

研究テーマ**栄養制限時の老化制御におけるコンデンシンの役割****1. はじめに 緒言 目的 背景 序論**

本研究では、老化や寿命に関連した、クロマチン構造と機能制御機構の解析を、コンデンシンを中心に行うことを目標とした。当初の研究内容としては、A. コンデンシンによる核小体rDNAの構造とRNAポリメラーゼ I (Pol I) 系による転写制御機構と、B. 核質における、RNAポリメラーゼ II (Pol II) 系による一般のmRNA転写制御機構を解析し、栄養制限による寿命延長・老化遅延のメカニズムの研究分野に新たな視点を与えることであった。

しかしながら、1年間の研究期間で寿命や老化のメカニズムに迫ることは困難であるため、1. コンデンシンによる核小体クロマチン構造と転写制御、2. コンデンシンの染色体局在のメカニズム、に焦点を絞り解析を進めた。

2. 方法細胞培養

HeLa S3及び293細胞は、10% 牛胎児血清(Fetal bovine serum; FBS)、100 U/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシンを添加したDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)培地で、5% CO₂、37°Cの条件下で培養した。M期同調は、nocodazoleを最終濃度0.04 µg/mlもしくはTN-16を100 ng/mlで添加し、4時間後にM期細胞を回収した。

Stealth RNAiによるノックダウン

HeLa S3およびまたは293細胞を6ウェルプレートで30-50%コンフルエントになるように培養し、Stealth RNA (Invitrogen)をトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後の細胞をノックダウン細胞として使用した。ウエスタンブロッティングにより、ノックダウンの効率が90%以上であることを確認した。

クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

細胞培地中にformaldehydeを最終濃度1%になるように添加し、37°Cで10分間固定した。PBSで洗浄して回収した細胞を、SDSを含んだバッファー(1% SDS, 50 mM Tris [pH 8.1], 10 mM EDTA)に懸濁し超音波破碎を行った。さらに超遠心しその上清に、抗体と平衡化したProtein A sepharoseを加えてオーバーナイトでインキュベートした。さらに洗浄後ビーズに結合したDNAを回収したDNAをReal-Time PCRにより解析した。

3. 結果 研究成果**3-1. コンデンシンによる核小体クロマチン構造と転写制御**

コンデンシンは、二つのSMC (Structural Maintenance of chromosomes) ATPase ヘテロ二量体と、三つの non-SMC サブユニットから構成されるタンパク質複合体で、高等真核生物にはコンデンシン I と II の二つのアイソフォームが存在する。コンデンシンは DNA に正のコイルを導入する活性があ

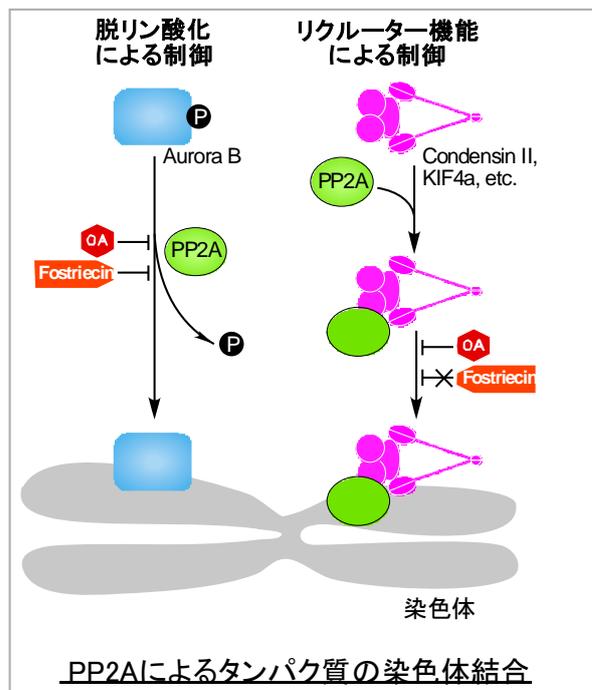
るので、我々はコンデンシンがクロマチンの構造の変換を介して遺伝子発現を制御し、老化や寿命などに関与するとの仮説に基づき解析を始めた。

まず、コンデンシンの細胞内の局在を解析したところ、二つのアイソフォームともに核小体に高濃度に存在した。また、ChIP アッセイからコンデンシンは核小体リボソーム DNA (rDNA) に直接結合することがわかった。そこで、コンデンシンをノックダウンして、rDNA の構造と遺伝子発現を解析したところ、ノックダウンにより rRNA の転写レベルが減少し、ヒストン H3 の K9 メチル化、DNA メチル化が低下し、ヒストンのアセチル化が上昇した。以上の結果から、コンデンシンは核小体 rDNA の構造をタイトにして遺伝子発現を抑制することがわかった。現在、コンデンシンの rDNA 結合のメカニズムと、細胞の機能における生理的役割を解析している。

3-2. PP2A によるコンデンシンの染色体局在制御

我々は、コンデンシンの M 期染色体結合の分子機構の解析を行った。ツメガエル卵抽出液を用いた染色体再構築系に、M 期の主要なホスファターゼである PP1, PP2A の阻害剤であるオカダ酸の添加したところ、コンデンシン II が染色体から脱落し、染色体がジグザグで異常な構造になった。一方、コンデンシン I の染色体結合にはオカダ酸添加は影響しなかった。さらに特異的な阻害剤を用いた解析、及び卵抽出液からの PP2A 免疫除去・add back の実験から、PP2A がコンデンシン II の染色体局在に関与していることがわかった。興味深いことに、ホスファターゼ活性を持たない変異体の PP2A もコンデンシン II の染色体結合を相補することができることから、この PP2A 依存的なコンデンシン II の染色体局在には、PP2A のホスファターゼ活性に依存しないことがわかった。また、阻害剤を用いて PP2A の染色体結合を阻害した際に、コンデンシン II の局在も阻害されることから、PP2A がコンデンシン II の染色体へのリクルーターとして機能することが示唆された。以上の結果から、PP2A には以前から知られている脱リン酸化酵素としての Catalytic function の他に、タンパク質をも染色体に運び結合させる脱リン酸化非依存的なリクルーターとして機能 (non-Catalytic function) を持つことが明らかになった。

さらに、PP2A がリクルーターとしてコンデンシン II 以外のタンパク質の染色体結合に関与するかを調べるために、オカダ酸添加・非添加で染色体画分のタンパク質を比較し、変化のあったタンパク質の同定、解析を行った。その結果、いくつかの候補タンパク質を同定した。以上の結果から、PP2A がコンデンシン II を含むいくつかの染色体タンパク質のリクルーターとして機能し、染色体構造を制御することが示された (右図)。



4. 考察 まとめ

本研究から、当初の目標であるコンデンシンによる栄養制限時の老化制御メカニズムを解明することはできなかった。しかしながら、コンデンシンのクロマチンへの結合メカニズムを解析するにあたり、ホスファターゼ

PP2Aの新たな機能を発見することができた。すなわち、従来Ser/ThRの脱リン酸化酵素と考えられてきたPP2Aが、コンデンシンIIを染色体へ結合させるリクルーターとしての機能を持つことを発見した。さらに、PP2AがコンデンシンII以外にもKIF4aなどの染色体結合にも関わることから、PP2Aがリクルーターとしての機能に普遍性があることが示唆された。

今後は、PP2Aによるコンデンシンをはじめとしたクロマチン結合タンパク質の局在制御、クロマチン構造変換、遺伝子発現制御、さらにそれに伴う老化、癌化といった生命現象との関連に注目し解析を続けたい。

5. 発表論文、参考文献

Takemoto A, Maeshima K, Ikehara T, Yamaguchi K, Murayama A, Imamura S, Imamoto N, Yokoyama S, Hirano T, Watanabe Y, Hanaoka F, Yanagisawa J, & **Kimura K.**

The chromosomal association of condensin II is regulated by a noncatalytic function of PP2A.

Nature Struct Mol Biol. (2009) 16:1302-1308