

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06971

研究課題名（和文）新規老化関連転写抑制因子ZBTB20の細胞周期への役割の解明

研究課題名（英文）The role of transcriptional repressor ZBTB20 on premature aging and energy metabolism

研究代表者

石井 恭正 (ISHII, Takamasa)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：20548680

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は老化メカニズムの解明を長期目標とし、老化関連遺伝子の探索・解析を行ってきた。無作為に遺伝子を破壊したジーントラップ短寿命モデルマウスをもちいて、明確な病態を示さず肥満を呈して短寿命となる原因遺伝子として16番染色体16qC1.1-3領域に位置するzbtb20遺伝子を特定した。当該遺伝子異常は、ヒトでは3番染色体欠失症候群や常染色体劣性遺伝子疾患プリムローズ症候群を発症し、早老症に酷似した病態を発症することが報告されていた。そこで本研究では、当該タンパク質の機能解析を実施し、当該遺伝子発現異常による肥満および短寿命のメカニズムに脂質代謝の同化作用の亢進が関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、プリムローズ症候群について、原因遺伝子がzbtb20であり、3番染色体欠失症候群に確認される早老症と同様の病態を呈することが報告された。これまで他の研究グループらによって、中枢神経の発生過程におけるZBTB20転写抑制因子の役割が徐々に明らかにされてきた一方、生体成熟後のZBTB20の役割は未だ不明であった。本研究によって、ZBTB20が生体成熟後にエネルギー代謝の同化と異化を制御し、特に脂質代謝を制御していることを示唆する成果を得た。本研究成果は、生体成熟後のエネルギー代謝を制御する新たな分子機構の一端を解明し、短寿命の原因となる肥満の新たな制御法を示唆する成果となった。

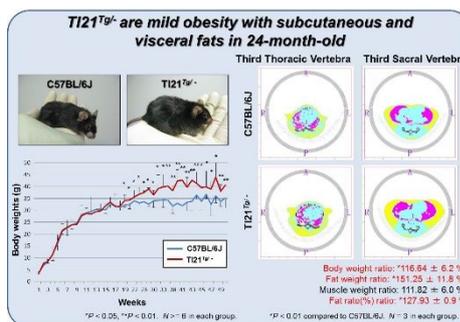
研究成果の概要（英文）： We have focused on the role of new age-related genes. The original new premature aging model mouse which has been established by our unique gene-trap technology (W02005123918 A1) has developed obesity and been short-lived with abnormal zbtb20 gene expression located in16qC1.1-3 region. It has been reported that the abnormal gene expression of zbtb20 which is located in 3q13.31 region develops primrose syndrome and 3q13 deletions and microdeletions syndrome in human. In this research, it has been clarified and suggested that the abnormal gene expression of zbtb20 develops obesity with the enhanced lipid metabolism resulting in short-lived.

研究分野：老年学

キーワード：転写因子 複製ストレス DNA損傷修復 代謝 クロマチン再構築

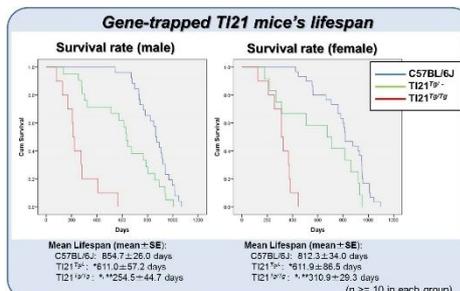
1. 研究開始当初の背景

我々は、新たな老化原因を解明する目的で、独自のジーントラップモデルマウス作製技術を開発し、C57BL/6J マウス系統をもちい短寿命モデル T121 マウス系統を構築した(特許:第 4811765 号, WO 2005123918 A1)。このうち、T121<sup>Tg</sup>/ヘテロマウスは、発生期・成熟期までは正常な表現型を呈し、壮年期以降に明確な病態を発現することなく、摂餌飲水量を変えずに肥満を呈し、短寿命となった(右上段・中段図)。さらに最近、このジーントラップの標的が、ZBTB20( zinc finger and BTB domain containing 20) 遺伝子座の 3'非翻訳領域(16qB4)の破壊による ZBTB20 遺伝子発現量の低下であることを明らかにしていた(右図)。

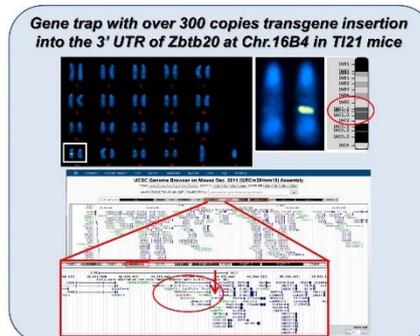


2. 研究の目的

ZBTB20 遺伝子は、ヒトの 3q13.31 欠失症候群で共通して欠損する遺伝子として報告されている(Hum Mutat, 34: 1415-1423, 2013)。さらに、2014 年には、ZBTB20 の C2H2-type zinc finger ドメインをコードする遺伝子変異がプリムローズ症候群の原因として報告された(Nature Genetics, 46: 815-817, 2014)。実際、我々が構築したジーントラップモデル T121<sup>Tg</sup>/ヘテロマウスおよび ZBTB20<sup>-/-</sup>ホモ欠損マウスは、これら症候群の病態と酷似した表現型を呈する。それらは、既述の遺伝性早老症のものと酷似しており、これら症候群の二次的原因も DNA 修復・複製障害であることが示唆された。



ZBTB20 遺伝子は、2002 年に新規 BTB/POZ domain zinc-finger 転写抑制因子として報告された(J Biol Chem., 277: 7608-7609, 2002)。2009 年には、ZBTB20<sup>-/-</sup>ホモ欠損マウスが作製され、既に、多様な解析が進み、早老症の病態を再現することに成功している(この際、ZBTB20<sup>+/-</sup>ヘテロ欠損マウスの表現型は標準マウスと変わらず正常と報告された)(Mol Cell Biol., 29: 2804-2815, 2009)。しかしながら、ZBTB20 の生理的役割に迫る分子機能解析は進んでおらず、未だ不明な点が多い。そこで、我々は ZBTB20 の機能解析を実施し、プリムローズ症候群や 3q13.31 欠失症候群の発症機序、および ZBTB20 発現量低下により明確な病態を発現せず肥満を呈し死に至る分子機構を明らかにする端緒を得ることを目標にした。



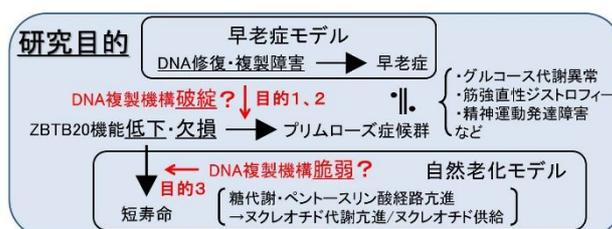
3. 研究の方法

目的 1: ZBTB20 機能欠損による DNA 複製および細胞周期障害の解明

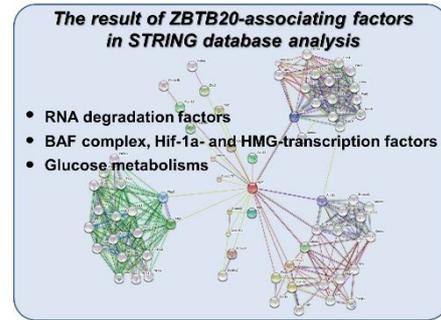
(1) siRNA 法による zbtb20 ノックダウン細胞株、および T121<sup>Tg</sup> ホモマウス胎児線維芽細胞をもちいて、細胞周期解析を実施し、G1, G2/M, M 期チェックポイントのうち何処で停滞しているかを検証した。

(2) ZBTB20 の Long form および Short form の過剰発現細胞株を樹立し、細胞周期解析を実施し、増殖遅延や生存率低下を検証した。

目的 2: ZBTB20 とその相互作用分子



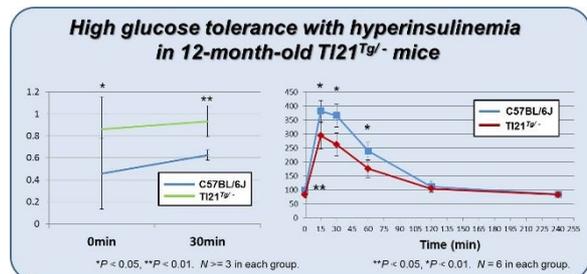
の DNA 複製および細胞周期への役割の解明  
 (3) 抗体を用いた IP 法により、候補となったタンパク質と ZBTB20 との相互作用を検証した。  
 (4) siRNA 法による zbtb20 ノックダウン細胞株、および  $Tl21^{Tg/Tg}$  ホモマウス胎児線維芽細胞をもちい、候補タンパク質の量的変化を詳細に解析した。  
 (5) 実験(2)で樹立した ZBTB20 の Long form および Short form の過剰発現細胞株をもちいて、実験(3)で ZBTB20 と直接相互作用が確認されたタンパク質との相互作用の可否を解析した。



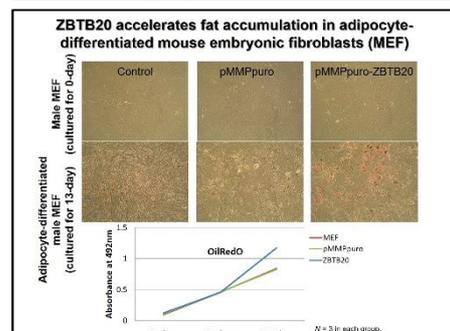
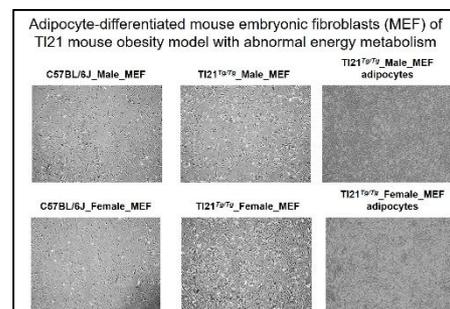
**目的3** : ZBTB20 転写抑制因子低下に伴う DNA 複製ストレスと糖代謝変動の解明  
 (6) ZBTB20 の標的遺伝子産物のうち、糖代謝・ペントースリン酸経路の律速酵素であるフルクトース-1,6-ビスリン酸脱リン酸化酵素活性、およびこれらの代謝を担うホスホフルクトキナーゼ2/フルクトース-2,6-ビスリン酸脱リン酸化酵素 (PFK2)・フルクトースビスリン酸アルドラーゼ・ヘキソキナーゼ・トランスケターゼの発現解析、さらにペントースリン酸経路の活性指標となる NADPH/NADP+比を測定した。  
 (7) iRNA 法による zbtb20 ノックダウン細胞株、および  $Tl21^{Tg/Tg}$  ホモマウス胎児線維芽細胞をもちい、エネルギー代謝活性 (ATP/ADP 量比・NADH/NAD+比・COX 活性・乳酸/ピルビン酸比) を解析した。

#### 4. 研究成果

ZBTB20 発現抑制モデル  $Tl21$  マウス系統の胎児線維芽細胞をもちいた先行研究において、細胞増殖遅延や生存率低下が顕著であった。 $Tl21^{Tg/Tg}$  ホモマウスは、常時低血糖で耐糖能脆弱異常を示し、プリムローズ症候群やその他早老症と酷似した病態生理を呈した。一方、壮年期以降に摂餌飲水量は変化しない中で肥満を呈する  $Tl21^{Tg/-}$  ヘテロマウスは、常時高インスリン血症でグルコース負荷耐性を呈した(右図)。この結果を背景に、本研究実験(6)(7)を実施した結果、ZBTB20 発現低下は、糖代謝・ペントースリン酸経路 -ヌクレオチド代謝を亢進させ、各組織細胞でグルコース取り込みを亢進し、エネルギー代謝の同化・異化のバランスを同化に傾倒し、特に脂肪酸合成を促進していることが示された。



ZBTB20 発現抑制ジーントラップモデルマウス胎児細胞株、siRNA 手法をもちいた siZBTB20 ノックダウン細胞株、およびレトロウィルスベクターをもちいた ZBTB20 long form 過剰発現細胞株とプリムローズ症候群モデル ZBTB20H596R 細胞株、さらに ZBTB20 Short form 過剰発現細胞株をもちいて、ZBTB20 発現形態および細胞機能変化の解析を実施した。実験(1)(2)の結果、それぞれの細胞株において、細胞増殖能・分化能・脂肪蓄積量に大きな変化が確認された。特に、多数の ZBTB20 スプライシングバリエーションの発現が確認され、それぞれのバリエーションが細胞増殖能・分化能・脂肪蓄積量に異なる影響を及ぼしていることが示された。特に、ZBTB20 Short form が、分化および脂質代謝の同化作用に大きく寄与していることが示された。



今後、実験(3) - (5)の成果によって、ZBTB20 相互作用タンパク質の候補となった RNA プロセッシング分解因子やクロマチン再構築因子などの中に、細胞周期依存性のヒストン mRNA 分解酵素 (U6 snRNA-associated Sm-like protein: LSM1) やユビキチン化酵素 (S-phase kinase-associated protein 1A: SKP1) のほか、ZBTB20 の細胞周期への関与が示される因子が多数候補となった。そこで、これらのタンパク質と ZBTB20 との相互作用をより詳細に解析し、ZBTB20 機能不全に伴う細胞周期障害の分子機序解明の端緒を得る。

また、糖代謝・ペントースリン酸経路 - ヌクレオチド代謝の亢進は、DNA 複製ストレスの惹起により、より多くのヌクレオチドプールが要求された結果であることが示唆されたことから、UV・X 線照射、DNA 損傷薬剤 (シスプラチン・マイトマイシン C) 暴露による DNA 傷害ストレスに対する応答性をより詳細に解析し、細胞増殖遅延や生存率低下を起こす ZBTB20 機能不全と DNA 修復障害との関連を明らかにする。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 石井恭正, 安田佳代	4. 巻 272
2. 論文標題 老化研究の進歩, 酸化ストレス研究の現状と展望.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医歯薬出版株式会社, 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 673-680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y. Sumino, T. Ishii, K. Yasuda, N. Ishii	4. 巻 1134
2. 論文標題 Metabolic Biomarkers in Nematode <i>C. elegans</i> During Aging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reviews on Advances in Experimental Medicine and Biology, Biomarker Studies of Metabolic and Metabolism-Related Disorders	6. 最初と最後の頁 163-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-12668-1_9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 石井 恭正、安田 佳代	4. 巻 56
2. 論文標題 老化の分子生理基盤	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 989 ~ 993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.11_989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 石井恭正, 安田佳代	4. 巻 2
2. 論文標題 老化メカニズムの徹底究明, 分子からアンチエイジングまで, 酸化ストレス研究の現状と展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医歯薬出版株式会社, 別冊・医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 9-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ishii T.
2. 発表標題 Age-dependently chronic innate immune response with 4-hydroxy-2-nonenal in mice.
3. 学会等名 The 35th Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology, The 19th Korea-Japan Joint Symposium, Session 7: Aging and immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井恭正
2. 発表標題 3q13.31欠失症候群・プリムローズ症候群に現れる老化症状：新たな早老機序に迫る．
3. 学会等名 第31回日本老年学会総会，第42回日本基礎老化学会大会，シンポジウムS4「幹細胞老化と加齢性疾患・早老症」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishii T., Asari S., Sugita K., Yasuda K., Miyazawa M., Yamamoto J.Y., Hartman P.S. and Ishii N.
2. 発表標題 Age-dependently chronic innate immune response with 4-hydroxy-2-nonenal in ROS-overproduced interstitial lung disease (ILD) model mice.
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Biology of Aging: Molecular, Cellular and Physiological Determinants of Lifespan and Healthspan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井恭正
2. 発表標題 電子伝達系障害酸化ストレスに対する適応応答の加齢変化
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会，第18回日本N0学会 合同学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018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
連携研究者	谷口 俊恭  (TANIGUCHI Toshiyasu)  (60794534)	東海大学・医学部・教授    (32644)	研究サポート・助言

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
---------	---------