

研究題目 細胞老化を誘導する新規ポリコム群遺伝子変異に関する基礎研究

研究組織

研究代表者：磯野協一（和歌山県立医科大学動物実験施設）

共同研究者：片桐豊雅（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

がん抑制遺伝子 *Ink4a-Arf* の発現は細胞老化と密接にリンクしており、現在最も信頼性の高い細胞老化マーカーとなっている。*Ink4a-Arf* 遺伝子はクロマチン制御因子であるポリコム群複合体によって転写制御されているが、老化シグナルはその抑制を解除する。しかしながら、その解除機構は明らかとなっていない。本研究では、老化誘導直近に起こる *Ink4a-Arf* 活性化とポリコム群複合体の動態の関係性について解析することで、老化初動の分子基盤に迫る契機としたい。

[1-2]研究の方法・経過

材料としてはマウス胎仔性繊維芽細胞 (MEF) を利用する。胎仔から MEF を樹立し、通常培養する。酸化ストレス・複製ストレス下にある培養環境は MEF の老化 (増殖能低下) をもたらす。この増殖能低下の度合いは経時的あるいは複製依存的に活性化する *Ink4a-Arf* 発現レベルに比例する。これはポリコム群複合体による *Ink4a-Arf* 抑制が和らいでいることを示唆している。“なぜ和らぐのか？”その仕組みの解明に向けて、各種ポリコム群遺伝子変異マウスから樹立した MEF を時系列に沿って RNA 発現解析する。加えて、*Ink4a-Arf* 活性化に関わる候補因子のノックダウン細胞も材料とした。またポリコム群複合体は *Ink4a-Arf* のみならず多くの分化関連遺伝子も抑制していることから、それら発現動向も同時に評価する必要がある。したがって、RNA 発現解析は次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を依頼した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

野生型および4種類のポリコム群遺伝子変異型 MEF の樹立翌日と培養4日後で計10検体。加えて、野生型 MEF (x2) および2種類の変異型 MEF (各 x2) へのノックダウン処理とそのコントロールで計12検体。以上、合計22検体の RNA ライブラリーを作製した。現在、それら検体の品質チェックを終え、シーケンシング中である。追加募集であることと全ての系統を littermate で揃える必要性を求めたことからサンプル調製が予定より遅れこの2月となってしまった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

老化初期における *Ink4a-Arf* 活性化に各変異がどの程度影響しているかを示唆できる。候補とした *Ink4a-Arf* 活性化因子の貢献および変異との関わりを示唆できる。さらに全遺伝子およびポリコム群標的遺伝子の発現との対比によって細胞老化に伴う *Ink4a-Arf* 発現制御の選択性を提示あるいは考察できると考える。今後、*Ink4a-Arf* の発現変化とポリコム群および候補活性化因子の局在変化との関連性を調査するために ChIP-seq をおこなう。これにより *Ink4a-Arf* 発現を介した細胞老化の初期応答の分子基盤に迫りたい。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし。

[3-2]学会発表

なし。来年度予定。

[3-3]成果資料等
なし。

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

MEF はヘテロの細胞集団であることから現在の戦略からは全体の傾向を提示することができるが、個々の細胞の老化推移や *Ink4a-Arf* 発現を知ることはできない。場合によっては、1細胞レベルの解析が必要になるかもしれない。