

研究題目 ヒト老化細胞に形成される 3D ゲノム構造とその形成機構の解明

研究組織

研究代表者：野間 健一（北海道大学遺伝子病制御研究所）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：太田 信哉（北海道大学遺伝子病制御研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

細胞老化は、テロメア短小化、DNA 損傷、がん遺伝子(発がん性 Ras)の過剰発現や、がん化学療法などによる様々な細胞ストレスによって引き起こされる非常に安定した細胞周期停止状態として定義される。この細胞老化現象は、細胞の異常な増殖を防ぐことを通じて、極めて重要ながん抑制メカニズムとして機能している。従って、細胞老化に主要な役割を担う p53 や Rb などコードする遺伝子の多くは、がん抑制遺伝子として認識されている。いったん細胞老化が誘導されると、p53 標的遺伝子や老化関連分泌表現型 (Senescence-Associated Secretory Phenotype; SASP) 因子をコードする遺伝子 (SASP 遺伝子) などのゲノム上に分布する多くの遺伝子の転写が活性化される。これらの細胞老化に関与する遺伝子は、総称して老化遺伝子と呼ばれる。ゲノム広範に分布する老化遺伝子の活性化に加えて、老化細胞では、ゲノム上に散在するヘテロクマチン領域の凝集やセントロメア周辺のサテライト DNA 領域の膨張など、ゲノムの 3 次元構造 (3D ゲノム構造) の再編成が起こることが知られている。しかし現時点では、老化細胞に形成される 3D ゲノム構造の詳細やその形成機構、および老化細胞に特異的なゲノム構造と老化遺伝子活性化の関連性は、殆ど理解されていない。

申請者は、2007 年の独立以来、独自のゲノミクス法、または他のグループが開発した手法を改良した方法を用いて 3D ゲノム構造を解析してきた (Tanizawa et al. *Nucleic Acids Res* 2010; Kim et al. *Nature Genetics* 2016; Tanizawa et al. *Nature Struct & Mol Biol*

2017)。その 10 年以上にわたる研究を通して、大小サイズの異なるさまざまクロマチンドメイン構造体が多重構造を形成しており、染色体動態、転写制御、DNA 修復などの生命現象に関与していることを明らかにしてきた (Tanaka et al. *Molecular Cell* 2012; Iwasaki et al. *Molecular Cell* 2015)。加えて最近では、分裂期の染色体凝縮に必須であるコンデンシンによる 3D ゲノム構造の形成と遺伝子の転写制御に焦点を当てて研究を進めており、本研究では、その分子機構の解明に取り組んだ。

[1-2]研究の方法・経過

これまで細胞老化研究で実験材料として使用されてきているヒト IMR90 細胞は、老化する細胞故、寿命が限られており、今日では枯渇してきている。そこで、本細胞に安定して発現するヒトテロメラーゼ (hTERT) をコードする遺伝子を導入し、さらにこの細胞の低酸素状態の培養系を構築した。これにより、その寿命を飛躍的に延長させた IMR-90T 細胞の構築とその培養に成功した。さらにこの細胞に発現誘導可能な発がん性 Ras (H-RasV12) を導入し、薬剤の添加で自在に OIS の誘導を可能にした細胞 IMR-90TR を作成した。本細胞は、薬剤による OIS 誘導後 2 日で、老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼの非常に強い活性が検出され、同時に核内に細胞老化特異的ヘテロクマチン構造 (senescence-associated heterochromatic foci: SAHF) も観察された。

この IMR-90TR を用いて、OIS 誘導前後の細胞核を精製し、画分に含まれるタンパク質を徳島大学先端酵素学研究所に設置の Orbitrap 型質量分析装置による定量を試みた。実際には、安定同位体を用いた Stable Isotope Labeling by

Amino acids in Cell culture (SILAC)技術を用いることで、OISの誘導前とOIS誘導後8日目の老化細胞の核画分に含まれるタンパク質を相対的に比較定量した。また、断片化ペプチドは強陽イオン交換固相SCXを用いて、複数に分画した後にnano LCによりそれぞれをさらに分離し、質量分析を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

質量分析の結果、OIS誘導前後のそれぞれの細胞核画分で、2777種類のタンパク質の同定と1501種類のタンパク質の定量に成功した。また、SCXによる分画を行わないで質量分析を実施したところ、定量タンパク質は754種類であったことから、細胞核の同定と定量にはSCXによる分画が効果的であることがわかった。これは、ヒストンなどのDNA結合タンパク質は、リジンやアルギニンを多く持つため正電荷に帯電しているものが多いことが理由の一つにあると考えられる。

OISの誘導後の核内では、これまでに報告がある複数の老化に関連した転写因子が、非常に増加していると同時に、老化細胞特異的な3Dゲノム構造の形成に必須であるとされているHigh mobility group protein 1, 2 (HMGA1, 2)なども同様に顕著に増加していることが実際に観察できた。これらの先行研究の結果の再現性の検証により、その信頼性を確認できた。

興味深いことに、複数あるヒストンタンパク質のアイソザイムについて、老化誘導前後で全く変化しないものと、著しく増加あるいは減少するものと、3つのカテゴリーに分けられた。この結果は、特定のヒストンに関して、細胞老化の過程で、ゲノム上で大規模な置換が起こっている可能性を示唆している

さらに、著しい増減を示すタンパク質には、未だ老化との関連性が十分に示されていないタンパク質も存在した。これらのタンパク質は、実際に細胞老化の核内でどのような役割を担っているかを検証する研究を今後進めていく。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究は、ゲノミクスとプロテオミクスという両方の学術分野の融合を必要とするため、国内外においても例を見ない独創的なものである。また、3Dゲノムは、生物学の比較的新しい分野であるが、国内のこの分野における研究は残念ながら国際的に遅れをとっているのが実

状である。本年度以降は、3Dゲノム分野とプロテオミクスを融合させた新規分野の確立し、この次世代の研究分野で先駆的な役割を担い、我が国の科学技術の進展へ貢献を目指す。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Sakuno T, Tashiro S, Tanizawa T, Iwasaki O, Ding DQ, Haraguchi T, Noma K*, Hiraoka Y*. Rec8 cohesin-mediated loop-axis chromatin architecture is required for meiotic recombination. *Nucleic Acids Research*. 2022 March 25; On line (<https://doi.org/10.1093/nar/gkac183>)

*Co-correspondence

[3-2]学会発表

ZNF518によるCENP-B依存的なペリセントロメアヘテロクロマチン化機構
第93回日本遺伝学会年会、東京・2021年9月

[3-3]成果資料等

ZNF518によるCENP-B依存的なペリセントロメアヘテロクロマチン化メカニズム
北海道大学部局横断シンポジウム、札幌・2021年9月

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本共同利用研究により、細胞老化前後でタンパク質組成変化を定量的に測定することが可能となった。今後は、コンデンシン等のゲノム構造の形成に重要な因子の非存在下では、老化によりどのようなタンパク質組成変化が起こるのかを測定し、細胞老化に伴う3Dゲノム構造の形成の分子機構について、その全容解明を目指す。