

哺乳類ミトコンドリア DNA の転写に関する研究

松澤 亮輔 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中田 和人 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

ミトコンドリアは酸化リン酸化反応によって ATP を産生する細胞小器官である。ミトコンドリアには、独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) が細胞あたり数百から数千コピー含有されており、この mtDNA を起点としたセントラルドグマ (mtDNA の複製・転写・翻訳) が存在している。哺乳類の mtDNA は、約 16.5kb の環状 2 本鎖構造を呈しており、13 種類のタンパク質構造遺伝子と、これらを翻訳するために必要な 2 種類の rRNA、22 種類の tRNA がコードされている。

環状 2 本鎖構造の mtDNA は、それぞれの鎖の比重の違いから重鎖と軽鎖に分類されている。この重鎖と軽鎖の転写のためのプロモーターとして、HSP1、HSP2、LSP が知られている。HSP1 と HSP2 は重鎖を鋳型とする転写のためのプロモーターであり、LSP は軽鎖を鋳型とする転写のためのプロモーターである。

前述のように mtDNA は細胞内に数百~数千コピー存在しているが、これらのコピーがすべて等しく転写されているのか否かは、ほとんど検証例もなく、よく解っていない。本研究では、この mtDNA の転写の均一性、あるいは異質性について検証を試みようと考えた。しかし、細胞内の mtDNA はそれらの塩基配列がほぼすべて等しいホモプラスミーの状態であることから、単純に DNA と RNA の塩基配列を比較しても転写の均一性や異質性を検証・議論することは極めて難しい。そこで、mtDNA mutator mice の mtDNA を活用できないかと考えた。mtDNA mutator mice は、mtDNA 唯一の複製酵素である DNA polymerase γ の校正機能だけを破壊することによって樹立されたマウスで、加齢に伴って mtDNA にランダムな突然変異が蓄積していくとされている。このマウス由来の mtDNA であれば、多コピー存在する mtDNA 分子を識別するマーカーとなる突然変異が多数存在することから、DNA と RNA の突然変異率を比較検討することができるのではないかと考えた。

【材料と方法】

① 細胞の樹立

mtDNA に多数の突然変異を有する mtDNA mutator mice の血小板 (無核であり、ミトコンドリアを有する) と、mtDNA の配列がほぼ均一であることが期待されるコントロールとして C57BL/6 マウスの血小板を、それぞれ mtDNA を含まないマウス培養細胞である ρ^0 B82 細胞と融合することにより、B82mtPolG^{mut/mut} および B82mtB6 細胞を得た。

② mtDNA の調整

まず、各細胞から Total DNA を抽出した。この Total DNA 溶液に対し、核 DNA のコンタミネーションを極力防ぎ、mtDNA の純度を高める目的で、直鎖 DNA だけを特異的に分解する Exonuclease V を処理し、環状 DNA である mtDNA だけが残るようにした。この溶液から再度核酸抽出を行って純度の高い mtDNA を調整した。

③ mtRNA の調整

大量培養した細胞をホモジェナイズし、3,000 rpm の緩やかな遠心分離によって核を沈殿させた。上清を取り分け、15,000 rpm の高速遠心分離によってミトコンドリアの粗画分を得た。この粗画分から Total RNA を抽出した。

④ NGS による塩基配列解析

mtDNA については、TruePrep Kit (Vazyme) を用いてライブラリ調整を行い、NovaSeq (Illumina) によって配列解析を実施した。

mtRNA については、TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero Kit (Illumina) を用いて細胞質 rRNA を除去した条件でライブラリ調整を行い、NovaSeq (Illumina) によって配列解析を実施した。

⑤ 配列の比較解析

④で得られた配列データを、以下のツールを用いて解析した

クオリティコントロール : fastp v0.20.1

マッピング : BWA v0.7.16

変異抽出 : bcftools v1.13

マッピングでは Genome Reference Consortium Mouse Build 39 (GRCm39) を参照配列として使用した。検出された突然変異のうち、変異率が 5%以上のものを解析対象として比較解析を実施した。

【結果】

詳細な解析結果は、発表会にて報告する。