

リボザイムを用いた皮膚細胞新規老化遺伝子の単離と解析

筑波大学 応用生物化学系

柳 澤 純

In the somatic cells of humans, the telomere repeats have been proposed to provide each cell with a counting mechanism that helps prevent the unlimited proliferation of wayward cells in adult tissues. According to this idea, somatic cells are born with a full complement of telomeric repeats; however, the telomerase enzyme, hTERT, is turned off in a tissue like the skin, so that each time a cell divides, it loses 50-100 nucleotides from each of its telomeres. After many cell generations, the descendant cells will inherit defective chromosomes and consequently will withdraw permanently from the cell cycle and cease dividing—a process called replicative cell senescence. In theory, such a mechanism could provide a safeguard against the uncontrolled cell proliferation of abnormal cells in somatic tissues.

The idea that telomere length acts as a “measuring stick” to count cell division and thereby regulate the cell’s life time has been tested in several ways. For certain types of human cells grown in tissue culture, the experimental results support the theory. However, the molecular mechanism of replicative cell senescence remains unknown. To investigate this process, we tried to identify new genes, those are involved in the process of replicative cell senescence by the method using ribozyme library. In addition, we examined the transcriptional regulation of hTERT, a human telomerase enzyme. hTERT expression is regulated by the methylation status of its promoter region. To express the TERT, the promoter region should be hypermethylated. In contrast, in somatic cells, the promoter region of TERT is hypomethylated to inhibit the expression of TERT gene. Therefore, we tried to examine the regulation mechanism for DNA methylation and demethylation.

1. 緒言

ヒト正常体細胞を培養すると無限には分裂できず、分列可能回数には限界がある。これを体細胞の有限分裂寿命、または発見者の名をとって Hayflick の分裂限界と呼んでいる。“細胞の老化”とはこの分裂限界に近づくその過程のことをいい、ヒトでは細胞分裂回数が 50～70 回と決まった範囲内で停止する。この分裂寿命は細胞自身の持つテロメア短縮という現象と関連が深いことが明らかになっている。

テロメアとは染色体の両末端に存在する部分で 6 塩基 (–TAAGGG–) の反復配列からなる 12kbp (ヒト) の塩基配列からなる。DNA 複製の際に約 50～150bp ずつ短縮していき、テロメアサイズが 5000bp に近づくと増殖停止機能を持つ CDK inhibitor 遺伝子ファミリーなどの遺伝子群の発現が上昇することにより、細胞増殖を停止する。

このようにテロメア短縮、それに伴う CDK inhibitor 遺伝子ファミリーの発現と細胞の分裂停止には相関関係があると推測されるが、その分子機構については未だ不明のままである。本研究では未だ明らかにされていない細胞老化の分子機構の解明を目的とし、老化を規定する新規の因子の同定を試みる。老化に伴い細胞増殖が抑制されることか

ら細胞増殖抑制を制御する因子が細胞の老化に関与していることが示唆される。増殖抑制に関わる因子の多くは癌抑制因子として知られており、p53 や p21 のように老化関連因子・癌抑制因子両方の因子として機能しているものも知られている。そこで新規癌抑制遺伝子を探索するとともにこれらの遺伝子と老化との関連を解析する。

テロメアの長さは、テロメラゼ (hTERT) と呼ばれる酵素によって調節を受けている。HTERT は germ cell と stem cell において発現が認められ、normal somatic cell では発現が見られない。HTERT 遺伝子の normal somatic cell での発現は、テロメアの伸長による細胞の不死化とそれに引き続く癌化を引き起こす可能性がある。したがって、TERT 遺伝子の発現調節は極めて厳密に行なわれなくてはならない。近年、hTERT 遺伝子の発現調節に TERT 遺伝子プロモーター上の DNA メチル化状態が関与することが報告された。ゲノム DNA の CpG シトシンのメチル化修飾は哺乳類や植物などで広く認められる。DNA のメチル化修飾は遺伝子発現を調節するエピジェネティクス機構の一つとして知られており、遺伝子の転写抑制やヘテロクロマチン形成を介して、初期発生や分化・X 染色体の不活性化・インプリンティングなど様々な生命現象に関わっていると考えられている。また、多くの腫瘍でメチル化異常は癌抑制遺伝子を不活性化したり、ゲノムの不安定化を助長することが知られている。ゲノムのメチル化シトシンは脱アミノ反応で値チミンに変化しやすく、この結果生じた T-G ミスマッチが修復されないと、様々な疾患を引き起こす。

現在、DNA メチル化はメチル化維持活性をもつ Dnmt1 と de novo メチル化活性をもつ Dnmt3a および Dnmt3b に



Molecular cloning of novel genes involved in the aging

Jun Yanagisawa

Institute of Applied Biochemistry,
Tsukuba University

よって調節されていると考えられている。一方、DNA 脱メチル化はその現象は捕らえられているものの、制御機構についてはほとんど明らかになっていないが、受動的脱メチル化と能動的脱メチル化機構があると考えられている。受動的脱メチル化とは、DNA 複製後の新規の DNA 鎖にメチル化がおこらずに維持されることである。能動的脱メチル化とは、複製に依存せずに酵素などの働きによってメチル基が外れることである。

また、メチル化 DNA に特異的に結合するタンパクの存在も明らかになった。現在、MeCP2・MBD1・MBD2・MBD3・MBD4 の 5 種類が知られており、主に DNA メチル化とヒストンの修飾やクロマチンとの相互作用を仲介している。MBD4 は T-G ミスマッチに対するグリコシラーゼ活性をもち、その他は転写抑制に働くと考えられている。そして、これらメチル化 DNA 結合タンパクの異常が遺伝病や腫瘍で認められている。

このように、DNA メチル化脱メチル化がさまざまな生命現象に関わり、また、疾患の原因にもなりうることが明らかとなってきた。しかしながら、どのようにして DNA メチル化パターンが決定し維持され、そして解除されるかという DNA メチル化の時間的空間的制御ネットワークの分子基盤はほとんど解明されていない。そこで我々は hTERT 遺伝子の DNA メチル化・脱メチル化による転写制御機構を明らかにするため、DNA 脱メチル化に関する因子の取得と、脱メチル化機構の解明を目的とし研究を行なった。

2. 実験

2.1 リボゾームライブラリーを用いた老化遺伝子・癌抑制遺伝子のスクリーニング

上記のように、老化遺伝子は、癌抑制遺伝子としての性質を併せ持つ可能性が高い。そこでリボザイムライブラリーを用い、癌抑制遺伝子のスクリーニングを試みた。リボザイムライブラリーとは、酵素 RNA で特異的 mRNA にアニールし触媒活性により mRNA を破壊するリボザイムの集合である。癌抑制因子 mRNA が破壊されると細胞は癌化し、足場依存性が低くなるため、軟寒天培地中での増殖が可能になる。そこでランダムに基質 mRNA を破壊するリボザイムライブラリーを正常細胞に導入し、癌抑制因子 mRNA の破壊された細胞株について、軟寒天培地中での増殖を指標にクリーニングすることを試みた。

2.2 hTERT 遺伝子プロモーター上の脱メチル化機構の解明

前述したように hTERT 遺伝子プロモーターはメチル化・脱メチル化によってその活性の制御が行なわれている。HTERT の発現は、プロモーターの hypermethylation で促進し、逆に hypomethylation で抑制される。DNA のメ

チル化・脱メチル化は、シトシン残基に起こり、hTERT のみならず、多くのプロモーター活性を制御し、転写の活性化・不活化において重要な役割を担っているものと考えられているが、その分子機構についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。そこで、今回はとくに不明な点が多い DNA の脱メチル化機構に焦点をあて、その解析を行なうこととし、まず、DNA 脱メチル化が認められる細胞株を探索することとした。

2.2.1 ヒト IL-2 遺伝子の刺激による脱メチル化誘導

2003 年 3 月にマウス T リンパ球では IL-2 遺伝子プロモーターが刺激により脱メチル化し、IL-2 の分泌が高まると報告された。(nature immunology, 4,235,2003) この脱メチル化反応は 20min で生じ、複製に関わらず脱メチル化することも明らかとなった。そこで、我々は T リンパ球系の細胞株である Jurkat 細胞を用いて、脱メチル化が誘導されるか否か検討した。Jurkat 細胞株に PMA (Phorbol-12-Myristate-13-acetate) 20ng/ml および Ca-ionophore1_M 処理を 24hr 行い、RT-PCR にて IL-2mRNA の発現誘導を検討し、さらに、Bisulfite を用いてメチル化状態を検討した。

2.2.2 マウス APRT 遺伝子の in vivo, in vitro assay を用いた脱メチル化誘導

Cedar らは teratocarcinoma 由来の F9 細胞内で、APRT 遺伝子の脱メチル化が誘導されることを報告した。彼等は plasmid に CpG を含む APRT 遺伝子上流の 25Kb をサブクローニングし、それを F9 細胞に transfection することによって、脱メチル化が誘導されること (nature 371,435,1994)、また、F9 細胞の細胞抽出液と APRT 遺伝子上流のメチル化 DNA fragment とを反応させることによって、脱メチル化されることを明らかにした (Cell, 86, 709, 1996)。そこで、彼らのデータの再現性を調べるため、同様の実験を行なった。

2.2.3 TAT 遺伝子のグルココルチコイドによる脱メチル化誘導

Tyrosine aminotransferase (TAT) 遺伝子は肝臓特異的に発現している。肝細胞において、この遺伝子上流約 24Kb 付近の 4 つの CpG は脱メチル化していることが知られている。一方、発現していない組織では TAT 遺伝子上流の CpG はメチル化していることが報告されている。また、肝細胞ではグルココルチコイドによりこの領域の脱メチル化を誘導できると報告されている。そこで、まず、Bisulfite を用いて実際にグルココルチコイド (Dexamethasone) で、脱メチル化が誘導されるかどうかの検討を行なった。Dex 10^{-7} M で 24 時間処理した後、Bisulfite sequence を行なった。次に、TAT 遺伝子の Dex による脱メチル化反応が複製に関わっているかどうかを検討した。ミモシン mimosine という

G1 期での細胞周期停止薬で処理して、複製を止めた状態で、Dex 処理を行った。なお、mimosine の効果は細胞内への BrdU の取込みの有無で確認した。あらかじめ mimosine 0.5mM で 12 時間処理した細胞に、Dex 10^{-7} M を加え、さらに 12 時間処理した。その後、bisulfite にてメチル化状態を検討した。

① Dexamethasone (dex) による TAT 遺伝子発現誘導

肝細胞に合成グルココルチコイドである dexamethasone (Dex) [10^{-7} M] 処理を 24 時間行い、TAT 遺伝子の上流 -2.5kb 付近の CpG に脱メチル化誘導をかけた。同時に細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行い、dex による Tat 遺伝子発現を確認した。

② TAT 遺伝子プロモーターのメチル化確認

Bisulfite sequencing PCR (DNA の CpG ジヌクレオチドのシトシンをチミンへ化学変化させる方法。メチル化シトシンはチミンに変化しないので、シーケンスによりメチル化を確認できる。) 肝細胞のゲノム DNA を Sodium bisulfite で処理し特定の部分 (図 1 参照) をクローニングし、シーケンスを行った。

③ 細胞周期を同調させた場合の脱メチル化確認

細胞を Mimosine [0.5mM] 処理を 12 時間行い、細胞周期を G1 終盤に同調させて、続いて dex [10^{-7} M] 処理を 12 時間行った。その後、Bisulfite sequencing 法を用いて、メチル化状況を調べた。なお、肝細胞の同調は、BrdU の取り込みにより確認した。

3. 結果と考察

3.1 リボゾームライブラリーを用いた老化遺伝子・癌抑制遺伝子のスクリーニング

軟寒天培地中での増殖を見るため、メチルセルロース濃度 1.8% で癌細胞 (HeLa)、正常細胞 (NIH3T3) をそれぞれ培養した。その結果、HeLa 細胞は癌化しコロニーを形成したが NIH 3 T3 細胞も増殖してしまった。そこで、NIH 3 T3 細胞が増殖を示さない至的培地条件の検討をメチルセルロース濃度を変えて行った。(図)

その結果、NIH 3 T3 細胞はメチルセルロース濃度 2.0% 以降増殖を示さなくなった。一方、HeLa 細胞は 3.0% 以降コロニー形成率が半分ほどに落ち込んだ。これは、メチルセルロースが細胞増殖に悪影響を与えたためと考えられた。

これらの結果から、メチルセルロース濃度を 2.4% とし、リボザイムライブラリーをレトロウイルスを用いて NIH3t3 に感染させスクリーニングを行なった。3 回の独立したスクリーニングを行なったが、足場非依存的増殖を示すクローンが得られなかった。良好な結果が得られない原因として、リボザイムライブラリーの品質とリボザイムによるターゲットの切断効率の低さが考えられるため、今後改良を加え続行をする予定である。

3.2 hTERT 遺伝子プロモーター上の脱メチル化機構の解明

3.2.1 ヒト IL-2 遺伝子の刺激による脱メチル化誘導

Jurkat 細胞では刺激処理によって IL-2 遺伝子の発現が確認されたが、DNA のメチル化については刺激により誘導されておらず、刺激処理前よりすでに脱メチル化されていることが明らかになった。この細胞株は T 細胞系由来のものであり、すでに分化が終了しているものと考えられる、したがって、刺激前より CpG は脱メチル化状態であったと考えられる。この細胞を使って、脱メチル化酵素の精製は行えないと判断した。また、in vitro の脱メチル化活性測定系を用いて、Jurkat 細胞の細胞抽出液中の脱メチル化活性を測定したが、測定可能な脱メチル化活性は Jurkat 細胞抽出液中には存在しないことが明らかとなった。

3.2.2 APRT 遺伝子の in vivo, in vitro assay を用いた脱メチル化誘導

Cedar らとまったく同じ実験系を用いて teratocarcinoma 由来の F9 細胞内で、APRT 遺伝子の脱メチル化が誘導されるか否かを検討した。plasmid に CpG を含む APRT 遺伝子上流の 2.5Kb をサブクローニングし、それを F9 細胞に transfection することによって、脱メチル化が誘導されること、また、F9 細胞の細胞抽出液と APRT 遺伝子上流のメチル化 DNA fragment とを反応させることによって、脱メチル化されることを同様の実験系を用いて確認した。しかしながら、実際に Bisulfite PCR を行い sequence を調べてみると、脱メチル化は誘導されていなかった。以上の結果から、Cedar らの Nature と Cell は実験操作の問題で脱メチル化が誘導されたように見えただけであるとの結論に至った。F9 細胞内で脱メチル化が起こるという報告は、実験操作上のアーティファクトであり、事実ではない。

3.2.3 TAT 遺伝子のグルココルチコイドによる脱メチル化誘導

肝細胞の TAT 遺伝子は、dex 処理によって遺伝子発現が強く誘導されることを RT-PCR で確認した。次に TAT 遺伝子プロモーターのメチル化状態をみるため、Bisulfite sequencing PCR を行った。その結果、CpG 3-5 では dex 処理前は 65% メチル化していたが、処理後メチル化は 4% へと減少した。このことから、dex 処理によって TAT 遺伝子プロモーターの脱メチル化が誘導されることが明らかとなった (Fig. 1 A)。そこで、この脱メチル化が複製依存的かどうかをみるために、細胞周期の同調を施し、dex 処理による脱メチル化誘導を行った。その結果、CpG 3-5 では dex 処理により、脱メチル化が誘導された。このことから、脱メチル化が複製依存的ではなく、積極的な機構によることが証明された (Fig. 1 B)。

一方、GREs より上流の部分の CpG 1,2 については、dex 処理により特に脱メチル化されることはなかった（細胞周期の同調を行った場合も、同様の結果が得られた）（Fig.1 A,B）。Dex 刺激により、GREs の上流で脱メチル化されず、下流で脱メチル化する理由としては、次に示すように様々なものが考えられる。第一に、CpG 1,2 は CpG 3-5 よりも GREs から離れているために、脱メチル化され

にくいという可能性がある。第二に、GRE の上流のクロマチン構造が密になっているために、クロマチンのリモデリングが起こりにくく、脱メチル化機構が抑えられている可能性がある。今後、本系を用いて脱メチル化の分子機構の解析を行い、hTERT 遺伝子制御機構の解明へとつなげたいと考えている。

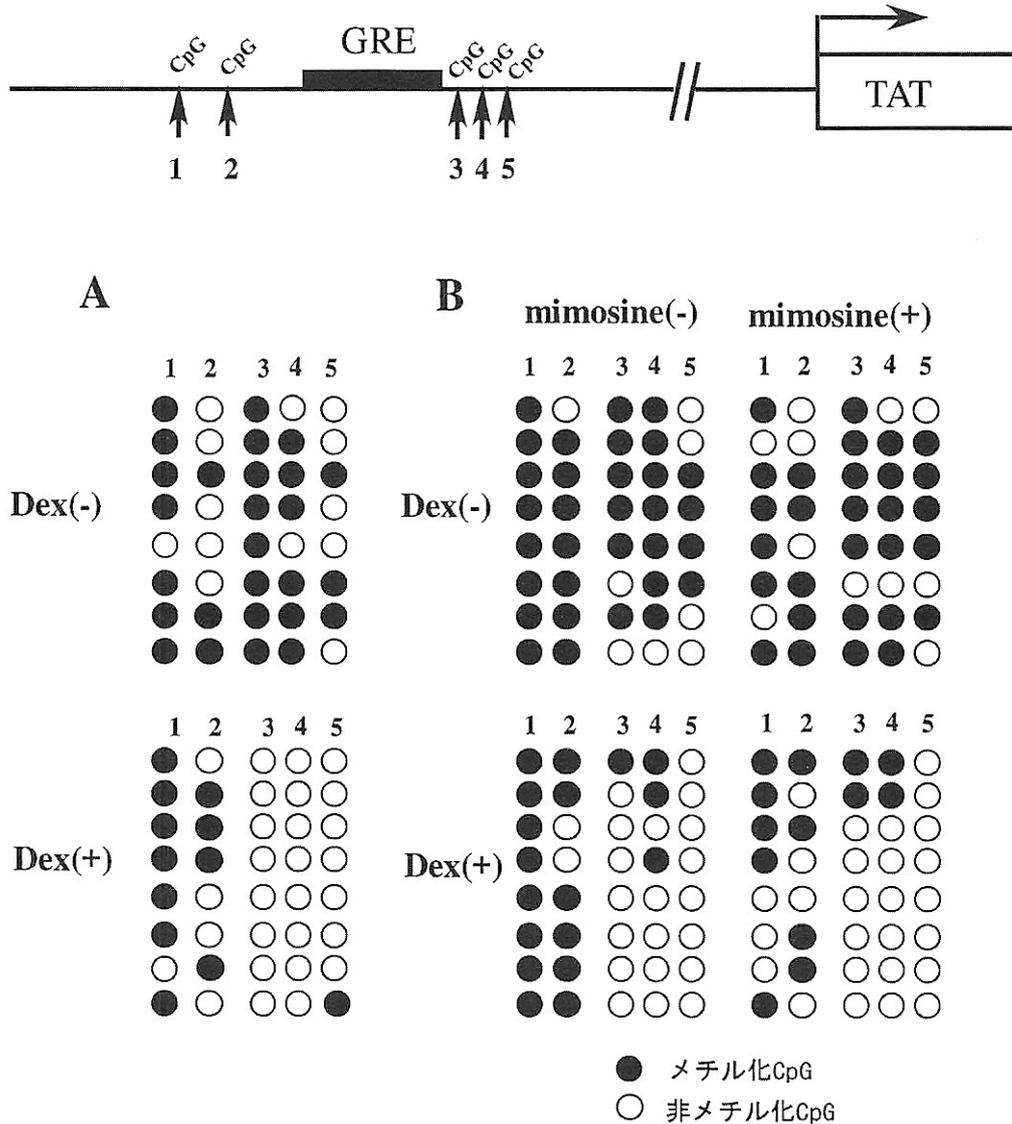


Fig. 1 TAT 遺伝子のグルココルチコイドによる脱メチル化誘導
 A. TAT 遺伝子プロモーターの dexamethasone による脱メチル化誘導
 H4IIE 細胞をグルココルチコイドの合成リガンドである dexamethasone (10^{-7} M) で処理し、24 時間後、Bisulfite sequencing 法でメチル化状態について検討した。
 B. 複製非依的な脱メチル化誘導
 G1 期への細胞周期同調剤である mimosine (0.5mM) を 12 時間処理後、dexamethasone (10^{-7} M) で 12 時間処理し、Bisulfite sequencing 法でメチル化状態について検討した。