

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19012

研究課題名(和文)細胞膜損傷による細胞老化誘導の分子基盤解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for plasma membrane damage-dependent cellular senescence

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

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)：出芽酵母とヒト培養細胞で、物理的損傷を受けた細胞膜には突起状構造(傷跡)が多数形成されていることが見出され、遺伝子操作により傷跡を取り除いたところ、出芽酵母細胞の寿命は延長された。つまり、細胞膜に残った傷跡が細胞老化の一因であることが明らかになった。細胞老化が促進された細胞では細胞創傷治癒能が低下していた。以上より、細胞膜の損傷とそれによる脂質構成の変化が、出芽酵母とヒト培養細胞に共通の細胞老化の一因であることが示唆された。さらに、これらのこの解析の過程で、出芽酵母とヒト培養細胞において細胞膜損傷を引き金として細胞周期を一時停止させる「細胞膜損傷チェックポイント」が発見された。

研究成果の概要(英文)：We found that physical damage to the plasma membrane induces the formation of "scars", membrane projections with altered lipid composition, after plasma membrane repair in budding yeast and human cultured cells. Genetic manipulation that removes the scars significantly extended yeast replicative lifespan. These results suggest that the scar itself, or the altered phospholipid composition, seems to be a cause for cellular senescence after plasma membrane damage. During the course of these studies, we unexpectedly discovered a previously unappreciated cell cycle checkpoint that senses plasma membrane damage. The "plasma membrane damage checkpoint" transiently arrests the cell cycle in yeasts and human cultured cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞創傷治癒 細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

この世で最初の細胞が生まれた時、そこには遺伝情報を司る核酸と、それを包み込み環境変化から守る膜が存在したという。そうであれば、細胞創傷治癒機構は生命の誕生の瞬間から必要とされただろう。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、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い。その一因は、細胞創傷治癒に関与する遺伝子の網羅的同定がなされていないことである。そこで研究代表者は出芽酵母を用いて細胞創傷治癒に関与する遺伝子を網羅的に同定した。その結果、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ということを見出している。

## 2. 研究の目的

本研究では出芽酵母細胞とヒト培養細胞を用いて、まず「損傷による細胞膜の老化」という現象を詳細に解析する。次に酵母の遺伝学という強みを活用し細胞膜老化の分子機構を解明する。さらにヒト正常細胞を用いて「損傷 細胞膜の老化 細胞老化の誘導」という一連の現象が進化的に保存されているかを検討するとともに、酵母を用いて明らかにした分子機構がヒトにも存在するかを解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞創傷治癒完了後と老化細胞における細胞膜の比較

損傷を受けた細胞膜が修復されると損傷部位の細胞膜を構成する脂質の種類が変化する。この時の細胞膜およびその周辺の形状を超微細構造まで観察する目的で、FIB-SEM (名古屋大学電子顕微鏡施設)により電子顕微鏡の連続像を自動取得し、三次元立体像を構築して解析する。

また老化細胞を材料として同様の解析を行い、損傷修復後の細胞と比較することで「細胞膜の老化」による変化の詳細を明らかにする。

### (2) 細胞創傷治癒後の細胞膜の強度測定

細胞創傷治癒後の細胞膜を構成する脂質の種類が変化していることから、修復した細胞膜は無傷の細胞膜に比べ強度が低下していることが示唆される。そこで一度損傷を与えた細胞膜の断裂しやすさを検討する。同様に老化細胞の細胞膜強度を検討する。

### (3) 細胞膜損傷部位における脂質構成変化の分子機構解明

様々な遺伝子を欠損した細胞を用いてライブセルイメージング解析を行い、細胞膜構成の変化に必要な遺伝子を同定する。

### (4) ヒトにおける進化的保存性の検討

細胞創傷治癒による細胞老化の誘導の進化的保存性を調べるために、ヒト正常細胞を用いて細胞に損傷を与え、細胞老化誘導の有無を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞創傷治癒完了後と老化細胞における細胞膜の比較

界面活性剤処理により損傷を与えたヒト正常細胞を固定し樹脂包埋した後に FIB-SEM (名古屋大学電子顕微鏡施設)による解析に供した。得られた電子顕微鏡の連続像より三次元立体像を構築したところ、若い細胞の表面は滑らかである一方、細胞膜損傷を与えた細胞表面には多数の突起状あるいは小胞状構造(以下「傷跡」と呼ぶ)が形成されていることが明らかになった。興味深いことに、外部から人為的ストレスを与えることなく、繰り返し分裂させることによるみ老化させた細胞表面にも同様の傷跡が形成されていた。これらの結果は、細胞膜損傷や細胞質分裂が傷跡形成を促進し、そのことが何らかの形で細胞老化を誘導することを示唆している。

### (2) 細胞創傷治癒後の細胞膜の強度測定

細胞膜修復後の細胞を用いて細胞膜強度を測定したところ、低下することが明らかになった。また遺伝子に変異を導入することにより老化を促進させた細胞の細胞膜強度を測定したところ、この場合も低下することが示された。以上より傷跡における細胞膜強度は低下していることが示唆された。

### (3) 細胞膜損傷部位における脂質構成変化の分子機構解明

様々な遺伝子を欠損した出芽酵母を用いてライブセルイメージング解析を行い、細胞膜構成の変化に必要な遺伝子を同定した。この解析の過程で、細胞膜損傷にตอบสนองして G1 期において細胞周期を一時停止させる「細胞膜損傷チェックポイント機構」が世界に先駆けて見出された(Kono et al., PNAS, 2016; Kono and Ikui, BioEssays, 2017)。細胞膜が傷つくと GSK-3 キナーゼの出芽酵母ホモログである Mck1 キナーゼ依存的に Cdc6 タンパク質 (DNA 複製に必須の因子) が分解され、DNA 複製が抑制される (図 1)。さらに S 期の細胞周期エンジンである Clb5/Cdk1 の阻害因子 Sic1 が安定化することで S 期が抑制される。以上の分子機構により、細胞周期

は G1 期で停止する。

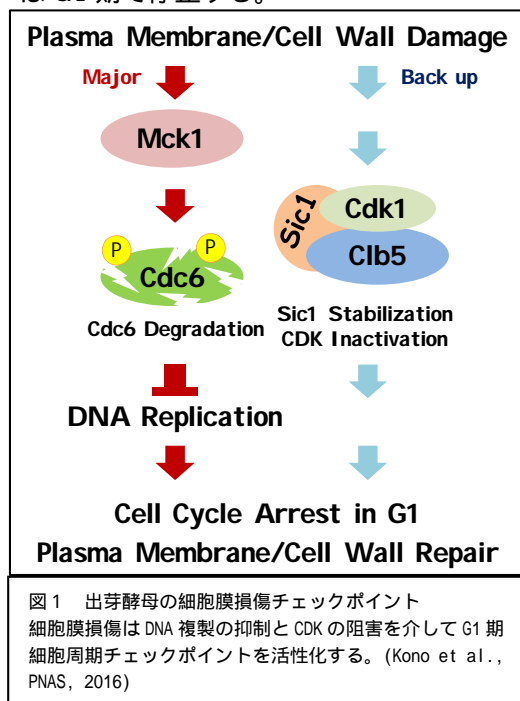


図1 出芽酵母の細胞膜損傷チェックポイント  
細胞膜損傷は DNA 複製の抑制と CDK の阻害を介して G1 期  
細胞周期チェックポイントを活性化する。(Kono et al.,  
PNAS, 2016)

#### (4) ヒトにおける進化的保存性の検討

細胞膜損傷による細胞老化機構及び細胞膜損傷チェックポイント機構のヒト正常細胞における進化的保存性を検討したところ、大枠において保存されていることが明らかになった。詳細な分子機構の解析は今後の課題とした。

#### <引用文献>

Kono K, Al-Zain A, Schroeder L, Nakanishi M, Ikui AE. Plasma membrane/cell wall perturbation activates a novel cell cycle checkpoint during G1 in *S. cerevisiae*. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113(25): 6910-5

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7件)

Hatakeyama R, Kono K and Yoshida S. Ypk1/Ypk2 kinases maintain Rho1 at the plasma membrane by flippase-dependent lipid remodeling after membrane stresses. (2017) J. Cell. Sci. 130: 1169-1178. doi: 10.1242/jcs.198382. 査読あり

Kono K, Al-Zain A, Schroeder L, Nakanishi M, Ikui AE. Plasma membrane/cell wall perturbation activates a novel cell cycle checkpoint during G1 in *S. cerevisiae*. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113(25): 6910-5 doi: 10.1073/pnas.1523824113. 査読あり

Kono K, Okada H, Ohya Y. Local and Acute Disruption of the Yeast Cell Surface. (2016) Cold Spring Harb Protoc. 2016(8): pdb.prot085266. doi: 10.1101/pdb.prot085266. 責任著者、査読あり

Okada H, Kono K, Neiman AM, Ohya Y. Examination and Disruption of the Yeast Cell Wall. (2016) Cold Spring Harb Protoc. 2016(8):pdb.top078659. doi: 10.1101/pdb.top078659. 査読あり

Orii M, Kono K, Wen H-I and Nakanishi M. PP1-dependent Formin Bnr1 dephosphorylation and delocalization from a cell division site. (2016) PLOS ONE. 11(1): e0146941. doi: 10.1371/journal.pone.0146941. 共同責任著者、査読あり

Kono K, Ikui AE. A new cell cycle checkpoint that senses plasma membrane/cell wall damage in budding yeast. (2017) Bioessays. 39(4). doi: 10.1002/bies.201600210. 総説、責任著者、査読あり

河野恵子 細胞創傷治癒 その分子機構と老化との関連 (2015) 化学と生物 15(11):751-755.

doi:10.1271/kagakutoseibutsu.53.751

和文総説、責任著者、査読あり

〔学会発表〕(計 8件)

河野恵子「細胞創傷治癒 その分子機構と老化との関連」(2017年2月24日) 第1回産学連携21世紀酵母フォーラム サントリーグローバルイノベーションセンター(京都府相楽郡)

河野恵子「細胞創傷治癒 その分子機構と老化との関連」(2016年12月22日)生理化学ユニット代6回シンポジウム 京都大学農学部大講義室(京都府京都市左京区)

河野恵子「酵母で明らかにする新しい老化のメカニズム」(2016年11月29日)酵母ルネッサンス2 東京大学先端科学技術研究センター(東京都目黒区)

河野恵子、西村耕太郎、城村由和、森山陽介、佐藤良勝、東山哲也、中西真「細胞創傷治癒 その分子機構と老化との関連」(2016年9月9日)酵母遺伝学フォーラム第49回研究報告会 シーサイドホテル舞子ビル(兵庫県神戸市)

河野恵子「細胞創傷治癒 その分子機構と老化との関連」(2016年4月24日)名市大若手研究者ランチョンセミナー 名古屋市立大学大学院医学研究科(愛知県名古屋市)

河野恵子「細胞創傷治癒 その分子機構と老化との関連」(2016年1月8日)第4回植物イメージングの会 link and mix in ITbM 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所(愛知県名古屋市)

河野恵子「細胞創傷治癒におけるユビキチンの役割」(2015年3月29日)日本農芸化学会2015年度大会シンポジウム 岡山大学(岡山県岡山市)

河野恵子「細胞創傷治癒 その分子機構と老化との関連」(2014年9月3日)酵母合同シンポジウム 東京大学(東京都文京区)

〔その他〕

2016年12月16日読売新聞科学欄「酵母、生物実験の友」

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