

UVエンドヌクレアーゼを欠損した分裂酵母における 紫外線損傷ミトコンドリアDNAの修復

大山 恵理子・河野 真二^{1,2)}・池田 正五^{1,2)}*

岡山理科大学大学院理学研究科修士課程生物化学専攻

1) 岡山理科大学理学部生物化学科

2) 岡山理科大学生命科学部生物科学科

(2023年9月19日受付、2023年10月19日受理)

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) のミトコンドリアDNA (mtDNA) の紫外線 (UV) による損傷量を定量的PCRで測定することで、UV損傷mtDNAの修復過程を観察できる実験系を開発した。この方法で、種々のDNA修復変異体におけるUV損傷mtDNAの修復を解析した。分裂酵母のUVエンドヌクレアーゼ (Uve1p) は核とミトコンドリアにおけるUV損傷DNAの修復に関与することが知られている。本研究でも、Uve1pが照射後の修復培養2時間以内に起きるmtDNAの修復に作用していることがわかった。核DNAのUve1による修復経路で働くFlapエンドヌクレアーゼ (Rad2p) は、mtDNA修復に関与していなかった。したがって、ミトコンドリアでUve1pによる修復経路が完結するためには、Rad2pを代替する酵素が必要である。Uve1欠損株でも、修復培養時間を8時間程度に延長するとmtDNA損傷がほとんど消失した。そこで、後期の修復過程へのオートファジーの関与を調べたが、Atg1欠損により修復速度は低下しなかった。uve Δ 細胞におけるmtDNAのコピー数が修復培養4時間以降に増加し、菌体の伸長がみられた。これらの結果は、修復培養の後期に新規にmtDNAが合成されることによって見かけ上の修復が起る可能性を示唆する。

1. 緒論

生物のDNAは細胞内外から絶えず損傷を受け、細胞の致死や突然変異の原因になる。例えば、紫外線 (UV) はチミン二量体や6,4-光産物などを形成する (Friedberg *et al.*, 2006)。また、アルキル化剤は7-メチルグアニンや3-メチルアデニン (3-meA) などを生じる。DNAの酸化損傷では、8-オキシグアニンやチミングリコールのような塩基損傷、APサイト及び一本鎖切断のような損傷を生じる。チミン二量体や3-meAなどの損傷はDNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼの進行を阻害するので致命的である。一方、8-オキシグアニンのような損傷は、塩基対合性が変わるので突然変異原性がある。種々のDNA修復系はこれらの損傷を修復し、生物学的影響が現れるのを回避している。すなわち、UV損傷はヌクレオチド除去修復 (NER) や組換え修復で、小さな塩基損傷は主に塩基除去修復 (BER) で修復されている。

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は分子生物学の重要なモデル生物である。分裂酵母のDNAの修復系は、ヒトを含めた真核生物に共通な点と分裂酵母独特のものがある。一般的に、UV損傷はNERで修復されるが、分裂酵母はUVエンドヌクレアーゼ (Uve1p) が関与する

独自の経路 (Uve1経路) をもっている (McCready *et al.*, 2000)。Uve1経路では、まずUVにより生じたチミン二量体などをUve1pが認識し、損傷の3'側を切断する。生じた3' OH端にDNAポリメラーゼが作用し、損傷を含む一本鎖領域が修復DNA合成により跳ね除けられ、DNAにFlap構造が生じる。余分な一本鎖をFlapエンドヌクレアーゼ (Rad2p) が除去し、DNAリガーゼがDNA鎖を連結する。アルキル化や酸化により生じた損傷塩基は、主にBERにより修復される。

DNAは核のみならずミトコンドリアにも存在している。ミトコンドリアDNA (mtDNA) は、酸化的リン酸化に関わる電子伝達系のタンパク質のいくつかをコードしているので、mtDNAの維持は、真核細胞の機能的な電子伝達系の組み立てに必須である。したがって、mtDNAの損傷の蓄積は、ヒトでは病気や老化の原因となる。分裂酵母のミトコンドリアは動物細胞のそれと比較的よく似た性質を持っている (Schafer and Wolf, 2004)。例えば、mtDNAの大きさは、分裂酵母のものは19 kb、ヒトでは17 kbであり類似しているのに対し、出芽酵母では約75 kbである。また、出芽酵母はミトコンドリアの無い細胞を生じやすいプチポジティブな性質であるが、分裂酵母や動物細胞はプチネガティブである。そ

表1 本研究で用いた菌株

株の略号 (株名)	遺伝子型	由来
WT (FY7507)	<i>h</i>	^a YGRC
<i>uve1Δ</i> (FY18781)	<i>h ura4-D18 uve1::ura4</i>	^a YGRC
<i>rad2Δ</i>	<i>h rad2::kanMX6</i>	本研究
<i>atg1-m</i> (FY29391)	<i>h atg1-m14</i>	^a YGRC
<i>atg1-m/uve1Δ</i>	<i>h atg1-m14 uve1::kanMX6</i>	本研究

^aYGRC : Yeast Genetic Resource Center

のため、分裂酵母は、ヒトの正常なmtDNAの維持機構の解明に有効なモデルになりうると考えられる。

分裂酵母のmtDNAの修復機構はあまり解明されていない。ヒトや出芽酵母の場合、核DNAにコードされているDNA修復酵素の内、一部にはミトコンドリア移行シグナルが付加されているので、翻訳後ミトコンドリアに移行し、mtDNAの損傷の修復に働く。実際にいくつかのBER酵素はミトコンドリアに移行する (de Souza-Pinto *et al.*, 2008)。NERは多数のタンパク質により構成される経路で、それらはほとんどミトコンドリアに移行しない。したがって、NERはUV損傷mtDNAの修復には関与しない。分裂酵母では、Uve1pがミトコンドリアに移行し、UV損傷mtDNAの修復に関与していることが知られている (Yasuhira & Yasui., 2000; Tanihigashi *et al.*, 2006)。

本研究では、分裂酵母細胞に直接UVを照射し、DNAを抽出した後、mtDNAの損傷量を定量することで、mtDNAの修復機構を解析した。UV損傷により生じるチミン二量体は、DNAポリメラーゼの進行を阻害することから、損傷量を定量的PCRで測定できる (Senoo *et al.*, 2016)。まず、分裂酵母をUV照射し、続いて修復培養をすることで、損傷DNAの修復速度を観察できる実験系を開発した。それを用いて、Uve1pなど各種のDNA修復酵素やオートファジーを欠損した変異体の修復速度を比較することで、UV損傷mtDNAの修復経路を調べた。さらに、UV照射したUve1p欠損株を長時間修復培養することにより起こるmtDNAのコピー数や形態の変化を観察した。

2. 材料と方法

2-1 菌株と培地

本研究で用いた菌株を表1に示した。分裂酵母の原栄養型野生株 (WT) としてFY7570 (*h*) を用いた。窒素を含むEMM培地 (EMM+N培地) は、EMM w/o Nitrogen (MP Biomedicals) 2.714 gとNH₄Cl 0.5 gを量り、純水100 mLに溶解し、オートクレーブで滅菌した。YE培地は、酵母エキス (ナカライテスク) 0.5 gとグルコース (Sigma) 3 gを純水100 mLに溶解し、オートクレーブ

で滅菌した。寒天培地は、2%精製寒天末 (ナカライテスク) を含む。

2-2 *atg1-m/Uve1*二重破壊株の作成

分裂酵母ゲノムDNAからPCRで*uve1*のコード領域の457~2793番塩基の間の領域を増幅させた。プライマーは*uve1* (+457) Fw (5' -TCG TCA GAA TCC GAA TCG GAG-3') と*uve1* (+2793) Rv (5' -CAC CGC AGC AAC TTC AGA TAT G-3') を使用した。増幅にはPremix *Taq*TM (Ex *Taq*TMVersion 2.0) (TaKaRa) を使用し、PCRサイクルは94°C 2 min→【90°C 30 sec→52°C 30 sec→72°C 2.5 min】 (×25 cycles) →16°Cで行なった。PCR産物を精製し、pGEM-T Vector System 1 (Promega) を用いて、TAクローニングした (pGEMT-*uve1*)。次に、pFA6a-kanMX6 (Bähler *et al.*, 1998) を鋳型として、PCRでkanMX6の両端に*KpnI*と*XbaI*の認識配列を付加した断片をKOD-Plus (TOYOBO) を使用して増幅した。プライマーはkanR (+1521) *KpnI*Rv (5' -ATG GTA CCG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C-3') とkanR (+43) *XbaI*Fw (5' -GCT CTA GAC GGA TCC CCG GGT TAA TTA AG-3') を使用し、PCRサイクルは94°C 2 min→【94°C 15 sec→59°C 30 sec→68°C 2 min】 (×30 cycles) →16°Cで行なった。pGEMT-*uve1*とkanMX6を*KpnI*と*XbaI*で切断し、目的断片をアガロースゲルのバンドから単離し、両者をライゲーションして*uve1*破壊カセットを含むプラスミドpGEMT-*uve1*-kanを作成した。

pGEMT-*uve1*-kanから、プライマー-*uve1* (+457) Fwと*uve1* (+2793) Rvを用いて、PCRによって*uve1*破壊カセットを増幅した。増幅は、KOD-Plusを使用し、PCRサイクルは、94°C 2 min→【90°C 30 sec→52°C 30 sec→72°C 2.5 min】 (×25 cycles) →16°Cで行なった。Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) でPCR産物を精製した。次に、酢酸リチウム法 (今井, 1994) で*atg1-m*細胞に*uve1*破壊カセットを導入した。形質転換後、YE培地に植菌し、28°Cで16 h培養した。寒天培地表面にビロード布を押し付けて写し取り、100 μg/mL G418 (kanMX6遺伝子に対する選択薬剤) を含むYE寒天培地に植菌しレプリカを作成した。28°Cで培養

し、生えたシングルコロニーをもう一度YE+G418寒天培地に植菌し、G418耐性を確認した。コロニー菌体を直接PCRで分析して、*uveI*が破壊されていることを確認した。

2-3 Rad2破壊株の作成

WTにkanMX6マーカを含む*rad2*破壊カセットを導入し、*rad2*破壊株を作成した。まず、*rad2*破壊カセットを含むプラスミドpGEMT-rad2-kan (久米, 2011) を単離した。その後、PCRによって*rad2*破壊カセットをKOD-Plusを用いて増幅した。プライマーは*rad2* (-721) Fw (5' -ACT CTC TTG GTA AAA TGC CT-3') と*rad2* (+2046) Rv (5' -TAC CAA ATG CCA TTT GCT TG-3') を使用し、PCRサイクルは94°C 2 min → [94°C 15 sec → 46°C 30 sec → 68°C 3 min] (×25 cycles) → 16°Cで行なった。分裂酵母の形質転換とG418耐性のスクリーニングは、*uveI*破壊株作成と同様に行なった。*Rad2*が破壊されたことをコロニーダイレクトPCRで確認した。

2-4 UV損傷と修復

各菌株のシングルコロニーをEMM+N培地3 mL (φ 15 mm 試験管) に植菌し、28°Cで往復振とう機 (250 rpm) を用いて一晩培養した。翌日、培養液の濁度を分光光度計 (BIO-RAD Smart Spec™Plus) で測定した。EMM+N培地20 mL (200 mL容溝付き三角フラスコ) にOD₆₀₀が0.1になるように植菌し、28°Cで回転式振とう機 (140 rpm) を用いて、約18時間培養した。濁度を測定し対数増殖期 (OD₆₀₀ = 2~8) であることを確認した。培養液を50 mL容遠心管に移し、4°Cで3,000 rpmで5 min遠心し、上清を取り除き、1×PBS (0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 10 mLで懸濁した。もう一度遠心し、上清を取り除き、OD₆₀₀が4になるように1×PBSを加え再懸濁した。

OD₆₀₀が4の菌液1 mLを15 mL遠心管にとり、12,000 rpmで5 min遠心し、菌体を-80°Cに保存した (無損傷のサンプル)。UV損傷を行う場合、同じ菌液をφ 60 mmシャーレ1枚当たり1.5 mL注ぎ、UV (254 nm) をFUNA-UV-LINKER FS-1500 (フナコシ) を用いて、付図に示したエネルギー量ほど照射した。それぞれのシャーレから菌液1 mLをとり、集菌した菌体を-80°Cに保存した (損傷サンプル)。

修復培養を0 hを含めて4点行う場合、4枚のシャーレをUV照射 (20 J/m²) した。各シャーレから菌液を1.1 mLずつ1本の15 mL容遠心管に集めた。まず、そこから菌液1 mLを新しい15 mL遠心管に移し、集菌した菌体を-80°Cに保存した (修復0 hのサンプル)。残りの菌液を12,000 rpmで5 min遠心し、上清を取り除いた。そこに、28°Cに温めておいたEMM+N培地を3.4 mL加え再懸

濁し、3本の新しい15 mL遠心管にそれぞれ1 mLずつ入れた。再懸濁した後、28°Cで往復振とう機 (250 rpm) で修復培養した。それぞれ付図に示した培養時間の後に集菌し、菌体を-80°Cに保存した (各修復時間のサンプル)。

2-5 酵母からのDNAの抽出と定量

フェノール・クロロホルム法 (Bähler *et al.*, 1998) で酵母からDNAを抽出した。OD₆₀₀が約4の菌液1 mLから集菌した菌体 (-80°Cに保存) を、超純水 500 μLに再懸濁し、1.5 mL容マイクロチューブに移した。12,000 rpmで4°Cで5 min遠心し、上清を取り除いた。*S. pombe* mtDNA抽出 Buffer (2% Triton-X100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) 200 μLを加え再懸濁した。フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール 25:24:1 (ナカライテスク) 200 μLとジルコニアビーズ (BioSpec Products) 約0.3 gを加えて、2.5 minボルテックスミキサーで攪拌した。12,000 rpmで4°Cで5 min遠心し、上清を約180 μLほど新しい1.5 mL容マイクロチューブに移した。もう一度12,000 rpmで4°Cで5 min遠心し、上清160 μLを新しい1.5 mL容マイクロチューブに移した。99.5% エタノール 1 mLを加えて4回転倒混和し、12,000 rpmで4°Cで5 min遠心し、上清を取り除いた。蓋を開けた状態で、沈殿を室温で5 min風乾させた。沈殿をTE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) 50 μLに溶解して、4°Cで保存した。

2-6 DNA損傷量の定量

mtDNAの損傷を定量的PCRで測定した。mtDNAの長い領域 (10 kb) をDNA損傷検出のために、短い領域 (154 bp) をサンプル間の鋳型mtDNA量の補正のために、それぞれKOD-Fx Neo (TOYOBO) を用いて増幅させた。長い領域を増幅させるプライマーはSpmtDNA (4461) Fw (5' -CCC AAG GTG TTG TGC AAT TAG TGT TAA GTC G-3') とSpmtDNA (14463) Rv (5' -ACT CGA ACC AAC ACG CTC GAA AGC G-3') を使用し、PCRサイクルは94°C 2 min → [98°C 10 sec → 52°C 30 sec → 68°C 5 min] (×23 cycles) → 16°Cで行なった。短い領域を増幅させるプライマーはSpmtDNA (4338) Fw (5' -GAA GGA GGA ATT GCG AGT AAT CAC-3') とSpmtDNA (4491) Rv (5' -CGA CTT AAC ACT AAT TGC ACA ACA CCT TGG G-3') を使用し、PCRサイクルは94°C 2 min → [98°C 10 sec → 52°C 30 sec → 68°C 5 sec] (×25 cycles) → 16°Cで行なった。

同様に、核DNAの損傷を測定した。核DNAの長い領域 (10 kb) をDNA損傷の検出のために、短い領域 (152 bp) をサンプル間の核DNA量の補正のために、それぞれKOD-Fx Neoを用いて増幅させた。長い領域を増幅させるプ

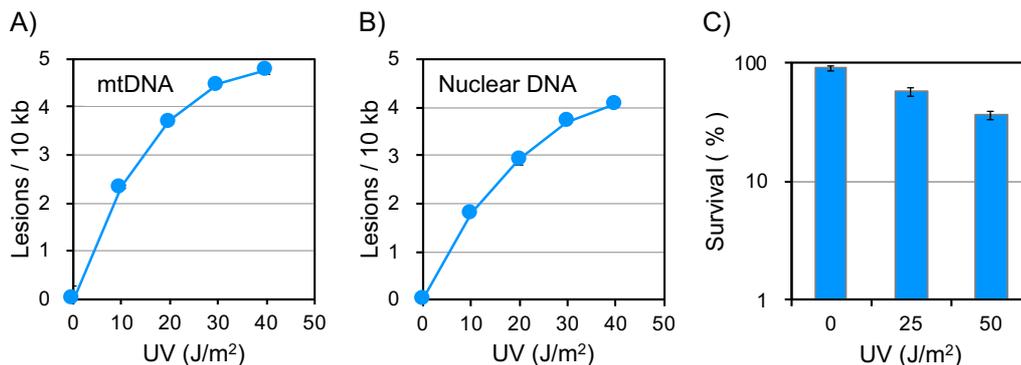


図1 UV照射した分裂酵母のミトコンドリアと核のDNA損傷の定量

- A) 分裂酵母のWTにさまざまなエネルギーのUVを照射し、mtDNAの損傷量 (lesions/10 kb) を定量的PCRにより測定した。DNAの抽出と損傷の定量は、材料と方法の記述に従って行った。
 B) A)と同様に分裂酵母にUVを照射し、生じた核DNAの損傷量を測定した。C) UV照射による分裂酵母の生存率の変化を調べた。UVを照射した菌液の全菌数を血球計算盤で測定した。さらに、適当に超純水を用いて希釈し、菌液100 μ Lをガラスビーズ (Bac' n' Roll Beads、ニッポンジーン) でYE寒天培地に植菌した。28°Cで3日間培養した後、生じたコロニー数から生菌数を計測した。生菌数を全菌数で割って、生存率を算出した。

ライマーはFw (CII:1471166) (5' -GCA GAC AAG AAG CAT CGA CGT CGT G-3') とRv (CII:1481177) (5' -GCT GTG TCT TTA CAC AAT GCC GAG TTC C-3') を使用し、PCRサイクルは94°C 2 min \rightarrow 【98°C 10 sec \rightarrow 63°C 30 sec \rightarrow 68°C 5 min】 (\times 25 cycles) \rightarrow 16°Cで行なった。短い領域を増幅させるプライマーはFw (CII : +336) (5' -GAG GAG CAC CCT TGC TTG TTG ACT G-3') とRv (CII : +487) (5' -GTG GTA CGA CCA GAG GCA TAC AAA GAC-3') を使用し、PCRサイクルは94°C 2 min \rightarrow 【98°C 10 sec \rightarrow 63°C 30 sec \rightarrow 68°C 5 sec】 (\times 28 cycles) \rightarrow 16°Cで行なった。

PCRによって増幅したミトコンドリアおよび核のDNAの量をQubitTMdsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。短い領域のPCR産物量でサンプル間の鋳型DNA量を補正した後、損傷DNAからの増幅DNA量を A_D 、非損傷DNAからの増幅DNA量を A_0 として、損傷量の相対比 (A_D/A_0) を算出した。標的DNA (10 kb) 中の損傷量は、次の計算式で求めた。

$$\text{損傷 (lesions/10 kb)} = -\ln(A_D/A_0)$$

3. 結果と考察

3-1 UV照射によるmtDNAの損傷と修復

UV照射によりできるポリミジン二量体はDNAポリメラーゼの進行を妨げるので、PCRに基づく検査法で検出することができる (Senoo *et al.*, 2016)。分裂酵母WTにUVを照射し、mtDNAの損傷量の変化を定量的PCRで調べた (図1A)。損傷量 (lesions/10 kb) はUV照射量とともに増加し、30 J/m²以降から損傷は4~5個で飽和した。核のUV損傷測定したところ、mtDNAの損傷量とほぼ同じ曲線を描いた (図1B)。したがって、UV照

射は、核DNAとmtDNAにほぼ同等の損傷を与えることがわかった。

修復反応を観察するためは、生存率があまり低下しない照射量で損傷を与える必要がある。WTの生存率は、照射したUV量が25 J/m²のとき生存率は58%となり、50 J/m²のときは36%となった (図1C)。損傷量と生存率から考えて、修復を観察するためのUV照射量を20 J/m²とし、以下の実験に適用した。

分裂酵母WTで修復時間ごとのmtDNAの損傷の減少量を測定した (図2)。修復培養時間とともにmtDNAの損傷量が減少した。修復時間1 hで、10 kbあたりの損傷が3個から1.5個にまで半減した。さらに4 hで損傷が完全に修復された。これらの結果は、本実験系が分裂酵母の細胞内で起こるUV損傷mtDNAの修復過程を観察するために適したものであることを示している。

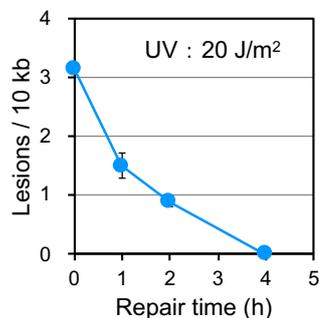


図2 分裂酵母mtDNAのUV損傷の修復過程

分裂酵母のWTにUVを20 J/m²照射した後、EMM+N培地で、グラフに示した時間、28°Cで修復培養を行った。その後、DNAを抽出し、mtDNAの損傷を定量的PCRにより測定した。

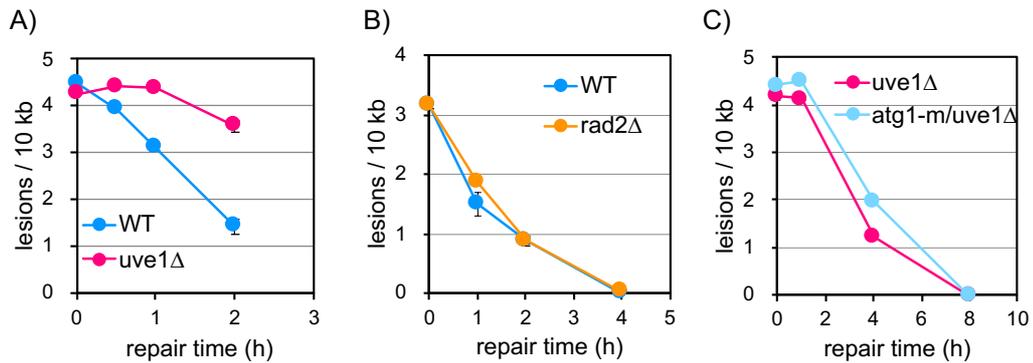


図3 分裂酵母のDNA修復およびオートファジーを欠損した菌株におけるmtDNAのUV損傷の修復過程
 A) 分裂酵母のWTとUve1p欠損株 (*uve1Δ*) にUVを20 J/m² 照射した後、EMM+N培地で、グラフに示した時間、28°Cで修復培養を行った。その後、DNAを抽出し、DNA損傷 (lesions/10 kb) を定量的PCRにより測定した。
 B) WTとrad2p欠損株 (*rad2Δ*) にUVを20 J/m² 照射した後、A)と同様に、DNA損傷を定量的PCRにより測定した。
 C) Uve1p欠損株とatg1/Uve1p二重欠損株 (*atg1-m/uve1Δ*) にUVを20 J/m² 照射した後、A)と同様に、DNA損傷を定量的PCRにより測定した。

3-2 分裂酵母のDNA修復欠損株におけるUV損傷mtDNAの修復過程

UV損傷mtDNAの修復に関与するDNA修復酵素を特定するため、種々のDNA修復欠損株におけるmtDNAの修復能を調べた。Uve1pはチミン二量体を認識してDNA鎖を切断するUVエンドヌクレアーゼ (McCready *et al.*, 2000) で、核DNAのみならずmtDNAの修復に関与していることが示されている (Yasuhira & Yasui, 2000)。定量的PCRを用いた本実験系で、Uve1pのUV損傷mtDNAの修復への関与を確認した (図3A)。WTでは、直線的にmtDNAの損傷量が低下し、2 h後、10 kb当たりの損傷が約4.5個から1.5個にまで修復された。一方、*uve1Δ*は、1 hではほとんど修復されず、2 hで10 kb当たり1個以下の損傷が修復されるに過ぎなかった。また、核DNAの修復速度も、WTに比べ*uve1Δ*の方が遅かった (データは示さない)。この結果はYasuhira & Yasui (2000) のものと一致し、Uve1pがUV損傷核DNAのみならずmtDNAの修復に重要な役割を果たしていることがわかった。

Rad2pは核におけるUV損傷DNAのUve1修復経路にFlapエンドヌクレアーゼとして働く修復酵素 (Alleva *et al.*, 2000) であり、データベースUniprotではミトコンドリアにも局在する。これまでUV損傷mtDNAの修復におけるRad2pの関与は不明である。*rad2Δ*のmtDNA修復速度を調べたところ、WTと同じであった (図3B)。すなわち、Rad2pはmtDNAの損傷修復には関わらない。分裂酵母では、核のUV損傷はUve1p経路とNERによって修復されるが、ミトコンドリアでNERは働かない。ミトコンドリアにおけるUve1pによる修復系が完結するためには、Rad2pのもつFlapエンドヌクレアーゼ活性を代替する酵素が必要である。

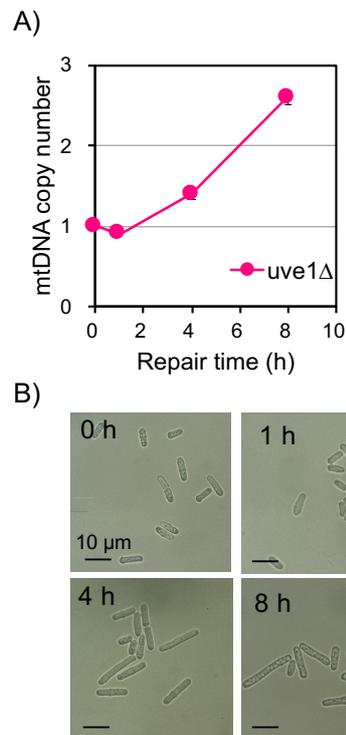


図4 分裂酵母Uve1欠損株のmtDNAの修復過程におけるコピー数と形態の変化

A) 分裂酵母のUve1p欠損株 (*uve1Δ*) にUVを20 J/m² 照射した後、EMM+N培地で、グラフに示した時間、28°Cで修復培養を行った。その後、DNAを抽出し、mtDNAコピー数を定量的PCRにより測定した。すなわち、mtDNAの短い領域 (154 bp) のPCR産物量を核DNAの短い領域 (152 bp) のPCR産物量で割ることで、核DNAに対するmtDNA量の相対値として算出した。グラフでは、修復0時間におけるmtDNAコピー数を1として、各修復時間後のコピー数を相対的に表した。

3-3 *uve1Δ*株の長時間培養によるUV損傷mtDNAの修復過程

*uve1Δ*におけるUV損傷mtDNAの修復は、培養時間2 hまでの短い時間では、わずかにしかみられなかった (図3A)。しかし、修復培養を延ばすと直線的に修復され、8 hでほぼ完全に修復された (図3C)。このことは、損傷後、早い時間に行われるUve1pによる初期修復反応と、遅い時間に行われるUve1pに依存しない後期修復反応の二種類があることが示唆される。後期修復反応のは、損傷mtDNAが分解され、新規にmtDNAが合成されることによって引き起こされる見かけ上のmtDNA修復である可能性がある。損傷mtDNAは、ヌクレアーゼにより直接分解されるかオートファジーによりミトコンドリア丸ごと処理されることにより分解されるのではないかと考えた。

オートファジー因子のひとつであるAtglpの変異株 (*atgl-m*) におけるmtDNAの修復速度を調べた。AtglpはAtglキナーゼの構成要素で、オートファゴソーム形成に関わる (Mukaiyama *et al.*, 2010)。Uve1pによる修復反応を除外するため、二重変異株 (*atgl-m/uve1Δ*) と *uve1Δ* のmtDNAの修復速度を比較した (図3C)。もしオートファジーが後期修復反応に関わっているとすると、*atgl-m/uve1Δ* は *uve1* 単独欠損株に比べてmtDNA修復速度が遅くなる。実験の結果、両株の修復速度はほぼ同じであり、UVにより損傷したmtDNAの修復反応にオートファジーは直接関わっていないことがわかった。

*uve1Δ*細胞におけるmtDNAの核DNAに対する相対的なコピー数を調べたところ、修復時間4 h以降コピー数が増加し、8 h後にUV照射直後と比べて約2.6倍になった (図4A)。このことは、UVにより損傷したmtDNAの回復にmtDNAの新規合成が強く関与していることが考えられる。UV照射後、修復期間中に菌体の伸長がみられた (図4B)。mtDNAのコピー数は細胞の体積に依存して、厳密に制御されている (Jajoo *et al.*, 2016)。

*uve1Δ*細胞のUV照射による伸長の原因やこれがmtDNAのコピー数の増加に関係しているか、今後、研究を進める必要がある。

参考文献

- Alleva, J. L., Zuo, S., Hurwitz, J., and Doetsch, P. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 2659-2666
- Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A. 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998) *Yeast* **14**, 943-951
- de Souza-Pinto, N.C., Wilson, D.M. 3rd, Stevnsner, T.V., Bohr, V.A. (2008) *DNA repair* **7**, 1098-1109
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., and Ellenberger, T. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.
- Jajoo, R., Jung, Y., Huh, D., Viana, M., Rafelski, S., Springer, M., and Paulsson, J. (2016) *Science* **351**, 169-172
- McCready, S. J., Osman, F., and Yasui, A. (2000) *Mutat Res* **451**, 197-210
- Mukaiyama, H., Nakase, M., Nakamura, T., Kakinuma, Y., and Takegawa, K. (2010) *FEBS Letters* **584**, 1327-1334.
- Schäfer, B., and Wolf, K. (2004) *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*, Richard, E. (Ed.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. pp415-430
- Senoo, T., Yamanaka, M., Nakamura, A., Terashita, T., Kawano, S., and Ikeda, S. (2016) *J Microbiol Methods*, **127**, 77-81
- Tanihigashi, H., Yamada, A., Igawa, E., and Ikeda, S. (2006) *Biochem Biophys Res Commun* **347**, 889-894
- Yasuhiro, S., and Yasui, A. (2000) *J Biol Chem* **275**, 11824-11828
- 今井義幸 (1994) 酵母による遺伝子実験法, 羊土社, 25-40
- 久米託矢 (2011) 岡山理科大学大学院理学研究科修士論文

DNA repair of UV-induced DNA damage in UV endonuclease-deficient fission yeast mitochondria

Eriko OHYAMA, Shinji KAWANO^{1,2)} and Shogo IKEDA^{1,2)*}

Graduate School of Science,

¹⁾*Department of Biochemistry, Faculty of Science,*

²⁾*Department of Bioscience, Faculty of Life Science*

Okayama University of Science,

1-1 Ridai-cho Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received September 19, 2023; accepted October 19, 2023)

On the basis of measuring the DNA damage by quantitative PCR, we developed an experimental system for observation of DNA damage and its repair process in the fission yeast mitochondria. Using this method, we studied the repair capacity of UV-damaged mitochondrial DNA (mtDNA) in various DNA repair mutants. UV endonuclease (Uve1p) is known to participate in repair of UV damage DNA in both nucleus and mitochondria of the yeast. In this study, we found that Uve1p strongly involves in restoration of damaged mtDNA within 2 hours after UV-irradiation. Flap endonuclease (Rad2p) is known to act on the repair pathway initiated by Uve1p in nucleus, whereas Rad2p-deficient mutant could repair mtDNA at the same rate as the wild type. Unknown enzyme that alternates with Rad2p is necessary to complete the Uve1p pathway in mitochondria. In Uve1p-deficient mutant (*uve1Δ*) most of the mtDNA damages disappeared by extending repair time to 8 hours. We tested the involvement of the autophagy in the late repair reaction, but an Atg1-lacking mutant could restore mtDNA damage. Copy numbers of mtDNA in the *uve1Δ* cells increased to 2.5-fold during 8 hours of repair time, and the extension of the cell length was observed. These results suggest the possibility that newly synthesis of mtDNA in mitochondria caused an apparent repair of mtDNA in late repair time.

Keywords: fission yeast; mitochondria; UV-induced DNA damage; UV endonuclease.