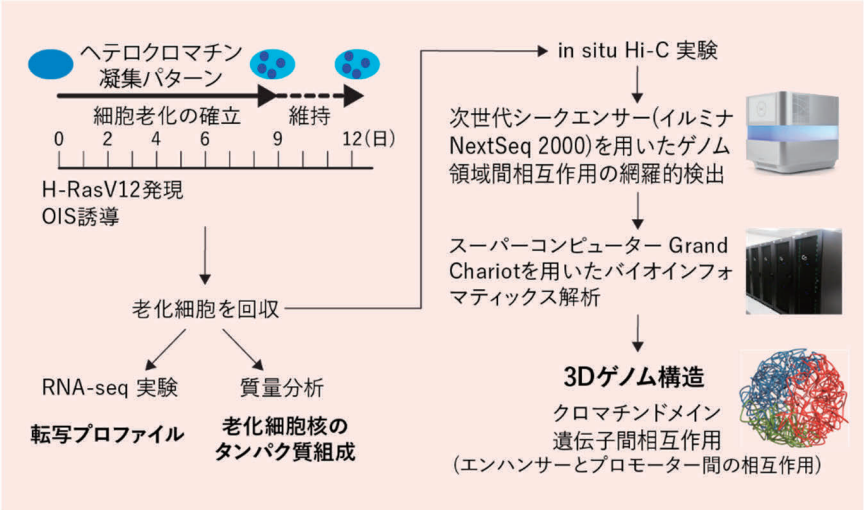
210　3Dゲノム構造から見る細胞老化	野間　健一

【目的】細胞老化は、細胞の異常な増殖を防ぐことを通じて、極めて重要ながん抑制メカニズムとして機能している。いったん細胞老化が誘導されると、p53 標的遺伝子や老化関連分泌表現型（Senescence-Associated Secretory Phenotype：SASP）因子をコードする遺伝子（SASP 遺伝子）などのゲノム上に分布する多くの遺伝子の転写が活性化される。これらの細胞老化に関与する遺伝子は、総称して老化遺伝子と呼ばれる。ゲノム広範に分布する老化遺伝子の活性化に加えて、老化細胞では、ゲノムの 3 次元構造（3D ゲノム構造）の再編成が起こることが知られている。しかし現時点では、老化細胞に形成される 3D ゲノム構造の詳細やその形成機構、および老化細胞に特異的な 3D ゲノム構造と老化遺伝子活性化の関連性は、殆ど理解されていない。これらの問題を解決する足掛かりとして、本研究は、ヒト老化細胞の 3D ゲノム構造と転写プロファイルに加えて、細胞核に含まれるタンパク質組成を決定することを目的に遂行された。

【方法】ヒト肺組織由来の線維芽細胞（IMR-90）において、がん遺伝子誘発性老化（Oncogene-Induced Senescence：OIS）を誘導し、老化細胞の 3D ゲノム構造と転写プロファイルを *in situ* Hi-C と RNA-seq ゲノミクス法を用いて解析した（下図を参照）。また、OIS 誘導後の老化細胞から核を抽出し、質量分析により含まれるタンパク質の変化を定量的に解析した。

【結果】*in situ* Hi-C 実験によって、老化細胞に形成される 3D ゲノム構造を高解像度で決定することが出来た。その結果を新たなアルゴリズムで解析し、遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー領域間の相互作用を網羅的に推定することが出来た。また、RNA-seq 実験によって、老化遺伝子の転写活性化が検出できた。更には、3D ゲノム構造と老化遺伝子の転写活性化の関係性を調べたところ、興味深いことに、遺伝子のプロモーター領域が複数のエンハンサーと相互作用しており、その相互作用の数が転写活性化に寄与していることが推察された。加えて、質量分析により、218 種類のタンパク質が老化細胞の核内で増加しているという興味深い結果も得られた。これらのタンパク質には老化細胞に特異的な 3D ゲノム構造形成に関与していることが推察されるものが含まれていた。

ヒト老化細胞の 3D ゲノム構造、転写プロファイル、核内タンパク質組成の解析



210. 3D ゲノム構造から見る細胞老化

野間　健一

北海道大学 遺伝子病制御研究所 病態研究部門 ゲノム医生物学分野

Key words：細胞老化，3D ゲノム構造，老化遺伝子，転写制御，質量分析

緒　言

当研究室では、これまで独自のゲノミクス法、または他のグループが開発した手法を改良した方法を分裂酵母モデルに適用し、ゲノムの 3 次元構造（3D ゲノム構造）を解析してきた［1～5］。これらの研究を通して、大小サイズの異なる様々なクロマチンドメイン構造体が多重構造を形成しており、その特異的な構造が染色体動態、転写制御、DNA 修復などの生命現象に関与していることを明らかにした［6～8］。更に最近では、ヒト老化細胞の 3D ゲノム構造と遺伝子の転写制御に焦点を当てて研究を進めてきた［9，10］。

細胞老化は、テロメア短小化、DNA 損傷、がん遺伝子（発がん性 Ras）の過剰発現や、がん化学療法などによる様々な細胞ストレスによって引き起こされる非常に安定した細胞周期停止状態として定義される。この細胞老化現象は、細胞の異常な増殖を防ぐことを通じて、極めて重要ながん抑制メカニズムとして機能している。従って、細胞老化に主要な役割を担う p53 や Rb などをコードする遺伝子の多くは、がん抑制遺伝子として認識されている。いったん細胞老化が誘導されると、p53 標的遺伝子や老化関連分泌表現型（Senescence-Associated Secretory Phenotype：SASP）因子をコードする遺伝子（SASP 遺伝子）などのゲノム上に分布する多くの遺伝子の転写が活性化される。これらの細胞老化に関与する遺伝子は、総称して老化遺伝子と呼ばれる。また、ゲノム広範に分布する老化遺伝子の活性化に加えて、老化細胞では、ゲノム上に散在するヘテロクマチン領域の凝集やセントロメア周辺のサテライト DNA 領域の膨張など、3D ゲノム構造の再編成が起こることが知られている。しかし現時点では、老化細胞に形成される 3D ゲノム構造の詳細やその形成機構、および老化細胞に特異的な 3D ゲノム構造と老化遺伝子の転写活性化の関連性は、殆ど理解されていない。

この重要かつ未解明な問題を解決する足掛かりとして、本研究は、*in situ* Hi-C と RNA-seq ゲノミクス法を用いて老化細胞の 3D ゲノム構造と転写プロファイルを決定することと同時に、質量分析法により細胞核に含まれるタンパク質組成を決定することを目的に遂行された。

方　法

1. *In situ* Hi-C 法を用いた老化細胞に形成される 3D ゲノム構造の決定

ヒト肺組織由来の線維芽細胞（IMR-90）で発がん性 Ras（H-RasV12）を過剰発現させ、がん遺伝子誘発性老化（Oncogene-Induced Senescence：OIS）を誘導した。OIS 誘導後の細胞を回収し、*in situ* Hi-C 実験を行った。この *in situ* Hi-C 法では、パラホルムアルデヒドを用いてゲノム構造を固定した後、3C（Chromosome Conformation Capture）実験を行う。3C 法は、制限酵素処理と DNA リガーゼ処理を組み合わせたものである。この *in situ* Hi-C 実験により得られたサンプルを遺伝子病制御研究所のイルミナ NextSeq2000 次世代シークエンサーで処理し、その配列情報を本学のスーパーコンピューターで解析した。それと並行して RNA-seq 実験を行い、老化細胞の転写プロファイルを決定した。

加えて、得られた *in situ* Hi-C データから遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー領域間の相互作用を検出するアルゴリズムの作成に着手した。様々な条件を検討したところ、図 1 に示した条件で遺伝子のプロモーター

領域とエンハンサー領域間の相互作用を推定できることが明らかとなった。

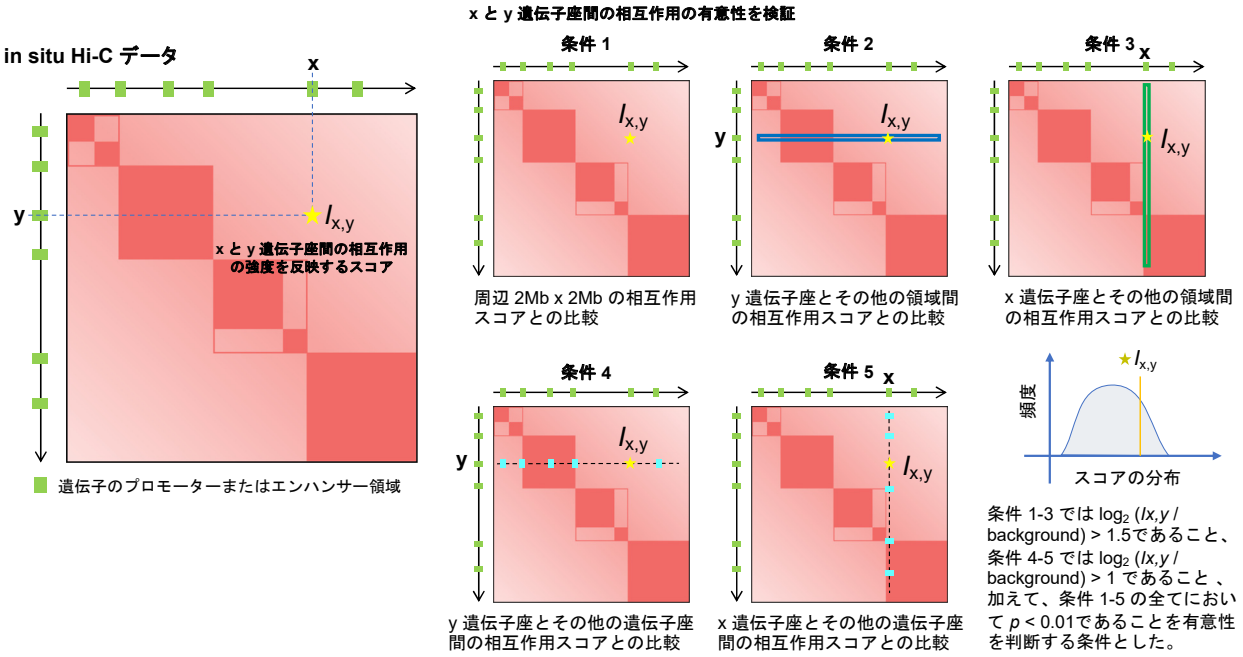


図 1. 遺伝子領域とエンハンサー間の相互作用を推定するアルゴリズムの開発
in situ Hi-C データに基づいて、遺伝子のプロモーターとエンハンサー領域間の相互作用を検出するため、5 つの条件を設定し有意な相互作用を抽出した。

2. 老化細胞の 3D ゲノム構造形成に関与するタンパク質組成の網羅的理解

質量分析においては、実験材料の均質性が重要であるため、細胞老化を効率よく誘導できる系を構築した。その第一段階として、IMR-90 細胞にヒトのテロメラーゼ遺伝子である *TERT* を安定発現する細胞株を確立した。次に、がん遺伝子である活性型 *RAF1* とエストロゲンレセプターの融合遺伝子を発現誘導できる細胞株を作成した。この細胞株を用いた実験で、タモキシフェンの添加により、おおよそ 72 時間で全ての細胞が細胞老化の表現型を示すことが確認できた。

また本研究では、Stable isotope labeling using amino acids in cell culture（SILAC）と呼ばれる、質量分析の弱点である定量性を補うプロテオミクスの手法を用いた。この手法では、異なる安定同位体の質量差分、同じタンパク質の質量分析のピーク位置がシフトして現れるため分子数レベルでの比較定量が可能となる。具体的には、老化細胞と増殖細胞を質量数の異なる安定同位体のアミノ酸（リジンとアルギニン）で標識し、両細胞を 1 : 1 で混合する。次いで、細胞核を生化学的に単離した後、質量分析を用いて細胞核に含まれる全タンパク質を定量する。結果的に、老化細胞と増殖細胞のプロテオーム変化を比較することができた。

結果および考察

1. *In situ* Hi-C 法を用いた老化細胞に形成される 3D ゲノム構造の決定

In situ Hi-C 実験により、老化細胞の 3D ゲノム構造情報を獲得できた。その結果を見てみると、コントロールの増殖細胞では見られない、ストライプ状の相互作用パターンが検出できた（図 2a の上段パネルを参照）。この結果から、従来顕微鏡下で観察されてきた老化細胞特異的なヘテロクロマチンの凝集（Senescence-Associated Heterochromatic Foci : SAHF）が、*in situ* Hi-C ゲノミクス法でも検出できること、更にはこの凝集がどの染色

体領域で起きているかを詳細かつ網羅的に明らかにすることができた。更に、得られたデータの解像度を検討してみたところ、10 kb という非常に高解像度で 3D ゲノム構造情報を獲得できていることが確認できた（図 2a の中段と下段パネルを参照）。更には、新規に開発した遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー間の相互作用を推定するアルゴリズム（図 1 参照）をこの高解像度データに適用し、増殖細胞と老化細胞における遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー間の相互作用を網羅的に推定した。

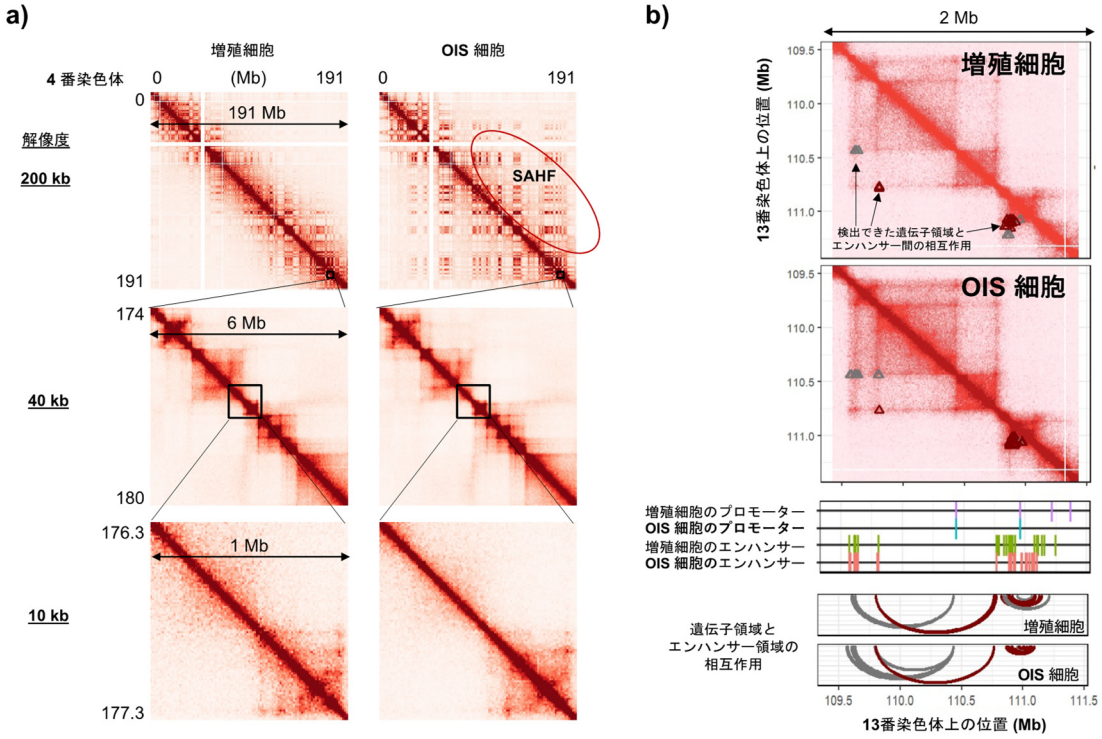


図 2. 老化細胞における遺伝子とエンハンサー領域間の相互作用の検出

a）IMR-90 増殖細胞（左）と OIS 細胞（右）を用いた *in situ* Hi-C 実験の結果。ここでは、4 番染色体の結果を示す。上段に、191 Mb 領域内の相互作用スコアを示す。中段に、6 Mb 領域を、下段に 1 Mb 領域の結果を示す。

b）図 1 に示したアルゴリズムを用いて、遺伝子のプロモーターとエンハンサー領域間の有意な相互作用を推定した。上段の *in situ* Hi-C マップ上にある三角印は推定された有意な相互作用を示す。その下に、遺伝子のプロモーターとエンハンサー領域のゲノム上の位置を示す。一番下に、推定された相互作用をループ表記法で示す。

加えて、RNA-seq 実験の結果から、p53 標的遺伝子や SASP 遺伝子などの老化遺伝子が、増殖細胞に比べて老化細胞で転写活性化されていることが確認できた。続いて、この結果と、*in situ* Hi-C 実験由来の遺伝子領域間の相互作用マップを比較したところ、遺伝子のプロモーター領域とその近傍に位置するエンハンサー領域間の相互作用が、転写レベルと相関していることが明らかになった。特に、プロモーターと相互作用するエンハンサーの数（組み合わせ）が多いほど、転写レベルが上昇する傾向にあった。

これらの結果は、エンハンサーが単独で相互作用する遺伝子の活性化に関与するよりも、複数のエンハンサーが標的遺伝子と相互作用することにより、効率的に転写を活性化できることを示唆している。この現象を説明する現時点での仮説としては、これらのエンハンサー領域に、共通の転写因子が結合し、液相分離を介して遺伝子

のプロモーター領域と複数のエンハンサーが凝集する分子機構を考えている。結果的に、転写因子や RNA ポリメラーゼなどの転写関連の因子を液滴に濃縮することにより、転写効率を促進するのではないかと考えており、今後この仮説を検証したい。

2. 老化細胞の 3D ゲノム構造形成に関与するタンパク質組成の網羅的理解

単離した核タンパク質の質量分析により、2,746 種類のタンパク質について、細胞老化に伴う核内のプロテオーム変化を測定することができた。2,746 種類のタンパク質のうち、218 種類のタンパク質は、細胞老化に伴い核内で有意に増加し、246 種類のタンパク質は有意に減少することを見出した（図 3a）。この結果から増加したタンパク質群を Factors Significantly Increased with oncogene-induced Senescence（FSISs）とし、減少したタンパク質群を Factors Significantly Decreased with oncogene-induced Senescence（FSDSs）とした。実際に、FSISs の一つ FSIS1 に特異的な抗体を用いて細胞老化誘導前後の細胞を免疫染色することで、FSIS1 が細胞老化誘導後に強く核内への局在を示すことを確認できた（図 3b）。今後は、FSISs と FSDSs が細胞老化に伴い 3D ゲノム構造にどのように作用するのかを検証していきたい。

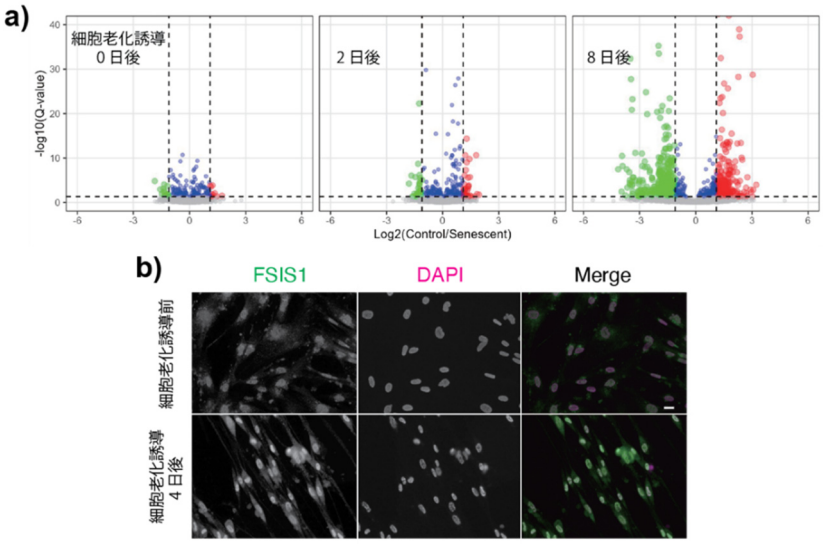


図 3. 細胞老化に伴う核タンパク質組成変化

a) 細胞老化誘導 0、2、8 日後の 2,746 タンパク質の変化。細胞老化の誘導に伴い核内で増加したタンパク質を緑で、減少したタンパク質を赤で示した。

b) 細胞老化誘導前と細胞老化誘導 4 日後の細胞における FSIS1 の局在を免疫染色により確認した。スケールバー：20 μm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野の福本毅医師と北海道大学遺伝子病制御研究所の太田信哉博士である。

文　献

1) Tanizawa H, Iwasaki O, Tanaka A, Capizzi JR, Wickramasinghe P, Lee M, Fu Z, Noma K. Mapping of long-range associations throughout the fission yeast genome reveals global genome organization linked to transcriptional regulation. Nucleic Acids Res. 2010 Dec;38（22）:8164-77. doi: 10.1093/nar/gkq955. Epub 2010 Oct 28. PMID: 21030438

2) Tanizawa H, Noma K. Unravelling global genome organization by 3C-seq. Semin Cell Dev Biol. 2012 Apr;23（2）:213-21. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.11.003. Epub 2011 Nov 18. PMID: 22120510

3) Kim KD, Tanizawa H, Iwasaki O, Noma K. Transcription factors mediate condensin recruitment and global chromosomal organization in fission yeast. Nat Genet. 2016 Oct;48（10）:1242-52. doi: 10.1038/ng.3647. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27548313

4) Tanizawa H, Kim KD, Iwasaki O, Noma K. Architectural alterations of the fission yeast genome during the cell cycle. Nat Struct Mol Biol. 2017 Nov;24（11）:965-976. doi: 10.1038/nsmb.3482. Epub 2017 Oct 9. PMID: 28991264

5) Noma K. The Yeast Genomes in Three Dimensions: Mechanisms and Functions. Annu Rev Genet. 2017 Nov 27;51:23-44. doi: 10.1146/annurev-genet-120116-023438. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28853923

6) Tanaka A, Tanizawa H, Sriswasdi S, Iwasaki O, Chatterjee AG, Speicher DW, Levin HL, Noguchi E, Noma K. Epigenetic regulation of condensin-mediated genome organization during the cell cycle and upon DNA damage through histone H3 lysine 56 acetylation. Mol Cell. 2012 Nov 30;48（4）:532-46. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.011. Epub 2012 Oct 18. PMID: 23084836

7) Iwasaki O, Tanizawa H, Kim KD, Yokoyama Y, Corcoran CJ, Tanaka A, Skordalakes E, Showe LC, Noma K. Interaction between TBP and Condensin Drives the Organization and Faithful Segregation of Mitotic Chromosomes. Mol Cell. 2015 Sep 3;59（5）:755-67. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.007. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26257282

8) Sakuno T, Tashiro S, Tanizawa H, Iwasaki O, Ding DQ, Haraguchi T, Noma K, Hiraoka Y. Rec8 Cohesin-mediated Axis-loop chromatin architecture is required for meiotic recombination. Nucleic Acids Res. 2022 Apr 22;50（7）:3799-3816. doi: 10.1093/nar/gkac183. PMID: 35333350

9) Yokoyama Y, Zhu H, Zhang R, Noma K. A novel role for the condensin II complex in cellular senescence. Cell Cycle. 2015;14（13）:2160-70. doi: 10.1080/15384101.2015.1049778. PMID: 26017022

10) Iwasaki O, Tanizawa H, Kim KD, Kossenkov A, Nacarelli T, Tashiro S, Majumdar S, Showe LC, Zhang R, Noma K. Involvement of condensin in cellular senescence through gene regulation and compartmental reorganization. Nat Commun. 2019 Dec 12;10（1）:5688. doi: 10.1038/s41467-019-13604-5. PMID: 31831736