

## 研究題目 新規ポリコム遺伝子変異による早期細胞老化に関する研究

### 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 *p16Ink4a* 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。*p16Ink4a* 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、その分子機構は依然と議論の余地を残している。本研究では、ポリコム群 PHC2 の点変異マウスを解析することで、老化初動で起こる *p16Ink4a* 遺伝子の選択的脱抑制という仮説を証明するためにその分子機構に迫りたい。

#### [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 *p16Ink4a* 発現レベルに比例する。しかしこれらの事象は MEF 樹立後複数回の継代培養からの結果であることから、*p16Ink4a* 脱抑制の始まりについては不明である。我々が作製した PHC2 点変異型 (EK) MEF では MEF 樹立 4 日目で野生型比べ著しい *p16Ink4a* 脱抑制が起こった (RT-qPCR 解析)。しかしながら、他のポリコム群標的遺伝子 (Arf、Pitx2、Gata4 など) の発現変化に違いは見られなかった。この結果は、*p16Ink4a* の選択的脱抑制を示唆している。これをゲノムワイドに検証するために貴大学共同利用助成 (2019 年度) にて RNA-sequencing を実施した。その結果は、ポリコム群標的遺伝子全体 (数百遺伝子)

の発現変化は正常であることを示し、*p16Ink4a* 選択的脱抑制の可能性を示唆した (図 1)。今回の共同利用助成では、ChIP-sequencing により我々の仮説を追究する。材料として、野生型および EK 型 MEF の樹立培養後 1 日目と 4 日目をを用い、目的分子は PHC2 に加え、その結合パートナーである RING1B とする。この結果は貴重な情報となるはずである。

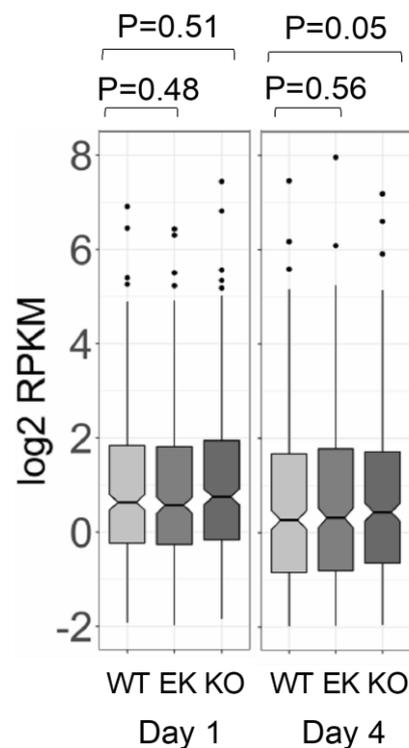


図1 ポリコム群標的遺伝子の発現

### 【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 EK 型 MEF の 1 日目と 4 日目培養細胞に対して PHC2 抗体と RING1B 抗体（ともに自作）で ChIP をおこなった。別の独立した MEF でバイオリジカルリプライトも追加した。以上の合計 16 検体を次世代シーケンサーで配列決定した。その結果、p16Ink4a 遺伝子座を含むポリコーン群標的遺伝子への RING1B および PHC2 の局在は野生型と EK 型とで大きな違いは見られなかった（図 2-3）。したがって、EK 型 MEF 培養 4 日目で起こる p16Ink4a の脱抑制は本解析で見えてくるポリコーン群の局在変化で説明つくものではなかった。1 つの可能性として、EK 変異型では何からの変化により p16Ink4a 活性化因子のアクセシビリティが高まっていることが考えられる。その調査のためは、Chromatin Conformation capture 法や p16Ink4a 転写活性因子について解析を進める必要があると思われる。

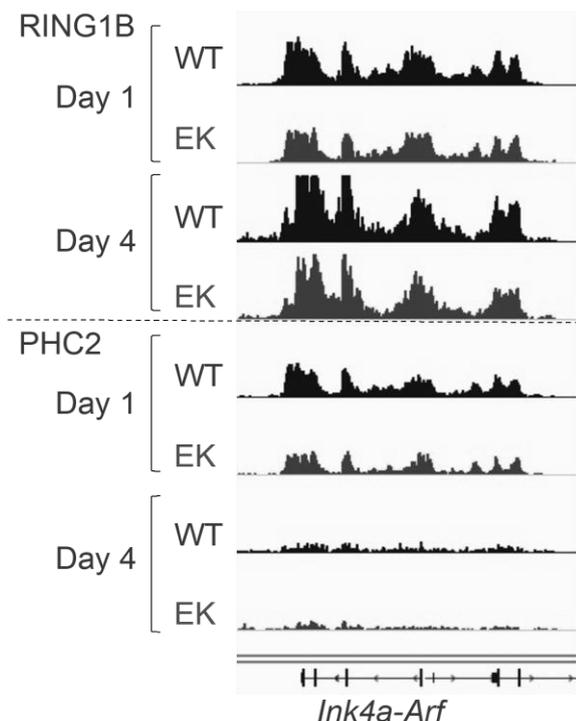


図2 *Ink4a-Arf* 領域でのポリコーン群局在

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

RNA-sequencing および ChIP-sequencing 解析は、申請者の考えの通りに、細胞老化開始でおこる p16Ink4a 発現の選択的解除に PHC2 が担っていることを示唆した。さらに、培養 1 日目と 4 日目の比較において、RING1B レベルは変化がないのに対して PHC2 レベルは 4 日目で著しく低下したことは非常に興味深い結果であった。この現象もまた老化初動に重要な役割を果たしている可能性がある。以上、本実験系は老

化開始における分子基盤の調査に適していると考えられる。本実験系におけるポリコーン群の役割を解明することで、医学的側面と結びついた細胞老化の促進や抵抗をより深く理解できると期待している。

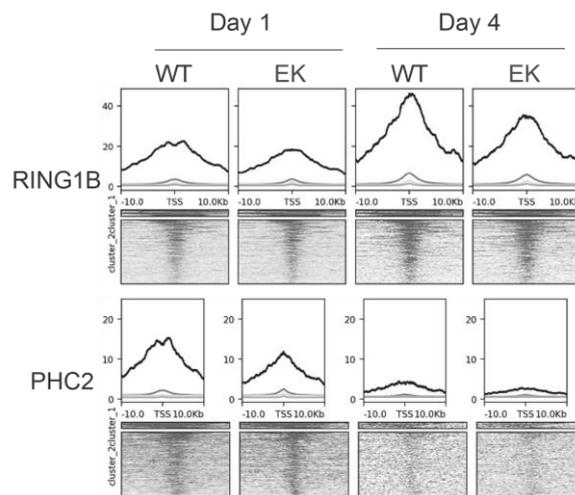


図3 ポリコーン群標的遺伝子の転写開始点付近における局在

### 【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 p16Ink4a 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。