

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570008

研究課題名(和文)ヌクレオソーム構造による老化応答遺伝子の発現制御

研究課題名(英文)Regulation of the senescence responsive genes by nucleosomal change

研究代表者

鮎沢 大 (Ayusawa, dai)

横浜市立大学・その他の研究科・教授

研究者番号：00142109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト老化細胞において5-ブロモデオキシウリジンがヌクレオソーム構造を変化させるかどうか検証した。ヒト細胞の初期老化応答遺伝子PAI-1遺伝子近傍のヌクレオソーム配置を鋭敏に検出するために、精密なヌクレオソーム位置を解析できる「プライマー伸長法」を構築した。マイクロコッカルヌクレアーゼで切断したDNAをプライマー伸長で選択的に合成し、リンカーDNAを結合させてPCRを行うと、バンドが多数出現した。いくつかの改良を施し、特異的なバンドを増幅することにほぼ成功した。検出感度は大幅に改善され、ヒトゲノム上のヌクレオソーム配置(5-7個)を正確に決定できる段階まで達した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we verified whether 5-bromodeoxyuridine can change nucleosomal structure in the promoter region of the PAI-1 gene quickly responsive to 5-bromodeoxyuridine in human HeLa cells. We developed "the primer extension method" to precisely analyze the positioning of nucleosomes on DNA. Digestion of the chromatin DNA with micrococcal nuclease followed by linker ligation and PCR with specific primers revealed specific bands that are thought to be derived from digestion with the nuclease. With efforts to eliminate non-specific bands, we came to a situation where we can precisely detect a change in the nucleosomal structure.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝ゲノム動態

キーワード：細胞老化 ヌクレオソーム 5-ブロモデオキシウリジン

1. 研究開始当初の背景

1970年代、BrdU、ジブチル-cAMP、酪酸は、細胞分化を制御する試薬として注目を集めた。その後、cAMPはPKAの活性化因子、酪酸はヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であることが判明し、両者は生物学の発展に多大な貢献をした。BrdUの作用機序も盛んに研究されたが、その中心であったWeintraub博士が1995年に癌で死去した後、研究は途絶えたままである。その当時の研究者は、5-ブロモウラシルが取り込まれたDNAは電気陰性度を増し、ヒストンとの結合力を増強し、遺伝子発現の変動をもたらすと考えた。申請者は、細胞老化の誘導剤を探索する過程で、BrdUが任意の動物細胞を速やかに、かつ明瞭に老化に導くことを見出した。これを契機に、申請者はBrdUの作用機序の解明に着手した。

細胞老化は、種々の慢性的な細胞障害によって誘導される。老化細胞はDNA複製の遅滞と細胞の肥大化・扁平化を共通の特徴とする。さらに、細胞の肥大化は核の膨張と核膜の崩壊をもたらす。しかし、普遍的かつ最強の細胞老化誘導剤であるBrdUは、細胞の肥大化を起こさず、核の膨張と核膜の崩壊を速やかに誘導した。以上から、BrdUは凝集したクロマチンを弛緩させ、核膜の崩壊、分裂能の喪失、老化応答遺伝子の誘導をもたらすという新しい仮説を提示した。

上記の仮説は申請者の幾多の報告によって裏付けられている。BrdUが誘導する老化応答遺伝子は、ヘテロクロマチンやG-バンドにクラスターを形成して存在する。BrdUはヘテロクロマチン遺伝子の発現や斑入り(position effect variegation)を誘導する。BrdUがDNAに取り込まれると、配列特異的に折れ曲がり構造が解消し、B型構造がA型構造(一部Z型)に変換する。これらの変化はDNAを硬くし、ヌクレオソームのDNAへの結合を阻害すると予想される。出芽酵母のヌクレオソーム形成モデルを用いて、BrdUがAT-配列特異的にヌクレオソーム形成を破壊する。このとき、抑制されている遺伝子の発現が誘導される。出芽酵母において、特定のヒストン脱アセチル化酵素(Hda1とSir2)の遺伝子破壊細胞がBrdU抵抗性を示し、同過剰産生細胞が感受性を示す。特定遺伝子の発現はBrdU感受性に関与しない。

本研究では、ヒト培養細胞を用いて、BrdUがヌクレオソーム構造の変化を誘発するかどうかを検証する。しかし、従来のヌクレオソーム検出法は、ヒト細胞のゲノム上のヌクレオソーム構造を正確に検出するには感度がやや足りないことが分かっている。したがって、ヌクレオソーム検出法の改良が不可欠となっている。

2. 研究の目的

申請者らは、出芽酵母のヌクレオソーム形成モデル系を利用し、5-ブロモデオキシウリジン(BrdU)がDNAのトポロジーを変えることによってヌクレオソーム構造を破壊し、遺伝子発現を誘導すること明らかにした。本研究では、ヒト老化細胞においても、BrdUがヌクレオソーム構造を変化させるかどうか検証する。具体的には、本研究はヒト細胞のヌクレオソーム構造を鋭敏に検出する方法の改良、初期老化応答遺伝子の近傍におけるヌクレオソーム構造の観察、ヒストン脱アセチル化酵素のヌクレオソームの構造への関与、の三部から構成される。

BrdUの投与によって老化したHeLa細胞および継代培養で老化した正常線維芽細胞について、初期老化応答遺伝子の誘導および抑制にヌクレオソームの構造が関与するかどうかを明らかにする。具体的には、以下の3部に分けて実施する。

- 1) DNAのバンドを増強する「プライマーPCR法」と「プライマー伸長法」の二つを組み合わせ、ヌクレオソーム構造の信頼できる検出系を構築する。
- 2) 細胞老化の初期過程で発現誘導が起こる遺伝子(初期老化応答遺伝子と呼ぶ)の近傍について、ヌクレオソーム構造の変化を解析する。申請者らは、HeLa細胞にBrdUを投与後、12、36、72、96時間ごとにmRNAを回収し、アレー解析によって発現量が増減する遺伝子を30個ほど同定している。これら遺伝子の発現変動にヌクレオソーム構造がどう関与するか明らかにする。次に、正常老化細胞においても同様な解析を行い、ヌクレオソームの構造変化が初期老化応答遺伝子の発現に関与するかどうか調べる。
- 3) 出芽酵母において、10個のヒストン脱アセチル化酵素の遺伝子破壊株と過剰産生株を作製している。このうちの2種の酵素の破壊株がBrdU抵抗性を示し、過剰産生株がBrdU感受性を示した。ヒトホモログ遺伝子を同定し、HeLa細胞の同遺伝子をRNAi法によって抑制し、ヒストン脱アセチル化酵素がヌクレオソーム構造の変化に関与するかどうか調べる。

正常細胞の継代老化系は若い細胞と老化細胞の混在し、老化の進行は遅い。正常細胞の分裂回数は有限なので、細胞工学的実験は困難である。これに対し、BrdUを用いる細胞老化誘導系では、すべての細胞が同調的かつ短時間に老化形質を呈する。とくに重要な点は、不死化細胞株を用いて生化学的・遺伝的解析を行えることである。これらの利点を生かし、初期老化応答遺伝子のカタログを作成した。遺伝子の発現はさまざまな機構によっ

て起きる。クロマチン変化による遺伝子発現を検出しようとするならば、BrdU の初期応答遺伝子を対象とする必要がある。後期応答遺伝子は増殖停止のシグナルや転写因子によって誘導されるからである。

申請者は、ヌクレオソーム構造の変化（遊離と不安定化）によってクロマチン脱凝縮が起こり、不活性遺伝子が誘導されるというモデルを呈示している。従来のモデル（DNA とヒストンの結合力が増強）とは逆である。このモデルが実証されれば、遺伝子発現とクロマチン構造との構造的関係が明らかになるだろう。細胞老化という複雑な現象をクロマチン構造のレベルで統一的に説明できるのは魅力的である。細胞老化の予防法にもつながる。すでに、MAP キナーゼ、チェックポイントキナーゼ（Chk1）、タンパク質合成、G タンパク質などを抑制すると、核膨張と細胞老化が抑制されることを見いだしている。クロマチン構造が細胞老化の必要十分条件になり得ることを示唆する。本研究の特徴は、背景と目的はすべて申請者自身の成果に基づくことである。本研究により、細胞老化の統一理論のみならず、長年の謎であった BrdU の作用機序を解明できると確信する。

3. 研究の方法

ヒト細胞の核 DNA 上のヌクレオソーム配置を鋭敏に検出するために、広範囲のヌクレオソーム配置を解析できる「プライマーPCR法」と精密なヌクレオソーム位置を解析できる「プライマー伸長法」を構築する。次に、BrdU を添加した HeLa 細胞について、初期老化応答遺伝子の近傍におけるヌクレオソーム配置を観察する。継代老化細胞についても同様な解析を行い、目的とするヌクレオソーム配置の変化が老化応答遺伝子の発現誘導に関与することを一般化する。また、出芽酵母において、特定のヒストン脱アセチル化酵素の欠損が BrdU 抵抗性を与えることが判明している。ヒトの相同遺伝子を RNAi 法で抑制し、ヌクレオソーム構造を解析する。

1) プライマーPCR法を用いた広範囲のヌクレオソーム配置（5-7 個）の検出法

出芽酵母系で用いた従来法では、細胞核を粗精製し、マイクロコッカルヌクレアーゼでリンカーDNA を部分的に切断する。DNA を精製し、制限酵素で切断し、RI 標識したプローブを用いて通常のサザンプロット解析を行う。同様な方法により、BrdU を投与した HeLa 細胞の PAI-1 遺伝子について、ヌクレオソーム配置の変化を検出した。ただし、多量の DNA が必要であり、検出されたバンドも薄く、結果は不安定であった（酵母系では感度が 4-50 倍高い）。

本研究では、プライマーPCR法を用いて DNA

を増幅し、検出を容易にする。この方法での検出感度は理論上 100 倍-1000 倍改善され、ヒトゲノム上のヌクレオソーム配置（5-7 個）を正確に決定できると期待する。

2) プライマー伸長法を用いた精密なヌクレオソーム配置（1-2 個）の解析法

上記の方法で増幅した DNA について、プライマー伸長法を用いてマイクロコッカルヌクレアーゼ切断部位を決定する。この方法により、ゲノム DNA 上におけるヌクレオソームの位置を塩基単位で決定できる。

3) BrdU 添加により老化した HeLa 細胞におけるヌクレオソーム解析

HeLa 細胞に BrdU を添加した後、ノザンロット解析によって初期老化応答遺伝子の発現を経時的（0-96h）に追跡すると、9 個の発現パターンが得られる。BrdU 添加 12 時間後に発現量が顕著に誘導される遺伝子と抑制される遺伝子を選定し、従来法と改良法を用いてヌクレオソーム配置を観察する。次に、プライマー伸長法を用いて、ヌクレアーゼ切断部位の詳細なマップを作成する。以上より、初期老化応答遺伝子の発現誘導にヌクレオソームの変動が関与するかどうか明らかになる。また、これら遺伝子の発現パターンの違いにヌクレオソーム構造が関与するかどうかを調べる。

4) 継代老化細胞におけるヌクレオソーム解析

上記の初期老化応答遺伝子は継代老化した正常線維芽細胞でも発現が上昇する。一般に、細胞老化の研究では、新規に観察した現象は継代老化した正常線維芽細胞で確認するのが常である。そこで、若い細胞と老化した細胞との間で上記遺伝子のヌクレオソーム配置を比較する。この実験によって、ヌクレオソーム配置の変化と老化応答遺伝子の発現変動との関係を一般化できる。

4. 研究成果

出芽酵母系で用いた従来法では、細胞核を粗精製し、マイクロコッカルヌクレアーゼでリンカーDNA を部分的に切断する。DNA を精製し、制限酵素で切断し、RI 標識したプローブを用いて通常のサザンプロット解析を行うことによって、容易にヌクレオソーム構造を解析できた。しかし、同様な方法により、ヒト細胞の PAI-1 遺伝子について、ヌクレオソーム配置の変化を検出したが、多量の DNA が必要であり、検出されたバンドも薄く、感度が（酵母系では感度が 4-50 倍高い）不十分であると結論された。

本研究では、ヒト老化細胞においても、5-

プロモデオキシウリジンがヌクレオソーム構造を変化させるかどうか検証した。具体的には、ヒト細胞の初期老化応答遺伝子 PAI-1 遺伝子近傍のヌクレオソーム配置を鋭敏に検出するために、広範囲のヌクレオソーム配置を解析できる「プライマー-PCR 法」と精密なヌクレオソーム位置を解析できる「プライマー伸長法」を構築した。とくに、「プライマー伸長法」を重視し、その開発と応用に時間を割いた。

マイクロコッカルヌクレアーゼで切断した DNA をプライマー伸長で選択的に合成し、とリンカー-DNA を結合させて PCR を行うと、再現性に乏しいバンドが多数出現した。これらの非特異的なバンドをいかにして最小に抑えるかに大半の労力を費やした。最終年度には、いくつかの DNA 修飾酵素を用いて、特異的なバンドを増幅することにほぼ成功した。検出感度は大幅に改善され、ヒトゲノム上のヌクレオソーム配置 (5-7 個) を正確に決定できる段階まで達した。研究は不完全であったが、完成を目指しさらに継続する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

新井 留実、谷脇 歩美、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大：ヒト老化細胞における核内構造の変化 日本農芸化学会 2012、仙台

新井 留実、三木 健輔、藤井 道彦、鮎沢 大：細胞老化に伴う核内及び核膜構造の変化 日本分子生物学会 2013、神戸

末松佑理、山上義己、三木健輔、藤井道彦、鮎沢大：5-プロモデオキシウリジンによる老化応答遺伝子のヌクレオソーム構造の変化 日本農芸化学会 2014、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮎沢大 (AYUSAWA, Dai)
横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科・教授
研究者番号：00142109

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：