

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

氏 名 佐々木 妙子

論 文 題 目 ヒト培養細胞を用いた細胞周期における
ミトコンドリア核様体維持機構の解析

論文審査担当者

主 査 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 教授
博士(理学) 東山 哲也
委 員 名古屋大学 理学研究科 教授 博士(理学) 杉田 護
委 員 名古屋大学 理学研究科 教授 博士(理学) 五島 剛太
委 員 名古屋大学 理学研究科 准教授 博士(理学) 佐々木 成江

論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアは半自律的に増殖する細胞小器官であり、独自の DNA であるミトコンドリア DNA (mtDNA) を持つ。生体内において mtDNA は、タンパク質とともに折りたたまれた、ミトコンドリア核様体 (mt 核様体) と呼ばれる構造をとっており、この構造が mtDNA の複製や伝達に重要な役割を果たしている。ヒトでは、1 細胞あたり数百個もの mt 核様体が存在するが、極微小 (約 0.1 μm) のため観察が困難である。また、細胞周期を同調させる操作が mtDNA の複製に影響を与えるため、細胞周期において膨大な数の mt 核様体の mtDNA がいつ複製され、どのようにその数が維持されているのかわかっていない。

これまでに、先行研究により高感度な DNA 染色試薬である SYBR Green I を用いることで、ヒト細胞内の微小な mt 核様体を生体染色できることが分かっている。そこで申請者は、細胞周期インジケータである Fucci2 を導入した HeLa 細胞 (Fucci2 細胞) を SYBR Green I 染色することで、細胞周期を同調させることなく細胞周期における mt 核様体の維持機構の解析を試みた。従来の SYBR Green I による染色では核 DNA も染まってしまうが、申請者は低濃度の SYBR Green I により、mt 核様体のみを選択的に染色できることを見出し、この手法を用いて、細胞周期の時期を判別しながら mt 核様体の観察を行うことに成功した。細胞周期における mt 核様体の詳細な動態を観察した結果、細胞周期非依存的に mt 核様体が 1 つのミトコンドリア内で頻繁に接着と解離を行っており、常に接着と解離が同頻度で起こっていることが分かった。さらに、mtDNA 結合タンパク質である TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A) を発現抑制した結果、解離の頻度のみが有意に減少し、mt 核様体の巨大化および数の減少が生じた。これらの結果より、mt 核様体のサイズと数は接着・解離の頻度が適切に制御されることによって維持されており、TFAM は核様体の解離過程の制御に関わっていることが示唆された。

次に申請者は、細胞周期において mt 核様体数がどのように制御されているか調べた。各時期における細胞あたりの mt 核様体の総数は、G₁ 期にはほとんど変化せず、S 期から増加し始め、S/G₂ 期までに約 2 倍に増加した。また、個々の細胞をタイムラプス観察することで、S 期中期から後期に mt 核様体数が最も増加することを明らかにした。さらに、チミジンアナログである EdU を用い、mtDNA の合成時期の解析を試みた。申請者は、わずか 10 分間の mtDNA 合成でも安定して検出できる手法を開発し、Fucci2 細胞の DNA 複製を可視化した。その結果、mtDNA の複製は細胞周期を通じて見られたが、S 期に活性が最も上昇することが明らかとなった。よって、mt 核様体数の増加と mtDNA 複製は同時期に起こっており、互いに関係していることが予想された。そこで、mtDNA 複製を停止させた時の mt 核様体の増加数を計測したところ、mt 核様体数の増加はほとんど生じなかったことから、mt 核様体数の増加には mtDNA 複製が必要であることが示唆された。さらに、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害剤であるロスコビチン処理により、mtDNA 複製および mt 核様体数の増加がともに停止した。この結果は、mtDNA 複製と mt 核様体数の増加が CDK を介して細胞周期と同調している可能性を示唆している。

申請者の研究は、ミトコンドリア核様体の細胞周期における基本的な維持機構を明らかにしたものであり、今後、これらの維持機構の分子メカニズムを明らかにすることで、細胞周期において適切に mtDNA を維持・伝達する機構の解明につながることを期待される。

以上の理由により、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。