

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20570193

研究課題名(和文)

転写因子 JDP2 による細胞老化および細胞増殖抑制の分子機構に関する研究

研究課題名(英文) The molecular mechanisms of cellular aging and inhibition of cell growth mediated by transcription factor JDP2.

研究代表者

中出 浩司 (NAKADE KOJI)

独立行政法人理化学研究所・遺伝子材料開発室・協力研究員

研究者番号： 20392053

研究成果の概要(和文):

転写因子 JDP2 による老化制御機構を解析し、JDP2 が酸化ストレスに応答して p16Ink4a locus からのヒストンメチル化因子である PRC1, PRC2 の離脱を促すことがわかり、これにより周囲のヒストン H3 リジン 27 残基の脱メチル化を誘導される。若い細胞ではエピジェネティックな効果により抑制されていた細胞増殖抑制因子である p16Ink4a 及び p19Arf の発現量が増大し、Senescence が誘導され、細胞老化が起こるメカニズムが提唱された。

研究成果の概要(英文):

We have analyzed the molecular mechanisms of JDP2 in the regulation of cellular aging. We found that JDP2 induces the release of the histone methyltransferases, PRC1 and PRC2, from the p16Ink4a locus in response to oxidative stress, resulting the demethylation of histone H3 lysine 27 residue. This demethylation of histone causes the up-regulation of p16Ink4a and Arf, which are silenced by epigenetic effect in young cells. Finally, the cells are aged with senescent morphology.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野: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: (1)老化 (2)細胞増殖 (3)酸化ストレス (4)転写 (5)エピジェネシス (6)セネッセンス (7)p16Ink4a

## 1. 研究開始当初の背景

日本をはじめとする先進諸国では医療技術の進歩により長寿が達成されたが、高齢化に伴う医療保険費の増大が社会問題となっている。このため、いかに健康を維持しつつ老化と巧みにつきあうかが次の課題であり、老化のメカニズム解明を目指した研究が世界的に注目されつつある。老化とは則ち新陳代謝の低下であり、ミクロの視野で考えれば細胞分裂の停止と言える。ガン化していない正常細胞の老化の分子メカニズムはマウス胎児繊維芽細胞(MEF)培養系を用いた研究により解明が進行中であり、凡そ次のように考えられている。代謝活動や酸素により生じる活性酸素が細胞内蓄積し、この酸化ストレスによるDNAの損傷と修復が繰り返される。DNAの修復の間はガン抑制遺伝子産物であるp19Arf-p53-p21wafのネットワークにより一時的に細胞増殖が停止し、修復が終了すると再び細胞増殖が開始されるが、修復不能とみなされた場合細胞周期制御因子であるp16Ink4aの発現量が増大し、senescenceと呼ばれる不可逆的な細胞増殖停止が誘導される。このp16Ink4aの発現調節が目下の課題であり、ヒトにおいてはゲノム末端のテロメア配列の短小化が一つの引き金と考えられているが、マウス細胞においてはテロメア配列の短小化を伴わない老化が一般的であり、他にもヒト・マウスに共通な老化メカニズムが存在していると考えられ解析が進行中である

## 2. 研究の目的

我々が今まで分化決定因子の一つとして着目し、研究を進めてきた転写因子にJDP2(Jun dimerization protein 2)がある。JDP2はDNA上のAP1配列に結合し転写を抑制する因子として知られ、我々はこれまでにJDP2が試験管内でp300によるヒストンのアセチル化を阻害すること、F9細胞にJDP2を強制発現させるとレチノイン酸依存性の分化誘導を抑制すること、生理的発現条件下で繊維芽細胞から脂肪細胞への分化を抑制することを示し、分化抑制因子としての報告してきた。

一方で、JDP2KO-MEF細胞を経代培養していく過程で、JDP2KO-MEF細胞が比較的長期間培養可能であることを発見した。則ち、形質転換していない初代培養細胞は経代培養に伴う酸化ストレスにより細胞老化を起こし、培養開始からほぼ4-5週間後にsenescenceが誘導されるが、JDP2KO-MEF細胞では6週間以上培養を継続しても増殖を続けた。

我々はまずsenescenceを起こした老化細胞に特徴的なp16Ink4aの発現の上昇を検討したところ、培養開始35日後のJDP2KO-MEF細胞では野生型に比べてp16Ink4aのmRNAの発現量の減少が認められた。次に、JDP2KO-MEF細胞では形質転換による不死化が早期に起こるのではないかと考え、形質転換細胞に特異的なp16Ink4aプロモーター領域のCpGアイランドのメチル化をバイサルファイド法を用いて検討したが、長期培養後のJDP2KO-MEF細胞ではメチル化が検出できなかったことより、早期の形質転換ではないと考えられた。これらを踏まえて、JDP2は細胞がストレスを受けて、p16Ink4aの発現に伴いsenescenceを引き起こすまでのシグナル伝達系に含まれると考え、次の点を明らかにしていきたいと考えている。

- (1) p16Ink4a 遺伝子の発現調節機構とJDP2の関与を検討する。
- (2) JDP2をノックダウンすることによる細胞側への影響、則ち細胞老化の遅延や老化の解除などを調べ、細胞工学への応用を検討する。
- (3) 老化・細胞周期制御関連遺伝子のノックダウンを図ることによりJDP2の老化シグナルカスケードでの位置付けと役割を明らかにし、細胞老化メカニズムの理解を深める。

## 3. 研究の方法

- (1) p16Ink4a 遺伝子の発現調節機構とJDP2の関与の検討。  
JDP2が何らかの遺伝子発現を制御しているとの仮説の元に、senescenceに関わる遺伝子の発現を測定した。Senescenceの誘導時にはp16Ink4aの発現量が上昇し、p16Ink4aがRbのリン酸化を抑制することにより、サイクリン等細胞増殖に必須な遺伝子の発現をつかさどる転写

因子E2Fの活性を抑えているとされている。実際、高酸素濃度(20%)と低酸素濃度(3%)で培養した若いマウス繊維芽細胞(培養開始直後)と老いた細胞(40日間培養)で p16Ink4a の発現を比較したところ、予想通り老いた野生型の細胞で p16INK4 が高発現を示したのに対して JDP2 欠損株では発現量が低かった。また低酸素濃度で培養を続けた場合、野生型、JDP2 欠損株共に40日後でも増殖を続け p16Ink4a の発現量も低かった。このことより JDP2 と酸化ストレスの存在が p16Ink4a の発現と Senescence の誘導に重要であると考え、アデノウイルスを用いて JDP2 を強制発現させ p16Ink4a の発現誘導と細胞増殖の停止の有無を検討する。また p16Ink4a の発現は若い細胞ではタンパク質複合体である PRC1、PRC2(polycomb repressive complexes)が DNA 上の p16Ink4a locus に結合し周囲のヒストンをメチル化させることにより発現を抑制し、老いた細胞では何らかのメカニズムにより PRC1、PRC2が p16Ink4a locus から外れ p16Ink4a が発現し、細胞周期の停止が起こるとされている。そこで JDP2 の存在下、非存在下において高酸素濃度で長期間培養した MEF と低酸素濃度で培養した MEF 細胞を調製し、PRC1、PRC2 に含まれるタンパク質の一つ、Bmi1、EZH2 及びメチル化ヒストンなどに対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)法により各条件における Ink4a locus 上の PRC の形成と近傍のメチル化ヒストンに対する抗体を用いた ChIP を行い JDP2 による直接的な転写制御の可能性についても検討する。

(2) JDP2 ノックダウンによる細胞への影響の検討。  
正常細胞が in vitro での培養条件において、早い段階で老化し分裂を停止してしまうことは細胞工学上の課題のひとつである。JDP2 の細胞老化における役割は不明であるが、老化に至るプロセスに関与するか、老化の状態の保持に関与するか、あるいはその双方と考えられる。いずれにせよ RNAi を用いた JDP2 のノックダウンにより細胞の老化状態をコントロールできれば培養技術上の有

効な技法となりうる。そこで我々は RNAi による JDP2 ノックダウンの可能性を検討していく予定である。まず JDP2 に対する siRNA を設計し、これを野生型 MEF 細胞にトランスフェクションすることによる内在性 JDP2 の一時的な発現抑制効果を検討し、合わせて細胞増殖能と遺伝子の発現パターンを解析していく。トランスフェクションする対象に比較的若い老化の過程にある細胞や既に老化して増殖が停止した細胞を用いて実験を行えば JDP2 が老化に至るプロセスに関与するか、或いは老化の状態の保持に関与するかが明確になると考えている。以上の実験により siRNA による JDP2 ノックダウンによる細胞増殖能の復活が確認されれば、恒常的な JDP2 の発現抑制を目指してレトロウイルスを用いた JDP2-shRNA の発現系を構築し、その効果を正常細胞培養系で検討していく。

(3) JDP2 の老化シグナルカスケードでの位置付けと役割の解明。

JDP2 が p16Ink4a の発現を誘導することは我々の研究により明らかとなったが、これと同時に p19Arf の発現量の若干上昇も認められた。老化に伴う Senescence の誘導には p16Ink4a-pRb 経路の他に DNA 損傷などジェノトキシックなストレスに応答して細胞増殖抑制を誘導する p19Arf-p53 経路も関与しているとされる。JDP2 が p16Ink4a のみか、p16Ink4a と p19Arf の双方に依存して Senescence を誘導するのか解明する為に、それぞれの下流遺伝子である pRb と p53 に対する shRNA を導入してノックダウンすると同時に、JDP2 を強制発現させることにより、JDP2 のそれぞれの経路に対する関与を調べていく。また、レンチウイルスにより JDP2 欠損マウス胎児繊維芽細胞に p16Ink4a ならびに p19Arf を強制発現させ細胞増殖への影響を検討していく。更に、JDP2 発現のみにより Senescence を誘導できるかを検証する為に、JDP2 をレンチウイルスを用いて強制発現させ低酸素培養条件下(3%酸素濃度)での細胞増殖への影響をみていくことにより、老化シグナルカスケード上の JDP2 の役割を検討していく。

4. 研究成果

(1) p16Ink4a 遺伝子の発現調節機構と JDP2 の関与の検討。

JDP2 欠損マウス胎児繊維芽細胞にアデノウイルスを用いて JDP2 を強制発現させると、感染 4 日後に細胞の増殖抑制が観察され、リアルタイム RT-PCR 法によって p16Ink4a の mRNA 発現量の増加が認められた。またアデノウイルス感染細胞を Senescence の指標である SA(Senescence associated)- $\beta$ -Galactosidase 活性により染色した結果、JDP2 強制発現下において顕著に細胞が染まり、JDP2 発現により Senescence が誘導されるとの結論が得られた。またクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)により、JDP2 欠損マウス胎児繊維芽細胞においては、野生型のものとは異なり、20%酸素存在下での長期間培養後も PRC1,PRC2 の p16Ink4a locus への結合が認められた。更に JDP2 欠損マウス胎児繊維芽細胞においては野生型と比較して p16Ink4a locus 上のヒストン H3 リジン 27 残基のメチル化のレベルが高いことが認められた。同様に JDP2 に対する抗体を用いて ChIP 法により JDP2 の p16Ink4a locus への結合を検証したところ、特に若い繊維芽細胞において JDP2 の結合が認められた。以上のことより、JDP2-p16Ink4a locus 上に存在すると 20% 酸素存在下の培養条件では PRC1,PRC2 が p16Ink4a locus から外れやすくなり、このため p16Ink4a locus 近傍のヒストン H3 の脱リン酸化が促進され、Ink4a はエピジェネティックなサイレンシングから解放されて発現量が増え、細胞増殖停止へと進み Senescence が起こる、というメカニズムが考えられた。

(2) JDP2 ノックダウンによる細胞への影響の検討。

JDP2 に対する siRNA を設計し、20%酸素存在条件下で培養開始後 1 週間程の野生型マウス繊維芽細胞にトランスフェクションしたところ、siRNA は JDP2 の発現を抑制し、細胞増殖が促進された。また、レンチウイルスによる JDP2 に対する shRNA の導入を試み、野生型マウス繊維芽細胞の JDP2-shRNA のトランスフォーマントを作製した。こ

のトランスフォーマントは JDP2 欠損株と同様に 20%酸素存在条件下で一ヶ月程培養を続けても Senescence が起きることもなく増殖を続けた。しかしながら、Senescence が回避されるのは若いマウス繊維芽細胞から JDP2-shRNA トランスフォーマントを作成した時で、既に Senescence を起こした老化マウス繊維芽細胞からトランスフォーマントを作成した場合には Senescence からのリカバリーは不可能であった。これは後述するように、JDP2 は Senescence の状態を保つ為のファクターではなく、ストレスシグナルに応答して Senescence を誘導するメディエーターであるからと考えられる。

(3) JDP2 の老化シグナルカスケードでの位置付けと役割の解明。

JDP2 欠損マウス胎児繊維芽細胞に pRb 及び p53 に対する shRNA をレンチウイルスベクターにより導入し、同時に JDP2 を強制発現させたところ、pRb 及び p53 の単独でのノックダウンでは JDP2 による細胞増殖抑制は回避できないが、の双方を同時にノックダウンすると JDP2 による細胞増殖抑制効果は消失した。pRb と p53 がそれぞれ p16Ink4a と p19Arf の下流遺伝子であることを考慮すると、JDP2 は p16Ink4a-pRb 経路と p19-Arf 経路の双方の老化シグナルカスケードに関与すると考えられる。また p16Ink4a と p19Arf をレンチウイルスにより強制発現させると野生型と同様に JDP2 欠損マウス胎児繊維芽細胞でも増殖抑制効果が得られたことから、JDP2 の作用点は少なくとも p16Ink4a や p19Arf より下流ではないことが確認された。また JDP2 欠損マウス胎児繊維芽細胞にレンチウイルスにより JDP2 を強制発現させた状態で、低酸素条件下 (3%酸素濃度) で培養を行うと、20%酸素存在下の場合と異なり、JDP2 による増殖阻害効果は得られなかった。以前の実験では 20%酸素存在下で JDP2 の発現量が上昇することから、JDP2 の発現が Senescence に重要であると思われたが、今回の実験より、JDP2 発現のみでは Senescence の誘導は不可能で、酸化ストレスなどの刺激が同時に必要なことがわかり、換言すれば JDP2 は酸化ストレスより受けるシグナルに応答して p16Ink4a locus 上での PRC1,PRC2 の離脱を促すメディエーターであると考えられた。

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 6 件)

1. Pan, J., K. Nakade, Y.C. Huang, Z.W. Zhu, S. Masuzaki, H. Hasegawa, T. Murata, A. Yoshiki, N. Yamaguchi, C.H. Lee, W.C. Yang, E.M. Tsai, Y. Obata, and K.K. Yokoyama, Suppression of cell-cycle progression by Jun dimerization protein-2 (JDP2) involves downregulation of cyclin-A2. *Oncogene*, 2010. 29(47): p. 6245-56. 査読・有
2. K. Nakade, B. Wasylyk and K.K. Yokoyama Epigenetic regulation of p16Ink4a and Arf by JDP2 in cellular senescence. *BioMolecular Concepts*, 2010. 1: p. 49-58. 査読・有
3. Nakade, K., J. Pan, T. Yamasaki, T. Murata, B. Wasylyk, and K.K. Yokoyama, JDP2 (Jun Dimerization Protein 2)-deficient mouse embryonic fibroblasts are resistant to replicative senescence. *J Biol Chem*, 2009. 284(16): p. 10808-17. 査読・有
4. Weidenfeld-Baranboim, K., T. Hasin, I. Darlyuk, R. Heinrich, O. Elhanani, J. Pan, K.K. Yokoyama, and A. Aronheim, The ubiquitously expressed bZIP inhibitor, JDP2, suppresses the transcription of its homologue immediate early gene counterpart, ATF3. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(7): p. 2194-203. 査読・有
5. Yamasaki, T., A. Takahashi, J. Pan, N. Yamaguchi, and K.K. Yokoyama, Phosphorylation of Activation Transcription Factor-2 at Serine 121 by Protein Kinase C Controls c-Jun-mediated Activation of Transcription. *J Biol Chem*, 2009. 284(13): p. 8567-81. 査読・有
6. Nakade, K., Pan, J., T. Yamasaki, M. Noguchi, S. Masuzaki, S. Kishikawa, T. Murata, Z.W. Zhu, X.Y. Chen, H. Hasegawa, N. Yamaguchi, E.M. Tsai, J.N. Lee, and K.K. Yokoyama, Role of histone chaperone JDP2 in replicative senescence. *Current Topics in Biochemical Research*, 2009. 11(1): p. 75-97. 査読・有

[学会発表] (計 6 件)

1. 中出浩司、他

Jun dimerization protein 2 mediates replicative senescence

第 33 回日本分子生物学会年会

2010 年 12 月 8 日

神戸ポートアイランド、神戸

2. 中出浩司、他

Jun dimerization protein 2 as a mediator of replicative senescence

第 69 回日本癌学会学術総会

2010 年 9 月 23 日

大阪国際会議場、大阪

3. 中出浩司 et al.

Jun dimerization protein 2-deficient mouse embryonic fibroblasts are resistant to replicative senescence

第 32 回日本分子生物学会年会

2009 年 12 月 9 日

パシフィコ横浜、横浜

4. 中出浩司 et al

細胞老化を制御する AP1 転写因子、Jun Dimerization Protein 2. 第 31 回日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 10 日 神戸ポートアイランド

5. 潘建治 et al

JDP2 プロモーターによるトランスジェニックマウスでの小脳特異的な Cre 発現。第 31 回日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 10 日 神戸ポートアイランド

6. 潘建治 et al.

Generation and characterization of Nur77/TR3, JDP2 promoter-driven tissue-restricted Cre transgenic mice. 第 67 回日本癌学会学術総会.

2008 年 10 月 28 日

名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中出 浩司 (NAKADE KOJI)

独立行政法人理化学研究所・遺伝子材料開発室・協力研究員

20392053

(2)研究分担者

潘 建治(Pan Jhanzhi)

独立行政法人理化学研究所・遺伝子材料開発室・

専任研究員

80373356