

## 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）

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 などを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手法を用いて 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な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

質量分析においては、実験材料の均質性が最も重要であるため、細胞老化の一つである癌遺伝子誘発性細胞老化 (Oncogene-Induced Senescence, OIS) を効率よく誘導できる系を構築した。その第一段階として、胎児肺由来細胞 (IMR-90) にヒトテロメラーゼ遺伝子である hTERT を安定発現する細胞株 (IMR-90T) を確立した。次に、今度はがん遺伝子である活性型 RAF1 とエストロゲンレセプターの融合遺伝子を発現誘導できる細胞株 (IMR-90TR) を作成した。この細胞株を用いた実験で、タモキシフェンの添加により、おおよそ 72 時間で全ての細胞に老化関連酸性  $\beta$ -ガラクトシダーゼの非常に強い活性が検出され、同時に細胞老化特異的ヘテロクロマチン構造 (Senescence-Associated Heterochromatic Foci:SAHF) も観察された。

上記の IMR-90TR 細胞を用いて、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。その際、安定同位体を用いた Stable Isotope Labeling using Amino acids in Cell culture (SILAC) 技術を用いて、質量分析の弱点である定量性を補うプロテオミクスの手法を用いた。この手法では、異なる安定同位体の質量差分、同じタンパク質の質量分析のピーク位置がシフトして現れるため分子数レベルでの比較定量が可能となる。具体的には、老化細胞とコントロールとして増殖性細胞を質量数の異なる安定同位体のアミノ酸 (リジンとアルギニン) で標識し、両細胞を 1:1 で混合した。次いで、細胞核を生化学的に単離した後、質量分析を用いて細胞核に含まれる全タンパク質

を定量した。結果的に、老化細胞と増殖性細胞のプロテオーム変化を比較することができた。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、質量分析を行うことで、網羅的な解析を行なった。

## 【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

単離した核タンパク質の質量分析により、2746種類のタンパク質について、OISに伴う核内の変化を測定することができた。2746種類のタンパク質のうち、218種類のタンパク質は、OISに伴い核内で有意に増加し、246種類のタンパク質は有意に減少することを見出した(図A)。この結果から増加したタンパク質群を **Factors Significantly Increased with oncogene-induced Senescence (FSISs)** とし、減少したタンパク質群を **Factors Significantly Decreased with oncogene-induced Senescence (FSDSs)** とした。実際に、FSISsの一つFSIS1に特異的な抗体を用いてOIS誘導前後の細胞を免疫染色することで、FSIS1はOIS誘導後に強く核内への局在を示すことを確認できた(図B)。今後は、細胞老化に伴い、FSISsとFSDSsが核内のゲノム構造にどのように作用するのかを検証していきたい。

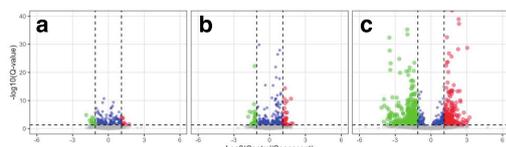


図. 細胞老化に伴う核タンパク質組成変化  
(A) OIS誘導後0(a), 2(b), 8(c)日後の2746タンパク質の変化

OISの誘導に伴い細胞核内で増加したFSISsを緑で、減少したFSISsを赤で示した。(B)細胞老化誘導前と誘導96時間後のFSIS1の局在を免疫染色により検証した。

[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

1. **Shinya Ohta**, Jun-Ichirou Ohzeki, Nobuko Sato, **Ken-Ichi Noma**, and Hiroshi Masumoto  
Formation of pericentromeric heterochromatin via ZNF518s that link satellite DNA to heterochromatin.  
BioRxiv  
doi.org/10.1101/2022.09.16.508097,  
2022年10月
2. Konstantinos Stamatiou, Aldona Chmielewska, **Shinya Ohta**, William Earnshaw, and Paola Vagnarelli  
CCDC86/Cyclon is a novel Ki-67 interacting protein important for cell division  
Journal of Cell Science, 136(2): jcs26039,  
2023年1月

[3-2]学会発表

1. クロマチン高次構造とその生物学的役割:酵母からヒト細胞老化まで  
**野間健一**  
日本人類遺伝学会・第67回大会、横浜・2022年12月16日
2. ZNF518を介したペリセントロメアへのヒストンメチル化酵素の誘導  
**太田信哉**  
第94回日本遺伝学会年会、札幌・2022年9月

[3-3]成果資料等

Formation of pericentromeric heterochromatin via ZNF518s that link satellite DNA to heterochromatin  
太田信哉  
第17回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム、金沢・2022年10月

## 【4】今後の課題等

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の定量的な測定が可能になった。今後は、より詳細に細胞老化の各段階におけるタンパク質の組成の変化を決定する。その結果から、経時変化を示すFSISsとFSDSsがゲノム構造の形成にどのように関与しているのか、特にコヒーシンやコンデンシンなどのゲノム構造形成に重要な役割を担う因子との関係性に着目し、細胞老化に伴う3Dゲノム構造の形成機構について、その全容解明を目指す。