

氏 名	う え かわ な つ こ 上 川 奈 都 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2606 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	細胞老化関連遺伝子の発現調節機構および機能の解析

論文調査委員 (主 査)
教 授 今 井 裕 教 授 矢 野 秀 雄 教 授 久 米 新 一

論 文 内 容 の 要 旨

高等生物では加齢にともなって、繁殖能・骨量・筋量・免疫応答能など、様々な個体レベルでの機能低下が認められる。このような生理機能の変化は、ヒトでは生活の質、家畜では生産性の低下につながることから、生体の加齢変化の分子機構を解明し、老化関連疾患の予防や治療法を開発することが求められている。近年、生体内で誘導されるストレス応答性の細胞老化が、加齢や疾病にともなう組織の機能低下の原因となる可能性が指摘されている。そこで本研究では、細胞老化機構の解明を目指して、細胞老化関連遺伝子の発現調節機構および機能を解析した。

酵母や線虫の研究から、ヒストンアセチル化による発現制御を受けている遺伝子(群)が、老化の表現型に影響を与えている可能性が示唆されていることから、第2章では、老化関連遺伝子であるマンガン・スーパーオキシドディスムターゼ(MnSOD)のヒストンアセチル化による転写制御について解析を行った。C2C12細胞に脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤を添加するとMnSOD遺伝子発現が誘導され、MnSODがヒストンアセチル化による発現調節を受けていることが明らかになった。プロモーター解析の結果、HDAC阻害剤による発現誘導にはMnSODプロモーター領域への転写因子(Sp1/Egr1)の結合部位が重要であった。これらの転写因子とMnSODプロモーターの結合量をクロマチン免疫沈降にて解析した結果、HDAC阻害剤処理後、Sp1とHDAC1の結合は減少し、Egr-1との結合量が増加することが明らかとなった。以上の結果から、MnSOD遺伝子は、Sp1-HDAC1複合体によってプロモーター領域のヒストンアセチル化状態を調節され、転写制御を受けている可能性を示唆した。

第3章では、マウス胎児由来繊維芽細胞(MEF)の細胞老化における細胞老化関連遺伝子の機能解析を試みた。MEFの細胞老化にともない発現量が増加する遺伝子をサブプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション法を用いて探索した。その結果、34種の遺伝子を同定した。そのうちの11種の遺伝子について、細胞老化における発現量の変化を定量RT-PCR法にて解析したところ、発現様式によって3群に分類できた。このことから、MEF細胞老化の過程で複数の遺伝子が協調的に転写調節を受け、老化を制御していることが考えられた。また、MEF細胞老化関連遺伝子のヒト相同遺伝子についてヒト繊維芽細胞の細胞老化における発現量の変化を解析した。今回解析した4遺伝子は、すべてヒト繊維芽細胞の細胞老化の過程でも発現量が増加しており、ヒト・マウスの細胞老化において共通に機能している可能性が示唆された。次に、MEF細胞老化関連遺伝子の中から、インターロイキン1レセプターアンタゴニスト(IL-1Ra)とTARSHに着目し、機能の解析を行った。

IL-1Raは、炎症性サイトカインIL-1のシグナルを阻害する分子であることから、第4章では、細胞老化誘導に重要な機能を果たしているp38活性化とIL-1シグナルの関与について検討を行った。MEF細胞老化にともなうp38の活性化とIL-1 β 遺伝子発現量の増加が同じ時期に認められ、細胞老化におけるp38活性化の上流分子としてIL-1 β が関与している可能性が考えられた。IL-1Ra欠損MEFを継代培養するとp38の活性化と細胞増殖能の低下が野生型よりも早期に認められた。これらの結果から、IL-1RaはIL-1シグナルを阻害することによってp38の活性化を抑制し、細胞老化の進行を負に制御していると考えられた。

第5章では、機能未知分子 TARSH の遺伝子発現について、細胞老化と癌化に着目して解析を行った。TARSH の cDNA を単離、塩基配列を解析し、少なくとも5種類のスプライシングバリエントが存在することを明らかにした。これらは SH3 ドメイン結合部位を複数含む領域から転写されており、バリエントごとに結合する因子や細胞内局在に差異のある可能性が考えられた。ノザンプロッティングの結果、マウスでは TARSH は肺で高発現し、加齢にともなう発現の変化を定量的 RT-PCR で解析したところ、加齢個体 (20ヶ月齢) では TARSH 遺伝子発現量が低下していた。近年、細胞老化が発癌抑制機構として働いている可能性が示されていることから、ヒト肺癌由来細胞株における TARSH 発現量を RT-PCR で解析した。その結果、肺癌由来細胞では TARSH の発現は検出限界以下であり、正常細胞と比べて著しく発現が抑制されていた。以上の結果から TARSH が肺組織で細胞癌化抑制因子として機能している可能性が示唆され、加齢にともなう発癌リスクの増加と TARSH 発現レベルの関連が示唆された。

以上のように、本論文ではヒストンアセチル化による老化関連遺伝子 MnSOD の発現制御機構を明らかにした。また、MEF 細胞老化関連遺伝子を同定し、細胞老化における p38 活性化機構に IL-1 シグナルが関与していること、IL-1Ra が細胞老化を負に制御していることを明らかにした。また、機能未知分子である TARSH が発癌抑制因子として生体内で機能している可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

高等生物では、加齢にともなって繁殖能・骨量・筋量・免疫応答能など、様々な機能の低下が認められる。このような生理機能の変化は、家畜では生産性の低下や利用する生産物の質的变化につながることから、生体の加齢変化の分子機構を解明し、老化関連疾患の予防法や治療法の開発が求められている。本論文は、細胞老化の分子機構の解明を目指して、細胞老化関連遺伝子の発現調節機構や機能を解析したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 哺乳類の個体老化と細胞老化の両者で機能していることが知られている MnSOD 遺伝子の発現が、転写因子 Sp1 と HDAC1 の複合体によるプロモーター領域のヒストンアセチル化によって調節されていることを明らかにした。このことから、哺乳動物においても酵母や線虫と同様にヒストンアセチル化による発現制御を受けている遺伝子(群)が老化の表現型に影響を与えている可能性が示された。
2. マウス胎児由来繊維芽細胞における細胞老化関連遺伝子発現の経時変化を詳細に解析し、細胞老化の過程でこれらの遺伝子発現が協調的に制御されていることを明らかにした。また、ヒト繊維芽細胞の細胞老化の過程でマウスと同様に発現量が増加している遺伝子は、ヒトの個体老化に関与している可能性が示された。
3. 細胞老化にともなう p38 活性化に IL-1 β が関与していることを明らかにした。また、IL-1Ra は IL-1 シグナルを阻害することによって、p38 の活性化を抑制し、細胞老化の進行を負に制御していることを示した。
4. マウスの細胞老化にともなう発現量が増加するが、機能は未知である TARSH の cDNA をクローニングするとともに、5種類の転写バリエントの存在を明らかにした。癌由来細胞では TARSH 遺伝子発現が著しく抑制されていることから、細胞老化過程で TARSH が発癌抑制作用を有していることが推察された。

以上のように、本論文は、細胞老化関連遺伝子の発現制御機構や細胞老化における役割を明らかにし、細胞老化の分子機構とその生理的意義に関する新知見を示したものであり、細胞生物学、動物生理学、家畜生産学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。