

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

|                   |                                                                                                                                                                                        |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 題目(和文)            | 細胞老化におけるクロマチン凝縮の分子機構                                                                                                                                                                   |
| Title(English)    |                                                                                                                                                                                        |
| 著者(和文)            | 舟山亮                                                                                                                                                                                    |
| Author(English)   |                                                                                                                                                                                        |
| 出典(和文)            | 学位:博士（理学）,<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第6745号,<br>授与年月日:2007年3月26日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:                                                                                              |
| Citation(English) | Degree:Doctor of Science,<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第6745号,<br>Conferred date:2007/3/26,<br>Degree Type:Course doctor,<br>Examiner: |
| 学位種別(和文)          | 博士論文                                                                                                                                                                                   |
| Type(English)     | Doctoral Thesis                                                                                                                                                                        |

平成 18 年度  
学位論文

細胞老化におけるクロマチン凝縮の分子機構

東京工業大学  
大学院生命理工学研究科  
生命情報専攻  
**01D23127**

舟山 亮

指導教官

岸本 健雄 教授  
石川 冬木 教授

# 目次

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| 略語                                                    | 4  |
| 要旨                                                    | 6  |
| 第 1 章 序論と目的                                           | 10 |
| 1.1 細胞老化                                              | 11 |
| 1.2 細胞老化における増殖停止の分子機構                                 | 12 |
| 1.3 がん抑制機構としての細胞老化の役割                                 | 13 |
| 1.4 細胞老化における増殖停止の不可逆性                                 | 14 |
| 1.5 クロマチンの構造と染色体テリトリー                                 | 16 |
| 1.6 Senescence-Associated Heterochromatic Focus: SAHF | 17 |
| 1.7 本研究の目的                                            | 18 |
| 1.8 本論文の構成                                            | 19 |
| 第 2 章 結果 老化細胞における凝縮クロマチンの構造解析                         | 25 |
| 2.1 がん遺伝子 RasG12V の遺伝子導入による細胞老化の誘導                    | 26 |
| 2.2 Ras 老化細胞におけるセントロメアの局在                             | 27 |
| 2.3 Ras 老化細胞の FISH 解析                                 | 27 |
| 2.4 Ras 老化細胞における DAPI 陰性領域の機能解析                       | 28 |
| 2.5 Ras 老化細胞における PML ボディーの局在解析                        | 29 |
| 2.6 Ras 老化細胞におけるヒストンの翻訳後修飾の解析                         | 30 |
| 第 3 章 結果 リンカー DNA 結合蛋白質による細胞老化表現型の制御                  | 39 |
| 3.1 SAHF 形成に伴って変化するクロマチン結合蛋白質の解析                      | 40 |
| 3.2 Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の消失                           | 41 |
| 3.3 さまざまな老化細胞における SAHF 形成とヒストン H1 の消失                 | 42 |
| 3.4 老化細胞におけるヒストン H1 消失の分子機構                           | 43 |
| 3.5 ヒストン H1 の強制発現とノックダウンの試み                           | 44 |
| 3.6 ヒストン H1-EGFP 融合蛋白質の発現による<br>細胞老化表現型の部分的な誘導        | 45 |
| 3.7 Ras 老化細胞における HMGA2 の増加                            | 46 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 3.8 ヒストン H1 と HMGA2 の置換による SAHF 形成の制御 | 47 |
| 第 4 章 考察                              | 59 |
| 4.1 SAHF：新規のクロマチンの凝縮形態                | 60 |
| 4.2 ヒストン H1 消失の分子機構                   | 62 |
| 4.3 ヒストン H1 と HMGA2 の置換による SAHF 形成の制御 | 63 |
| 4.4 ヒストン H1 の消失と細胞老化表現型               | 65 |
| 4.5 今後の展望                             | 67 |
| 第 5 章 実験材料および方法                       | 71 |
| 参考文献                                  | 79 |
| 謝辞                                    | 85 |
| 講演目録                                  | 86 |
| 報文目録                                  | 86 |

## 略語

|              |                                               |
|--------------|-----------------------------------------------|
| Asf1         | anti-silencing factor 1                       |
| BrU          | bromouridine                                  |
| BrdU         | bromodeoxyuridine                             |
| BSA          | bovine serum albumin                          |
| CBB          | coomassie brilliant blue                      |
| CCD          | charge-coupled device                         |
| CDK          | cyclin-dependent kinase                       |
| CMV          | cytomegalovirus                               |
| DAPI         | 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride |
| DMEM         | Dulbecco's modified Eagle's medium            |
| DNA          | deoxyribonucleic acid                         |
| DTT          | dithiothreitol                                |
| EDTA         | ethylenediaminetetraacetic Acid               |
| EF1 $\alpha$ | elongation factor 1 $\alpha$                  |
| FBS          | fetal bovine serum                            |
| FISH         | fluorescence <i>in situ</i> hybridization     |
| HA           | hemagglutinin                                 |
| HIRA         | histone regulation A                          |
| HMGA2        | high mobility group A2                        |
| HP-1         | heterochromatin protein 1                     |
| HRP          | horseradish peroxidase                        |
| IgG          | immunoglobulin G                              |
| LSC          | laser-scanning cytometer                      |
| LTR          | long terminal repeat                          |
| MAPK         | mitogen-activated protein kinase              |
| MKK6         | MAPK kinase 6                                 |
| PBS          | phosphate-buffered saline                     |
| PI           | propidium iodide                              |
| PML          | promyelocytic leukemia                        |
| PVDF         | polyvinylidene fluoride                       |
| Rb           | retinoblastoma                                |

|          |                                                           |
|----------|-----------------------------------------------------------|
| RNA      | ribonucleic acid                                          |
| RNAi     | RNA interference                                          |
| RNase    | ribonuclease                                              |
| SAHF     | senescence-associated heterochromatic foci                |
| SDS      | sodium dodecyl sulfate                                    |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| Tris     | Tris (hydroxymethyl) aminomethane                         |

## 要旨

ヒトの正常細胞は、染色体末端テロメア DNA の短小化、酸化ストレス、あるいはがん遺伝子の活性化などのさまざまなストレスに応答して不可逆的に増殖を停止する。これを細胞老化という。細胞老化は、ストレスを受けた細胞の増殖を安定に抑制することにより、生体内のがん抑制機構のひとつとして働いていると考えられている。また、老化細胞は増殖を停止だけでなく、細胞の肥大化、酸性条件下での $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇やヘテロクロマチンの形成などの特徴的な変化を示す。このうち、老化細胞のヘテロクロマチン (Senescence-Associated Heterochromatic Focus, SAHF) は、細胞の増殖に必要な遺伝子の発現を抑制することにより、老化状態の安定な維持に寄与していると考えられている。しかしながら、SAHF 構造の実体や SAHF 形成の分子機構についてはよく分かっていない。そこで本研究では、細胞老化における SAHF 形成の役割を明らかにすることを目的として、SAHF 構造の詳細と SAHF 形成の分子機構について調べた。

本研究では、がん遺伝子 RasG12V をヒト正常線維芽細胞 WI-38 に導入して細胞老化を誘導した。まず、RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導した細胞（以下、Ras 老化細胞）とベクターのみを導入した、増殖している mock 細胞を DAPI 染色し、染色パターンを比較した。その結果、Ras 老化細胞では核内全体に斑点状の凝縮クロマチンが観察され、SAHF が形成されたことを確認した。興味深いことに、SAHF は非常に大きく、若い細胞で見られる不活性 X 染色体より大きいものも観察された。この観察から、Ras 老化細胞の一つの SAHF は一つの染色体に由来する巨大な構造体であると考えられた。この仮説を検討するために、セントロメア蛋白質に対する抗体を用いて Ras 老化細胞の免疫染色を行い、個々の染色体のセントロメアを可視化した。その結果、Ras 老化細胞の一つの SAHF はセントロメアシグナルを一つだけもち、SAHF が一つの染色体に由来する構造体であるという仮説とよく一致した。この仮説をさらに検討するために、12 番染色体全体を認識する DNA プローブを用いて Ras 老化細胞の FISH 解析を行った。その結果、Ras 老化細胞では 2 つの FISH シグナルが観察され、これらのシグナルは 2 つの SAHF シグナルとほぼ完全に一致した。以上の結果から、Ras 老化細胞の一つの SAHF は一つの染色体に由来する構造体であることが明らかになった。

分裂期の凝縮染色体、アポトーシス細胞の凝縮クロマチン、および転写の不活性なヘテロクロマチンは、最もよく研究されたクロマチンの凝縮形態である。これらの凝縮クロマチンは、それぞれ特異的なヒストンの翻訳後修飾により特徴付けられ、分裂期染色体ではヒストン H3 Ser10 と Ser28 のリン酸化、アポトーシス細胞の凝縮クロマ

チンではヒストン H2B Ser14 のリン酸化、およびヘテロクロマチンではヒストン H3 Lys9 のメチル化が観察される。そこで、SAHF がこれらの凝縮クロマチンと関係しているかどうかを調べるために、修飾特異的な抗ヒストン抗体を用いて、Ras 老化細胞のヒストンの翻訳後修飾を調べた。その結果、Ras 老化細胞の SAHF は、分裂期染色体およびアポトーシス細胞の凝縮クロマチンで観察されるヒストンのリン酸化を示さず、これらの凝縮クロマチンとは異なる性質をもつと考えられた。一方、免疫染色の結果、Ras 老化細胞の SAHF は、ヘテロクロマチンで観察されるジメチル化ヒストン H3 Lys9 のシグナルとよく共局在した。しかしながら、ジメチル化ヒストン H3 Lys9 のシグナルは若い細胞でも核内全体に観察された。また、イムノブロット解析の結果、ジメチル化ヒストン H3 Lys9 の総量は、若い細胞と Ras 老化細胞とで同じであった。これらの結果から、Ras 老化細胞の SAHF は、転写の不活性なヘテロクロマチンとも異なる性質をもつと考えられた。

次に、老化細胞における SAHF 形成の分子機構を調べるために、生化学的な解析を行った。増殖している若い細胞と Ras 老化細胞からクロマチン蛋白質を調製し、SDS-PAGE により分離後、CBB 染色を行った。その結果、若い細胞と Ras 老化細胞で異なるパターンを示す複数の蛋白質バンドを明らかにした。質量分析とイムノブロット解析の結果、Ras 老化細胞で消失している蛋白質としてヒストン H1、Ras 老化細胞で増加している蛋白質として High Mobility Group A2 (HMGA2) を同定した。興味深いことに、これら 2 つの蛋白質はヌクレオソーム間のリンカー DNA に結合する蛋白質であった。

全細胞抽出液を用いたイムノブロット解析の結果、ヒストン H1 はクロマチン画分だけでなく、細胞全体から消失していると考えられた。ヒストン H1 はクロマチンの高次構造の安定化に重要であると考えられているので、高度に凝縮したクロマチン構造である SAHF においてヒストン H1 が消失しているのは予想外であった。また、ヒストン H1 の消失は、RasG12V の導入により誘導される細胞老化だけでなく、染色体末端テロメア DNA の短小化により誘導される複製老化細胞などでも観察された。さらに、老化細胞でのヒストン H1 の消失は SAHF の形成効率とよく相関して観察された。これらの結果から、細胞老化におけるヒストン H1 の消失は、さまざまな種類の老化細胞において SAHF 形成と一致して起こる現象であることが明らかになった。

そこで、細胞老化および SAHF 形成におけるヒストン H1 消失の役割を調べる実験を行った。まず、若い細胞にヒストン H1 を強制的に発現させた後、RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導し、細胞老化表現型と SAHF 形成効率を調べた。しかしながら、この方法では、ヒストン H1 の蛋白質量を回復させることができず、ヒストン

H1 の存在が細胞老化や SAHF 形成に抑制的に働いているかどうかを調べることができなかった。次に、若い細胞のヒストン H1 の発現を RNAi (RNA interference) により抑制し、ヒストン H1 の消失が細胞老化表現型や SAHF 形成を誘導するかどうかを調べた。しかしながら、ヒトの体細胞では少なくとも 6 種類のヒストン H1 のバリエーションが存在するため、RNAi によりヒストン H1 を減少させることはできなかった。したがって、老化細胞で観察されるヒストン H1 の消失が、細胞老化や SAHF 形成の誘導に重要な役割を果たしているかどうかを直接的に明らかにすることはできなかった。

次に、ヒストン H1 と緑色蛍光蛋白質 (EGFP) との融合蛋白質を作製して増殖している若い細胞に遺伝子導入し、その効果を調べた。その結果、ヒストン H1 の N 末端側に EGFP を融合した蛋白質 (N-fusion H1) を遺伝子導入すると、細胞は急激に増殖を停止することが分かった。また、この細胞は肥大化し、酸性条件下で  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が上昇することから、細胞老化表現型を示していると考えられた。さらに重要なことに、N-fusion H1 を導入した細胞では、内在性ヒストン H1 を含めた総ヒストン H1 蛋白質量が著しく減少していた。これらの結果から、増殖停止を含む一部の細胞老化表現型は、ヒストン H1 の消失とよく相関して誘導されることが分かった。ただし、N-fusion H1 を導入した細胞は SAHF 形成を示さないことから、SAHF 形成にはヒストン H1 の消失のほかに何らかの因子が必要であると考えられた。

既に述べたように、老化細胞ではヒストン H1 の消失と一致して HMGA2 が増加していた。また、最近、老化細胞の SAHF 形成には HMGA2 が関与していることが報告された。そこで、老化細胞の SAHF 形成には、ヒストン H1 と HMGA2 が置き換わることが重要ではないかと考えた。この仮説を検討するために、若い細胞に HA-HMGA2 を遺伝子導入した後、さらに N-fusion H1 を遺伝子導入して、内在性ヒストン H1 と HA-HMGA2 が置き換わる状態を再現した。HA-HMGA2 を単独で遺伝子導入した場合、細胞は SAHF 形成も老化表現型も示さなかった。しかしながら、HA-HMGA2 と N-fusion H1 を共発現させた細胞では、SAHF 形成が有意に誘導された。これらの結果から、老化細胞の SAHF 形成には、ヒストン H1 と HMGA2 の置換が重要であることが明らかになった。

本研究の結果、老化細胞の個々の SAHF は、それぞれ一つの染色体に由来する巨大な構造体であることが明らかになった。また、この構造体はこれまで考えられていた転写の不活性なヘテロクロマチンとは異なり、リンカー DNA 結合蛋白質の変化を伴う新規のクロマチンの凝縮形態であることが明らかになった。今後、ヒストン H1 消失の分子機構を明らかにし、また、細胞老化の誘導とヒストン H1 消失との因果関係を明らかにすることが重要である。これらの問題を明らかにすることにより、がんの予

防および治療の標的となる新たな現象の分子基盤が明らかになると期待される。

## 第 1 章

### 序論と目的

## 1.1 細胞老化

ヒトの正常組織から単離した細胞は、培養環境下で有限の回数分裂した後、次第に増殖能力を失い、最終的に不可逆的に増殖を停止する(Hayflick and Moorhead, 1961)。これを複製老化という(図 1-1)。複製老化細胞は、細胞の肥大化、酸性条件下での $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性(老化関連 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性)の上昇やクロマチンの凝縮(senescence-associated heterochromatic focus, SAHF)などの特徴的な変化を示す(Dimri et al., 1995) (Narita et al., 2003)。

複製老化は最も研究された細胞老化のひとつで、その原因や分子機構がよく調べられている。未分化な細胞を除く多くのヒト正常細胞は、染色体末端テロメア DNA を伸長する酵素テロメラーゼをもたないので、S 期にテロメア DNA を完全に複製することができず、増殖の結果テロメア DNA が短小化する(Harley et al., 1990)。短小化したテロメア DNA は、DNA 損傷チェックポイントを活性化し続け、その結果、細胞は不可逆的に増殖を停止する(d'Adda di Fagagna et al., 2003; Gire et al., 2004)。実際に、DNA 損傷応答に重要な ATM、ATR、Chk1 および Chk2 を欠損した細胞は、複製老化表現型を部分的に回避する(d'Adda di Fagagna et al., 2003; Gire et al., 2004)。また、テロメラーゼを強制的に発現したヒト正常線維芽細胞は、細胞分裂に伴うテロメア DNA の短小化および DNA 損傷チェックポイントの活性化を示さず、同時に複製老化表現型を示さない(Bodnar et al., 1998; Gire et al., 2004)。したがって、複製老化はテロメア DNA に依存した細胞老化であると考えられる。

これに対して、ストレス誘導性早期老化(stress-induced premature senescence)と呼ばれる細胞老化は、テロメア DNA 非依存的に、複製老化とよく似た表現型を誘導する(図 1-1)。例えば、マウス胚から調製した線維芽細胞は、ヒト線維芽細胞より長いテロメア DNA をもつにもかかわらず、ヒトよりも少ない回数の細胞分裂後に老化表現型を示す(Sherr and DePinho, 2000)。また、増殖しているヒト正常線維芽細胞を致死量以下の過酸化水素で処理すると、細胞は直ちに老化表現型を示す(Chen and Ames, 1994) (Serrano et al., 1997)。これらの細胞老化はテロメア DNA の短小化を伴わず、またテロメラーゼの強制発現によって抑制されないことから、テロメア DNA 非依存的に起こると考えられる(Wei et al., 1999)。通常、細胞老化という言葉は、複製老化とストレス誘導性早期老化とを合わせて指す。

がん遺伝子 RasG12V の発現により誘導される細胞老化は、ストレス誘導性早期老化のひとつで、特にがん遺伝子誘導性老化(oncogene-induced senescence, OIS)という。1.3 節で詳しく述べるように、OIS は生体内のがん抑制機構として重要な役割を果たしていると考えられている。Ras は細胞膜の細胞質側に局在する低分子量 GTP 結合蛋白

質で、GTP を結合した活性型と GDP を結合した不活性型が存在する。GTP 結合活性型 Ras は、MAPKKK である Raf との結合を介して、Raf-Mek-Erk の MAPK シグナル伝達経路を活性化し、細胞の増殖を正に制御する(Kolch, 2005)。Ras のがん性変異体 RasG12V は、多くのがん細胞で見られる突然変異のひとつで、GTP を加水分解することができない。したがって、RasG12V は構成的に活性型状態にあり、持続的に増殖シグナルを発生して、細胞のがん化に大きく関わっている。興味深いことに、RasG12V の遺伝子導入は、NIH-3T3 細胞などの不死化した細胞株では増殖の亢進を引き起こすが、有限寿命の正常細胞では細胞老化を誘導する(Serrano et al., 1997)。正常細胞は、過剰な増殖シグナルに対して、細胞老化を誘導することにより、がん化を抑制していると考えられている(1.3 節)。最近、RasG12V により誘導される細胞老化の分子機構が報告された(Di Micco et al., 2006)。RasG12V の遺伝子導入の直後、正常細胞は一過的に異常な増殖の亢進を示す。このとき、S 期の細胞では複製起点が異常に発火し、その結果生じた損傷 DNA が DNA 損傷チェックポイントを活性化することにより、細胞は増殖を停止する。したがって、RasG12V による細胞老化は、複製老化と同じように、持続的な DNA 損傷チェックポイントの活性化により誘導されると考えられる。

## 1.2 細胞老化における増殖停止の分子機構

細胞老化は 2 つのがん抑制遺伝子 p53 と Rb により制御されており、これらの蛋白質を同時に不活性化する SV40 の large T 抗原は、ヒト線維芽細胞の老化表現型の誘導を抑制する(Ben-Porath and Weinberg, 2005; Shay et al., 1991)(図 1-2)。同様に、p53 と Rb をそれぞれ不活性化するヒトパピローマウイルスの E6 と E7 は、細胞に同時に遺伝子導入すると細胞老化の誘導を抑制する(Shay et al., 1991)。p53 は、DNA 損傷を含めたさまざまなストレスに応答して活性化する転写因子で、老化細胞ではセリン 15 がリン酸化されて蛋白質が安定化し、転写活性化能が上昇する。活性化した p53 は、標的遺伝子である p21 サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害因子の発現を増加させる。p21 は、さらに、サイクリン-CDK 複合体の酵素活性を阻害して、転写調節因子 Rb を低リン酸化型(活性化型)にする。活性化型 Rb は、G1 期から S 期への移行に重要な E2F ファミリーの転写因子の機能を抑制し、その結果、老化細胞は G1 期で細胞周期を停止する(図 1-2)。

このモデルでは、p53 は p21 を介して Rb にシグナルを伝えるので、p53 と

Rb は細胞老化を誘導する一つのシグナル伝達経路を形成するよう見える。しかし、p21 のノックアウトマウスから調製した線維芽細胞は、野生型マウスの線維芽細胞と同様に細胞老化表現型を示す(Pantoja and Serrano, 1999)。また、既に述べたように、E6 と E7 を同時に遺伝子導入したヒト線維芽細胞は、細胞老化を回避するが、これらを単独で導入した細胞は回避することができない(Shay et al., 1991)。これらの結果から、p53 と Rb は、細胞老化を誘導する独立のシグナル伝達経路を形成すると考えられる(Ben-Porath and Weinberg, 2005)。しかし、p53 が Rb 非依存的に細胞老化を誘導する分子機構の詳細は分かっていない(図 1-2)。

p16<sup>INK4a</sup>は、細胞老化の過程でp53 とは独立に発現上昇するCDK阻害因子である。p21 がサイクリン-CDK複合体の酵素活性を阻害するのに対して、p16<sup>INK4a</sup>は、CDK4 またはCDK6 と結合することにより、サイクリン-CDK複合体の形成を阻害する。その結果、Rbは活性化型となり、E2Fの活性を抑制して細胞周期を停止させる。p16<sup>INK4a</sup>が細胞老化のどのような状況に応答して発現上昇するのかについてはよく分かっていないが、Etsファミリーの転写因子が発現を制御することが知られている(Ohtani et al., 2001)。

細胞は異なるストレス刺激に対して、細胞老化という特定の表現型を示す。すなわち、細胞には、異なるストレスからのシグナルを集約し、細胞老化へ向かう 1 つのシグナルに変換する分子機構が存在すると考えられる。p38 MAP キナーゼは、複製老化およびストレス誘導性早期老化において共通にリン酸化される蛋白質キナーゼである(Iwasa et al., 2003) (Wang et al., 2002)。ヒト正常線維芽細胞に、p38 をリン酸化する MKK6 の構成的活性化型変異体 (MKK6EE) を遺伝子導入すると、細胞は急速に老化表現型を示す。また、ヒト正常線維芽細胞の複製老化およびマウス線維芽細胞のストレス誘導性早期老化は、それぞれ、MKK6 のドミナントネガティブ変異体 (MKK6AA) および p38 の特異的阻害剤 SB203580 により抑制される(Iwasa et al., 2003)。したがって、p38 は、異なるストレス刺激により誘導される複製老化およびストレス誘導性早期老化において、共通に重要な役割をもつシグナル伝達分子である(Ishikawa, 2003)。

### 1.3 がん抑制機構としての細胞老化の役割

正常細胞が培養環境下で有限の分裂寿命をもつのに対して、多くのがん組織由

来の細胞株は無限に増殖する能力をもつ。また、既に述べたように、細胞老化はがん抑制遺伝子 p53 と Rb に依存して細胞の増殖を抑制する。これらのことから、細胞老化が生体内のがん抑制機構として機能していることは予想されていた(Campisi, 2005)。また、老化細胞に特徴的な老化関連β-ガラクトシダーゼ活性を指標にして、生体内に細胞老化表現型を示す細胞が存在することも知られていた(Dimri et al., 1995)。

最近、細胞老化が生体内のがん抑制機構として機能していることを示す複数の報告がなされている(Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Lazzerini Denchi et al., 2005; Michaloglou et al., 2005)。内在性のK-ras遺伝子に発がん性の変異 (G12V) をもつマウスは、肺および膵臓において、前がん状態にある腺腫 (adenoma) と悪性化した腺がん (adenocarcinoma) を形成する(Guerra et al., 2003)。前がん状態の腺腫は、CDK阻害因子p16<sup>INK4a</sup>の増加や老化関連β-ガラクトシダーゼ活性の上昇を含めた複数の細胞老化表現型を示すが、悪性化した腺がんは示さない(Collado et al., 2005)。これらの結果は、前がん状態の腫瘍細胞において細胞老化が起きていることを示しており、細胞老化が腫瘍細胞の悪性化を抑制している可能性が示唆された。

また、色素性母斑と呼ばれる皮膚のほくろは、メラニン細胞が重層に密集して形成される良性腫瘍である。色素性母斑を形成する細胞は、しばしば蛋白質リン酸化酵素BRAFの発がん性変異 (V600E) をもつことが知られているが、悪性化して黒色腫に変化することは少なく、一生を通して増殖が抑制される場合が多い。ヒトの正常なメラニン細胞にBRAF<sup>V600E</sup>を遺伝子導入すると、細胞は*in vitro*で急速に細胞老化表現型を示す(Michaloglou et al., 2005)。また、皮膚の色素性母斑を形成する細胞は、老化関連β-ガラクトシダーゼ陽性を示す。これらの結果から、BRAF<sup>V600E</sup>の発がん性変異は、前がん状態の色素性母斑において細胞老化を誘導し、メラニン細胞のがん化を抑制していることが示唆された。さらに、色素性母斑を形成する細胞は正常なメラニン細胞と同程度のテロメア長をもつことから、観察された細胞老化表現型はストレス誘導性早期老化であると考えられた(Michaloglou et al., 2005)。これらの報告から、細胞老化は、がん遺伝子を獲得した細胞の増殖を安定に抑制することで、生体内のがん抑制機構として働いていると考えられる (図 1-3) (Schmitt, 2003)。

#### 1.4 細胞老化における増殖停止の不可逆性

複製老化細胞は、栄養と増殖因子に富む培養環境下でも安定に増殖を停止しており、複製老化を回避して増殖を再開することはない。細胞老化のがん抑制機構としての機能は、この増殖停止の不可逆性により発揮されると考えられている。老化細胞が増殖を停止するためには、既に述べたCDK阻害因子p21 と p16<sup>INK4a</sup>が重要な役割を果たすが、これらの因子だけでは老化細胞の増殖停止の不可逆性を説明することはできない。最近、増殖停止の不可逆性を説明する2つのモデルが提唱された（図 1-4）(Narita et al., 2003; Takahashi et al., 2006)。

既に述べたように、p53 と Rb の不活性化は細胞老化への進行を抑制する。しかし、既に複製老化に達したヒト細胞で p53 と Rb を不活性化しても、細胞は DNA 合成を行うことはできるが、増殖を再開することはできない(Gorman and Cristofalo, 1985)。このことから、老化細胞には G2 期または M 期で細胞周期を停止させる何らかの分子機構がある可能性が示唆されていた。温度感受性 large T 抗原を発現するヒト線維芽細胞 SVts8 は、非制限温度（34℃）では p53 と Rb が不活性化して無限に増殖するが、血清の存在下、制限温度（38℃）で培養すると急速に細胞老化を起こす(Takahashi et al., 2006)。制限温度下で血清による増殖刺激を受けた細胞では、活性酸素種が増加し、蛋白質リン酸化酵素 PKC $\delta$ が活性化する（図 1-4A）。活性化した PKC $\delta$ は、細胞質分裂の完了に重要な蛋白質リン酸化酵素 WARTS の減少を介して、細胞質分裂を抑制する。したがって、老化細胞は、CDK 阻害因子の蓄積による G1 期での細胞周期の停止に加えて、M 期で細胞周期を停止させる機構をもつ。また、ヒト正常線維芽細胞に活性化型 PKC $\delta$ を強制的に発現すると、活性酸素種が増加して細胞老化が起こることから、活性酸素種と PKC $\delta$ の間にはポジティブフィードバックループが存在すると考えられる（図 1-4A）。このことから、老化細胞は、持続的な活性酸素種の増加と PKC $\delta$ の活性化により細胞質分裂を抑制して、不可逆的な増殖停止を保証している。

増殖停止の不可逆性を説明するもう一つのモデルは、本研究の対象であるヘテロクロマチン形成である（図 1-4B）(Narita et al., 2003)。次節で詳しく述べるが、細胞の核は、DAPI などの DNA 結合色素によって淡く染まるユークロマチン領域と、濃く染まるヘテロクロマチン領域に分けられる。一般に、ユークロマチンは転写の活性が高く、ヘテロクロマチンは転写が不活性であることがよく知られている。増殖しているヒト正常線維芽細胞や低血清環境下で一過的に増殖を停止している細胞の核は、DNA 結合色素により比較的一様に染色さ

れるが、老化細胞の核は斑点状に染色される(Narita et al., 2003)。この斑点状の構造は、メチル化ヒストン H3 (Lys9)や heterochromatin protein 1 (HP-1)などのヘテロクロマチンに特徴的な蛋白質をもつことから、senescence-associated heterochromatic focus (SAHF: サーフ)と呼ばれる。一方、老化細胞では、G1 期から S 期への移行に重要なサイクリン A や PCNA の遺伝子がヘテロクロマチン化される。これらの遺伝子のヘテロクロマチン化は、増殖している細胞や一過的に増殖を停止した細胞では観察されず、老化細胞において SAHF の出現とよく一致して観察される。したがって、老化細胞は、細胞の増殖に必要な遺伝子の発現を SAHF 形成により安定に抑制することで、G1 期で細胞周期を不可逆的に停止すると考えられる (図 1-4B)。

## 1.5 クロマチンの構造と染色体テリトリー

クロマチンは、それぞれ 2 分子のコアヒストン H2A、H2B、H3 および H4 から成るヒストン八量体と、その周囲を約 1.8 回転巻きついた約 146 塩基対の DNA から構成され、この構成単位をヌクレオソームという (図 1-5A) (Hayes and Hansen, 2001; Luger and Hansen, 2005)。ヌクレオソーム同士は、少なくとも 20 塩基対以上のリンカーDNAによりつながって直径約 10 nm の繊維を形成し、さらにこの繊維が 1 周約 6 ヌクレオソームになる形で巻きついて直径約 30 nm の繊維を形成する。この 30 nm の繊維状構造は、ヌクレオソームとリンカーDNAに結合するヒストン H1 により安定化されと考えられている(Robinson and Rhodes, 2006; Thoma et al., 1979)。したがって、ヒストン H1 はクロマチンの高次構造の安定化に寄与する蛋白質である。

細胞周期の間期の核では、染色体を構成するクロマチンは核内に一様に分布するのではなく、特定の領域に局在する。これを染色体テリトリーという (図 1-5A) (Cremer and Cremer, 2001)。個々の染色体テリトリーは、染色体間ドメイン (interchromosome domain) と呼ばれる網の目状の空間により区画化されている。染色体間ドメインには、転写の活発に行われているユークロマチンや転写に関係する蛋白質が多く存在し、RNA の転写、成熟や輸送が行われている(Williams, 2003)。また、染色体間ドメインには、PML ボディーなどの核内構造体が局在することが知られている(Bridger et al., 1998)。

ヒストンにはアミノ酸配列のよく似た複数の蛋白質が存在し、これをバリエーションという。例えば、ヒトのヒストン H1 には、生殖細胞に特異的なバリエーションを含めると

少なくとも 10 種類が存在し、これらはすべて異なる遺伝子によりコードされている (Marzluff et al., 2002)。バリエーションの変化はクロマチンの機能的な制御に重要である。ヒストン H2A のバリエーションであるヒストン H2AX は、DNA 二重鎖切断の修復に寄与している (Thiriet and Hayes, 2005)。また、ヒストン H2A のもうひとつのバリエーションであるヒストン macroH2A は、女性の細胞で観察される不活性 X 染色体に多く存在し、転写の不活性なヘテロクロマチンを形成するのに重要な役割を果たしている (Costanzi and Pehrson, 1998)。さらに、精子特異的なバリエーションであるプロタミンは、精子核における高度なクロマチン凝縮に重要である (Kimmins and Sassone-Corsi, 2005)。

クロマチンの機能は、ヒストンの翻訳後修飾や非ヒストン蛋白質によっても制御される (Strahl and Allis, 2000)。ヒストン H3 (Ser10 と Ser28) と H2B (Ser14) のリン酸化は、それぞれ、細胞分裂期の凝縮染色体とアポトーシス細胞の凝縮クロマチンで特徴的に観察される翻訳後修飾である (図 1-5B) (Cheung et al., 2003; Wei et al., 1998)。これらの修飾の機能的な役割はよく分かっていないが、生物種間でよく保存されており、クロマチンの機能に重要な役割を果たしていると考えられている (Ahn et al., 2005)。また、ヒストン H3 (Lys9) のメチル化と、メチル化ヒストン H3 に結合する非ヒストン蛋白質 HP-1 は、転写の不活性なヘテロクロマチンの形成に重要である (図 1-5B) (Nakayama et al., 2001)。

High Mobility Group (HMG) 蛋白質は、核内に最も多く存在する非ヒストン蛋白質で、HMGA、HMGB、および HMGN のファミリーから成る (Reeves, 2001)。HMG は約 110 アミノ酸からなる小さな蛋白質で、ヒストン H1 と同じようにリンカー DNA に結合する (Hill and Reeves, 1997)。HMG はヒストン H1 と競合的にクロマチンに結合することにより、遺伝子の発現制御やクロマチンの構造変化に寄与していると考えられている (Catez et al., 2004)。このように、クロマチンの構造と機能は、ヒストンバリエーション、翻訳後修飾および非ヒストン蛋白質の組み合わせによって複雑に制御されている。

## 1.6 Senescence-Associated Heterochromatic Focus: SAHF

既に述べたように、老化細胞の SAHF は、増殖停止の不可逆性に寄与するクロマチン構造である。SAHF には、メチル化ヒストン H3、HP-1 およびヒストン macroH2A などが存在することから、転写の不活性なヘテロクロマチンであると考えられている (Narita et al., 2003; Zhang et al., 2005)。しかしながら、SAHF 形成の分子機構はよく分かっていない。

Asf1a と HIRA は、ヒストン H3 とヒストン H4 のクロマチンへの取り込みに重要なヒストンシャペロンである(Tagami et al., 2004)。増殖している若いヒト正常線維芽細胞に、これらを単独または同時に遺伝子導入すると、細胞は SAHF を形成し、細胞老化表現型を示す(Zhang et al., 2005)。したがって、Asf1a と HIRA は SAHF 形成に重要な役割を果たすことが示唆されている。しかしながら、SAHF 形成がヒストン H3 のクロマチンへの取り込みにより制御されているかどうかは明らかでない。また、Asf1a と HIRA がヘテロクロマチン構造を引き起こす機構も知られていない。

E1A は、Rb や転写調節因子 p300 に結合してその機能を不活性化するアデノウイルスのがん遺伝子産物である。E1A を発現したヒト線維芽細胞では、RasG12V の遺伝子導入により誘導される細胞老化表現型と SAHF 形成が抑制される(Narita et al., 2003)。また、RNA interference (RNAi) により Rb をノックダウンした細胞では、同様に SAHF 形成が抑制される。したがって、SAHF 形成は、細胞老化を誘導するシグナル伝達経路のうち、特に Rb 経路により制御されている可能性が示唆されている(図 1-2)。しかし、SAHF 形成が Rb 非依存的に形成される例も報告されている(Chan et al., 2005)。p400 は、SWI2/SNF2 ファミリーに属するクロマチンリモデリング因子で、RNAi により p400 をノックダウンしたヒト正常線維芽細胞は、細胞老化表現型と SAHF 形成を示す。p400 のノックダウンによる SAHF 形成は、p53 または p21 のノックダウンにより抑制されるが、Rb のノックダウンでは抑制されない。したがって、p400 のノックダウンによる SAHF 形成は、p53 と p21 に依存して起こり、Rb 非依存的に起こると考えられる。

## 1.7 本研究の目的

がん抑制機構としての細胞老化の役割を考えると、安定な増殖停止に寄与する SAHF は、老化細胞の重要な表現型のひとつである。SAHF はもともと、老化細胞の核内で斑点状に形成されるクロマチンとして顕微鏡観察により発見された構造体なので、顕微鏡下で SAHF の構造をより詳細に特徴付けることは必要な作業である。また、SAHF の形成機構を分子レベルで明らかにすることは急務である。本研究では、老化細胞の不可逆的な増殖停止の分子機構を明らかにし、がんの予防および治療の新たな分子標的を明らかにすることを目的として、細胞老化に伴う SAHF 形成の分子機構を解析した。

## 1.8 本論文の構成

本論文では、まず、顕微鏡解析により明らかにした SAHF 構造の詳細について述べる（第 2 章）。次に、生化学的解析により明らかにした SAHF 形成の分子機構について述べ（第 3 章）、最後にこれらの結果を考察する（第 4 章）。実験材料および方法は第 5 章で述べる。

## さまざまなストレス

複製老化  
(テロメア依存的)



テロメアDNA  
の短小化

ストレス誘導性早期老化  
(テロメア非依存的)



培養  
ストレス



酸化  
ストレス

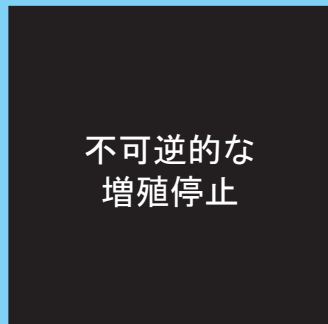


がん遺伝子  
の活性化

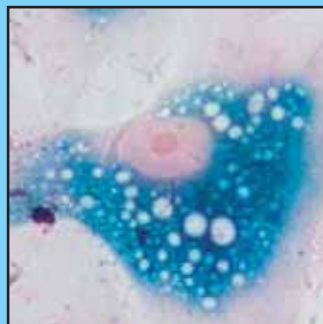


## 細胞老化表現型

老化関連  
 $\beta$ -ガラクトシダーゼ  
活性の上昇

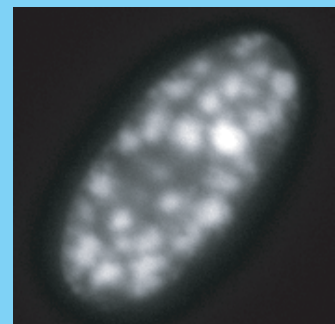


Hayflick et al. Exp Cell Res 1961



Dimri et al. PNAS 1995

クロマチンの凝縮  
(Senescence-associated  
heterochromatic foci, SAHF)



Narita et al. Cell 2003

図 1-1 細胞老化

細胞老化は、テロメア DNA 依存的な複製老化と非依存的なストレス誘導性早期老化に分けられる（上）。複製老化は、細胞分裂に伴って徐々に短小化したテロメア DNA が、損傷 DNA として認識された結果として起こる。これに対して、ストレス誘導性早期老化は、さまざまなストレス刺激により急速に誘導され、テロメア DNA の短小化を伴わない。老化細胞は、不可逆的な増殖停止のほかに、老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇（中央下）やクロマチン凝縮などの特徴的な表現型を示す（右下）。

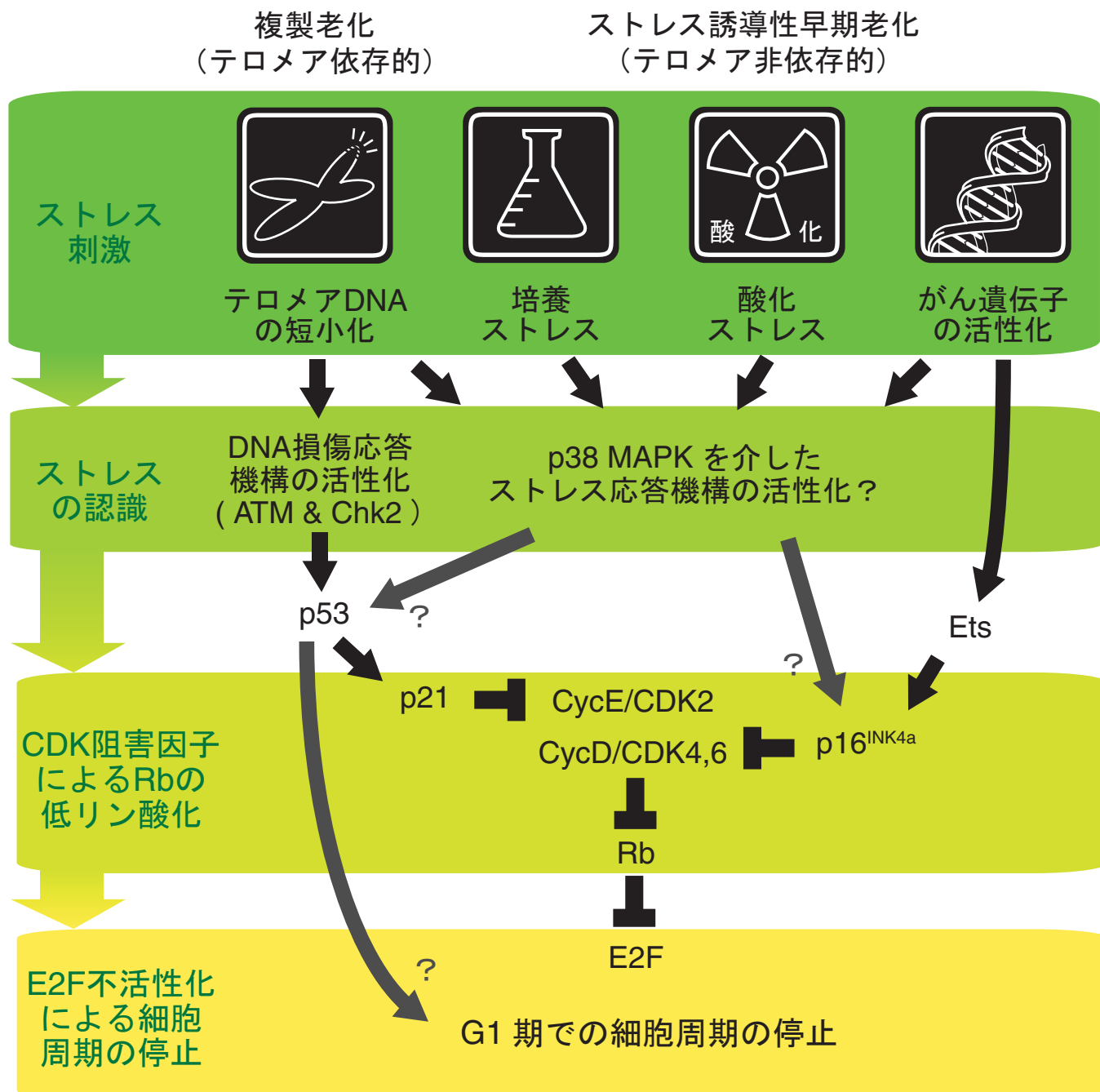


図 1-2 細胞老化における増殖停止の分子機構

細胞老化はがん抑制遺伝子 p53 と Rb により制御される。p53 により増大した CDK 阻害因子 p21 は、p16 と共に、サイクリン -CDK 複合体の抑制を介して、Rb の低リン酸化を引き起こす。低リン酸化型 Rb は、転写因子 E2F の活性を抑制し、細胞周期を G1 で停止させる。p38 MAPK は、さまざまなストレス刺激に応答して共通にリン酸化され、細胞老化の誘導に寄与している。p38 MAPK が CDK 阻害因子の発現上昇を引き起こす分子機構はまだ明らかにされておらず、図中では ? で示した。また、p53 が Rb 非依存的に細胞老化を誘導する分子機構もよく分かっていない。

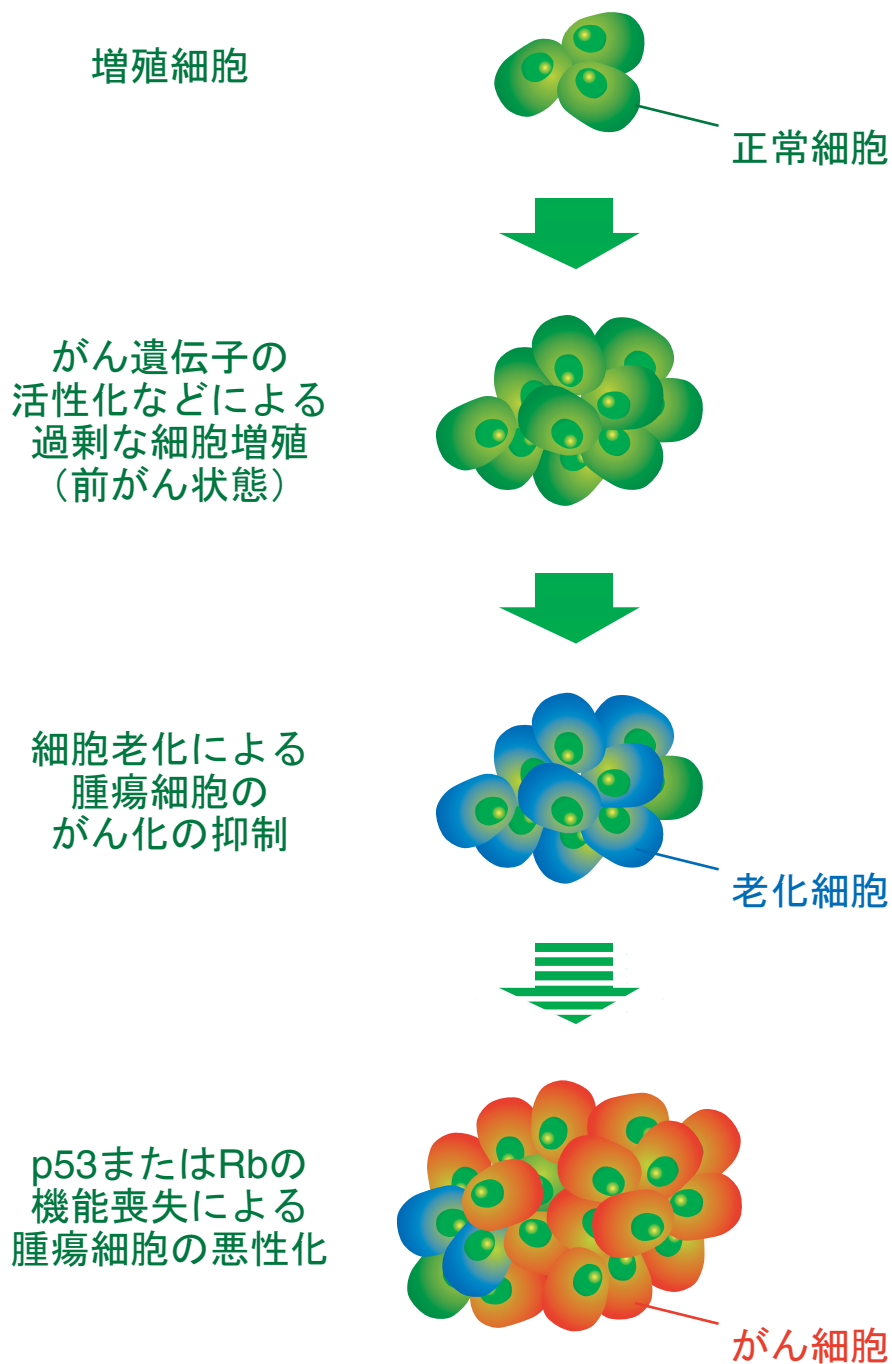


図 1-3 がん抑制機構としての細胞老化の役割

増殖している細胞（緑）において、Ras や BRAF などのがん遺伝子が活性化されると、細胞は異常に増殖して、前がん状態にある良性の腫瘍を形成する。このとき細胞は、細胞老化を誘導して増殖を安定に抑制し（青）、腫瘍細胞のがん化を抑制している。しかし、がん抑制遺伝子 p53 または Rb の機能をさらに喪失した細胞（赤）は、細胞老化を誘導することができずがん化する。細胞老化は前がん状態の腫瘍細胞とよく一致して観察され、これらの細胞でがん抑制機構として働いていると考えられる。

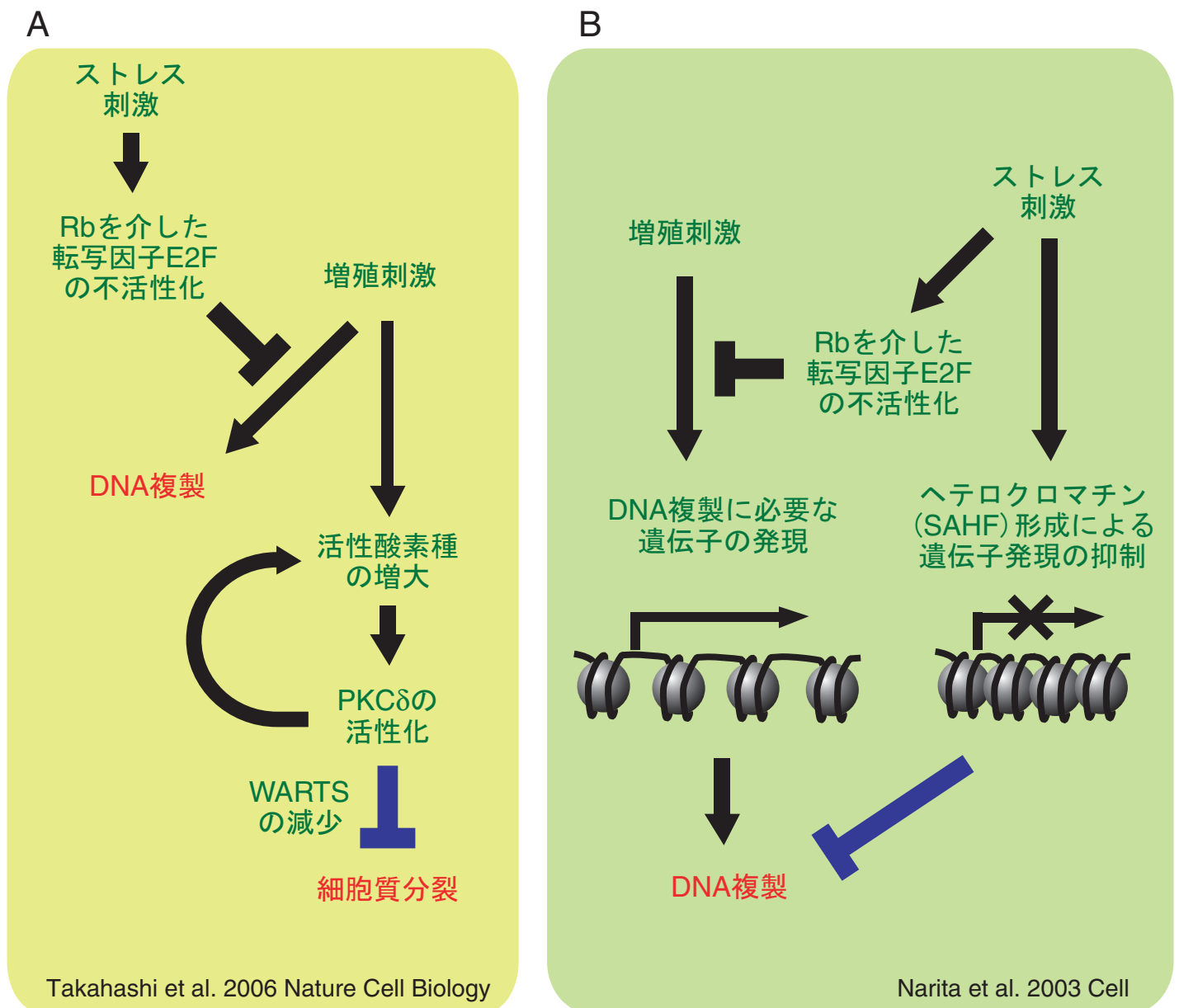
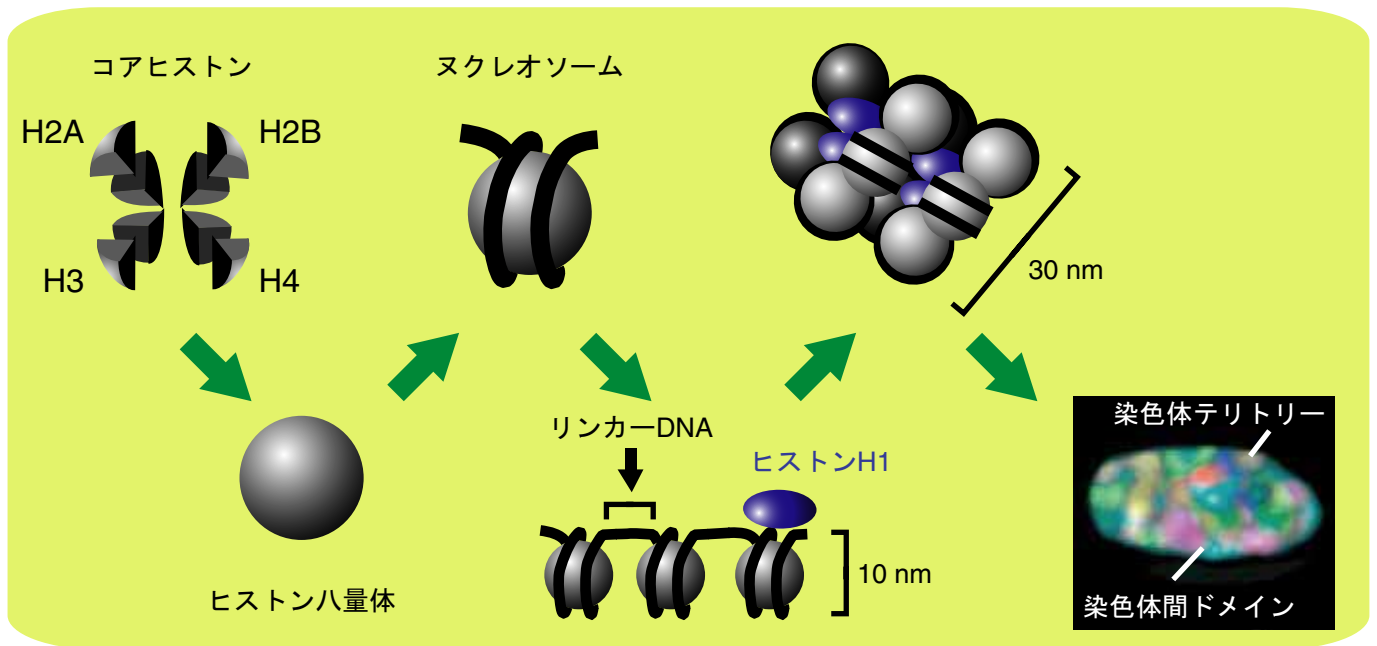


図 1-4 増殖停止の不可逆性を説明する 2 つのモデル

(A) ストレスを受けた細胞は、p53 と Rb の活性化を介して転写因子 E2F を不活性化し、DNA 複製を抑制する。このとき同時に増殖刺激があると、細胞内の活性酸素種が増大し、PKC $\delta$  の活性化を引き起こす。活性化した PKC $\delta$  はさらに、WARTS タンパク質の減少を介して細胞質分裂を抑制する（青）。

(B) 老化細胞は、転写因子 E2F の不活性化に加えて、ヘテロクロマチンを形成することで、DNA 複製に必要な遺伝子の発現を安定に抑制している（青）。

A



B

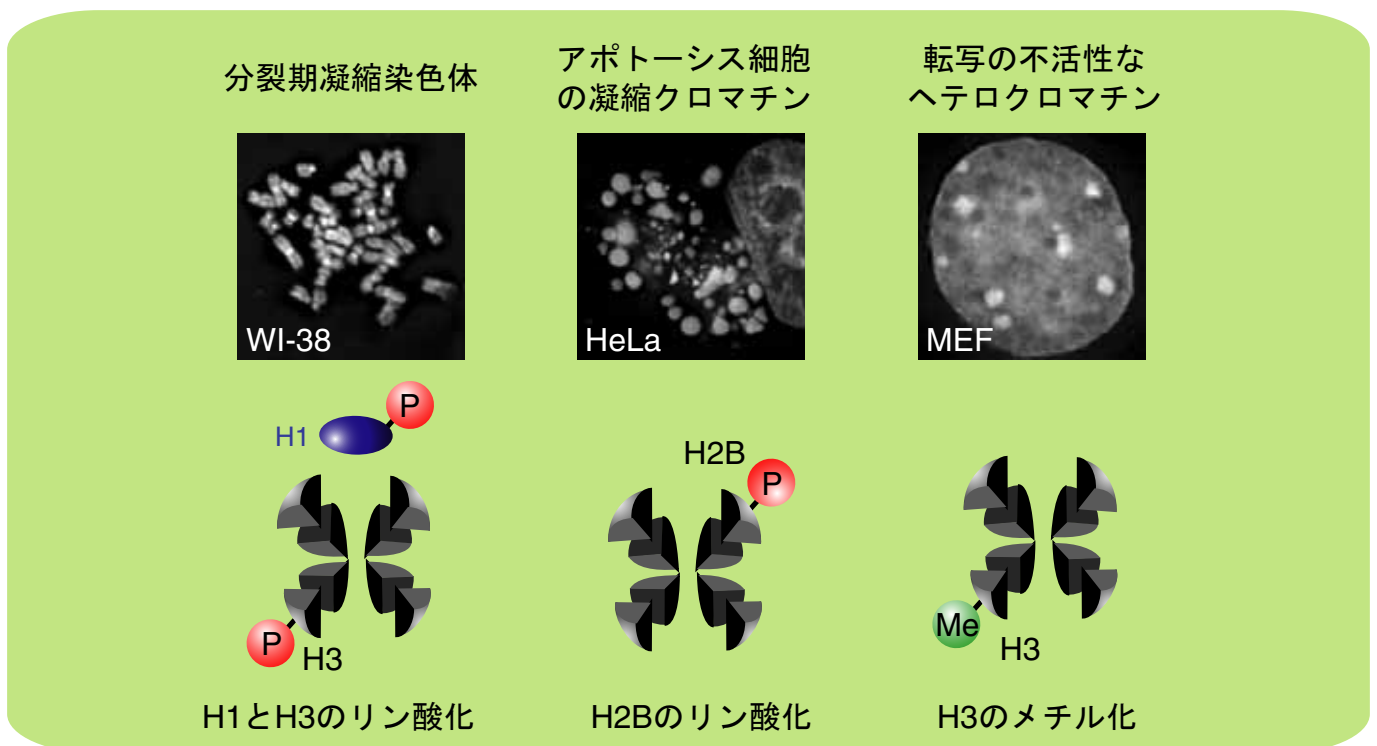


図 1-5 クロマチンの構造と染色体テリトリー

(A) クロマチンの構造を模式的に示した。クロマチンの構成単位であるヌクレオソームは、ヒストン八量体と約 146 塩基対の DNA から成る。ヒストン H1 はヌクレオソームとリンカー DNA に結合して、クロマチンの高次構造を安定化する。間期の核では、染色体は核内の特定の領域に局在し、染色体テリトリーを形成する（写真はヒト線維芽細胞の染色体テリトリーを示す。Bolzer et al., 2005 より転用）。

(B) 特異的なヒストンの翻訳後修飾をもつ 3 種類の凝縮クロマチンを示した。写真は、ヒト正常線維芽細胞 WI-38 の分裂期凝縮染色体（左）、UV 照射によりアポトーシスを起こした HeLa 細胞の凝縮クロマチン（中）、およびセントロメア近傍領域のヘテロクロマチンをもつマウス線維芽細胞（MEF、右）の DAPI 染色像を示す。

## 第 2 章

### 結果

#### 老化細胞における凝縮クロマチンの構造解析

## 2.1 がん遺伝子 RasG12V の遺伝子導入による細胞老化の誘導

SAHF 形成は、さまざまなストレス刺激により誘導される細胞老化において共通に観察される表現型である(Narita et al., 2003)。本研究では、ヒト正常線維芽細胞 WI-38 に、がん性突然変異をもつ Ras (RasG12V) を遺伝子導入して、細胞老化を誘導した (図 2-1A)。この実験では、WI-38 細胞に RasG12V 遺伝子を発現するレトロウイルスを感染させた後、薬剤を含む培養液で 3~5 日間培養して遺伝子導入細胞を選別した。薬剤選別を終了した日を 0 日目と定義し、1~7 日目の間に細胞老化表現型を解析した。この実験系の利点は、1) レトロウイルスを用いることで、RasG12V 遺伝子を WI-38 細胞に効率よく導入することができる、2) 遺伝子導入後 1 週間程度の短期間の間に、細胞老化表現型を同調性よく誘導することができる、3) RasG12V を導入した細胞は、薬剤選別中に一過的に増殖した後で細胞老化表現型を示すので、回収できる老化細胞の数が多く、生化学的な解析が行いやすい、4) RasG12V を導入した WI-38 細胞は、SAHF を効率よく形成するので、SAHF 形成の分子機構を解析するのに適している、などが挙げられる。

RasG12V を導入した WI-38 細胞 (以下、Ras 老化細胞という) は、薬剤選別終了後直ちに増殖を停止し、実験を行った 1 週間の間、増殖を回復した細胞が出現することにはなかった (図 2-1B)。また、Ras 老化細胞は、空ベクターを導入した細胞 (以下、mock 細胞という) に比べて細胞全体が肥大化し、老化関連 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇を示した (図 2-1C)。これらの結果は、すでに報告されている Ras 老化細胞の表現型とよく一致しており、本研究においても、RasG12V の遺伝子導入により効率よく細胞老化が誘導できることがわかった(Serrano et al., 1997)。

そこで、Ras 老化細胞における SAHF の構造を調べるために、細胞を DNA 結合色素 DAPI で染色し、染色パターンを蛍光顕微鏡により解析した (図 2-1D)。mock 細胞の核が一様の染色パターンを示すのに対して、Ras 老化細胞の核は斑点状の SAHF を示した。Ras 老化細胞では、薬剤選別終了後 1 日目に約 80%の細胞で SAHF が観察された。その後 7 日間の間、SAHF 陽性細胞の割合はほとんど変化しなかったが、SAHF シグナルが徐々に大きくなっているように見え、クロマチンがより高度に凝縮しているのを反映していると考えられた。特に、薬剤選別終了後 7 日目の Ras 老化細胞において、大きな SAHF 構造が観察された (図 2-1D、下)。WI-38 細胞は女性由来の線維芽細胞なので、2 つの X 染色体のうちひとつは不活性化している。不活性化 X 染色体は DAPI により濃染色される Barr 小体として観察され、また、抗ヒストン macroH2A 抗体により濃染色される (Costanzi and Pehrson, 1998) (図 2-1D、上、矢頭)。興味深い

ことに、Ras 老化細胞では、mock 細胞の不活性 X 染色体と同じか、それ以上に大きい SAHF が観察された（図 2-1D）。この観察結果から、Ras 老化細胞の個々の SAHF は、間期の染色体テリトリーに相当する巨大な構造体である可能性が考えられた。

## 2.2 Ras 老化細胞におけるセントロメアの局在

セントロメアは、分裂期染色体を娘細胞へ分配するのに重要な DNA 配列で、ひとつの染色体はセントロメア領域をひとつだけもつ。そこで、Ras 老化細胞の SAHF が、染色体テリトリーかどうかを調べるために、セントロメア蛋白質 CENP-B を免疫染色により可視化して、セントロメアと SAHF の局在パターンを解析した（図 2-2A）。抗 CENP-B シグナルは、mock 細胞および Ras 老化細胞の核内でドット状に観察された。また、Ras 老化細胞では、抗 CENP-B シグナルの約 85%が少なくとも部分的に SAHF と共局在した（図 2-2B）。興味深いことに、SAHF の約 70%は、抗 CENP-B シグナルをひとつだけもち、抗 CENP-B シグナルをひとつももたない SAHF や 2 つ以上もつ SAHF は少なかった（図 2-2C）。さらに、Ras 老化細胞では、抗 CENP-B シグナルの多くが SAHF の周縁部分に局在した（図 2-2D、左）。細胞周期を停止しているヒト線維芽細胞およびリンパ球では、セントロメア領域は対応する染色体テリトリーの周縁部分に局在することが報告されており、Ras 老化細胞の SAHF とセントロメアの局在パターンはこれと酷似していた（図 2-2D、右）(Weierich et al., 2003)。これらの結果から、Ras 老化細胞の SAHF は、ひとつの染色体テリトリーであることが強く示唆された。

## 2.3 Ras 老化細胞の FISH 解析

Ras 老化細胞の SAHF が、染色体テリトリーであることをより直接的に示すために、ヒト 12 番染色体の全体を認識する DNA プローブを用いて FISH 解析を行った（図 2-3）。用いた DNA プローブは、WI-38 細胞の 2 つの分裂期凝縮染色体と反応することから、2 つの 12 番染色体を特異的に認識していると考えられた（図 2-3A）。そこで、Ras 老化細胞の FISH 解析を行い、デコンボリューション顕微鏡を用いて、FISH シグナルと SAHF の局在パターンを比較した（図 2-3B）。その結果、調べた 5 つの細胞のすべてにおいて、2 つの FISH シグナルは SAHF のシグナルとほぼ完全に一致した（図 2-3B）。以上の結果から、老化細胞の SAHF は、染色体テリトリーであることが明らかになっ

た。

## 2.4 Ras 老化細胞における DAPI 陰性領域の機能解析

Ras 老化細胞の SAHF は、ひとつの染色体に由来するほとんどすべてのクロマチンを含むことから、染色体テリトリーであると考えられた。一般に、核内では、染色体テリトリーは染色体間ドメインと呼ばれる網の目状の空間により区画化されている。染色体間ドメインでは RNA の転写、成熟や輸送が活発に行われており、また、PML ボディーなどの核内構造体が局在する（1.5 節）。Ras 老化細胞では、DAPI 陰性領域が SAHF を区画化するように存在することから、SAHF と DAPI 陰性領域は、それぞれ染色体テリトリーと染色体間ドメインに対応すると考えられた。そこで、Ras 老化細胞の DAPI 陰性領域が染色体間ドメインであるかどうかを調べるために、転写の制御に関わる因子を免疫染色により可視化した。

まず、転写を行う RNA polymerase II (RNA pol II) に対する抗体を用いて免疫染色を行った（図 2-4A）。抗 RNA pol II シグナルは、mock 細胞と Ras 老化細胞の両方で、DAPI シグナルの弱い領域に多く観察された。特に Ras 老化細胞では、抗 RNA pol II シグナルは DAPI 陰性領域に特異的に局在し、SAHF が局在する部位では、抗 RNA pol II シグナルはわずかしかな観察されなかった。定量的な解析の結果、約 90% の SAHF は抗 RNA pol II シグナルを示さなかった（図 2-4B）。また、SAHF 陽性の複製老化細胞を用いて、転写の調節因子であるヒストンアセチル化酵素 CBP およびヒストン脱アセチル化酵素 HDAC の局在を免疫染色により解析した（図 2-4C）。その結果、CBP は、2.5 節で詳しく述べる PML ボディーと共局在し、DAPI 陰性領域に斑点状に局在した。また、HDAC は、DAPI 陰性領域に分散して局在した。これらの結果から、老化細胞の DAPI 陰性領域は、転写の制御に関わる因子が局在する場であると考えられた。

次に、DAPI 陰性領域において転写が活発に行われていることを示すために、Ras 老化細胞の新規合成 RNA をブロモ標識ウリジン (BrU) により可視化することを試みた。この方法は、Wansink らによってすでに確立されている (Wansink et al., 1993)。具体的には、Ras 老化細胞を 0.05% の Triton X-100 を含むバッファーで処理して膜を透過させた後、BrU を加えて 35°C で 10 分間反応した。反応後、細胞を固定し、BrU を取り込んだ新規合成 RNA を、抗ブロモデオキシウリジン (BrdU) 抗体を用いた免疫染色により可視化した（図 2-4D）。Ras 老化細胞の SAHF は、0.05% の Triton X-100 処理により構造が分かりにくくなる傾向にあった。しかし、BrU シグナルの多くは、DAPI

陰性領域に局在することが分かった（図 2-4D）。この実験で観察された BrU シグナルは、未標識のウリジンをういたときには観察されなかった（図 2-4E）。また、BrU シグナルは、 $\alpha$ -アマニチン（1  $\mu\text{g/ml}$ ）処理、または RNase A（50  $\mu\text{g/ml}$ ）処理により減弱した。 $\alpha$ -アマニチンは、1  $\mu\text{g/ml}$  では RNA pol II を特異的に阻害することから、観察した BrU シグナルは RNA pol II により転写された RNA に由来すると考えられた（図 2-4E）（Weinmann et al., 1974）。以上の結果から、Ras 老化細胞の DAPI 陰性領域は、転写が活発に行われている染色体間ドメインであることが強く示唆された。

## 2.5 Ras 老化細胞における PML ボディーの局在解析

DAPI 陰性領域が染色体間ドメインであることをさらに示すために、PML ボディーの局在を解析した（図 2-5）。Promyelocytic leukemia（PML）遺伝子は急性前骨髄球性白血病の原因遺伝子のひとつで、その遺伝子産物は核の染色体間ドメインで PML ボディーと呼ばれる顆粒状の構造体を形成する（Negorev and Maul, 2001）。PML ボディーは、転写因子や DNA 修復関連蛋白質などを含み、細胞老化やアポトーシスの誘導に寄与している（Ferbeyre et al., 2000）。抗 PML 抗体を用いて Ras 老化細胞の免疫染色を行った結果、PML ボディーは DAPI 陰性領域に特異的に局在した（図 2-5A）。定量的な解析の結果、90%以上の PML ボディーは DAPI 陰性領域に局在し、SAHF の内部に局在する PML ボディーはほとんど観察されなかった（図 2-5B）。この結果から、Ras 老化細胞の DAPI 陰性領域は染色体間ドメインであることが強く示唆された。

しかしながら、SAHF は高度に凝縮したクロマチン構造なので、SAHF の内部に PML ボディーのシグナルが観察されなかったのは、抗 PML 抗体が SAHF の内部に浸透できなかった結果による可能性が考えられた。この可能性を排除するために、PML ボディーに構成的に局在する蛋白質 Sp100 に緑色蛍光蛋白質 EGFP を融合したキメラ蛋白質（EGFP-Sp100）を作製し、抗体を用いずに PML ボディーを可視化することを試みた。この実験では、まず、増殖している若い WI-38 細胞に EGFP-Sp100 を発現するレトロウイルスを感染させ、薬剤選別により遺伝子導入細胞を得た。抗 PML 抗体を用いた免疫染色の結果、EGFP-Sp100 を導入した若い WI-38 細胞では、EGFP-Sp100 シグナルと抗 PML 抗体シグナルが完全に一致した（図 2-5C）。したがって、EGFP-Sp100 を用いて PML ボディーの核内局在を観察できることがわかった。そこで、この細胞に RasG12V を発現するレトロウイルスを感染させて、EGFP-Sp100 を発現した Ras 老化細胞を得た。蛍光顕微鏡による解析の結果、EGFP-Sp100 シグナルは DAPI 陰性領域

に特異的に局在し、SAHF の内部に観察されることはなかった (図 2-5D)。これらの結果から、SAHF 陽性細胞で観察される DAPI 陰性領域は、染色体間ドメインであることが明らかになった。

## 2.6 Ras 老化細胞におけるヒストンの翻訳後修飾の解析

細胞はさまざまな生物学的局面でクロマチンを凝縮させる。細胞分裂期の凝縮染色体、アポトーシス細胞の凝縮クロマチン、および転写の不活性なヘテロクロマチンは、最もよく研究されたクロマチンの凝縮形態である (序論 1-5、図 1-5B)。これらの凝縮クロマチンは、それぞれ特異的なコアヒストンの翻訳後修飾をもつ。すなわち、分裂期凝縮染色体ではヒストン H3 Ser10 と Ser28 のリン酸化、アポトーシス細胞の凝縮クロマチンではヒストン H2B Ser14 のリン酸化、また、転写の不活性なヘテロクロマチンではヒストン H3 Lys9 のメチル化が観察される (図 1-5B)。これらのヒストン翻訳後修飾は生物種間で高度に保存されているので、それぞれの凝縮クロマチンを特徴付けるよい指標となる (Strahl and Allis, 2000)。そこで、Ras 老化細胞の SAHF がこれらの凝縮クロマチンに関係しているかどうかを調べるために、修飾特異的な抗ヒストン抗体を用いて、SAHF 形成に伴うヒストン翻訳後修飾の変化を調べた (図 2-6)。

この実験では、WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入し、薬剤選別終了後 7 日目に抗ヒストン抗体を用いて免疫染色を行った (図 2-6A)。また、薬剤選別終了後 1~7 日目に、酸抽出によりヒストンを回収し、抗ヒストン抗体を用いてイムノブロット解析を行った (図 2-6B)。薬剤選別終了後 1~7 日目の SAHF 陽性細胞の割合は、mock 細胞では約 1%、Ras 老化細胞では約 90%であった (図 2-6B、下)。

まず、分裂期凝縮染色体のヒストン H3 のリン酸化を、抗リン酸化ヒストン H3 Ser10 抗体および抗リン酸化ヒストン H3 Ser28 抗体を用いて調べた。WI-38 細胞の免疫染色の結果、これらの抗体は mock 細胞の分裂期凝縮染色体と強く反応したが、Ras 老化細胞の SAHF とは反応しなかった (図 2-6A、H3(S10)ph および H3(S28)ph)。酸抽出ヒストン画分のイムノブロット解析でも同様の結果が得られた。リン酸化ヒストン H3 シグナルは、コルセミド処理により細胞分裂期に停止した HeLa 細胞では強く見られたが、mock 細胞や Ras 老化細胞では観察されなかった (図 2-6B)。次に、アポトーシス細胞の凝縮クロマチンで観察されるリン酸化ヒストン H2B を調べた。免疫染色では、リン酸化 H2B シグナルは、紫外線照射によりアポトーシスを起こした HeLa 細胞と強く反応するが、Ras 老化細胞の SAHF とは反応しなかった (図 2-6A、H2B(S14)ph)。

また、酸抽出ヒストン画分のイムノブロット解析の結果、リン酸化ヒストン H2B のシグナルは、mock 細胞と Ras 老化細胞とで同程度に見られ、SAHF 形成と関連した変化は認められなかった（図 2-6B）。これらの結果から、Ras 老化細胞の SAHF は、分裂期凝縮染色体およびアポトーシス細胞の凝縮クロマチンとは異なる性質をもつと考えられた。

老化細胞の SAHF は、転写の不活性なヘテロクロマチンに特徴的な性質をもつことがすでに報告されている（序論 1.6 節）(Narita et al., 2003; Zhang et al., 2005)。これらの報告と一致して、免疫染色のジメチル化ヒストン H3 シグナルは、Ras 老化細胞の SAHF とよく一致した（図 2-6A、RasG12V、H3(K9)me）。しかしながら、ジメチル化ヒストン H3 シグナルは、mock 細胞でも核全体に一様に観察された（図 2-6A、mock、H3(K9)me）。また、酸抽出ヒストン画分のイムノブロット解析では、ジメチル化ヒストン H3 のバンドは、SAHF 形成と関連したシグナルの増加を示さなかった。これらの結果から、免疫染色により観察されたジメチル化ヒストン H3 シグナルと SAHF の共局在は、クロマチンが凝縮した結果として観察されたもので、Ras 老化細胞の SAHF 形成は、ヒストン H3 Lys9 のメチル化の増加を伴わないと考えられた。したがって、老化細胞の SAHF は、これまで考えられていた転写の不活性なヘテロクロマチンとも異なる性質をもつことが示唆された。

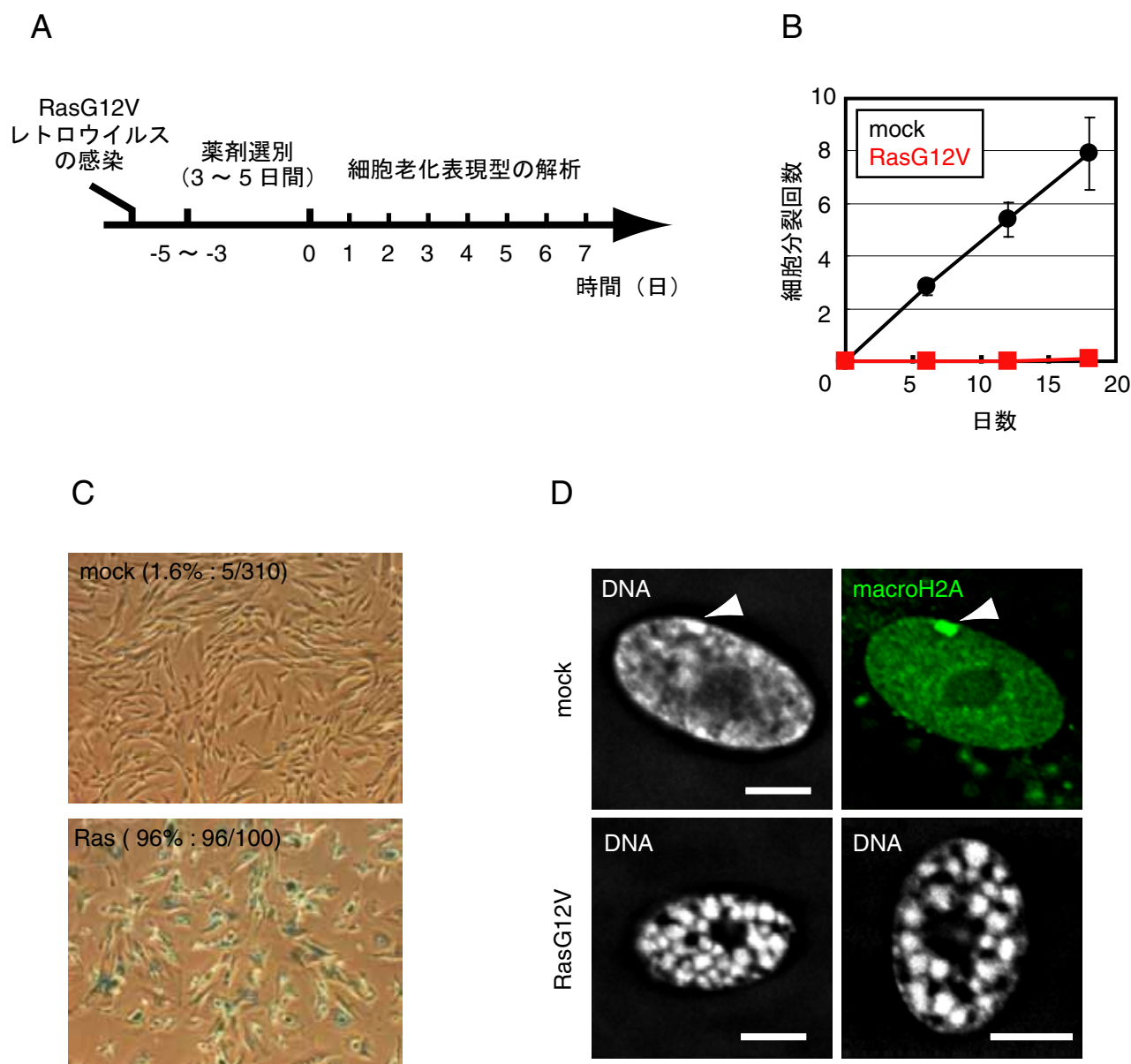


図 2-1 RasG12V の遺伝子導入による細胞老化の誘導

(A) 本研究で行った実験を模式的に示した。増殖している WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入すると、薬剤選別終了後 1 週間以内に細胞は老化表現型を示す。

(B) mock 細胞および Ras 老化細胞の増殖曲線を示した。Ras 老化細胞は、薬剤選別終了後約 3 週間の間、安定に増殖を停止した。エラーバーは、3 回の実験の標準偏差を示す。

(C) mock 細胞および Ras 老化細胞の老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色を行った。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性陽性細胞の割合を示した。Ras 老化細胞は、肥大化し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性陽性を示した。

(D) mock 細胞を DAPI (白) および抗 macroH2A 抗体 (緑) で染色した (上)。矢頭は不活性 X 染色体を示す。Ras 老化細胞の SAHF の中には、mock 細胞の不活性 X 染色体と同じか、それよりも大きいものも見られた。(下)。スケールバー = 10  $\mu$ m。

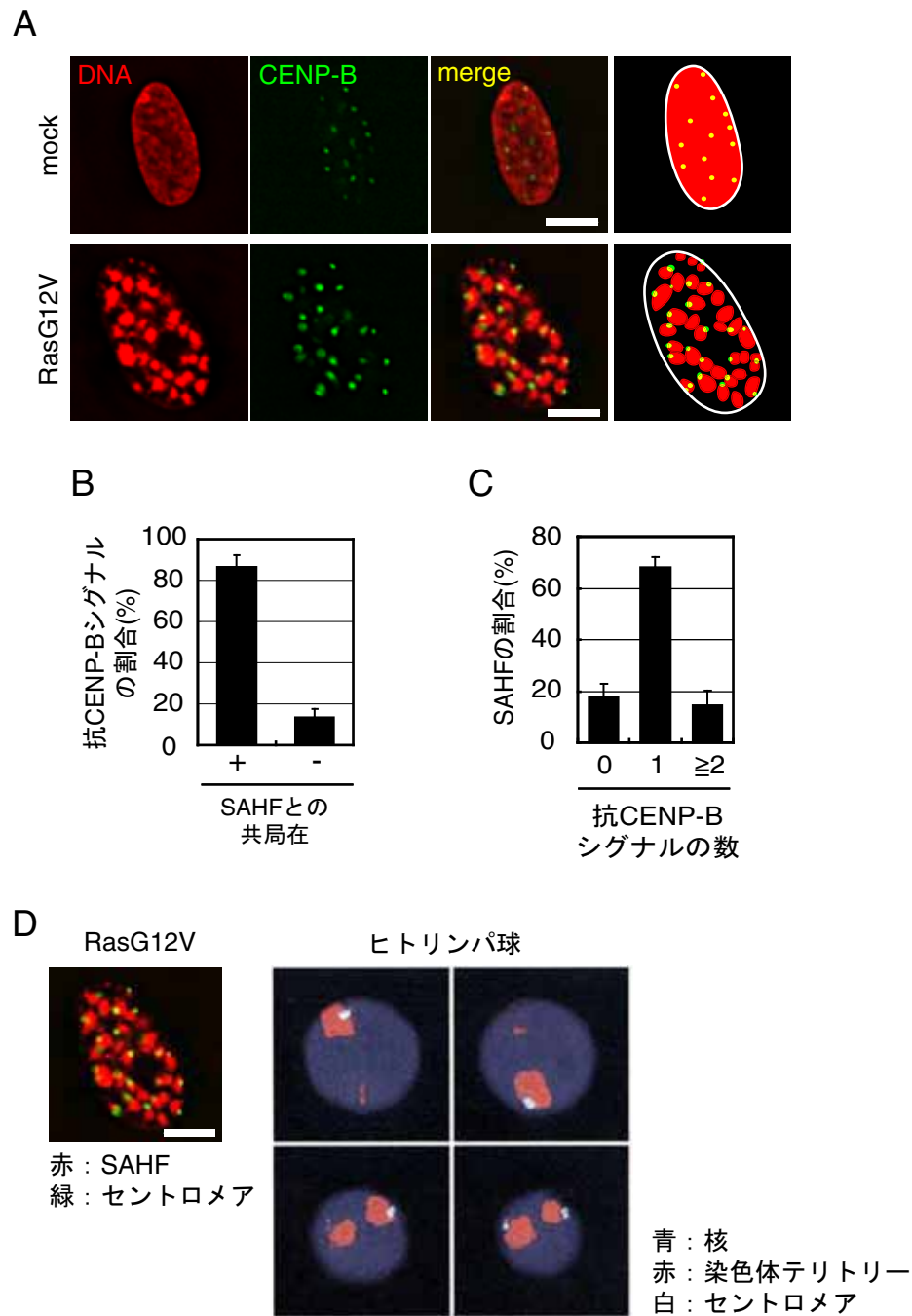


図 2-2 Ras 老化細胞におけるセントロメアの局在解析

(A) mock 細胞と Ras 老化細胞を抗 CENP-B 抗体（緑）と DAPI（赤）で染色した。CENP-B シグナルの局在パターンを模式的に示した（右）。スケールバー = 10  $\mu$ m。

(B) SAHF と共局在する抗 CENP-B シグナルの割合を示した。

(C) 抗 CENP-B シグナルの数を 0、1、または 2 つ以上もつ SAHF の割合を示した。約 70% の SAHF は、抗 CENP-B シグナルをひとつだけもつ。

(D) Ras 老化細胞では、多くの抗 CENP-B シグナルが SAHF の周縁部分に局在した（左）。この局在パターンは、ヒトリンパ球におけるセントロメアと染色体テリトリーの局在パターンに酷似していた（右、Weierich et al., 2005 より転載）。

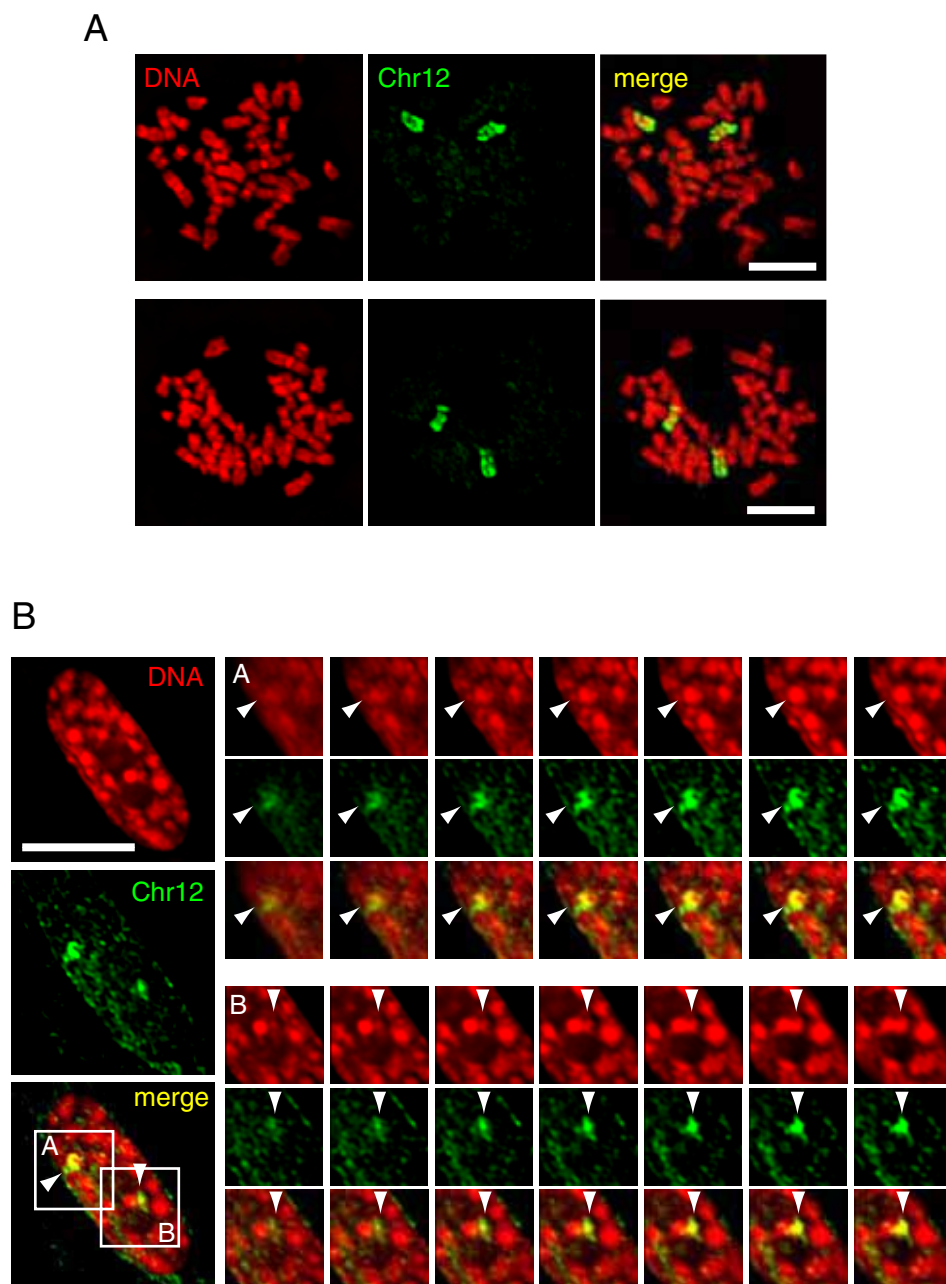
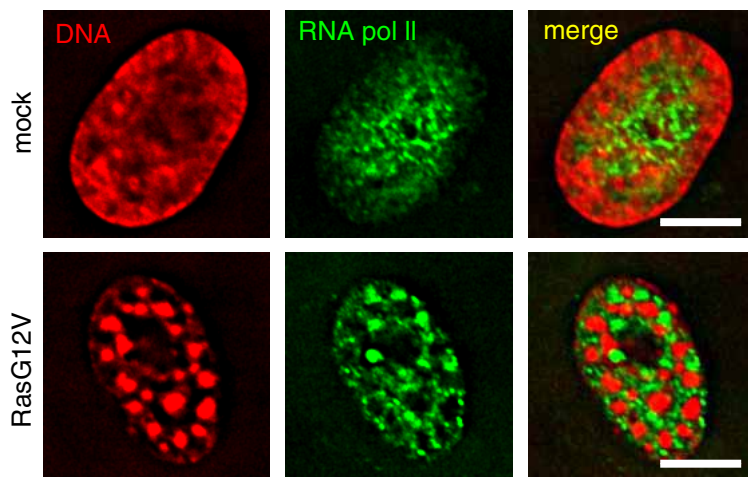


図 2-3 Ras 老化細胞の FISH 解析

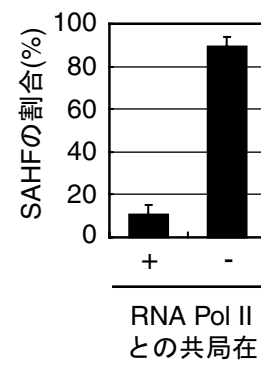
(A) hTERT を発現している WI-38 細胞から分裂期凝縮染色体を調製し、12 番染色体に対する DNA プローブを用いて、FISH 解析（緑）と DAPI 染色（赤）を行った。2 つの FISH シグナルと 2 つの凝縮染色体が共局在して観察された。スケールバー = 10  $\mu\text{m}$ 。

(B) Ras 老化細胞を、A で述べたように FISH 解析した。サンプルは、デコンボリューション顕微鏡を用いて観察し、0.4  $\mu\text{m}$  間隔の光学切片を作製した（右）。Ras 老化細胞の 2 つの FISH シグナルは、2 つの SAHF シグナルとほぼ完全に一致した（矢頭）。スケールバー = 10  $\mu\text{m}$ 。

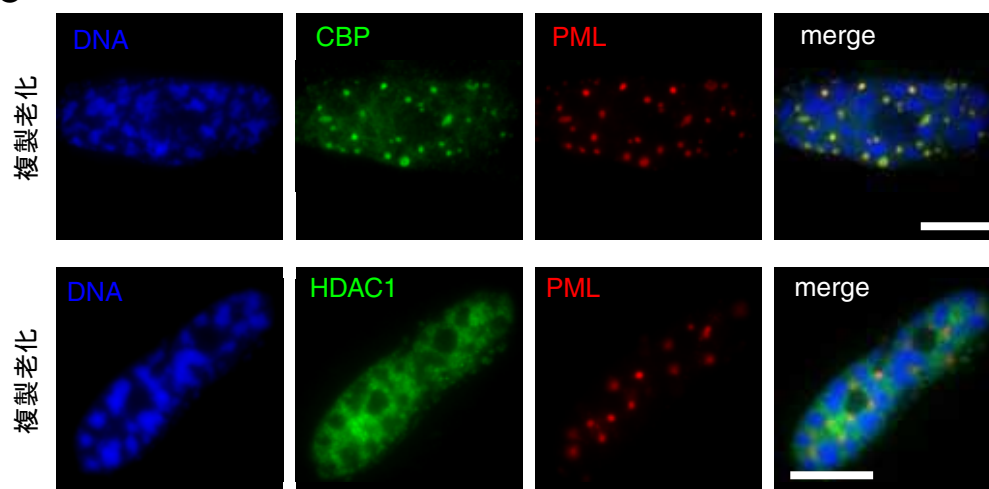
A



B



C



D

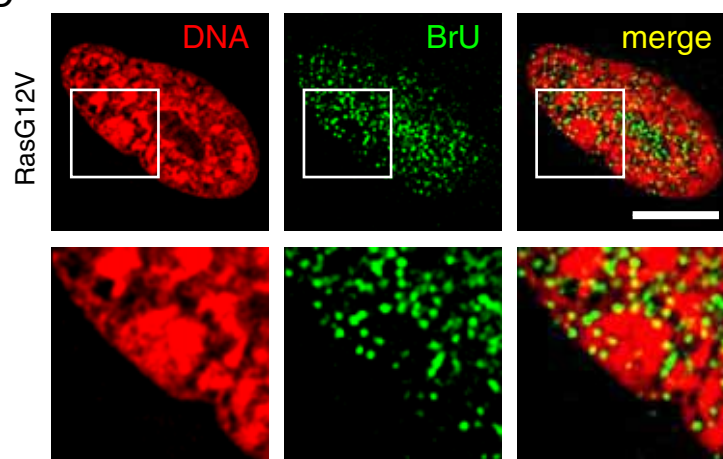


図 2-4 Ras 老化細胞の DAPI 陰性領域の解析

次のページへ続く。

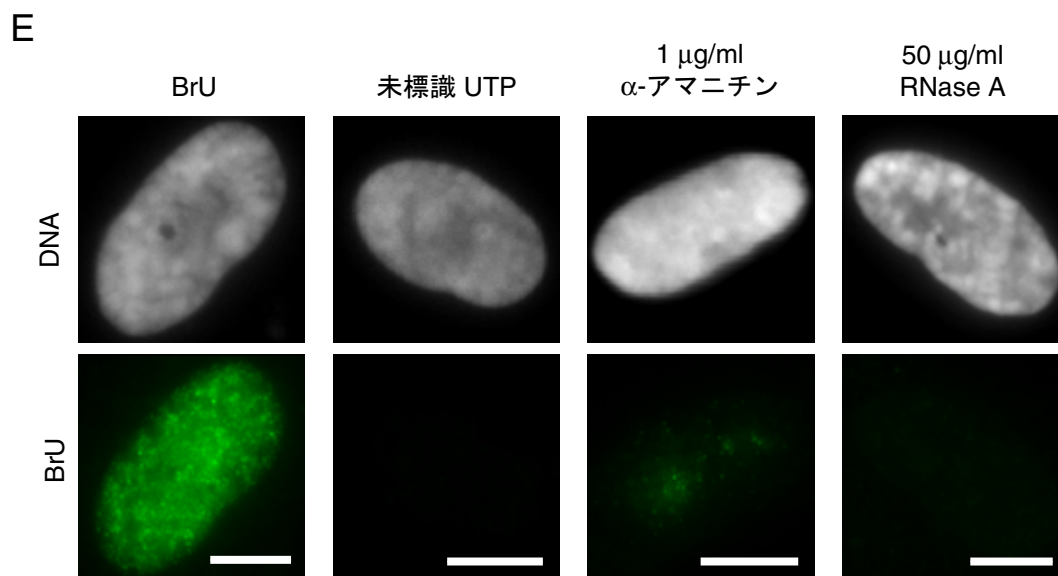


図 2-4 Ras 老化細胞の DAPI 陰性領域の解析

(A) WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入し、mock 細胞と Ras 老化細胞を抗 RNA pol II 抗体 (緑) と DAPI (赤) で染色した。スケールバー = 10  $\mu\text{m}$ 。

(B) Ras 老化細胞において、抗 RNA pol II シグナルと共局在する SAHF の割合を示した ( $n = 341$ )。エラーバーは標準偏差を示す。

(C) WI-38 細胞の継代培養により、複製老化細胞を調製し、免疫染色 (緑と赤) および DAPI 染色 (青) を行った。抗 CBP シグナルと抗 HDAC1 シグナルは、DAPI 陰性領域に特異的に局在した。抗 PML シグナルの局在パターンについては、2.5 節で詳しく述べる。スケールバー = 10  $\mu\text{m}$ 。

(D) Ras 老化細胞をブロモ標識ウリジン (BrU) で処理し、抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色により、新規合成 RNA を可視化した。BrU シグナルは DAPI 陰性領域に特異的に観察された。スケールバー = 10  $\mu\text{m}$ 。

(E) Ras 老化細胞を未標識ウリジンで処理した場合、染色シグナルは観察されなかった。また、BrU シグナルは、 $\alpha$ -アマニチンまたは RNase A 処理により減弱した。スケールバー = 10  $\mu\text{m}$ 。

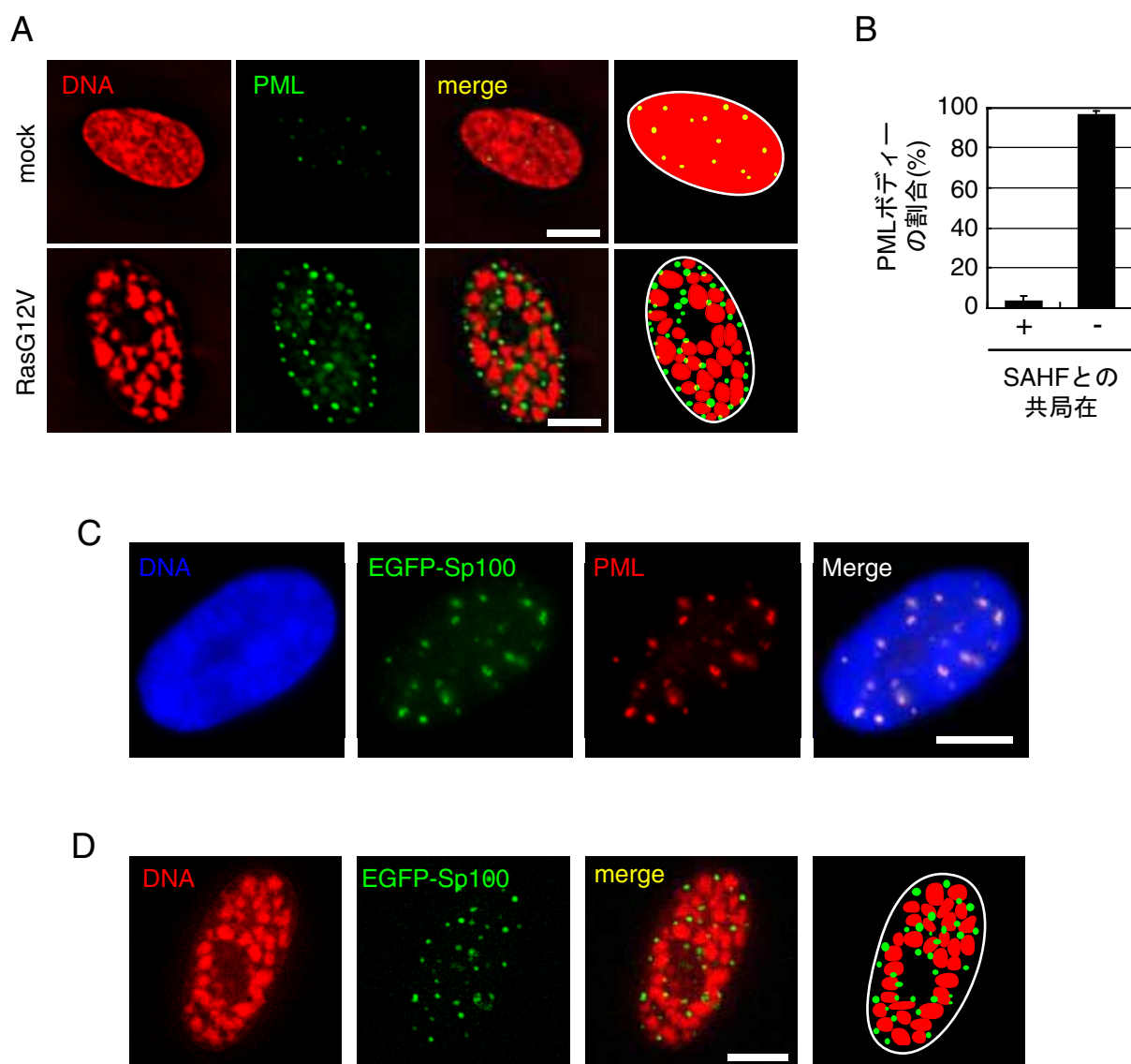


図 2-5 Ras 老化細胞における PML の局在解析

(A) WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導した。mock 細胞と Ras 老化細胞を抗 PML 抗体（緑）と DAPI（赤）で染色した。スケールバー = 10  $\mu$ m。

(B) Ras 老化細胞において、SAHF と共局在する PML ボディーの割合を示した (n = 491)。

(C) WI-38 細胞に EGFP-Sp100 を遺伝子導入し、抗 PML 抗体と DAPI（青）で染色した。抗 PML シグナル（赤）は、EGFP-Sp100（緑）シグナルと完全に一致した。スケールバー = 10  $\mu$ m。

(D) EGFP-Sp100 を発現している細胞に、RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導した。細胞を DAPI 染色して（赤）、EGFP の蛍光を観察した。EGFP-Sp100（緑）は、DAPI 陰性領域に特異的に局在した。スケールバー = 10  $\mu$ m。

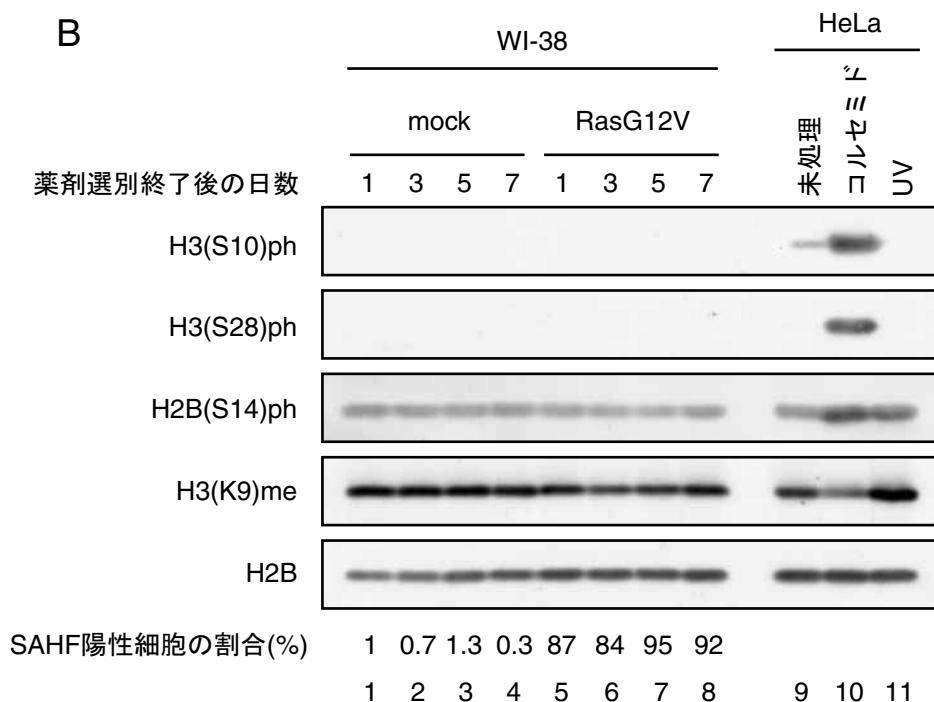
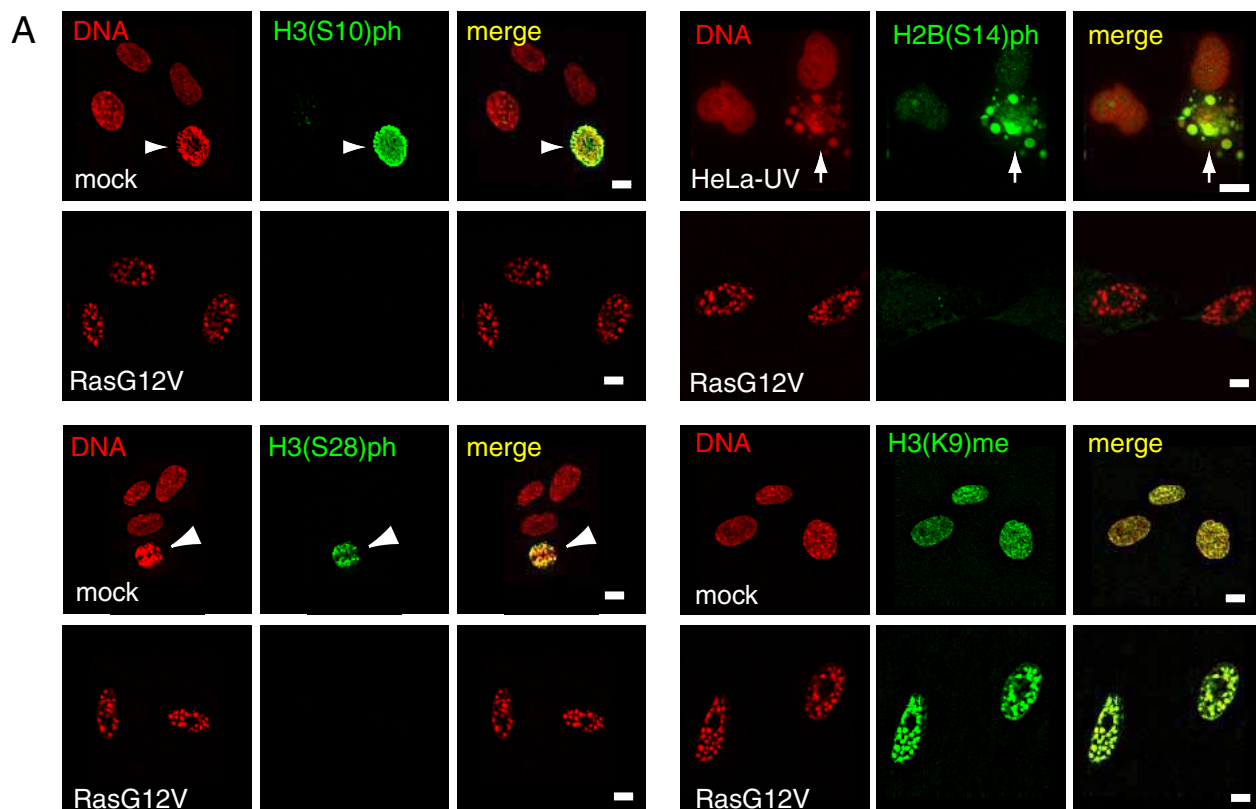


図 2-6 Ras 老化細胞におけるヒストン翻訳後修飾の解析

(A) WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導した。また、HeLa 細胞に紫外線 (100 Jm<sup>-2</sup>) を照射し、アポトーシスを誘導した (HeLa-UV)。細胞を抗ヒストン抗体 (緑) と DAPI (赤) で染色した。スケールバー = 10 μm。

(B) WI-38 細胞に RasG12V 遺伝子を導入した。また、HeLa 細胞をコルセミドまたは紫外線 (UV) で処理した。これらの細胞から酸抽出によりヒストンを調製し、抗ヒストン抗体を用いてイムノブロット解析を行った。ヒストンを回収した時点での SAHF 陽性細胞の割合を示した (下)。

## 第 3 章

### 結果

#### リンカーDNA 結合蛋白質による 細胞老化表現型の制御

### 3.1 SAHF 形成に伴って変化するクロマチン結合蛋白質の解析

第2章で述べたように、老化細胞の SAHF はこれまで知られている凝縮クロマチンとは異なる性質をもつと考えられた。そこで、SAHF の形成機構を分子レベルで明らかにするために、生化学的な解析を行った。

WI-38 細胞に空ベクターまたは RasG12V を遺伝子導入し、それぞれ、SAHF 陰性の mock 細胞と SAHF 陽性の Ras 老化細胞を得た。薬剤選別終了後 7 日目に、これらの細胞からクロマチン結合蛋白質を調製して構成蛋白質を比較した (図 3-1A)。クロマチン結合蛋白質の調製では、まず、細胞を低塩濃度のバッファーで処理して細胞を肥大化させた後、注射針を 20 回程度通過させて細胞膜を機械的に破碎した。核画分を低速遠心により回収した後、0.2% Triton X-100 を含むバッファーで処理して遠心した。この操作により、核内でクロマチンまたは核マトリックスに強く結合する蛋白質の画分 (クロマチン画分 N2) をペレットとして回収した。DNA 結合色素 Hoechst33342 を用いて各ステップの核画分を染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した (図 3-1B)。その結果、SAHF 構造は低塩濃度では不明瞭になるものの、クロマチン画分 N2 でも観察できることが分かった。また、クロマチン画分 N2 を硫酸で処理して、クロマチン DNA に強く結合する塩基性蛋白質を可溶化し、これをヒストン画分 AE として回収した (図 3-1A)。

そこで、得られた細胞質画分 C、可溶性核画分 N1、およびクロマチン画分 N2 を SDS-PAGE により分離し、Coomassie 染色により構成蛋白質を比較した (図 3-1C)。その結果、mock 細胞と Ras 老化細胞との間で異なるパターンを示す蛋白質のバンドとして、mock 細胞のクロマチン画分 N2 に特異的に見られる約 37 kD のバンドと、Ras 老化細胞のクロマチン画分 N2 で増加している約 22 kD のバンドを発見した (図 3-1C、レーン 5 および 6、矢頭)。

次に、これらの蛋白質を同定するために質量分析を行った (図 3-1D)。mock 細胞と Ras 老化細胞のクロマチン画分 N2 のレーンから、37 kD および 22 kD のバンドを切り出し、トリプシン処理により消化した。調製したサンプルの質量分析は、当研究室博士研究員の齊藤基輝博士の御協力のもとで行った。質量分析の結果、mock 細胞の 37 kD のバンドからは、ヒストン H1 に由来する 7 種類のペプチドが検出された (図 3-1D)。これらのペプチドは、Ras 老化細胞の 37 kD 付近のゲルからは検出されなかった。したがって、mock 細胞のクロマチン画分 N2 に特異的に見られる 37 kD のバンドは、ヒストン H1 であることが示唆された。一方、Ras 老化細胞のクロマチン画分 N2 で増加している 22 kD のバンドからは、High Mobility Group A2 (HMGA2) に由来する 3 種類

のペプチドが検出された（図 3-1D）。しかし、これらのペプチドは、mock 細胞と Ras 老化細胞の両方で同程度に検出され、質量分析の結果だけでは 22 kD のバンドが HMGA2 であるかは不明であった。

### 3.2 Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の消失

Ras 老化細胞で増加する 22 kD のバンドについては、3.7 節で詳しく述べる。ここでは、Ras 老化細胞で消失する 37 kD のバンドがヒストン H1 かどうかを調べた。このために、ウサギおよびヒツジから調製した異なる 2 種類の抗ヒストン H1 抗体を用いてイムノブロット解析を行った（図 3-2）。どちらの抗ヒストン H1 抗体も、mock 細胞のクロマチン画分 N2 で 37 kD 付近にバンドを示すが、Ras 老化細胞では示さなかった（図 3-2A）。したがって、Ras 老化細胞で消失する 37 kD のバンドはヒストン H1 であると考えられた。このとき、抗ヒストン H1 ウサギ抗体が 37 kD 付近にひとつのバンドを示すのに対して、抗ヒストン H1 ヒツジ抗体は、2 つのバンドを示した（図 3-2A）。これは、ヒストン H1 に多くのバリエーションが存在し、抗体のバリエーションに対する特異性が異なることを反映していると考えられた。また、抗 H1 ヒツジ抗体のイムノブロット解析では、クロマチン画分 N2 の約 40 kD 付近にやや強いシグナルが見られた（図 3-2A、レーン 9、丸）。しかし、このシグナルは、抗ヒツジ H1 抗体の非存在下でも観察されたことから、ヒストン H1 とは無関係なバンドと考えられた（図 3-2B）。

さらに、ヒストン画分 AE の Coomassie 染色およびイムノブロット解析でも同様の結果が得られ、Ras 老化細胞ではヒストン H1 のバンドが消失していた（図 3-2C、レーン 4 および 8）。ヒストン画分 AE を用いた実験では、比較対照として、非同調およびコルセミドで処理した HeLa 細胞のヒストン画分を用いた。ヒストン H1 は細胞分裂期に高度にリン酸化修飾を受け、SDS-PAGE での泳動度が変化して、バンドが上にシフトする（図 3-2C、レーン 2 および 6）。mock 細胞で見られる 37 kD のバンドは、コルセミド処理により上にシフトする、非同調 HeLa 細胞の 37kD のバンドとよく一致した。これらの結果から、Ras 老化細胞で消失する 37 kD のバンドはヒストン H1 であると結論した。

次に、Ras 老化細胞のクロマチンから消失したヒストン H1 が、細胞内に存在するかどうかを調べた（図 3-2D）。この実験では、mock 細胞、Ras 老化細胞、および低血清存在下で細胞周期を停止した WI-38 細胞（低血清細胞）を用いた。低血清処理は、非感染細胞を、0.1%の血清を含む培養液で 1 週間培養した。低血清細胞は血清の添加に

より増殖を再開するので、細胞老化の不可逆的な増殖停止とは異なり、SAHF も形成しない。これらの細胞のペレットを、SDS サンプルバッファーで直接懸濁して全細胞抽出液 (WCE) を調製した。抗ヒストン H1 ヒツジ抗体を用いたイムノブロット解析の結果、Ras 老化細胞のヒストン H1 は全細胞抽出液から消失していた (図 3-2D、レーン 3)。このとき、Ras 老化細胞の約 40 kD および約 35 kD 付近にやや強いシグナルが見られた (図 3-2D、レーン 3、白丸と黒丸)。しかし、これらのシグナルは、抗ヒツジ H1 抗体の非存在下でも観察されたことから、ヒストン H1 とは無関係なバンドと考えられた (図 3-2E)。また、薬剤選別終了後 0~7 日目の mock 細胞および Ras 老化細胞から全細胞抽出液を回収し、ヒストン H1 消失の時間経過を調べた (図 3-2F)。ヒストン H1 は薬剤選別終了後 2 日目に著しく減少し、6~7 日目にはほとんどすべて消失していた。これらの結果から、ヒストン H1 は、RasG12V の遺伝子導入により誘導される WI-38 細胞の細胞老化過程で、細胞から消失することが明らかになった。

### 3.3 さまざまな老化細胞における SAHF 形成とヒストン H1 の消失

ヒト正常線維芽細胞は、由来する組織や個体の違いにより、細胞老化の誘導に重要な CDK 阻害因子 p16<sup>INK4a</sup> の発現量が異なることが知られている (Ben-Porath and Weinberg, 2005)。例えば、BJ 細胞は p16<sup>INK4a</sup> の発現量が低く、複製老化に伴う増殖の停止はもうひとつの CDK 阻害因子 p21 により制御される (Beausejour et al., 2003)。このように、異なる組織や個体に由来するヒト正常線維芽細胞は性質が不均一である。そこで、Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の消失が、WI-38 以外の正常線維芽細胞でも見られるかどうかを調べた (図 3-3A)。この実験では、ヒト正常線維芽細胞 WI-38、MRC-5、IMR-90、および BJ に RasG12V を発現するレトロウイルスを感染させ、薬剤選別終了後 5 日目にヒストン画分 AE および細胞質画分 C を調製した。また、ブロモ標識デオキシウリジン (BrdU) の取り込みを指標に、増殖している細胞の割合を調べた (図 3-3A、下)。さらに、DAPI 染色により、SAHF 陽性細胞の割合を調べた (図 3-3A、下)。ヒストン画分 AE のイムノブロット解析の結果、RasG12V を遺伝子導入した MRC-5 および IMR-90 細胞では、ヒストン H1 が著しく減少していた (図 3-3A、レーン 4 および 6)。一方、RasG12V を遺伝子導入した BJ 細胞では、ヒストン H1 の減少は観察されなかった (図 3-3A、レーン 8)。BJ 細胞は、SAHF を効率よく形成しないことが報告されている (Narita et al., 2003)。本実験においても、RasG12V を発現した BJ 細胞は、増殖停止の表現型を示さず、SAHF の形成効率も著しく低かった (図 3-3A、下)。また、WI-38、MRC-5 お

よびIMR-90細胞で観察されたヒストンH1の減少の程度は、SAHF形成効率とよく相関した。したがって、Ras老化細胞におけるヒストンH1の消失は、SAHFの形成とよく一致して、さまざまなヒト正常線維芽細胞で起こることが分かった。

次に、ヒストンH1の消失が、RasG12V以外のストレス刺激による老化細胞でも見られるかどうかを調べた(図3-3B)。まず、WI-38細胞に、構成的活性化型MKK6(MKK6EE)を発現するレトロウイルスを感染させた。MKK6EEの遺伝子導入は、急速に細胞老化表現型を誘導することが報告されている(Iwasa et al., 2003)(Wang et al., 2002)。また、非感染WI-38細胞を継代培養により維持し、テロメアDNAの短小化による複製老化を誘導した。さらに、ヒストンH1消失の陽性対照として、Ras老化細胞を調製した。これらの細胞から全細胞抽出液を調製し、イムノブロット解析を行った。その結果、ヒストンH1は、複製老化細胞およびMKK6老化細胞で著しく減少しており、ヒストンH1の減少の程度はSAHF形成効率とよく相関した(図3-3B)。これらの結果から、ヒストンH1の消失は、さまざまなストレス刺激により誘導される老化細胞において、共通に見られる現象であることが明らかになった。

### 3.4 老化細胞におけるヒストンH1消失の分子機構

DNA複製と共役してクロマチンに取り込まれるヒストンは、その遺伝子発現がS期のDNA合成と一致して起こるように厳密に制御されている。これは、ヒストンmRNAの3'非翻訳領域に存在するステムループ配列が、DNA合成と一致してヒストンmRNAを安定化することによる(Gunjan et al., 2005)。老化細胞は増殖を停止しており、DNA複製を行っていない(図3-3B)。したがって、老化細胞はヒストンH1の遺伝子を発現していないと考えられた。そこで、老化細胞で見られるヒストンH1の消失が、ヒストンH1遺伝子の発現抑制の結果であるかどうかを調べた。この実験では、DNA合成を行っていないRas老化細胞と低血清細胞において、ヒストンH1のmRNA量と蛋白質量を比較した(図3-4)。

WI-38細胞にRasG12Vを遺伝子導入し、mock細胞およびRas老化細胞を調製した。また、mock細胞を低血清培養液で1週間培養して、低血清細胞を調製した。これらの細胞を核酸結合色素PIにより染色し、laser scanning cytometer(LSC)を用いてDNA含量を測定した(図3-4A、右)。低血清細胞は大部分がG1期で停止しており、S期の細胞はほとんど観察されなかった(図3-4A、右中央)。一方、Ras老化細胞のDNA含量のパターンは、S期に多くの細胞が存在することを示したが、このとき、細胞はBrdU

を取り込まず、DNA 合成を行っていないと考えられた (図 3-4A、下)。最近、Ras 老化細胞は、S 期で細胞周期を停止することが報告されており、Ras 老化細胞の LSC のパターンは、この現象を反映している可能性がある (Di Micco et al., 2006)。

これらの細胞から全 RNA を調製し、ヒストン H1 バリエーションのひとつ HIST1H1D 遺伝子の発現を RT-PCR により検出した。その結果、低血清細胞および Ras 老化細胞が DNA 合成を行っていないことと一致して、これらの細胞では HIST1H1D の mRNA が著しく減少していた (図 3-4B、レーン 2 および 3)。そこで、細胞からヒストン画分 AE を調製し、ヒストン H1 を Coomassie 染色およびイムノブロット解析により調べた (図 3-4C)。興味深いことに、低血清細胞では、増殖している mock 細胞と同程度のヒストン H1 が観察された。この結果は、ヒストン H1 の遺伝子発現が抑制されても、ヒストン H1 蛋白質量は変化しないことを示している。したがって、老化細胞におけるヒストン H1 の消失は、ヒストン H1 遺伝子の発現抑制だけでなく、ヒストン H1 蛋白質の安定性による制御も受けていると考えられた。

### 3.5 ヒストン H1 の強制発現とノックダウンの試み

細胞老化におけるヒストン H1 消失の役割を調べるために、Ras 老化細胞においてヒストン H1 を強制発現することを試みた (図 3-5A)。まず、WI-38 細胞にヒストン H1 (HIST1H1D) を発現するレトロウイルスまたはレンチウイルスを感染させ、薬剤選別により遺伝子導入細胞を得た。レトロウイルスによる遺伝子発現では、ヒストン H1 は LTR または CMV プロモーターの下流で発現するように設計した。また、レンチウイルスでは、EF1 $\alpha$  プロモーターの下流で発現するように設計した。一般的に、CMV および EF1 $\alpha$  プロモーターは、転写効率の高いプロモーターとして知られている。また、ウイルスベクターから発現するヒストン H1 mRNA は、内在性 mRNA に存在するステムループ配列をもたないので、細胞周期を通して発現する。得られた細胞に RasG12V を発現するレトロウイルスを感染させ、ヒストン H1 を強制発現した Ras 老化細胞を作製した。しかしながら、CMV および EF1 $\alpha$  プロモーターの下流でヒストン H1 を発現した細胞においても、ヒストン H1 蛋白質量は著しく減少していた (図 3-5A、レーン 6 および 8)。したがって、この実験では、Ras 老化細胞のヒストン H1 を回復させることができず、細胞老化におけるヒストン H1 消失の役割を明らかにすることができなかった。

次に、増殖している若い WI-38 細胞を用いて、RNAi によるヒストン H1 のノックダ

ウンを行い、ヒストン H1 消失の効果を調べることを試みた (図 3-5B)。ヒストン H1 のバリエント H1.2、H1.3、および H1.5 に対する 11 種類の short hairpin RNA (shRNA) を設計し、レトロウイルスベクターを用いて WI-38 細胞に導入した (図 3-5C)。界面活性剤を含むバッファーで細胞を処理し、クロマチン蛋白質を含む画分を調製してイムノブロット解析を行った。しかしながら、shRNA を導入した細胞では、ヒストン H1 蛋白質はほとんど減少しなかった (図 3-5C)。これは、WI-38 のような体細胞由来の細胞では、6 種類のヒストン H1 バリエントが存在するため、これらすべてのバリエントを効率よくノックダウンすることができなかったことによると考えられた。また、3.4 節で述べたように、クロマチンに結合したヒストン H1 は安定な蛋白質で、ヒストン H1 の mRNA 量が減少しても、ヒストン H1 蛋白質量が直ちに減少することはない。このこともノックダウンが成功しなかった理由のひとつであると考えられた。結果的に、RNAi によりヒストン H1 をノックダウンすることができず、若い細胞におけるヒストン H1 消失の効果を明らかにすることはできなかった。

### 3.6 ヒストン H1-EGFP 融合蛋白質の発現による細胞老化表現型の部分的な誘導

強制発現およびノックダウンの実験では、ヒストン H1 の消失が細胞老化の誘導に重要な役割を果たしているかどうかを直接的に明らかにすることができなかった。そこで、老化細胞におけるヒストン H1 の消失と細胞老化表現型の誘導との間に相関関係があるかどうかを調べた (図 3-6)。この実験では、ヒストン H1 のカルボキシル末端側またはアミノ末端側に EGFP または HA を融合したキメラ蛋白質を作製し、レトロウイルスを用いて WI-38 細胞に遺伝子導入した (図 3-6A)。カルボキシル末端側に EGFP を融合したヒストン H1 を C fusion、アミノ末端側に融合したヒストン H1 を N fusion と名づけた。N fusion 1 と N fusion 2 は、EGFP とヒストン H1 の ORF の間に異なるアミノ酸配列をもつ (実験方法および材料を参照)。また、比較対照として、アミノ末端側に HA を融合したヒストン H1 (HA-H1) または EGFP 単独を遺伝子導入した。さらに、細胞老化を誘導する陽性対照として RasG12V を遺伝子導入した。

ヒストン H1-EGFP 融合蛋白質が核内でクロマチンに結合し、内在性ヒストン H1 と同様の挙動をとることはすでに報告されている (Lever et al., 2000; Misteli et al., 2000)。これらの報告と一致して、抗 HA 抗体を用いた免疫染色と EGFP の蛍光観察の結果、作製したキメラ蛋白質は核内に特異的に局在した (図 3-6A)。また、N fusion 1 の EGFP シグナルは、分裂期凝縮染色体と共局在することから、ヒストン H1-EGFP 融合蛋白質

はクロマチンに結合していると考えられた (図 3-6B)。これらの細胞を、界面活性剤を含むバッファーで処理して遠心し、クロマチン蛋白質を含む画分をペレットとして回収した。クロマチン蛋白質のイムノブロット解析の結果、N fusion 1 および N fusion 2 を発現している細胞では、内在性ヒストン H1 を含めたヒストン H1 の総量が著しく減少していた (図 3-6C、レーン 5 および 6)。EGFP、HA-H1、および C fusion を発現した細胞ではこのような効果は見られなかった (図 3-6C、レーン 3、4 および 7)。

興味深いことに、N fusion 1 および 2 を導入した WI-38 細胞は、遺伝子導入後急速に増殖を停止し、BrdU の取り込み量の低下を示した (図 3-6D および E)。また、これらの細胞は肥大化し、老化関連 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の増加を示したことから、N fusion 1 および 2 の遺伝子導入は細胞老化表現型を誘導していると考えられた (図 3-6F および G)。そこで、薬剤選別終了後 3 日目の細胞から蛋白質を調製し、老化細胞のマーカー蛋白質を調べた (図 3-6H)。その結果、N fusion 1 および 2 を遺伝子導入した WI-38 細胞は、Rb 蛋白質の低リン酸化およびサイクリン A の減少を示し、細胞周期が G1 期で停止していると考えられた (図 3-6H、レーン 5 および 6)。また、N fusion 1 および 2 の遺伝子導入は、p53 Ser15 のリン酸化および CDK 阻害因子 p21 の増加を引き起こした。これらの表現型は、RasG12V の遺伝子導入により誘導される細胞老化表現型とよく一致した。これに対して、EGFP、C fusion、HA-H1、または未標識のヒストン H1 (H1) を導入した細胞は、ヒストン H1 の減少も細胞老化表現型も示さなかった (図 3-6H および I)。したがって、N fusion の遺伝子導入により誘導される細胞老化表現型は、ヒストン H1 蛋白質量の減少とよく相関して誘導されることが分かった。ただし、N fusion 1 および 2 を導入した細胞は、CDK 阻害因子 p16 の増加と SAHF の形成は示さなかった (図 3-6 H および A)。この結果から、老化細胞には、ヒストン H1 の消失のほかに SAHF 形成を制御する何らかの因子が存在すると考えられた。

### 3.7 Ras 老化細胞における HMGA2 の増加

細胞老化の過程で変化するクロマチン結合蛋白質のひとつとして、Ras 老化細胞で増加している 22 kD のバンドを発見した (3.1 節、図 3-1C)。質量分析の結果、このバンドは HMGA2 であることが示唆された。そこで、WI-38 細胞の mock 細胞および Ras 老化細胞からヒストン画分 AE を調製し、抗 HMGA2 抗体を用いたイムノブロット解析を行った (図 3-7A)。その結果、老化細胞のクロマチンでは HMGA2 が増加していた。興味深いことに、ヒストン H1 と HMGA2 は、どちらもリンカーDNAに結合する

蛋白質で、共通の結合部位をめぐって競合することが報告されていた（1.5 節）（Catez et al., 2004）。したがって、老化細胞ではヒストン H1 が HMGA2 に置き換わっていることが示唆された。一方、老化細胞の SAHF では、ヒストン macroH2A が増加することが報告されている（Zhang et al., 2005）。しかし、SAHF 形成におけるヒストン macroH2A の役割については明らかでない。

そこで、WI-38 細胞の Ras 老化細胞からヒストン画分 AE を調製し、macroH2A、HMGA2、およびヒストン H1 の経時変化をイムノブロット解析により調べた（図 3-7B）。その結果、Ras 老化細胞のヒストン H1 の消失は、HMGA2 の増加とよく相関し、ヒストン H1 と HMGA2 が置き換わっていると考えられた（図 3-7B、レーン 5～8）。また、HMGA2 の増加は、ヒストン H1 を強制発現した Ras 老化細胞においても観察された（図 3-7C）。したがって、Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の強制発現は、ヒストン H1 と HMGA2 の置換を抑制できないと考えられた。一方、すでに報告されている通り、Ras 老化細胞のクロマチンでは macroH2A が増加していた（図 3-7B、レーン 5～8）。

次に、細胞老化における HMGA2 と macroH2A の役割を調べるために、HMGA2 と macroH2A をそれぞれ HA と FLAG で標識し、レトロウイルスを用いて増殖している若い WI-38 細胞に遺伝子導入した（図 3-7D）。また、細胞老化を誘導する陽性対照として、RasG12V を遺伝子導入した。これらの細胞からヒストン画分 AE を調製し、イムノブロット解析を行った。その結果、HA-HMGA2 または macroH2A-FLAG を導入した細胞では、それぞれの蛋白質が Ras 老化細胞で見られる内在性 HMGA2 および内在性 macroH2A と同程度に増加した（図 3-7D、レーン 2 および 3）。また、これらの蛋白質は核に局在した（図 3-7E）。しかし、HA-HMGA2 または macroH2A-FLAG を導入した細胞は SAHF の形成を示さず、mock 細胞と同様に増殖して細胞老化表現型を示さなかった（図 3-7D、E および F）。また、これらの細胞ではヒストン H1 の減少は見られなかった。したがって、HMGA2 および macroH2A の増加は、SAHF の形成を含めた細胞老化表現型の誘導に不十分であると考えられた。

### 3.8 ヒストン H1 と HMGA2 の置換による SAHF 形成の制御

老化細胞のクロマチンでは、ヒストン H1 が消失する代わりに、HMGA2 と macroH2A が増加することを示した。一方、HA-HMGA2 または macroH2A-FLAG を単独で導入した WI-38 細胞では、それぞれの蛋白質は増加していたが、ヒストン H1 は減少しておらず、SAHF は形成されなかった。したがって、老化細胞の SAHF 形成には、HMGA2

または macroH2A が増加することと、ヒストン H1 が減少することの両方が重要である可能性が考えられた。この仮説を調べるために、内在性ヒストン H1 を著しく減少させる効果をもつヒストン H1-EGFP 融合蛋白質を用いた (3.6 節)。

まず、増殖している若い WI-38 細胞に HA-HMGA2 または macroH2A-FLAG をレトロウイルスにより遺伝子導入し、薬剤選別を行って遺伝子導入細胞を得た。これらの細胞に N fusion 1 または 2 を遺伝子導入することにより、HMGA2 または macroH2A が増加して、ヒストン H1 が減少する状態を再現した (図 3-8)。作製した細胞を、界面活性剤を含むバッファーで処理してクロマチン蛋白質を調製し、イムノブロット解析を行った (図 3-8A)。HMGA2 と N fusion 2 (レーン 11)、または macroH2A と N fusion 2 (レーン 12) を同時に遺伝子導入した細胞では、HMGA2 または macroH2A がそれぞれ増加し、ヒストン H1 が減少していた。これは、Ras 老化細胞 (レーン 4) で見られる状態とよく一致した。また、3.6 節で述べたように、N fusion 2 を遺伝子導入した細胞は、細胞老化と関係した増殖停止を示した。

これらの細胞を DAPI 染色し、SAHF 形成効率を調べた。その結果、N fusion 2 を単独で導入した細胞に比べて、HA-HMGA2 と N fusion 2 を同時に導入した細胞では、有意に SAHF が形成された (図 3-8B および C)。この効果は、N fusion 1 を導入した細胞でも同様に観察された (図 3-8D)。一方、macroH2A-FLAG と N fusion 2 を同時に導入した細胞は、SAHF を示さなかった。これらの結果から、老化細胞の SAHF 形成は、ヒストン H1 の減少と HMGA2 の増加、すなわちヒストン H1 と HMGA2 の置換により制御されると考えられた。

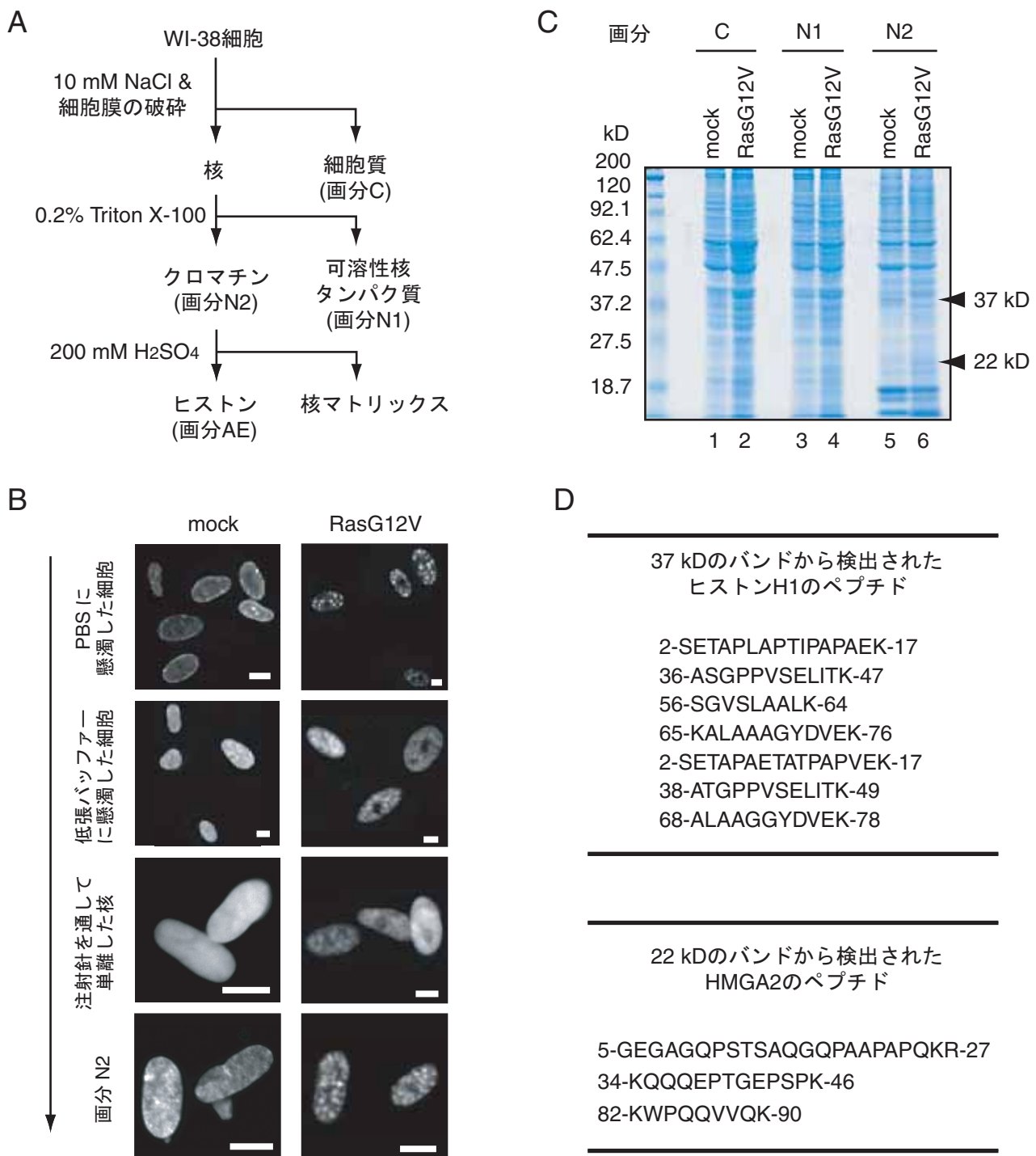


図 3-1 細胞老化に伴って変化するクロマチン結合タンパク質の解析

- (A) クロマチンタンパク質の調製方法を模式的に示した。
- (B) 分画の過程で、少量の核サンプルを Hoecst33342 で染色し、SAHF の形成を蛍光顕微鏡により観察した。SAHFは、クロマチン画分 N2においても保持されていた。スケールバー = 10  $\mu$ m。
- (C) mock 細胞および Ras 老化細胞から調製した画分を、SDS-PAGE により分離し、Coomassie 染色した。mock 細胞と Ras 老化細胞で変化する、37 kD と 22 kD のタンパク質バンドを矢頭で示した。
- (D) 37 kD と 22 kD のバンドを切り出し、質量分析を行った。これらのバンドから検出されたヒストン H1 と HMGA2 のペプチドを示した。

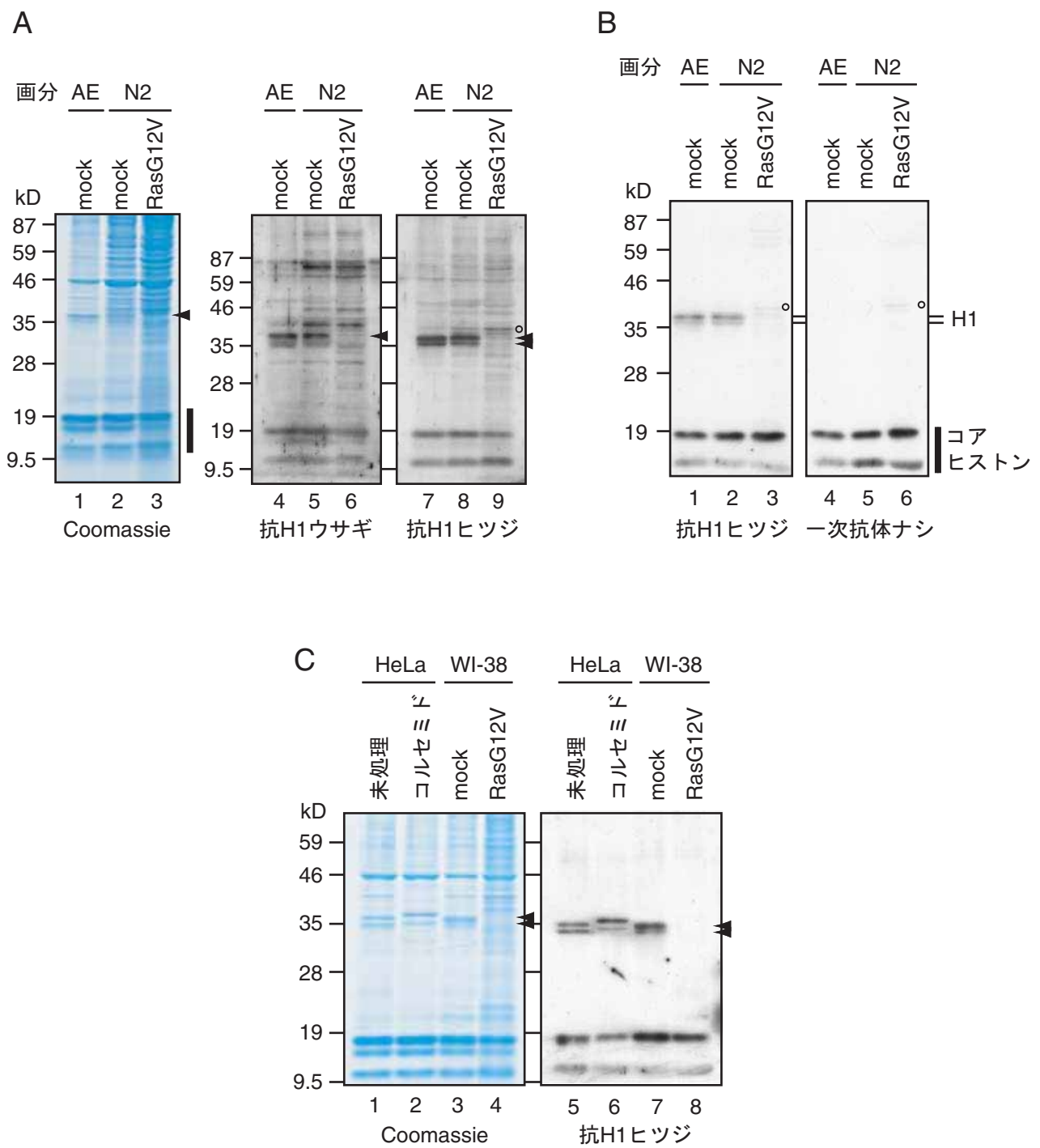
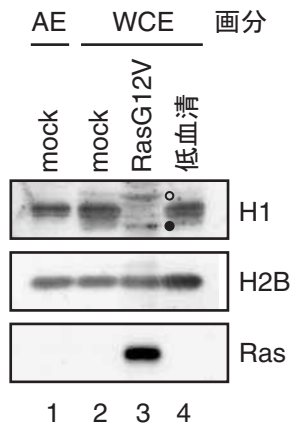


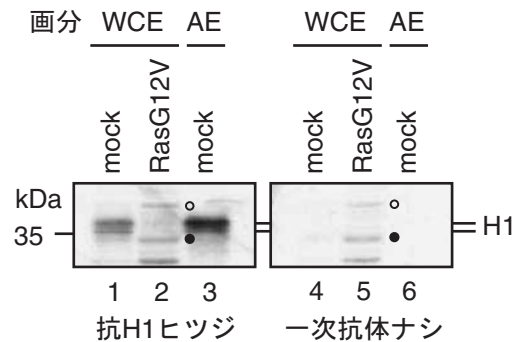
図 3-2 Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の消失

次のページへ続く。

D



E



F

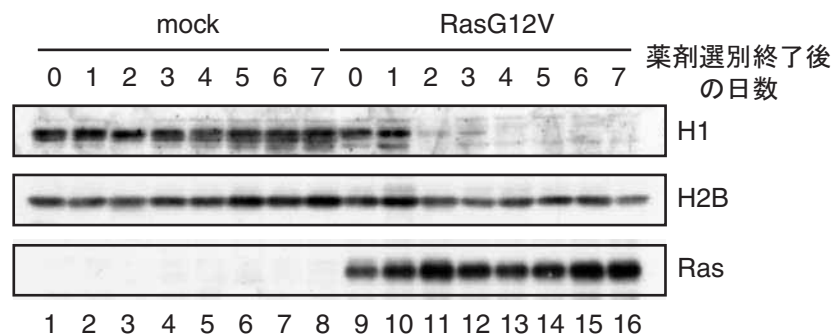


図 3-2 Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の消失

- (A) mock 細胞と Ras 老化細胞からクロマチン画分 N2 を調製して、Coomassie 染色とイムノブロット解析を行った。また、比較対照として、mock 細胞のヒストン画分を用いた。各サンプルのタンパク質量は、コアヒストンにより標準化した（垂直線）。ヒストン H1 を示すバンドを矢頭で示した。Ras 老化細胞で増大している非特異的なバンドを丸で示した。
- (B) 抗 H1 ヒツジ抗体の特異性を確認した。A で見られた丸のバンドは、一次抗体の非存在下でも検出されたことから、ヒストン H1 に無関係のタンパク質と考えられた。
- (C) mock 細胞と Ras 老化細胞から、ヒストン画分 AE を調製した。また、比較対照として、コルセミド処理した HeLa 細胞からヒストン画分 AE を調製した。調製したヒストンサンプルを、Coomassie 染色およびイムノブロットにより解析した。ヒストン H1 を示すバンドを矢頭で示した。
- (D) mock 細胞、Ras 老化細胞および低血清細胞から全細胞抽出液 (WCE) を調製し、イムノブロット解析を行った。Ras 老化細胞で増大している非特異的なバンドを丸で示した。
- (E) 抗 H1 ヒツジ抗体の特異性を確認した。D で見られた丸のバンドは、一次抗体の非存在下でも検出されたことから、ヒストン H1 に無関係のタンパク質と考えられた。
- (F) 薬剤選別終了後 0～7 日目の細胞から、全細胞抽出液を調製して、イムノブロット解析を行った。

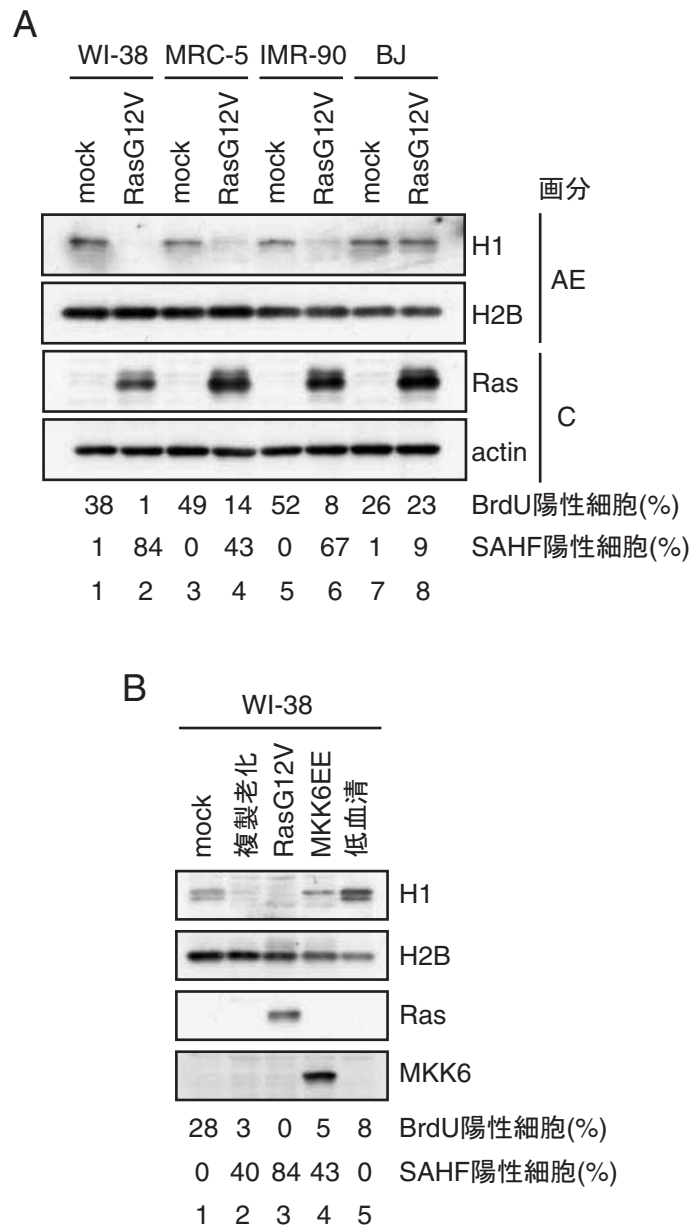


図 3-3 さまざまな老化細胞におけるヒストン H1 の消失

(A) ヒト正常線維芽細胞 WI-38、MRC-5、IMR-90、および BJ に、RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導した。図 3-1A で述べたようにヒストン画分 AE と細胞質画分 C を調製し、イムノブロット解析を行った。サンプルを調製した時点での BrdU 陽性細胞と SAHF 陽性細胞の割合を示した（下）。

(B) WI-38 細胞に、RasG12V と MKK6EE を遺伝子導入して細胞老化を誘導した。また、継代培養により、複製老化細胞を調製した。複製老化細胞の総分裂回数は 57 で、このとき細胞は 3 週間培養してもコンフルエントな状態にならなかった。比較対照として、mock 感染細胞および低血清培養液で 1 週間培養した細胞を用いた。これらの細胞から全細胞抽出液を調製し、イムノブロット解析を行った。サンプルを調製した時点での BrdU 陽性細胞と SAHF 陽性細胞の割合を示した（下）。

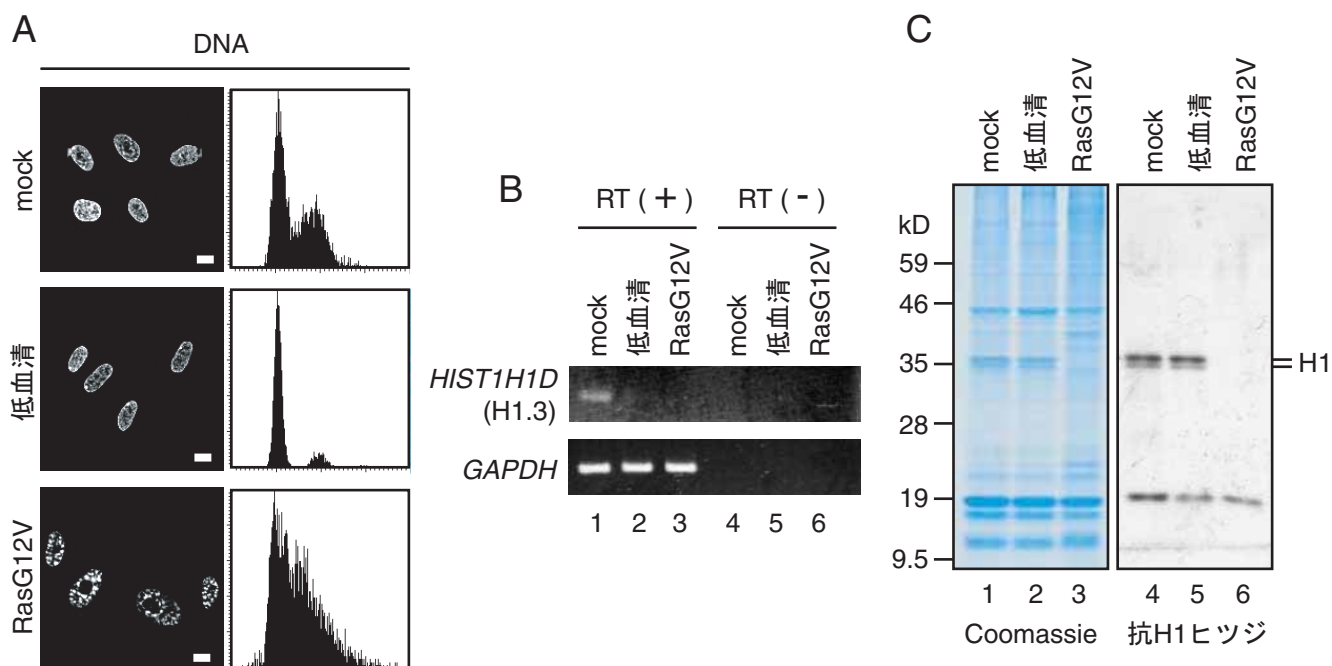


図 3-4 老化細胞におけるヒストン H1 消失の分子機構

(A) WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導した。また、非感染細胞を低血清培養液で 1 週間培養した（低血清）。これらの細胞を DAPI（左）または PI（右）で染色して、それぞれ、SAHF の形成と DNA 含量を解析した。DNA 含量のパターンは、多くの Ras 老化細胞が S 期に存在することを示したが、このとき細胞はほぼ完全に増殖を停止していた（下）。

(B) A で述べた細胞から RNA を調製し、ヒストン H1.3 をコードする *HIST1H1D*、および *GAPDH* の mRNA を RT-PCR により検出した。陰性対照として、逆転写酵素（RT）の非存在下で反応を行い、バンドが検出されないことを確認した（レーン 4 ~ 6）。

(C) A で述べた細胞から酸抽出によりヒストンを調製し、Coomassie 染色およびイムノブロット解析を行った。ヒストン H1 の位置を右に示した。

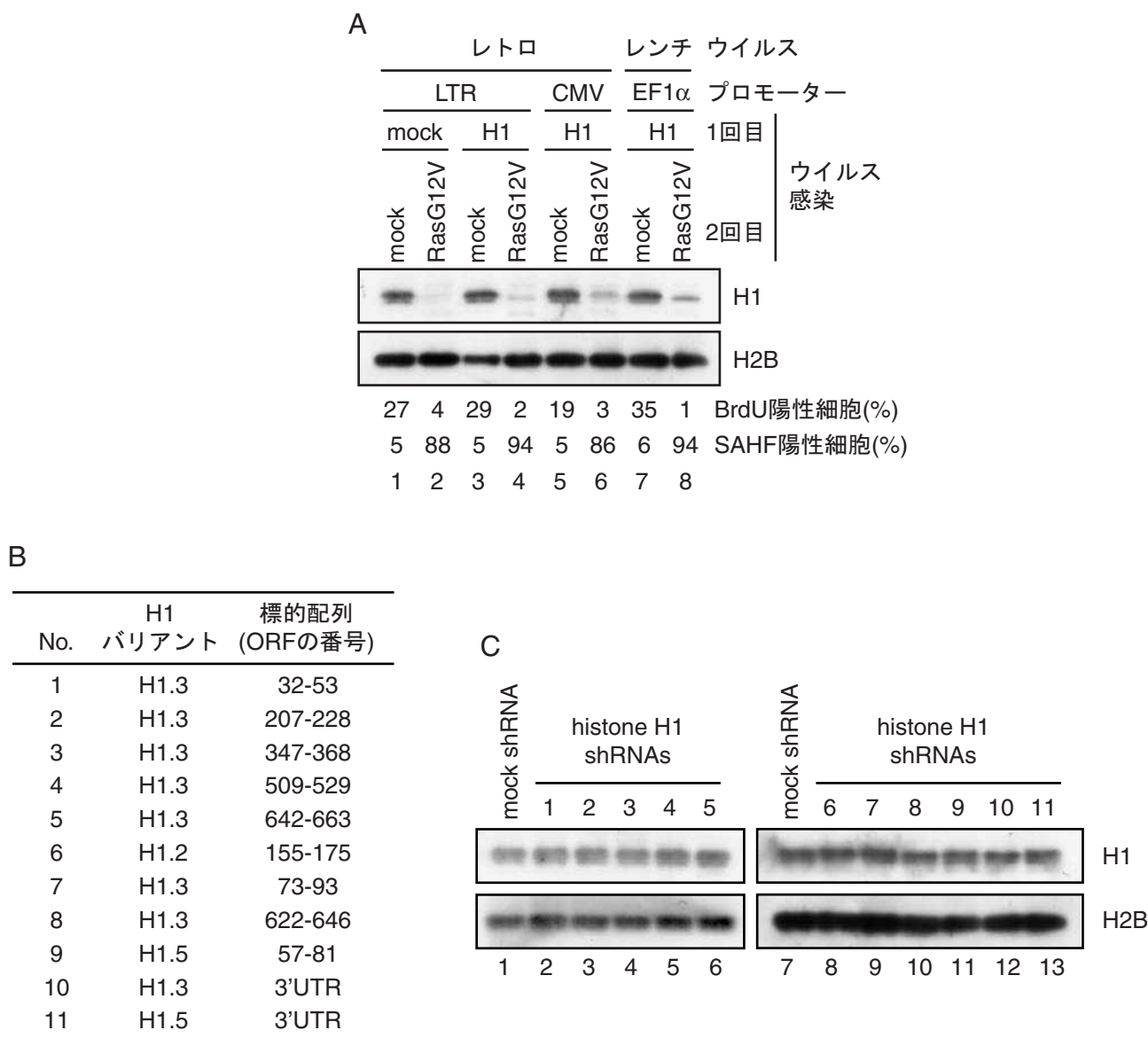


図 3-5 ヒストン H1 の強制発現とノックダウンの試み

(A) レトロウイルスまたはレチウイルスを用いて、WI-38 細胞にヒストン H1 (H1.3) を遺伝子導入し、薬剤耐性細胞を得た (ウイルス感染 1 回目)。これらの細胞に、RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導した (ウイルス感染 2 回目)。得られた細胞からクロマチンタンパク質を調製し、イムノブロット解析を行った。RasG12V を導入した細胞において、ヒストン H1 タンパク質量を回復させることはできなかった。サンプル調製した時点での、BrdU 陽性細胞と SAHF 陽性細胞の割合を示した (下)。

(B) RNAi の実験に用いた shRNA の標的部位を示した。

(C) レトロウイルスを用いて、WI-38 細胞にヒストン H1 shRNA を導入し、薬剤選別により導入細胞を得た。これらの細胞からクロマチンタンパク質を調製し、イムノブロット解析を行った。ヒストン H1 に対する shRNA は、ヒストン H1 のタンパク質量に影響しなかった。

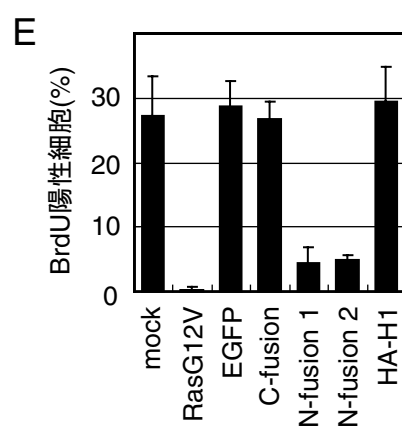
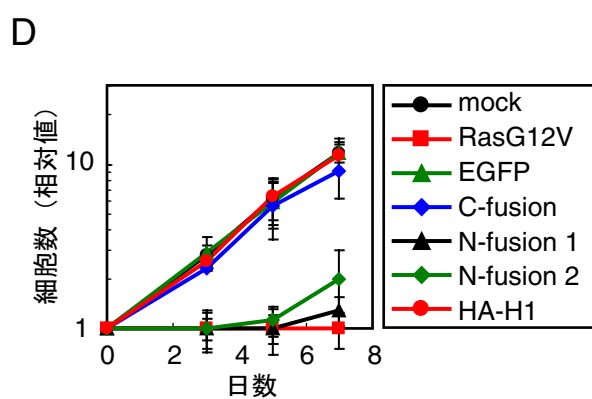
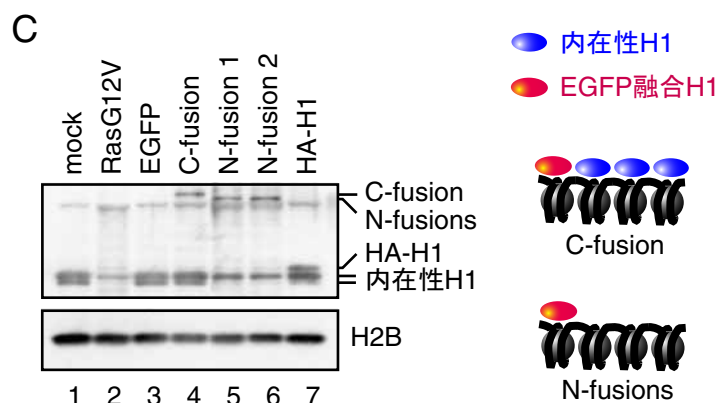
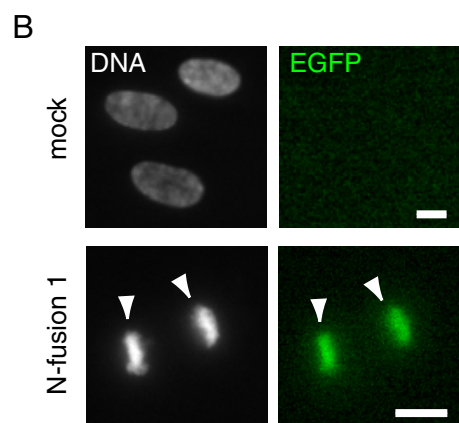
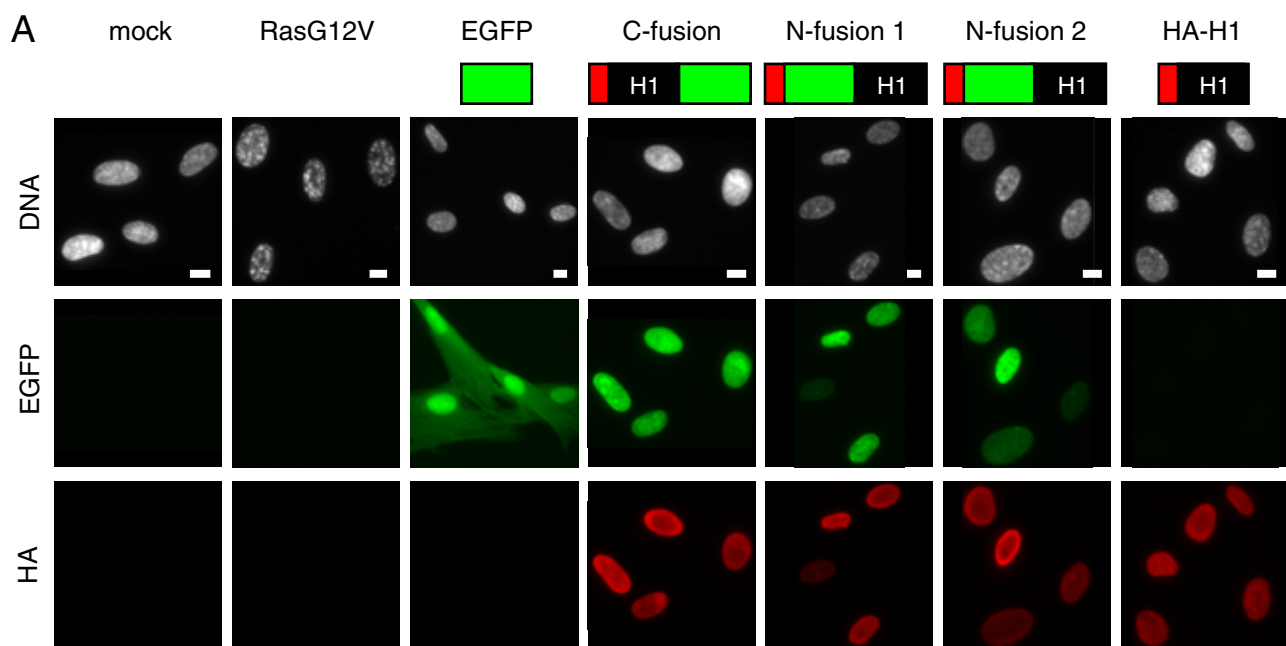
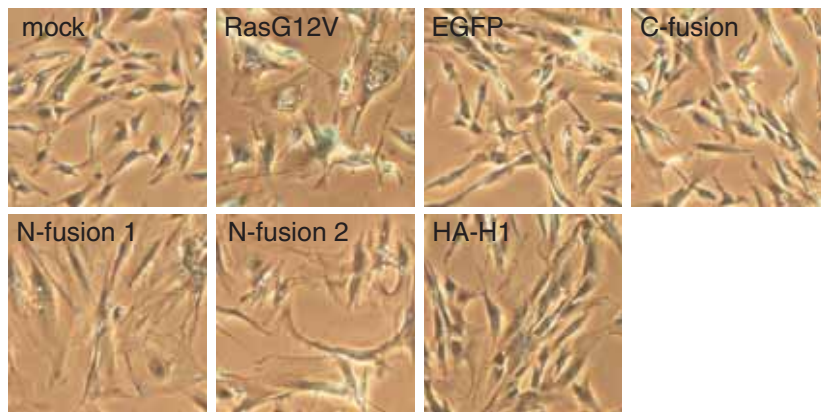


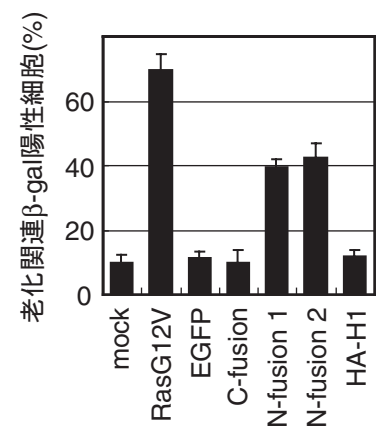
図 3-6 ヒストン H1-EGFP 融合タンパク質の発現による細胞老化の誘導。

次のページへ続く。

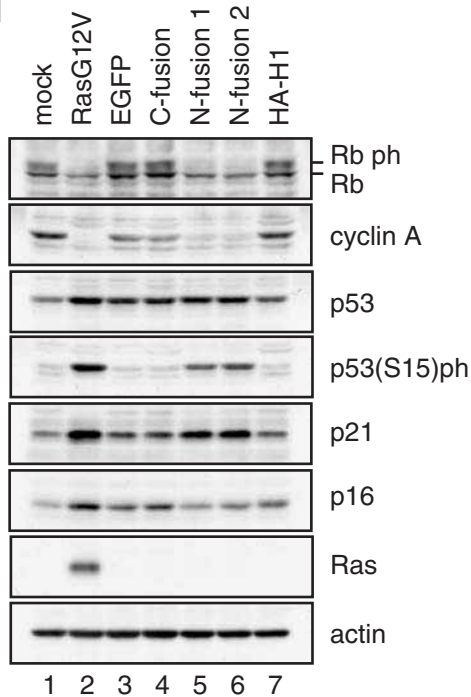
F



G



H



I

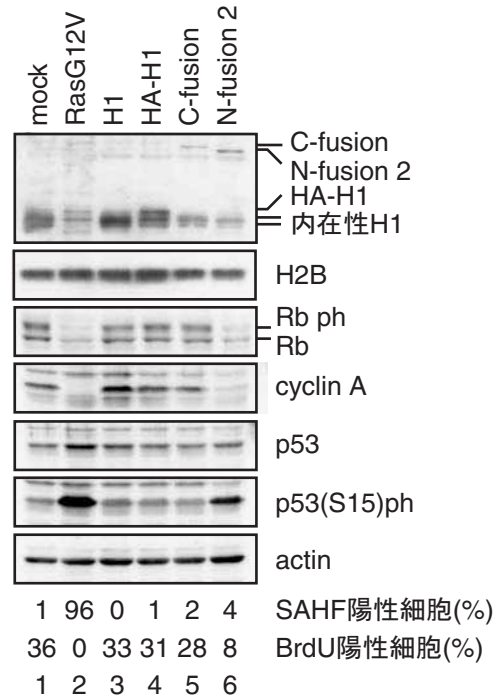


図 3-6 ヒストン H1-EGFP 融合タンパク質の発現による細胞老化の誘導

(A) ヒストン H1 融合タンパク質の構造を模式的に示した (上)。作製した遺伝子を WI-38 細胞に導入し、抗 HA 抗体 (赤) と DAPI (青) で染色した。また、EGFP の蛍光シグナルを緑で示した。ヒストン H1 融合タンパク質は、核に特異的に局在した。

(B) mock 細胞と N fusion 1 細胞を DAPI で染色し、EGFP の蛍光を観察した。N fusion 1 細胞の EGFP シグナルは、分裂期凝縮染色体と共局在した。

(C) A で述べた細胞を、界面活性剤を含むバッファーで処理して、クロマチンタンパク質を調製した。サンプルをイムノブロットにより解析した。内在性ヒストン H1 およびヒストン H1 融合タンパク質のバンドを右に示した。N fusion を発現した細胞では、内在性ヒストン H1 の量が著しく減少していた (レーン 5 および 6)。N fusion を発現した細胞で、内在性ヒストン H1 が減少する様子をイラストで示した (右)。

(D & E) 細胞の増殖曲線を示した (D)。薬剤選別終了後 3 日目に、BrdU 陽性細胞の割合を調べた (E, n = 200)。エラーバーは、3 回の実験の標準偏差を示す。

(F) 薬剤選別終了後 3 日目の細胞の位相差顕微鏡像を示した。RasG12V および N fusion を発現した細胞は肥大化した。

(G) 薬剤選別終了後 5 日目に、老化関連  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を調べた。RasG12V および N fusion を発現した細胞では、陽性細胞が多く見られた。

(H & I) C で述べたようにタンパク質を調製し、イムノブロット解析を行った。ph はリン酸化型を示す。サンプルを調製した時点での SAHF 陽性細胞と BrdU 陽性細胞の割合を示した (I、下)。

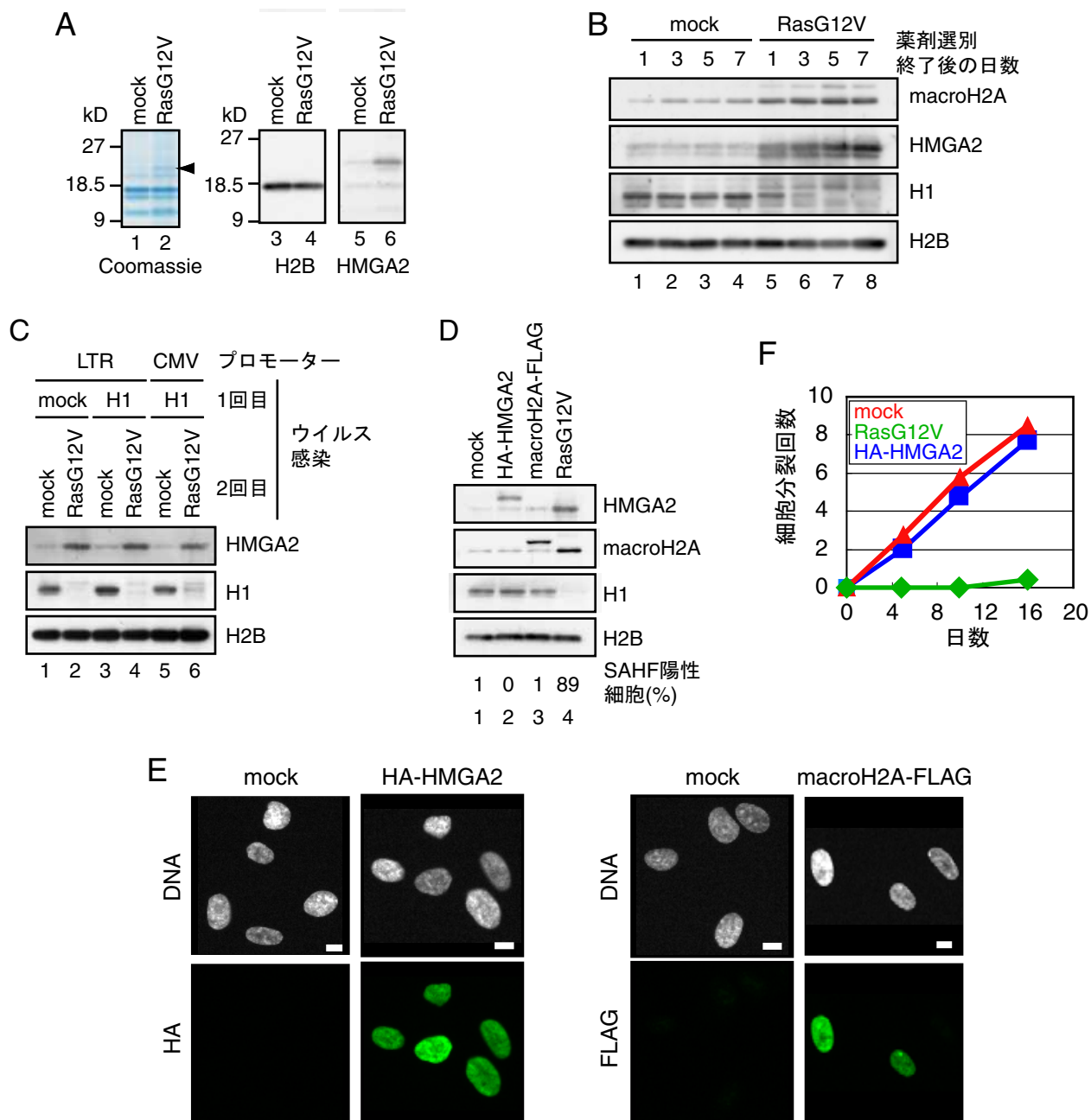


図 3-7 Ras 老化細胞における HMGA2 の増大

(A) WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入し、ヒストン画分を調製した。サンプルを Coomassie 染色およびイムノブロットにより解析した。老化細胞で増大している約 22 kD のバンド（矢頭）は、抗 HMGA2 シグナルと一致した。

(B) WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入し、薬剤選別終了後 1 ～ 7 日目にヒストン画分を調製した。サンプルをイムノブロットにより解析した。Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の消失は、HMGA2 の増大とよく相関した。

(C) 図 3-5A で述べた、ヒストン H1 を強制発現した Ras 老化細胞からクロマチンタンパク質を調製し、抗 HMGA2 抗体でイムノブロット解析した。ヒストン H1 の強制発現の有無に関わらず、Ras 老化細胞では HMGA2 が増大していた。

(D) WI-38 細胞に HA-HMGA2 および macroH2A-FLAG を遺伝子導入し、薬剤選別終了後 5 日目にヒストン画分を調製した。サンプルを調製した時点での SAHF 陽性細胞の割合を示した（下）。

(E) D で述べた細胞を免疫染色した。HA-HMGA2 および macroH2A-FLAG は核に局在した。

(F) HA-HMGA2 を導入した WI-38 細胞の増殖曲線を示した。HA-HMGA2 を導入した細胞は、mock 細胞と同程度に増殖した。細胞老化の陽性対照として、Ras 老化細胞を用いた。

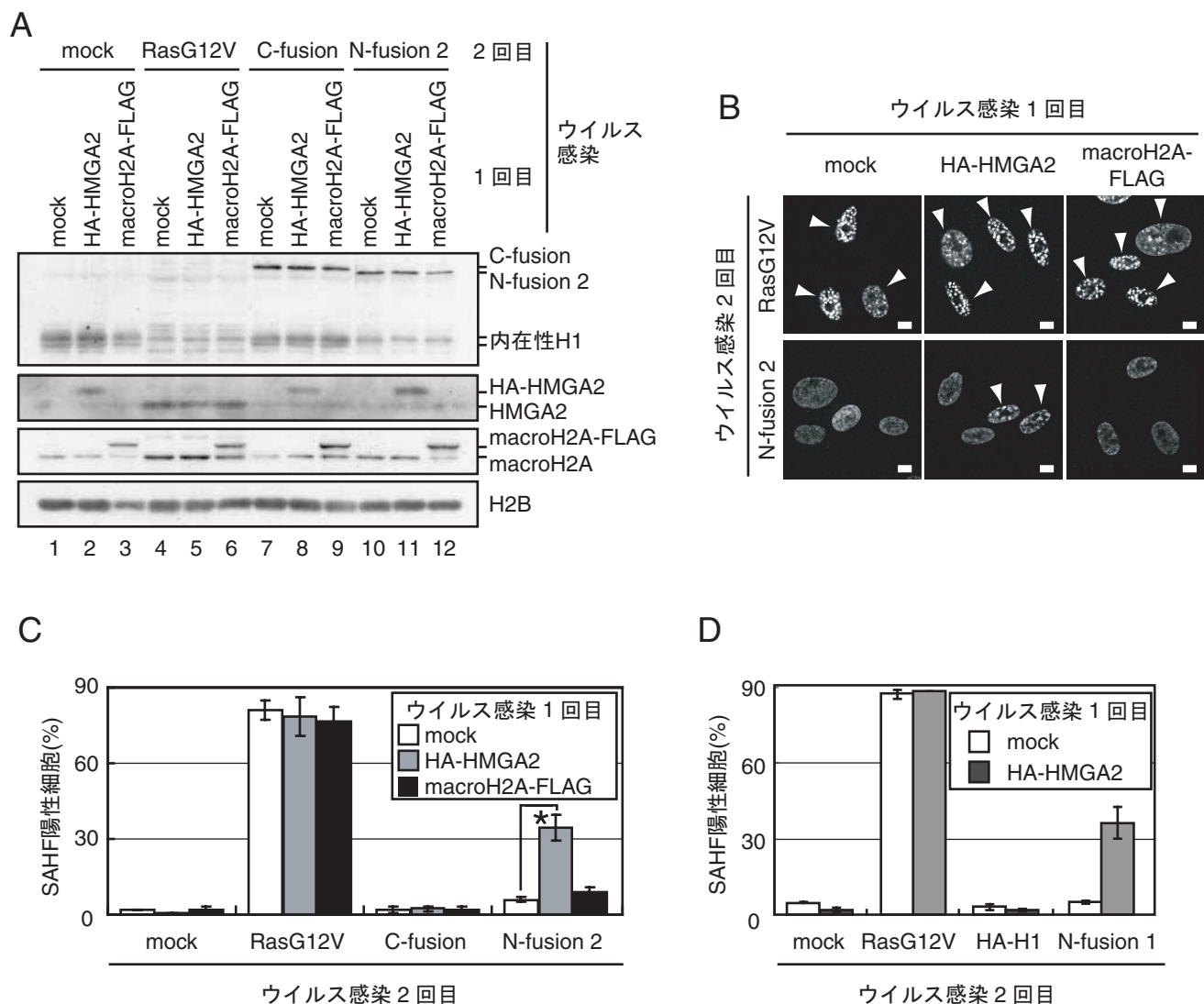


図 3-8 ヒストン H1 と HMGA2 の置換による SAHF 形成の制御

(A) 2 回の連続したレトロウイルス感染により、WI-38 細胞に 2 種類の遺伝子を同時に導入した。得られた細胞からクロマチンタンパク質を調製し、イムノブロット解析を行った。

(B & C) A で述べた細胞を DAPI 染色し、SAHF の形成効率を調べた。N fusion 2 を単独で遺伝子導入した細胞に比べて、HA-HMGA2 と N-fusion 2 を同時に遺伝子導入した細胞では、SAHF 陽性細胞の割合が有意に増大した (\*:  $P < 0.001$ )。

(D) A と同様の方法で、SAHF 形成効率に対する N fusion 1 の効果を調べた。

## 第 4 章

### 考察

本研究では、免疫染色および FISH 解析により、老化細胞の SAHF の構造を詳細に調べた。その結果、ひとつの SAHF はひとつの染色体テリトリーに対応する巨大な構造体であることを明らかにした。また、SAHF の間に見られる DAPI 陰性領域は、転写が活発に行われる染色体間ドメインであることを明らかにした。SAHF は、分裂期凝縮染色体、アポトーシス細胞の凝縮クロマチン、および転写の不活性なヘテロクロマチンに特徴的なヒストンの翻訳後修飾を示さないことから、これらの凝縮クロマチンとは異なる分子機構により制御されていると考えられた。また、老化細胞のクロマチン結合蛋白質を生化学的に解析した結果、SAHF 形成はヒストン H1 と HMGA2 の置換を伴うことを明らかにした。特にヒストン H1 の消失は、老化細胞で見られる増殖停止の表現型と密接に関係することを示した。さらに、ヒストン H1 と HMGA2 の置換を再現すると、SAHF が形成されることを示した。これらの結果から、老化細胞の SAHF 形成は、ヒストン H1 と HMGA2 により制御されると結論した。

#### 4.1 SAHF：新規のクロマチンの凝縮形態

老化細胞の SAHF は、細胞周期の G1 期から S 期への移行に重要な遺伝子の近傍で形成される、転写の不活性なヘテロクロマチンとしてはじめに記述された (Narita et al., 2003)。このモデルは、老化細胞の増殖停止の不可逆性を説明する魅力的なものであったが、当時、老化細胞の SAHF 構造を顕微鏡下で観察していた私にとっては、モデルの一部に直感的に受け入れ難い部分もあった。すなわち、老化細胞の SAHF は、DAPI で濃染される不活性 X 染色体と同程度に大きく、一部の遺伝子の近傍で形成されるヘテロクロマチンと解釈するには巨大な構造体であった。

細胞周期の間期の核では、個々の染色体は染色体テリトリーを形成しており、染色体間ドメインにより区画化されている (1.5 節、図 4-1)。ここで、老化細胞の SAHF と DAPI 陰性領域のパターンは、若い細胞の染色体テリトリーと染色体間ドメインのパターンとよく一致するように見えた (図 4-1)。すなわち、老化細胞の SAHF と DAPI 陰性領域は、それぞれ、染色体テリトリーと染色体間ドメインに対応していると考えられた。

本研究では、SAHF が染色体テリトリーであり、DAPI 陰性領域が染色体間ドメインであることを独立に示すことにより、この仮説が正しいことを証明した。

まず、抗 CENP-B 抗体を用いた免疫染色により、SAHF がセントロメアをひとつだけもつことを明らかにした。さらに、12 番染色体プローブを用いた FISH 解析により、老化細胞の 2 つの 12 番染色体シグナルが 2 つの SAHF シグナルとほぼ完全に一致することを示した。これらの結果から、SAHF は凝縮した染色体テリトリーであると考えられた。

一方、老化細胞の DAPI 陰性領域は、転写因子や RNA ポリメラーゼ II が局在し、転写が行われる場であることを示した。また、DAPI 陰性領域には PML ボディーが特異的に局在することを示した。これらの特徴は、染色体間ドメインで見られる特徴と一致する。したがって、老化細胞の SAHF は、特定の遺伝子の近傍で形成されるヘテロクロマチンではなく、染色体テリトリー全体が凝縮するクロマチンの新規の凝縮形態であると考えられた。ただし、老化細胞のすべての SAHF が凝縮した染色体テリトリーであると結論するためには、すべての染色体を別々に可視化し、より高解像度の FISH 解析を行うなど慎重に検討する必要がある。

SAHF がクロマチンの新規の凝縮形態であるという仮説は、ヒストンの翻訳後修飾の解析結果からも支持された。免疫染色およびイムノブロット解析の結果、老化細胞の SAHF は、分裂期凝縮染色体およびアポトーシス細胞の凝縮クロマチンに特徴的なヒストンのリン酸化を示さなかった。一方、すでに報告されている通り、SAHF は、転写の不活性なヘテロクロマチンに特徴的なジメチル化ヒストン H3 シグナルと共局在した(Zhang et al., 2005)。しかし、イムノブロット解析の結果、老化細胞のジメチル化ヒストン H3 の総量は若い細胞と同程度であり、細胞老化の過程で変化しなかった。この実験は、ジメチル化ヒストン H3 の総量の変化を見ているので、老化細胞の一部のクロマチンでヒストン H3 のメチル化が亢進している可能性は否定できない。したがって、増殖に必要な遺伝子の近傍で形成されるヘテロクロマチンが、細胞老化の不可逆性に寄与するというモデルを否定するものではない(Narita et al., 2003)。しかしながら、Ras 老化細胞の約 80%が SAHF 陽性を示し、SAHF が凝縮した染色体テリトリーであることを考えると、ヒストン H3 のメチル化を介したヘテロクロマチンの形成が、SAHF の形成を制御しているというモデルは考えにくい。したがって、SAHF の形成は、これまでに知られていない分子機構により制御されていると考えられた。

## 4.2 ヒストン H1 消失の分子機構

テロメア DNA 依存的に起こる複製老化の過程で、ヒストン H1 の量が部分的に減少することは、1980 年に三井らによって報告されていた(Mitsui et al., 1980)。しかし、ヒストン H1 の減少が細胞老化のどのような現象を反映しているのか、また、ヒストン H1 の減少が果たす役割はこれまで不明であった。

ヒストン H1 はクロマチンの高次構造の安定化に寄与すると考えられているので、クロマチンが高度に凝縮した老化細胞において、ヒストン H1 がほとんどすべて消失していることは予想外であった(Robinson and Rhodes, 2006)。ヒストンの遺伝子発現は、S 期の DNA 合成と一致して起こるように厳密に制御されており、Ras 老化細胞および低血清処理により一過的に増殖を停止した細胞では、ヒストン H1 遺伝子の発現が抑制されていた。しかしながら、低血清細胞ではヒストン H1 蛋白質の減少が起こらないことから、ヒストン H1 遺伝子の発現抑制は、必ずしも蛋白質量の減少を引き起こさないことが分かった。したがって、老化細胞におけるヒストン H1 の消失は、遺伝子発現の抑制だけでなく、蛋白質の不安定化によっても制御されていると考えられた。すなわち、老化細胞には、ヒストン H1 を細胞から積極的に排除する何らかの分子機構が存在する可能性が考えられた。

ヒストン H1 はクロマチンに強く結合するので、一見すると、核内をあまり移動しない静的な分子のように見える。しかし、fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP) 解析により、ヒストン H1 はクロマチンとの結合と解離をダイナミックに繰り返すことが示されている(Lever et al., 2000; Misteli et al., 2000)。FRAP 解析では、細胞にヒストン H1-GFP 融合蛋白質を遺伝子導入し、生細胞において GFP の蛍光を局所的に、かつ不可逆的に退光させる。その後、蛍光が回復するのに要した時間を測定することにより、退光部位の外側に存在した蛍光分子が移動する速度を測定できる(Reits and Neefjes, 2001)。ヒストン H1-GFP 蛋白質の移動は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A の存在下で速くなり、蛋白質リン酸化酵素阻害剤 staurosporine の存在下で遅くなる(Lever et al., 2000; Misteli et al., 2000)。すなわち、ヒストン H1 の移動は、コアヒストンまたはヒストン H1 のアセチル化およびリン酸化により制御されると考えられる。ヒストン H1 とクロマチンの結合と解離のバランスは、ヒストン H1 蛋白質の安定性に影響すると考えられるので、ヒストンの翻訳後修飾の変化は、老化細胞におけるヒストン H1 の消失に関係しているかもしれない。

ポリ ADP リボシル化酵素 (PARP) は、ADP リボシル基のポリマーを付加する酵素で、その主な基質は PARP 自身である(Schreiber et al., 2006)。ひとつの ADP リボシル

基は2つの負電荷をもつので、ポリ ADP リボシル化された PARP は、正電荷をもつヒストンに対してアクセプターとして機能することが示唆されている(Althaus et al., 1994)。実際に、PARP は、ヒストン H1 蛋白質の安定性に直接影響することが報告されている(Ullrich and Grune, 2001)。ヒト白血病細胞 K562 では、過酸化水素処理による酸化ストレスに応答して、ヒストン H1 蛋白質が分解を受ける。この分解は、PARP 阻害剤により抑制される。そこで、本研究では、PARP のポリ ADP リボシル化が細胞老化におけるヒストン H1 の消失に関与しているかを調べた(図 4-2)。しかしながら、免疫染色の結果、Ras 老化細胞は抗ポリ ADP リボシル基抗体に反応するシグナルを示さなかった。(図 4-2A)。また、Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の消失は、PARP 阻害剤 1,5-isoquinolinediol (IQ) により抑制されなかった(図 4-2B)。したがって、老化細胞におけるヒストン H1 の消失には、PARP は関与していないと考えられた。

老化細胞では、ヒストン H1 はユビキチン-プロテアソームによる特異的な蛋白質分解により消失するのかもしれない。(Pickart, 2004)。ヒストン H1 は、*in vitro* でポリユビキチン化されることが報告されており、また、HeLa 細胞およびマウスの脾臓細胞では、ユビキチン化されたヒストン H1 が検出されている(Liu et al., 2005) (Wisniewski et al., 2006)。しかし、本研究では、プロテアソーム阻害剤 MG-132 およびラクタシスチンは、調べた濃度ではヒストン H1 の消失を抑制しなかった(図 4-2C)。したがって、細胞老化に伴うヒストン H1 の消失に、プロテアソームが関係していることを示す証拠はまだない。

### 4.3 ヒストン H1 と HMGA2 の置換による SAHF 形成の制御

老化細胞の SAHF が、転写の不活性なヘテロクロマチンの形成によって起こると考えられた根拠は、1) 免疫染色の結果、老化細胞の SAHF は、メチル化ヒストン H3 や HP-1 などのヘテロクロマチン蛋白質と共局在する、2) クロマチン免疫沈降解析の結果、老化細胞の増殖に重要な遺伝子の近傍では、ヘテロクロマチン蛋白質が増加している、である(Narita et al., 2003)。実際に、ヘテロクロマチンの形成が SAHF の形成に関係していることを示唆する報告がある。Suv39h1 は、ヒストン H3 Lys9 をメチル化する酵素で、ヘテロクロマチンの形成に関与する(Rea et al., 2000)。Suv39h1 のノックアウトマウスから調製したリンパ球は、RasG12V の遺伝子導入により誘導される細胞老化表現型を部分的に回避する。また、RasG12V を導入した野生型マウスのリンパ球は、核内に HP-1

の強い免疫染色シグナルを示すが、ノックアウトマウスのリンパ球はこれを示さない。これらの結果から、Suv39h1 は、細胞老化を誘導するのに重要な役割を果たしていると考えられた。しかしながら、SAHF の形成が Suv39h1 により制御されているかどうかは明らかでない。

本研究では、SAHF 陽性の Ras 老化細胞において、ヒストン H1 が消失し、HMGA2 が増加することを示した。ヒストン H1 と HMGA2 は、共通の結合部位をめぐって競合的にクロマチンに結合するので、老化細胞では、ヒストン H1 が HMGA2 に置き換わっていると考えられた。Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の消失と HMGA2 の増加がよく相関することは、この仮説とよく一致する。また、本研究では、内在性ヒストン H1 を著しく減少させる効果を示す、ヒストン H1-EGFP 融合蛋白質 N fusion を用いて、ヒストン H1 と HMGA2 の置換が SAHF 形成に重要であることを示した。すなわち、N fusion を導入した細胞ではヒストン H1 の総量が減少したが、SAHF は形成されなかった。また、HA-HMGA2 を導入した細胞では HMGA2 の総量が増加したが、SAHF は形成されなかった。SAHF は、N fusion と HA-HMGA2 を同時に導入して、ヒストン H1 と HMGA2 の置換を再現した細胞において有意に形成された (図 4-3)。しかし、N fusion と HA-HMGA2 を同時に導入した細胞の SAHF の形成効率は、Ras 老化細胞に比べて低かった。このことは、ヒストン H1 と HMGA2 の置換のほかにも、SAHF の形成を制御する因子があることを示唆している。

N fusion を導入した細胞で、なぜ内在性ヒストン H1 が減少するのか、また、なぜ C fusion ではこのような効果が見られないのかは明らかでない。神経芽細胞種由来の細胞株 SK-N-SH 細胞を用いた FRAP 解析の結果、ヒストン H1 のアミノ末端側に EGFP をもつ蛋白質は、カルボキシル末端側に EGFP をもつ蛋白質に比べて、クロマチンに安定に結合することが報告されている (Hendzel et al., 2004)。N fusion と C fusion の効果の違いは、クロマチンに対する親和性の違いを反映しているのかもしれない。また、クロマチンに取り込まれた N fusion は、EGFP が立体障害として作用することにより、内在性ヒストン H1 が周辺のヌクレオソームへ結合するのを抑制しているのかもしれない。

最近、別のグループから、HMGA1 および HMGA2 が SAHF の形成に重要な役割を果たしていることが報告された (Narita et al., 2006)。この報告によると、ヒト正常線維芽細胞 IMR-90 に HA-HMGA2 または EGFP-HMGA2 を単独で遺伝子導入にすると、細胞老化表現型と SAHF 形成の誘導が起こる。報告された論文と本研究とでは、使用している細胞は違うものの、遺伝子の導入方法を含め

た実験方法はよく似ている。したがって、この結果は、HA-HMGA2 の単独導入ではこれらの表現型が誘導されないとする本研究の結果と矛盾するように見える。しかし、報告された、HMGA2 の導入による細胞老化は、遺伝子導入後 3~4 週間経過して初めて誘導される(Narita et al., 2006)。本研究で HA-HMGA2 を導入した細胞は、薬剤選別終了後 5 日程度で、HA-HMGA2 蛋白質の増加を示す(図 3-7D、レーン 2)。したがって、HMGA2 の導入後 3~4 週間後に起こる細胞老化表現型は、HMGA2 蛋白質の増加を直接反映していないように見える。HMGA2 を導入した細胞は、ヒストン H1 の消失を促進することで、間接的に細胞老化の誘導を促進している可能性がある。

ヒストン H1 と HMGA2 の置換が、どのような分子機構で SAHF 形成を誘導するのかは明らかでない。HMGA2 は約 110 アミノ酸からなる小さな蛋白質で、ヒストン H1 の半分程度の大きさしかない。サイズの小さい HMGA2 は、よりコンパクトなクロマチン構造を形成するのに適しているのかもしれない。一方で、ヒストン H1 が消失することもクロマチンが高度に凝縮するのに寄与している可能性がある。ラミン結合蛋白質の LAP2 $\beta$ 、emerin、および MAN1 は、共通の因子 BAF を介して、クロマチンを核膜につなぎとめている(Segura-Totten and Wilson, 2004)。また、BAF は、ヒストン H1.1 と結合することが報告されており、ヒストン H1 はクロマチンを核膜につなぎとめるのに重要であることが示唆されている(Montes de Oca et al., 2005)。ヒストン H1 を消失した老化細胞のクロマチンは、核膜に安定に結合することができず、HMGA2 によるクロマチンの凝縮効果を受けやすいのかもしれない。

#### 4.4 ヒストン H1 の消失と細胞老化表現型

本研究では、細胞老化および SAHF 形成におけるヒストン H1 消失の役割を調べるために、2 つの実験を行った。まず、ヒストン H1 を強制発現した WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入し、細胞老化と SAHF 形成の誘導が抑制されるかどうかを調べた。しかし、この細胞ではヒストン H1 の蛋白質量を回復させることができず、その効果を調べることはできなかった。次に、増殖している若い WI-38 細胞を用いて、RNAi によるヒストン H1 のノックダウンを試みた。しかし、RNAi によりヒストン H1 の蛋白質量を減らすことはできなかった。したがって、老化細胞で観察されるヒストン H1 の消失が、細胞老化表現型と SAHF 形成の誘導に重要な役割を果たしているかどうかを

直接的に明らかにすることはできなかった。

しかし、いくつかの実験結果は、ヒストン H1 の消失が細胞老化の誘導と密接に関係していることを示唆した。まず、ヒストン H1 の消失は、さまざまな種類のヒト正常線維芽細胞において、細胞老化を誘導するさまざまなストレス刺激により誘導された。また、ヒストン H1 の消失の程度は SAHF の形成効率とよく相関した。さらに、N fusion を遺伝子導入した WI-38 細胞では、細胞老化と関係した増殖の停止と老化関連 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇が誘導され、これらの表現型の誘導はヒストン H1 の減少とよく相関した。したがって、ヒストン H1 の消失は、細胞老化表現型の誘導に積極的に寄与している可能性がある。

ヒストン H1 の主要な 6 つのバリエーションのうち、3 つのバリエーションを同時にノックアウトしたマウスが報告されている(Fan et al., 2003)。このマウスは受精後 11.5 日目までに死に至るが、初期胚から胚性幹細胞 (ES 細胞) が樹立されて、クロマチンの構造と遺伝子発現パターンが解析された(Fan et al., 2005)。ノックアウト ES 細胞のクロマチンは、野生型 ES 細胞の半分の量のヒストン H1 しかもたず、ヌクレオソーム間の距離が有意に短小化していた。また、この細胞では、インプリンティング遺伝子を含めた一部の遺伝子で、DNA のメチル化パターンと mRNA の発現量に変化していた。ヒストン H1 の消失は、細胞老化に関与する遺伝子の発現パターンを変化させることにより、細胞老化の誘導に寄与するかもしれない。

一方、クロマチンから解離した遊離のヒストン H1 が、細胞老化表現型を誘導するシグナル分子として働いている可能性がある。細胞には、長時間にわたって遊離の状態にあるヒストン分子はほとんど存在せず、クロマチンに結合できない過剰なヒストンは、速やかに分解されるように厳密に制御されている(Gunjan et al., 2005)。出芽酵母では、過剰なヒストン分子は Rad53 (ヒト Chk2) 依存的に分解される(Gunjan and Verreault, 2003)。rad53 変異体では、S 期完了後に遊離のヒストンが残存し、その結果、細胞は正常に増殖することができない。本研究では、老化細胞で遊離のヒストン H1 を検出できていないが、ヒストン H1 は、一過的にクロマチンから解離して遊離の状態で存在する可能性がある。遊離のヒストン H1 は Chk2 を活性化して細胞老化を誘導し、その後で蛋白質分解を受けて消失するのかもしれない。興味深いことに、Chk2 の欠損は、細胞老化の誘導を抑制することが知られている(d'Adda di Fagagna et al., 2003)。

この仮説とよく似た現象として、遊離のヒストン H1 が、アポトーシスを誘

導するシグナル分子として機能する例がある (Konishi et al., 2003)。細胞が X 線照射により DNA 二重鎖切断を生じると、ヒストン H1 のバリエーション H1.2 がクロマチンから解離し、細胞質のミトコンドリアへ移行する。H1.2 は、Bak 依存的にミトコンドリアからチトクロム c を放出し、カスパーゼの活性化を介してアポトーシスを誘導する。アポトーシスは細胞老化とともに重要ながん抑制機構として知られている (Lowe et al., 2004)。ヒストン H1 は、異なる 2 つのがん抑制機構であるアポトーシスと細胞老化において、シグナル伝達分子として重要な役割を果たしているのかもしれない。

#### 4.5 今後の展望

本研究では、ヒストン H1 の消失と細胞老化表現型が密接に関係していることを示したが、因果関係を明らかにすることはできなかった。すなわち、老化細胞でヒストン H1 の量が回復すると細胞老化表現型は抑制されるのだろうか？ また、増殖している若い細胞でヒストン H1 の量が減少すると細胞老化が誘導されるのだろうか？ これらを実験的に検証して、細胞老化におけるヒストン H1 消失の重要性を明らかにすることは重要である。同時に、老化細胞におけるヒストン H1 消失の分子機構を明らかにすることにより、細胞老化が誘導される分子機構をより深く理解できるだろう。さらに、培養細胞で見られるこのような変化が、生体内で起こる細胞老化に適用できるかどうかを検証することは、がん抑制機構におけるヒストン H1 消失の役割を明らかにするために重要である。これらの問題を明らかにすることにより、がんの予防および治療の標的となる新たな現象の分子基盤が明らかになると期待される。

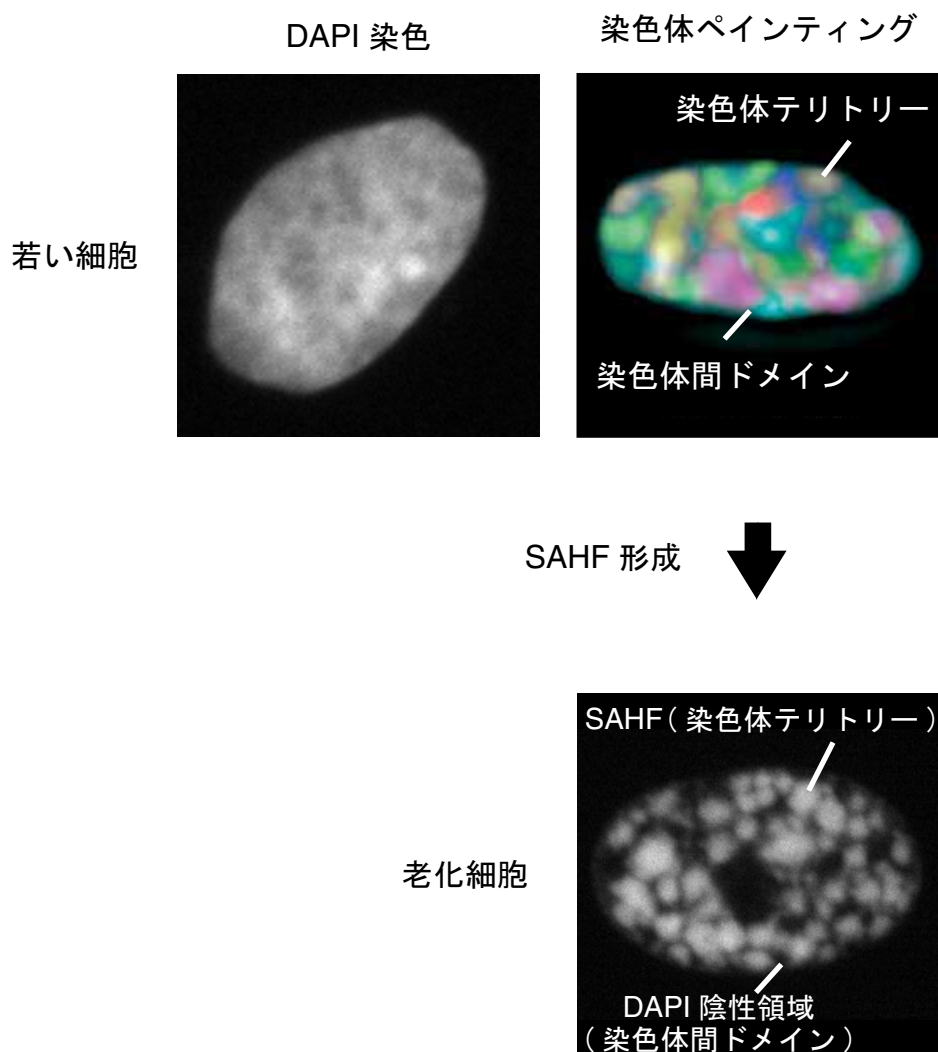


図 4-1 SAHF が凝縮した染色体テリトリーであることを示すモデル

若い細胞の DAPI 染色では、染色体は核内に一様に分布しているように見える（左上）。しかし、個々の染色体を染色体ペインティングにより染め分けると、染色体は核内の特定の領域で染色体テリトリーを形成していることが分かる（右上、Bolzer et al., 2005 より転載）。染色体テリトリーの間の領域は染色体間ドメインと呼ばれ、転写の活発に行われているユークロマチンや PML ボディが局在する。老化細胞では、個々の染色体テリトリーが高度に凝縮して、SAHF を形成する。また、染色体テリトリーが凝縮した結果、染色体間ドメインが DAPI 陰性領域として観察できるようになる。

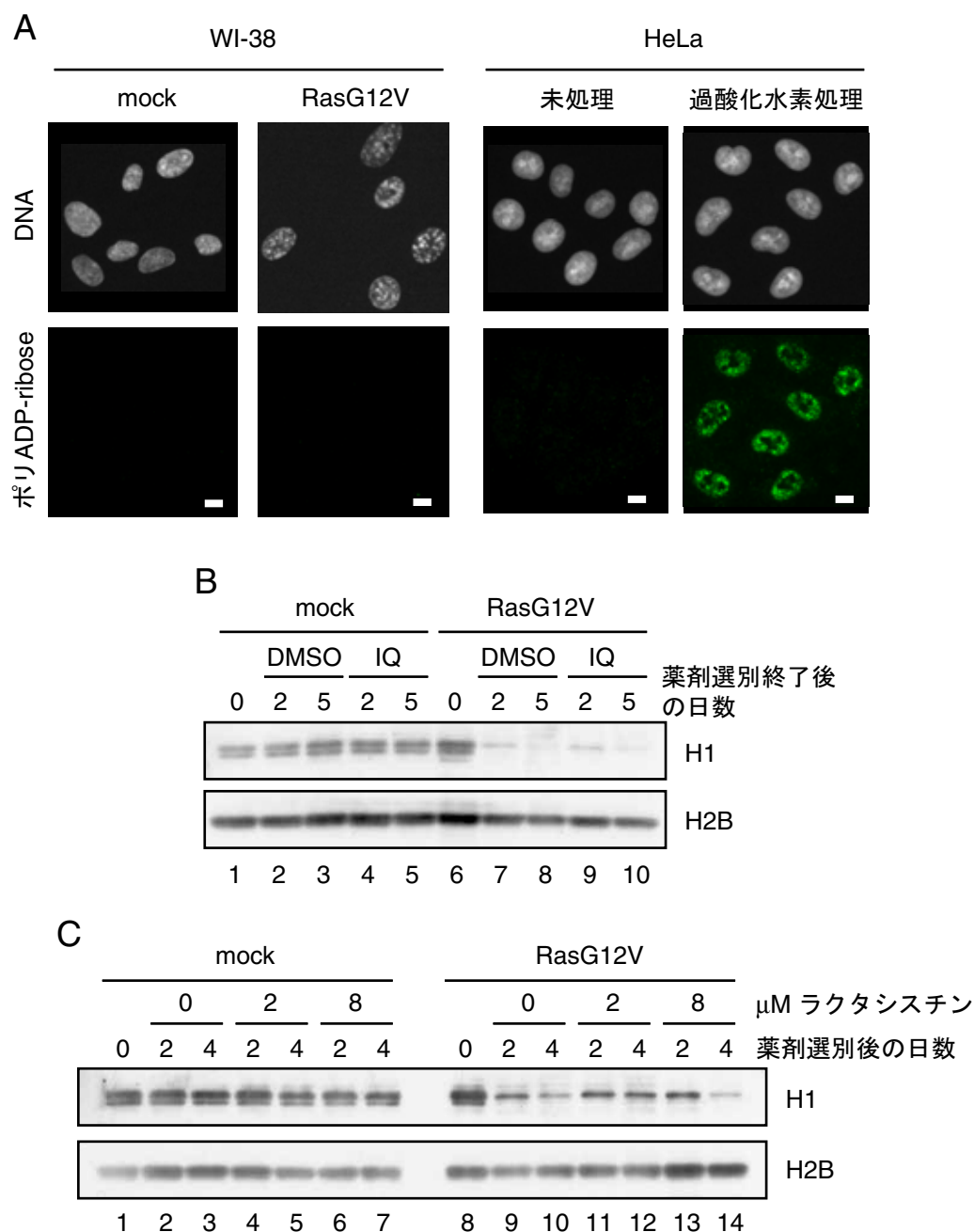


図 4-2 細胞老化におけるヒストン H1 の消失と PARP

(A) WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導した。また、陽性対照として、過酸化水素処理 (1 mM、10 min) した HeLa 細胞を調製した。これらの細胞を、抗ポリ ADP-ribose 抗体 (緑) と DAPI (白) で染色した。Ras 老化細胞では、抗ポリ ADP-ribose シグナルは観察されなかった。

(B) WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導した。薬剤選別終了後、細胞を PARP 阻害剤 1,5-isoquinolinediol(IQ)、または溶媒 (DMSO) で最大 5 日間処理した。細胞からクロマチンタンパク質を調製し、イムノブロット解析を行った。IQ 処理は、Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の消失を抑制しなかった (レーン 9 および 10)。

(C) WI-38 細胞に RasG12V を遺伝子導入して細胞老化を誘導した。薬剤選別終了後、細胞をプロテアソーム阻害剤ラクタシスチンで最大 4 日間処理した。細胞からクロマチンタンパク質を調製し、イムノブロット解析を行った。ラクタシスチンは、Ras 老化細胞におけるヒストン H1 の消失を抑制しなかった (レーン 14)。

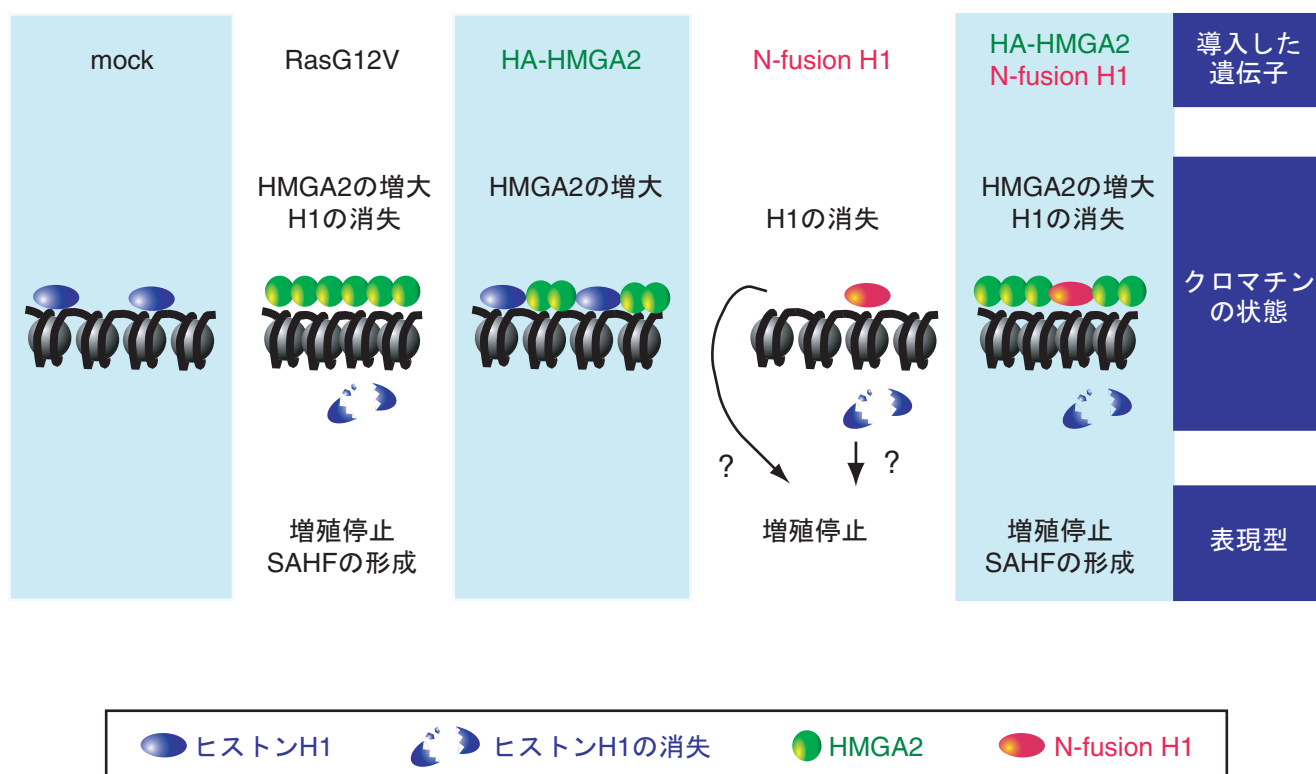


図 4-3 リンカー DNA 結合タンパク質による細胞老化表現型の制御

ヒストン H1 の消失と HMGA2 の増大が、細胞老化表現型の誘導に果たす役割を示した。HA-HMGA2 を単独で導入した WI-38 細胞は、老化と関連した増殖停止を示さず、SAHF も形成しない。一方、N fusion H1 を導入した細胞では、ヒストン H1 の総量が減少し、細胞老化と関係した増殖停止が起こる。ヒストン H1 を失ったクロマチン、またはクロマチンから解離した遊離のヒストン H1 が、増殖停止を誘導しているのかもしれない（矢印）。SAHF は、HA-HMGA2 と N fusion H1 を同時に導入した細胞で形成される。したがって、SAHF の形成は、ヒストン H1 と HMGA2 の置換によって制御されることが考えられる。

## 第 5 章

### 実験材料および方法

## 試薬

本研究では特に記さない限り、試薬はナカライテスク社、酵素はタカラバイオ社の製品を用いた。

## 細胞培養

ヒト正常線維芽細胞WI-38、MRC-5 およびIMR-90 はCoriell Cell Repositoriesから購入した。BJ細胞はAmerican Type Culture Collectionから購入した。レトロウイルスパッケージング細胞PhenixはGarry Nolan博士（スタンフォード大学）より分与された。293T細胞は米原伸教授（京都大学）より分与された。すべての細胞はDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、ニッスイ)、0.16% NaHCO<sub>3</sub>、10% fetal bovine serum (FBS、biowest)、2 mM L-glutamine (SIGMA)、96 U/ml Penicillin G (SIGMA)、72 U/ml Streptomycin (SIGMA) を用いて、5% CO<sub>2</sub>の存在下、37℃で培養した。

## レトロウイルスおよびレンチウイルスによる遺伝子導入

レトロウイルスベクター (pMX) は北村俊雄教授（東京大学医科学研究所）より分与された(Kitamura et al., 2003)。プラスミドDNAはQIAGEN plasmid midi kit (QIAGEN) を用いて精製し、-20℃で保存した。レトロウイルスによる遺伝子導入では、パッケージング細胞Phenixを30%の密度で10 cm培養皿 (FPI) に播種し、約40時間培養した。Phenix細胞の密度が80%程度になったことを確認し、FuGene6 (Roche) および OPTI-MEM (Gibco BRL) を用いてレトロウイルスベクターを遺伝子導入した。導入後24時間後に新鮮な培養液に交換した。培養液を交換して24時間後と36時間後にレトロウイルス上清を回収し、0.45 μmフィルター (PALL) で濾過した後、ポリブレン (SIGMA) を最終濃度8 μg/mlになるように加えてウイルス液とした。標的細胞はレトロウイルス感染の24時間前に5 x 10<sup>5</sup>個/10 cm培養皿になるように播種した。回収したウイルス液を、培養液を除去した標的細胞の培養皿に加えて感染とした。感染後24時間後から、2.5 μg/ml ピューロマイシン (SIGMA) または600 μg/ml G418を用いてそれぞれ3日間または5日間薬剤選別した。薬剤選別により非感染標的細胞が死滅することを確認した。薬剤選別終了後、感染細胞は薬剤フリーの培養液を用いて培養した。

レンチウイルスベクター (pCSII-IRES-neo) およびレンチウイルスパッケージングベクター (pCMV-VSV-G-RSV-RevおよびpCAG-HIVgp) は米原伸教授

(京都大学) より分与された。レンチウイルスによる遺伝子導入では、293T細胞を  $1.2 \times 10^6$  個/10 cm培養皿になるように播種して約 36 時間培養した。293T細胞の密度が 60%程度になったことを確認し、リン酸カルシウム法によりレンチウイルスベクターとレンチウイルスパッケージングベクターを遺伝子導入した。導入後 12 時間後に新鮮な培養液に交換してさらに 24 時間培養した。レンチウイルス上清を回収して 0.45  $\mu$ m フィルターで濾過した後、ポリブレンを最終濃度 8  $\mu$ g/ml になるように加えてウイルス液とした。標的細胞はレンチウイルス感染の 24 時間前に  $5 \times 10^5$  個/10 cm培養皿になるように播種した。感染後 48 時間後から、600  $\mu$ g/ml G418 を用いて 5 日間薬剤選別した。

ヒストン H1-EGFP 融合蛋白質のリンカーアミノ酸配列は以下の通りである。  
N fusion 1 : EGFP-Leu-Glu-Ala-Ala-Ala-Ile-Gly-Ser-H1、N fusion 2 : EGFP-Pro-Glu-Phe-Thr-H1、C fusion : H1-Pro-Glu-Phe-Thr-EGFP。

## 抗体

本研究で用いた抗体は以下の通りである。抗 mouse IgG 抗体 (HRP-cojugated、Code: NA931、GE healthcare)、抗 rabbit IgG 抗体 (HRP-cojugated、Code: NA934、GE healthcare)、抗 sheep IgG 抗体 (HRP-cojugated、Code: 713-035-003、Jackson)、抗 mouse IgG 抗体 (Cy3-cojugated、Code: 286003、Jackson)、抗 mouse IgG 抗体 (Alexa488-cojugated、Code: A-11001、Molecular Probe)、抗 rabbit IgG 抗体 (Alexa488-cojugated、Code: A-11008、Molecular Probe)、抗 RNA polymerase II 抗体 (clone: 8WG16、code: MMS-126R、Covance)、抗 HA 抗体 (clone: 16B12、code: MMS-101R、Covance)、抗 HMGA2 抗体 (Code: PRB-235C、Covance)、抗 cyclin A 抗体 (code: Sc-751、Santa Cruz)、抗 p16 抗体 (code: Sc-468、Santa Cruz)、抗 p21 抗体 (clone: 187、code: Sc-817、Santa Cruz)、抗 p53 抗体 (clone: Bp53-12、code: Sc-263、Santa Cruz)、抗 H-ras 抗体 (code: Sc-520、Santa Cruz)、抗 MKK6 抗体 (code: Sc-1992、Santa Cruz)、抗 phospho-S10 histone H3 抗体 (code: 06-570、Upstate)、抗 phospho-S14 histone H2B 抗体 (code: 07-191、Upstate)、抗 di-methyl K9 histone H3 抗体 (code: 07-212、Upstate)、抗 histone H2B 抗体 (code: 07-371、Upstate)、抗 histone macroH2A1 抗体 (code: 07-219、Upstate)、抗 BrdU 抗体 (clone: BMC9318、code: 1-170-376、Roche)、抗 actin 抗体 (clone: C4、code: 1501R、Chemicon)、抗 histone H1 sheep 抗体 (code: ab1938、abcam)、抗 Rb 抗体 (clone: G3-245、code: 554136、BD Pharmingen)、抗 phospho-S15 p53 抗体 (code: 9284、Cell Signaling)。抗 CENP-B 抗体は舛本

寛博士（名古屋大学）から分与された。抗 phospho-S28 histone H3 抗体は浦野健博士（名古屋大学）から分与された。抗 histone H1 rabbit 抗体は大隅圭太助教授（東京工業大学）から分与された。

## 免疫染色

6-well培養皿（IWAKI）にカバーガラス（22 x 22 mm、0.12～0.17 mm thickness、Matsunami）を敷き、細胞を  $1 \sim 1.5 \times 10^5$  個/well になるように播種して 48 時間培養した。培養液を除去して PBS（137 mM NaCl、8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、2.7 mM KCl および 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ）で洗浄した後、3% formaldehyde を含む PBS を用いて 4℃ で 20 分間固定した。PBS で洗浄し、0.5% Triton X-100 を含む PBS を用いて室温で 10 分間透過処理を行った後、0.5～5% Skim milk (BD) および 0.5% Triton X-100 を含む PBS を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。カバーガラスの細胞面に 0.5% Triton X-100 を含む PBS で希釈した 1 次抗体溶液 150  $\mu\text{l}$  を滴下し、4℃ で一晩静置した。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、0.5% Triton X-100 を含む PBS で希釈した 2 次抗体溶液 150  $\mu\text{l}$  を滴下し、室温、暗所で 1 時間静置した。PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、1  $\mu\text{g/ml}$  4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) を含む PBS を加えて室温、暗所で 10 分間静置した。PBS で 2 回洗浄した後、マウンティング剤（vectashield、VECTOR）を用いてスライドガラス（76 x 26 mm、1.2～1.5 mm thickness、Matsunami）にマウントし、プレパラートとした。

プレパラートは Deltavision deconvolution 顕微鏡システム（IX70, Olympus および applied Precision）を用いて観察した。使用した対物レンズとカメラはそれぞれ、油浸レンズ（UApo/340, 40x, NA 1.35, Olympus）および CCD カメラ（CH350, Photometrics）である。画像は SoftWorx ソフトウェア（Applied Precision）を用いて deconvolution 解析し、Photoshop ソフトウェア（Adobe）を用いて加工した。特に記さない限り、画像はひとつの光学切片を示す。

## 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)

M期凝縮染色体の FISH 解析は、STAR FISH (Cambio) を用いて添付プロトコルに従って行った。老化細胞の FISH 解析は Croft らの方法を改変して以下のように行った (Croft et al., 1999)。免疫染色の場合と同様に細胞を播種して 48 時間培養した。培養液を除去して PBS で洗浄した後、4% formaldehyde を含む PBS を用いて 4℃ で 10 分間固定した。PBS で洗浄し、0.5% Triton X-100 および 0.5% saponin

を含むPBSを用いて室温で10分間透過処理を行った。0.1 N HClを加えて室温で10分間静置し、DNAを変性させた。20% glycerolを含むPBSを加えて室温で30分間静置した後、液体窒素の液相に1分間浸して凍結させ、その後室温で20分間静置して融解した。この凍結、融解のサイクルをさらに2回行った。PBSで2回洗浄した後、2x SSC (300 mM NaCl、30 mM tri-sodium citrate dihydrate、pH7.0)を加えて5分間、50% formamideを含む2x SSCを加えて15分間、さらに10% dextran (SIGMA) および50% formamideを含む2x SSCを加えて20分間、室温で静置した。細胞が接着したカバーガラスをスライドガラスにのせて80℃で3分間静置した。プローブ溶液 17  $\mu$ l (hybridization buffer (Cambio) 12  $\mu$ l、probe solution (Cambio) 3  $\mu$ lおよび1 mg/ml Cot-1 DNA (Invitrogen) 2  $\mu$ l) を65℃で10分間、37℃で30分間静置した後、細胞が接着したカバーガラスに滴下し、湿箱内で37℃、一晩静置した。暗所で以下の洗浄操作を行った後、免疫染色の場合と同様にDAPI染色を行い、スライドガラスにマウントしてプレパラートとした。

洗浄操作

2xSSC、室温、5分間。

50% formamideを含む1x SSC、45℃、5分間、2回。

1x SSC、45℃、5分間、2回。

0.05% Tween 20を含む4x SSC、45℃、4分間。

2x SSC、室温、5分間。

PBS、室温5分間。

### ブロモ標識ウリジン (BrU) を用いた新規合成RNAの可視化

新規合成RNAの可視化はWansinkらの方法を改変して以下のように行った (Wansink et al., 1993)。免疫染色の場合と同様に細胞を播種して48時間培養した。培養液を除去し、0.05% Triton X-100を含むグリセロールバッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM EGTA、25% glycerol、Complete protease inhibitors (Roche)) 1 mlを加えて4℃で1分間静置した。転写バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 7.5]、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM EGTA、100 mM KCl、25% glycerol、25  $\mu$ M S-adenosylmethionine (NEB)、0.5 mM BrUTP (SIGMA)、ATP、CTPおよびGTP、8 U/ml RNase inhibitorおよびComplete protease inhibitors) 1 mlを加えて35℃で10分間静置し、転写反応を行った。新規合成RNAに取り込まれたBrUを、抗BrdU抗体を用いた免疫染色により検出した。

## 蛋白質抽出液の調製

細胞の分画は以下のように行った。細胞をトリプシン処理により回収し、PBSで2回洗浄した後、10 mM NaClを含むバッファーA (40 mM Tris-HCl [pH 7.4]、1 mM EDTA、0.5 mM DTT、1 mM sodium orthovanadate (和光)、1 mM sodium fluoride、100 nM okadaic acid (SIGMA) およびComplete protease inhibitors) に懸濁して4℃で10分間静置した。23～26ゲージ注射針 (JMS) を用いて細胞膜を破碎して1,000g、4℃で10分間遠心した後、上清を回収した。この上清は細胞質蛋白質を多く含み、画分C (Cytoplasmic fraction) とした。ペレットを150 mM NaClおよび0.2% Triton X-100を含むバッファーAで懸濁して、4℃で10分間静置した。1,000g、4℃で10分間遠心した後、上清を回収した。この上清は遊離の核蛋白質を多く含み、画分N1 (Nuclear fraction 1) とした。ペレットをSDSサンプルバッファー (125 mM Tris-HCl [pH 6.8]、4% SDS、20% glycerolおよびbromophenol blue) で懸濁し、超音波処理により粘性を消失させた。このペレットはクロマチンおよび核マトリックス蛋白質を多く含み、画分N2 (Nuclear fraction 2) とした。

ヒストンの酸抽出では、画分N2のペレットを200 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で懸濁し、4℃で30分間静置した。20,000g、4℃で10分間遠心して上清を回収し、1/4量の100% trichloroacetic acidを加えて4℃で10分間静置した。20,000g、4℃で5分間遠心し、ペレットを冷アセトンで洗浄して乾燥させた。ペレットをSDSサンプルバッファーで懸濁して酸抽出画分とした。

全細胞抽出液の調製では、セルスクレーパー (住友ベークライト) を用いて細胞を回収し、1,500 rpm、4℃で2分間遠心した。細胞のペレットをSDSサンプルバッファーで懸濁し、超音波処理により粘性を消失させて全細胞抽出液とした。

界面活性剤による蛋白質抽出は以下のように行った。セルスクレーパーを用いて細胞を回収し、1,500 rpm、4℃で2分間遠心した。細胞のペレットを抽出バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 7.4]、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM EDTA、1 mM DTT、1 mM sodium orthovanadate、1.25 mM sodium fluoride、100 nM okadaic acid、10 mM β-glycerophosphate (Calbiochem) およびComplete protease inhibitors) で懸濁して4℃で30分間静置した後、20,000g、4℃で10分間遠心して上清を回収した。ペレットをSDSサンプルバッファーで懸濁し、超音波処理により粘性を消失させた。

## イムノブロット解析

蛋白質をSDS-PAGEにより展開した後、セミドライブロッキング装置 (BIORAD) を用いてpolyvinylidene fluoride (PVDF、Millipore) 膜に転写した。2% bovine serum albumin (BSA) または0.5~5% skim milkを含むTNTバッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、140 mM NaClおよび0.05% Tween 20) を用いて室温で1時間ブロッキングした。ただし、抗histone H1 sheep抗体の場合、高いバックグラウンドシグナルを避けるためにブロッキングを行わず、代わりにTNTバッファーを用いて室温で1時間洗浄した。TNTバッファーに希釈した1次抗体溶液をPVDF膜に浸透させ、室温で1時間または4℃で一晩反応させた。TNTバッファーを用いて室温で5~10分間、3回洗浄した後、TNTバッファーに希釈した2次抗体溶液をPVDF膜に浸透させ、室温で1時間反応させた。TNTバッファーを用いて室温で5~10分間、3回洗浄した後、ECL immunoblotting detection reagents (GE Healthcare) および自動現像機 (AP500、DAITO) を用いてX線フィルム (GE Healthcare) に感光させた。

## SDS-PAGEゲルのクマシーブルー染色および質量分析による蛋白質の同定

SDS-PAGEゲルを水で5分間、3回洗浄した後、CBB Stain Oneを用いて室温で1時間染色した。染色後、水で脱染したゲルを質量分析に使用した。質量分析は、京都大学大学院石川冬木教授研究室の齊藤基輝博士に御協力頂き、以下のように行った。ゲルから蛋白質バンドを切り出し、脱色液 (50% アセトニトリル、25 mM 重炭酸アンモニウム) 100  $\mu$ lを加えて室温で約30分間攪拌した。脱色液を除き、アセトニトリル 100  $\mu$ lを加えて室温で10分間攪拌した後、減圧遠心機 (CC-105、TOMY) を用いてゲル片を乾燥させた。ゲル片にトリプシン溶液 (10  $\mu$ g/ml トリプシン (Promega)、50 mM 重炭酸アンモニウム (pH 8)) 50  $\mu$ lを加えて4℃で30分間静置した後、余分なトリプシン溶液を除いて37℃で一晩静置した。ゲル片に抽出液 (50% アセトニトリル、5% 蟻酸) 50  $\mu$ lを加えて室温で30分間攪拌し、液を回収した。この操作をさらに1回行って合計100  $\mu$ lの抽出液を回収し、減圧遠心機を用いて10~20  $\mu$ lになるまで濃縮した。濃縮後、5% 蟻酸 20  $\mu$ lを加えて攪拌し、これを試料溶液として質量分析に用いた。質量分析は、hybrid mass spectrometer (QSTAR XL, Applied Biosystems) を用いて行った。

## ブロモ標識デオキシウリジン (BrdU) を用いたS期細胞の検出

免疫染色の場合と同様に細胞を播種して48時間培養した。培養液に最終濃度

100  $\mu$ MになるようにBrdUを添加して5時間培養した。培養液を除去してPBSで洗浄した後、2% formaldehydeを含むPBSを用いて4°Cで15分間固定した。PBSで洗浄し、0.5% Triton X-100を含むPBSを用いて室温で5分間透過処理を行った後、水で洗浄した。1.5 N HClを加えて室温で10分間静置し、DNAを変性させた。0.5% Skim milkおよび0.5% Triton X-100を含むPBSを用いて室温で1時間ブロッキングした後、取り込まれたBrdUを、抗BrdU抗体を用いた免疫染色により検出した。

### **Laser scanning cytometer によるDNA含量の解析**

免疫染色の場合と同様に細胞を固定、透過処理した後、Propidium Iodide 溶液 (50  $\mu$ g/ml propidium iodide、200  $\mu$ g/ml RNase A、PBS) を加えて37°C、暗所で30分間静置した。PBSで2回洗浄した後、マウンティング剤を用いてスライドグラスにマウントしてプレパラートとした。DNA含量はlaser scanning cytometer (LSC2、Olympus) を用いて解析した。

### **RT-PCR**

RNA PCR kit (タカラバイオ) を用いて添付のプロトコルに従って行った。使用したプライマーのヌクレオチド配列は以下の通りである。

*HIST1H1D*:

5'-CAAGCCTAGGAAGCCTGCTG

5'-AAAGGGGAACGTCCCGCCAG

*GAPDH*:

5'-ATTTGGTCGTATTGGGCGCCTGGTC

5'-TTGTCATACTTCTCATGGTTCACAC

### **Senescence associated - $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) アッセイ**

免疫染色の場合と同様に細胞を播種して48時間培養した。培養液を除去してPBSで洗浄した後、0.5% glutaraldehydeを含むPBSを加えて室温で10分間固定した。PBSおよび洗浄バッファー (1 mM  $MgCl_2$ 、PBS、pH 6.0) で洗浄した後、染色液 (0.65 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-Gal) 、1 mM  $MgCl_2$ 、5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ 、5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ 、PBS、pH 6.0) を加えて37°Cで一晩静置した。

## 参考文献

- Ahn, S.H., W.L. Cheung, J.Y. Hsu, R.L. Diaz, M.M. Smith, and C.D. Allis. 2005. Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell*. 120:25-36.
- Althaus, F.R., L. Hofferer, H.E. Kleczkowska, M. Malanga, H. Naegeli, P.L. Panzeter, and C.A. Realini. 1994. Histone shuttling by poly ADP-ribosylation. *Mol Cell Biochem*. 138:53-9.
- Beausejour, C.M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S.W. Lowe, P. Yaswen, and J. Campisi. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J*. 22:4212-22.
- Ben-Porath, I., and R.A. Weinberg. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. 37:961-76.
- Bodnar, A.G., M. Ouellette, M. Frolkis, S.E. Holt, C.P. Chiu, G.B. Morin, C.B. Harley, J.W. Shay, S. Lichtsteiner, and W.E. Wright. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 279:349-52.
- Braig, M., S. Lee, C. Loddenkemper, C. Rudolph, A.H. Peters, B. Schlegelberger, H. Stein, B. Dorken, T. Jenuwein, and C.A. Schmitt. 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*. 436:660-5.
- Bridger, J.M., H. Herrmann, C. Munkel, and P. Lichter. 1998. Identification of an interchromosomal compartment by polymerization of nuclear-targeted vimentin. *J Cell Sci*. 111 (Pt 9):1241-53.
- Campisi, J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 120:513-22.
- Catez, F., H. Yang, K.J. Tracey, R. Reeves, T. Misteli, and M. Bustin. 2004. Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin. *Mol Cell Biol*. 24:4321-8.
- Chan, H.M., M. Narita, S.W. Lowe, and D.M. Livingston. 2005. The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 --> p21 senescence pathway. *Genes Dev*. 19:196-201.
- Chen, Q., and B.N. Ames. 1994. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:4130-4.
- Chen, Z., L.C. Trotman, D. Shaffer, H.K. Lin, Z.A. Dotan, M. Niki, J.A. Koutcher, H.I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo, and P.P. Pandolfi. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 436:725-30.
- Cheung, W.L., K. Ajiro, K. Samejima, M. Kloc, P. Cheung, C.A. Mizzen, A. Beeser, L.D. Etkin, J.

- Chernoff, W.C. Earnshaw, and C.D. Allis. 2003. Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*. 113:507-17.
- Collado, M., J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A.J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguria, A. Zaballos, J.M. Flores, M. Barbacid, D. Beach, and M. Serrano. 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 436:642.
- Costanzi, C., and J.R. Pehrson. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*. 393:599-601.
- Cremer, T., and C. Cremer. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*. 2:292-301.
- Croft, J.A., J.M. Bridger, S. Boyle, P. Perry, P. Teague, and W.A. Bickmore. 1999. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*. 145:1119-31.
- d'Adda di Fagagna, F., P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, and S.P. Jackson. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 426:194-8.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P.G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P.G. Pelicci, and F. d'Adda di Fagagna. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 444:638-42.
- Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9363-7.
- Fan, Y., T. Nikitina, E.M. Morin-Kensicki, J. Zhao, T.R. Magnuson, C.L. Woodcock, and A.I. Skoultchi. 2003. H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol Cell Biol*. 23:4559-72.
- Fan, Y., T. Nikitina, J. Zhao, T.J. Fleury, R. Bhattacharyya, E.E. Bouhassira, A. Stein, C.L. Woodcock, and A.I. Skoultchi. 2005. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell*. 123:1199-212.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives, and S.W. Lowe. 2000. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev*. 14:2015-27.
- Gire, V., P. Roux, D. Wynford-Thomas, J.M. Brondello, and V. Dulic. 2004. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *Embo J*. 23:2554-63.
- Gorman, S.D., and V.J. Cristofalo. 1985. Reinitiation of cellular DNA synthesis in BrdU-selected nondividing senescent WI-38 cells by simian virus 40 infection. *J Cell Physiol*. 125:122-6.

- Guerra, C., N. Mijimolle, A. Dhawahir, P. Dubus, M. Barradas, M. Serrano, V. Campuzano, and M. Barbacid. 2003. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell*. 4:111-20.
- Gunjan, A., J. Paik, and A. Verreault. 2005. Regulation of histone synthesis and nucleosome assembly. *Biochimie*. 87:625-35.
- Gunjan, A., and A. Verreault. 2003. A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell*. 115:537-49.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 345:458-60.
- Hayes, J.J., and J.C. Hansen. 2001. Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr Opin Genet Dev*. 11:124-9.
- Hayflick, L., and P.S. Moorhead. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25:585-621.
- Hendzel, M.J., M.A. Lever, E. Crawford, and J.P. Th'ng. 2004. The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin in vivo. *J Biol Chem*. 279:20028-34.
- Hill, D.A., and R. Reeves. 1997. Competition between HMG-I(Y), HMG-1 and histone H1 on four-way junction DNA. *Nucleic Acids Res*. 25:3523-31.
- Ishikawa, F. 2003. Cellular senescence, an unpopular yet trustworthy tumor suppressor mechanism. *Cancer Sci*. 94:944-7.
- Iwasa, H., J. Han, and F. Ishikawa. 2003. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells*. 8:131-44.
- Kimmins, S., and P. Sassone-Corsi. 2005. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*. 434:583-9.
- Kitamura, T., Y. Koshino, F. Shibata, T. Oki, H. Nakajima, T. Nosaka, and H. Kumagai. 2003. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol*. 31:1007-14.
- Kolch, W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:827-37.
- Konishi, A., S. Shimizu, J. Hirota, T. Takao, Y. Fan, Y. Matsuoka, L. Zhang, Y. Yoneda, Y. Fujii, A.I. Skoultschi, and Y. Tsujimoto. 2003. Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell*. 114:673-88.
- Lazzerini Denchi, E., C. Attwooll, D. Pasini, and K. Helin. 2005. Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland. *Mol Cell Biol*.

25:2660-72.

- Lever, M.A., J.P. Th'ng, X. Sun, and M.J. Hendzel. 2000. Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells. *Nature*. 408:873-6.
- Liu, Z., R. Oughtred, and S.S. Wing. 2005. Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones. *Mol Cell Biol*. 25:2819-31.
- Lowe, S.W., E. Cepero, and G. Evan. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 432:307-15.
- Luger, K., and J.C. Hansen. 2005. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol*. 15:188-96.
- Marzluff, W.F., P. Gongidi, K.R. Woods, J. Jin, and L.J. Maltais. 2002. The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics*. 80:487-98.
- Michaloglou, C., L.C. Vredeveld, M.S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C.M. van der Horst, D.M. Majoor, J.W. Shay, W.J. Mooi, and D.S. Peeper. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 436:720-4.
- Misteli, T., A. Gunjan, R. Hock, M. Bustin, and D.T. Brown. 2000. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*. 408:877-81.
- Mitsui, Y., H. Sakagami, S. Murota, and M. Yamada. 1980. Age-related decline in histone H1 fraction in human diploid fibroblast cultures. *Exp Cell Res*. 126:289-98.
- Montes de Oca, R., K.K. Lee, and K.L. Wilson. 2005. Binding of barrier to autointegration factor (BAF) to histone H3 and selected linker histones including H1.1. *J Biol Chem*. 280:42252-62.
- Nakayama, J., J.C. Rice, B.D. Strahl, C.D. Allis, and S.I. Grewal. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*. 292:110-3.
- Narita, M., M. Narita, V. Krizhanovsky, S. Nunez, A. Chicas, S.A. Hearn, M.P. Myers, and S.W. Lowe. 2006. A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell*. 126:503-14.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A.W. Lin, S.A. Hearn, D.L. Spector, G.J. Hannon, and S.W. Lowe. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 113:703-16.
- Negorev, D., and G.G. Maul. 2001. Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene*. 20:7234-42.
- Ohtani, N., Z. Zebedee, T.J. Huot, J.A. Stinson, M. Sugimoto, Y. Ohashi, A.D. Sharrocks, G. Peters, and E. Hara. 2001. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature*. 409:1067-70.
- Pantoja, C., and M. Serrano. 1999. Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are

- resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene*. 18:4974-82.
- Pickart, C.M. 2004. Back to the future with ubiquitin. *Cell*. 116:181-90.
- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B.D. Strahl, Z.W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C.P. Ponting, C.D. Allis, and T. Jenuwein. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 406:593-9.
- Reeves, R. 2001. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene*. 277:63-81.
- Reits, E.A., and J.J. Neefjes. 2001. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol*. 3:E145-7.
- Robinson, P.J., and D. Rhodes. 2006. Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol*. 16:336-43.
- Schmitt, C.A. 2003. Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer*. 3:286-95.
- Schreiber, V., F. Dantzer, J.C. Ame, and G. de Murcia. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:517-28.
- Segura-Totten, M., and K.L. Wilson. 2004. BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol*. 14:261-6.
- Serrano, M., A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach, and S.W. Lowe. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 88:593-602.
- Shay, J.W., O.M. Pereira-Smith, and W.E. Wright. 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res*. 196:33-9.
- Sherr, C.J., and R.A. DePinho. 2000. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*. 102:407-10.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-5.
- Tagami, H., D. Ray-Gallet, G. Almouzni, and Y. Nakatani. 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*. 116:51-61.
- Takahashi, A., N. Ohtani, K. Yamakoshi, S. Iida, H. Tahara, K. Nakayama, K.I. Nakayama, T. Ide, H. Saya, and E. Hara. 2006. Mitogenic signalling and the p16(INK4a)-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol*. 8:1291-7.
- Thiriet, C., and J.J. Hayes. 2005. Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol Cell*. 18:617-22.
- Thoma, F., T. Koller, and A. Klug. 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the

- nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol.* 83:403-27.
- Ullrich, O., and T. Grune. 2001. Proteasomal degradation of oxidatively damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells. *Free Radic Biol Med.* 31:887-93.
- Wang, W., J.X. Chen, R. Liao, Q. Deng, J.J. Zhou, S. Huang, and P. Sun. 2002. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol.* 22:3389-403.
- Wansink, D.G., W. Schul, I. van der Kraan, B. van Steensel, R. van Driel, and L. de Jong. 1993. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol.* 122:283-93.
- Wei, S., S. Wei, and J.M. Sedivy. 1999. Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Res.* 59:1539-43.
- Wei, Y., C.A. Mizzen, R.G. Cook, M.A. Gorovsky, and C.D. Allis. 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7480-4.
- Weierich, C., A. Brero, S. Stein, J. von Hase, C. Cremer, T. Cremer, and I. Solovei. 2003. Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Res.* 11:485-502.
- Weinmann, R., H.J. Raskas, and R.G. Roeder. 1974. Role of DNA-dependent RNA polymerases II and III in transcription of the adenovirus genome late in productive infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:3426-39.
- Williams, R.R. 2003. Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning. *Trends Genet.* 19:298-302.
- Wisniewski, J.R., A. Zougman, S. Krueger, and M. Mann. 2006. Mass spectrometric mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations and phosphorylation as well as differences between cell culture and tissue. *Mol Cell Proteomics.*
- Zhang, R., M.V. Poustovoitov, X. Ye, H.A. Santos, W. Chen, S.M. Daganzo, J.P. Erzberger, I.G. Serebriiskii, A.A. Canutescu, R.L. Dunbrack, J.R. Pehrson, J.M. Berger, P.D. Kaufman, and P.D. Adams. 2005. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell.* 8:19-30.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、たくさんの貴重なご助言と激励をくださいました石川冬木教授に心より感謝いたします。また、長い間に渡り温かく見守ってくださいました岸本健雄教授に心より感謝いたします。

レトロウイルスベクターを分与して頂きました東京大学医科学研究所北村俊雄教授、ウイルスパッケージング細胞を分与して頂きましたスタンフォード大学Garry Nolan博士、MKK6 cDNAを分与して頂きました東京大学分子生物学研究所後藤由季子教授ならびに京都大学生命科学研究科西田栄介教授、Sp100 cDNAを分与して頂きました国立長寿医療センター本山昇教授、macroH2A cDNAを分与して頂きました国立遺伝学研究所柴原慶一教授、抗CENP-B抗体を分与して頂きました名古屋大学舩本寛博士、抗リン酸化ヒストンH3Ser28抗体を分与して頂きました名古屋大学浦野健博士、および抗ヒストンH1抗体を分与して頂きました東京工業大学大隅圭太博士には心より感謝いたします。

研究室の煩雑な事務処理を引き受けてくださり、研究室を明るくしてくださいました秘書の片山安希子氏、佐々木睦氏、阪本真弓氏には心より感謝いたします。東京工業大学でのさまざまな事務処理を引き受けてくださいました岸本健雄教授研究室秘書多田優美子氏には心より感謝いたします。また、研究生活だけでなく、私生活においても大変お世話になりました石川研究室の皆様には心より感謝いたします。

最後に、長い間に渡って、精神的にも経済的にも支えてくださいました家族に心よりお礼を申し上げます。

## 講演目録

1. 舟山 亮、齊藤 基輝、田野邊 寛子、石川冬木 「Proteasome-dependent Degradation of Linker Histone H1 in Ras-induced Senescent Cells」第6回 文部科学省特定領域研究「がん」5領域 若手研究者ワークショップ 長野 (2005)
2. 舟山 亮、齊藤 基輝、田野邊 寛子、石川冬木 「細胞老化に伴うクロマチン凝縮とヒストンH1の消失」第28回 日本分子生物学会年会 福岡 (2005)
3. 舟山 亮、齊藤 基輝、田野邊 寛子、石川冬木 「細胞老化に伴うクロマチン凝縮とヒストンH1の消失」第23回 染色体ワークショップ 広島 (2006)
4. 舟山 亮、齊藤 基輝、田野邊 寛子、石川冬木 「Loss of Linker Histone H1 in Cellular Senescence」20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 京都 (2006)
5. 舟山 亮、齊藤 基輝、田野邊 寛子、石川冬木 「Loss of Linker Histone H1 in Cellular Senescence」Molecular Genetics of Aging New York (2006)

## 報文目録

Funayama, R., M. Saito, H. Tanobe, and F. Ishikawa. 2006. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol.* 175:869-880