

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14648

研究課題名（和文）細胞老化マーカーp16INK4aの発現誘導に関わる遺伝子の網羅的同定

研究課題名（英文）Identification of genes involved in the expression of the cellular senescence marker p16INK4a

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）・特任助教

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）：近年、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子p16INK4a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。細胞老化を引き起こすストレスとしては、がん遺伝子の活性化とテロメアの短縮がよく知られている。これらのストレスは、どちらも、DNA損傷応答を介して細胞老化を引き起こす。本研究では、DNA損傷によるp16INK4aの発現誘導に関わる遺伝子を、ゲノムワイドsiRNAスクリーニングにより網羅的に同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個体老化の分子メカニズムの解明は、生物学の中心的課題のひとつであるとともに、健康寿命の延伸に寄与することから、超高齢社会を迎えた我が国においては、社会的意義が極めて大きい。本研究では、細胞老化の基本メカニズムの解明に向けて、細胞老化に必要な遺伝子を網羅的に同定した。

研究成果の概要（英文）：Recent studies indicate that p16INK4a-positive senescent cells accumulate in the body over time and contribute to organismal aging. Oncogene activation and telomere erosion induce cellular senescence through the DNA damage response. In this study, genes involved in the expression of p16INK4a in response to DNA damage were identified by a genome-wide siRNA screen.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

p16INK4aは、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やRAFなどのがん遺伝子が活性化した細胞では、ゲノムDNAに損傷が生じ、転写因子p53が活性化する。p53は、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDK) p21CIP1の発現を誘導し、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、DNA損傷が一定期間持続すると、p16INK4aの発現が誘導される。p16INK4aは、CDK4/6を阻害することで、細胞老化を引き起す。

このようなp16INK4aのがん抑制遺伝子としての役割に加え、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、p16INK4a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、炎症性サイトカインやケモカインを分泌することで、様々な老化関連疾患の一因となる。例えば、p16INK4aを発現した老化細胞を、選択的に除去できるようにした遺伝子改変マウスにおいては、様々な臓器の加齢に伴う機能低下が緩和され、健康寿命が延伸する (Baker DJ et al, *Nature*, 2016)。また、p16INK4a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)。

p16INK4a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、p16INK4a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p16INK4a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、p16INK4a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、p16INK4a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。本研究では、DNA損傷によるp16INK4a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正常細胞を用いたゲノムワイド siRNA スクリーニングを行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、p16INK4aの発現を指標としたゲノムワイド siRNA スクリーニングを実施した。予め siRNA とトランスフェクション試薬を分注したマイクロプレートの各ウェルに、IMR90 ヒト正常細胞を加え、リバーストランスフェクションを行った。24時間後、DNA損傷剤ドキシソルピシンを加えた。抗 p16INK4a 抗体を用いた免疫染色を行い、ハイコンテンツイメージアナライザーによる画像解析を行った。使用した siRNA ライブラリーは、18,115 遺伝子をカバーしており、384 ウェルプレートの各ウェルに、同一遺伝子を標的とした4種類の異なる配列の siRNA が分注してある。大量のプレートを用いて、精度良く実験を行う必要があるため、自動分注機と自動プレート洗浄機を用いた。ゲノムワイド siRNA スクリーニングの結果は、別の配列の siRNA を用いた二次スクリーニングにより確定した。こうして得られた新規細胞老化関連遺伝子の機能解析を行った。

#### 4 . 研究成果

上記スクリーニングで同定された 59 遺伝子の中には、既に p16INK4a の発現誘導における役割が報告されている SWI/SNF 複合体の構成因子である、SMARCB1 と SMARCA4 が含まれていた。このことから、スクリーニングの結果は概ね妥当なものと考えている。

スクリーニングで同定された遺伝子の中には、呼吸鎖複合体 I の構成因子が含まれていた。この遺伝子をロックダウンした細胞では、p16INK4a の発現誘導が抑制されるとともに、ミトコンドリア ROS の産生が抑制されていた。この結果から、細胞老化におけるミトコンドリアの役割をさらに解析しようと考えた。そこで、スクリーニングで同定されたミトコンドリア局在の BCL-2 ファミリータンパク質に着目し、細胞老化における役割を解析した。このタンパク質は、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、ミトコンドリア代謝の変化、p16INK4a の発現誘導を促進することを見出した。また、このタンパク質は 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た。最近、ミトコンドリア代謝産物が、ヒストン修飾の基質となることで、遺伝子発現を制御することが明らかになってきた。このため、上記の結果は、DNA 損傷に応じて、ミトコンドリア代謝変化を介して、遺伝子発現を制御する新たなシグナル伝達経路の存在を示唆していると考えられる。

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<br>小田原傑, 山内翔太, 一條秀憲  |
| 2. 発表標題<br>細胞老化におけるASK1の機能解析 |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会    |
| 4. 発表年<br>2019年              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>深谷俊介, 山内翔太, 一條秀憲                 |
| 2. 発表標題<br>ミトコンドリアの機能不全による細胞老化に関わる遺伝子の網羅的探索 |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会                   |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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