

博士論文

細胞老化における MDM4 の選択的スプライシング制御を介した  
スプライシング因子 PRPF19 の役割

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

細胞分子生物学研究室

平成29年度入学 矢野 公義

主指導教員 田原 栄俊

## 目次

1. 研究背景.....	2
2. 実験材料・方法.....	4
3. 結果.....	12
4. 考察.....	32
5. 参考文献.....	34
6. 謝辞.....	37

## 1. 研究背景

1961年に Hayflick らは、継代培養したヒトの正常線維芽細胞が一定回数 of 細胞分裂を繰り返した後、不可逆的に細胞周期を停止することを観察し、この現象を「細胞老化」と名付けた<sup>1</sup>。この細胞老化は、DNA 複製に伴うテロメア短縮によって引き起こされ、一般的に「複製老化」と呼ばれている。その後、放射線や化学療法剤によって誘発された DNA 損傷や RAS や PTEN などのがん（抑制）遺伝子の（不）活性化によっても、分裂限界に達する前に細胞老化を誘導することが明らかになった<sup>2-4</sup>。細胞老化を誘導した細胞（以下、老化細胞）は、増殖能の低下の他にも、扁平肥大化した細胞形態、 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性の上昇、クロマチン構造の変化、DNA 損傷応答の活性化、様々な生理活性物質の分泌などの特徴を示す<sup>5</sup>。これまでに、このような特徴を示す老化細胞が生体内の様々な組織でも観察され、細胞老化の生理学的な役割に関する研究が数多く報告されている<sup>6</sup>。特に、細胞老化は p53-p21/p16-Rb がん抑制経路を介してゲノム異常を有した細胞の無秩序な増殖を防ぐがん抑制機構の一つとして長い間考えられてきた。さらに、胚発生や損傷修復、免疫応答にも細胞老化が関与することが報告され、生体の恒常性維持に重要な役割を果たすことが明らかになった。その一方で、老化細胞から分泌される炎症性サイトカイン、細胞外マトリクス分解酵素、増殖因子、さらには細胞外小胞（エクソソーム）などが腫瘍の増殖や転移を促進することが明らかになってきた。

p53 は「ゲノムの守護神」と呼ばれるように、様々なストレスに反応して活性化することによって細胞老化の誘導とも密接に関与している<sup>7</sup>。murine double minute 2 (MDM2) や murine double minute 4 (MDM4) は主要な p53 抑制因子であり<sup>8</sup>、これらの阻害は p53 の活性化を引き起こし、アポトーシスや細胞老化を介した細胞増殖抑制作用を示すことが報告されている<sup>9,10</sup>。MDM2 は E3 ユビキチンリガーゼ活性を持ち、プロテアソーム系を介して p53 を分解する一方で<sup>11</sup>、MDM4 は E3 ユビキチンリガーゼ活性を持たないが、p53 と結合することによって MDM2 による p53 の分解を促進する<sup>12</sup>。MDM4 は、全長をコードする翻訳型 MDM4-FL とエクソン 6 のスキッピングが起きた非翻訳型 MDM4-S の 2 種類の選択的スプライシングアイソフォームが存在することが知られている。また、メラノーマ細胞では、serine-arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) の発現抑制は、MDM4-FL から MDM4-S へのスプライシング変換を引き起こすことによって p53 依存的なアポトーシスを誘導する<sup>13</sup>。MDM4 は、複数のがん組織で高発現していることが検出され、p53 のがん抑制機能を低下させることから<sup>14-17</sup>、その選択的スプライシングの変化は発がん過程の重要な要素として考えられている<sup>18</sup>。しかしながら、細胞老化における分子基盤における MDM4 の選択的スプライシングの影響はほとんど明らかになっていない。

DNA 損傷応答もまた、p53 を介した細胞老化誘導機構の主要なシグナル経路として機能している。テロメア短縮による染色体末端の脱保護やがん遺伝子の活性化による DNA 複製ストレスなどは、セリン/スレオニンキナーゼである ataxia telangiectasia mutated (ATM) や ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) を活性化させ、直接的に、もしくは下流エフェクターである checkpoint kinase 1/2 (Chk1/2) のリン酸化を介して、p53 を活性化させる<sup>19,20</sup>。活性化した p53 は、p21 をコードする cyclin dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A) や他の下流遺伝子の転写活性化を介して細胞周期の停止を引き起こす。また近年、TP53 の選択的スプライシングアイソフォームである p53 $\beta$  の

発現が、DNA 損傷誘導性の細胞老化を制御していることが明らかになった<sup>21</sup>。これまでも、DNA 損傷応答は様々な遺伝子の選択的スプライシングを変化させることが報告されていることから、RNA スプライシングの変化が細胞老化の誘導に重要な役割を果たしているのではないかと考えられる<sup>22</sup>。しかしながら、現在までにどのようなスプライシング因子が細胞老化を制御しているのかは十分に解明されていない。

本研究では、正常ヒト胎児肺由来二倍体線維芽細胞における細胞老化誘導機構を解析することによって、細胞老化を制御するスプライシング因子を同定し、スプライシング因子がどのように細胞老化誘導に寄与しているのかを詳細に調べた。

## 2. 実験材料・方法

### 細胞培養

本実験には、正常ヒト胎児肺由来二倍体線維芽細胞株 TIG-3 (Health Science Research Resources Bank)、正常ヒト胎児肺由来二倍体線維芽細胞株 MRC-5 (National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)、正常ヒト胎児肺由来二倍体線維芽細胞株 IMR-90 (National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)、Lenti-X 293T (Clontech) を使用した。Lenti-X 293T 細胞株は、ヒト胎児腎細胞株 HEK293T より SV40 ラージ T 抗原を高発現した細胞株を限外希釈法により単離し、高力価なレンチウイルス産生を可能にするレンチウイルスパッケージング用細胞株である。TIG-3 細胞と Lenti-X 293T 細胞は、10% FBS (GE Healthcare) を含有する Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich) 中で培養した。MRC-5 細胞と IMR-90 細胞は、10% FBS を含有する Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich) 中で培養した。すべての細胞は、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。当研究室では、TIG-3 細胞は約 80 集団倍加レベル (Population doubling levels: PDLs)、MRC-5 細胞は約 70 PDLs、IMR-90 細胞は約 55 PDLs で細胞老化様の細胞周期停止を誘導することを観察した。TIG-3 細胞において、継代早期細胞として 41-59 PDLs、老化細胞として 77-83 PDLs の範囲で使用した。

### PRPF19 及び MDM4 過剰発現細胞の樹立

cDNA 発現用レンチウイルスベクター pCDH-CMV-EF1-GFP-T2A-Puro (System Biosciences) を制限酵素 *EcoRI* と *NotI* で切断した後、In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio) を用いて PRPF19 及び MDM4 の cDNA を組み込んだ。作製したベクターは、レンチウイルス用パッケージングベクター pLP1, pLP2, pLP/VSVG (ViraPower lentiviral expression system, Invitrogen) と共に、トランスフェクション試薬 Lipofectamine LTX and PLUS reagent (Invitrogen) を用いて Lenti-X 293T 細胞にフォワードトランスフェクションして、その 24 時間後に培地交換した。培地交換して 24 時間後に、レンチウイルスを含む培養上清を回収して、Lenti-X concentrator (Clontech) を用いてウイルス培養液を濃縮した。PRPF19 及び MDM4 過剰発現細胞の樹立には TIG-3 細胞を使用し、レンチウイルスを含む培地中で 24 時間培養した後、1 µg/mL のピューロマイシンを含有する培地中で継代培養してピューロマイシン耐性細胞株を選択した。

### 3D-Gene マイクロアレイ解析

ISOGEN II (NIPPON GENE) を用いて、細胞からトータル RNA を抽出した。3D-Gene マイクロアレイ解析、パスウェイ解析 (GenMAPP ver. 2.1, MAPP Finder)、遺伝子オントロジー解析 (GENECODIS2.0) は TORAY 株式会社に受託した。データは、Gene Expression Omnibus (GEO) にアップロードした (GSE162201)。

### リアルタイム PCR 解析

miRNeasy Mini kit (QIAGEN) もしくは ISOGEN II を用いて、細胞からトータル RNA を抽出した。mRNA の発現量を解析するために、High-Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写を行い、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2×) Universal (KAPA Biosystems) を用いてリアルタイム PCR 解析を行なった。PCR 装置として Rotor-Gene Q (QIAGEN) を使用した。mRNA の相対発現量比は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法によって算出した。使用した PCR プライマーリストは表 1 に示している。

### ウェスタンブロット解析

細胞を 2×SDS sample buffer [116.7 mM Tris-HCl (pH 6.8), 3.67% (w/v) SDS, 0.004% (w/v) BPB, 12% (w/v) glycerol, 200 mM DTT] 中で溶解し、95°C で約 5-10 分間熱変性処理を行なった。XL-Bradford (APRO Science) を用いてサンプルのタンパク質定量を行なった後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってタンパク質を分離して、ゲルから PVDF メンブレンにタンパク質を転写した。メンブレンは、ブロッキング処理終了後に、室温で約 3 時間もしくは 4°C で一晩、一次抗体希釈液中でインキュベートした。一次抗体反応終了後、メンブレンを洗浄して、室温で約 30-60 分間、二次抗体希釈液中でインキュベートした。二次抗体反応終了後、メンブレンを洗浄して、化学発光試薬 Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) もしくは ImmunoStar Zeta (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) に浸した。イメージング装置 ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare) もしくは FUSION SYSTEM (Vilber-Lourmat) を使用して、化学発光シグナルを検出してタンパク質発現量を解析した。使用した抗体リストは表 2 に示している。

### siRNA のトランスフェクション

トランスフェクション試薬 Lipofectamine RNA-MAX transfection reagent (Invitrogen) を用いて、細胞に siRNA を最終濃度 10 nM になるようにリバーストランスフェクションした。使用した siRNA リストは表 3 に示している。

### 老化関連 $\beta$ ガラクトシダーゼ活性の評価

細胞を 100 nM のバフィロマイシン A を添加した培地中で 1 時間培養した後、1  $\mu$ M の SPiDER- $\beta$ Gal (DOJINDO) を添加して 15 分間培養した。その後、細胞を回収して、フローサイトメーター FACSCalibur (BD Biosciences) を用いて蛍光を検出した。前方散乱と側方散乱をもとにゲートを設定し、ゲート中の 10,000 細胞を解析して、FL1 ヒストグラムを作製した。データ解析には FlowJo (FlowJo LLC) を使用した。

### 老化関連ヘテロクロマチン構造の観察

チャンバースライドに細胞を用意して、4%パラホルムアルデヒドによって室温で 10 分間固定処理した。固定処理終了後、0.2% Triton-X 100 によって室温で 5 分間透過処理した。透過処理終了後、3% BSA で 5 分間ブロッキング処理をして、室温で 2 時間、anti-trimethyl-Histone H3 (Lys9)

(1:500, Merck Millipore, #07-422) の一次抗体希釈中でインキュベートした。一次抗体反応終了後、サンプルを洗浄して、室温暗所で 1 時間、Alexa Fluor 594-conjugated anti-Rabbit IgG (1:1,000, Invitrogen) の二次抗体希釈液中でインキュベートした。二次抗体反応終了後、室温で 3 分間、0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI (DOJINDO) 希釈液中でインキュベートした。洗浄後、Fluorescence Mounting Medium (Dako) を滴下し、カバーガラスを乗せて密閉した。蛍光顕微鏡 BZ-X810 All-in-One (KEYENCE) を使用して、核内の老化関連ヘテロクロマチン構造を観察した。

## EdU 細胞増殖試験

24 穴プレートに細胞を用意して、10  $\mu\text{M}$  の EdU を含む培地中で 24 時間培養した。その後、Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Imaging kit (Molecular Probes) を用いて、細胞を染色した。蛍光顕微鏡 BZ-X810 All-in-One を使用して、細胞を観察した。

## 一本鎖 DNA の検出

細胞を 20  $\mu\text{M}$  の BrdU を含む培地中で 48 時間培養した後、siRNA をトランスフェクションした。サンプルは、70%エタノール中で固定処理した後、37°C で 1 時間、anti-BrdU (1:200, Dako, M0744) の一次抗体希釈液中でインキュベートした。一次抗体反応終了後、サンプルを洗浄して、室温暗所で 1 時間、Alexa Fluor 488-conjugated anti-Mouse IgG (1:1,000, Invitrogen) の二次抗体希釈液中でインキュベートした。二次抗体反応終了後、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の PI (Sigma-Aldrich) と 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の RNase A (QIAGEN) を含む PBS(-)中で細胞を懸濁して、その 30 分後に、フローサイトメーター FACSCalibur を用いて蛍光を検出した。

## コメットアッセイ

Comet Assay kit (Trevigen) を用いて、アルカリ性条件コメットアッセイを行なった。テール中の DNA 量は、TriTek Comet Score (ver. 1.5) software (TriTek Corp.) を用いて測定した。

## PCR 法によるスプライシングアイソフォーム発現量解析

miRNeasy Mini kit を用いて、細胞からトータル RNA を抽出した。RNA 抽出過程において、Rnase-free Dnase set (QIAGEN) を用いて Dnase 処理過程を追加した。High-Capacity RNA-to-cDNA kit を用いて逆転写を行い、KOD-plus-ver.2 (TOYOBO) を用いて PCR を行なった。PCR 反応条件は、前処理変性を 94°C で 2 分間行なった後に、変性 (98°C、10 秒)、アニーリング (57°C、30 秒)、伸長 (68°C、30 秒) を 30 サイクルで行なった。その後、アガロース電気泳動によって PCR 増幅産物を分離した。サンプルには Midori Green Direct (NIPPON Genetics) を添加し、ゲル撮影装置 LED トランスイルミネーター (BIO CRAFT) を使用して PCR 増幅産物を観察した。使用した PCR プライマーリストは表 1 に示している。

## RNA シークエンス解析

miRNeasy Mini kit を用いて、細胞からトータル RNA を抽出した。RNA 抽出過程において、Rnase-free Dnase set を用いて Dnase 処理過程を追加した。RNA 品質解析 (NanoDrop 8000 Microvolume UV-Vis spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific; Agilent RNA 6000 Nano kit, Agilent Technologies)、ライブラリー調整 (SMARTer Standard Total RNA Sample Prep Kit – HI Mammalian, Takara Bio; AMPure XP beads, Beckman Coulter)、次世代シーケンス解析 (HiSeq sequencer, Illumina)、データ解析は、株式会社ダナフォームに受託した。シーケンスの生データの品質確認 (FASTQC ver. 0.11.7)、トリミング (Trim Galore! Ver. 0.4.4, Trimmomatic ver. 0.36)、フィルタリング (cutadapt ver. 1.16) を行なった後に、ヒトゲノム GRCh38.p10 にマッピング (STAR ver. 2.6.1a) した。選択的スプライシング変化を解析するために、rMATS ver. 4.0.2 を使用した。また、MDM4 のスプライシング変化を示すゲノムアノテーションは Integrative Genomics Viewer ver. 2.4.16 を使用した。データは、Gene Expression Omnibus (GEO) にアップロードした (GSE168391)。

## 共免疫沈降

細胞を 1×cell lysis buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 1 mM EDTA, 5% (v/v) glycerol, protease inhibitors] 中で溶解した後、Protein G beads (GE Healthcare) を添加して 4°C で 1 時間、前洗浄した。前洗浄した細胞溶解液に 2 µg の normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) もしくは anti-PRPF3 (Proteintech, 10106-1-AP) を添加して、4°C で一晩インキュベートした。その後、Protein G beads を添加して 4°C で 2 時間インキュベートした。1×cell lysis buffer で洗浄後、2×SDS sample buffer でビーズからタンパク質を溶出した。タンパク質溶出液はウェスタンブロット法によって解析した。

## 統計解析

GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software) を用いて、データの統計学的処理を行なった。棒グラフデータには、平均値及び標準偏差を示した。有意差検定には、スチューデントの t 検定によって p 値を算出した。Not significant (n.s.) は  $p \geq 0.05$ 、\*は  $p < 0.05$ 、\*\*は  $p < 0.01$ 、\*\*\*は  $p < 0.001$  を示している。



表 1. 使用した PCR プライマーのリスト

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
<b>RT-PCR</b>		
<i>GAPDH</i>	CACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGG	CTCTTCCTCTTGTGCTCTTGCTGG
<i>SRSF3</i>	CAGTTCATTGTGGGTTGCTTCTG	AGTCTAACAGGGTGGGAGTGTG
<i>PRPF19</i>	ATGGTTACTACCTGGCTACAGCGG	TGCCTGTTGAAGCGATGAACTTGG
<i>PRPF38A</i>	ACCATAGGCAACACCAACACAG	TGGCTTCTTTCACTCACTCTCTCC
<i>CWC22</i>	AGCATAACCAGAGGATGAGTTGGG	TGGGTGAAGATTGGAGAAGCAC
<i>WTAP</i>	TCAAGCAAGTCCAGCAGCC	TGTCTTTAGTCTGTTCCAGTTCACC
<i>PRPF4B</i>	TTCTTCTGGTGGGTTTTGCTCC	AGAGACGGGGTGTAGGTTTCAG
<i>SRSF1</i>	ACCTCCAGACATCCGAACCAAG	CGAACTCAACGAAGGCGAAGG-
<i>DHX15</i>	GCCTGTAAGAGAATAAAGCGTGAAG	GCTGCTGAGGTGGAAGTGTAG
<i>SRSF6</i>	GAAGATAAGCCACGCACAAGCC	ACGGGAGCGACTTTTTGAGATAC
<i>SF3B1</i>	AAAGGCTGCTGGTCTGGCTAC	TGTTGTGTTACGGACATACTCATCC
<i>CDKN1A</i>	TGCAATTCCCCTCTGCTGCTG	TGTGTCCCTTCCCCTTCCAGT
<i>CDKN2A</i>	CAACGCACCGAATAGTTACGGTGC	ACCAGCGTGTCCAGGAAGCCCTC
<i>LMNB1</i>	CTGGAAATGTTTGCATCGAAGA	GCCTCCCATTGGTTGATCC
Total <i>TP53</i>	ACTTCTTGTTCCCCACTGACAGC	CCACAACAAAACACCAGTGCAGG
<i>TP53</i> $\beta$ isoform	AAATGGTTCTATGACTTTGCCTGATA	CAGCTCTCGGAACATCTCGAA
<b>RT-PCR</b>		
<i>GAPDH</i> exon3-exon4	TGGTCACCAGGGCTGCTT	AGCTTCCCGTTCTCAGCCTT
<i>TP53</i> exon7-exon10	CTCACCATCATCACACTGGAA	TCATTCAGCTCTCGGAACATC
<i>MDM4</i> exon5-exon7	GAATCTTGTCACCTTAGCCACTGC	TGCTCTGAGGTAGGCAGTGTG

表 2. ウェスタンブロット解析で使用した抗体のリスト

Antibody	Resource	Dilution
<b>Primary antibody</b>		
Anti-PRPF19	Bethyl Laboratories, A300-101A	1:1,000
Anti-CWC22	Santa Cruz Biotechnology, cs-398178	1:1,000
Anti-WTAP	Santa Cruz Biotechnology, sc-374280	1:1,000
Anti-SRSF3	Santa Cruz Biotechnology, sc-33652	1:1,000
Anti-DHX15	Santa Cruz Biotechnology, sc-271686	1:1,000
Anti-p53	Santa Cruz Biotechnology, sc-126	1:1,000
Anti-phospho-p53 (Ser15)	Cell Signaling Technology, #9284	1:1,000
Anti-p21	BD Pharmigen, #554228	1:1,000
Anti-p16	Cell Signaling Technology, #92803	1:1,000
Anti-Cyclin D1	Cell Signaling Technology, #2926	1:1,000
Anti-Cyclin D3	Cell Signaling Technology, #2936	1:1,000
Anti-CDK4	Cell Signaling Technology, #2906	1:1,000
Anti-CDK6	Cell Signaling Technology, #3136	1:1,000
Anti-ATR	Santa Cruz Biotechnology, sc-1887	1:1,000
Anti-ATM	Merck Millipore, PC116	1:1,000
Anti-SRSF3	Medical & Biological Laboratories, RN080PW	1:1,000
Anti-MDM4	Merck Millipore, #04-1555	1:1,000
Anti-PRPF3	Proteintech, 10106-1-AP	1:1,000
Anti-PRPF8	Santa Cruz Biotechnology, sc-55533	1:1,000
Anti- $\beta$ -Actin	Sigma-Aldrich, A5441	1:5,000
<b>Secondary antibody</b>		
HRP-conjugated IgG secondary anti-Mouse	Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-035-003	1:5,000
HRP-conjugated IgG secondary anti-Rabbit	Jackson ImmunoResearch Laboratories, 111-035-003	1:5,000
HRP-conjugated IgG secondary anti-Goat	Santa Cruz Biotechnology, sc-2020	1:5,000

表 3. 使用した siRNA のリスト

siRNA	Resource
Silencer Select Negative Control No.1 siRNA	Thermo Fisher Scientific, 4390844
Silencer Select siRNA targeting PRPF19 #1	Thermo Fisher Scientific, ID: s223754
Silencer Select siRNA targeting PRPF19 #2	Thermo Fisher Scientific, ID: s26186
Silencer Select siRNA targeting PRPF19 #3	Thermo Fisher Scientific, ID: s26184
Silencer Select siRNA targeting CWC22 #1	Thermo Fisher Scientific, ID: s33633
Silencer Select siRNA targeting CWC22 #2	Thermo Fisher Scientific, ID: s33631
Silencer Select siRNA targeting CWC22 #3	Thermo Fisher Scientific, ID: s33632
Silencer Select siRNA targeting WTAP #1	Thermo Fisher Scientific, ID: s18432
Silencer Select siRNA targeting WTAP #2	Thermo Fisher Scientific, ID: s18431
Silencer Select siRNA targeting WTAP #3	Thermo Fisher Scientific, ID: s18433
Silencer Select siRNA targeting SRSF1 #1	Thermo Fisher Scientific, ID: s12727
Silencer Select siRNA targeting SRSF1 #2	Thermo Fisher Scientific, ID: s12726
Silencer Select siRNA targeting SRSF1 #3	Thermo Fisher Scientific, ID: s12725
Silencer Select siRNA targeting DHX15 #1	Thermo Fisher Scientific, ID: s4030
Silencer Select siRNA targeting DHX15 #2	Thermo Fisher Scientific, ID: s4029
Silencer Select siRNA targeting DHX15 #3	Thermo Fisher Scientific, ID: s4028
Silencer Select siRNA targeting SRSF3 #1	Thermo Fisher Scientific, ID: s12733
Silencer Select siRNA targeting SRSF3 #2	Thermo Fisher Scientific, ID: s12731
Silencer Select siRNA targeting SRSF3 #3	Thermo Fisher Scientific, ID: s12732
Silencer Select siRNA targeting PRPF3 #1	Thermo Fisher Scientific, ID: s17434
Silencer Select siRNA targeting PRPF3 #2	Thermo Fisher Scientific, ID: s17435
Silencer Select siRNA targeting PRPF3 #3	Thermo Fisher Scientific, ID: s17436
Silencer Select siRNA targeting PRPF8 #1	Thermo Fisher Scientific, ID: s20797
Silencer Select siRNA targeting PRPF8 #2	Thermo Fisher Scientific, ID: s20798
Silencer Select siRNA targeting PRPF8 #3	Thermo Fisher Scientific, ID: s20796
Staelth RNAi siRNA Negative Control Med GC Duplex #2	Thermo Fisher Scientific, 12935-112
Stealth siRNA targeting PRPF19	Thermo Fisher Scientific, ID: HSS120653
Stealth siRNA targeting PRPF19 3'UTR	Thermo Fisher Scientific, S: 5'- UGUAAGCAGUGAUCUAGUUUCAUUA-3', AS: 5'- UAAUGAAACUAGAUCACUGCUUACA-3'
Stealth siRNA targeting p53	Thermo Fisher Scientific, S: 5'- CCAGUGGUAUUCUACUGGGACGGAA-3', AS: 5'- UUCCGUCCCAGUAGAUUACCACUGG-3'
Stealth siRNA targeting MDM4	Thermo Fisher Scientific, ID: HSS106419
AllStars Negative Control siRNA	QIAGEN, 1027280
siRNA targeting ATR	Hokkaido System Science, S: 5'- CCUCCGUGAUGUUGCUUGAtt-3',

AS: 5'-UCAAGCAACAUCACGGAGGtt-3'

Hokkaido System Science,

siRNA targeting ATM

S: 5'-GCGCCUGAUUCGAGAUCUtt-3',

AS: 5'-AGGAUCUCGAAUCAGGCGCtt-3'

---

S: sense strand sequence, AS: antisense strand sequence

### 3. 結果

#### 細胞老化を制御するスプライシング因子の同定

細胞老化を制御するスプライシング因子を探索するために、正常ヒト胎児肺由来線維芽細胞株である TIG-3 細胞の継代早期 (41 PDL) と老化 (77 PDL) 細胞を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行なった (図 1A, B)。過去の報告と同様に<sup>23</sup>、パスウェイ解析や遺伝子オンロジー解析の結果から、細胞周期に関与する遺伝子群と同様に RNA プロセッシングや RNA スプライシングに関与する遺伝子群の発現が複製老化に伴って低下していた (図 1C, D)。これらの発現低下した遺伝子の中から上位 10 遺伝子 (*SRSF3*, *PRPF19*, *PRPF38A*, *CWC22*, *WTAP*, *PRPF4B*, *SRSF1*, *DHX15*, *SRSF6*, *SF3B1*) について、RT-qPCR 法によるバリデーション解析を行なった結果、*PRPF19*, *PRPF38A*, *CWC22*, *WTAP*, *SRSF1*, *DHX15*, *SRSF6* の発現が複製老化に伴って有意に低下した (図 1E)。我々は、老化細胞で 2 倍以上発現が低下していた *PRPF19*, *CWC22*, *WTAP*, *SRSF1*, *DHX15* に着目して、ウェスタンブロット法によってこれらのタンパク質発現量を解析した。mRNA 発現量解析の結果と同様に、これらのタンパク質発現量は複製老化に伴って低下することが示された (図 1F)。

次に、これらの遺伝子に対する siRNA を用いたノックダウンによって細胞老化が誘導されるかどうかを検討した。各遺伝子に対して 3 種類の siRNA を用いてノックダウン効率を評価した (図 1G, H)。3 種類の内、最も強いノックダウン効率を示した siRNA を用いて、TIG-3 細胞の増殖及び細胞老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性を調べた。*PRPF19*, *CWC22*, *DHX15* のノックダウンによって有意に細胞増殖が抑制されることが示された (図 1I)。重要なことに、候補 5 遺伝子の中でも、*PRPF19* をノックダウンした細胞において最も強く  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性陽性細胞の増加が観察された (図 1J)。これらの機能的スクリーニングの結果から、細胞老化の誘導に関与する重要なスプライシング因子として *PRPF19* を同定した。

#### 継代早期細胞に対する *PRPF19* のノックダウンは細胞老化を誘導する

細胞老化における *PRPF19* の役割を解析するために、複数の細胞老化マーカーを指標として *PRPF19* のノックダウンが細胞老化を誘導するかどうかを検討した。TIG-3 細胞の複製老化において、*PRPF19* のタンパク質発現は約 60-70 PDL で低下し始めるため、60 PDL に達する前の継代早期 TIG-3 細胞を用いて *PRPF19* のノックダウン実験を行なった (図 2A)。翻訳領域 (si*PRPF19*) または 3' 非翻訳領域 (si*PRPF19* 3'UTR) を標的とする 2 種類の *PRPF19* に対する siRNA をトランスフェクションした細胞において、*PRPF19* のタンパク質発現は十分に抑制された (図 2B)。また、これらの siRNA による *PRPF19* のノックダウンによって細胞増殖は有意に抑制された (図 2C)。

より詳細に細胞老化を評価するために、siRNA をトランスフェクションして 7 日後の細胞における細胞老化関連遺伝子の発現量、細胞老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性、細胞老化関連ヘテロクロマチン構造について解析した。RT-qPCR 解析の結果から、*PRPF19* をノックダウンした細胞では *CDKN1A* (p21) や *CDKN2A* (p16) の発現上昇、*LMNB1* (Lamin B1) の発現低下が観察された

(図 2D)。さらに、PRPF19 のノックダウンによって  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性が上昇し、ヒストン H3 リジン 9 番目のトリメチル化を伴うヘテロクロマチン構造が形成された (図 2E, F, G)。これらの結果から、PRPF19 の発現低下は細胞老化を引き起こすことが示された。さらに、他の正常ヒト胎児肺由来線維芽細胞株である MRC-5 細胞と IMR-90 細胞においても、PRPF19 のノックダウンによって細胞増殖の抑制、 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性が上昇、*CDKN1A* (p21) の発現上昇が観察された (図 2H, I, J, K)。これらの結果から、PRPF19 の発現低下は細胞老化の誘導を促進することが示された。

### PRPF19 は p53 依存的細胞老化機構に関与する

PRPF19 の発現低下によって制御される細胞老化誘導機構を調べるために、PRPF19 をノックダウンした細胞における G1/S 細胞周期チェックポイント因子の発現を解析した。siRNA をトランスフェクションして 3 日後のウェスタンブロット解析の結果から、PRPF19 をノックダウンした細胞では p53 の安定化及びセリン 15 番目のリン酸化を伴う活性化、その転写標的遺伝子である p21 の発現上昇が観察された (図 3A)。その一方で、この時点ではまだ p16 の発現上昇は観察されず、Cyclin D1 や CDK4 の発現はほとんど変化しなかった (図 3A)。そのため、我々は PRPF19 の発現低下は p53-p21 経路を介して細胞老化を誘導しているのではないかと考えた。

この仮説を検証するために、p53 をノックダウンした細胞を用いて PRPF19 のノックダウン実験を行なった。ウェスタンブロット解析の結果から、p53 をノックダウンした細胞では PRPF19 のノックダウンによる p21 の発現上昇が消失することが観察された (図 3B)。さらに、PRPF19 の発現低下による細胞老化誘導において p53 の関与を検討するために、細胞老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性評価と EdU 細胞増殖試験を行なった。PRPF19 をノックダウンした細胞と比較して、p53 と PRPF19 をノックダウンした細胞では  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性の上昇が抑制された (図 3C)。また、PRPF19 のノックダウンによって引き起こされる細胞周期の停止は、p53 ノックダウン細胞では回復した (図 3D, E)。したがって、PRPF19 の発現低下は p53 依存的に細胞老化を誘導することが明らかになった。

### PRPF19 のノックダウンは DNA 損傷応答非依存的に p53 を活性化させる

DNA 損傷応答は p53 依存的な細胞老化誘導を駆動することが知られているため、DNA 損傷応答が PRPF19 の発現低下による p53 の活性化を制御しているかどうかを検証した。PRPF19 をノックダウンした細胞の DNA 損傷レベルを評価するために、BrdU 染色によって一本鎖 DNA を検出した。BrdU 抗体を用いて免疫染色した後にフローサイトメトリー解析を行なった結果、コントロール細胞と比較して、PRPF19 をノックダウンした細胞では BrdU 蛍光強度が上昇していることが観察された (図 4A)。この結果と一致して、コメットアッセイの結果においても、PRPF19 のノックダウンによって有意に DNA 損傷が蓄積することが示された (図 4B, C, D)。ATM と ATR は、DNA 損傷応答を介した p53 の活性化の主要シグナル因子であることから、これらの因子が PRPF19 のノックダウンによる p53 の活性化に関係するかどうかを検討した。ATR と PRPF19、ATM と PRPF19 を同時にノックダウンした細胞において p53 及び p21 の発現量を解析したが、

我々の予想に反して、ATR や ATM のノックダウンは PRPF19 をノックダウンした細胞における p53 の活性化にほとんど影響しなかった (図 4E, F)。

近年、TP53 の選択的スプライシング産物である p53 $\beta$  が DNA 損傷応答を介して細胞老化の誘導に寄与していることが明らかになったことから<sup>21</sup>、我々はこの関与についても検証した。TP53 遺伝子の選択的スプライシングアイソフォームを検出できるプライマーを設計して RT-PCR 及び RT-qPCR 解析を行うことによって、TP53 の mRNA アイソフォームの発現量を解析した (図 4G, H)。過去の報告と同様に<sup>24</sup>、スプライシング因子 SRSF3 をノックダウンした細胞では p53 $\beta$  の発現上昇が観察されたが、その一方で、PRPF19 をノックダウンした細胞では p53 $\beta$  の発現上昇はほとんど観察されなかった (図 4I, J, K, L)。これらの結果から、PRPF19 の発現低下は ATM/ATR シグナルや p53 $\beta$  の発現上昇などの DNA 損傷応答非依存的に p53 を活性化させることが示唆された。

### PRPF19 は MDM4 のエクソン 6 の選択的スプライシングを制御する

我々は、PRPF19 が pre-mRNA スプライシングに重要な役割を果たすことから<sup>25</sup>、PRPF19 の発現低下が老化関連遺伝子の選択的スプライシングに影響を与えることによって、細胞老化の誘導に関係しているかもしれないと考えた。この仮説を検証するために、コントロール細胞と PRPF19 をノックダウンした細胞の RNA シークエンスデータを用いて Multivariate Analysis of Transcript Splicing (MATS) 解析を行い、PRPF19 のノックダウンによって変化する選択的スプライシングイベントを検出した。この結果から、PRPF19 をノックダウンした細胞で、エクソンスキッピング (skipped exon)、イントロン保持 (retained intron)、相互排他的エクソン (mutually exclusive exons)、選択的 5' スプライス部位 (alternative 5' splice site)、選択的 3' スプライス部位 (alternative 3' splice site) を含む 1,935 イベントの選択的スプライシング変化が検出された (図 5A)。また、PRPF19 のノックダウンは主に、エクソンスキッピングを引き起こすことが明らかになった。このエクソンスキッピングを引き起こした候補遺伝子の中から、我々はエクソン 6 のスキッピングを引き起こした MDM4 に着目した (図 5B)。MDM4 は、MDM2 依存的な p53 の分解を促進する、重要な p53 抑制因子として知られている<sup>12</sup>。さらに、メラノーマ細胞では、SRSF3 のノックダウンが全長の MDM4-FL からエクソン 6 のスキッピングを引き起こした MDM4-S (ナンセンス変異依存的 mRNA 分解機構の標的産物) への選択的スプライシング変化を引き起こし、MDM4 タンパク質の発現低下と p53 の活性化を引き起こすことが報告されている<sup>13</sup>。このような知見から、我々は PRPF19 の発現低下を伴う細胞老化においても MDM4 の選択的スプライシング変化が重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

この仮説を検証するために、MDM4 遺伝子のエクソン 5 にフォワードプライマー、エクソン 7 にリバープライマーを設計して RT-PCR 解析を行うことによって、MDM4 の mRNA アイソフォームの発現量を解析した (図 5C)。RNA シークエンス解析の結果と同様に、PRPF19 のノックダウンによって MDM4-FL から MDM4-S への発現変化が引き起こされ、さらに、ウェスタンブロット解析の結果から、MDM4 タンパク質の発現低下も観察された (図 5D)。重要なことに、継代早期 TIG-3 細胞と比較して老化細胞においても同様に、MDM4-FL から MDM4-S への発現変化と

MDM4 タンパク質の発現低下が観察された (図 5E)。さらに PRPF19 のノックダウンと同様に、MDM4 をノックダウンした細胞では、p53 の安定化及びセリン 15 番目のリン酸化を伴う活性化、その転写標的遺伝子である p21 の発現上昇が観察された (図 5F)。

MDM4 の選択的スプライシング変化に対する PRPF19 の影響を評価するために、siRNA 耐性 PRPF19 過剰発現細胞に siPRPF19 3'UTR をトランスフェクションすることによって、PRPF19 のノックダウンによる MDM4 の選択的スプライシング変化がレスキューされるかどうかを検討した。ルシフェラーゼ発現コントロール細胞と比較して siRNA 耐性 PRPF19 過剰発現細胞では、siPRPF19 3'UTR によって PRPF19 の発現量はほとんど変化せず、MDM4-FL から MDM4-S への発現変化も引き起こされなかった (図 5G)。これらの結果から、細胞老化において PRPF19 は MDM4 の選択的スプライシングを調節することが明らかになった。

次に、PRPF19 をノックダウンした細胞の p53 の活性化における MDM4 の関与を検討した。MDM4-FL の過剰発現が、PRPF19 のノックダウンによる p53 の活性化を抑制するかどうかを検討した結果、ルシフェラーゼ発現コントロール細胞と比較して MDM4-FL 過剰発現細胞では、PRPF19 のノックダウンによる p53 及び p21 の発現上昇が抑制された (図 5H, I)。興味深いことに、ルシフェラーゼ発現コントロール細胞と比較して MDM4-FL 過剰発現細胞では、複製老化過程における細胞周期停止状態への移行が遅延することが観察された (図 5J, K)。これら結果から、PRPF19 は MDM4 の選択的スプライシングを調節することによって、p53-p21 経路を制御して細胞老化の誘導に寄与することが明らかになった。

### **PRPF19 は PRPF3-PRPF8 相互作用を安定化することによって MDM4 の選択的スプライシングを制御する**

最後に、PRPF19 がどのように MDM4 の選択的スプライシングを調節しているのかを調べた。PRPF19 は U4 snRNP 構成因子 PRPF3 と U5 snRNP 構成因子 PRPF8 の相互作用を促進することによって、コアスプライソソームである U4/U6.U5 tri-snRNP を安定化する<sup>26</sup>。そのため、U4/U6.U5 tri-snRNP の不安定化が MDM4 の選択的スプライシング変化に影響するのではないかと考えた。老化細胞及び PRPF19 をノックダウンした細胞において、PRPF3 と PRPF8 の発現量を解析した結果、老化細胞ではこれらのタンパク質の発現低下が観察された一方で、PRPF19 をノックダウンした細胞ではこれらの発現量にほとんど変化は観察されなかった (図 6A, B)。

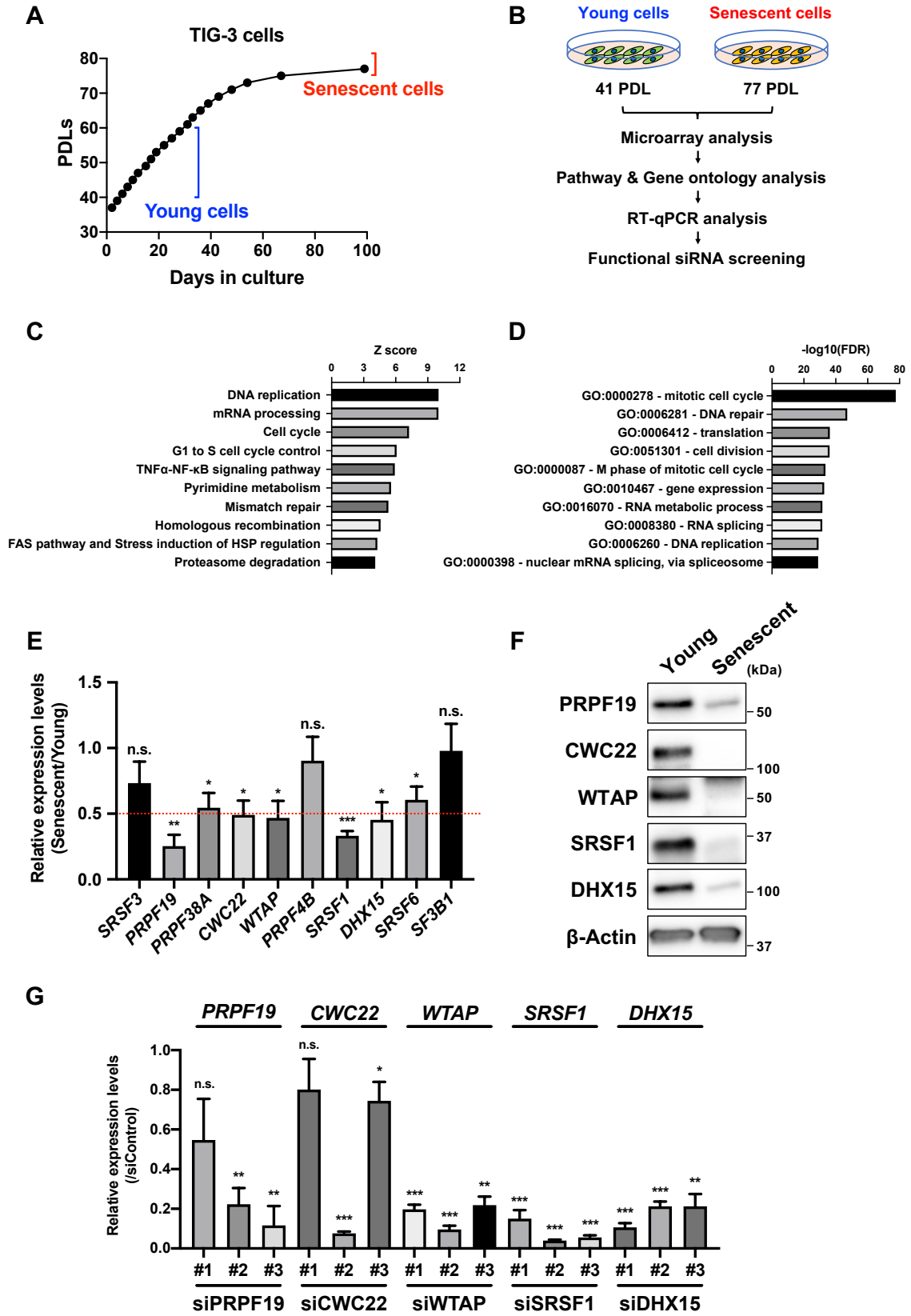
次に、PRPF3 と PRPF8 の発現低下が MDM4 の選択的スプライシングに与える影響を調べた。PRPF19 をノックダウンした時と同様に、PRPF3 及び PRPF8 をノックダウンした細胞においても MDM4-FL から MDM4-S への発現変化と MDM4 タンパク質の発現低下が観察された (図 6C)。このことから、U4/U6.U5 tri-snRNP 関連タンパク質が MDM4 の選択的スプライシングに重要な役割を果たすことが示唆された。

PRPF19 による PRPF3 のユビキチン化は PRPF3-PRPF8 相互作用を促進することから<sup>26</sup>、PRPF19 の発現低下が PRPF3-PRPF8 相互作用に与える影響を評価した。コントロール細胞と PRPF19 をノ



ックダウンした細胞を用いて、PRPF3 抗体による共免疫沈降を行なった。その結果、PRPF19 のノックダウンによって PRPF3-PRPF8 相互作用が減弱することが示された (図 6D)。これらの結果から、PRPF19 は PRPF3-PRPF8 相互作用を安定化することによって MDM4 の選択的スプライシングを制御することが明らかになった。また、老化細胞において PRPF3 と PRPF8 の発現低下が観察されたことから、PRPF19 による PRPF3-PRPF8 相互作用の調節は細胞老化誘導の初期過程に重要な役割を果たすことが示唆される。

以上の結果をまとめると、PRPF19 を中心とした RNA スプライシング機構の調節変化が p53 依存的な細胞老化誘導機構に重要な役割を果たすことが明らかになった (図 6E)。



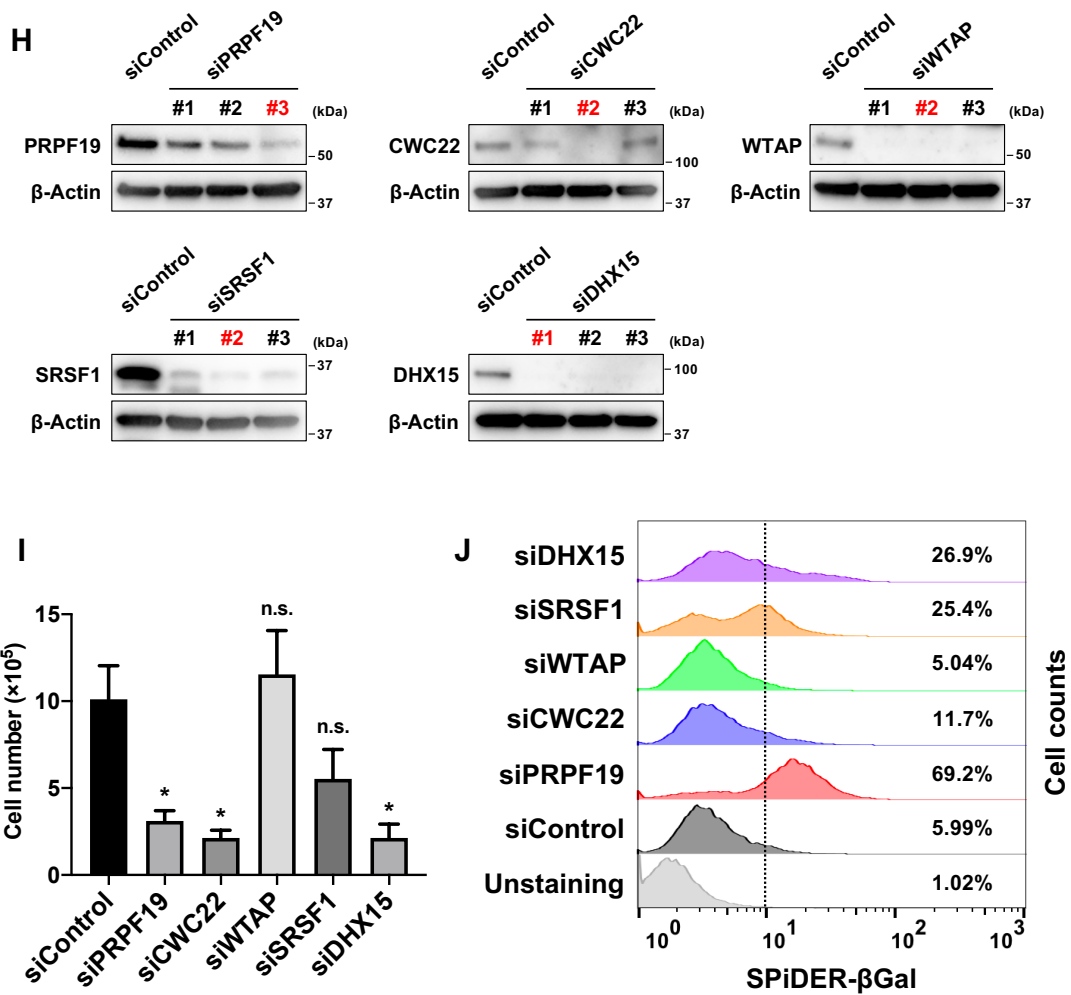
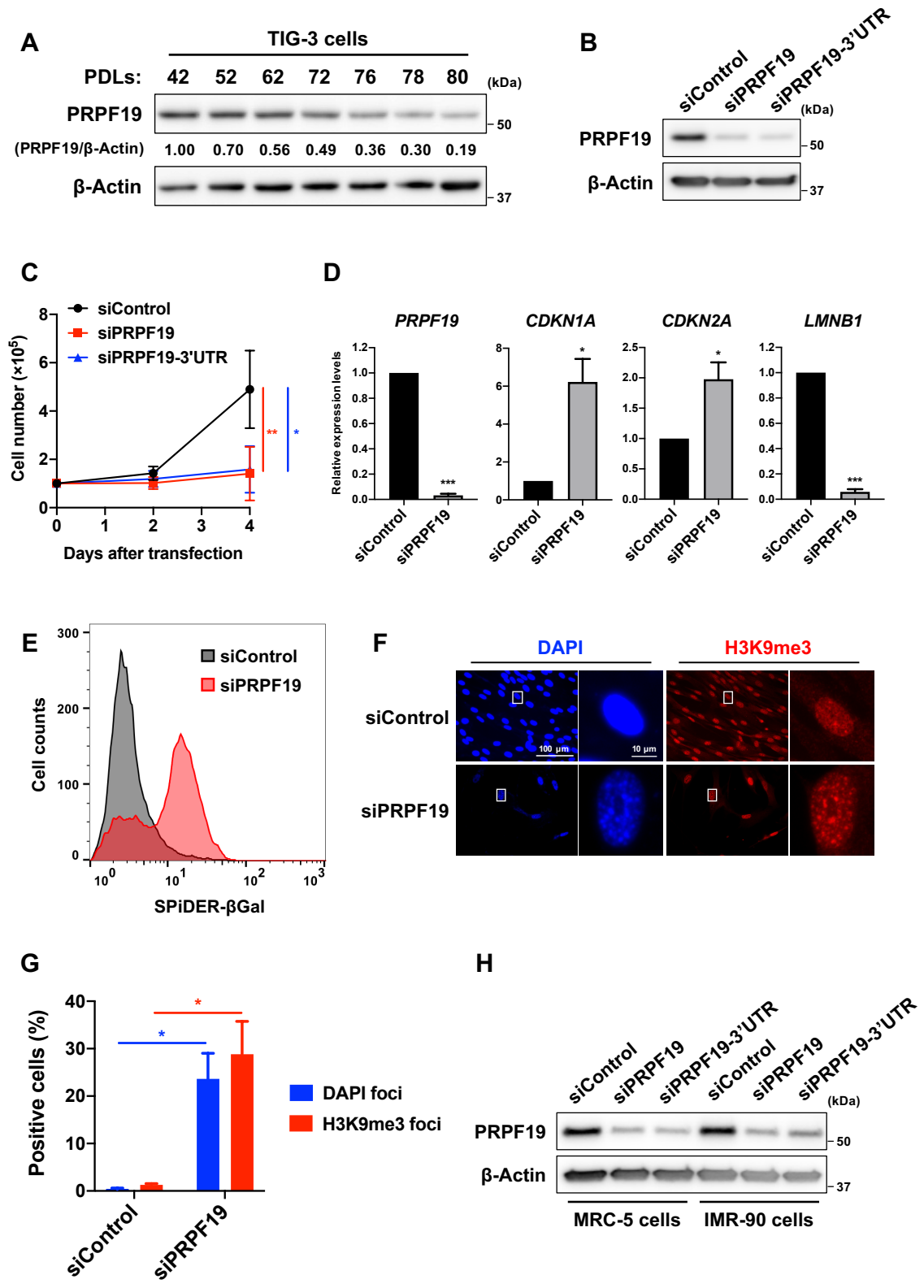


図1. 細胞老化を制御するスプライシング因子の同定

- マイクロアレイ解析に使用した TIG-3 細胞の継代培養プロセス。
- 細胞老化制御因子を同定するための実験デザイン。
- パスウェイ解析において、老化 TIG-3 細胞で 2 倍以上発現が低下した遺伝子群における上位 10 経路。
- 遺伝子オントロジー解析において、老化 TIG-3 細胞で発現が低下した遺伝子群における上位 10 経路。
- マイクロアレイ解析において、老化 TIG-3 細胞で発現が低下した RNA プロセッシング及び RNA スプライシングに関与する上位 10 遺伝子に対する RT-qPCR 解析。GAPDH を内部標準遺伝子として相対発現量を示した。
- 継代早期及び老化 TIG-3 細胞のウェスタンブロット解析。
- TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後の RT-qPCR 解析。GAPDH を内部標準遺伝子として相対発現量を示した。
- TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後のウェスタンブロット解析。
- TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 4 日後の細胞数。
- TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 7 日後の細胞老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性評価。



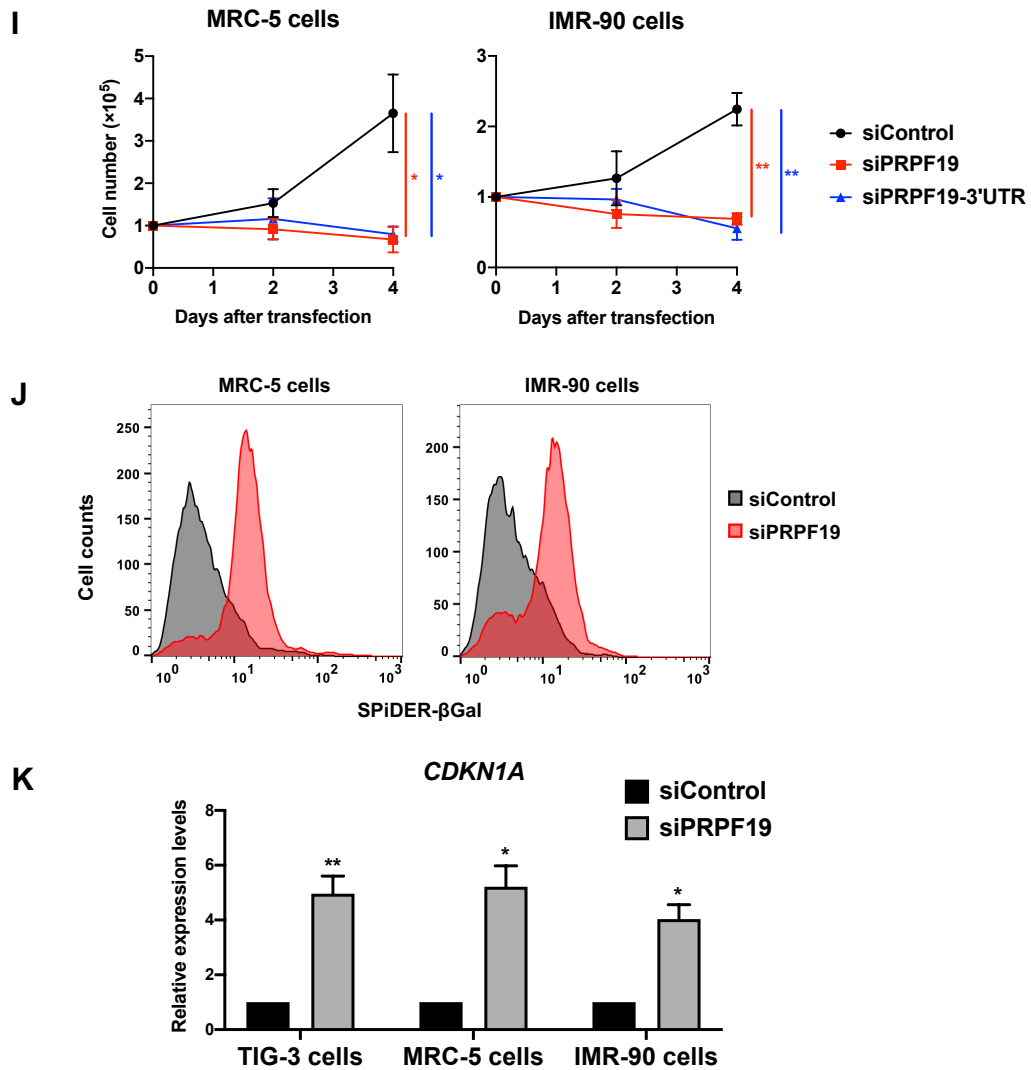
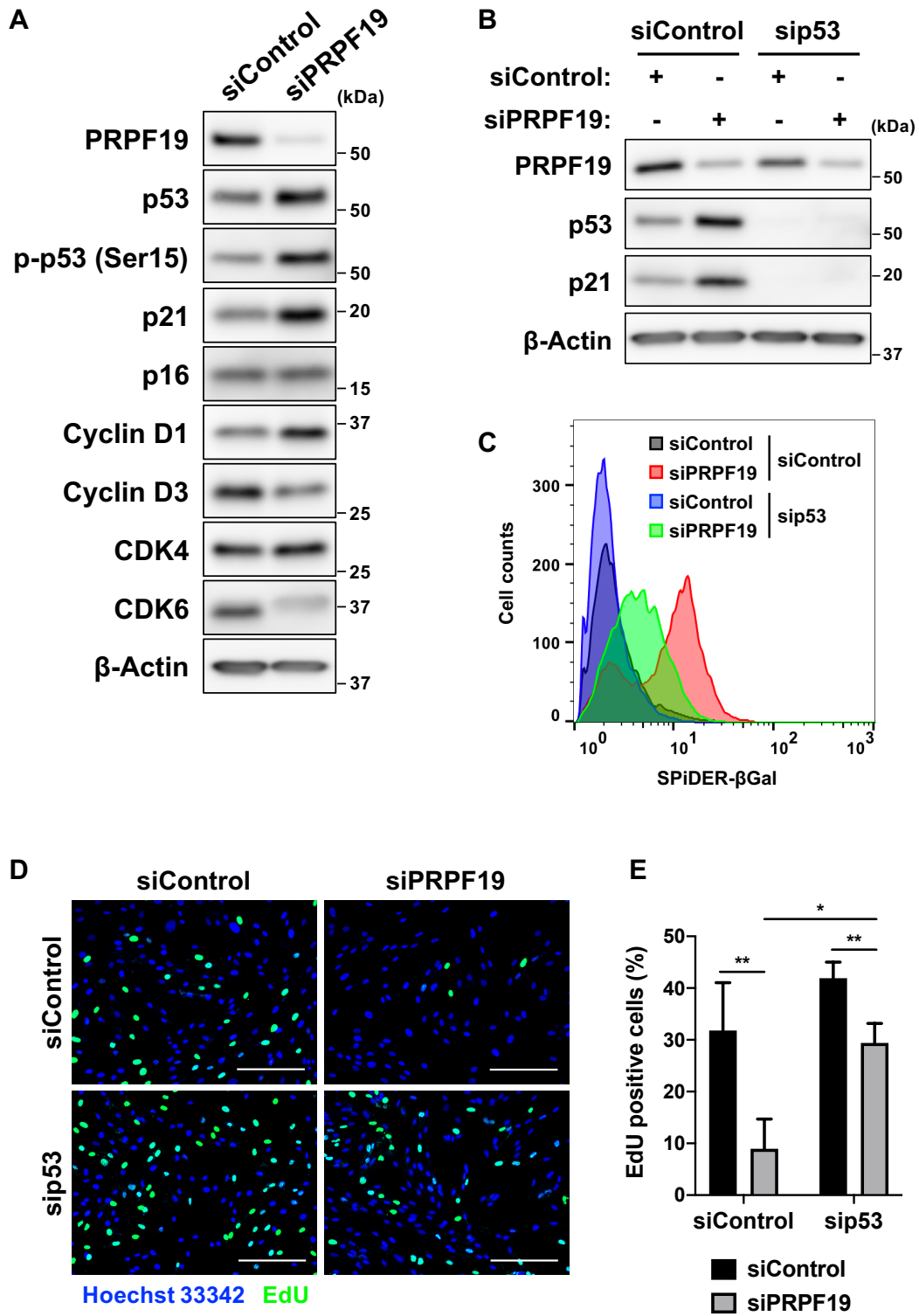


図2. 継代早期細胞に対する PRPF19 のノックダウンは細胞老化を誘導する

- 各 PDL の TIG-3 細胞におけるウェスタンブロット解析。
- TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後のウェスタンブロット解析。
- TIG-3 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) に各 siRNA をトランスフェクションした 2, 4 日後に細胞計数を行なった細胞増殖曲線。
- TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 7 日後の RT-qPCR 解析。GAPDH を内部標準遺伝子として相対発現量を示した。
- TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 7 日後の老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性評価。
- TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 7 日後の DAPI 及び H3K9me3 の免疫蛍光染色。
- F において、細胞老化関連ヘテロクロマチン構造 (DAPI 及び H3K9me3 の蛍光凝集) が観察された細胞の割合を示した棒グラフ。
- MRC-5, IMR-90 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後のウェスタンブロット解析。
- MRC-5, IMR-90 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) に各 siRNA をトランスフェクションした 2, 4 日後に細胞計

数を行なった細胞増殖曲線。

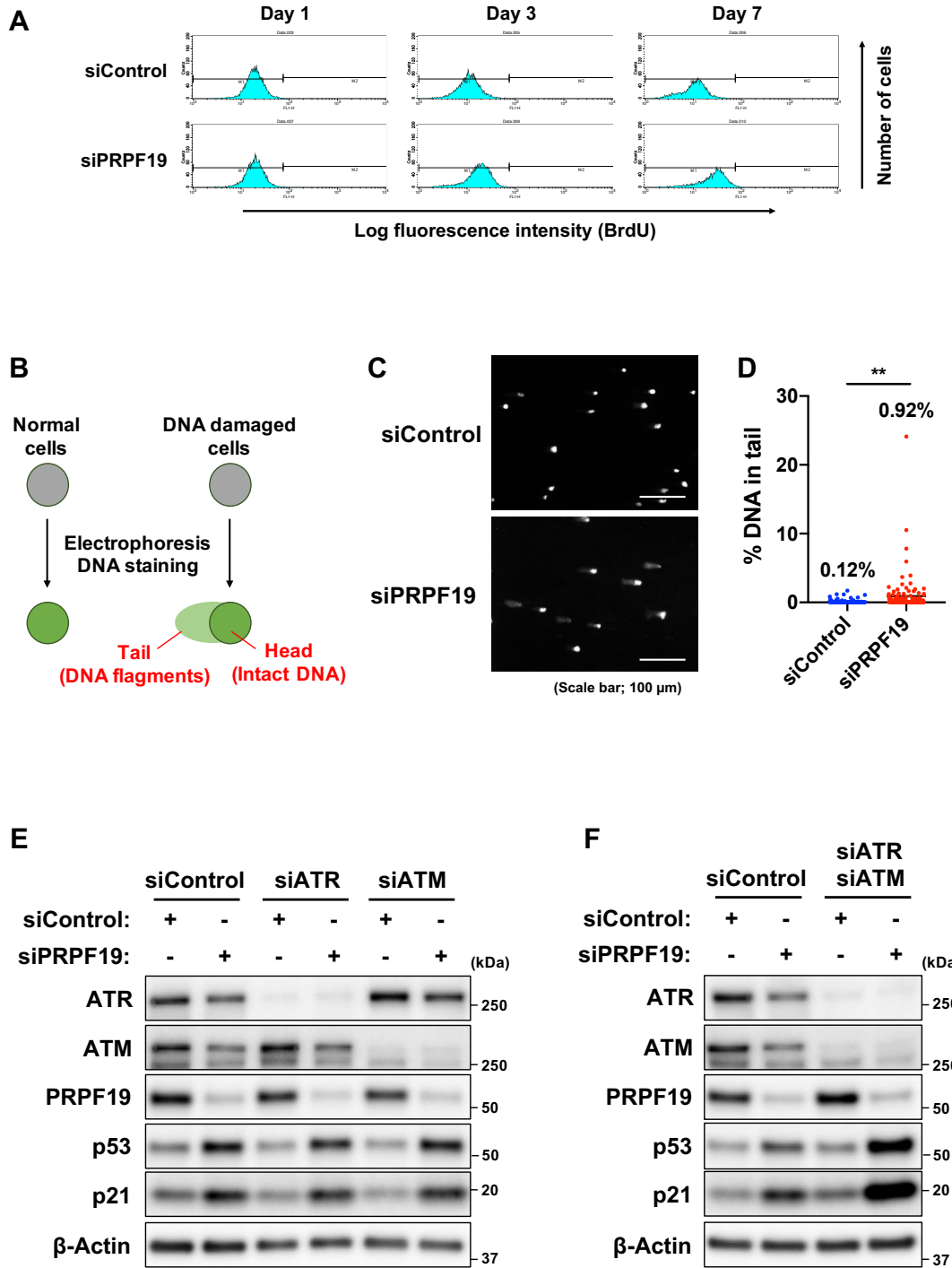
- J. MRC-5, IMR-90 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 7 日後の老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性評価。
- K. TIG-3, MRC-5, IMR-90 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後の RT-qPCR 解析。GAPDH を内部標準遺伝子として相対発現量を示した。



### 図 3. PRPF19 は p53 依存的細胞老化機構に関与する

- A. TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後のウェスタンブロット解析。
- B. TIG-3 細胞に siControl もしくは sip53 をトランスフェクションした 2 日後に、siControl もしくは siPRPF19 をトランスフェクションして、その 2 日後のウェスタンブロット解析。
- C. TIG-3 細胞に siControl もしくは sip53 をトランスフェクションした 2 日後に、siControl もしくは siPRPF19 をトランスフェクションして、その 7 日後の老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性評価。
- D. TIG-3 細胞に siControl もしくは sip53 をトランスフェクションした 2 日後に、siControl もしくは siPRPF19 をトランスフェクションして、その 2 日後の EdU 細胞増殖試験。10  $\mu$ M の EdU を 24 時間添加して免疫蛍光染色を行なった。スケールバーは 200  $\mu$ m。
- E. D において、EdU 陽性細胞の割合を示した棒グラフ。





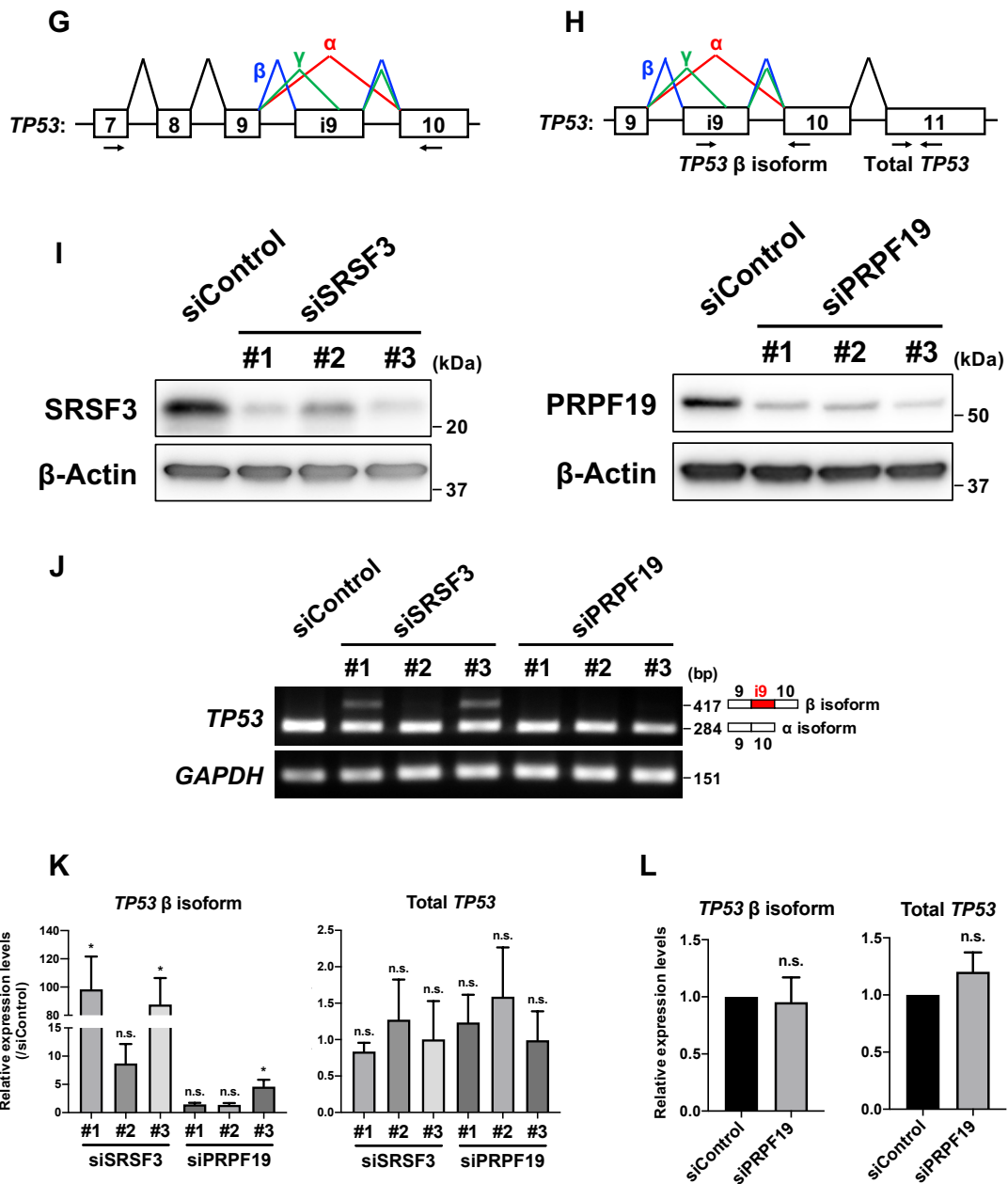
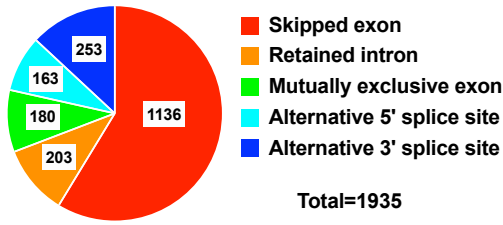


図4. PRPF19のノックダウンはDNA損傷応答非依存的にp53を活性化させる

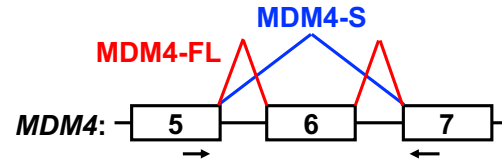
- TIG-3細胞をBrdU含有培地で48時間培養した後、各siRNAをトランスフェクションした1, 3, 7日後のフローサイトメトリー解析。
- コメットアッセイの概略図。
- TIG-3細胞に各siRNAをトランスフェクションした2日後のコメットアッセイ。
- Cにおいて、コメットテール中のDNA割合を示したドットプロット。
- TIG-3細胞に各siRNAを共トランスフェクションした3日後のウェスタンブロット解析。
- TIG-3細胞に各siRNAを共トランスフェクションした3日後のウェスタンブロット解析。
- 3種類のTP53のスプライシングアイソフォームを検出するためのPCRプライマーデザイン。
- Total TP53, TP53  $\beta$  isoformを検出するためのPCRプライマーデザイン。

- I. TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後のウェスタンブロット解析。
- J. TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後の PCR 解析。
- K. TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後の RT-qPCR 解析。GAPDH を内部標準遺伝子として相対発現量を示した。
- L. TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後の RT-qPCR 解析。GAPDH を内部標準遺伝子として相対発現量を示した。

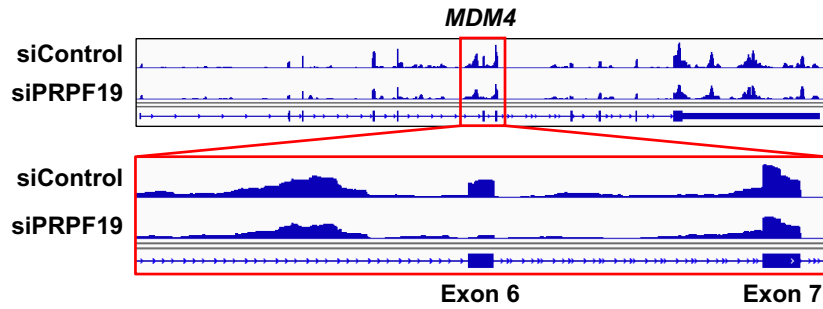
**A** siControl vs siPRPF19  
(FDR<0.05)



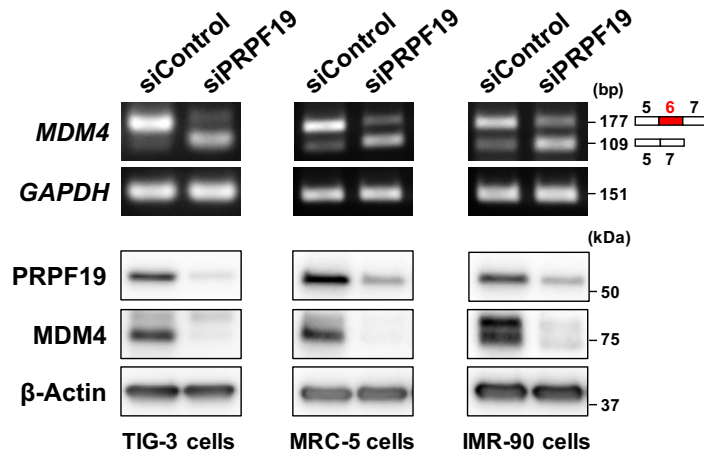
**C**



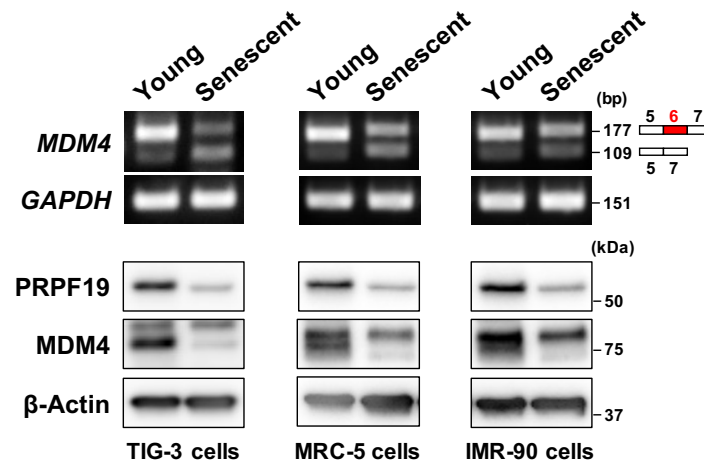
**B**



**D**



**E**



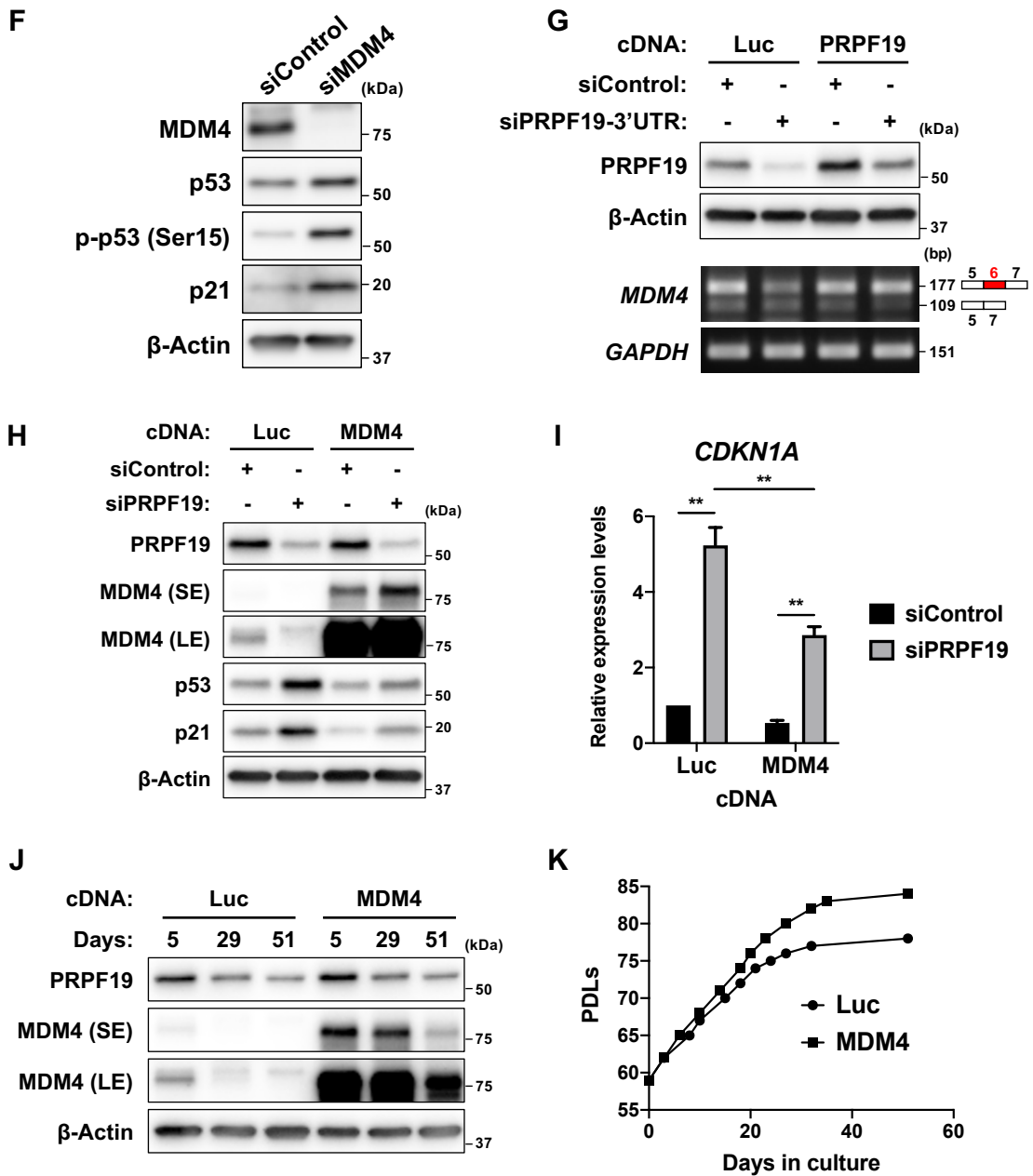
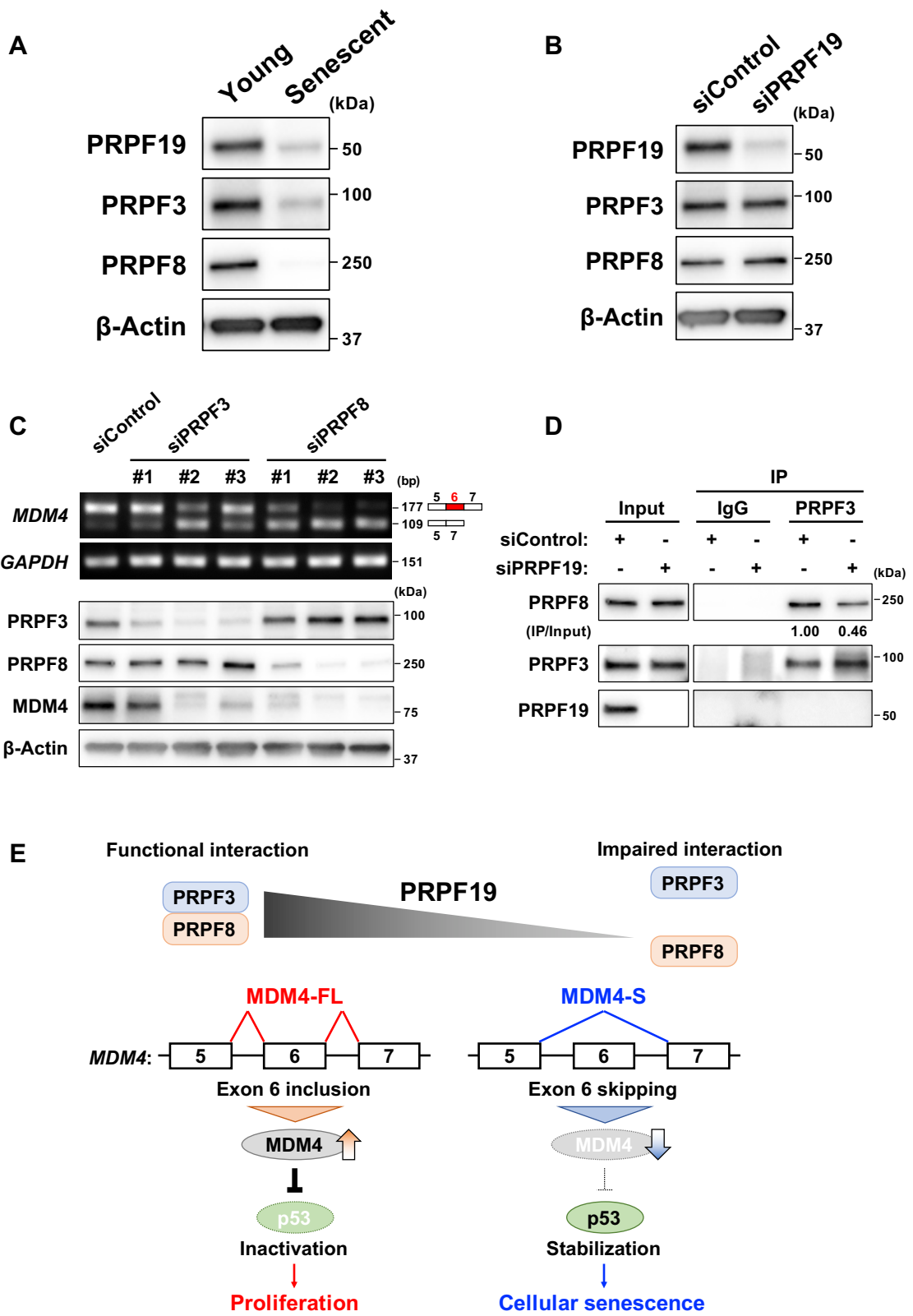


図5. PRPF19はMDM4のエクソン6の選択的スプライシングを制御する

- TIG-3細胞に各siRNAをトランスフェクションした3日後のRNAシーケンス解析において、rMATS解析から得られた5種類の選択的スプライシング変化イベントを示した円グラフ。
- Integrative Genomics Viewerを用いて、RNAシーケンス解析から得られたMDM4のゲノムアノテーションのマッピング。
- MDM4-FL, MDM4-Sを検出するためのPCRプライマーデザイン。
- TIG-3, MRC-5, IMR-90細胞に各siRNAをトランスフェクションした3日後のRT-PCR解析(上データ)及びウェスタンブロット解析(下データ)。
- 継代早期及び老化TIG-3, MRC-5, IMR-90細胞のRT-PCR解析(上データ)及びウェスタンブロット解析(下データ)。
- TIG-3細胞に各siRNAをトランスフェクションした3日後のウェスタンブロット解析。

- G. ルシフェラーゼ（ネガティブコントロール）もしくは siRNA 耐性 PRPF19 を発現する TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後のウェスタンブロット解析（上データ）及び RT-PCR 解析（下データ）。
- H. ルシフェラーゼ（ネガティブコントロール）もしくは MDM4-FL を発現する TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後のウェスタンブロット解析。
- I. ルシフェラーゼ（ネガティブコントロール）もしくは MDM4-FL を発現する TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後の RT-qPCR 解析。GAPDH を内部標準遺伝子として相対発現量を示した。
- J. ルシフェラーゼ（ネガティブコントロール）もしくは MDM4-FL を発現する TIG-3 細胞のウェスタンブロット解析。
- K. ルシフェラーゼ（ネガティブコントロール）もしくは MDM4 を発現する TIG-3 細胞の継代培養プロセス。



**図6. PRPF19はPRPF3-PRPF8相互作用を介してMDM4の選択的スプライシングを制御する**

- A. 継代早期及び老化 TIG-3 細胞のウェスタンブロット解析。
- B. TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後のウェスタンブロット解析。
- C. TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後の RT-PCR 解析（上データ）及びウェスタンブロット解析（下データ）。
- D. TIG-3 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした 3 日後に、各抗体を用いて免疫沈降を行った後のウェスタンブロット解析。
- E. PRPF19 による細胞老化制御機構の概略図。



## 4. 考察

細胞老化は加齢性疾患、胚発生、組織修復などに関与することから、組織恒常性の維持や病気の発症に重要な役割を果たしている<sup>6</sup>。したがって、細胞老化を誘導するシグナル経路や分子メカニズムの解析は、細胞老化の生理的な役割を明らかにする上で極めて重要である。本研究では、正常ヒト胎児肺由来二倍体線維芽細胞を用いて、細胞老化を制御するスプライシング因子として PRPF19 を同定した。PRPF19 は細胞の複製老化に伴って発現低下し、p53 依存的な細胞老化誘導を促進する。PRPF19 をノックダウンした細胞では、p53 抑制因子である MDM4 の選択的スプライシングが全長の MDM4-FL からエクソン 6 をスキッピングした MDM4-S に変化し、そのタンパク質発現量が低下することが観察された。この選択的スプライシング調節は、PRPF19 による U4/U6.U5 tri-snRNP コアスプライソソームの構成因子 PRPF3-PRPF8 の相互作用の安定化によって制御される。これらの結果から、我々は p53 依存的な細胞老化誘導機構において PRPF19 による RNA スプライシング調節が重要な役割を果たすことを明らかにした。

老化細胞では、分子レベル、形態レベルで様々な変化が観察される<sup>5</sup>。これまでに、RNA スプライシングの調節変化が細胞老化や加齢と関与することが明らかになっている<sup>27</sup>。例えば、TP53 の選択的スプライシングアイソフォームである p53β の発現が細胞老化を促進することが報告されている<sup>21</sup>。p53β の発現は、スプライシング因子 SRSF3 や SRSF7 を介して DNA 損傷応答依存的に調節されている。これらの報告と同様に、我々のマイクロアレイ解析においても数種類の SR タンパク質ファミリーが複製老化に伴って発現低下することが観察された。これらの発現低下したスプライシング因子の中でも、PRPF19 は老化細胞で劇的に発現量が低下していることを見出した。PRPF19 は、ATM/ATR や p53β を介した DNA 損傷応答非依存的に細胞老化を制御する。そのため、本研究から得られた結果は、様々な細胞老化誘導刺激に応じて RNA スプライシングは複数の経路を介して細胞老化を制御することが示唆される。これらのスプライシング因子の選択的細胞老化制御機構を明らかにするためには、今後より詳細な解析が必要となる。

p53 抑制因子として知られる MDM4 は、発生における p53 活性を厳密に制御する<sup>28</sup>。また MDM2 とは対照的に、MDM4 は心臓や肺などいくつかの組織ではほとんど検出されない一方で、がん組織では高発現が認められる<sup>29</sup>。がん細胞における p53 の不活性化は、MDM4 の過剰発現と密接に関係しているため、MDM4 阻害による p53 の再活性化はがん細胞の増殖抑制に寄与する<sup>18</sup>。また、MDM4 阻害は p53 変異がん細胞の増殖を抑制することも報告されている<sup>30</sup>。したがって、MDM4 はがん治療の分子標的として期待されている。その一方で、MDM4 の発現を評価する上で、その発現量は mRNA とタンパク質でほとんど相関しないという知見が得られている。興味深いことに、MDM4-FL/MDM4-S 比は MDM4 タンパク質発現量と相関することから、MDM4 の発現を評価する有用な方法として考えられている。メラノーマ細胞では、スプライシング因子 SRSF3 が重要な MDM4 の選択的スプライシング調節因子として報告されている<sup>13</sup>。老化 TIG-3 細胞では SRSF3 はわずかな発現低下であったが、SRSF3 のノックダウンは MDM4 の選択的スプライシング変化を引き起こすことを観察している。これらの知見は、スプライシング因子が MDM4-FL/MDM4-S 比の重要な決定因子であり、細胞種や細胞応答によってその調節は厳密に制御される。PRPF19 の発現量は MDM4 の発現量と強く相関していることから、PRPF19 による MDM4

の発現制御ががん細胞の増殖にも寄与している可能性が示唆される。

RNA スプライシングは5種類のコアスプライソソーム (U1, U2, U4, U5, U6 snRNP) を中心として、転写された mRNA からイントロンの切り出し反応を行う<sup>31</sup>。U1, U2 snRNP は、mRNA 上のスプライスサイトを認識した後、U4/U6.U5 tri-snRNP が結合することによってイントロンの切り出し反応が進行する。U4/U6.U5 tri-snRNP は多くのスプライシング因子によって構成、制御されている。U4 snRNP 構成因子 PRPF3 と U5 snRNP 構成因子 PRPF8 の相互作用は、U4/U6.U5 tri-snRNP の安定化に重要である。過去の報告と同様に<sup>26</sup>、我々も PRPF19 が PRPF3-PRPF8 相互作用を安定化に寄与することを観察した。また、PRPF19 のノックダウンによって PRPF3 と PRPF8 のタンパク質発現量はほとんど変化しない一方で、老化細胞ではこれらのタンパク質発現量は低下することが観察された。過去の報告から、老化細胞では細胞周期や RNA 代謝に関与するタンパク質が細胞老化関連タンパク質分解の標的となることが知られているため<sup>32</sup>、PRPF3 と PRPF8 も細胞老化関連タンパク質分解の標的となりうる可能性が示唆される。細胞老化においてスプライシング因子の発現がどのように制御されるかは、より詳細な解析を進めていく必要がある。

本研究結果から、U4/U6.U5 tri-snRNP の重要な調節因子である PRPF19 は、MDM4 の選択的スプライシングを調節することによって p53 依存的な細胞老化誘導に寄与することが明らかになった。近年、老化細胞除去法が加齢疾患治療や健康寿命の延伸に寄与することが明らかになってきている<sup>33-35</sup>。本研究から得られた知見は、細胞老化の分子基盤における RNA スプライシング機構の役割と新規老化細胞除去標的としてのスプライシング因子の有用性を示唆している。

## 5. 参考文献

- 1 Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* **25**, 585-621, doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6 (1961).
- 2 Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. & Wahl, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**, 2540-2551, doi:10.1101/gad.8.21.2540 (1994).
- 3 Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593-602, doi:10.1016/s0092-8674(00)81902-9 (1997).
- 4 Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-730, doi:10.1038/nature03918 (2005).
- 5 Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* **28**, 436-453, doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001 (2018).
- 6 He, S. & Sharpless, N. E. Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000-1011, doi:10.1016/j.cell.2017.05.015 (2017).
- 7 Kasthuber, E. R. & Lowe, S. W. Putting p53 in Context. *Cell* **170**, 1062-1078, doi:10.1016/j.cell.2017.08.028 (2017).
- 8 Wade, M., Wang, Y. V. & Wahl, G. M. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol* **20**, 299-309, doi:10.1016/j.tcb.2010.01.009 (2010).
- 9 Vassilev, L. T. *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844-848, doi:10.1126/science.1092472 (2004).
- 10 Ling, X. *et al.* FL118 induces p53-dependent senescence in colorectal cancer cells by promoting degradation of MdmX. *Cancer Res* **74**, 7487-7497, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0683 (2014).
- 11 Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**, 25-27, doi:10.1016/s0014-5793(97)01480-4 (1997).
- 12 Linares, L. K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Muller, S. & Scheffner, M. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12009-12014, doi:10.1073/pnas.2030930100 (2003).
- 13 Dewaele, M. *et al.* Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J Clin Invest* **126**, 68-84, doi:10.1172/JCI82534 (2016).
- 14 Danovi, D. *et al.* Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Mol Cell Biol* **24**, 5835-5843, doi:10.1128/MCB.24.13.5835-5843.2004 (2004).
- 15 Laurie, N. A. *et al.* Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* **444**, 61-66, doi:10.1038/nature05194 (2006).
- 16 Gilkes, D. M. *et al.* Regulation of MDMX expression by mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* **28**, 1999-2010, doi:10.1128/MCB.01633-07 (2008).
- 17 Gembarska, A. *et al.* MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med* **18**,

- 1239-1247, doi:10.1038/nm.2863 (2012).
- 18 Marine, J. C. & Jochemsen, A. G. MDMX (MDM4), a Promising Target for p53 Reactivation Therapy and Beyond. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, doi:10.1101/cshperspect.a026237 (2016).
- 19 Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **14**, 501-513, doi:10.1016/s1097-2765(04)00256-4 (2004).
- 20 Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638-642, doi:10.1038/nature05327 (2006).
- 21 Chen, J., Crutchley, J., Zhang, D., Owzar, K. & Kastan, M. B. Identification of a DNA Damage-Induced Alternative Splicing Pathway That Regulates p53 and Cellular Senescence Markers. *Cancer Discov* **7**, 766-781, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0908 (2017).
- 22 Giono, L. E. *et al.* The RNA Response to DNA Damage. *J Mol Biol* **428**, 2636-2651, doi:10.1016/j.jmb.2016.03.004 (2016).
- 23 Harries, L. W. *et al.* Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging Cell* **10**, 868-878, doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00726.x (2011).
- 24 Tang, Y. *et al.* Downregulation of splicing factor SRSF3 induces p53beta, an alternatively spliced isoform of p53 that promotes cellular senescence. *Oncogene* **32**, 2792-2798, doi:10.1038/onc.2012.288 (2013).
- 25 Chanarat, S. & Strasser, K. Splicing and beyond: the many faces of the Prp19 complex. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 2126-2134, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.05.023 (2013).
- 26 Song, E. J. *et al.* The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome. *Genes Dev* **24**, 1434-1447, doi:10.1101/gad.1925010 (2010).
- 27 Deschenes, M. & Chabot, B. The emerging role of alternative splicing in senescence and aging. *Aging Cell* **16**, 918-933, doi:10.1111/accel.12646 (2017).
- 28 Parant, J. *et al.* Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet* **29**, 92-95, doi:10.1038/ng714 (2001).
- 29 De Clercq, S. *et al.* Widespread overexpression of epitope-tagged Mdm4 does not accelerate tumor formation in vivo. *Mol Cell Biol* **30**, 5394-5405, doi:10.1128/MCB.00330-10 (2010).
- 30 Carrillo, A. M., Bouska, A., Arrate, M. P. & Eischen, C. M. Mdmx promotes genomic instability independent of p53 and Mdm2. *Oncogene* **34**, 846-856, doi:10.1038/onc.2014.27 (2015).
- 31 Will, C. L. & Lührmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, doi:10.1101/cshperspect.a003707 (2011).
- 32 Deschênes-Simard, X. *et al.* Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev* **27**, 900-915, doi:10.1101/gad.203984.112 (2013).
- 33 Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*

- 530**, 184-189, doi:10.1038/nature16932 (2016).
- 34 Amor, C. *et al.* Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies. *Nature* **583**, 127-132, doi:10.1038/s41586-020-2403-9 (2020).
- 35 Zhang, P. *et al.* Senolytic therapy alleviates A $\beta$ -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* **22**, 719-728, doi:10.1038/s41593-019-0372-9 (2019).

## 6. 謝辞

本研究の実施及び本論文の作成にあたって、多大なるご指導とご鞭撻をいただきました田原栄俊教授（広島大学大学院医系科学研究科・細胞分子生物学研究室）、高橋陵宇准教授（広島大学大学院医系科学研究科・細胞分子生物学研究室）に心より感謝申し上げます。

本研究の実施にあたって、多大なるご協力とご助言をいただきました塩谷文章先生（国立がん研究センター研究所・細胞情報学分野）、山本雄介先生（国立がん研究センター研究所・細胞情報学分野）に心より感謝申し上げます。

PRPF19 の機能解析において、共に研究に努めてきました阿部純子さん、志戸岡友希さん、須藤優樹さん、管仕成さん、阪上拓樹さんに心より感謝申し上げます。

最後に、私の研究活動を常に支え、応援して下さった家族に心より感謝申し上げます。