

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650081

研究課題名(和文) 出芽ホヤ体細胞の加齢とそのリセットにおける核ミトコンドリア相互作用

研究課題名(英文) Nuclear-mitochondrial interactions in somatic cell senescence in budding tunicates

研究代表者

川村 和夫 (Kawamura, Kaz)

高知大学・自然科学系・教授

研究者番号：30136361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミサキマメイタボヤは、出芽と加齢に連動して、ミトコンドリア呼吸鎖遺伝子群の活性化と不活性化を繰り返している。核ゲノムがコードするミトコンドリア転写因子TFAMとミトコンドリア機能維持因子PHN2に的を絞って、ミトコンドリア呼吸鎖因子COX1の発現調節との相関を調べた。PmTFAMとPmPHN2は出芽時に最も発現量が多いこと、ヒストンメチル化が発現量に影響すること、TFAMをノックインあるいはノックダウンするとPmCOX1の発現量が上昇・下降することがわかった。これらの結果は、クロマチンのヒストン修飾がTFAMやPHN2を介してミトコンドリアの機能を調節することを示している。

研究成果の概要(英文)：In the budding tunicate, *Polyandrocarpa misakiensis*, mitochondrial respiratory genes are repeatedly activated and inactivated in relation to budding and zooidal senescence. In this research project, it was examined how and to what extent 2 nuclear genes, mitochondrial transcription factor a (PmTFAM) and prohibitin 2 (PmPHN2), were involved in gene activation of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (PmCOX1). Both PmTFAM and PmPHN2 were most abundantly expressed during budding stages and attenuated during ageing. An endogenous humoral factor, TC14-3, regulated PmTFAM and PmPHN2 gene expression via histone methylation and PmPHN2 was also influenced by histone acetylation. RNAi of PmTFAM caused PmCOX1 downregulation, and the transfection of PmTFAM mRNA upregulated PmCOX1 expression. These results strongly suggest that PmTFAM and PmPHN2 mediate the nuclear control of mitochondrial genes through histone modification.

研究分野：動物発生学

キーワード：ホヤ 出芽 加齢 ミトコンドリア TFAM Prohibitin 2 ヒストンメチル化

1. 研究開始当初の背景

加齢と死は、真核生物の普遍的属性である。生殖系幹細胞や体細胞系組織幹細胞など一部の例外を除けば、すべての細胞にとって加齢は不可避である。細胞増殖能の低下、ミトコンドリアの機能不全、SA ガラクトシダゼ(リソソーム酵素)活性の上昇などが不可逆的に進行する。哺乳類の加齢の要因は諸説あり、ミトコンドリア遺伝子変異蓄積説もその一つである。

脊索動物門ミサキマメイタボヤの加齢は、哺乳類とよく似た構造的機能的劣化を伴っている。しかし、ホヤが出芽をすると、上記の劣化事象は、調べた限りすべてリセットされていた。即ち、出芽ホヤ体細胞の加齢は、ミトコンドリアの遺伝子機能を含めて、可逆的に進行する。

ミサキマメイタボヤの TC14 は分泌性タンパクで、4 つの isoforms の存在が知られている。このうち TC14-3 は、ポリコムグループ Eed 誘導によるヒストンメチル化を介して、cytostatic factor として機能する。TC14-3 の発現は出芽特異的である。加齢個体に TC14-3 リコンビナントタンパクを与えると、ミトコンドリア呼吸鎖遺伝子群が誘導される。この結果は、ミトコンドリア遺伝子機能が、TC14-3 の発現量と正の相関をもつことを示している。しかしながら、ヒストンメチル化因子である TC14-3 が、如何にしてヒストンを持たないミトコンドリアゲノムの遺伝子発現を調節しているのか、全く不明であった。

2. 研究の目的

ミサキマメイタボヤの 2 つの核遺伝子 ‘ミトコンドリア転写因子 *PmTFAM*’ と ‘ミトコンドリア機能維持因子 *PmPHN2*’、ミトコンドリア呼吸鎖遺伝子群 (MRC) からは ‘シトクローム c オキシダーゼサブユニット 1 *PmCOX1*’ に焦点を絞る。第 1 に、加齢と出芽に伴うそれらの遺伝子の発現変化を調べる。第 2 に、核遺伝子のノックインとノックダウンが、*PmCOX1* の発現にどのような影響を与えるかを明らかにする。第 3 に、*PmTFAM* と *PmPHN2* のコアプロモーター領域のヒストン修飾を調べる。第 4 に、TC14-3 によるヒストン修飾が、核遺伝子と *PmCOX1* の発現にどのような影響を与えるかを調べる。最後に、遺伝子発現の変化が、ミトコンドリアの膜電位機能に影響を与えるか否かを調べる。本研究により、加齢と出芽に伴うミトコンドリアの可逆的機能変化が、*PmTFAM* や *PmPHN2* などの核遺伝子により調節されていること、それら核遺伝子の発現はヒストン修飾により調節されていることが明らかになる。また、本研究は、ヒストン修飾と *PmTFAM* や *PmPHN2* の間に第 3 の因子が介在している可能性を示唆する。

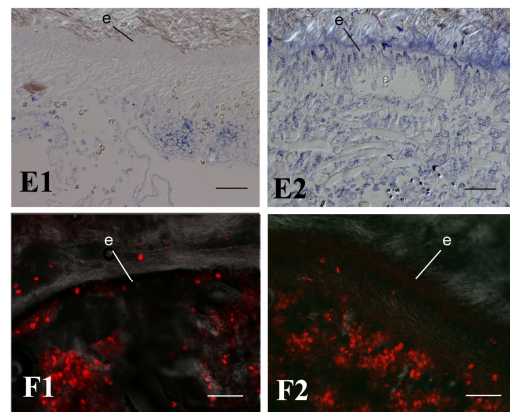
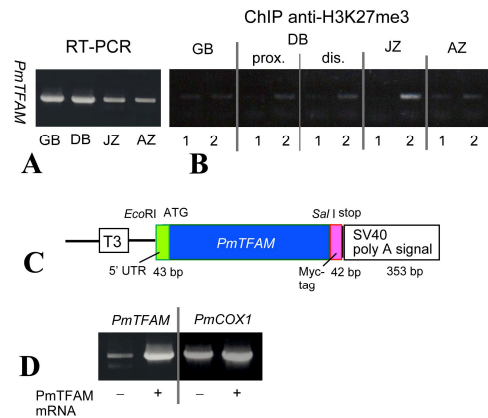


図 1 *PmTFAM* のヒストン修飾、遺伝子発現とミトコンドリア遺伝子機能への影響 (詳細は Kawamura et al., Mech Ageing Dev 2015; 145: 1-12 を参照)

3. 研究の方法

- (1) In situ hybridization (ISH) と RT-PCR 法を用いて、*PmTFAM* と *PmPHN2* の発現解析を行った。
- (2) 核遺伝子と *PmCOX1* の関係を調べるため、核遺伝子 mRNA と siRNA を作製した。pCMV に組み込んだ cDNA から、T3 プロモーターを用いて mRNA を合成した。siRNA は受託合成した。これらの産物をリポフェクション法もしくはエレクトロポレーション法により組織に導入した。*PmCOX1* の発現を ISH と RT-PCR で調べた。
- (3) クロマチン免疫沈降 (ChIP)・クロスリンク法を用いて、加齢と出芽における *PmTFAM* と *PmPHN2* のヒストンメチル化を検出した。
- (4) TC14-3 が *PmTFAM*、*PmPHN2*、*PmCOX1* を誘導するかを RT-PCR 法で調べた。ChIP 法を用いて、TC14-3 がヒストンメチル化を誘導するか否か、またヒストンメチル化阻害剤 (GSK343) が TC の効果を解除できるかを調べた。
- (5) ミトコンドリア膜電位を可視化する蛍光色素 MitoTracker を用いて、加齢と出芽、

TC14-3 処理の有無、PmTFAM mRNA 導入の有無がミトコンドリア機能を活性化するか否かを共焦点顕微鏡を用いて調べた。

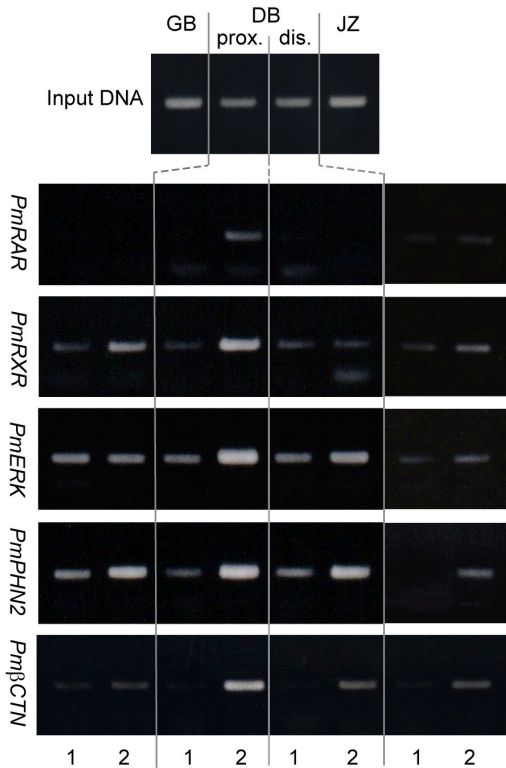


図2 PmPHN2 と分化転換関連遺伝子群のヒストン H3K9 アセチル化(詳細は Kawamura et al., Dev Dyn 2015; 244: 10-20 を参照)

4. 研究成果

PmTFAM は、加齢によって発現量が低下し、出芽に伴い発現が増強した(図 1)。*PmPHN2* はハウスキーピング遺伝子で、その発現量は著しく高かった。芽体の分化転換組織ではむしろ発現量が増加したが、加齢に伴って減少した。*PmCOX1* は、加齢に伴い発現低下することが既に分かっている。3つの遺伝子はすべて、表皮において著しく発現低下した。

RNAi の手法で *PmTFAM* をノックダウンすると、*PmCOX1* の発現が低下した。他方、*PmTFAM* mRNA を細胞に導入すると、*PmCOX1* の発現が増強した(図 1)。*PmPHN2* mRNA を組織に導入すると、MitoTracker シグナルが増強した。これらの結果は、*PmTFAM* と *PmCOX1* の遺伝子発現に正の相関のあること、加齢に伴うミトコンドリアの機能低下は *PmTFAM* と *PmPHN2* が発現低下することに主たる原因のあることを示している。

ヒストン修飾が *PmTFAM* と *PmPHN2* の発現を調節しているか否かを ChIP 法で調べた。*PmTFAM* と *PmPHN2* は、ともにコアプロモーター領域のヒストン H3K27 メチル化

に変化はなかった(図 1)。他方、*PmPHN2* は分化転換組織でヒストン H9 アセチル化を強く受けていた(図 2)。レチノイン酸は、ヒストンアセチル化酵素 *PmGCN5* を介して、*PmPHN2* や分化転換関連遺伝子のヒストン H9 アセチル化を促進した。

出芽特異的 cytostatic factor TC14-3 は、*PmTFAM*、*PmPHN2* および *PmCOX1* の発現を上昇させた。TC14-3 の効果は、ヒストンメチル化阻害剤 GSK343 や polycomb グループ Eed を RNAi するとキャンセルされた(図 3)。これらの結果は、*PmTFAM* と *PmPHN2* がヒストンメチル化を介してミトコンドリアの遺伝子機能を調節していることを強く示唆した。他方で、TC14-3 は、*PmTFAM* と *PmPHN2* のヒストンメチル化に影響を与えなかった。TC14-3 は、分化転換遺伝子群のヒストンメチル化を著しく促進したので、上記の結果は実験操作の誤りによるとは考えられない。この結果は、TC14-3 と *PmTFAM*・*PmPHN2* の間にヒストンメチル化を受ける第3の遺伝子が存在する可能性を示唆している。

最後に、加齢 TC14-3 *PmTFAM* がミトコンドリアの呼吸機能に影響を与えるか否かを、蛍光色素 Mitotracker の取り込みによって調べた。1. 加齢に伴って、表皮の蛍光は著しく低下した。2. *PmTFAM* mRNA は、Mitotracker による蛍光強度を上昇させた(図 1)。3. TC14-3 は、Mitotracker による蛍光強度を上昇させた(図 3)。これらの結果は、ホヤ加齢がミトコンドリア膜電位の低下を伴っていること、膜電位低下は出芽や TC14-3 あるいは *PmTFAM* の処理で可逆的に回復できることを明瞭に示した。

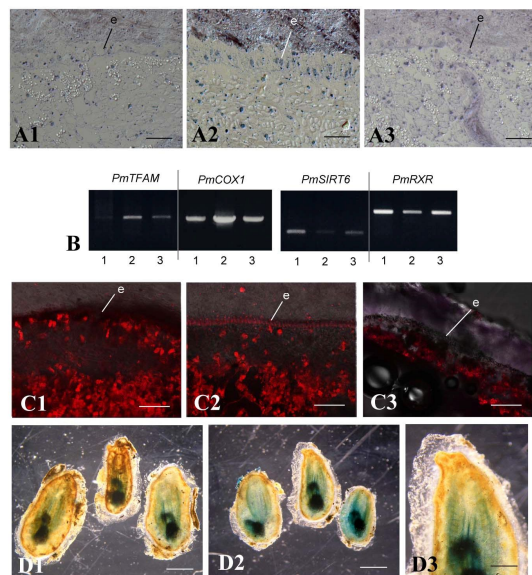


図3 ミトコンドリア活性化に対する TC14-3 とヒストンメチル化阻害剤 GSK343 の効果(詳細は Kawamura et al., Mech Ageing Dev 2015; 145: 1-12 を参照)

以上の結果より、*PmTFAM* は MRC の発現を調節する主要な転写因子の一つであること、*PmPHN2* はミトコンドリアの呼吸機能を増強する因子であること、TC14-3 は *PmTFAM* と *PmPHN2* を介して MRC の遺伝子発現と呼吸機能を正に調節していることを示した。また、ヒストン修飾は MRC の発現調節に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

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 2 件)

Kawamura K, Sekida S, Sunanaga T. Histone methylation codes involved in stemness, multipotency, and senescence in budding tunicates. *Mech. Ageing Dev.* 査読有, 2015, 145: 1-12. doi: 10.1016/j.mad.2014.12.001.

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

〔学会発表〕(計 3 件)

川村和夫、砂長毅. ホヤの出芽・再生・加齢におけるヒストンコード. 日本動物学会第 83 回大会, 仙台, 東北大学, 2014 年 9 月 13 日

砂長毅、大月恵、黒田沙希、川村和夫. 群体ホヤの生殖腺形成に関わる遺伝子の単離. 日本動物学会第 82 回大会, 岡山, 岡山大学, 2013 年 9 月 26 日

Sunanaga T, Kuroda S, Otsuki M, Kawamura K. Screening and identification of differentially expressed genes in gonadal tissues in colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. International Tunicate Meeting at Naples, Italy, June 21, 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村 和夫 (Kawamura Kaz)

高知大学・教育研究部自然科学系・教授

研究者番号：30136361

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：