

課題番号 66

エピジェネティック制御因子の異常が引き起こす 老化機構の解明

〔1〕組織

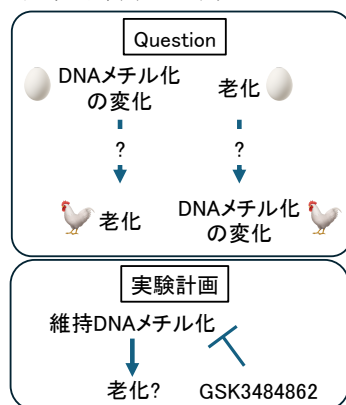
代表者：鶴木 元香
(東京大学大学院医学系研究科)

対応者：宇井 彩子
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 20 万円

〔2〕研究経過

加齢に伴って DNA のメチル化が変化することは、DNA メチル化率から生物学的年齢が予測できることから明らかである。しかしながら、DNA のメチル化の変化が老化の原因なのか、結果なのかは明らかではない。そこで、本共同研究では、その因果関係を明らかにすることを目的として研究を行った。



以下、研究活動状況の概要を記す。

対応者の宇井彩子准教授はクロマチンリモデリング研究の専門家で、本共同研究を進めるにあたり、*zoom* や学会などで数回、研究打ち合わせをおこなった。代表者は長年、ICF 症候群という DNA 低メチル化を伴う遺伝性疾患の分子病態基盤の解明に携わってきた。最近の研究で、ICF 症候群患者細胞では、*CDCA7/HELLS* クロマチンリモデリング複合体の機能喪失により複製非共役型維持 DNA メチル化機構が破綻していることが明らかとなり、本疾患で低メチル化が認められる領域は後期複製領域が主で、加齢に伴い低メチル化する領域と重複することが明らかにされている。*CDCA7/HELLS* クロマチンリモデリング複合体は、DNMT1/UHRF1 維持 DNA メチル化複合体がヘミメチル化 DNA へアクセスすることを促進することで、維持 DNA メチル化に寄与している。*CDCA7* 及び *HELLS* 欠損細胞株では細胞老化マーカーである SA- β -gal 陽性細胞が微増していたことから、

より直接的に維持 DNA メチル化に関与する DNMT1 の酵素活性を阻害することで人為的に低メチル化を引き起こした場合に、細胞老化が引き起こされるかどうかを検討した。

〔3〕成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。
維持 DNA メチル化機構の破綻は、DNA 複製に伴って受動的に低メチル化を引き起こすため、まず予備実験として、HeLa 細胞及び HEK293 細胞の培地に、最近開発された DNMT1 阻害剤である GSK3484862 (Chen et al. NAR Cancer, 2023) を 0.01、0.04、0.1、0.5、1、2、4、10、50 μ M の濃度で添加し、細胞増殖には大きな影響を与えず、DNA のメチル化が低下する濃度を決定した。8 日間の培養後、HeLa 細胞では 0.5 μ M 以下の濃度では細胞増殖に影響はなく、1 μ M の濃度で細胞増殖が 20%ほど抑制され、それ以上の濃度では細胞死が誘導された。HEK293 細胞では、0.1 μ M 以下の濃度では細胞増殖に影響はなく、0.5 μ M 以上の濃度で細胞死が誘導され、DNA メチル化の喪失に対して HEK293 細胞は感受性が高いことが示唆された。増殖がぎりぎり妨げられない 1 μ M の濃度で 8 日間培養した HeLa 細胞からゲノム DNA を抽出し、メチル化感受性制限酵素である HpaII (認識配列：CCGG) でゲノム DNA を切断して、アガロースゲル電気泳動にて DNA メチル化レベルを調べたところ、HpaII 切断断片が 1 μ M GSK3484862 の 8 日間処理で有意に増えていたことから、当該条件でゲノム全体の低メチル化が誘導されることがわかった。この条件で、HeLa 細胞に細胞老化が誘導されたかを、老化マーカーである *p16* と *p21* の発現を指標に qRT-PCR にて調べた。その結果、当該条件で *p16* の発現増加は認められなかったが、*p21* の発現は 3 倍以上に増加していた。さらに細胞毒性の低い 0.5 μ M、14 日間の培養条件では、*p16* の発現は 1.4 倍とわずかに増加し、*p21* の発現は 10 倍以上に増加した。これらの予備実験の結果から、DNA の低メチル化が、細胞老化を誘導する可能性が示唆されたため、細胞老化が起こる過程やシグナル経路を、RNA-seq 法などで詳細に調べる計画を立てた。しかしながら、本研究を行なっている最

中に、Defossez 博士が率いるフランスの研究グループが、DNMT1 や UHRF1 をオーキシメグロン法で分解し、維持 DNA メチル化機構を破綻させると、非古典的なシグナル経路で細胞老化が起こることを、RNA-seq 法などで詳細に調べ、公表した (Chen et al., bioRxiv, 2024: doi.org/10.1101/2024.08.23.609297)。彼らの研究成果は、DNA の低メチル化が細胞老化の原因となることを示しており、代表者の当初計画は先を越されてしまう形になってしまった。

その後、本共同研究テーマである『エピジェネティック制御因子の異常が引き起こす老化機構の解明』に新しい視点から取り組むべく思案していた時に、Sara Selig 博士と Maria Matarazzo 博士が率いるイスラエルとイタリアの ICF 症候群の研究グループから、早期姉妹染色分体分離という異常所見を示す ICF 症候群症例が見つかったとの連絡があり、本症例で変異している ZBTB24 タンパク質 (CDCA7 の転写活性化因子) の機能解析に協力して、国際共同研究として研究成果を国際誌に投稿した (Givol et al. 論文投稿中)。しかしながら、本論文では、早期姉妹染色分体分離の分子病態機構の解明には至っておらず、当該機構の解明は今後の課題となった。

代表者は、これまでの実験データから、CDCA7/HELLS クロマチンリモデリング複合体が、姉妹染色分体を繋ぎ止めるコヒーシン・コンデンシンと相互作用する可能性を免疫沈降 (IP)・質量分析 (MS/MS) 解析と iPOND-MS/MS 解析の結果から見出している。そこで、ICF 症候群では、CDCA7 や HELLS の変異や発現低下により、その相互作用が破綻して姉妹染色分体の接着が緩み、今回見つかった患者のように、早期姉妹染色分体分離が認められることがあるのではないかと考えた。コヒーシンの異常は卵母細胞の老化に関与することが報告されており、コンデンシン II の機能阻害は細胞老化を引き起こすことが報告されているため、エピジェネティック制御因子である CDCA7/HELLS クロマチンリモデリング複合体とコヒーシン・コンデンシンの相互作用の破綻が、染色体不安定性を介して老化を引き起こす可能性を考え、この新しい視点から、本共同研究テーマに取り組むことにした。

東北大学加齢医学研究所との共同研究費で購入した FLAG 抗体、ウェスタンブロットング関連試薬、細胞培養用消耗品を用いて、IP-MS/MS 解析の結果を、IP-Western blotting にて確認し、CDCA7/HELLS 複合体がコヒーシン・コンデンシンとアフィニティーは弱いものの相互作用することを確認した (図)。また、IP-MS/MS 解析を biological triplicate でおこなって結果を堅実なものにするためのサンプル調整を終了し、他施設の共同研究者にサンプルの質量分析を依頼

した。

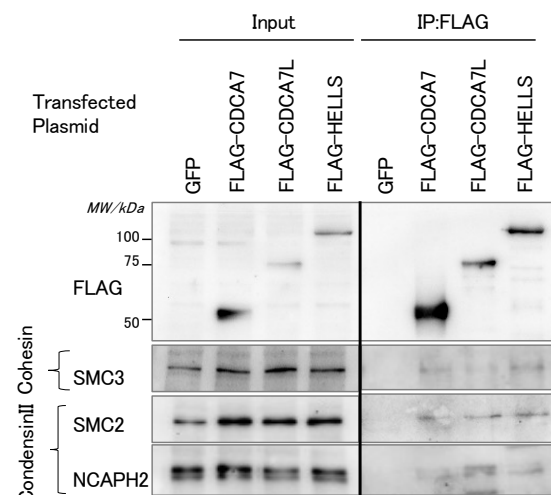
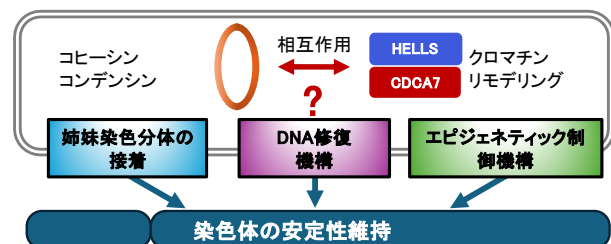


図 CDCA7 (CDCA7L) /HELLS クロマチンリモデリング複合体とコヒーシン・コンデンシン II との免疫沈降による相互作用解析。

今年度は、当初予定していた実験計画が思い通りに進まなかったものの、代表者独自の新しい視点からエピジェネティック因子と老化の関係を明らかにできる可能性がある新たな研究計画の着想に至り、計画の一部をスタートさせることができた。

(3-2) 波及効果と発展性など

今後、代表者は、エピジェネティック因子である CDCA7/HELLS クロマチンリモデリング複合体とコヒーシン・コンデンシンの相互作用を基軸に、姉妹染色分体の接着機構、DNA 修復機構、エピジェネティック制御機構のクロストークを介した染色体安定性維持機構という新研究領域を開拓する予定である。このクロストーク機構の破綻が老化の一因となる可能性は高いため、代表者の取り組みは、新しい視点から老化の理解を進める一助となることが期待される。この新研究領域を開拓するために、代表者は、コヒーシン・コンデンシンの専門家たちと綿密なディスカッションを重ねている。また、代表者は、エピジェネティクス、コヒーシン・コンデンシン、DNA 修復、DNA 複製をつなぐ人的ネットワークの構築も進めており、大型予算の獲得も目指す予定である。これらの取り組みは、本共同研究により大きく後押しされた。



〔4〕 成果資料
該当なし。