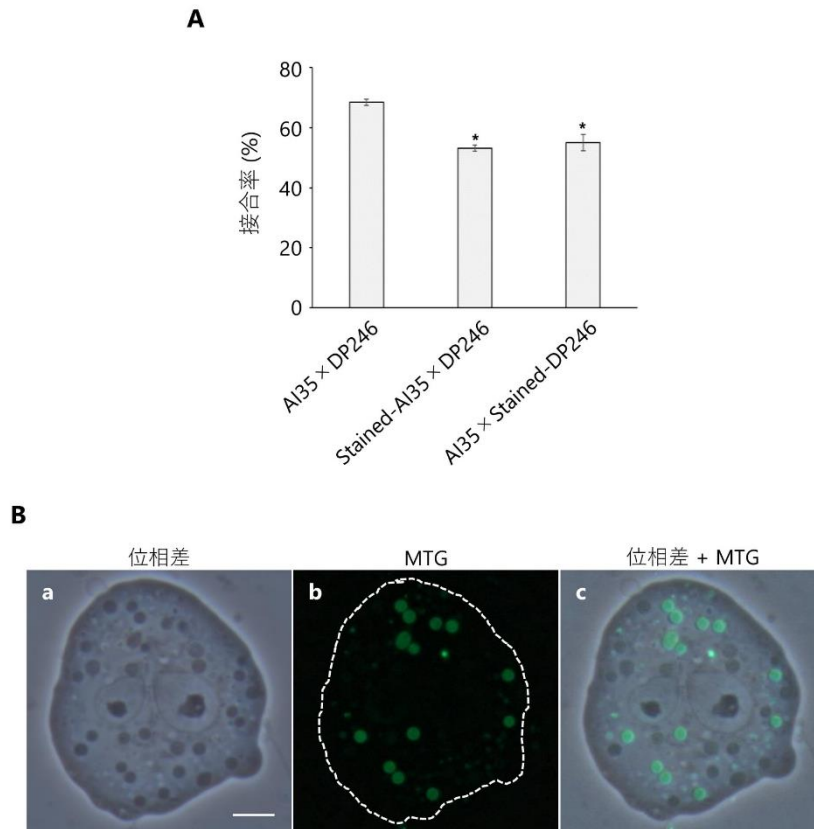


図 7. MTG 染色を行った細胞を用いた接合子形成

(A) MTG 染色による接合子形成への影響

染色していない AI35 と DP246 (AI35 × DP246)、MTG 染色した AI35 と染色していない DP246 (Stained-AI35 × DP246)、および染色していない AI35 と MTG 染色した DP246 (AI35 × Stained-DP246)をそれぞれ交配し、交配後 1 時間目における接合子の割合を調べた。n > 270。エラーバーは独立した 3 回の施行により求めた標準誤差である。有意差はダネット検定により求めた。*P < 0.05。

(B) 染色していない AI35 と MTG 染色した DP246 を交配した接合子の観察

染色していない AI35 と MTG 染色した DP246 (AI35 × Stained-DP246)を交配し、交配後 1 時間目における接合子を観察した。(a) 位相差像、(b) MTG 蛍光像、および (c) 重ね合わせ像。接合子中において半数のミトコンドリアが MTG の蛍光を有していた。白破線は細胞の位置を示している。スケールバーは 5 μm。

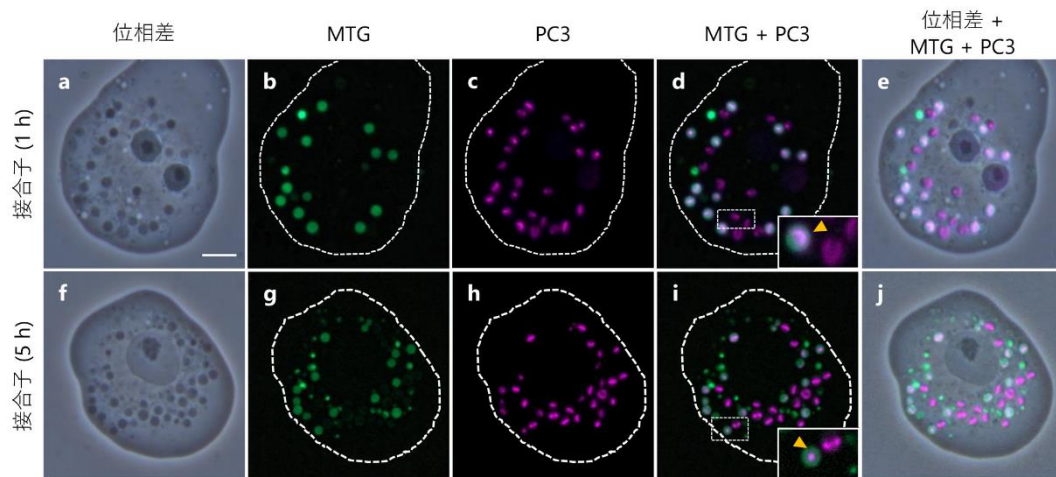


図 8. DP246 由来の mt 核様体の選択的分解の観察

染色していない AI35 と MTG 染色した DP246 を交配し、PC3 を用いた DNA 染色し、交配後 1 時間目 (a-e) および交配後 5 時間目 (f-j) の接合子を観察した。(a, f) 位相差像、(b, g) MTG 染色像、(c, h) PC3 染色像、(d, i) MTG 染色像と PC3 染色像の重ね合わせ像、および (e, j) 位相差像と蛍光像の重ね合わせ像。d と i の挿入図は白四角で囲った範囲の拡大像であり、矢じりは DP246 由来の MTG 蛍光を持つミトコンドリアを示す。交配後 1 時間目の接合子ではすべてのミトコンドリアが長い棒状の mt 核様体を持っていたが、交配後 5 時間目では DP246 由来のミトコンドリアでのみ短い mt 核様体が観察された。白破線は細胞の位置を示している。スケールバーは 5 μm 。

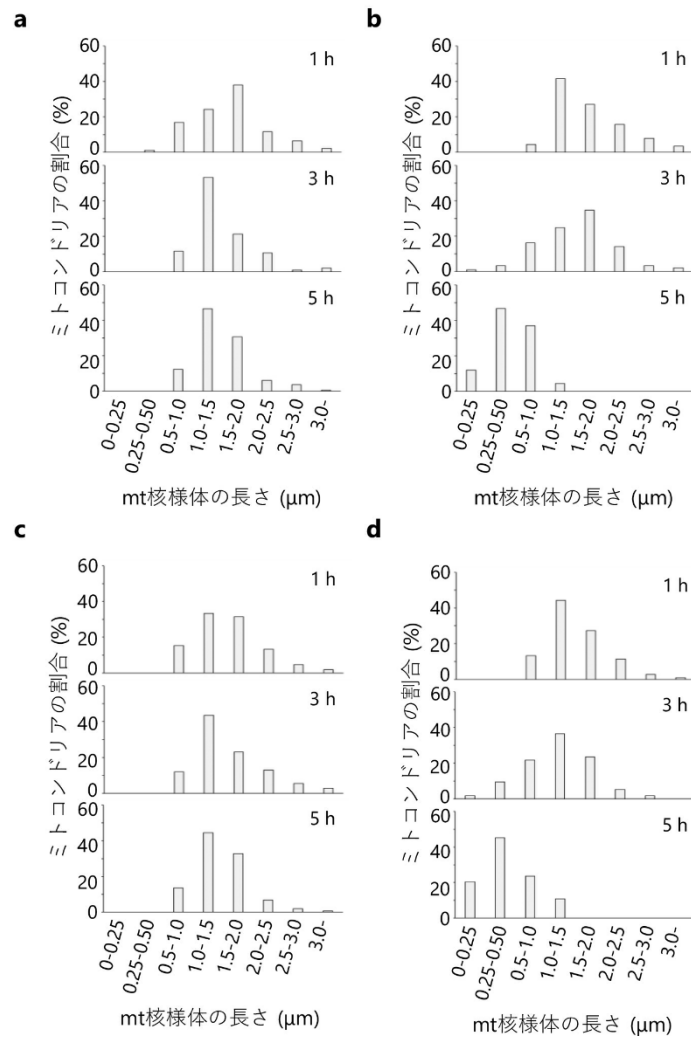


図9. 接合子成熟過程における AI35 と DP246 由来の mt 核様体の長さの分布

MTG 染色により接合子内の片親由来のミトコンドリアを識別し、PC3 を用いた DNA 染色後に、交配後 1、3、5 時間目の接合子におけるそれぞれの mt 核様体の長さを測定した。(a、b) AI35 と MTG 染色した DP246 を交配させた接合子における mt 核様体の長さの分布。(c、d) と MTG 染色した AI35 と DP246 を交配させた接合子における mt 核様体の長さの分布。(a、c) AI35 由来の mt-核様体の長さの分布。(b、d) DP246 由来の mt 核様体の長さの分布。ヒストグラムは各長さの mt 核様体を持つミトコンドリアの割合を示している。n = 8。

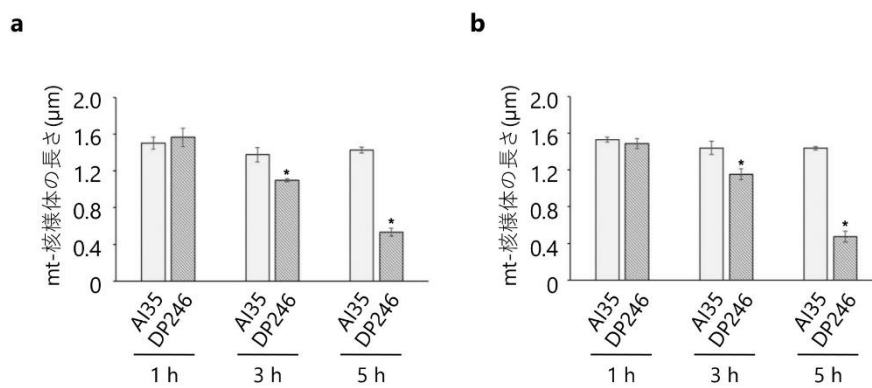


図 10. 接合子成熟過程における AI35 と DP246 由来の mt 核様体の長さの変化

MTG 染色により接合子内の片親由来のミトコンドリアを識別し、PC3 を用いた DNA 染色後に、交配後 1、3、5 時間目の接合子におけるそれぞれの mt 核様体の長さを測定した。(a) AI35 と MTG 染色した DP246 を交配させた接合子における mt 核様体の長さ。

(b) MTG 染色した AI35 と DP246 を交配させた接合子における mt 核様体の長さ。n = 8。エラーバーは独立した 3 回の施行により求めた標準誤差である。有意差はダネット検定により求めた。*P < 0.05。

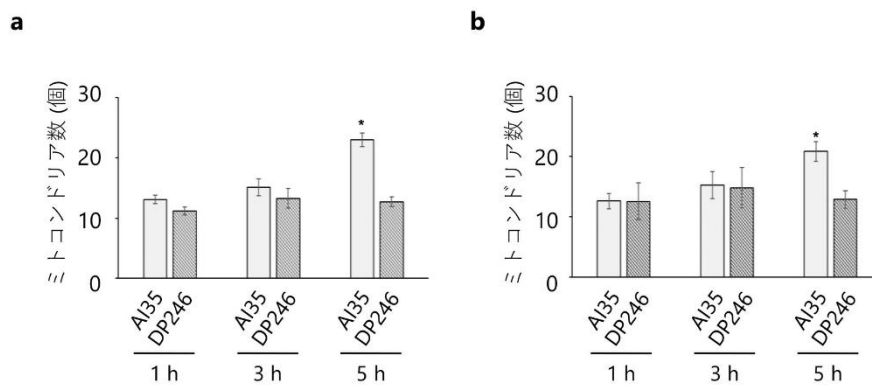


図 11. 接合子成熟過程における母方と父方由来のミトコンドリアの数の変化

MTG 染色により接合子内の片親由来のミトコンドリアを識別にし、交配後 1、3、5 時間目における AI35 と DP246 由来のミトコンドリア数を測定した。(a) AI35 と MTG 染色した DP246 を交配させた接合子。(b) MTG 染色した AI35 と DP246 を交配させた接合子。n = 7。エラーバーは独立した 3 回の施行により求めた標準誤差である。有意差はダネット検定により求めた。*P < 0.05。

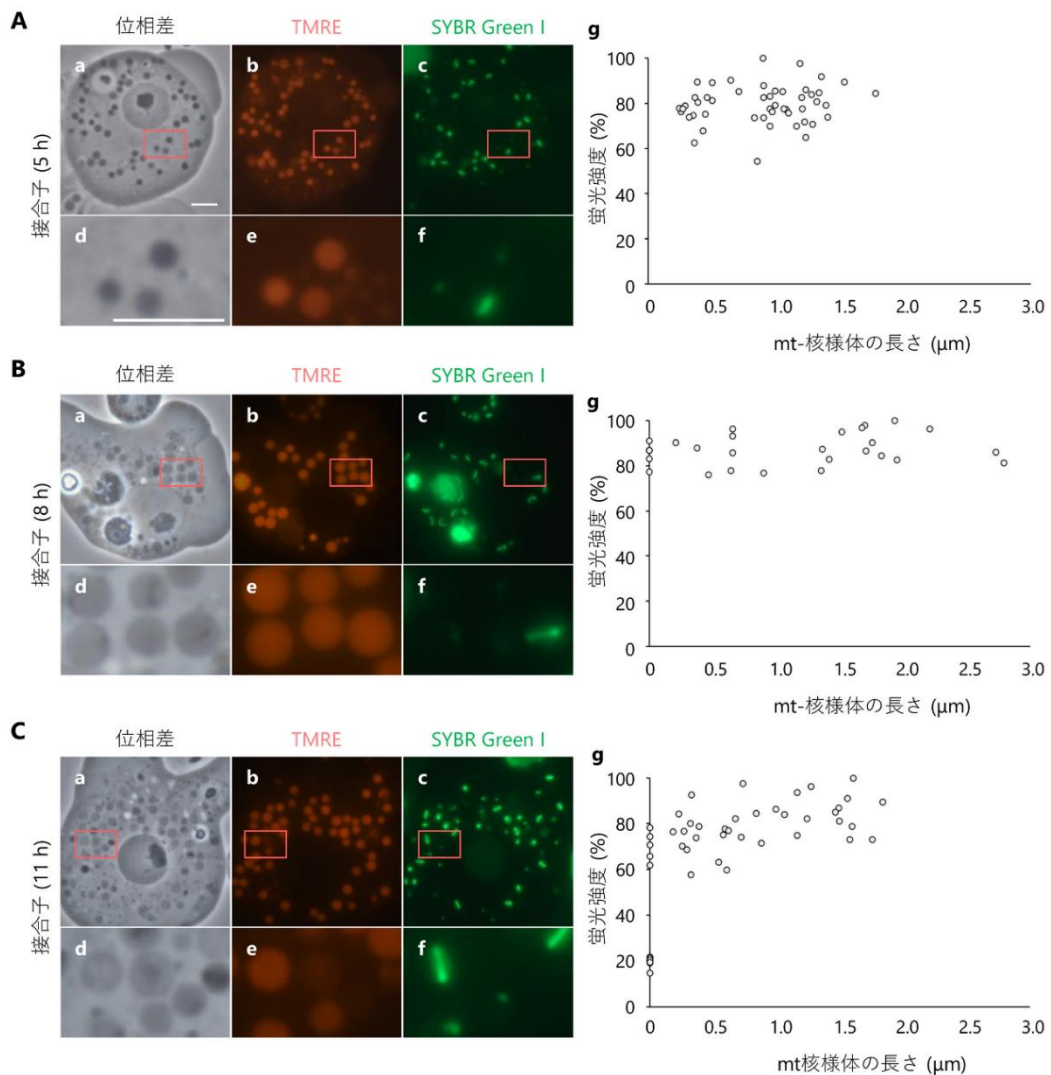


図 12. TMRE を用いた接合子成熟過程におけるミトコンドリア膜電位の変化

AI35 と DP246 を TMRE で染色後、交配後 5 (A)、8 (B)、11 (C) 時間目の接合子を顕微鏡観察前に、SYBR Green I を用いて mtDNA を染色した。(a - c) 接合子。(d - f) 赤四角の範囲を拡大した図。(a, d) 位相差像、(b, e) TMRE 蛍光像、(c, f) SYBR Green I 蛍光像。(g)プロット図は各 mt 核様体の長さのミトコンドリアにおける TMRE の蛍光強度をプロットした図。細胞内で最も高い蛍光強度を 100% とした。交配後 5 時間目の接合子では、mt 核様体の長さが 0.5 μm 未満のミトコンドリアが観察され(黄色矢じり)、交配後 8、11 時間目の接合子では、mt 核様体が消失したミトコンドリアが観察された(白矢じり)。交配後 11 時間目の接合子では、mt 核様体が消失したミトコンドリアの一部で TMRE の蛍光強度が低下していた (C)。スケールバーは 5 μm 。(A) n = 51、(B) n = 29、(C) n = 48。

ミトコンドリア分裂因子候補	AI35	DP246	接合子 (5 h)
FtsZ	5	5	5
ダイナミン様タンパク質	4	5	3
ダイナミン B	4	4	4
OPA3	4	5	5
FIS1	0	0	2

(検出回数)

表 1. 真正粘菌におけるミトコンドリア分裂に関与する候補因子

AI35、DP246 および交配後 5 時間目の接合子から単離したミトコンドリアを nanoLC-MS/MS 用いてショットガンプロテオミクスを行った。検出された配列を、Blast2Go を用いてタンパク質を同定した。表は同定されたタンパク質のうち、他の生物でミトコンドリア分裂に関与することが報告されているタンパク質の一覧である。プロテオミクス解析は独立して 5 回行い、表内の数字はそれぞれ検出された回数を示している。

第二章

単離ミトコンドリアを用いた
母性遺伝における選択的な mtDNA
分解に関与する DNase の解析

2-1. 要旨

同形配偶子における母性遺伝において、接合後にみられる父方 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ことがわかってきた。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 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 が母性遺伝における mtDNA の選択的分解に関与していないことが報告されている。真正粘菌においては、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 が同定されており、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、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 存在下では活性 pH 範囲が pH5.5 - 8.0 であり、 Ca^{2+} 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 に関して、それらの性質を明らかにすることは、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 同定の重要な手掛かりとなる。本章では、交配後 3 時間目の接合子から単離したミトコンドリアを用いて、様々な条件下でインキ

ュベートし、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アッセイ前後で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、母性遺伝に関与する DNase の性質を調べた。その結果、 Mg^{2+} 存在下のみで 0.5 μm より短い 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 活性が検出されなかった。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 7.5 - 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、これらの知見は、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の解明に役立つことが期待される。

2-2. 序論

DNase は、DNA を分解する酵素である。2 本鎖 DNA 切断活性をもつ DNase の多くは主に金属イオン結合ドメインとヌクレアーゼドメインを持つ。DNase は単体もしくは複合体を形成することで標的 DNA と結合し、二価の金属イオンを触媒として DNA の切断を行う。DNase の触媒機構は多様であり、必要な金属イオンの種類や数はそれぞれ異なることが知られている (Wei 2011)。ミトコンドリア内に局在する DNase としては、MGM1 (Kornblum *et al.* 2013、Szczeny *et al.* 2013)、FEN1 (Zheng *et al.* 2008、Gloor *et al.* 2012)、DNA2 (Zheng *et al.* 2008、Gloor *et al.* 2012)、APE1 (Stuart *et al.* 2004、Szczeny and Mitra 2005)、APE2 (Tsuchimoto *et al.* 2001、Burkovic *et al.* 2006)、ENDOG (Cote and Ruiz-Carillo 1993、Li *et al.* 2001、Ohsato *et al.* 2002)、EXOG (Tann *et al.* 2011、Tigchelaar *et al.* 2015)、TATDN (Obaidur 2018) など複数報告されている。それらは、DNA 修復、複製、mtDNA の維持、アポトーシスなど様々な機能をもつ。

これまでに、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 ENDOG が報告されている (Steven and Patrick 2012、Qinghua *et al.* 2016)。ENDOG は、ミトコンドリアの膜間に局在し、アポトーシスの際にミトコンドリアから放出され、核内でゲノムワイドな切断に関与するエンドヌクレアーゼとして機能することがよく知られている (David *et al.* 2006)。ショウジョウバエ

では、精子形成過程において 2 段階ですべての mtDNA は除去される。ENDOG の欠損変異株においては、最終的には mtDNA は完全に除去されるが、第一段階の mtDNA の除去が遅れることから、精子形成時の mtDNA の除去に ENDOG が関与していると考えられている (Steven and Patrick 2012)。また、線虫では、受精後に精子ミトコンドリアでのみ内膜の崩壊が生じ、膜間に存在していた ENDOG のホモログである CPS-6 がマトリックス内に流入することが免疫電顕で観察され、さらにエンドヌクレアーゼ G を発現抑制することによりミトコンドリアおよび mtDNA の分解の遅延が生じることが報告されている (Qinghua *et al.* 2016)。一方、同形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 の欠損変異株においても父方由来の mtDNA の分解が生じることから、クリプトコッカスにおいては NUC1 が母性遺伝における mtDNA の選択的分解に関与していないことが示唆された (Nishimura *et al.* 2020)。

これまでに、真正粘菌では、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 (表 2、浦川 修士論文 2019)。これらの DNase はアメーバ細胞および変形体から単離したミトコンドリアからも検出されており、接合子特異的な発現を示していない。また、PpEndoG-like は、大腸菌発現系を用いたリコンビナントタンパク質を用いた解

析により、pH5.5 - 8.0 では Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 存在下で、さらに pH6.0 - 7.0 では Ca^{2+} 存在下でも DNase 活性を持つことが示された（中村 修士論文 2021）。よって、母性遺伝における DNase 活性の金属要求性や活性 pH 範囲を調べることは、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 同定の重要な手掛かりとなる。

真正粘菌は、mtDNA の複製などの機能を保持したまま、ミトコンドリアを高純度かつ大量に単離することができる（Sasaki *et al.* 1994）。森山らは、接合子から単離したミトコンドリアを用いたザイモグラフィ法により、母性遺伝に関与する DNase の金属要求性や pH 依存性を調べた（Moriyama *et al.* 2005）。単離したミトコンドリアをサーモン由来の精子 mtDNA が入ったアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE し、様々な 2 価の金属イオンが入った pH3.5 - 9.5 のバッファー中に泳動後のゲルをひたし、反応させ、エチジウムブロマイドで染色されないバンドを検出することで DNase 活性を調べたところ、アメーバ細胞および初期の接合子から単離したミトコンドリアには Ca^{2+} 要求性の DNase が、後期の接合子や変形体から単離したミトコンドリアには Mn^{2+} 要求性の DNase がそれぞれ活性を持つことが示唆された（Moriyama *et al.* 2005）。しかし、この Mn^{2+} 要求性の DNase 活性は、*in vivo* において mt 核様体の分解が生じる交配後 3 時間目では検出されておらず、mt 核様体が完全に消失した交配後 8 時間目以降の細胞

由来のミトコンドリアにおいて強く検出された。また、Ca²⁺要求性の DNase は接合子由来のミトコンドリアだけではなく、アメーバ細胞由来の単離ミトコンドリアにおいても DNase 活性が検出されており、ザイモグラフィ法で検出された DNase 活性が母性遺伝に関与するものなのかは不明である。

本章では、より *in vivo* に近い条件でミトコンドリア内に存在する DNase の活性を調べ、母性遺伝に関与する DNase の金属要求性や活性 pH 範囲を明らかにすることを目的とした。そのために、単離ミトコンドリアを様々な pH 条件下かつ 2 価の金属イオン存在下でインキュベートし、ミトコンドリア内の mt 核様体の長さを測定し、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アッセイ前後で変化するかどうかを調べることで、DNase の活性を評価する *semi-in vitro* アッセイ法の開発し、母性遺伝に関与する DNase の性質を調べた。

2-3. 実験材料および方法

2-3-1. 変形体の培養法

本研究では、AI35 と DP246 をかけ合わせて作られた変形体を用いた。変形体は Daniel と Baldwin が用いた培養液 (Daniel and Baldwin) を使用し、21°C インキュベーター内で振とう培養した。

2-3-2. ミトコンドリアの単離

アメーバ細胞または接合子からミトコンドリアを単離するために、エアブラシ(Airbrush Hand-piece HP-62B、OLYMPUS、Ishikawa、Japan)とエアコンプレッサー(APC-001; AiRTEX、Osaka、Japan)を用いた。細胞を上記に記した方法で回収し、ミトコンドリア単離バッファー(0.5 M D(-)-マンニトール、20 mM Tris-HCl (pH 7.7))で懸濁した。細胞懸濁液 1 ml をエアブラシに入れ、0.15 MPa で細胞を破碎した。破碎液は NE1-S'バッファー(0.5 M D (-)-マンニトール、20 mM Tris-HCl (pH 7.7)、1 mM EDTA (pH 7.5)、0.4 mM PMSF、7 mM 2-メルカプトエタノール、0.4 mM スペルミジン)1 ml を入れた 15 ml コニカルチューブに回収した。細胞破碎液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに分注し、600 ×g で、30 秒間 4°C で遠心した。上清を別のエッペンドルフチューブに移し、9,100 ×g で、1 分間 4°C で遠心し、上清を捨てた。粗ミトコンドリア画分を NE1-S'バッファー

で懸濁し、NE-1S'バッファーで希釈した 40%パーコール 300 μ l、20%パーコール 900 μ l、粗ミトコンドリア画分懸濁液 900 μ l を順に 2 ml チューブに注ぎ、20,400 \times g で、45 分間 4°Cで遠心した。得られたミトコンドリア画分に 1 ml NE1-S'バッファーを加え、9,100 \times g で、1 分間 4°Cで遠心し、上清を捨て、10 μ l の NE1-S'バッファーを滴下し、単離ミトコンドリア懸濁液とした (図 13)。変形体からミトコンドリアを単離する際は Sasaki らが行った方法を用いた (Sasaki *et al.* 1998)。

2-3-3. 単離ミトコンドリアにおける mtDNA 染色

単離ミトコンドリア懸濁液にグルタルアルデヒドおよび DAPI を終濃度が 0.8 %および 1 μ g/mL となるよう滴下した。観察前に low-melting agarose type IV-A (Sigma-Aldrich)を終濃度が 2 %となるよう加え、スライドガラスに滴下し、カバーガラスをのせた。

2-3-4. Semi-*in vitro* アッセイ

Semi-*in vitro* アッセイでは単離ミトコンドリアを 1 mM MES buffer (pH 6.5) もしくは 1 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0-9.0)で懸濁し、MgCl₂、CaCl₂、MnCl₂、CoCl₂、ZnSO₄、もしくはこれらすべてを終濃度が 0.1、1.0、もしくは 10 mM となるよ

う添加したのち、24°Cインキュベーター内で 1 時間静置した。その後、上記に記した方法で mtDNA を染色し、ImageJ を用いて核様体の長さを測定した。

2-4. 結果

2.4.1 単離ミトコンドリアにおける mt 核様体の構造の評価

真正粘菌における母性遺伝に関与する DNase の性質を明らかにするために、まず、単離したミトコンドリアが mt 核様体の長さが *in vivo* の状態を保持しているのかを調べた。AI35 と DP246 を交配し、交配後 0、1、2、3、5 時間目の細胞から単離したミトコンドリア中の mt 核様体の長さを測定した (図 14)。交配後 0-2 時間目の細胞から単離したミトコンドリアには長さが 0.5 μm より短い mt 核様体はほとんど見られなかったが、*in vivo* と同様に、交配後 3 時間目の細胞から単離したミトコンドリアから 0.5 μm より短い mt 核様体をもつミトコンドリアの割合が増加し始めた (図 14)。したがって、単離したミトコンドリアでも mt 核様体の長さが保たれていることが確かめられた。

2.4.2 pH による単離ミトコンドリア内での DNase 活性への影響

本研究では、単離したミトコンドリアを様々な条件下でインキュベーションし、アッセイ前後での 0.5 μm より短い mt 核様体をもつミトコンドリアの割合の変化を調べることで、DNase 活性を評価した (図 15 a)。そして、この手法を *semi-in vitro* アッセイ法と名付けた。接合子では、交配後 3 時間目から mt 核様体の選択的分解が観察され始めることから、少なくとも交配後 3 時間目の接合

子のミトコンドリア内で母性遺伝に関与する DNase が機能していると考えられる。そこで、交配後 3 時間目の細胞から単離したミトコンドリアを用いて *semi-in vitro* アッセイを行った。まず、単離したミトコンドリアにおける mt 核様体の分解に及ぼす pH の影響を調べた。DNase の活性には二価の金属イオンが必要であり、必要となる金属イオンの種類は DNase ごとに異なっていることが知られている。そこで、5 種類の 2 価の金属イオン (1mM Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+}) の混合存在下で、様々な pH 条件の *semi-in vitro* アッセイを行った。アッセイを行う前は $0.5\ \mu\text{m}$ より短い mt 核様体をもつミトコンドリアの割合は 8% だったが (図 17 b)、1 時間のインキュベーションにより、それらの割合は pH7.5 - 9.0 の条件下で増加し、pH7.7 の時、27% と最も高くなった (図 15 b)。また、金属イオン非存在下ではこのような割合の増加は生じなかった。よって、ミトコンドリア中の DNase は活性 pH 範囲が 7.5 - 9.0 であり、pH7.7 で最大の活性となることが分かった。

2.4.3 接合子の単離ミトコンドリア内での DNase 活性の金属要求性

DNase 活性に必要な二価の金属イオンを特定するために、pH7.7 のバッファーに上記で用いた 5 種類の二価の金属イオンをそれぞれ別々に添加し、*semi-in vitro* アッセイを行った。交配後 3 時間目の細胞から単離したミトコンドリアを

1 mM Mg^{2+} 存在下でインキュベーションすると図 16 のように mt 核様体の分解が観察された。この条件下では 0.5 μm より短い mt 核様体をもつミトコンドリアの割合はアッセイ前と比較して 8 %から 28%へと増加しており、10mM の Mg^{2+} 存在下でも同様に増加した (図 17)。一方で、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} を用いた場合には、どの濃度においても 0.5 μm より短い mt 核様体をもつミトコンドリアの割合は増加しなかった (図 17)。よって、交配後 3 時間目の細胞から単離したミトコンドリアにおける DNase 活性には Mg^{2+} が必要であることが示唆している。

2.4.4 Mg^{2+} 要求性 DNase 活性の時期特異性の評価

これまでに検出した DNase 活性が接合子特異的なものなのかを調べるために、配偶子であるアメーバ細胞および接合子が成熟した変形体から単離したミトコンドリアを用いて *semi-in vitro* アッセイを行った。AI35、DP246 および変形体から単離したミトコンドリアを用い、1 mM の Mg^{2+} 存在下の pH7.7 のバッファー中で *semi-in vitro* アッセイを行ったところ、いずれも 0.5 μm より短い mt 核様体をもつミトコンドリアの割合は増加しなかった (図 18)。したがって、*semi-in vitro* アッセイで検出した DNase 活性は接合子特異的なものであると考えられる。さらに、接合子成熟過程においてどの時期から DNase 活性を持つのかを調べる

ために、*in vivo* では mt 核様体の分解が観察されない交配後 1、2 時間目の細胞から単離したミトコンドリアを用いて *semi-in vitro* アッセイを行った。アッセイを行う前は 0.5 μm より短い mt 核様体をもつミトコンドリアの割合はどちらも 1 - 2%程度であり、アッセイ後もこれらの割合の増加は生じなかった (図 18)。

このように、*in vivo* で mt 核様体の分解が生じていない細胞由来のミトコンドリアでは *semi-in vitro* アッセイで DNase 活性が検出されなかったことから、*semi-in vitro* アッセイで検出されている DNase 活性は母性遺伝を反映していると考えられる。よって、 Mg^{2+} 要求性の DNase が母性遺伝における mt 核様体の分解に関与している可能性が示唆された。

2-5. 考察

本研究では、接合子成熟過程における父方 mt 核様体の選択的分解が観察される。始める交配後 3 時間目の接合子から単離したミトコンドリアを用いて、母性遺伝に参与する DNase の性質を調べるために *semi-in vitro* アッセイ法を開発した。真正粘菌の変形体では、これまでに パーコール密度勾配遠心を用いた高純度ミトコンドリア単離法が確立している (Sasaki *et al.* 2003)。そして、単離されたミトコンドリアは、*in vivo* の構造を保持した mt 核様体を含み、高い DNA 合成能を保持していることが報告されている。本研究においてアメーバ細胞と接合子からミトコンドリアを単離したところ、交配後 3 時間目および 5 時間目の細胞から単離したミトコンドリアの一部に 0.5 μm 未満の mt 核様体が含まれていた (図 14)。また、0.5 μm 未満の mt 核様体を持つ単離ミトコンドリアの割合は交配後 3 時間目では 8% であり、5 時間目では 36% に増加した (図 14)。これらの割合は、*in vivo* で観察された割合と同等であった。よって、アメーバ細胞および接合子から単離したミトコンドリアにおいても mt 核様体の長さや構造は保持されていることが分かった。

Semi-in vitro アッセイ法では、単離ミトコンドリア中の mt 核様体を観察し、アッセイ前後での 0.5 μm 未満の mt 核様体を持つミトコンドリアの割合の変化

を調べることでDNase 活性を評価した (図 15 a)。交配後3 時間目の細胞から単離したミトコンドリアを用いた場合、 Mg^{2+} 存在下でインキュベートした時のみ長さが 0.5 μm 未満の mt 核様体を持つミトコンドリアの割合が増加し、 Mn^{2+} や Ca^{2+} 存在下 では増加しなかった (図 16、17)。また、最大活性は、pH7.7 の 1 mM Mg^{2+} 存在下で得られた(図 15 b)。これまでに、ザイモグラフィー法により、真正粘菌ではアメーバ細胞と交配初期の接合子から単離したミトコンドリアには Ca^{2+} 依存性の DNase 活性が、交配後 8 時間目と 12 時間目の接合子から単離したミトコンドリアには Mn^{2+} 依存性の DNase 活性が検出された。しかし、本研究で開発した *semi-in vitro* アッセイ法では Ca^{2+} や Mn^{2+} 存在下では DNase 活性が検出されなかった (図 17)。ザイモグラフィー法では SDS-PAGE を用いているため、タンパク質構造の変成が伴うことや、*in vivo* とは異なり、タンパク質と複合体を形成している mt 核様体ではなく、裸の mtDNA やサケの精子由来の mtDNA の分解を調べることで DNase 活性を評価している。一方で、*semi-in vitro* アッセイ法では単離したミトコンドリア内で生じる mt 核様体の分解を観察することで DNase 活性を調べており、ザイモグラフィー法と比較して、より *in vivo* に近い DNase 活性を検出できていると考えられる。また、ザイモグラフィー法で検出された DNase 活性は *in vivo* で mt 核様体の分解が生じていない時期の細胞の単離ミトコンドリアでも検出されているが、*semi-in vitro* アッセイ法では、

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、 Mg^{2+} 存在下においても DNase 活性は検出されなかった (図 18)。このように、*semi-in vitro* アッセイ法では、接合子成熟過程における mt 核様体分解の時期にのみ DNase 活性が検出されており、母性遺伝に関与している可能性が高い。

これまでに修士課程で行った単離ミトコンドリアを用いたショットガンプロテオミクス解析において、真正粘菌のミトコンドリア内に ENDOG ホモログである PpEndoG-like が同定されている (表 2、浦川 修士論文)。ENDOG は、ショウジョウバエ (Steven and Patrick 2012) や線虫 (Qinghua *et al.* 2016) の母性遺伝に関与する DNase として報告されている。ショウジョウバエでは、父方の mtDNA は精子形成期に 2 つのプロセスで完全に除去され、ENDOG は mtDNA の初期除去に関与している (Steven and Patrick 2012)。線虫では、受精後のミトコンドリア内膜の崩壊により、父方のミトコンドリア内の CPS-6 がミトコンドリア膜間空間からマトリックスに移動し、父方の mtDNA の分解に関与している可能性が示唆されている (Qinghua *et al.* 2016)。一方、クリプトコッカスでは、NUC1 は母性遺伝におけるミトコンドリアの mtDNA の分解には関与していない (Nishimura *et al.* 2020)。我々の研究室において、PpEndoG-like の精製リコンビ

ナントタンパク質を用いた性状解析では、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 存在下では pH5.5 - 8.0 で、 Ca^{2+} 存在下では pH6.0 - 7.0 で PpEndoG-like の DNase 活性が検出されている (中村 修士論文 2021)。これらの金属要求性と活性 pH 範囲は、他の生物で同定された ENDOG、EXOG、CPS-6、NUC1 (Jana *et al.* 2010、Francesco *et al.* 2017) と同様であるが、*semi-in vitro* アッセイで検出した DNase 活性とは異なっていた (図 15、17)。また、第一章における TMRE 染色を用いた解析からも、真正粘菌では mtDNA 分解中も内膜が維持されており、線虫とは異なりミトコンドリア内膜の崩壊による PpEndoG-like の局在変化は起こっていないと考えられる。よって、真正粘菌の母性遺伝における mt 核様体の分解には PpEndoG-like が関与していないと考えられる。

母性遺伝は有性生殖を行う生物において広く保存されているが、そのメカニズムは様々であることが分かってきている (Sato and Sato 2013)。しかし、母性遺伝の進化についてはほとんど知られていない。母性遺伝の進化を理解するためには、有性生殖の祖先と考えられている同形配偶子生殖において、母性遺伝のための DNase の制御機構を調べることが重要である。しかし、同形配偶子を持つ生物において、mtDNA の選択的な分解に関与する DNase は不明である。本研究では、*semi-in vitro* アッセイ法により、真正粘菌の母性遺伝に関与する

DNase が Mg^{2+} 要求性であることを示した。これまでに、接合子由来の単離ミトコンドリアを用いて行ったプロテオミクス解析では、これまでにミトコンドリア内に存在すると報告されてきた 4 種類の DNase とミトコンドリアでの存在や機能が未知の 5 種類の DNase が存在した。これらのうち、PpEndoG-like 以外で DNase 活性に Mg^{2+} が必要と報告されているのは、FEN1、TATDN、EEP ファミリーヌクレアーゼ、Mrr 制限酵素の 4 種類である (Jana *et al.* 2010、Min *et al.* 2004、Chen *et al.* 2014、Bartlam and Yamamoto 2010、Shuang-yong *et al.* 2011)。FEN1 は mtDNA の複製や修復に関与している (Lidza Kalifa *et al.* 2009)。また、EEP ファミリーヌクレアーゼはホスホジエステル結合を切断するという共通の触媒機構を持っており、EEP ファミリーヌクレアーゼの 1 つである Ccr4 は p53 を介して細胞周期の停止を仲介するインスリン様成長因子結合タンパク質の調節因子として同定されている (Mittal *et al.* 2011)。また、Mrr 制限酵素は、IV 型制限酵素に属し、大腸菌において外来由来の DNA 除去に関与している (Janusz and Leszek 2001)。TATDN は、ENDOG と相互作用することでアポトーシスに関与しており、TATDN は核内で ENDOG と DNA 分解複合体を形成することが示唆されている (Gannavaram and Debrabant 2012)。また、近年 TATDN ファミリータンパク質の 1 つである TATDN3 はミトコンドリアに局在する DNase と予想され、*in vitro* において mtDNA の切断活性を有することが報告されている (Obaidur

2018)。そのため、これらの DNase は真正粘菌の母性遺伝に関与する DNase の候補となりうる。しかし、これらの DNase はアメーバ細胞や変形体のミトコンドリアからも同定されており、これらの DNase が母性遺伝に関与する場合、時期特異的に DNase を活性化させるメカニズムがあると考えられる。semi-*in vitro* アッセイ法により、母性遺伝に関与する DNase 活性は交配後 2 - 3 時間目の間に生じることが示唆されており（図 18）、今後、交配後 2 時間目と 3 時間目の接合子から単離したミトコンドリアをプロテオミクス解析し、比較することで、母性遺伝における父方 mtDNA の選択的分解に関与する DNase の活性化メカニズムの解明に繋がることが期待される。

2.6. 図表

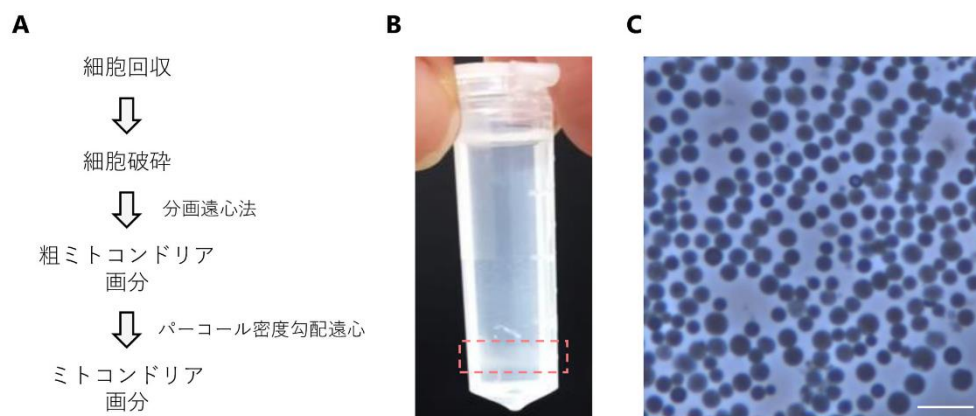


図 13. 真正粘菌におけるミトコンドリアの単離

(A) ミトコンドリアの単離法

(B) パーコール密度勾配遠心後のミトコンドリア画分

パーコール密度勾配遠心後、赤破線で囲われた部分のバンドをミトコンドリア画分として回収した。

(C) パーコール密度勾配遠心後のミトコンドリア画分の位相差顕微鏡による観察
回収したミトコンドリア画分を位相差観察したところ、浸透圧により丸くなった高純度なミトコンドリアが観察された。スケールバーは 5 μm 。

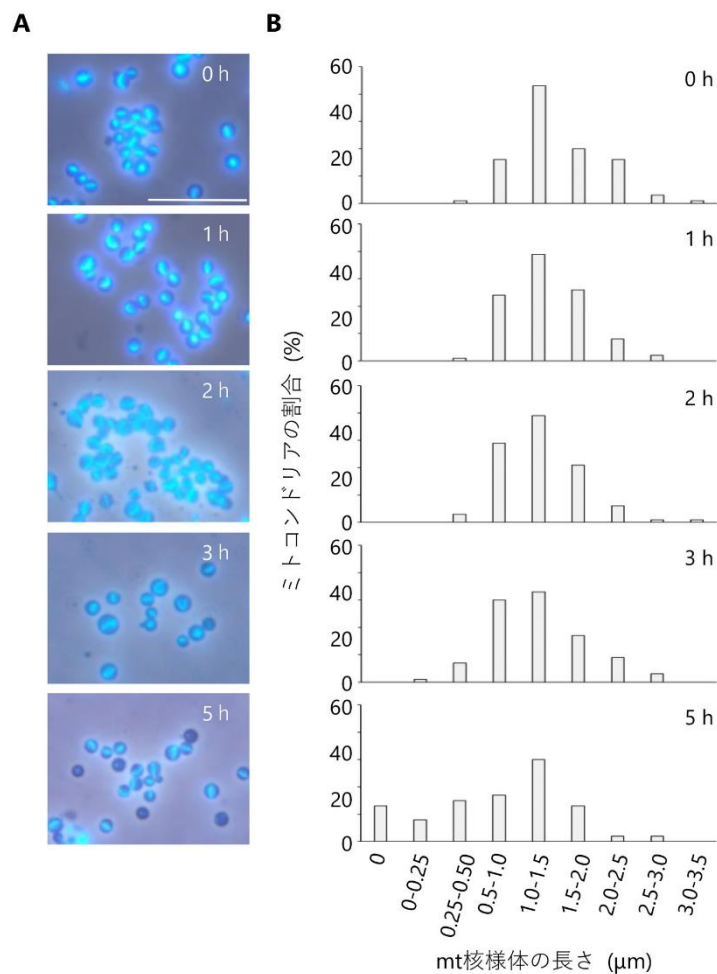


図 14. 交配後各時間の接合子から単離したミトコンドリアの mt 核様体の長さ

交配後 0、1、2、3、5 時間目の接合子から単離したミトコンドリアを、DAPI で DNA を染色し、mt 核様体の長さを測定した。

(A) 単離したミトコンドリアの位相差-DAPI 染色像

交配後 0、1、2、3、5 時間目の接合子から単離したミトコンドリアを DAPI で染色し観察した。写真は位相差像と DAPI 染色像の重ね合わせ像である。

(B) 単離ミトコンドリアにおける mt 核様体の長さの分布

ヒストグラムは交配後 0、1、2、3、5 時間目の接合子から単離したミトコンドリアにおける、それぞれの長さの範囲にある mt 核様体を持つミトコンドリアの割合を示している。n = 100。

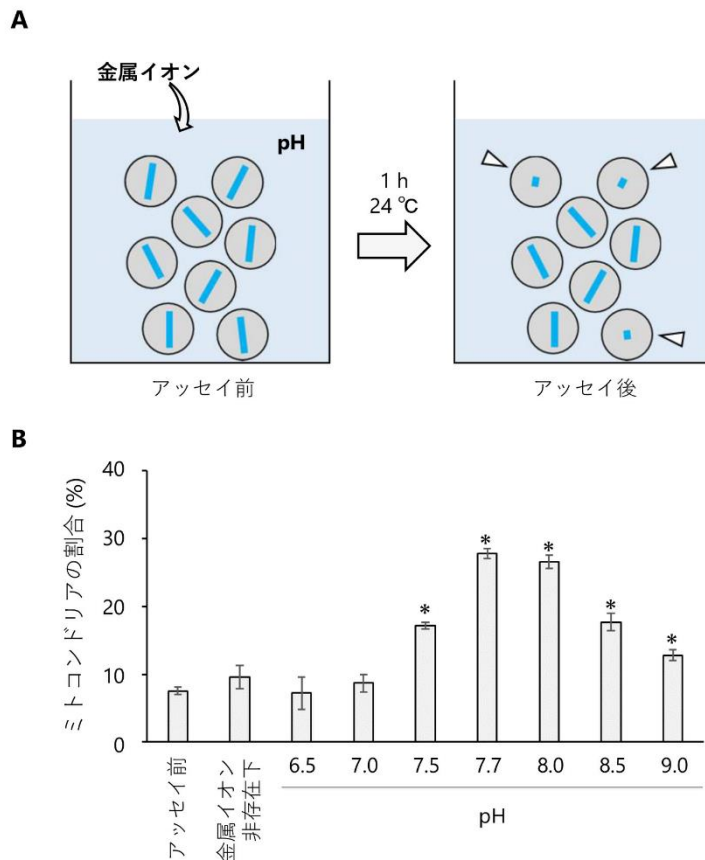


図 15. semi-*in vitro* アッセイ法を用いた pH による DNase 活性への影響

(A) Semi-*in vitro* アッセイ法の模式図

単離したミトコンドリアを様々な pH 条件下で 2 価の金属イオンと 1 時間 24°C でインキュベートした。ミトコンドリアを DAPI で DNA を染色し、mt 核様体の長さを測定することで、アッセイ前後で mt 核様体の長さの 0.5 μm 未満のミトコンドリアの数が変化するかどうかを調べることで DNase 活性を評価した。

(B) mt 核様体の分解における pH の影響

交配後 3 時間目の接合子から単離したミトコンドリアを 5 種類の金属イオン (1 mM Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Co²⁺) 存在下で様々な pH 条件下で 1 時間インキュベートし、DAPI 染色後、mt 核様体の長さを測定し、0.5 μm 未満のミトコンドリアの割合を調べた。pH7.5–9.0 で DNase 活性が検出された。n = 100–104。エラーバーは独立した 3 回の施行により求めた標準偏差である。有意差はダネット検定により求めた。*P < 0.05。

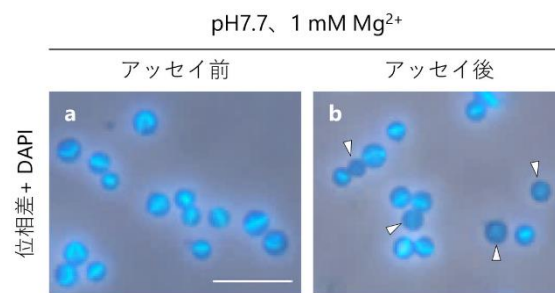


図 16. semi-*in vitro* アッセイ前後の単離ミトコンドリアの観察

交配後 3 時間目の接合子から単離したミトコンドリアを pH7.7 で、1 mM Mg²⁺ 存在下で 1 時間インキュベートし、DAPI 染色後、観察した。アッセイ前 (a) およびアッセイ後 (b) のミトコンドリアの位相差像と DAPI 染色像の重ね合わせ像。アッセイ後 (b) では、mt 核様体の分解が生じたミトコンドリア (矢じり) の数が増加した。

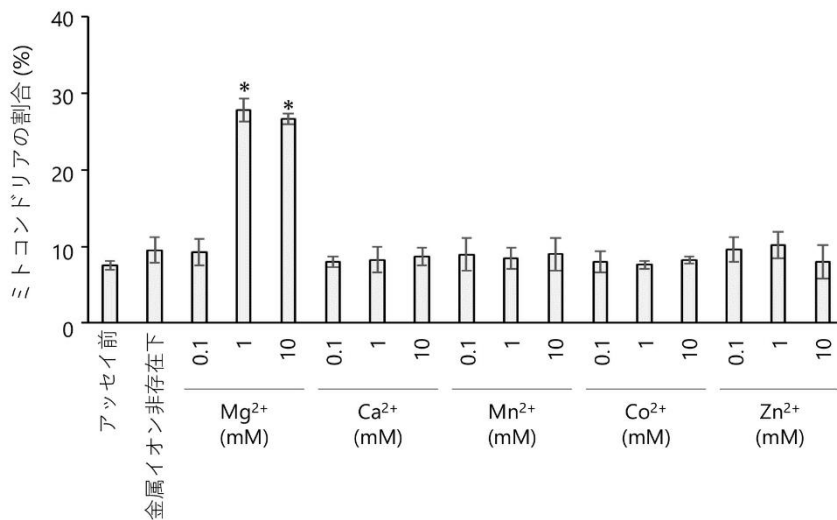


図 17. semi-*in vitro* アッセイ法を用いた DNase の金属要求性の解析

交配後 3 時間目の接合子から単離したミトコンドリアを pH7.7 で 0.1、1、10 mM の Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、もしくは Zn²⁺ 存在下で 1 時間インキュベートし、DAPI 染色後、mt 核様体の長さを測定し、0.5 μm 未満のミトコンドリアの割合を調べた。1、10 mM の Mg²⁺ 存在下でのみ DNase 活性が検出された。n = 98 – 102。エラーバーは独立した 3 回の施行により求めた標準偏差である。有意差はダネット検定により求めた。

*P < 0.05。

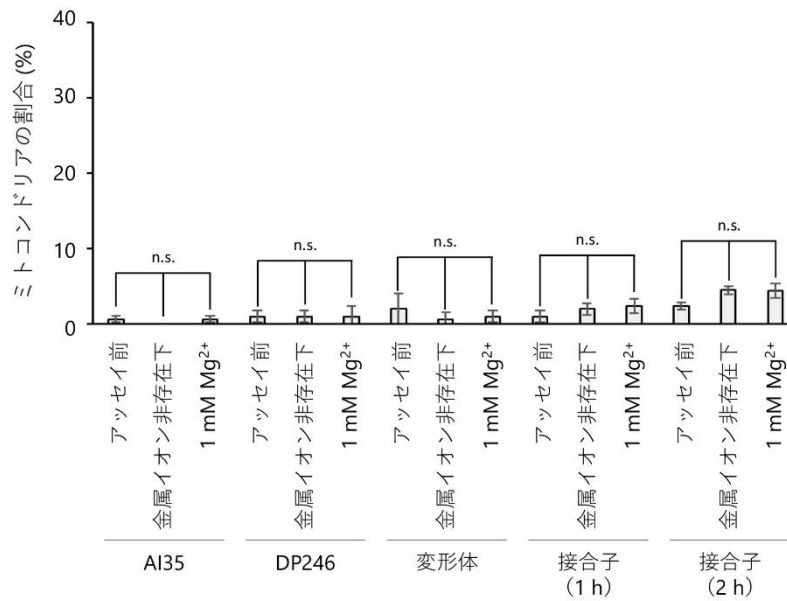


図 18. semi-*in vitro* アッセイ法を用いた DNase 活性の接合子特異性

In vivo で mtDNA の選択的分解が生じない AI35、DP246、変形体および交配後 1、2 時間目の接合子から単離したミトコンドリアを用いて pH7.7 で、1 mM Mg²⁺存在下で 1 時間インキュベートし、DAPI 染色後、mt 核様体の長さを測定し、0.5 μm 未満のミトコンドリアの割合を調べた。n = 97 – 111。エラーバーは独立した 3 回の施行により求めた標準偏差である。有意差はダネット検定により求めた。n.s.は有意差なしを示す。

DNase	AI35	DP246	接合子 (5 h)	変形体	核様体
ENDOG	5	5	5	2	0
FEN1	5	5	5	3	1
オリゴヌクレアーゼ	5	5	3	3	0
APエンドヌクレアーゼ	0	0	0	1	0
TATD	4	5	5	2	1
S1-P1ヌクレアーゼ	1	3	4	1	0
SbcCエンドヌクレアーゼ	5	5	5	3	1
スタフィロコッカルヌクレアーゼ	5	5	5	3	0
EEPファミリーヌクレアーゼ	4	3	3	1	0
Mrrヌクレアーゼ	3	4	3	3	1

(検出回数)

表 2. 真正粘菌における母性遺伝に関与する候補 DNase

AI35、DP246、交配後 5 時間目の接合子および変形体から単離したミトコンドリアを nanoLC-MS/MS 用いてショットガンプロテオミクスを行った。検出された配列を、Blast2Go を用いてタンパク質を同定した。表は同定された DNase の一覧である。他の生物でこれまでにミトコンドリア内での存在が報告されている 5 種類の DNase (青) と、ミトコンドリアでの機能が未知である 5 種類の DNase (黄色) が検出された。AI35、DP246 および交配後 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は独立して 5 回行い、変形体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は独立して 3 回行った。表内の数字はそれぞれ検出された回数を示している。

謝辞

本研究では、多くの方々にご協力いただきました。この場を借りて心より御礼申し上げます。

学部生の時分から直接ご指導していただいた佐々木成江准教授（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）には、研究面だけでなく、生活面の双方において、常に熱心かつ粘り強くご指導してくださり、本研究を博士論文としてまとめ上げることができました。心より感謝申し上げます。

研究室の長である東山哲也教授（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻・名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所・東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻）には、非常に恵まれた研究環境を整えていただきました。また、本研究を遂行するにあたり、多岐にわたるご助言をくださいました。心より感謝申し上げます。

副指導教官である五島剛太教授（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）と杉山伸講師（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）には、本研究に関して、多くのご助言をくださいました。厚く御礼申し上げます。

共同研究をしていただいた桑田啓子博士（元名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所）には、プロテオミクス解析を行うにあたって、実験方法や MS 解析を行うためのサンプル調整法を指導していただき、さらにデータの

解析方法について多くのアドバイスをいただきました。心より感謝申し上げます。

佐藤良勝特任准教授（名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所）には、実験手法や論文作成に関して多くのご指導をしていただくとともに、研究生活に関するご助言をしていただきました。厚く御礼申し上げます。

金岡雅浩講師（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）には、本研究を行うに際し、学部生の時分から多くのご指導とご助言をいただきました。心から感謝いたします。

栗原大輔特任講師（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）には、顕微鏡や実験機器の操作方法に関してご指導していただき、多くのご助言をいただきました。厚く御礼申し上げます。

水多陽子 YLC 特任助教（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）には、実験器具の取り扱いに関し有益なご助言をくださいました。厚く御礼申し上げます。

深津美紀子さん（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻生殖分子情報学グループ秘書）には、研究費の予算申請などの事務手続き全般を行っていただき、研究生活を支えていただきました。厚く御礼申し上げます。

田中順子さん（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻技術補佐員）には

本研究を行うにあたり、細胞の培養やDNAのベクター作成などを支援していただきました。厚く御礼申し上げます。

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻卒業生の佐々木妙子博士、多賀優さん、中村聡さん、および、東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻の松本恵実さんには、研究生生活を共にし、研究面だけでなく生活面からも支えていただきました。心から感謝いたします。

研究室の同期である長江拓也君（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）と中島耕大君（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）には、研究生生活を共にし、研究に関する多くの助言や私生活の相談など、あらゆる面で助けていただきました。心より感謝いたします。

卓越大学院プログラム GTR に参画した教員や事務員の方々には大学院博士課程において、融合研究や異分野の学生及び教員の方々との交流の機会を設けてくださり、より充実した研究生生活を送ることができました。心より感謝申し上げます。

そして、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所、名古屋大学名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻生殖分子グループの先輩、後輩、スタッフの皆様には、本研究に関するアドバイスから私生活の相談など、多くのご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、これまで温かく支えてくださった家族や友人に心から感謝いたします。

参考文献

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de-Brujin, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R., & Young, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290:457–465. (1981)

Ankel-Simons, F. & Cummins, J.M. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,93,13859—13863. (1996)

Bartlam, M & Yamamoto, T. The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex. *Protein Cell* 1(5): 443–452. (2010)

Birky, C. W. Jr. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(25):11331–11338. (1995)

Beech, P. L., Nheu, T., Schultz, T., Herbert, S., Lithgow, T., Gilson, P. R., & McFadden, G. I. Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science*. 18; 287(5456):1276-9. (2000)

Bujnicki, M. J. & Rychlewski, L. Identification of a PD-(D/E) XK-like domain with a novel configuration of the endonuclease active site in the methyl-directed restriction enzyme Mrr and its homologs. *Gene* 267:183-191. (2001)

Burkovics, P., Szukacsov, V., Unk, I. & Haracska, L. Human Ape2 protein has a 3'-5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs. *Nucleic Acids Res* 34, 2508–2515. (2006)

Chen, Y. C., Li, C. L., Hsiao, Y. Y., Duh, Y., & Yuan, H. S. Structure and function of TatD exonuclease in DNA repair. *Nuc acid Res* 42(16):10776-10785. (2014)

Coté, J. & Ruiz-Carillo, A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by

endonuclease G. *Science* 261, 765–769. (1993)

Cree, L. M., Samuels, D. C., de Sousa Lopes, S. C., Rajasimha, H. K., Wonnapijit, P., Mann, J. R., Dahl, H. H. & Chinnery, P. F. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat. Genet.* 40: 249–254. (2008)

David, K. K., Sasaki, M., Yu, S-W., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* volume 13, pages 1147–1155. (2006)

Dawid, I. B., & Blackler, A. W. Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Dev Biol* 29: 152–162. (1972)

Dee, J. Multiple alleles and other factors affecting plasmodium formation in the true slime mould *Physarum polycephalum*. *Schw J Protozool.* 13: 610–616. (1966)

Domenico, S., Nataliya, K., Vladimir, N. C., Konstantin, G. K., & Mikhail, F. A. Methods for Efficient Elimination of Mitochondrial DNA from Cultured Cells. *PLoS One.* 11(5):e0154684. (2016)

Elizabeth S. G., Lawrence, I. G., & Julius M. Petite Mutation in Yeast. *J Bacteriol.*; 107(1): 377–381. (1971)

El Meziane, A., Callen, J. C. & Mounolou, J. C. Mitochondrial gene expression during *Xenopus laevis* development: a molecular study. *EMBO J* 8:1649–1655. (1989)

Francesco, B., Robert, N. L., & Zofia, M. C. Human mitochondrial nucleases. *FEBS J.* 284(12): 1767–1777. (2017)

Frédéric, L., Florence, M., Paule, F., Anne, L., & Manuel, R. Organization and dynamics

of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci.* 117(Pt 13):2653-62. (2004)

Gannavaram, S. & Debrabant, A. Involvement of TatD nuclease during programmed cell death in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.*83(5):926-35. (2012)

Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6715–6719. (1980)

Gilson, P, R. & Beech, P, L. Cell division protein FtsZ: running rings around bacteria, chloroplasts and mitochondria. *Res Microbiol.* 152(1):3-10. (2001)

Gloor, J, W., Balakrishnan, L., Campbell, J, L. & Bambara, R, A. Biochemical analyses indicate that binding and cleavage specificities define the ordered processing of human Okazaki fragments by Dna2 and FEN1. *Nucleic Acids Res* 40, 6774–6786. (2012)

Hayashi, J., Yonekawa, H., Gotoh, O., Motohashi, J., & Tagashira, Y. Two different molecular types of rat mitochondrial DNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 81:871–877. (1978)

Hutchison, C. A. III, Newbold, J. E., Potter, S. S., & Edgell, M. H. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251: 536–538. (1974)

Jana, K., Lauber, C., Gimadutdinow, O., Urbanska, A., Cymerman, I., Ghosh, M., Szczesny, B. & Meiss, G. Production and characterization of recombinant protein preparations of Endonuclease G-homologs from yeast, *C. elegans* and humans. *Protein Expr Purif.* 73(1):99-106. (2010)

Jansen R, P, S. & De Boer, K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *MolCell Endocrinol.* 145 : 81 – 8. (1998)

Kalifa, L., Beutner, G., Phadnis, N., Sheu, S. & Sia, A, E. Evidence for a Role of FEN1

in Maintaining Mitochondrial DNA Integrity. *DNA Repair* 8(mst). 8: 1242–1249. (2009)

Kawano, S., Anderson, R. W., Nanba, T., & Kuroiwa, T. Polymorphism and uniparental inheritance of mitochondrial DNA in *Physarum polycephalum*. *J Gen Microbiol* 133: 3175–3182. (1987a)

Kawano, S., Kuroiwa, T., & Anderson, R. W. A third multiallelic mating-type locus in *Physarum polycephalum*. *J Gen Microbiol* 133:2539-2546. (1987b)

Kawano, S., & Kuroiwa, T. Transmission pattern of mitochondrial DNA during plasmodium formation in *Physarum polycephalum*. *J Gen Microbiol* 135: 1559–1566. (1989)

Kawano, S., Takano, H., Imai, J., Mori, K. & Kuroiwa, T. A genetic system controlling mitochondrial fusion in the slime mould, *Physarum polycephalum*. *Genetics*. 133(2): 213–224. (1993)

Kirouac-Brumet, J., Mansson, S., & Pallota, D. Multiple allelism at the *matB* locus in *Physarum polycephalum*. *Can J Genet Cytol* 23: 9–16. (1981)

Kornblum, C., Nicholls, T. J., Haack, T. B., Scholer, S., Peeva, V., Danhauser, K., Hallmann, K., Zsurka, G., Rorbach, J., Iuso, A., Wieland, T., Sciacco, M., Ronchi, D., Comi, P. G., Mootha, K. V., Klopstock, T., Strom, M. T., Meitinger, T., Minczuk, M., Kunz, S. W., & Prokisch, H. Loss-of-function mutations in *MGME1* impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nat Genet* 45, 214–219. (2013)

Kroon, A. M., de Vos W. M., & Bakker, H. The heterogeneity of rat-liver mitochondrial DNA. *BiochimBiophys Acta* 519: 269–273. (1978)

Kuroiwa, T. Studies on mitochondrial structure and function in *Physarum polycephalum*.I.

Fine structure, cytochemistry, and 3H-uridine autoradiography of a central body in mitochondria, *Exp. Cell Res.* 78, 351-359. (1973)

Kuroiwa, T. Studies on mitochondrial structure and function in *Physarum polycephalum*. III. Electron microscopy of a large amount of DNA released from a central body in mitochondria by trypsin digestion. *J. Cell Biol.* 63, 299-306. (1974)

Kuroiwa, T., Hizume, M. & Kawano, S. Studies on mitochondrial structure and function in *Physarum polycephalum* IV. Mitochondrial division cycle. *Cytologia.* 43: 119-136. (1978)

Kuroiwa, T., Kawano, S., Nishibayashi, S., and Sato, C. Epifluorescent microscopic evidence for maternal inheritance of chloroplast DNA. *Nature* 298: 481-483. (1982)

Kuroiwa, T. Review of cytological studies on cellular and molecular mechanisms of uniparental (maternal or paternal) inheritance of plastid and mitochondrial genomes induced by active digestion of organelle nuclei (nucleoids). *J. Plant. Res.* 123, 207–230. (2010)

Li, L, Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95–99. (2001)

Mary, B, M., & Herschel, K, M. Observations on the Behavior of Suppressors in *Neurospora*. *PNAS* 38 (3) 205-214. (1952)

Min, F., Dipak, P., Joe, J, D., Thomas, C., Dietrich, S., Ihtshamul, H., & Jon, R, S. Roles of divalent metal ions in flap endonuclease–substrate interactions. *Nat structural & mol bio* (11)5: 450-456. (2004)

Mittal, S., Aslam, A., Doidge, R., Medica, R. & Winkler, G, S. The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4-Not complex contribute to

the prevention of cell death and senescence. *Mol Biol Cell* 22(6):748-58. (2011)

Mirfakhrai, M., Tanaka, Y., & Yanagisawa, K. Evidence for mitochondrial DNA polymorphism and uniparental inheritance in the cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*: effect of intraspecies mating on mitochondrial DNA transmission. *Genetics* 24: 607–613. (1990)

Moriyama, Y., & Kawano, S. Rapid, selective digestion of mitochondrial DNA in accordance with the *matA* hierarchy of multiallelic mating types in the mitochondrial inheritance of *Physarum polycephalum*. *Genetics* 164:963-975. (2003)

Moriyama, Y., Yamazaki, T., Nomura, H., Sasaki, N., & Kawano, S. Early zygote-specific nuclease in mitochondria of the true slime mold *Physarum polycephalum*. *Curr Genet* 48: 334-343. (2005)

Moriyama, Y., & Kawano, S. Maternal inheritance of mitochondria: multipolarity, multiallelism and hierarchical transmission of mitochondrial DNA in the true slime mold *Physarum polycephalum*. *J Plant Res*;123(2):139-48. (2010)

Nishimura, Y., Yoshinari, T., Naruse, K., Yamada, T., Sumi, K., Mitani, H., Higashiyama, T., & Kuroiwa, T. Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *PNAS* 103: 1382-1387. (2006)

Nishimura, Y., Shikanai, T., Kawamoto, S. & Toh-e, A. Step-wise elimination of α -mitochondrial nucleoids and mitochondrial structure as a basis for the strict uniparental inheritance in *Cryptococcus neoformans*. *Sci Rep*: 2045-2322. (2020)

Obaidur Rahman. Investigating the role of TATDN3 in Mitochondria. Master's Thesis: University of Eastern Finland. (2018)

Ohsato, T., Ishihara, N., Muta, T., Umeda, S., Ikeda, S., Mihara, K., Hamasaki, N. & Kang, D. Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in

intermembrane space. *Eur J Biochem* 269, 5765–5770. (2002)

Patrick, J. K. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 12;365(1541):729-48. (2010)

Qinghua, Z. Haimin, L., Hanzeng, L., Nakagawa, A., Jason, L. J., Eui-Seung, L., Harry, L. B., Skeen-Gaar, R. R., Suehiro, Y., William, D., Mitani, S., Yuan, H. S., Byung-Ho, K., & Xue, D. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science* 353: 394-399. (2016)

Rawi, A. S., Louvet-Vallée, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R., & Galy, V. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science.* 334(6059):1144-7. (2011)

Rebecca, R., Moon-Yong, C. & David, C. C. Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *Elife.* 5: e17896. (2016)

Reilly, J. G., & Thomas, C. A. Jr. Length polymorphisms, restriction site variation, and maternal inheritance of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*. *Plasmid* 3: 109–115. (1980)

Rong, Y., Shao-Bo, J., Urban, L., Monica, N., & Jian, Z. Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery. *EMBO J.* 15; 38(8): e99748. (2019)

Sasaki, N., Suzuki, T., Ohta, T., Kawano, S. & Kuroiwa, T. Behavior of mitochondria and their nuclei during cell proliferation in *Physarum polycephalum*. *Protoplasma.* 182: 115-125. (1994)

Sasaki, N., Sakai, A., Kawano, S., Kuroiwa, H., & Kuroiwa, T. DNA synthesis in isolated

mitochondrial nucleoids from plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Protoplasma* 203, 221–231. (1998)

Sasaki, N., Kuroiwa, H., Nishitani, C., Takano, H., Higashiyama, T., Kobayashi, T., Shirai, Y., Sasaki, A., Kawano, S., Murakami, K., & Kuroiwa, T. Glom is a novel mitochondrial DNA packaging protein in *Physarum polycephalum* and causes intense chromatin condensation without suppressing DNA functions. *Mol Biol Cell* 12:4758–4769. (2003)

Sasaki, T., Sato, Y., Higashiyama, T. & Sasaki, N. Live imaging reveals the dynamics and regulation of mitochondrial nucleoids during the cell cycle in Fucci2-HeLa cells. *Sci Rep.* 7: 11257. (2017)

Sato, M., & Sato, K. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science*. 334(6059):1141-4. (2011)

Sato, M. & Sato, K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta*. 1833(8):1979-84. (2013)

Sato, M., Sato, K., Tomura, K., Kosako, H. & Sato, K. The autophagy receptor ALLO-1 and the IKKE-1 kinase control clearance of paternal mitochondria in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol*. 20(1):81-91. (2018)

Seung-Wook, R., Hyeon, J, J., Myunghwan, C., Mariusz, K., & Chulhee, C. Optic atrophy 3 as a protein of the mitochondrial outer membrane induces mitochondrial fragmentation. *Cell Mol Life Sci*. 67(16):2839-50. (2010)

Shinnick, T. M., Pallotta, D. J., Jones-Brown, Y. V. R., Youngman, P. J., & Holt, C, E. A gene imz affecting the pH sensitivity of zygote formation in *Physarum polycephalum*. *Curr Microbiol* 1: 163-166. (1978)

Shuang-yong, X., Anna, R. C., Siu-Hong, C., Yu, Z., & Patrick, L. A type IV modification-dependent restriction enzyme SauUSI from *Staphylococcus aureus*. subsp. aureus USA300. *Nucleic Acids Res.* 39(13): 5597–5610. (2011)

Specht, C. A., Novotnym, C. P., & Ullrich, R. C. Mitochondrial DNA of *Schizophyllum commune*: restrictionmap, genetic map, and mode of inheritance. *Curr Genet* 22:129-134. (1992)

Steven, Z. D., & Patrick, H. O. Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development. *Dev Cell* 22(3): 660-668. (2012)

Strepp, R., Scholz, S., Kruse, S., Speth, V., & Reski, R. Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14; 95(8):4368-73. (1998)

Stuart, J. A., Hashiguchi, K., Wilson, D. M., 3rd., Copeland, W. C., Souza-Pinto, N. C. & Bohr, V. A. DNA base excision repair activities and pathway function in mitochondrial and cellular lysates from cells lacking mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 32, 2181–2192. (2004)

Sutovsky, P., Moreno, D. R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* volume 402, pages371–372. (1999)

Sutovsky, P., Moreno, D. R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod.* 63(2):582-90. (2000)

Szczesny, B. & Mitra, S. Effect of aging on intracellular distribution of abasic (AP) endonuclease 1 in the mouse liver. *Mech Ageing Dev* 126, 1071–1078. (2005)

Szczesny, R. J., Hejnowicz, M. S., Steczkiewicz, K., Muszewska, A., Borowski, L. S.,

Ginalski, K. & Dziembowski, A. Identification of a novel human mitochondrial endo/exonuclease Ddk1/c20orf72 necessary for maintenance of proper 7S DNA levels. *Nucleic Acids Res* 41, 3144–3161. (2013)

Takano, H., Abe, T., Sakurai, R., Moriyama, Y., Miyazawa, Y., Nozaki, H., Kawano, S., Sasaki, N. & Kuroiwa, T. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Physarum polycephalum*. *Mol Gen Genet* 264:539–545. (2001)

Tann, A. W., Boldogh, I., Meiss, G., Qian, W., Van-Houten, B., Mitra, S. & Szczesny, B. Apoptosis induced by persistent single-strand breaks in mitochondrial genome: critical role of EXOG (5'-EXO/endonuclease) in their repair. *J Biol Chem* 286, 31975–31983. (2011)

Tigchelaar, W., Yu, H., de-Jong, A. M., van-Gilst, W. H., van-der-Harst, P., Westenbrink, B. D., de-Boer, R. A. & Sillje, H. H. Loss of mitochondrial exo/endonuclease EXOG affects mitochondrial respiration and induces ROS-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 308, C155–C163. (2015)

Tsuchimoto, D., Sakai, Y., Sakumi, K., Nishioka, K., Sasaki, M., Fujiwara, T. & Nakabeppu, Y. Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res* 29, 2349–2360. (2001)

Uno, K., Sugimoto, N. & Sato, Y. N-aryl pyrido cyanine derivatives are nuclear and organelle DNA markers for two-photon and super-resolution imaging. *Nat Commun*. 11;12(1):2650. (2021)

Wei, Y. Nucleases: Diversity of Structure, Function and Mechanism. *Q Rev Biophys*. 44(1): 1–93. (2011)

Wilch, G., Ward, S., & Castle, A. Transmission of mitochondrial DNA in *Ustilago*

violacea. *Curr Genet* 22:135-140. (1992)

Youngman, P. J., Pallotta, D. J., Hosler, B., Struhl, G., & Holt, C. E. A new mating compatibility locus in *Physarum polycephalum*. *Genetics* 91: 683-693. (1979)

Zheng, L., Zhou, M., Guo, Z., Lu, H., Qian, L., Dai, H., Qiu, J., Yakubovskaya, E., Bogenhagen, D, F., Demple, B., & Shen, B. Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates. *Mol Cell* 32, 325–336. (2008)

浦川直希 母性遺伝における父方ミトコンドリアDNAの選択的分解に関与するヌクレアーゼの探索 名古屋大学修士論文 (2019)

中村聡 真正粘菌のミトコンドリア母性委遺伝におけるエンドヌクレアーゼ G 様タンパク質の関与について 名古屋大学修士論文 (2021)

山田佳歩 真正粘菌を用いた mt 核様体分裂機構の解析 名古屋大学修士論文 (2015)