

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860219

研究課題名(和文)レーザーアブレーションを利用した細胞創傷治癒機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for cellular wound-healing

## 研究代表者

河野 恵子(Keiko, Kono)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30632723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は増殖の過程で細胞膜に様々な環境ストレスを受け、傷つく。傷の周りにタンパク質が集まり、細胞質分裂とよく似た仕組みで速やかに行われる修復を「細胞創傷治癒」と呼ぶ。このしくみに欠損があるとデュシェンヌ型筋ジストロフィー症を発症するが、詳細な分子機構は解明されていない。本研究では細胞創傷治癒に關与する遺伝子を網羅的に同定し、膜損傷の修復後に細胞膜を構成する脂質の種類が変化して「細胞膜の老化」が起こり、それが細胞老化を誘導する一因となることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cellular wound-healing, enabling the repair of plasma membrane damage, is frequent in nature. Despite its ubiquitous usage, the underlying molecular mechanisms are poorly understood. Here we report a genome-wide screen to identify biological processes required for cellular wound-healing in yeast. 109 out of 6,032 mutations screened exhibited cellular wounding-specific lethality. Based on the screen, we uncovered a previously unappreciated link between cellular wound-healing and replicative aging: senescence determined by the number of cell division. Plasma membrane damage and subsequent damage repair promoted reorganization of phospholipids near the damage site. The plasma membrane reorganization accelerated replicative aging. Thus, we propose that cellular wound-healing mediated PS exposure on the plasma membrane outer leaflet is an evolutionary conserved mechanism promoting cellular senescence in eukaryotes.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞創傷治癒 分裂老化

### 1. 研究開始当初の背景

この世に最初の細胞が生まれた時、そこには遺伝情報をコードする核酸と、それを包み込む膜があったという。そうであれば、膜に与えられた損傷を修復する「細胞創傷治癒」の仕組みは、地球上に生命が誕生したその瞬間から必要とされたであろう。ウニやヒトデ、あるいは哺乳類の培養細胞を用いたこれまでの細胞創傷治癒研究によって、細胞膜が損傷を受けると傷の周りにアクチンや微小管、Rho 型 GTPase などが集まり、細胞質分裂とよく似た仕組みで修復されること (Sonnemann and Bement, *Annu Rev Cell Dev*, 2011)、この機構に欠損があるとデュシェンヌ型筋ジストロフィー症を発症すること (Bashir et al., *Nature*, 1998) などが明らかになっているが、分子機構の全貌を俯瞰するには至っていなかった。その原因の一つは、これまでの細胞創傷治癒研究にウニやヒトデ、あるいはカエルなどの卵母細胞が用いられてきたことであろう。これらの系は細胞生物学的観察に適しているが、未知の現象に關与する遺伝子を網羅的に同定する遺伝学的解析には不向きである。

### 2. 研究の目的

科学史上にいくつも例があるように、ある現象に關与する因子を網羅的に同定するには、酵母は極めて強力なツールとなり得る。細胞周期における Hartwell や Nurse、小胞輸送における Sheckman、そしてオートファジーにおける Ohsumi らの成果をはじめ、その成功は枚挙に暇がない。そこで本研究では、出芽酵母の強力な遺伝学を背景に、ポストゲノム時代のツールを駆使して、細胞創傷治癒に關与する因子の網羅的同定を試みた。

### 3. 研究の方法

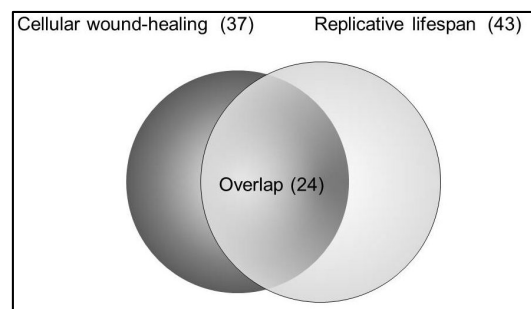
まず、出芽酵母にも他の真核生物と類似した、局所的な損傷を修復する機構が存在

するかどうかを検討するために、細胞表面の微細な領域にレーザーで損傷を与え、ライブセルイメージングでタンパク質の局在変化を観察するレーザーダメージ実験系を確立した。

### 4. 研究成果

レーザーダメージ実験により出芽酵母細胞にも高等真核細胞と同様の細胞創傷治癒機構が存在することを示した。さらに娘細胞への細胞極性と傷への細胞極性は競合しており、娘細胞に局在する極性制御タンパク質がプロテアソームにより分解されることが細胞創傷治癒機構の開始に必要であることを明らかにした。

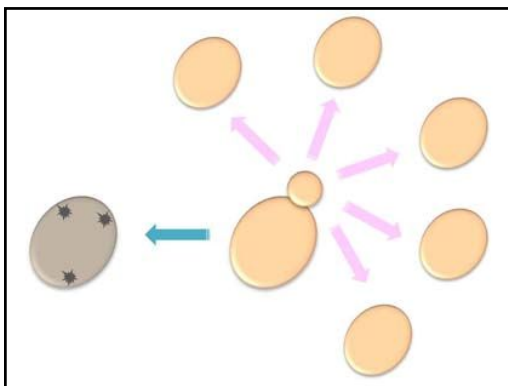
次に、細胞創傷治癒に關与する遺伝子を網羅的に取得する目的で、出芽酵母の必須遺伝子の mRNA 量を低下させた DAMP ライブラリー、非必須遺伝子を破壊した破壊株コレクションを用いて、計 6032 株 (全 ORF 6275 の 96%) についてスクリーニングを行った。その結果、細胞創傷治癒に關与する因子として 109 の遺伝子が同定され、それらは 37 の生物学的プロセスのグループに



分類された。興味深いことに、この 37 の機能グループは、SGD データベース (<http://www.yeastgenome.org/>) 上の「Replicative lifespan (分裂寿命、一つの細胞が分裂できる回数)」の維持に必要な遺伝子群 (119 遺伝子、43 の機能グループ) と、半数以上に当たる 24 の機能グループが重複していた。このことは細胞創傷治癒と細胞老化との間に未知の深い関わりがある

ことを示唆している。

細胞創傷治癒と老化との分裂老化との緊密な関係を説明するには、次のような仮説が考えられる。出芽酵母は「母細胞から娘細胞が出芽する」という分裂様式をとるため、新たな細胞膜の合成は主として娘細胞で行われる。従って、細胞創傷治癒機構に欠損があると、通常の増殖の過程で母細胞が受ける損傷（物理的障害や多様な環境ストレスによる障害）を修復できず、母細胞の死は早まり、結果として一つの母細胞から生じる娘細胞の数も少なくなると予想される（分裂寿命の短縮 = 早期老化の誘導）。



この可能性を検討するために、細胞に損傷を与える条件の下で分裂寿命を測定したところ、コントロールの約 1/3 に短縮しており、細胞膜に損傷を与えると細胞老化が早まることが示唆された。さらに細胞膜損傷は細胞膜構成の変化を誘導することが見出された。次に細胞膜構成の変化が細胞老化を誘導するかどうかを検討する目的で、膜損傷を与えなくても細胞膜構成が変化している細胞を用いて分裂寿命を測定した。その結果、細胞膜構成の変化が分裂老化を導くことが明らかになった。

これらの結果を考え合わせると、細胞老化の原因としてよく知られている Sirtuin、テロメア、Tor、ミトコンドリア、プロテアソームなどの異常に加え、細胞膜損傷とその後の修復も細胞老化の重要な一因である

可能性が示唆された。

< 引用文献等 >

Sonnemann and Bement, Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annu Rev Cell Dev*, 2011, Vol. 27: 237-263.

Bashir et al., A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat. Genet.* 1998, 20, 37-42.

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 河野恵子、細胞創傷治癒 その分子機構と老化との関連、化学と生物、査読有、2015 (in press) DOI 未定

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 河野恵子、細胞創傷治癒におけるユビキチンの役割、日本農芸化学会 2014 年度大会、招待講演、2015 年 3 月 26 日-29 日、岡山大学（岡山）

2. 折井みなみ、河野恵子、温欣宜、中西真 プロテインフォスファターゼ 1 は分裂面におけるフォーミンの入れ替わりと収縮環形成を促進する、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日-27 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

3. 河野恵子、細胞創傷治癒 その分子機構と老化との関連、第 21 回酵母シンポジウム、招待講演、2014 年 9 月 3 日-4 日、東京大学（東京）

4. 折井みなみ、河野恵子、温欣宜、中西真 PP1 依存的なフォーミンの交替は収縮環形成を促進する、酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会、2014 年 9 月 1 日-3 日、東京大学（東京）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河野 恵子 (KONO, Keiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30632723

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし