

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07078

研究課題名(和文)細胞核ヒストン修飾とミトコンドリア遺伝子機能を繋ぐ転写抑制シグナル

研究課題名(英文)Transcriptional regulators involved in nuclear histone modification and mitochondrial gene expression

研究代表者

川村 和夫 (Kawamura, Kazuo)

高知大学・その他部局等(名誉教授)・名誉教授

研究者番号：30136361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：加齢はミトコンドリア(Mt)の機能低下を伴うが、両者の因果関係は不明である。ミサキメイトボヤのMtは、個体に加齢し死を迎えるまで遺伝子機能を低下し続けるが、出芽すると体細胞のMt遺伝子機能は劇的に回復する。本研究は、まずMt転写因子a(TFAM)(トランスエレメント)とMtゲノムのDループ(シスエレメント)がMtの遺伝子機能に直接関与していることを示した。次に、TFAMが加齢に伴い発現低下する仕組みを調べた。遺伝子変異ではなく、抑制性転写因子YY1がYAF2と協働してコリプレッサーSIRT6をTFAM遺伝子の転写調節領域にリクルートし、ヒストンH3リシン9を脱アセチル化することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Aging accompanies the decrease in mitochondrial gene and respiratory activities. In the budding tunicate, *Polyandrocarpa misakiensis*, mitochondrial activities are repeatedly regulated during aging and budding cycles. This research project revealed first that mitochondrial transcription factor A (TFAM) acts on the D-loop of mitochondrial genome to facilitate the expression of downstream genes. Both the transcription factor, Yin-Yang-1 (YY1) and the transcriptional corepressor, Sirtuin 6 (SIRT6) are upregulated during zooidal aging. PmSirt6 mRNA, when introduced into buds together with PmYY1 mRNA, severely downregulated TFAM gene expression. Pull-down assays, gel shift assays, and cross-linking experiments indicated that YY1 recruited SIRT6 to the 5' upstream region of TFAM gene to facilitate the deacetylation of histone H3K9. These results indicate that during normal tunicate aging, epigenetic histone modification causes the decrease of mitochondrial activity without genetic damage.

研究分野：発生生殖生物学

キーワード：ホヤ ミトコンドリア Tfam YY1 Sirtuin6 プルダウンアッセイ ゲルシフトアッセイ 架橋法

1. 研究開始当初の背景

動物の加齢は、細胞の形態や機能の変化を伴い、その影響は核ゲノムやオルガネラにも及ぶ。ミトコンドリアは、ATP や脂肪酸の産生のみならず、生殖細胞分化や細胞死にも関与する多機能オルガネラである。ミトコンドリア・フリーラジカル説によれば、むしろオルガネラこそが加齢の後期段階（老化）を支配する主役である。呼吸鎖複合体 及び から漏れる活性酸素種は、ミトコンドリアゲノムを損傷し、蓄積する変異が呼吸鎖機能不全を誘発し、細胞老化の原因や個体死の遠因になるといふ。他方、フリーラジカルによる DNA 損傷は、老化を推進するほどに強力なのかという疑問がある。ミトコンドリアの機能低下の原因、および機能低下と老化の因果関係は、依然として不明である。

2. 研究の目的

ミサキマメイタボヤは出芽（無性生殖）する原索動物である。個体の寿命は 4 - 5 か月であるが、個体死を迎える前に出芽することで無性株は約 50 年間命を繋いできた。出芽は再生の様式なので、再生すると寿命が延び、しかもそれが半世紀も続いているのは驚きである。哺乳類同様、ミサキマメイタボヤのミトコンドリアは、個体の加齢とともに遺伝子機能・呼吸鎖機能が低下するものの、出芽するとそれらの機能は劇的に回復する。哺乳類では、ミトコンドリア転写因子 a (TFAM) がミトコンドリアの遺伝子機能に一義的に関与している。TFAM は核ゲノムがコードする HMG タンパクである。ミトコンドリアゲノムの non-coding region (D-ループ)にあるプロモーターに結合すると、TFAM は DNA を折り曲げ転写を促進する。本研究は、最初に、ミサキマメイタボヤの TFAM が、加齢・出芽に連動してミトコンドリアの機能変化をもたらす主たる因子であることを示した。*PmTfam* mRNA や siRNA を加齢個体

に導入することで、それを証明した。次に、*PmTfam* の発現調節メカニズムを調べた。抑制性転写因子 Yin-Yang-1 (YY1) とコリブレッサー Sirtuin6 (SIRT6) の関与を示した。mRNA やリコンビナントタンパクを調製し、in vivo および in vitro で研究を進めた。

3. 研究の方法

レポーター遺伝子の作製とその利用
ミサキマメイタボヤのミトコンドリア DNA (全長 15.3 kb) (図 1A) から、non-coding region (NCR) とその内部に挿入されている 12S rRNA 遺伝子 (2.3 kb) をクローニングし、すでにプラスミドにサブクローニングしておいた GFP の 5' 上流域にライゲーションした (図 1B,C)。この *PmNCR2.3K/GFP* をもとに、NCR を部分的に欠失した種々のレポーター遺伝子を作製した。レポーター遺伝子をエレクトロポレーション法でホヤに導入し、遺伝子発現に対する cis エLEMENT の効果を調べた。

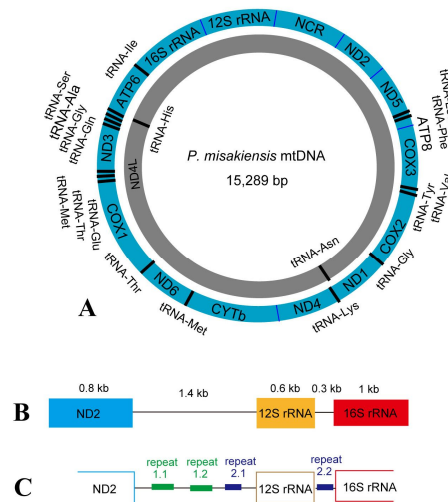


図 1

人工 mRNA の作製とその利用

ミサキマメイタボヤのミトコンドリア転写因子 a (*PmTfam*) 全長 ORF (756 bp) に約 60 bp の 5' UTR がついた cDNA を、pCMV-Myc Tag (Stratagene) に挿入し、T3

プロモーターから転写した。PmYY1 (ORF, 954 bp) と PmSirt6 (ORF, 996 bp) についても、同様に人工 mRNA を合成した。PmTfam の siRNA 合成は業者委託した。

リコンビナントタンパクの調製

PmYY1 と PmSirt6 の cDNA を、各々 pQE30 His-Tag ベクターに挿入し、IPTG によりタンパク発現を誘導した。アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーにより、タンパクを精製した。

タンパク間相互作用の解析

GST PmYAF2 融合タンパクとグルタチオンビーズを用いて、PmYY1 と PmSIRT6 のプルダウンアッセイを行った。タンパク架橋剤 SMCC を用いて、YY1 と YAF2、SIRT6 と YAF2 の結合を経時的に調べた。

タンパク DNA 間相互作用の解析

PmTfam の 5' 上流域 (約 1.5 kb) から、YY1 結合モチーフをもつと予想される 30 塩基のオリゴヌクレオチドを 3 か所選び、YY1・YAF2・SIRT6 との結合をゲルシフトアッセイで調べた。

また、タンパク DNA 架橋剤 SPB を用いて、オリゴ DNA と YY1 の結合を経時的に調べた。

4. 研究成果

PmTfam mRNA を人工合成し (図 2A) エレクトロポレーション法でホヤ加齢個体

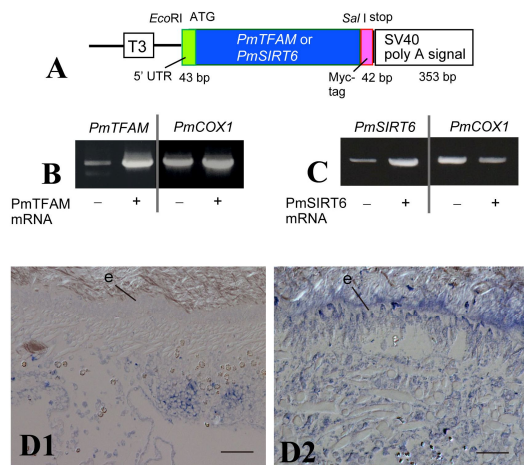


図 2

に導入した。シトクローム c オキシダーゼ 1 (PmCOX1) の発現を in situ hybridization と RT-PCR で調べたところ、mRNA の導入により遺伝子発現が促進された (図 2B, D)。PmTfam siRNA をリポフェクション法でホヤ芽体に導入したところ、PmCOX1 の発現が抑制された。

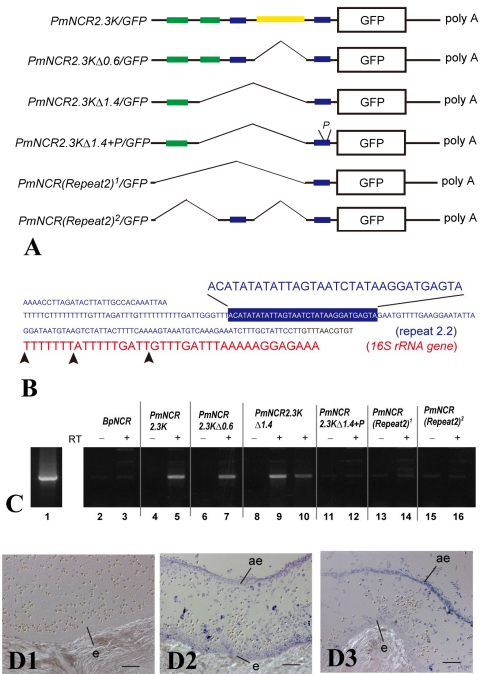


図 3

D ループで駆動するように設計したレポーター遺伝子 (PmNCR2.3K/GFP) を、リポフェクション法により成体及び芽体に導入した。レポーター遺伝子は成体の生殖系列細胞で強く発現し、芽体においては上皮性体細胞が強いシグナルを発した。これらの発現パターンは、ミトコンドリア 16S rRNA のそれと一致した。次に、遺伝子発現に必要な cis エlement を同定するため、内部欠失レポーター遺伝子を作製した (図 3A)。NCR の中央部 1.4 キロを欠くレポーター遺伝子は機能したが、更に 32 ヌクレオチドを除くと発現が消失した (図 3A, C, D)。この配列は NCR の 3' 末端近傍に位置し、TATA ボックスのモチーフをもっていた (図 3B 青のボックス)。

次に、NCR レポーター遺伝子の発現を調節する trans エlementについて調べた。

哺乳類では、ミトコンドリア転写因子 A (TFAM) が NCR 上のプロモーターに結合する。PmTFAM mRNA をレポーター遺伝子と共にホヤ生体に導入したところ、TATA ボックス上流の塩基の長さに依存して GFP の発現が最大 5 倍まで促進された (図 4)。これらの結果は、NCR の TATA ボックス配列が必須 cis エlementで、その上流配列は trans エlementとしての TFAM が効果的に働くために必要であることを示した。

trans エlementである TFAM の発現を負に調節する 2 つの因子を発見した。一つは転写因子 YY1 であり、他の一つは転写コリプレッサー Sirt6 である (図 2 A, C)。これらは

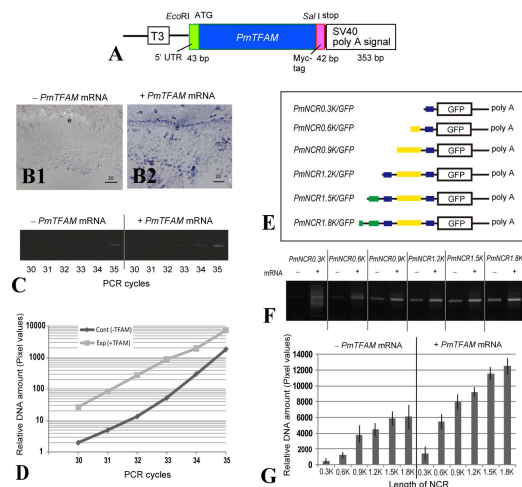


図 4

発現部位と時期がよく似ており、出芽の時に最も発現量が低く、加齢とともに発現量が増加するパターンを示した。PmSirt6 mRNA をホヤに導入し ChIP 解析したところ、PmTFAM 遺伝子上流のコアプロモーター領域で、ヒストン H3K9 の脱アセチル化がおきていた。

YY1 と SIRT6 は zinc 結合タンパクである。YAF2 は ring finger ドメインをもち、タンパク-タンパク相互作用を担う。YY1, YAF2, Sirtuin6 タンパクを調製し、アフィニティ

共沈実験を行ったところ、この 3 つのタンパクは相互作用できることが生化学的に証明された。その相関は EDTA に感受性を示すことから、タンパク間相互作用は zinc 要求性であることが強く示唆された。SMCC を用いたクロスリンク法により、YAF2 は homophilic 四量体を形成できること、YAF2 は、YY1 もしくは SIRT6 と 1:1 で結合することが分かった。ゲルシフトアッセイは、YY1 が YAF2 と SIRT6 を PmTfam の 5' 上流域の YY1 結合モチーフにリクルートすることを示した。また、SPB 架橋法により、YY1 は 2:1 比で DNA に結合することが示唆された。これらの結果より、PmTfam 遺伝子の YY1 結合モチーフに対して、2 分子の YY1 と 8 分子の SIRT6 が集合し、Tfam のヒストン脱メチル化を促進することで Mt の機能低下を導いていると結論した。

PmYY1 と PmSIRT6 は、出芽特異的分泌タンパク TC14-3 により発現抑制される遺伝子として発見された。TC14-3 は、cytostatic 活性を示し、これは TC14-3 によって誘導される PmEed がサイクリンなどのヒストン H3K27 をトリメチル化することに起因している。本研究は、出芽のとき PmYY1 と PmSirt6 のヒストン H3K27 トリメチル化がおきていることを示した。このメチル化によって、PmYY1 と PmSIRT6 は発現抑制され、結果的に PmTfam は PmYY1 と PmSIRT6 による発現抑制から解除されると考えられる。TC14-3 と PmEed を繋ぐシグナル伝達は、加齢と出芽のサイクルに重要な役割を果たすことが鮮明になった。トランスクリプトーム解析で得られた PmFoxO と PmAkt は、この経路を構成するパーツのようだが、その全容は未だ不明である。

最後に、老化個体でミトコンドリアの機能が低下することに、果たしてどんな意味があるのかを問うた。加齢個体に PmTfam mRNA を導入して、ミトコンドリアの遺伝子

機能を強制的に上昇させた。核ゲノムの損傷を示す TUNEL 陽性細胞が著しく増加した。核ゲノムがコードする遺伝子群のうち、SOD2 などのフリーラジカルスカベンジャーは、加齢に伴って発現量が低下する。そのような状態で、ミトコンドリアの機能を上昇させると、核ゲノムは活性酸素種の攻撃に晒されるのであろう。ミトコンドリアの機能低下は、核ゲノムを保護するうえで適応的な意義があることをこの結果は示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Alié A, Hiebert LS., Simion P, Scelzo M, Prünster MM, Lotito S, Delsuc F, Douzery EJP, Dantec C, Lemaire P, Darras S, Kawamura K, Brown FD, Tiozzo S. (2018) Convergent acquisition of non-embryonic development in styelid ascidians. *Mol Biol Evol.* 査読あり doi: 10.1093/molbev/msy068
Kawamura K, Yoshida T, and Sekida S. (2018) Autophagic dedifferentiation induced by cooperation between TOR inhibitor and retinoic acid signals in budding tunicates. *Dev. Biol.* 査読あり 433(2), 384-393. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.08.023

Kawamura K, Saitoh Y, Ballarin L, and Sunanaga T. (2017) Regulatory *cis*- and *trans*-elements of mitochondrial D-loop-driven reporter genes in budding tunicates. *Mitochondrion* 査読あり 35, 59-69. doi: 10.1016/j.mito.2017.05.006

Kawamura K, Sekida S, and Sunanaga T. (2015) Histone methylation codes involved in stemness, multipotency, and senescence in budding tunicates. *Mech. Ageing Dev.* 査読あり 145, 1-12. doi:

10.1016/j.mad.2014.12.001

Shibuya M, Hatano M, and Kawamura K. (2015) Interactive histone acetylation and methylation in regulating transdifferentiation-related genes during tunicate budding and regeneration. *Dev. Dyn.* 査読あり 244, 10-20. doi: 10.1002/dvdy.24212

[学会発表](計 4 件)

川村和夫 「出芽ホヤの脱分化を調節する starvation とレチノイン酸シグナルの独立と協調」日本動物学会第 88 回富山大会 2017 年 9 月 21 日 9 月 23 日 富山県民会館

吉田拓人 「出芽ホヤの細胞分化と加齢におけるミトコンドリアの品質管理に関わる Atg 関連遺伝子」第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日 12 月 2 日 パシフィコ横浜

斉藤優也 「出芽ホヤにおけるミトコンドリアの活性化はヒストンメチル化をトリガーとした TFAM の誘導を介しておこる」第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日 12 月 2 日 パシフィコ横浜

川村和夫 「ヒストンメチル化はなぜホヤミトコンドリアを活性化できるのか」日本動物学会第 86 回新潟大会 2015 年 9 月 17 日 9 月 19 日 新潟コンベンションセンター

[その他]

ホームページ等
Pmisakiensis BLAST Search
<http://octopus.obs-vlfr.fr/blast/Pmisakiensis/blast.php>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川村 和夫 (Kawamura, Kazuo)
高知大学・名誉教授
研究者番号: 30136361