

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06061

研究課題名(和文)細胞老化に伴うミトコンドリア代謝変化の遺伝子発現制御における役割

研究課題名(英文) Role of mitochondrial metabolic changes in the regulation of gene expression during senescence

研究代表者

山内 翔太 (Yamauchi, Shota)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：00728941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスにより細胞周期が不可逆的に停止することを細胞老化という。もともと、培養細胞において発見された現象であるが、最近では、個体老化との関連が注目されている。細胞老化において中心的な役割を担うのが、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害因子p16INK4aである。応募者は、DNA損傷によるp16INK4aの発現誘導に関わる遺伝子を、網羅的に同定するために、ゲノムワイドsiRNAスクリーニングを行った。本研究では、このスクリーニングで同定されたBNIP3というタンパク質が、ミトコンドリアにおける脂肪酸酸化を促進することで、細胞老化を誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化は生体に備わるがん抑制機構のひとつとして古くから知られてきたが、近年、個体の老化や老化関連疾患との関わりが注目されている。しかしながら、細胞老化を誘導する基本メカニズムには、未だ不明な点が多く残されている。本研究では、ミトコンドリアで、エネルギー源の一つである脂肪酸が消費されることが、細胞老化誘導の鍵となっていることを見出した。この成果は、将来的にがんや老化関連疾患の治療法開発につながる基盤となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cellular senescence is the irreversible arrest of the cell cycle due to stress. Originally discovered in cultured cells, this phenomenon has recently attracted attention in relation to organismal aging. A cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor, p16INK4a, plays a central role in cellular senescence. We performed a genome-wide siRNA screen to identify genes involved in the induction of p16INK4a expression by DNA damage. We found that a protein identified in this screen, BNIP3, induces cellular senescence by promoting fatty acid oxidation in mitochondria.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞老化 ミトコンドリア 代謝 DNA損傷応答

### 1. 研究開始当初の背景

p16<sup>INK4a</sup> は、ヒトのがんで、最も高頻度に変異が見られるがん抑制遺伝子のひとつである(Sharpless NE and Sherr CJ, *Nat Rev Cancer*, 2015)。Ras などのがん遺伝子に変異により活性化した細胞では、ゲノム DNA に損傷が生じ、がん抑制遺伝子 p53 が活性化する。p53 は、CDK 阻害因子 p21<sup>CIP1</sup> の発現を誘導することで、細胞周期を一時的に停止する。この間に、細胞は、DNA 損傷の修復を試みるが、これがうまくいかず、DNA 損傷が一定期間持続すると、p16<sup>INK4a</sup> の発現が誘導される。p16<sup>INK4a</sup> は、CDK4/6 を阻害することで、細胞老化を引き起こし、発がんを未然に防ぐ。

このような p16<sup>INK4a</sup> のがん抑制遺伝子としての役割は、古くから知られているが、最近では、個体老化における役割も報告されてきている。個体内では、何らかのストレスにより p16<sup>INK4a</sup> を発現するようになった老化細胞が、加齢に伴い蓄積する (Burd CE et al, *Cell*, 2013)。細胞老化による幹細胞の枯渇は、組織修復能の低下につながる (van Deursen JM, *Nature*, 2014)。これに加え、個体内に蓄積した老化細胞は、IL-6 等の炎症性サイトカインを恒常的に分泌することで、様々な老化関連疾患の一因となる。例えば、p16<sup>INK4a</sup> を発現した老化細胞を、薬剤投与により死滅できるようにした遺伝子改変マウスにおいては、心臓や腎臓の加齢に伴う機能低下が緩和され、寿命が延伸する (Baker DJ et al, *Nature*, 2016)。また、p16<sup>INK4a</sup> をコードする *INK4/ARF* 領域は、心筋梗塞、脳卒中、糖尿病といった老化関連疾患のリスク要因となる一塩基多型が、最も集中するホットスポットである (Jeck WR et al, *Aging Cell*, 2012)。

p16<sup>INK4a</sup> の発現は、増殖能を有する正常細胞では、*INK4/ARF* 領域におけるヒストンメチル化により抑制されている (Martin N et al, *Trends Mol Med*, 2014)。この抑制がストレスに応じて解除され、p16<sup>INK4a</sup> の発現が誘導されるメカニズムは、ほとんどわかっていない。このため、個体内で p16<sup>INK4a</sup> の発現を誘導するストレスの実体も不明である。

### 2. 研究の目的

近年、p16<sup>INK4a</sup> を発現した老化細胞の蓄積が、個体老化の一因となることが明らかになってきた。しかしながら、p16<sup>INK4a</sup> の発現誘導を担うストレス応答シグナル伝達経路の全容は、未だ明らかになっていない。

細胞老化に伴い、ミトコンドリア ROS (活性酸素種) の産生や膜電位の低下といったミトコンドリア機能不全が起こることが知られている。最近、このようなミトコンドリア機能不全が、p16<sup>INK4a</sup> や炎症性サイトカインの発現誘導に必要であることが報告された (Correia-Melo C et al, *EMBO J*, 2016)。応募者は、DNA 損傷による p16<sup>INK4a</sup> の発現誘導に必要な遺伝子を網羅的に同定するために、ヒト初代培養細胞を用いたゲノムワイド siRNA スクリーニングを行った。細胞老化に必要な遺伝子を、ゲノムワイド siRNA スクリーニングにより探索した研究は、これまでに報告がない。本研究では、このスクリーニングで同定されたミトコンドリア関連遺伝子の機能を明らかにすることで、DNA 損傷とミトコンドリア機能不全をつなぐ新規のシグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

応募者は、BNIP3 が、DNA 損傷に応じて、ミトコンドリア ROS の産生、ミトコンド

リア膜電位の低下、p16<sup>INK4a</sup>の発現誘導を促進することを見出していた。また、BNIP3がDNA損傷応答キナーゼATMによりリン酸化されるという予備的実験結果を得ていた。

本研究では、BNIP3のリン酸化サイトを変異体の解析や質量分析法により同定した(Q Exactive; ThermoFisher Scientific)。同定されたリン酸化サイトに変異を加えたBNIP3と野生型のBNIP3を、BNIP3ノックダウン細胞に導入し、比較することで、p16<sup>INK4a</sup>の発現誘導におけるこのリン酸化サイトの役割を解析した。

BNIP3はBCL-2などのタンパク質と結合することで、ミトコンドリア機能不全を引き起こすと考えられているが、細胞老化における役割は報告されていない。本研究では、BNIP3と結合するタンパク質を質量分析法により網羅的に同定した。

#### 4. 研究成果

質量分析の結果、BNIP3のS70がリン酸化部位であることがわかった。S70のリン酸化は、独自に作成したリン酸化抗体によっても確認することができた。また、上述のような再発現実験により、S70がDNA損傷によるp16発現誘導に関与することがわかった。

BNIP3の結合タンパク質を質量分析法により網羅的に同定したところ、ATMがBNIP3結合タンパク質であることがわかり、BNIP3がATMの基質であることがさらに裏付けられた。また、BNIP3結合タンパク質にはMICOSと呼ばれる複合体の構成タンパク質が多く含まれることがわかった。MICOSはミトコンドリアの内膜に局在する複合体で、ミトコンドリア内膜と外膜の接触部位の形成と、クリステの形成というふたつの役割を担っている。電子顕微鏡を用いた解析により、細胞老化に伴いクリステの数が増加することがわかった。この増加はBNIP3のノックダウンにより抑制されることがわかった。

BNIP3が細胞老化に伴うミトコンドリア構造変化に関わることが明らかになったが、ミトコンドリアの機能においてどのような役割を果たすのかは不明であった。メタボローム解析の結果、BNIP3が細胞老化に伴う脂肪酸酸化の亢進に重要であることがわかった。脂肪酸酸化とは、細胞のエネルギー源である脂肪酸が分解されてアセチル CoA が産生される代謝過程である。したがって、本研究により、ミトコンドリアエネルギー代謝と細胞老化誘導の密接な関係が明らかになったといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内翔太
2. 発表標題 DNA損傷応答シグナルはミトコンドリア代謝のリモデリングにより細胞老化を誘導する
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内翔太 一條秀憲
2. 発表標題 細胞老化におけるミトコンドリア代謝リプログラミングの役割
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------