

平成22年6月7日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20370079

研究課題名（和文） 細胞老化における核・クロマチン機能

研究課題名（英文） Studies on the structure and function of the nucleus in senescent cells

研究代表者

石川 冬木（ISHIKAWA FUYUKI）

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：30184493

研究成果の概要（和文）：

我々は、これまでに老化細胞では、ヒストン H1 が完全に消失することを明らかにしてきた。本研究では、老化細胞核の機能・構造に焦点をあてて、その分子機構の解析を試みた。その結果、1) 老化細胞では、おそらくユビキチン・プロテアソーム系によってヒストン H1 が消失すること、2) 炎症反応を惹起する NF- κ B 経路が活性化されて、特徴的な遺伝子発現をもたらすこと、3) 核膜構造と機能に異常があることを見いだした。これらの老化細胞特異的な分子機構を標的として老化・発がん過程を制御する方法が開発されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

We have previously reported that histone H1 disappears and HMGA proteins are increased in cellular senescent cells. In this study, we further examined the structure and function of the nucleus in senescent cells. We found that 1) histone H1 is likely degraded via the ubiquitin-proteasome pathway, 2) the NF- κ B pathway is involved in inducing the characteristic gene expression profiles in senescent cells, and 3) the nuclear membrane is structurally and biochemically dysfunctional. These results will provide a means to control the senescence phenotypes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
年度			
総計	10,400,000	3,120,000	13,520,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：テロメア、細胞老化、NF- κ B、ヘテロクロマチン、ヒストンH1、HMGA、lamin

1. 研究開始当初の背景

正常細胞は、細胞増殖のたびに、末端複製問題に従って染色体末端テロメアが短小化

する。テロメア長がある閾値まで短小化したとき、細胞はそれ以上のテロメア短小化を防ぐために、細胞分裂を非可逆的に停止する。

この状態は複製老化と呼ばれ、増殖停止以外にも、核や細胞質の拡大、遺伝子発現プロファイルの変化、senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal)活性の亢進など、特徴ある一連の表現型を示す。

正常細胞は、テロメア短小化以外にも、さまざまな刺激によって複製寿命とよく似た状態を示す。中でも、活性型がん遺伝子 Ras およびその下流にある Raf 遺伝子を構成的に発現させると、約 1 週間の短期間のうちに老化表現型が誘導され、細胞は非可逆的に増殖停止する。がん遺伝子の発現以外にも、非致死性の低容量の酸化ストレスなどによっても老化表現型は誘導され、これらは、まとめてストレス誘導性細胞老化と呼ばれ、ストレス誘導性細胞老化と複製老化をあわせて細胞老化と総称される。

生体内において、細胞老化は、個体老化の原因のひとつとなると同時に、重要ながん抑制機構としても機能する。

線維芽細胞や上皮細胞がそれらの果たすべき機能を遂行するためには、それぞれの組織・細胞種に特徴的な遺伝子発現が必要であるが、これらの細胞が細胞老化すると、機能発現に必要な遺伝子の発現が異常となり、細胞が果たすべき機能をなしえなくなる。このような細胞の数の増加は、組織の機能低下、ひいては、個体老化を招くと考えられる。

一方、正常細胞からがん細胞が誕生する過程は、複数のがん遺伝子の活性化とがん抑制遺伝子の失活が蓄積しておこるが、中でも、Ras や Raf がん遺伝子の活性化は、大腸がんや悪性黒色腫など多くのがんの比較的初期におこる。これらの活性型がん遺伝子が構成的に発現されることで、細胞老化が誘導されることは、正常細胞ががん化への第一歩を踏み出したときに、その細胞の増殖を非可逆的に抑制することで、それ以上のがん化過程を防ごうとするがん抑制機構の役割を果たしているものとして注目されている。

細胞老化が個体老化機構あるいはがん抑制機構の一つとして機能する場合、最も重要な点は、細胞老化が非可逆的であり、全ゲノム遺伝子の発現プロファイルを変えることである。このことから、老化細胞では、若い機能的な細胞と比較して、ゲノム DNA の存在様式に大きな変化があることが予想される。実際、老化細胞の核には、特徴的なヘテロクロマチン SAHF (senescence-associated heterochromatin focus) が出現することが Narita らによって報告された (Cell, 4:859, 2003)。我々は、SAHF 形成に、リンカーヒストン H1 の消失とリンカー結合蛋白質 HMGA の増加が重要であることを見いだした (J Cell Biol. 175: 869, 2006)。

2. 研究の目的

以上のように、老化細胞における核構造のダイナミックな変化は、細胞老化の表現型をもたらすための中心的な役割を果たしていると考えられる。本研究の目的は、老化細胞におけるリンカーヒストン H1 の消失と HMGA の増大というこれまでの知見を足がかりに、老化細胞核構造の変化の分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 老化細胞誘導系

正常ヒト線維芽細胞のひとつである WI-38 細胞に、レトロウイルスを用いて活性型 H-Ras を遺伝子導入して発現させた。あるいは、Raf がん遺伝子のキナーゼドメインとエストロジェン受容体(ER)のキメラ遺伝子 Raf-ER を構成的に発現している WI-38 細胞に、ER のリガンドであるタモキシフェンを培地に添加することにより Raf がん遺伝子の発現誘導をおこなった。これらの実験において、処理後、2~3 日で増殖速度が低下し、7 日で細胞老化表現型が完成した。

(2) 老化細胞の転写プロファイルの網羅的解析

活性化 H-Ras がん遺伝子の発現により誘導された WI-38 細胞と対照細胞より poly(A)+RNA を調製し、東大医科学研究所の中村祐輔教授との共同実験により、発現プロファイルのマイクロアレイ解析を行った。

(3) 前項と同じく調製された老化 WI-38 細胞と若い対照細胞より蛋白質を抽出し、質量分析によりプロテオーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 老化細胞におけるヒストン H1 の消失の分子機構

リンカーヒストン H1 は、真核生物にわたって保存された蛋白質であり、精子などの生殖細胞をのぞくと、これまでにヒストン H1 が消失した体細胞の例は知られていなかった。従って、ヒストン H1 の消失の分子機構を明らかにすることが重要である。老化細胞といえども、ヒストン H1 遺伝子の発現 (mRNA) は停止していなかったため、ヒストン H1 蛋白質が分解されることが考えられた。実際、プロテアソーム阻害剤である MG132 を培地に添加することにより、ヒストン H1 の消失を部分的に阻害することができたので、老化細胞におけるヒストン H1 の消失には、ユビキチン・プロテアソーム系が関与することが予想された。

(2) NF-κB 経路の関与

老化細胞の発現プロファイルを検索する過程で、IL6, IL1 などの炎症性サイトカイン

の遺伝子発現が亢進していることに気がついた。これらの遺伝子は、TNFなどの炎症刺激により NF- κ B 経路を活性化して発現誘導されていることが知られているので、NF- κ B 阻害剤を細胞老化誘導実験において培地中に添加したところ、老化表現型の発現が部分的に阻害されたことから、細胞老化誘導に NF- κ B 経路が関与していることが示唆された。

実際、老化細胞が炎症性サイトカインを特徴的に発現、分泌していることは、senescence-associated secretory pathway (SASP)として現在注目を集めており、本研究から、NF- κ B 経路を標的として細胞老化を制御する技術を開発する可能性が示唆された。

(3) 老化細胞の核膜異常

老化細胞の核蛋白質プロテオーム解析の結果から、対照細胞と比較して、老化細胞のラミンなどの核膜構成蛋白質の量が増加し、また局も変化することが明らかとなった。特に、正常は、核を均一な厚さで包んでいる核膜が、不均一な厚さを示し、特に核内部にまで折りたたまれている像が特徴的であった。核膜孔蛋白質にも量的および分布の異常が観察されたことから、老化細胞では、核輸送にも異常があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Mikawa, T., Kanoh, J., and Ishikawa, F. (2010). Fission yeast Vps1 and Atg8 contribute to oxidative stress resistance. *Genes Cells* 15, 229-242. (査読有)
2. Miyake, Y., Nakamura, M., Nabetani, A., Shimamura, S., Tamura, M., Yonehara, S., Saito, M., and Ishikawa, F. (2009). RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. *Mol Cell* 36, 193-206. (査読有)
3. Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., Ishikawa, F., Komurao, I. (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* 15, 1082-1087. (査読有)
4. Miyoshi, T., Kanoh, J., and Ishikawa, F. (2009). Fission yeast Ku protein is required for recovery from DNA replication stress. *Genes Cells* 14, 1091-1103. (査読有)

5. Kiriyama, M., Kobayashi, Y., Saito, M., Ishikawa, F., and Yonehara, S. (2009). Interaction of FLASH with arsenite resistance protein 2 is involved in cell cycle progression at S phase. *Mol Cell Biol* 29, 4729-4741. (査読有)
6. 谷村信行, 石川冬木 (2009). テロメアと幹細胞. *最新医学 (6月増刊号)* 64, 1308-1314. (査読無)
7. 石川冬木 (2009). 加齢のメカニズム: 老化は遺伝子に刷り込まれているのか. *画像診断* 29, 120-123
8. 齊藤基輝, 石川冬木 (2009). テロメアとゲノム安定性. *日本臨牀 (増刊)* 67, 107-112. (査読無)
9. Nabetani, A., and Ishikawa, F. (2009). Unusual telomeric DNAs in human telomerase-negative immortalized cells. *Mol Cell Biol* 29, 703-713. (査読有)
10. Shimamura, S., and Ishikawa, F. (2008). Interaction between DNMT1 and DNA replication reactions in the SV40 in vitro replication system. *Cancer Sci* 99, 1960-1966. (査読有)
11. 三好知一郎, 石川冬木 (2008). ヒトと分裂酵母で保存されたテロメアの最末端構造. *蛋白質・核酸・酵素* 53, 1850-1857. (査読無)
12. Satoh, D., Sato, D., Tsuyama, T., Saito, M., Ohkura, H., Rolls, M.M., Ishikawa, F., and Uemura, T. (2008). Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes. *Nat Cell Biol* 10, 1164-1171. (査読有)
13. 三好知一郎, 石川冬木 (2008). 分裂酵母 Pot1-Tpp1 による染色体末端保護とテロメア長制御. *実験医学* 26, 2601-2605. (査読無)
14. Miyoshi, T., Kanoh, J., Saito, M., and Ishikawa, F. (2008) Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length. *Science* 320, 1341-1344. (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

1. 石川冬木 「低容量ストレス反応」日本生化学会東北支部第 74 回例会・シンポジウム、2008 年 5 月 17 日 (岩手県盛岡市、アイーナいわて県民情報交流センター)
2. 石川冬木 「老化のメカニズム: 分子

- 生物学の立場から」 第 27 回東京 MRI 研究会、2008 年 7 月 5 日 (東京都、東京コンファレンスセンター・品川)
3. Fuyuki Ishikawa: Shelterin complex in fission yeast. *EMBO Conference 2008 "Telomeres and the DNA damage response"*. September 18, 2008. (Eurotel Victoria Villars, Villars-sur-Ollon, Switzerland)
 4. Fuyuki Ishikawa: Shelterin telomere complex. *67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association*. Oct 28, 2008. (Nagoya Congress Center, Nagoya)
 5. Fuyuki Ishikawa: Roles of shelterin complex in telomere maintenance. *BMB2008*. Dec 10, 2008. (Kobe Port Island, Kobe)
 6. 石川 冬木 「生物学的時間とスケール変換 (生物)」 数理研短期共同研究集会: RIMS 共同研究: 離散力学系の分子細胞生物学への応用数理、2009 年 1 月 6 日 (京都市、京都大学理学部)
 7. 石川 冬木 「有性生殖の対価としての染色体テロメア」 長浜バイオ大学バイオセミナー、2009 年 3 月 17 日 (長浜市、長浜バイオ大学)
 8. Fuyuki Ishikawa: Ctc1-Stn1-Ten1 complex. *CSHL meeting 'Telomere and Telomerase'*. Apr 29, 2009. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, U.S.A)
 9. 石川 冬木 「癌細胞がいかに悪性化するか」 岡山大学特別講義、2009 年 6 月 3 日 (岡山市、岡山大学)
 10. Fuyuki Ishikawa: A novel mammalian RPA-like complex, Ctc1-Stn1-Ten1, protects telomeres. *68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association*. Oct 2, 2009. (Pasifico Yokohama Convention Center, Yokohama)
 11. Yasuyuki Miyake, Mirai Nakamura, Akira Nabetani, Shoko Fujita, Shintaro Shimamura, Miki Tamura, Motoki Saito and Fuyuki Ishikawa: RPA-like Mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 Complex Binds to Single-Stranded DNA and Protects Telomeres Independently of the Pot1 Pathway. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology 'Telomere Biology and DNA Repair'*. Oct 10, 2009. (RACV Royal Pines Resort, Queensland, Australia)
 12. Fuyuki Ishikawa: Low-Dose Stress Responses. *The 5th International Fission Yeast meeting 'Pombe 2009'* Oct 29, 2009. (National Olympics Memorial Youth Center, Tokyo)
 13. Fuyuki Ishikawa: A Novel Rpa-Like Mammalian Stc1-Stn1-Ten1 Complex. *25th Radiation Biology Center International Symposium*. Nov 30, 2009. (Co-op Inn Kyoto, Kyoto)
 14. 石川 冬木 「分子生物学の過去、現在、未来」 モノクローナル抗体研究所創立 5 周年記念講演会、2009 年 12 月 12 日 (横浜市、神奈川歯科大学付属横浜研修センター)
 15. 石川 冬木 「低容量ストレス反応」 島根大学医学部セミナー、2010 年 1 月 29 日 (出雲市、島根大学医学部)
 16. Fuyuki Ishikawa: Telomere metabolism during the cell cycle revealed by analyzing single telomeres in human cells. *AACR Special Conference "The Role of Telomeres in Cancer Research"*. Mar 1, 2010. (The Worthington Renaissance Fort Worth Hotel, Fort Worth, Texas, U.S.A)
- 〔図書〕 (計 2 件)
1. 石川冬木 (2008). テロメア長制御と末端保護機能: shelterin 複合体. がんの分子標的治療. 鶴尾 隆 (編集) 南山堂
 2. 山崎晴丈、石川冬木 (2009). テロメアとテロメラーゼ. がん化学療法・分子標的治療 update. 西條長宏、西尾和人 (編集) 中外医学社
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 石川 冬木 (ISHIKAWA FUYUKI)
 京都大学・大学院生命科学研究所・教授
 研究者番号: 30184493
- (2) 研究分担者
 該当無し
- (3) 連携研究者
 該当無し