

主論文

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

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

機能調節学講座 生殖分子情報学グループ

佐々木 妙子

要約

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いる。1 つの mt 核様体には複数分子の mtDNA が含まれており、mt 核様体は mtDNA の複製や伝達に重要な役割を果たしていると考えられている。ヒトの核様体は極微小で (約 0.1 μm) あり、1 細胞あたり数百個ものミトコンドリア核様体が存在している。しかし、観察が困難であり、細胞周期を同調させる操作が mtDNA の複製に影響を与えてしまうため、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、当研究室では高感度な 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 核様体を生きたまま観察することに成功してきた。本研究では、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、細胞周期における mt 核様体の維持機構の解析を行った。Fucci2 細胞は、細胞周期の時期に応じて核の色が変化するため、細胞周期を同調させることなく細胞周期の時期を判別することができる。しかし、従来の SYBR Green I による染色では、核 DNA も染まってしまうために、Fucci2 細胞の核の色の変化を観察するには不向きであった。SYBR Green I の染色条件の検討を行った結果、低濃度の SYBR Green I を用いることで、mt 核様体のみを選択的に染色できることが分かった。そして、この手法を用いることで、細胞周期の時期を判別しながら mt 核様体を観察できることを確認した。

この手法を用いて細胞周期における mt 核様体の詳細な動態を解析したところ、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分離を繰り返している様子が観察された。細胞周期の各時期における mt 核様体のライブイメージングを行い、接着と分離の頻度を計測したところ、細胞周期全体に渡って接着と分離はどちらも mt 核様体あたり 1 分間に約 1 回起きており、常に接着と分離が同頻度で起こっていることが分かった。この接着と分離によって mt 核様体の構成成分が交換されているのか調べるために、UV 照

射により緑から赤へ蛍光変換するタンパク質 mEOS2 で mt 核様体を標識した。細胞の一部の mt 核様体を蛍光変換することで、赤色と緑色の mt 核様体が接着し、分離する様子をタイムラプス観察したところ、それらの mt 核様体は接着・分離後も色の変化が起こらなかった。よって、接着・分離の際に mt 核様体の構成成分は交換されないことが示唆された。さらに、mtDNA 結合タンパク質である TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A) を発現抑制すると、mt 核様体が巨大化し、数が減少することが知られている。TFAM を発現抑制した細胞における mt 核様体の接着・分離の頻度を計測した結果、分離の頻度のみが有意に減少していた。このことから、mt 核様体のサイズと数は接着・分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 は核様体の分離過程の制御に関わっていることが示唆された。

次に、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るために、各時期における細胞あたりの mt 核様体の総数を測定した。その結果、mt 核様体数は G₁ 期にはほとんど変化せず (534±87 個)、S 期から増加し始め (714±142 個)、S/G₂ 期までに約 2 倍に増加した (982±163 個)。また、個々の細胞をタイムラプス観察し、mt 核様体の増加数を詳細に調べたところ、S 期中期から後期に最も増加することがわかった。以上の結果より、mt 核様体の数が細胞周期によって制御されていることが初めて示唆された。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行った。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分かった。

以上の結果から、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。mtDNA 複製阻害剤である、ジデオキシシチジン (ddC) を添加したところ、核 DNA 合成や細胞周期は正常であったが、mtDNA 複製および mt 核様体の増加はほとんど起こらなかった。一方、核 DNA ポリメラーゼ阻害剤であるアフィジコリンを用いた際には、mt 核様体の増加および mtDNA 複製は正常に起こった。これらの結果から、mt 核様体数の増加には核 DNA の複製は必要ではなく、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ピチン処理により、mt 核様体数の増加および mtDNA 複製がともに停止した。このことは、mt 核様体数の増加と mtDNA 複製が 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。

以上の研究結果から、mt 核様体の数や大きさの維持には、mt 核様体の動態制御が重要であることが示唆された。また、mt 核様体数は mtDNA 複製と連動しながら細胞周期中で制御されていることが示され、この制御に CDK が関わっていることも明らかとなった。今後さらに詳しい分子メカニズムを明らかにすることで、細胞周期における mtDNA の維持機構の解明につながることを期待される。