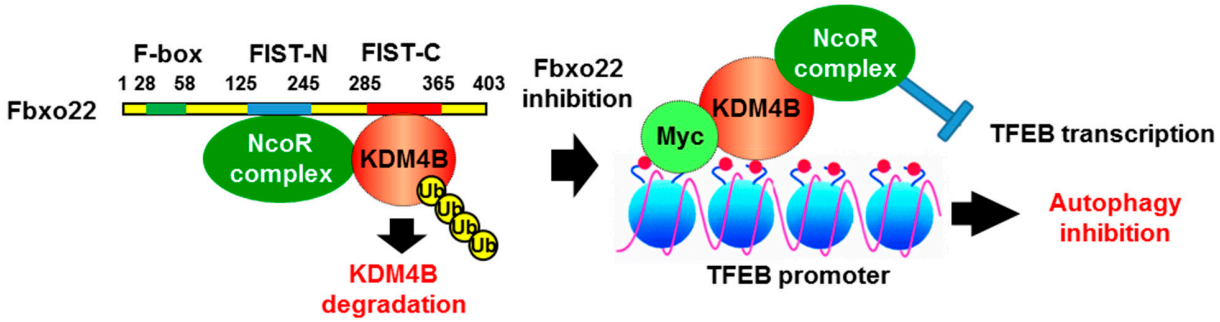
137　細胞老化における栄養応答性転写因子TFE3の機能解析	城村　由和

【目的】近年の研究により、細胞老化は恒久的な増殖停止を介して、発がん防御機構として働くだけではなく、SASP と呼ばれる炎症性サイトカインを中心とした生理活性因子の発現・分泌を介して、個体老化も促進すると考えられている。しかし、恒久的な増殖停止や SASP を制御する機構は不明な点が多い。本研究では、老化細胞で発現が上昇する転写因子 TFE3、およびそのファミリー遺伝子 TFEB の発現制御、およびその機能解析を目的とした。

【方法】筆者らによる RNA-seq を用いた網羅的遺伝子解析により、Fbxo22 ユビキチンリガーゼが TFE3、および TFEB の発現制御に関わる可能性が示唆された。そこで、RNAi 法を用いて、老化細胞における Fbxo22 の発現抑制を行い、TFE3、および TFEB の発現に与える影響を解析した。さらに、その制御機構を解明するために、プロモーター解析、Fbxo22 によるユビキチン化アッセイ、および免疫沈降法による相互作用の解析を行った。また、RNAi 法により、TFE3、および TFEB の発現抑制が細胞老化に与える影響を解析した。

【結果】老化細胞における Fbxo22 の発現抑制の結果、TFE3 ではなく、TFEB の発現が特異的に抑制されることが分かった。また、その制御機構として、Fbxo22 が転写抑制因子 NcoR と複合体を形成した KDM4B を分解することで、Myc 依存的な転写を制御することも明らかになった。さらに、老化細胞における TFEB の発現抑制により、SASP の主要な構成因子の発現が抑制されることを見出した。

Fbxo22 ユビキチンリガーゼによる TFEB 発現制御メカニズム



137. 細胞老化における栄養応答性転写因子 TFE3 の機能解析

城村　由和

東京大学 医科学研究所 癌・細胞増殖部門 癌防御シグナル分野

Key words：老化，がん，シグナル伝達

緒　言

真核細胞は変異原ストレス等を受けると、DNA 損傷応答シグナルを活性化する。DNA 損傷応答シグナルは、多細胞生物体においては DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシス、あるいは早期細胞老化等を誘導して、異常染色体 DNA 構造を持った細胞の蓄積を防いでいる。この中でも、細胞老化は不可逆的に細胞増殖を停止することから、もっとも重要な抗腫瘍化機構の一つであると考えられてきた。しかし、近年の研究により、老化細胞は SASP と呼ばれる炎症性サイトカインを中心とした生理活性因子の発現・分泌により、発がん防御機構して働くだけではなく、個体老化を促進する負の側面を併せもつことが明らかになりつつある［1，2］。

我々および他の研究者により、細胞老化誘導機構の一端については解明できたものの、恒久的な増殖の停止が維持されるメカニズムや SASP といった老化形質制御メカニズムについては、未だ不明な点が多い。そこで、筆者らは RNA-seq 法により老化細胞で発現が変動する遺伝子の網羅的解析を行った結果、オートファジー・リソソームの機能を転写レベルで制御する鍵分子 TFE3、およびそのファミリー遺伝子 TFEB は、その発現が老化に伴い増加し、活性化することを見出した。

本研究では、老化細胞における TFE3 と TFEB の発現上昇のメカニズムを解明することを試みた。その結果、Fbxo22 ユビキチンリガーゼが転写抑制因子 NcoR と複合体を形成した KDM4B を分解することで、Myc 依存的に TFEB の転写を制御することを明らかにした。さらに、老化細胞における TFEB の機能解析を行ったところ、老化細胞の重要な形質の一つである SASP の主要な構成因子の発現が抑制されることを見出した。これらの結果は、これまで不明な点が多かった SASP の発現制御機構の解明につながるものであり、細胞老化の発がん・個体老化における役割を明らかにするものである。

方法および結果

1. Fbxo22 ユビキチンリガーゼの発現抑制は、オートファジー関連遺伝子群の発現を抑制する

これまでの筆者らの研究により、Fbxo22 ユビキチンリガーゼが老化細胞において、SASP の主要構成因子の発現を正に制御することを明らかにしている［3］。この詳細なメカニズムを解析するために、老化細胞における RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、まず、コントロールの正常線維芽細胞では、老化誘導に伴い、TFE3 や TFEB の発現上昇とともに、オートファジー関連遺伝子の発現が上昇することを見出した。一方、Fbxo22 発現抑制細胞では、有意にオートファジー関連遺伝子群の発現上昇が阻害されることが分かった（図 1）。

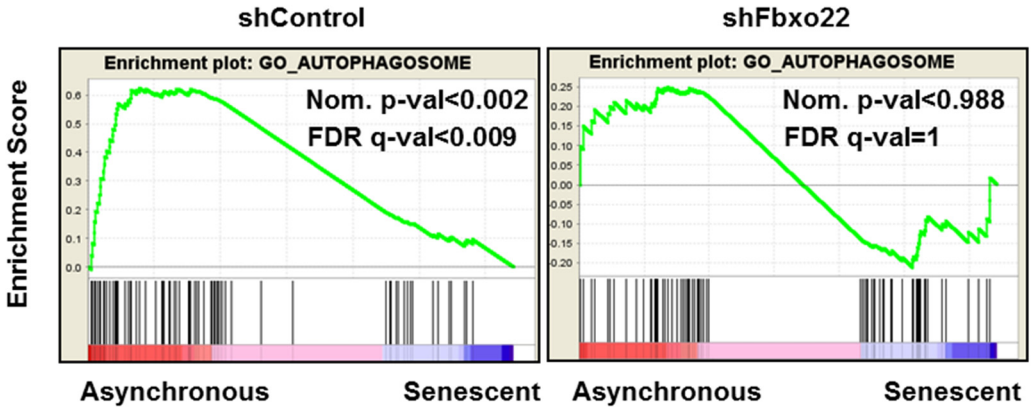


図 1. Fbxo22 の発現抑制は、細胞老化におけるオートファジー関連遺伝子群の発現上昇を阻害する
老化誘導前後のコントロール細胞と Fbxo22 抑制細胞の RNA を用いて、RNA-seq 解析を行った。

2. Fbxo22 ユビキチンリガーゼの発現抑制は、TFEB の発現を抑制する

上記の 1 の結果より、老化細胞において、Fbxo22 が TFE3、および TFEB の発現制御を介して、オートファジー関連遺伝子群の発現上昇を制御している可能性が考えられた。そこで、老化誘導前後のコントロール正常線維芽細胞と Fbxo22 発現抑制細胞の細胞抽出液を用いて、ウエスタンブロット法による解析を行った。その結果、Fbxo22 の発現抑制により、オートファジーの活性化が阻害されるとともに、TFE3 ではなく、TFEB の発現が抑制されることが分かった（図 2）。

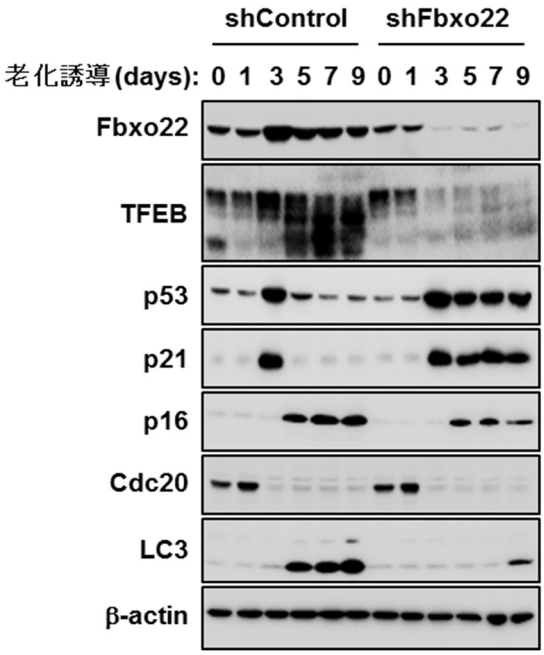


図 2. Fbxo22 の発現抑制は、老化細胞におけるオートファジーの活性化、および TFEB の発現を抑制する
老化誘導前後のコントロール正常線維芽細胞と Fbxo22 発現抑制細胞の細胞抽出液を用いて、ウエスタンブロット法により解析した。オートファジーの活性化の指標として、LC3 の発現を解析した。

3. Fbxo22 は転写抑制因子 NcoR と複合体を形成する KDM4B を分解する

上記の 2 の結果を受けて、Fbxo22 による TFEB 発現制御のメカニズムの解明を試みた。我々のこれまでの研究により、Fbxo22 は核内レセプターERalpha と複合体を形成した脱メチル化酵素 KDM4B を分解することを明らかにしている（投稿中）。以前の報告で、KDM4 ファミリーは転写抑制因子 NcoR と相互作用して、転写抑制複合体を形成することが示されている。そこで、Fbxo22 が KDM4B-NcoR 複合体と相互作用するかどうか、プロテアソーム阻害剤の存在下で免疫沈降法により検討したところ、Fbxo22 は KDM4B、および NcoR と三者複合体を形成することが分かった（図 3）。

さらに、Fbxo22 によるユビキチン化アッセイを行ったところ、Fbxo22 は NcoR の発現量依存的に KDM4B を分解することが分かった。これらの結果より、Fbxo22 は NcoR と複合体を形成する KDM4B を選択的に分解することが示唆された。

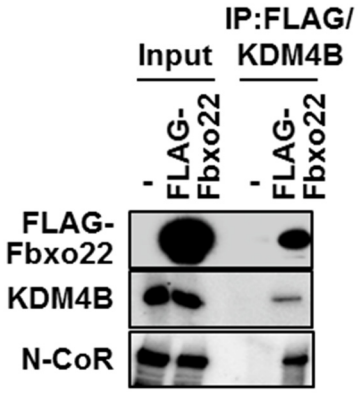


図 3. Fbxo22 は、KDM4B-NcoR 複合体と相互作用する
プロテアソーム阻害剤を処理したコントロール細胞と FLAG 融合 Fbxo22 発現細胞の細胞抽出液を用いて、抗 FLAG 抗体により免疫沈降した。免疫沈降物を FLAG ペプチドで溶出後、さらに抗 KDM4B 抗体により免疫沈降した。そのサンプルをウエスタンブロット法により解析した。

4. Fbxo22 は NcoR と複合体を形成する KDM4B の分解を介して、Myc 依存的に TFEB の発現を制御する

上記の検討に加えて、TFEB のプロモーター解析を行ったところ、Fbxo22 の発現抑制による TFEB の発現阻害には、転写因子 Myc の結合サイトを含む領域が重要であることが分かった。以前の報告で、KDM4B は Myc と相互作用することが知られている。そこで、Fbxo22 と Myc の発現抑制が TFEB のプロモーター活性に与える影響をリポーターアッセイで解析した。その結果、Fbxo22 と Myc の二重発現抑制によって、Fbxo22 の単独発現抑制による TFEB のプロモーター活性の阻害が認められなくなったことから、Fbxo22 のよる TFEB の発現制御には、NcoR-KDM4B-Myc 軸が深く関与することが示唆された（図 4）。

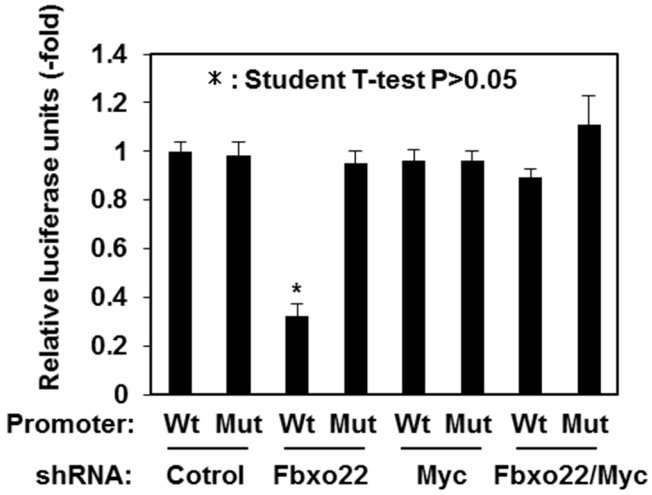


図 4. Fbxo22 は Myc 依存的に TFEB の発現を制御する
TFEB の転写開始点上流 2,000bp のプロモーター領域を用いて、リポーターアッセイを行った。

5. TFEB の発現抑制は、老化細胞におけるオートファジーの活性化、、および SASP を阻害する

最後に、RNAi 法により、老化細胞おける TFEB の役割を解析した。コントールの正常線維芽細胞の老化誘導後に生じるオートファジーの活性化は、Fbxo22 の発現抑制の時と同様、TFEB の発現抑制により、阻害されることが分かった（図 5）。さらに、qPCR 法により SASP の主要構成因子である IL-6、および IL-8 の発現を解析した結果、どちらも Fbxo22 の時と同様、阻害されることが明らかになった。

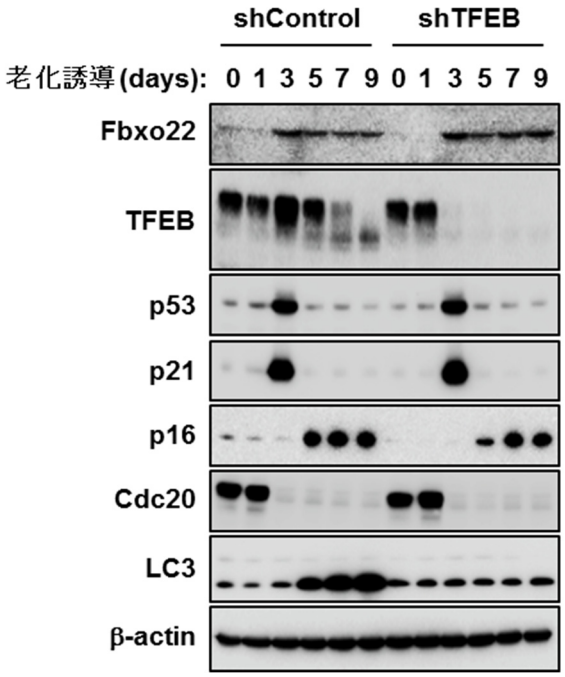


図 5. TFEB の発現抑制は、老化細胞におけるオートファジーの活性化を抑制する
老化誘導前後のコントロール正常線維芽細胞と TFEB 発現抑制細胞の細胞抽出液を用いて、ウエスタンブロット法により解析した。オートファジーの活性化の指標として、LC3 の発現を解析した。

考　察

本研究により、老化細胞におけるオートファジーの活性化、および SASP の発現制御には、Fbxo22 による NcoR-KDM4B の分解を介した TFEB の発現制御が重要な役割を果たすことを示唆する結果が得られた。当初の研究計画では、予備検討の中で、老化細胞で発現上昇・活性化が認められた TFE3 に着目していたが、予想に反して、TFE3 のファミリー遺伝子である TFEB の発現制御メカニズムとその老化細胞における役割の解明に至った。今後、さらに詳細に解析することで、老化細胞における TFE3 と TFEB の協調作用などが明らかになる可能性が考えられる。

本研究の課題として、TFEB によるオートファジーの活性化と SASP の発現制御がカップリングしているか否かを明らかにすることが挙げられる。以前に、オートファジーの活性化が SASP の制御に関与することが報告されているが、はっきりとしたメカニズムは不明なままである [4]。今後、Fbxo22-TFEB 軸を中心に解析することで、老化細胞におけるオートファジー活性化と SASP 制御の詳細な機能連関が明らかになり、細胞老化形質の制御メカニズムや個体老化・発がんにおける役割の解明につながることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学医科学研究所の中西真博士、古川洋一博士、聖マリアンナ医科大学の太田智彦博士である。本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Johmura Y, Nakanishi M. Multiple facets of p53 in senescence induction. Cancer Sci. 2016 Nov;107(11):1550-1555.Epub 2016 Nov 4.PMID:27507734 DOI:10.1111/cas.13060.

2) Watanabe S, Kawamoto S, Ohtani N, Hara E. Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. Cancer Sci. 2017 Apr;108(4):563-569. Epub 2017 Apr 18. PMID:28165648 DOI:10.1111/cas.13184

3) Johmura Y, Sun J, Kitagawa K, Nakanishi K, Kuno T, Naiki-Ito A, Sawada Y, Miyamoto T, Okabe A, Aburatani H, Li S, Miyoshi I, Takahashi S, Kitagawa M, Nakanishi M. SCF(Fbxo22)-KDM4A targets mwthylated p53 for degradation and regulates senescence. Nat Commun. 2016 Feb 12;7:10574. PMID:26868148 DOI:10.1038/ncomms10574

4) Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavare S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. Genes Dev. 2009 Apr 1;23(7):798-803. Epub 2009 Mar 11. PMID: 19279323 DOI:10.1101/gad.519709