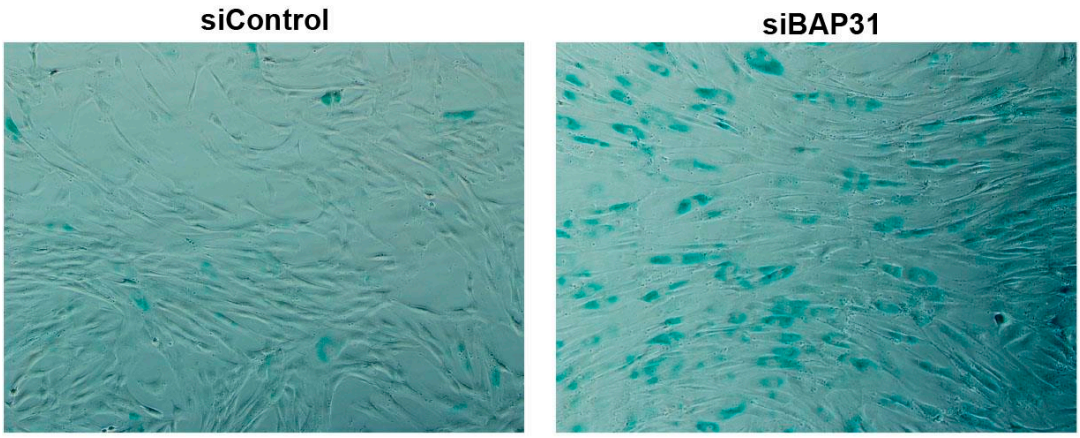
154　オルガネラコミュニケーションの破綻と老化機構の解析	難波　卓司

【目的】老化を遅らせ、若々しく健康に生きることは人類の共通の願いであるが、老化とは何か？何故老化するのか？という根本的な生命現象の答えは見つかっていない。私達の身体の最小の構成単位は細胞であり、細胞の老化に注目した細胞老化のメカニズムを明らかにすることで身体の老化の謎を解決しようと様々な研究がなされ老化細胞を除去することでマウスにおいては寿命が延長されることが分かり、老化は治療できる病気ではないかと注目されている。一方で細胞老化によりミトコンドリアの機能低下することが知られているが、老化によるミトコンドリアの機能が低下する機構、またミトコンドリアの異常が細胞老化を引き起こす機構はほとんど解明されていない。さらに小胞体ーミトコンドリア情報交換機構については全く解析されていなかった。そこで本研究では細胞老化の新たな誘導機構として小胞体ーミトコンドリア情報交換の破綻が関与しているのか、またその機構を解明することで老化細胞の形成防止と除去のための新たなターゲットの発見を目的とする。

【方法】遺伝子の発現変化を RNA-seq 法、qPCR 法、及びイムノブロット法により調べた。細胞老化については SA-β-gal 染色を用いて調べた。タンパク質複合体については免疫沈降法、タンパク質局在解析は細胞分画法を用いた。

【結果】NG1RGB 細胞（ヒト新生児由来、有限寿命）を培養期間 80 日以上の細胞（80d 細胞）について解析したところ、小胞体とミトコンドリア間のオルガネラコミュニケーション機構に重要な BAP31（小胞体局在）ーTom40（ミトコンドリア局在）複合体を調べたところ、この複合体が崩壊していることが示唆された。そこでミトコンドリアの機能維持に重要な BAP31 の発現を抑制し続けたところ、コントロールに比べて細胞老化が促進していることが明らかになった。さらに老化によりミトコンドリアタンパク質の局在が変化していることを発見し、これらのタンパク質がどのように細胞老化のシグナルに関与しているかを解析していった。

BAP31 の発現抑制は細胞老化を促進する（SA-β-gal 染色：老化細胞のマーカー）



154. オルガネラコミュニケーションの破綻と老化機構の解析

難波　卓司

高知大学 教育研究部 総合科学系 複合領域科学部門

Key words：老化，ミトコンドリア，オルガネラコミュニケーション

緒　言

有史以来最もストレスが多いといわれる現代において、日々の精神的ストレス、高栄養の食事や重ねていく年齢により、私たちの体は恒常性を乱され、老化していき臓器機能低下や様々な病気を発症する。そのため、このような生活ストレスがどのように私たちの体に悪影響を与えているかを解明することは健康な生活を送るために重要である。また、老化は著しくQOLの低下を引き起こすことから、老化を遅らせ、若々しく健康に生きることは人類の共通の願いであるが、老化とは何か？何故老化するのか？という根本的な生命現象の答えは見つかっていない。

私達の身体の最小の構成単位は細胞であり、細胞の老化に注目した細胞老化のメカニズムを明らかにすることで身体の老化の謎を解決しようと様々な研究がなされている。実際に臓器を構成する細胞の遺伝子変異について1細胞ごとに検討した結果が報告され、正常な機能を持つ臓器でも様々な遺伝子変異を持つ細胞や老化細胞が集まっていることも分かってきた。さらにこの老化細胞を除去することでマウスにおいては寿命が延長されることが分かり、現在アメリカでは老化細胞除去療法の臨床試験が開始され、老化は治療できる病気ではないかと注目されている。

ミトコンドリアは細胞のエネルギー産生やストレス応答に重要な細胞小器官である。これまでに老化した細胞ではミトコンドリアの機能が低下すること、およびミトコンドリアの機能低下は様々な病気の発症や増悪の原因になることが報告されている。しかし、細胞老化によりミトコンドリアの機能が低下する機構、またミトコンドリアの異常が細胞老化を引き起こす機構はほとんど解明されていない。これまでに小胞体–ミトコンドリア接触領域において小胞体膜タンパク質 BAP31 がミトコンドリアタンパク質と複合体を形成して特定のミトコンドリアタンパク質の細胞質からミトコンドリア内への輸送を制御すること、及びストレスを小胞体が感知することでこの複合体が崩壊し、ミトコンドリアタンパク質の輸送が阻害されてミトコンドリアの機能低下が起こることを発見した［1，2］。

そこで本研究では細胞老化の新たな誘導機構として小胞体–ミトコンドリア情報交換の破綻が関与しているのか、またその誘導機構を解明することで老化細胞の形成防止と除去のための新たなターゲットの発見を目的とする。

方　法

mRNAの発現変化はRNA-seq法、qPCR法を用いて検討した。タンパク質の発現変化はイムノブロット法により調べた。細胞老化については代表的な老化マーカーである老化関連酸性β-ガラクトシダーゼ（SA-β-gal）染色を用いて検討した。タンパク質複合体解析については BAP31 の特異的な抗体を用いて免疫沈降法を行った。ミトコンドリアタンパク質の局在変化については細胞分画法を用いた。

結果および考察

1. 細胞老化モデルの確立と新たな老化細胞機構の示唆

細胞を使用した老化研究を行うためによく使用されているモデルとして、正常な線維芽細胞を継代培養していった細胞が使用されている。そこで本研究では、線維芽細胞の中でも比較的入れ替わりが少ない皮膚の線維芽細胞であるNG1RGB細胞（ヒト新生児由来、有限寿命）を使用した。若い細胞は理研より購入したのち培養14日以内のものを、老化細胞は培養80日以上のものとした。まず、培養期間80日以上の細胞についてRNAseq解析により、この細胞が老化細胞の性質を示すのか検討を行った。

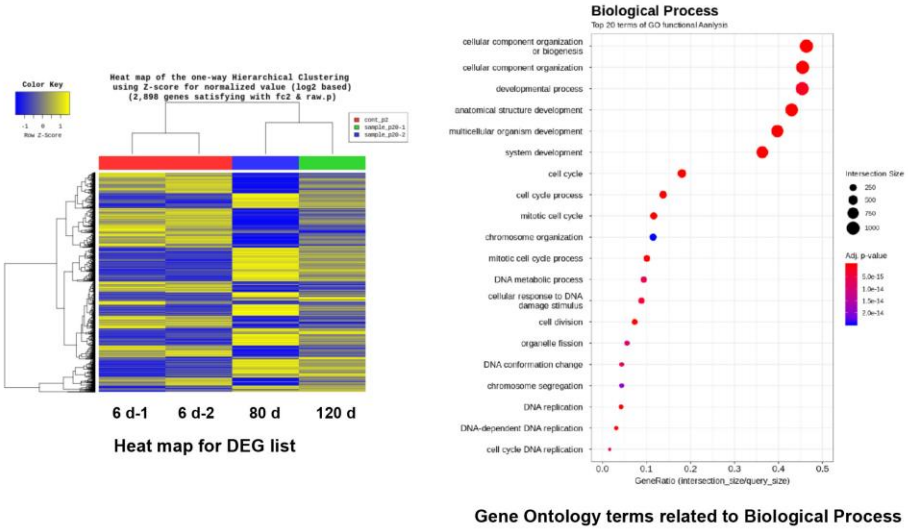


図 1. NB1RGB 老化細胞の RNA-seq 解析
若い細胞（6d-1、6d-2）と老化細胞（80d、120d）において網羅的にmRNAの発現解析を行った。

図 1 の結果より、これまでに様々な年齢のヒトの皮膚から採取した線維芽細胞の遺伝子発現変化について報告があったので、この結果と比較したところ、80 日以上培養した細胞（80d、120d）はヒトの老化した線維芽細胞とよく似た遺伝子発現変化を示したので、確認として老化により遺伝子発現が変化する代表的な遺伝子について qPCR により mRNA の発現を検討した。

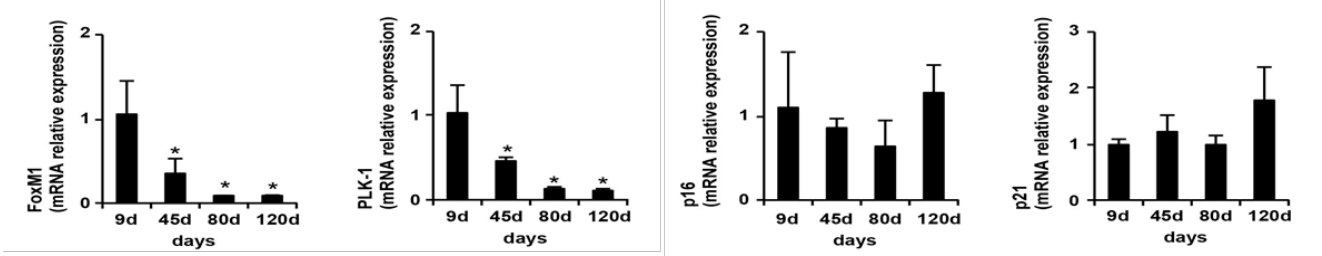


図 2. NB1RGB 老化細胞における老化細胞老化関連遺伝子の発現変化
FoxM1、PLK-1、p16、p21 について mRNA 発現変化を qPCR により検討した。
*P＜0.05（Tukey test）。

図 2 の結果からヒトの老化細胞で発現量が低下する FoxM1 や PLK-1 の発現は本研究で作製した老化細胞でもその発現は減少した。これまで細胞老化の機構については、細胞は分裂出来る回数が決まっていて分裂限界に達した細胞が老化細胞となる経路と DNA 障害やストレスにより細胞周期が停止して老化細胞となる経路の二つの経路が考えられていた。この経路では細胞周期の停止に関わる *p21* や *p16* 遺伝子の発現が増加することが知られていたがこれらの遺伝子の発現は変化していなかった。老化細胞の指標としてよく用いられている senescence-associated-β-*galactosidase*（SA-β-gal）を検討したところ、80d 細胞で SA-β-gal の活性が確認された。80d 細胞は細胞の分裂速度は低下していたがまだ分裂能を有していて、これまでの分裂の停止＝細胞の老化というこれまでの考えと一致していなかった。以上の結果から細胞の分裂を繰り返していくうちに徐々に老化が進んでいく可能性を考えた。

2. 細胞老化とオルガネラコミュニケーションの変化

継代培養を繰り返すことで確立した老化細胞（80d 細胞）において小胞体とミトコンドリア間のオルガネラコミュニケーション機構が変化しているのかをこれまでの研究で明らかにした BAP31－Tom40 複合体に注目して解析した。

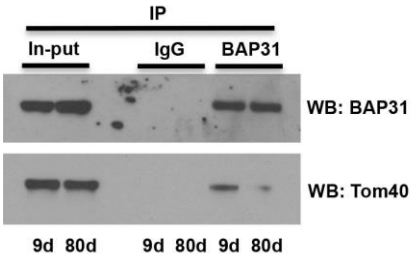


図 3. NB1RGB 老化細胞における BAP31－Tom40 複合体形成変化

若い細胞と老化細胞において免疫沈降法により BAP31－Tom40 相互作用を検討した。

図 3 に示すように 80d 細胞では BAP31 と Tom40 の結合が崩壊していた。そこで若い細胞において BAP31 の発現を阻害することで擬似的に小胞体とミトコンドリア間のオルガネラコミュニケーション阻害を行い細胞の老化が促進されるかを検討した。若い細胞に 21 日間 3 日ごとに BAP31 の siRNA を処理して SA-β-gal の活性（図 4）及び mRNA の発現変化を検討したところ、BAP31 の発現抑制により、細胞老化が促進することが示唆され、小胞体とミトコンドリア間のオルガネラコミュニケーションの破綻は何らかの機構で細胞老化の促進に関与していることが示唆された。

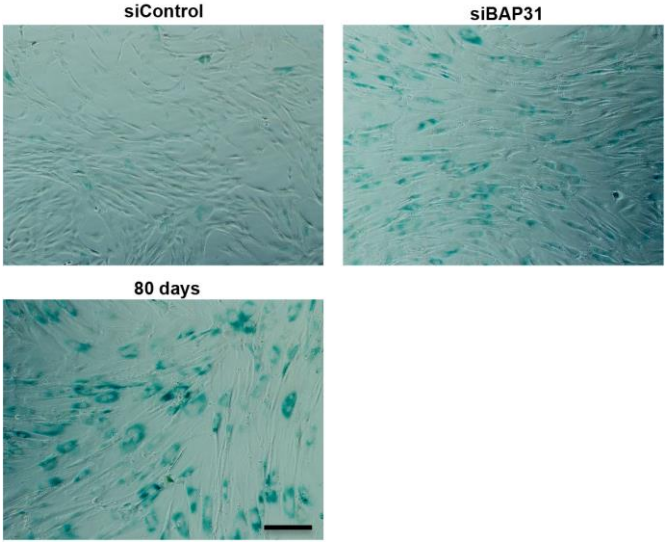


図 4. BAP31 発現抑制による細胞老化の促進

表記の細胞において老化細胞のマーカーである SA-β-gal の活性を測定した。

青色に染色された細胞が老化細胞である（スケールバー：50μm）。

3. ミトコンドリア異常が細胞に与える影響と細胞老化への関与

次に細胞を培養していく間に小胞体ーミトコンドリア接触領域に異常が生じるメカニズムを探求しようと考え、まず図 1 に示した RNA-seq の結果を解析した。老化により遺伝子の発現が変化するミトコンリア関連遺伝子をピックアップし、それら遺伝子の過剰発現や発現抑制が細胞の老化特性にどのような影響を与えているかを現在解析している。また、ミトコンドリアタンパク質の中で重要な機能を持つタンパク質をピックアップし、タンパク質の局在が変化するかを網羅的に解析している。

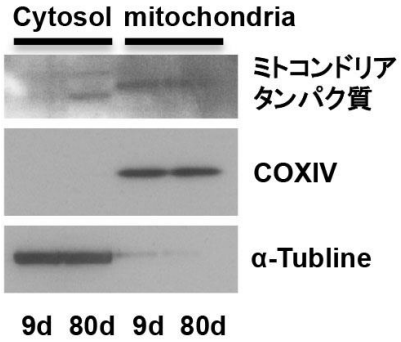


図 5. 老化細胞におけるミトコンドリアタンパク質の局在変化と分子量の変化
若い細胞と老化細胞においてミトコンドリア局在タンパク質についてその局在変化を検討した。ミトコンドリアマーカー：COXIV、細胞質マーカー：α-Tubline。

その例として図 5 に示すようにミトコンドリアに局在するタンパク質が老化により細胞質に且つ分子量が小さいタンパク質として局在変化することが示唆された。このようなタンパク質を網羅的に特定していくことで、タンパク質レベルで制御されているミトコンドリア異常を起因とした新たな老化関連のシグナル応答を特定できる可能性を考えている。

以上の結果から、細胞の老化は分裂及び時間により徐々に進行すること、その過程で小胞体とミトコンドリア間のオルガネラコミュニケーションに異常が起きていることが老化を促進する一つのメカニズムであることが示唆された。引き続き詳細な分子機構とミトコンドリ異常からのシグナルが細胞の老化に関与しているかについて解析を行うことは重要である。

謝　辞

本研究は、上原記念生命科学財団奨励研究によりご支援頂きました。深く感謝いたします。

文　献

1） Namba, T. （2019） BAP31 regulates mitochondrial function via interaction with Tom40 within ER-mitochondria contact sites. Science Advances 5, eaaw1386.

2） Namba, T., Tian, F., Chu, K., Hwang, S. Y., Yoon, K. W., Byun, S., Hiraki, M., Mandinova, A., and Lee, S. W. （2013） CDIP1-BAP31 complex transduces apoptotic signals from endoplasmic reticulum to mitochondria under endoplasmic reticulum stress. Cell reports 5, 331-339.