

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16513

研究課題名(和文) ヒストン・レベルの減衰と老化

研究課題名(英文) Decline in the histone level and organismal aging

研究代表者

太田 翔(Ohta, Sho)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70837541

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)：加齢に伴って、生体組織において老化細胞が増加する。細胞老化が加齢に伴う生体機能の低下に関与することが明らかとなりつつあるが、細胞老化の分子メカニズムは不明な点が多い。本研究は、加齢に伴って見られるヒストンタンパク質レベルの低下に着目した。本研究により、ヒストン遺伝子の遺伝子発現を薬剤誘導的に抑制することのできるES細胞の樹立に成功した。加えて、樹立したES細胞を用いて遺伝子改変マウスを作製した。ES細胞において、ヒストン遺伝子の発現抑制が細胞老化関連遺伝子の上昇させることを見出した。作製したマウスを詳細に解析することで、細胞老化、ならびに個体老化の分子メカニズムが明らかになるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子をコードするゲノムDNAはヒストン分子と複合体を形成し、細胞内に収納されている。ヒストン分子は、どの遺伝子を使うか、使わないか、という遺伝子発現制御における分子的基盤である。そのようなヒストン分子の低下を実験的に誘導できるシステムは、老化のみならず多様な生命現象におけるヒストンの生理的機能を明らかにすることのできるこれまでにない実験系と言える。

研究成果の概要(英文)：The number of senescent cells in tissues increases as an organism ages, and cellular senescence is associated with the functional decline during aging. However, the molecular mechanisms behind the increased senescent cells are largely unknown. In the current study, I have generated a genetically engineered mouse ES cell line in which the protein level of histones are downregulated in a drug inducible manner. In addition, I have generated mice using the ES cell line. Analyses of the mice are yet to be done, but they can be an experimental tool to investigate profound roles of the histone/nucleosome decline seen in the aging process.

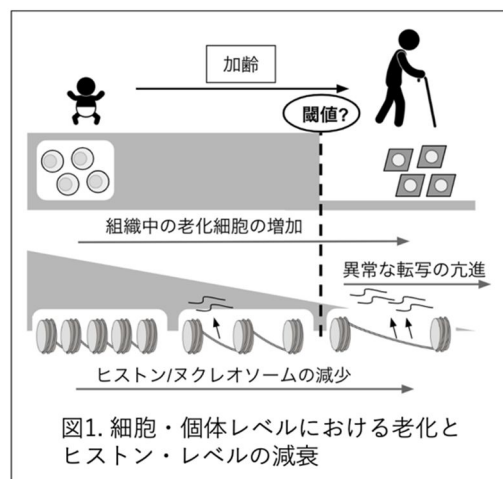
研究分野：分子生物学

キーワード：ヒストン

1. 研究開始当初の背景

細胞老化は、様々なストレスによって誘導される、細胞増殖の不可逆的な停止である。加齢に伴って生体組織中において細胞老化を起こした細胞（老化細胞）が増加する（図1）。さらに、こうした老化細胞が加齢関連疾患や加齢に伴う生体機能の低下に深く関わっていることが明らかになってきた。これまで、In vitro での細胞老化誘導実験により、細胞老化の分子メカニズムおよび老化細胞の特性については詳細に研究されてきた。しかしながら、加齢によって亢進する細胞老化は、in vitro 実験で用いるような一過的で急激な外的ストレスによって生じるとは考えにくく、個体の加齢による自然老化においてはどのような分子現象が引き金となって細胞老化が惹起されるかは不明なままであった。酵母などのモデル生物を使った研究から、ヒストンのレベルが老化と密接に関連していることが知られている。これらの生物では老化するに連れてヒストン・レベルが減衰するが、ヒストンを強制発現することにより分裂寿命が伸延される。ヒトにおいても高齢者から単離した正常細胞のヒストン・レベルが若年者のものと比べて減衰していることが知られていた（図1）。哺乳類ではヒストン・レベルの減衰と細胞老化との関連は分かっていないが、ヒストン・レベルが細胞老化の閾値を規定していることが示唆された。

酵母や線虫などのモデル生物では、老化によるヒストン・レベルの減衰によりヌクレオソームのレベルが低下し、それにより非遺伝子領域からの異常な転写が亢進する。ヒトにおいても、個体老化に伴う非遺伝子領域の転写が報告されている（図1）。ヒストン/ヌクレオソーム・レベルの減衰によって引き起こされる異常な転写によって生じる転写産物が細胞老化の引き金となる可能性が考えられた。



2. 研究の目的

本研究は上述のような背景を踏まえ、ヒストン・レベルの連続的な減衰と細胞老化との関連を明らかにすることを目的とした。加えて、ヒストン・レベルの減衰が細胞老化を介して個体レベルでの老化との関係を理解することを目指した。

3. 研究の方法

ヒストン・レベルを薬剤依存的に操作可能な新規マウスモデルの作製し実験に用いることとした。樹立したマウスモデルよりマウス胎性線維芽細胞を単離し細胞老化に関連する実験を実施することとした。

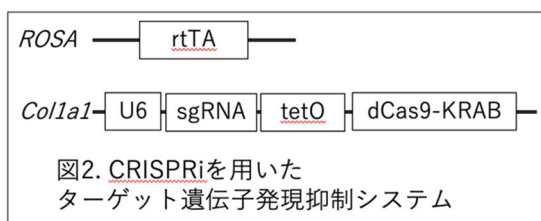
4. 研究成果

(1) 遺伝子改変 ES 細胞の作出

当初予定していた遺伝子改変において、内在性 Slbp 遺伝子を欠失した ES 細胞を得ることができなかった。致死性のある遺伝子欠損を過剰発現ではレスキューできなかったことが原因と考えられた。

そこで、CRISPRi と呼ばれる CRISPR/Cas9 を改変した手法を応用した遺伝子のノックダウンを、薬剤依存的に誘導可能な遺伝子改変を考案した（図2）。この際、プロモーター領域をターゲットとするガイド RNA を複数設計し、ノックインに用いるプラスミドに搭載した。その結果、Slbp 遺伝子をドキシサイクリン依存的にノックダウンすることのできる ES 細胞の作出に成功した。

Slbp 遺伝子に加えて、ヒストンをコードする遺伝子をターゲットとするガイド RNA を設計し、同様の遺伝子改変の実施を試みた。ヒストンタンパク質をコードする遺伝子にはゲノム上に多数の遺伝子コピーを持つという特徴がある。したがって、単一ヒストンタンパク質の発現抑制を目的とした場合、多数の遺伝子コピーを同時にターゲティングできるようにガイド RNA を設計する必要がある。そこで、独自にプログラム



を作成しガイド RNA を設計することを目指した。ガイド RNA のオフターゲットを持つ可能性を示すスコアの計算には CRISPOR と呼ばれる広く利用されているガイド RNA 設計プログラムで用いられているアルゴリズムを利用した。その結果、ヒストン H4 をコードする遺伝子 13 コピーを一度にターゲティングすることのできるガイド RNA を設計することに成功した。さらに進めて、H4 遺伝子をドキシサイクリン依存的にノックダウンすることのできる ES 細胞を作成することができた。

(2) 遺伝子改変 ES 細胞の評価

CRISPRi-Slbp-ES 細胞ならびに CRISPRi-H4-ES 細胞におけるターゲット遺伝子、すなわち Slbp と H4 の遺伝子発現抑制効率を qPCR ならびにイムノプロットングにより評価した。その結果、いずれの ES 細胞株においてもそれらのターゲット遺伝子の発現がドキシサイクリン依存的に抑制されることを明らかにした。

(3) 遺伝子改変マウスの作製

CRISPRi-Slbp-ES 細胞ならびに CRISPRi-H4-ES 細胞をマウス胚にインジェクションすることにより新規のマウスモデル作製を目指し、現在までに期待通りの改変アリルを持つマウスの作出に成功した。

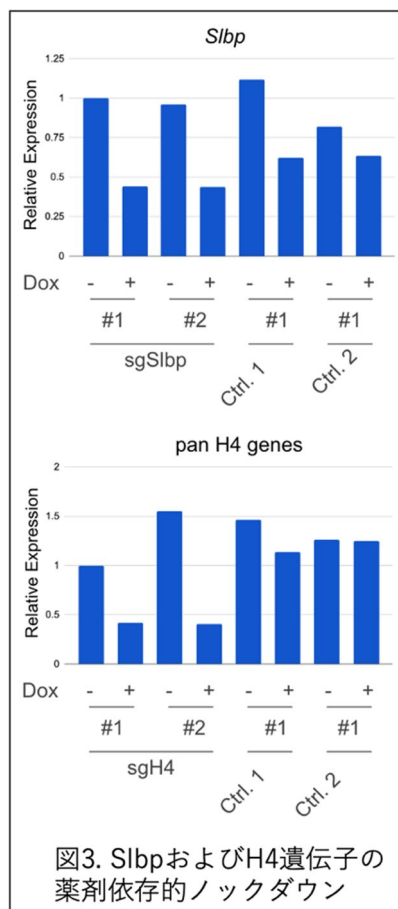


図3. SlbpおよびH4遺伝子の薬剤依存的ノックダウン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 SENOO Manami, HOZUJI Hiroshi, ISHIKAWA-YAMAUCHI Yu, TAKIJIRI Takashi, OHTA Sho, UKAI Tomoyo, KABATA Mio, YAMAMOTO Takuya, YAMADA Yasuhiro, IKAWA Masahito, OZAWA Manabu	4. 巻 66
2. 論文標題 RNA-binding protein Ptbp1 regulates alternative splicing and transcriptome in spermatogonia and maintains spermatogenesis in concert with Nanos3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 459 ~ 467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-060	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 Yagi Masaki, Kabata Mio, Tanaka Akito, Ukai Tomoyo, Ohta Sho, Nakabayashi Kazuhiko, Shimizu Masahito, Hata Kenichiro, Meissner Alexander, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of distinct loci for de novo DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B during mammalian development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16989-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------