

令和 2 年 4 月 29 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860287

氏名

加佐 和寿

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：ウメオ大学（スウェーデン 国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
ヒトミトコンドリアゲノム品質維持と細胞周期との共役を制御する分子機構の解明
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umeå University
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究の目的は、mtDNA 複製と細胞周期との共役制御の重要性と分子機構の解明である。

真核生物のエネルギー産生を担う細胞内小器官ミトコンドリアは独自のゲノム (mtDNA) を有し、そのコピー数は 1 細胞当たり数百～数千に維持されるよう制御される。mtDNA 複製は、コピー数や遺伝情報の安定維持、ひいては正常なヒトの生命活動において重要である。最近の研究により、細胞周期の進行に応じた mtDNA 複製活性の変動が示唆されたが、その共役制御の重要性と分子機構は不明である。また、mtDNA 複製におけるリーディング鎖-ラギング鎖共役型、及び非共役型の複製モードのスイッチングなど mtDNA 複製制御機構の全容が明らかになりつつある。一方で、mtDNA 複製の開始タイミング制御やラギング鎖共役型複製の分子機構は未解明である。

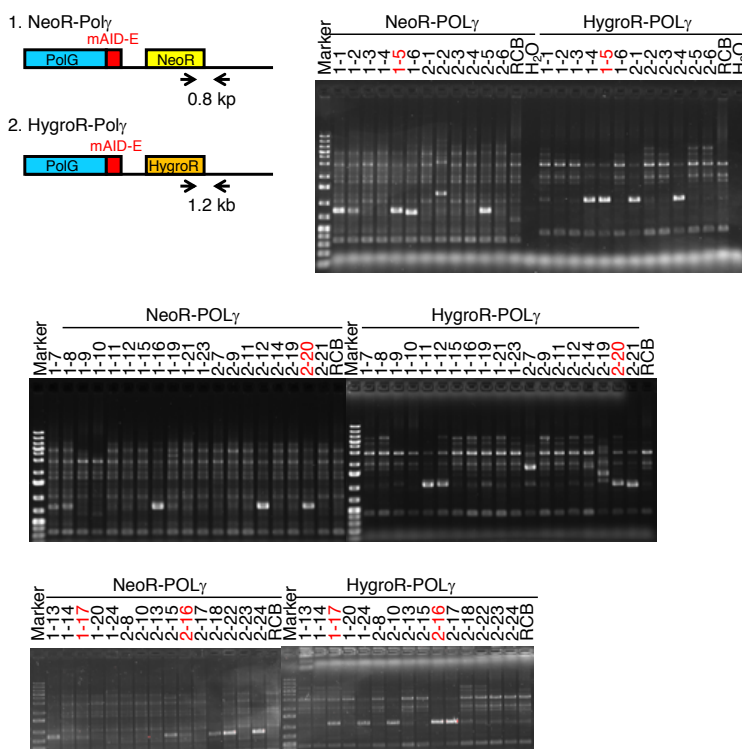
計画 A. ミトコンドリア内蛋白質ノックダウン系の構築

計画 A では、申請者の蛋白質分解法の知識と派遣先機関で確立されているゲノム編集技術を融合し、ミトコンドリア内蛋白質の迅速な分解系の構築を試みた。申請者は第一に、オーキシン誘導デグロン (AID; auxin-inducible degron) 法に着目した。AID 法では、植物ホルモンオーキシン添加により蛋白質分解系が活性化され、核、細胞質に存在する AID タグ付加蛋白質を数時間で分解できる (Nishimura *et al.*, 2009 *Nat Methods*)。一方、AID 法ではミトコンドリア内蛋白質を分解できない。そこで申請者は第二のデグロンとして、大腸菌由来プロテアーゼとその機能を促進するアダプター蛋白質による特異的タグ (E-tag) 付加蛋白質の分解系 (E-degron; E. coli degron) に着目した。申請者は、ミトコンドリア移行シグナル (MTS) 付加大腸菌プロテアーゼ / アダプター発現誘導により AID 法によるミトコンドリア内タグ化蛋白質を分解を促進できる

と考えた。計画 A では、AID 法と E-degion を組み合わせること
でミトコンドリア内蛋白質の迅速な分解系の確率を目指した。

まず、ヒト培養細胞の培養方法などの基礎的技術を習得し
(派遣開始前において申請者はヒト細胞を用いた研究の経験が
なかったため本技術は必須)、派遣先グループにおいて独立して
研究を遂行する基盤を確立した。また、AID 法に必要なプロ
テオソームアダプター蛋白質 OsTIR1 発現細胞株 RCB4662 (理
化学研究所より分与) の培養条件を派遣機関において確立し
た。次に、CRISPR/Cas9 系を用いて mtDNA 複製の必須構成因子
である mtDNA ポリメラーゼ Polyへの mAID-E タグ導入に成功した (図 1)。当初予想通り、大
腸菌プロテアーゼ/アダプターを発現しない条件において Poly-
mAID-E タグのみでは植物ホルモンであるオーキシン添加による迅速な Poly分解は確認できな
かった (data not shown)。次に、ミトコンドリア移行シグナル MTS を付加した大腸菌プロテ
アーゼ/アダプター発現によりミトコンドリア内での Poly-mAID-E の分解が促進されるか検討し
た。種々の発現系での大腸菌プロテアーゼ、及びアダプター蛋白質の発現を試みたが、現在ま
でにミトコンドリア内での良好な機能発現は確認できていない。派遣期間終了後は MTS-プロ
テアーゼ-アダプター融合蛋白質発現系を検討し、AID/E-degion 系を組み合わせたミトコンド
リア内 Poly分解の開発、最適化を行う。

図1. CRISPR/Cas9法によるPOLYタグ化株の構築



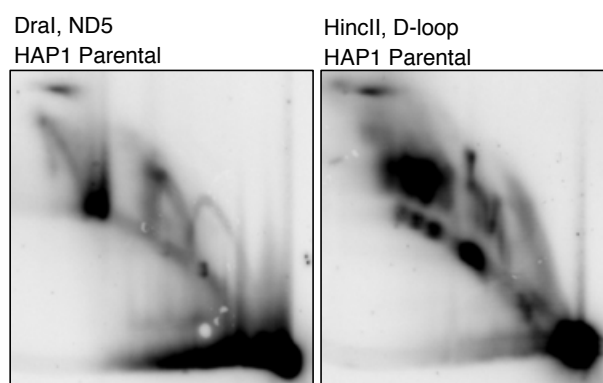
CRISPR/Cas9法によりMtDNAポリメラーゼPolg遺伝子のC末端にダブルデグロンタグ(mAID-E)、及びネオマイシン、ハイ
グロマイシン耐性遺伝子を導入した。2種類のガイドRNA (#1,
#2) による遺伝子改変の結果、計4個の単離コロニー (1-5, 1-
17, 2-16, 2-20) においてPCRによるタグの導入が確認できた。

計画 B. mtDNA 複製と細胞周期との共役制御の重要性

計画 B では、既存の方法で細胞周期を同調させた細胞での mtDNA コピー数変動と複製モー
ドの解析を行う。加えて、mtDNA 複製阻害剤により mtDNA 複製周期を停止
させた場合での培養細胞の倍加時間や細胞周期の進行異常をフローサイ
トメトリー等により解析する。これらの双方向解析により、細胞周期と
mtDNA 複製との共役制御機構の解明へのアプローチを試みた。

現在までに、フローサイトメトリー法を用いて通常の培養条件における
RCB4662 株、および HAP1 株での細胞周期解析の基盤を確立した。具体的
には、両株におけるダブルチミジンブロック法による G1/S 期停止、ノコダ
ール処理による M 期停止、及び停止後の細胞周期再進行の条件を確立した。第二に、二次元ゲ

図2. 二次元ゲル電気泳動法によるmtDNA複製中間体解析



高純度に精製したミトコンドリアから抽出したmtDNAを
制限酵素 (DraI or HincII) 処理した後、二次元ゲル電気泳
動-サザンブロット法によりmtDNA複製中間体を分離した。

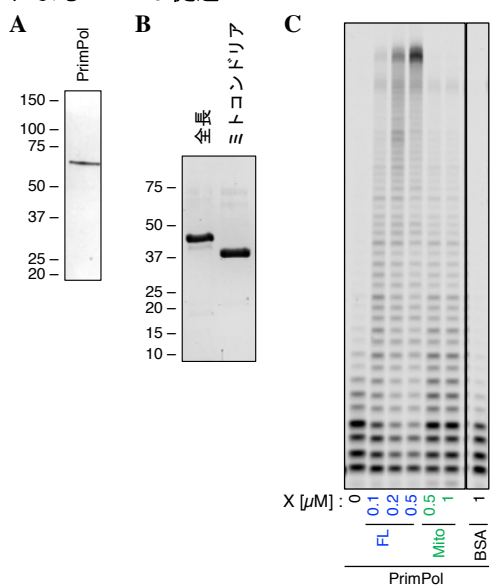
ル電気泳動法を用いた mtDNA 複製モードの解析手法を確立した (図 2)。本手法は派遣先機関を含む少数のグループでのみ確立されている手法であり、本研究計画の遂行に必須である。現在までに通常の培養条件における複製モードの解析に成功している。第三に、細胞周期の同調技術 (ダブルチミジンプロック法) を用いて細胞周期に応じた mtDNA コピー数変動の解析を試みた。ヒト培養細胞から抽出した全 DNA での定量 PCR 法を用いて mtDNA コピー数解析を行ったが、現在までに各細胞周期での mtDNA コピー数変動は確認できておらず先行研究と一致する結果は得られていない。派遣期間終了後は解析手法を変更し (二次元ゲル電気泳動法、BrdU 取り込み等による新規 mtDNA 複製解析)、引き続き細胞周期と mtDNA 複製との共役の解析の検討を継続する。

計画 C. mtDNA 複製制御の試験管内再構成と分子機構解析

計画 C では、ラギング鎖共役型 mtDNA 複製の細胞周期制御における重要性を解明する。受入研究者である Dr Wanrooij S 博士らの解析により、PrimPol プライマーゼ/ポリメラーゼが mtDNA 品質維持とラギング鎖成熟を含む mtDNA 複製モードの制御に関わることが新たに示唆された (Stojković et al, 2016 Sci Rep.; Torregrosa-Muñumer et al, 2017 PNAS)。加えて本計画では先行研究により同定された PrimPol 相互作用因子 X に着目し、試験管内解析系と細胞内解析系の両方向からミトコンドリア内での PrimPol-X 依存的 mtDNA 品質維持機構の重要性と分子機構の解明を試みた。

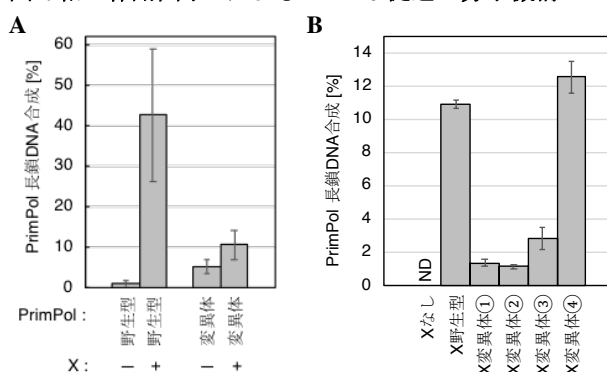
先行研究により、PrimPol 相互作用因子 X は核内での PrimPol 機能を制御することが示唆されている。申請者はまず、PrimPol 及び相互作用因子 X (全長、ミトコンドリアバリエント) をリコンビナント蛋白質として大腸菌内で発現、高純度に精製し (図 3AB)、相互作用因子 X のミトコンドリアバリエントによる PrimPol の促進を初めて再構成することに成功した (図 3C)。一致する結果として、試験管内 DNA 合成系において PrimPol と相互作用因子 X による DNA 合成は mtDNA 複製の特異的阻害剤に耐性であることを申請者は見出した。さらにヒト培養細胞を用いた解析においても一致する結果が得られており、これらの因子が細胞内で mtDNA コピー数維持に重要な役割を果たすことが初めて見出された。本研究成果はミトコンドリア内で PrimPol 相互作用因子 X の制御因子の mtDNA 品質維持における重要性を初めて解明した点において非常に重要である。

図3. 相互作用因子XミトコンドリアバリエントによるPrimPol促進



A. PrimPol野生型の精製。B. 相互作用因子X (全長、ミトコンドリアバリエント) の精製。C. 試験管内DNA複製系を用いて相互作用因子X ミトコンドリアバリエントによるPrimPolのDNA合成活性促進を初めて確認した。

図4. 相互作用因子XによるPrimPol促進の分子機構



A. PrimPolの相互作用因子Xとの相互作用部位変異体ではXによる促進は見られなかった。B. 相互作用因子Xの特異的モチーフの変異体 (①、②、③) ではPrimPolのDNA合成活性促進は見られなかった。

さらに、申請者は相互作用因子 X による PrimPol 制御について詳細な分子機構解析を行った。第一に、PrimPol、及び相互作用因子 X の変異体を多数精製し、試験管内 DNA 合成系を用いた解析により PrimPol-X 間の蛋白質間直接相互作用が PrimPol ポリメラーゼ活性制御に必須であることを見出した (図 4A)。第二に、PrimPol 相互作用因子 X の蛋白質構造モデリング、及び精製した相互作用因子 X 変異体を用いた試験管内 DNA 合成系により PrimPol 制御に必須の相互作用因子 X の機能モチーフを同定した (図 4B)。加えて試験管内再構成系において、PrimPol 相互作用因子 X は細胞内と同程度の低いヌクレオチド (Deoxynucleoside triphosphates; dNTP) 濃度下における PrimPol の DNA 合成に必須であった (data not shown)。これらの結果は PrimPol の DNA ポリメラーゼ活性制御の詳細な分子機構を初めて解明した非常に重要な成果である。

最後に計画 C では、精製 mtDNA 複製装置の再構成についても部分的に検討を行った。現在までに、mtDNA 複製に必須の Poly γ による DNA 合成、TWINKLE ヘリカーゼ、及び一本鎖 DNA 結合因子 mtSSB 等を用いた試験管内解析手法を確立済みである。申請者は PrimPol とこれら複製装置との共役制御機構の試験管内再構成を検討し、現在までに TWINKLE ヘリカーゼにより PrimPol の機能が促進されることを見出した。派遣期間終了後は、これらの手法を組み合わせ mtDNA 複製の全反応の再構成に挑戦する。

申請者は本研究成果を各学会において発表し、多数のフィードバックを得ている (口頭発表 2 件、ポスター発表 3 件)。本研究成果に関して共同研究も積極的に行い (Prof. Blanco L グループ in Centro De Biología Molecular Severo Ochoa, Spain、他多数)、近く論文投稿 (bioRxiv 含む) 予定である。また本研究により得た手法を用いた成果が J Am Chem Soc. (JACS) 誌に受理された (下記 Reference 参照)。

Reference

Quinazoline Ligands Induce Cancer Cell Death through Selective STAT3 Inhibition and G-Quadruplex Stabilization.

Jamroskovic, J., Doimo, M., Chand, K., Obi, I., Kumar, R., Brännström, K., Hedenström, M., Nath Das, R., Akhunzianov, A., Deiana, M., **Kasho, K.**, Sulis Sato, S., Pourbozorgi, PL., Mason, JE., Medini, P., Öhlund, D., Wanrooij, S., Chorell, E., and Sabouri, N.

J Am Chem Soc. 2020;142(6):2876-2888. doi: 10.1021/jacs.9b11232.