

総説

ミトコンドリア DNA の維持機構 — ゲノムワイドスクリーニングによってわかってきたこと —

福應 温

純真学園大学 保健医療学部 検査科学科

The machinery of mitochondrial DNA maintenance — Novel components from a genome-wide RNAi screen —

Atsushi FUKUOH

Department of Medical Laboratory Science, Faculty of Health Sciences,
JUNSHIN GAKUEN University

要旨: ミトコンドリア DNA の健全な複製, 修復そして伝達は生命にとって必要不可欠である. これら mtDNA 維持機構に働く因子の異常は様々な病態と関連しているため, 長年興味深い研究対象となっているにもかかわらず, まだその全貌は明らかになっていない. 最近, 我々はキイロショウジョウバエ S2細胞を用いて mtDNA の量的維持に着目したゲノムワイド RNAi スクリーニングを行い約100の陽性遺伝子を抽出することに成功した. 得られた陽性遺伝子群にはミトコンドリア DNA ポリメラーゼなどの既知の因子に加えて, これまで mtDNA の維持との関連が予想されていなかった因子も多く得られた. 本稿ではスクリーニングで得られた新規因子の役割についてこれまでの mtDNA 維持機構研究の成果とともに概説する.

キーワード: ミトコンドリア DNA, ゲノムワイド RNAi スクリーニング, ミトコンドリア転写終結因子, ATP 合成酵素, ミトコンドリア DNA 欠乏

Abstract: The faithful replication, repair and transmission of mitochondrial DNA (mtDNA) are essential for life. The machinery of mtDNA maintenance is only partially characterized despite the wide interest due to its involvement in disease, ranging from neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease through to susceptibility to cardiac ischemia, and perhaps even aging. To identify novel components of this machinery, we performed a genome-wide RNAi screen in *Drosophila* S2 cells, assaying for loss of fluorescence of mtDNA nucleoids stained with the DNA-intercalating agent PicoGreen. In addition to previously characterized components of the mtDNA maintenance machineries, positive genes included many proteins of the cytosolic proteasome and ribosome. These proteins involved in vesicle transport, plus the fact that some other factors involved in mitochondrial biogenesis or nuclear gene expression, >30 mainly uncharacterized proteins and most subunits of ATP synthase. In this review, current understandings of the mtDNA maintenance including novel components from the screen were discussed.

Keyword: mitochondrial DNA, genome-wide RNAi screen, mitochondrial transcription terminator, ATP synthase, mitochondrial DNA depletion

はじめに

ミトコンドリアは細胞内にある小器官で, われわれが必要とするエネルギーのほぼすべてを ATP (アデノシン三リン酸) として産生する. ミトコンドリアは約20億年前に自律的な生命体であることを捨てて真核細胞と共生したと考えられており, その名残としてその内部に核 DNA とは別のゲノ

ム情報を今なお保持している. それがミトコンドリア DNA (mtDNA) である. ほとんどの脊椎動物の mtDNA は約16,000塩基対ほどの環状 DNA で37の遺伝子がコードされており, その内訳は2個のリボソーム RNA, 22個のトランスファー RNA, そして電子伝達系を構成するサブユニットタンパクをコードする遺伝子13個である. そし

て mtDNA の維持や発現のための分子装置を構成するタンパク質因子は核 DNA のものとは異なるミトコンドリア独自のものであるが、これまで知られているものすべてのタンパク質因子が核の DNA にコードされている¹⁾。

mtDNA の健全な複製、修復そして伝達は生命にとって必要不可欠である。それらの過程の異常は様々な病態と関連している。例えば、特定疾患であるミトコンドリア脳筋症は mtDNA 上の変異によって心臓、骨格筋、脳などに異常を生じる。また、近年では mtDNA の異常と糖尿病などの生活習慣病や加齢、がんとの関連も注目されている。こうした背景により mtDNA 維持の全貌をつかむことはミトコンドリア機能低下に起因する様々な疾患の理解と治療法の開発の為に強く求められている²⁾⁻⁶⁾。

核の DNA と mtDNA との最も大きな違いは前者が細胞あたり2コピーのみ存在するのに対して後者は細胞あたり平均数百コピー以上にもなることである。このため、mtDNA の維持を考える場合には欠失・点変異などの質的な変化だけでなくコピー数という量的な変化も考慮しなくてはならない。我々は最近 mtDNA の量的維持に関わる新規遺伝子の探索を目的とした機能的遺伝子スクリーニングを行い、約100の陽性遺伝子を得た。本稿ではそれら陽性遺伝子産物の解析からわかってきた mtDNA の量的維持に関するいくつかの新しい知見について紹介する。

1. ミトコンドリア DNA の量的維持装置

1) mtDNA の複製装置

多コピーの環状 DNA といえはすぐに思い浮かぶのは大腸菌の F 因子のような、染色体（ある

いは核様体）とは別に自律的複製を行うプラスミド DNA であろう。実際、その類似性から mtDNA の伝統的複製モデルはおもに ColE1 プラスミド DNA の複製モデルを参考にして構築、提唱された⁷⁾。このモデルは mtDNA2本鎖の合成が非協調的に起こり、その複製過程では長い1本鎖 DNA 領域を形成するという特殊な複製様式であったが、近年になり、一般的な DNA の複製過程で見られるようなリーディング鎖とラギング鎖が協調的に合成されている複製中間体が検出され、現在ではいくつかの複製モデルが並存している¹⁾。一方、F 因子のようなプラスミド DNA 複製を試験管内再構成するためには21種類のタンパク質が必要であるのに対して⁸⁾、mtDNA の複製に必須のタンパク質は未だ8種類の同定にとどまっている(表1)。不足している構成要素が mtDNA の複製装置においては未だ同定されていないだけなのか、あるいはそもそも“単純”な構成であるのか興味をもたれる。特に複製途中の mtDNA において一般的な岡崎フラグメントが検出されないのと相まって確実なミトコンドリア DNA プライマーゼが未だ同定されていないことは mtDNA の複製装置に関する大きな謎のひとつである。最近、この“単純”な複製装置で mtDNA の複製機構を説明するモデルが提唱されている。“the bootlace mechanism of mtDNA replication”と名付けられたこのモデルはミトコンドリア RNA ポリメラーゼ (POLRMT) によって合成された転写産物の一部がラギング鎖のプライマーとしての機能を果たすというものである^{9) 10)}。我々が見出した POLRMT の鋳型 DNA 構造に依存した RNA 合成活性¹¹⁾はこのモデルとも矛盾しないが、今後の研究の進展によりこのモデルの真偽が明らかになっていくであろう。

表1. mtDNA 複製装置として同定されているタンパク質とその役割

タンパク質	役割	参考文献
POLG1	複製, 修復	64), 65)
POLG2	複製, 修復	64), 65)
Twinkle DNA helicase	複製	66)
mtSSB	複製	67)
RNaseH1	複製	68)
POLRMT	転写, 複製	7), 69)
TFAM	転写, 複製, mtDNA のパッケージング	14), 15), 16)
TFB2M	転写, 複製	70)

2) ミトコンドリア転写因子 (TFAM) と mtDNA の分解

mtDNA のコピー数の維持はその合成と分解とのバランスによって調整されていると考えられている。これまでに EndoG スクレアーゼなどがその局在と機能から mtDNA 維持への関与を示唆されているが、mtDNA 分解の分子メカニズムの詳細についてはまだよくわかっていない^{12) 13)}。しかしながら、これまでの TFAM に関する研究からは mtDNA の分解と維持についての多くの知見が得られている^{14) 15)}。TFAM は mtDNA の転写因子として最初に精製・クローニングされた¹⁶⁾。その後、ヒト培養細胞などでは TFAM は mtDNA1 分子あたり約1000分子存在しており、そのほとんどすべてが mtDNA に結合して、いわゆるヌクレオイド (nucleoid) と呼ばれる高次構造にパッケージされていることがわかってきた¹⁷⁾。そして TFAM と mtDNA との間には化学量的相関関係があることも明らかになっている¹⁸⁾。TFAM が結合していない mtDNA、あるいは mtDNA に結合していない TFAM はそれぞれ迅速に分解されることにより、mtDNA の量的維持が行われている。その為、今日では mtDNA は従来考えられてきたように裸で存在するのではなく TFAM によるパッケージングによって折りたたまれ、保護されているとの考えが広く受け入れられてきている。実際、ヌクレオイド構造の主要構成タンパク質である TFAM の mtDNA に対する保護的な役割は心機能やがん、そして老化などにおいて個体レベルでも重要であることが明らかになっている^{19) - 21)}。最近になって TFAM がミトコンドリアプロテアーゼ Lon の分解ターゲットであることが明らかになり、TFAM の分解を介した mtDNA の量的制御の仕組みがあることも明らかになってきている²²⁾。

3) その他の mtDNA の維持関連因子

その他にも、mtDNA の維持に関わると考えられているものには第2のミトコンドリア DNA ポリメラーゼとして発見された PrimPol²³⁾、DNA 結合 AAA タンパク質 ATAD3A²⁴⁾ などをはじめ、細胞骨格²⁵⁾ やミトコンドリアのダイナミクス^{26) - 29)}、タンパク質や核酸の安定性に関わるタンパク質因子^{30) - 32)} などが報告されている。しかしながら、

これらの因子が mtDNA の健全な量的維持においてどのように協調して働いているかはまだよくわかっていない。

2. ゲノムワイド RNAi スクリーニング

これまで述べたように mtDNA は TFAM を主要構成因子とするヌクレオイド構造をとっている。そのため、mtDNA の維持機構を理解するためにこれまで世界中の多くのグループがプロテオミクスの手法を用いたヌクレオイドの構成タンパク質の網羅的な同定を試みてきた。しかしながら、mtDNA ヌクレオイドの全体像についての統一的理解には至っていない³³⁾。そのような背景から我々は全く新しい手法で mtDNA (またはヌクレオイド) の量的維持に関わる遺伝子の同定をおこなった。

ショウジョウバエの Schneider 2細胞 (S2細胞) は RNA 干渉実験 (RNA interference: RNAi) に適しており、ゲノムワイドの遺伝子スクリーニングに広く使われている細胞である^{34) 35)}。さらに、先行研究からショウジョウバエにおいて mtDNA 維持の基本機構はヒトをはじめとする哺乳動物のそれと非常に類似していることがわかっている⁵⁾。ゲノムワイド RNAi スクリーニングは近年動物細胞にも応用され始めているが³⁶⁾、S2細胞は呼吸鎖複合体の欠損でも致死性を示さないため今回のスクリーニングには最適と考えた。一方、mtDNA を特異的に染色する方法としては2本鎖 DNA インターカレーターの蛍光試薬である PicoGreen を用いて染色する方法が確立されていた³⁷⁾。そこで我々は mtDNA の特異的蛍光染色と RNAi を組み合わせた機能的なゲノムスクリーニング法を開発し、mtDNA の量的維持に関わる新規遺伝子の探索を行った。S2細胞の mtDNA を生細胞内で特異的に染色する手法はこれまでに試みられたことがなく、予備実験では細胞質の非特異的なシグナルの高さから、mtDNA シグナルの検出を自動化することは困難であった。TFAM は mtDNA に結合することで2本鎖 DNA に負の超らせんを導入する能力を持つことが以前から知られており³⁸⁾、mtDNA に超らせんが導入されると PicoGreen のインターカレーションが阻害され、蛍光が減少することが報告されている²⁴⁾。これらのことより

TFAM の発現を RNAi で抑制して mtDNA を弛緩させることで PicoGreen の mtDNA への導入効率をあげる事が出来るのではないかと考えた。スクリーニングターゲットに対する RNAi と短時間の TFAM に対する RNAi とを組み合わせることで、予想通り mtDNA の蛍光シグナルを特異的に増幅させることに成功した (図1A)。

この検出系を用いてショウジョウバエ全遺伝子についてそれぞれの RNAi (16,019遺伝子領域に対する dsRNA 処理) 条件化での mtDNA シグナルを蛍光顕微鏡で観察した。その結果、mtDNA シグナルが著しく減少する、つまり mtDNA あるいはヌクレオイドの量的減少を示す105の1次スクリーニング陽性遺伝子を得た。その後、スクリーニングの再試行などを経て97の最終陽性遺伝子抽出した³⁹⁾ (図1B)。

3. 新たに発見された mtDNA の量的維持関連遺伝子

1) スクリーニングの概要

スクリーニング陽性遺伝子として抽出された遺伝子には DNA polymerase gamma や Twinkle helicase, mtSSB などのこれまで mtDNA の複製や維持に関わると報告されているタンパク質因子をコードする遺伝子のほとんどが含まれていた。陽性遺伝子を分類すると以下のようなカテゴリーに分類された。① mtDNA の複製・維持に関わるもの、②細

胞質翻訳に関わるもの、③プロテアソームに関するもの、④ ATP 合成酵素サブユニット、⑤ミトコンドリアの生合成・ダイナミズムに関与するもの、⑥核の遺伝子発現に関与するもの、⑦その他 (機能未知のものを含む)。 (図2)

一方、陽性遺伝子の全てにおいてその発現をそれぞれ単独に RNAi によってノックダウンした細胞を用いた定量的 PCR を行ったところ、mtDNA のコピー数が著しく減少するこれまで報告のなかった8遺伝子が抽出された³⁹⁾。それ以外の多くの陽性遺伝子の RNAi でも mtDNA の量的減少は観察されたが、比較的軽微であった。今回実施したスクリーニングで得られた陽性遺伝子の多くは mtDNA のトポロジーや mtDNA ヌクレオイドの構造に関与しているのかもしれない。

mtDNA のコピー数の減少が顕著に見られる新しい8遺伝子のうち、2つはカテゴリー①に属するミトコンドリア転写終結因子 MTERF ファミリーに属するタンパク質をコードし、3つはカテゴリー④の呼吸鎖複合体 V (ATP 合成酵素) のサブユニットをコードする遺伝子であった。

2) ミトコンドリア転写終結因子 MTERF ファミリー

MTERF (mitochondrial transcription termination factor) タンパク質は MTERF モチーフと呼ばれるロイシンジッパー様の保存されたアミノ酸配列

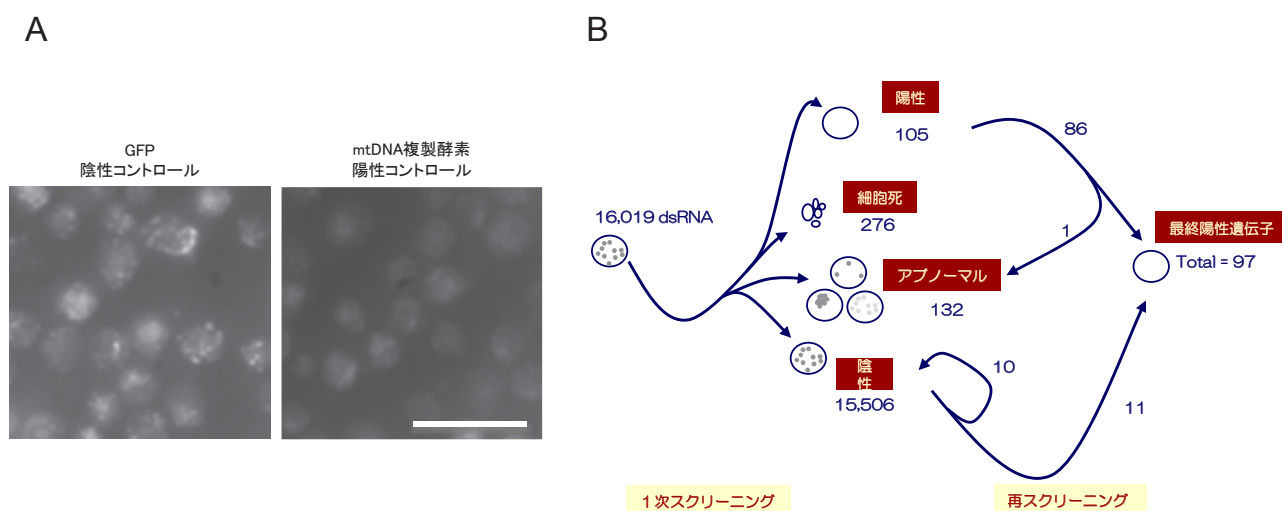


図1. (A) PicoGreen による S2細胞の染色像：陰性コントロールでは mtDNA はドット状に染色されるが、mtDNA 複製酵素の RNAi によってそのシグナルが消失する (スケールバー :50 μ m)。 (B) スクリーニングの概要：5日間の dsRNA 処理の後、S2細胞を PicoGreen 染色し、シグナルを陽性、陰性、アブノーマル、細胞死に分類し、105の1次陽性遺伝子抽出した。1次陽性遺伝子を用いた再スクリーニングにより、97の最終陽性遺伝子を得た。

を持つ一群のタンパク質で、ほとんどの多細胞生物に保存されている^{40) 41)}。多くの生物種で MTERF1 から MTERF4 までの4つのサブファミリーを構成しており、mtDNA の転写^{42) - 44)}、複製^{45) 46)}、翻訳^{47) - 49)}の制御に関与することが報告されている。ヒトではミトコンドリア脳筋症の原因となる mtDNA 上の tRNA 変異 (3243G 変異) が MTERF1 結合領域と重なり、MTERF1 の過剰発現ではその近傍での複製フォーク停止が亢進することが分かっている⁴⁵⁾。一方、ショウジョウバエゲノムにおいても4つの MTERF タンパク質が同定されている⁴¹⁾。そのうち mTTF タンパク質はショウジョウバエの MTERF ファミリーでもっとも良く研究されている分子であり、mtDNA 上の2か所の結合サイトにおいて転写装置を停止させることが *in vivo* および *in vitro* で証明されている^{50) - 52)}。今回のスクリーニングでは mTTF のほかに mTerf5 が陽性遺伝子として抽出されたが、mTerf5 は最近 mTTF と協調して転写終結に働くことが報告された⁵³⁾。我々は mTTF および mTerf5 の発現を細胞レベル、あるいは個体レベルで抑制して mtDNA の複製中間体を詳細に解析し、ショウジョウバエ mtDNA の複製フォークが mTTF 結合領域で一時停止すること、mTTF のノックダウンにより複製フォークの部位特異的停止が阻害され、非特異的な複製フォークの停止の増大やラギング鎖合成が阻害されることを見出した^{54) 55)}。また長時間の発現抑制によって mtDNA コピー数は約20% まで減

少することを明らかにした。一方、mTerf5 のノックダウンでは mTTF 結合領域での複製フォークの停止が増大した。これらの結果から我々は mTTF と mTerf5 とが mtDNA 上の mTTF 結合領域において転写装置と複製フォークとの衝突を回避するためのいわゆる「複製フォークバリア (replication fork barrier: RFB)」として協調的に機能するというモデルを提唱している⁵⁵⁾。mTTF や mTerf5 の発現量が十分でないと複製フォークが転写装置と衝突することで崩壊し、mtDNA コピー数減少を引き起こすと考えられる。また、mTTF の発現抑制では mtDNA のラギング鎖合成が阻害されていることから、mTTF/mTerf5 が複製フォークへのプライマー供給にも関与することが示唆されている。

3) ATP 合成酵素と mtDNA

ミトコンドリアの呼吸鎖複合体は電子伝達系とも呼ばれ、電子の流れに伴ってミトコンドリアマトリクスと膜間スペースとの間に発生するプロトン (H^+) の密度勾配を利用して細胞の活動に必要な ATP を産生する。呼吸鎖複合体 V はミトコンドリア内膜に存在する F1FoATP 合成酵素である。ショウジョウバエの ATP 合成酵素を構成するサブユニットをコードする遺伝子は2つが mtDNA にコードされ、14 遺伝子が核にコードされている。今回のスクリーニングでは核にコードされている14 遺伝子のうち9つが陽性遺伝子として抽出された³⁹⁾。9 遺伝子のそれぞれの遺伝子の

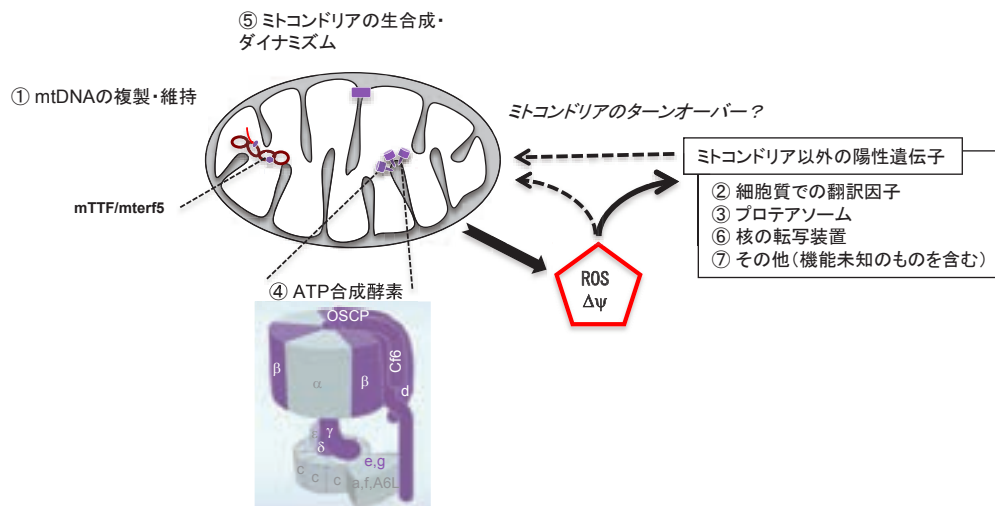


図2. 陽性遺伝子のカテゴリー：最終陽性遺伝子を7つのカテゴリーに分類した。陽性遺伝子カテゴリーのうちミトコンドリアで働く代表的な遺伝子産物を紫色で示す。

発現抑制を行うと mtDNA のコピー数の減少が観察され、そのうち3遺伝子では特に顕著であった。これまで酵母やトリパノソーマなどの原虫においては mtDNA の健全な量的維持に ATP 合成酵素が必要であることがいくつも報告されているが^{56)–63)}、今回の結果からは多細胞生物においても普遍的な制御機構があることが予想できる。

mtDNA のコピー数の減少が比較的穏やかな ATP 合成酵素サブユニットの発現抑制においてもミトコンドリア膜電位の低下が観察され、呼吸鎖複合体 I 及び IV からの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の産生が増大した。ROS の産生増大と mtDNA のコピー数の減少は ATP 合成酵素の阻害剤であるオリゴマイシンの添加によっても再現されたが、mtDNA のコピー数の減少を ROS による mtDNA 損傷だけで説明することは難しかった。スクリーニング陽性遺伝子としては核にコードされる遺伝子の発現制御やタンパク質分解にかかわる遺伝子が多数同定されており、ミトコンドリアの生合成の低下や分解の亢進そのものが mtDNA のコピー数の減少を引き起こしているのかも知れない。実際、ATP 合成酵素サブユニットの発現抑制下では細胞内成分の分解に関わるリソソームが増大し、リソソームとミトコンドリアとが共局在することが観察されている³⁹⁾。

おわりに

我々の行ったスクリーニングでは新たにいくつかの mtDNA の量的維持関連遺伝子が見出されているが、それらの分子レベルでの作用機序については今後の研究課題である。mTTF と mTerf5 との間には物理的相互作用があるのか、もし RFB 複合体を形成するのならどのように転写装置や複製フォークを制御しているのか。また、ラギング鎖の合成へどのように関わっているのか。これらを明らかにすることは mtDNA の健全な維持のメカニズムの一端を明らかにし、ミトコンドリア病の病態発症メカニズムの理解を深めることに大きく貢献することが期待できる。一方、mtDNA の量的維持は細胞内の状態に応答して調節されていると考えられるが、ATP 合成酵素はそのセンサーとして機能するのであろうか。スクリーニング陽性遺伝子群のなかでは、mtDNA 上で直接働いて

いるものを除けば、ATP 合成酵素の抑制は mtDNA のコピー数減少をもっとも強く引き起こしていた。ATP 合成酵素は mtDNA の量的調節に対してこれまで考えられてきた以上に重要な役割を担っているのかも知れない。

謝辞

本稿の執筆にあたっては Howard T. Jacobs 教授、康東天教授はじめ多くの共同研究者の方々に感謝いたします。なお本稿は純真学園大学個人研究助成および JSPS 科研費2459895の助成を受けたものです。

【参考文献】

- 1) McKinney EA, Oliveira MT (2013) Replicating animal mitochondrial DNA. *Genet Mol Biol* 36: 308–315.
- 2) Shadel GS (2008) Expression and maintenance of mitochondrial DNA: new insights into human disease pathology. *Am J Pathol* 172: 1445–1456.
- 3) Rötig A, Poulton J (2009) Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. *Biochim Biophys Acta* 1792: 1103–1108.
- 4) Ylikallio E, Suomalainen A (2012) Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann Med* 44: 41–59.
- 5) Oliveira MT, Garesse R, Kaguni LS (2010) Animal models of mitochondrial DNA transactions in disease and ageing. *Exp Gerontol* 45: 489–502.
- 6) Bratic A, Larsson NG (2013) The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 123: 951–957.
- 7) Clayton DA (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693–705.
- 8) Zzaman S, Abhyanker MM, Bastia D (2004) Reconstitution of F factor DNA replication in vitro with purified proteins. *J Biol Chem* 279: 17404–17410.
- 9) Reyes A, Kazak L, Wood SR, Yasukawa T, Jacobs HT, Holt IJ. (2013) Mitochondrial DNA replication proceeds via a 'bootlace' mechanism involving the incorporation of processed transcripts. *Nucleic Acids Res.* 41:5837–50.
- 10) Holt IJ, Jacobs HT. (2014) Unique features of DNA replication in mitochondria: A functional and evolutionary perspective. *Bioessays*. 36:1024–1031.
- 11) Fukuoh A, Ohgaki K, Hatae H, Kuraoka I, Aoki Y, Uchiumi T, Jacobs HT, Kang D. (2009) DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase. *Genes Cells*. 14:1029–1042.
- 12) Ohsato T, Ishihara N, Muta T, Umeda S, Ikeda S,

- Mihara K, Hamasaki N, Kang D. (2002) Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur J Biochem.* 269:5765–5770.
- 13) McDermott-Roe C, Ye J, Ahmed R, Sun XM, Serafin A, Ware J, Bottolo L, Muckett P, Cañas X, Zhang J, Rowe GC, Buchan R, Lu H, Braithwaite A, Mancini M, Hauton D, Martí R, García-Arumí E, Hubner N, Jacob H et al (2011) Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function. *Nature* 478: 114–118.
- 14) Kang D, Hamasaki N (2005) Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles. *Ann NY Acad Sci* 1042: 101–108
- 15) Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1819:921–9
- 16) Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18: 231–236.
- 17) Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N, Kang D. (2004) Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res.* 31: 1640–1645
- 18) Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoka A, Sasaki N, Hamasaki N, Kang D. (2004) Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol.* 24: 9823–9834.
- 19) Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. (2001) Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res.* 88: 529–535.
- 20) Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T, Kang D, Sunagawa K, Tsutsui H, Nakanishi H. (2008) Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *J Neurosci.* 28: 8624–8634.
- 21) Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T, Kang D, Sunagawa K, Tsutsui H, Nakanishi H. (2008) Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *J Neurosci.* 28: 8624–8634.
- 22) Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS (2010) Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18410–18415.
- 23) García-Gómez S, Reyes A, Martínez-Jiménez MI, Chocrón ES, Mourón S, Terrados G, Powell C, Salido E, Méndez J, Holt IJ, Blanco L (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells. *Mol Cell* 52: 541–553.
- 24) He J, Mao CC, Reyes A, Sembongi H, Di Re M, Granycome C, Clippingdale AB, Fearnley IM, Harbour M, Robinson AJ, Reichelt S, Spelbrink JN, Walker JE, Holt IJ (2007) The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *J Cell Biol* 176: 141–146.
- 25) Reyes A, He J, Mao CC, Bailey LJ, Di Re M, Sembongi H, Kazak L, Dzionek K, Holmes JB, Cluett TJ, Harbour ME, Fearnley IM, Crouch RJ, Conti MA, Adelstein RS, Walker JE, Holt IJ (2011) Actin and myosin contribute to mammalian mitochondrial DNA maintenance. *Nucleic Acids Res* 39: 5098–5108.
- 26) Jones BA, Fangman WL (1992) Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev* 6: 380–389.
- 27) Wong ED, Wagner JA, Gorsich SW, McCaffery JM, Shaw JM, Nunnari J (2000) The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* 151: 341–352.
- 28) Elachouri G, Vidoni S, Zanna C, Pattyn A, Boukhaddaoui H, Gaget K, Yu-Wai-Man P, Gasparre G, Sarzi E, Delettre C, Olichon A, Loiseau D, Reynier P, Chinnery PF, Rotig A, Carelli V, Hamel CP, Rugolo M, Lenaers G (2011) OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res* 21: 12–20.
- 29) Vielhaber S, Debska-Vielhaber G, Peeva V, Schoeler S, Kudin AP, Minin I, Schreiber S, Dengler R, Kollwe K, Zschratter W, Kornblum C, Zsurka G, Kunz WS (2013) Mitofusin 2 mutations affect mitochondrial function by mitochondrial DNA depletion. *Acta Neuropathol* 125: 245–256
- 30) Saada A (2004) Deoxyribonucleotides and disorders of mitochondrial DNA integrity. *DNA Cell Biol* 23: 797–806.
- 31) Ciesielski GL, Plotka M, Manicki M, Schilke BA,

- Dutkiewicz R, Sahi C, Marszalek J, Craig EA (2013) Nucleoid localization of Hsp40 Mdj1 is important for its function in maintenance of mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 1833: 2233–2243.
- 32) Kornblum C, Nicholls TJ, Haack TB, Schöler S, Peeva V, Danhauser K, Hallmann K, Zsurka G, Rorbach J, Iuso A, Wieland T, Sciacco M, Ronchi D, Comi GP, Moggio M, Quinzii CM, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Klopstock T et al (2013) Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nat Genet* 45: 214–219.
 - 33) Hensen F, Cansiz S, Gerhold JM, Spelbrink JN (2013) To be or not to be a nucleoid protein: A comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie* 100: 219–226.
 - 34) Ramadan N, Flockhart I, Booker M, Perrimon N, Mathey-Prevot B. (2014) Design and implementation of high-throughput RNAi screens in cultured *Drosophila* cells. *Nat Protoc*. 2:2245–64.
 - 35) Mohr SE. (2014) RNAi screening in *Drosophila* cells and in vivo. *Methods*. 68: 82–8.
 - 36) Mohr SE, Smith JA, Shamu CE, Neumüller RA, Perrimon N. (2014) RNAi screening comes of age: improved techniques and complementary approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15: 591–600.
 - 37) Ashley N, Harris D, Poulton J (2005) Detection of mitochondrial DNA depletion in living human cells using PicoGreen staining. *Exp Cell Res* 303: 432–446.
 - 38) Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA. (1992) DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem*. 267: 3358–67.
 - 39) Fukuoh A, Cannino G, Gerards M, Buckley S, Kazancioglu S, Scialo F, Lihavainen E, Ribeiro A, Dufour E, Jacobs HT. (2014) Screen for mitochondrial DNA copy number maintenance genes reveals essential role for ATP synthase. *Mol Syst Biol*. 21.10:734. doi: 10.15252/msb.20145117.
 - 40) Linder T, Park CB, Asin-Cayuela J, Pellegrini M, Larsson NG, Falkenberg M, Samuelsson T, Gustafsson CM. (2005) A family of putative transcription termination factors shared amongst metazoans and plants. *Curr Genet*. 48: 265–269.
 - 41) Roberti M, Polosa PL, Bruni F, Manzari C, Deceglie S, Gadaleta MN, Cantatore P. (2009) The MTERF family proteins: mitochondrial transcription regulators and beyond. *Biochim Biophys Acta*. 1787: 303–311.
 - 42) Kruse B, Narasimhan N, Attardi G. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. (1989) *Cell* 58:391–397.
 - 43) Park CB, Asin-Cayuela J, Cámara Y, Shi Y, Pellegrini M, Gaspari M, Wibom R, Hulténby K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Falkenberg M, Gustafsson CM, Larsson NG. (2007) MTERF3 is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription. *Cell* 130:273–285.
 - 44) Wenz T, Luca C, Torraco A, Moraes CT. (2007) mTERF2 regulates oxidative phosphorylation by modulating mtDNA transcription. *Cell Metab*. 9: 499–511.
 - 45) Hyvärinen AK, Pohjoismäki JL, Reyes A, Wanrooij S, Yasukawa T, Karhunen PJ, Spelbrink JN, Holt IJ, Jacobs HT. (2007) The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*. 35: 6458–6474.
 - 46) Hyvärinen AK, Pohjoismäki JL, Holt IJ, Jacobs HT. (2011) Overexpression of MTERFD1 or MTERFD3 impairs the completion of mitochondrial DNA replication. *Mol Biol Rep*. 38: 1321–1328.
 - 47) Roberti M, Bruni F, Loguercio Polosa P, Manzari C, Gadaleta MN, Cantatore P. (2006) MTERF3, the most conserved member of the mTERF-family, is a modular factor involved in mitochondrial protein synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1757: 1199–1206.
 - 48) Cámara Y, Asin-Cayuela J, Park CB, Metodiev MD, Shi Y, Ruzzenente B, Kukut C, Habermann B, Wibom R, Hulténby K, Franz T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hallberg BM, Gustafsson CM, Larsson NG. (2011) MTERF4 regulates translation by targeting the methyltransferase NSUN4 to the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metab*. 13: 527–539.
 - 49) Wredenberg A, Lagouge M, Bratic A, Metodiev MD, Spähr H, Mourier A, Freyer C, Ruzzenente B, Tain L, Grönke S, Baggio F, Kukut C, Kremmer E, Wibom R, Polosa PL, Habermann B, Partridge L, Park CB, Larsson NG. (2013) MTERF3 regulates mitochondrial ribosome biogenesis in invertebrates and mammals. *PLoS Genet*. 9:e1003178.
 - 50) Roberti M, Polosa PL, Bruni F, Musicco C, Gadaleta MN, Cantatore P. (2003) DmTTF, a novel mitochondrial transcription termination factor that recognises two sequences of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*. 31:1597–1604.
 - 51) Roberti M, Bruni F, Polosa PL, Gadaleta MN, Cantatore P. (2006) The *Drosophila* termination factor DmTTF regulates *in vivo* mitochondrial transcription. *Nucleic Acids Res* 34: 2109–2116.

- 52) Roberti M, Fernandez-Silva P, Polosa PL, Fernandez-Vizarra E, Bruni F, Deceglie S, Montoya J, Gadaleta MN, Cantatore P. (2005) In vitro transcription termination activity of the Drosophila mitochondrial DNA-binding protein DmTTF. *Biochem Biophys Res Commun.* 331:357–362.
- 53) Bruni F, Manzari C, Filice M, Loguercio Polosa P, Colella M, Carmone C, Hambardjieva E, Garcia-Diaz M, Cantatore P, Roberti M. (2012) D-MTERF5 is a novel factor modulating transcription in Drosophila mitochondria. *Mitochondrion.* 12:492–499.
- 54) Jöers P, Jacobs HT. (2013) Analysis of replication intermediates indicates that Drosophila melanogaster mitochondrial DNA replicates by a strand-coupled theta mechanism. *PLoS One.* 8: e53249.
- 55) Jöers P, Lewis SC, Fukuoh A, Parhiala M, Ellilä S, Holt IJ, Jacobs HT. (2013) Mitochondrial transcription terminator family members mTTF and mTerf5 have opposing roles in coordination of mtDNA synthesis. *PLoS Genet.* 9: e1003800.
- 56) Giraud MF, Velours J (1997) The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho⁻ yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F1. *Eur J Biochem* 245: 813–818.
- 57) Lai-Zhang J, Xiao Y, Mueller DM (1999) Epistatic interactions of deletion mutants in the genes encoding the F1-ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 18: 58–64.
- 58) Clark-Walker GD, Hansbro PM, Gibson F, Chen XJ (2000) Mutant residues suppressing rho⁽⁰⁾-lethality in *Kluyveromyces lactis* occur at contact sites between subunits of F₁-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1478: 125–137.
- 59) Contamine V, Picard M (2000) Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 281–315.
- 60) Lefebvre-Legendre L, Balguerie A, Duvezin-Caubet S, Giraud MF, Slonimski PP, Di Rago JP (2003) F1-catalysed ATP hydrolysis is required for mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under conditions where it cannot respire. *Mol Microbiol* 47: 1329–1339.
- 61) Duvezin-Caubet S, Rak M, Lefebvre-Legendre L, Tetaud E, Bonnefoy N, di Rago JP (2006) A “petite obligate” mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: functional mtDNA is lethal in cells lacking the delta subunit of mitochondrial F1-ATPase. *J Biol Chem* 281: 16305–16313.
- 62) Wang Y, Singh U, Mueller DM (2007) Mitochondrial genome integrity mutations uncouple the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Biol Chem* 282: 8228–8236.
- 63) Schnauffer A, Clark-Walker GD, Steinberg AG, Stuart K (2005) The F1-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function. *EMBO J* 24: 4029–4040.
- 64) Kaguni LS. (2004) DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem.* 73:293–320.
- 65) Graziewicz MA, Longley MJ, Copeland WC. (2006) DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev.* 106: 383–405.
- 66) Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M, Larsson C. (2001) Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet.* 28:223–231.
- 67) Ruhanen H, Borrie S, Szabadkai G, Tyynismaa H, Jones AW, Kang D, Taanman JW, Yasukawa T. Mitochondrial single-stranded DNA binding protein is required for maintenance of mitochondrial DNA and 7S DNA but is not required for mitochondrial nucleoid organisation. (2010) *Biochim Biophys Acta.* 1803: 931–939.
- 68) Cerritelli SM, Frolova EG, Feng C, Grinberg A, Love PE, Crouch RJ. (2003) Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Mol Cell.* 11: 807–815.
- 69) Fusté JM, Wanrooij S, Jemt E, Granycome CE, Cluett TJ, Shi Y, Atanassova N, Holt IJ, Gustafsson CM, Falkenberg M. (2010) Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Mol Cell.* 37:67–78.
- 70) Matsushima Y, Garesse R, Kaguni LS. (2004) Drosophila mitochondrial transcription factor B2 regulates mitochondrial DNA copy number and transcription in schneider cells. *J Biol Chem.* 279: 26900–26905.