

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06010

研究課題名(和文)細胞老化とSASP遺伝子発現制御におけるクロマチン制御因子TAF-Iの機能解析

研究課題名(英文)Functional analyses of TAF-I in regulation of cellular senescence and SASP gene transcription

研究代表者

加藤 広介 (Kato, Kohsuke)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90466673

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)：本研究は、培養細胞における細胞老化誘導系を用いてクロマチン制御因子TAF-Iによる細胞老化の制御機構の解明を目的とした。ヒトの正常繊維芽細胞でTAF-Iの発現を抑制し、がん遺伝子を発現させて細胞老化を誘導したところ、炎症性サイトカイン遺伝子の発現異常や、細胞老化に特異的なヘテロクロマチン構造の形成に異常が観察された。またそれらの原因が、核に局在するプロテアーゼであるカテプシンL1の発現抑制を介したヒストンH3のプロセッシングの異常によることを明らかにした。以上の結果より、TAF-Iは特異的なクロマチン構造の制御を介して、細胞老化に付随する遺伝子発現の制御に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会をむかえつつある我が国において、加齢に伴う疾患や身体機能低下の予防と治療法の確立は重要な課題である。このような加齢性疾患は慢性炎症が根本的な原因と考えられており、炎症老化(inflammaging)と呼ばれている。近年、炎症老化には体内での老化細胞の蓄積が関与している可能性が示唆されており、細胞レベルでの老化とそれに伴う炎症反応活性化のメカニズムを解明することは、加齢性疾患の予防と治療法の確立において重要である。本研究はそのような細胞老化のメカニズムの一端を解明したものであり、学術的にも社会的にも意義をもつものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the regulatory mechanism of cellular senescence by chromatin regulator TAF-I using a cellular senescence induction system in cultured cells. When TAF-I expression was suppressed in normal human fibroblasts and oncogenes were expressed to induce cellular senescence, abnormalities in the expression of inflammatory cytokine genes and in the formation of heterochromatin structures specific for cellular senescence were observed. The results also revealed that these abnormalities were caused by abnormal processing of histone H3 via suppression of expression of cathepsin L1, a protease localized in the nucleus. These results suggest that TAF-I may be involved in the regulation of gene expression associated with cellular senescence through the regulation of specific chromatin structures.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞老化 炎症老化 クロマチン ヒストンシャペロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者らは、これまでにクロマチン制御因子Template Activating Factor-1 (TAF-1)による、クロマチン構造制御を介したエピジェネティックな遺伝子発現の制御機構の解析とその生理的意義の解明を目指してきた。その過程で、TAF-1がテロメラーゼの酵素サブユニットをコードするTERT遺伝子の活性化を介してテロメアDNA長を制御し、細胞のがん化プロセスに関与することを明らかにしてきた。

(2) テロメアDNAの伸長制御は、細胞の老化とも密接に関わることが知られている。細胞老化が誘導された正常細胞では、特異的なクロマチン構造変換が生じることが知られている。TAF-1はヒストンシャペロンとしてクロマチン構造制御に関わることから、TAF-1がクロマチン制御を介して細胞老化に関わる可能性が考えられるが、その詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞老化におけるクロマチン構造変換とそれによる遺伝子発現制御におけるTAF-1の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞老化はヒトの正常繊維芽細胞 IMR90 にレンチウイルスベクターを用いてがん遺伝子 Ha-ras を過剰発現することで誘導した (Oncogene-induced senescence: OIS)。TAF-1 の発現抑制 (knock down: KD) は TAF-1 mRNA を標的とした shRNA をレンチウイルスベクターにより発現することで誘導した。細胞老化の表現型として、細胞の形態変化、クロマチン構造の変化、細胞老化に付随する炎症性サイトカイン遺伝子の発現などを検証した。

4. 研究成果

(1) OIS による細胞の形態変化とクロマチン構造変換は TAF-1 の KD により抑制される

正常細胞に細胞老化が誘導されると、細胞が扁平状の形態へ変化し、また細胞内に多数の液胞が生じることが知られている。IMR90 細胞に OIS を誘導すると同時に、TAF-1 の KD を行い、細胞の形態変化に与える影響を検討した。その結果、TAF-1 の KD により老化細胞で見られる液胞の形成が大きく抑制

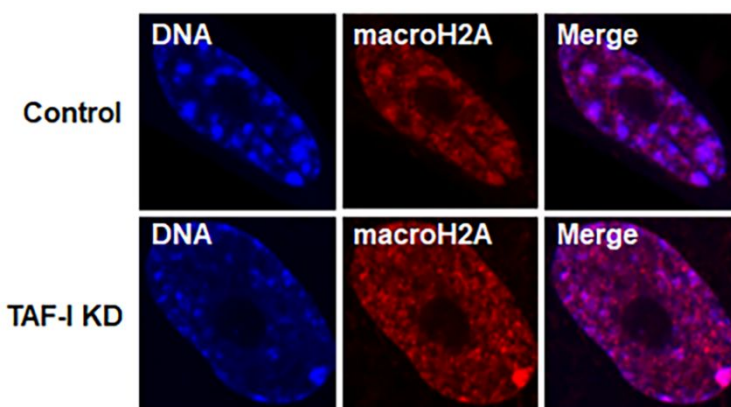


図1: TAF-1 KDによるSAHFの形成阻害

される様子が観察された。細胞老化が誘導された正常繊維芽細胞では、大規模なクロマチン構造の再構成が起こり、Senescence-associated heterochromatin foci (SAHF)と呼ばれる特異的なクロマチン構造が形成されることが知られている¹。そこで、SAHFの形成におけるTAF-1 KDの影響を、SAHFに局在するヒストンとして知られるヒストン macroH2Aの局在を蛍光顕微鏡で観察することで解析した。その結果、コントロールの細胞ではSAHFの形成が観察されたが、TAF-1をKDした細胞ではSAHFの形成が強く抑制されることが明らかとなった(図1)。

(2) OIS を誘導した細胞では TAF-I KD により SASP 遺伝子の発現異常がおこる

OIS が誘導された細胞では、Senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる炎症性サイトカインの発現促進が起こることが知られている。細胞老化における TAF-I KD の SASP 関連遺伝子の発現への影響について、定量 RT-PCR により検討した。その結果、コントロールの細胞では細胞老化の誘導後、10 日前後まで IL-1 α や IL-6 などの炎症性サイトカイン遺伝子の転写が増加したのち、13 日前後にかけて低下していく様子が観察された。一方、TAF-I KD 細胞では、炎症性サイトカイン遺伝子の転写は 10 日前後までほとんど増加せず、一方で 13 日前後で異常な増加を示した。

(3) TAF-I KD は細胞老化において重要な核内タンパク質のプロセシングの異常を引き起こす

細胞老化では、核膜の裏打ちタンパク質である Lamin B1 や、クロマチンを構成するヒストンタンパク質などがプロテアーゼによる切断や分解を受けることが知られており、これらのプロセスは老化細胞特異的なクロマチン構造の形成と遺伝子発現制御に重要である^{2,3}。IMR90 細胞に OIS を誘導し、TAF-I KD が Lamin B1 やヒストンタンパク質のプロセシング

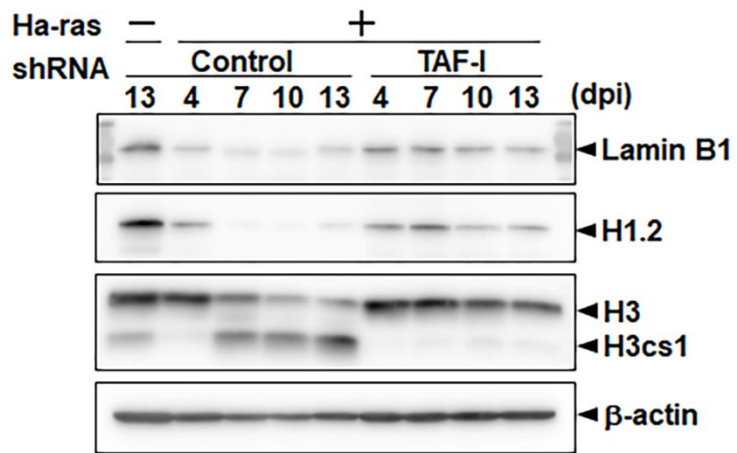


図2: TAF-I KDによる核内タンパク質のプロセシングの阻害

に与える影響をウェスタンブロットングにより検討した。その結果、TAF-I KD により Lamin B1 やヒストン H1 の分解や、ヒストン H3 の N 末端の切断産物 (H3cs1) が抑制されることが明らかとなった (図 2)。

(4) TAF-I KD は細胞老化におけるカテプシン L1 の発現を抑制する

カテプシン L1 はリソソームと核の両方に局在するプロテアーゼであり、細胞老化の誘導時に発現が促進され、Lamin B1 の分解やヒストン H3 のプロセシングに関与することが報告されている³。そこで、TAF-I KD による細胞老化誘導時における核内タンパク質のプロセシングの阻害が、カテプシン L1 の発現制御を介しているかを検討した。コントロールの細胞では、OIS の誘導後時間経過とともにカテプシン L1 の mRNA 量とタンパク質量がともに増加する様子が観察された。一方で TAF-I KD 細胞では、カテプシン L1 の mRNA とタンパク質量のどちらもコントロールに比較して低下する様子が観察された。

以上の結果より、TAF-I は細胞老化において、カテプシン L1 の発現制御を介した核内タンパク質のプロセシングと、それに続く老化細胞特異的なクロマチン構造の形成に関与する可能性が示唆された。

引用文献

1. Natita, M. *et al.*, Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell* 113: 703-716, 2003

- 2 . Shimi, T. et al., The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev.* 25: 2579-2593, 2011
- 3 . Duarte, LF. et al., Histone H3.3 and its proteolytically processed form drive a cellular senescence programme. *Nat. Commun.* 5: 5210, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|