

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04045

研究課題名(和文)細胞膜損傷を引き金とする細胞運命決定の分子基盤解明

研究課題名(英文)Mechanisms and consequences of plasma membrane damage

研究代表者

河野 恵子 (Kono, Keiko)

沖縄科学技術大学院大学・膜生物学ユニット・准教授

研究者番号：30632723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：この世で最初の細胞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により成立した。従って細胞膜の傷を修復する「細胞創傷治癒」の仕組みは生命誕生からほどなくして獲得されたと考えられる。細胞膜損傷は様々な疾患に関与するが、分子機構の全貌は不明であった。本研究により軽微な細胞膜損傷はDNA複製マシナリーの分解を誘導し、細胞周期停止タンパク質群の安定化に寄与する一方で、重篤な細胞膜損傷は細胞老化やアポトーシスに寄与すること、さらにながん細胞と正常細胞とで膜損傷による細胞運命決定に違いがあることなどが解明された。本研究成果は将来的に新たながん治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全ての細胞は膜で囲まれているので、細胞膜の傷を修復する「細胞創傷治癒」は極めて重要です。細胞膜損傷が出来なくなると筋ジストロフィー症など様々な病気になりますが、細胞膜の傷を治す仕組みはまだわからない部分が多く、そのため治療法が見つからない病気がたくさん残っています。本研究により細胞膜を治す過程で細胞が分裂を止める仕組みの詳細が解明されたほか、がん細胞と正常な細胞とで細胞膜が傷ついた時の応答に違いがあることも分かりました。本研究成果をさらに発展させていけば将来的に新たながん治療法の開発につながる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：The first cell on earth was composed of genetic materials surrounded by membrane. Therefore, plasma membrane repair is fundamental to life. Although plasma membrane repair is involved in a variety of diseases, underlying mechanisms remained unclear. We found that plasma membrane damage induces activation of the cell cycle checkpoint via the degradation of DNA replication machinery as well as stabilization of cell cycle inhibitors. Severe plasma membrane damage contributes to cellular senescence and apoptosis. Normal cells and cancer cells behaved differently after plasma membrane damage. These results may contribute to the development of new cancer therapies in the future.

研究分野：基礎医学

キーワード：老化 がん 細胞膜修復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

この世で最初の細胞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により成立した。従って細胞膜の傷を修復する「細胞創傷治癒」の仕組みは、生命の根幹を担っている。細胞膜は、物理的障害だけでなく、筋肉の収縮など生理的な活動によっても傷つく。そのような傷は、数秒から数分のうちに修復される。これまでに、細胞膜の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様式で修復されること(図1) この仕組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ことなどが明らかになっているが、細胞創傷治癒機構の全貌は未だ解明されていない。

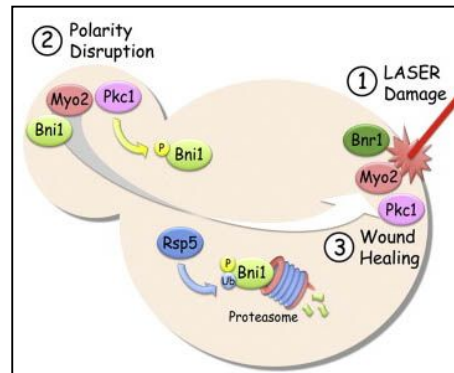


図1 出芽酵母の細胞創傷治癒
出芽酵母の細胞創傷治癒開始にはプロテアソームによる細胞極性制御タンパク質の分解が必要である。(Kono et al., Cell, 2012)

2. 研究の目的

細胞膜の損傷を修復する細胞創傷治癒機構は筋ジストロフィー症など様々な疾病に関与するが、メカニズムや生体内における機能の理解は遅れている。申請者はこれまでに発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結果、細胞膜損傷が出芽酵母において細胞周期チェックポイント機構をオンにすることなどを全ての生物に先駆けて明らかにしている。そこで本研究では、出芽酵母とヒト培養細胞を用いて細胞膜修復機構を追及するとともに損傷後の細胞運命を決定する分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

細胞創傷治癒分野ではヒト培養細胞やカエルの卵母細胞などがモデルとして使用されてきたが、これらのシステムでは遺伝学的解析が困難であるため、細胞創傷治癒機構の全体像は不明であった。一方、酵母は医学・生物学の歴史の中で「未知の現象に関与する遺伝子を網羅的に同定する」という局面で強力なツールとして用いられてきた。本研究では酵母の遺伝学を活用してヒトまで進化的に保存された細胞創傷治癒機構を解明することを目指す。具体的には出芽酵母を用いたスクリーニングで同定された細胞創傷治癒関連因子の解析を行うほか、それらの因子のヒトホモログについてヒト培養細胞(正常細胞、がん細胞)を用いて解析する。細胞膜損傷を導入する手法にはレーザーや複数の薬剤処理を用いる。

4. 研究成果

(1) 細胞膜損傷を起点とする細胞周期チェックポイントの発見

各種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する過程で、細胞膜損傷に反応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2)。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。これらの機構がヒト培養細胞において進化的に保存されているかを検討したところ、CDK阻害因子の安定化やDNA複製タンパク質の分解などについて進化的に保存されていることが明らかになった。さらなる解

析により G2/M 期や M 期で細胞周期を停止するチェックポイントの存在も示唆され、それぞれのプロセスにおいて鍵を握る因子の候補が同定された。

(2) 細胞膜損傷を起点とする細胞老化機構

上記のようにヒト培養細胞においても出芽酵母と同様に細胞膜損傷を起点として細胞周期を一時停止させる仕組みが存在することが明らかになったので、さらに重篤な細胞膜損傷により細胞老化（恒久的細胞周期停止）が誘導されるかどうかを検討した。その結果、重篤な細胞膜損傷は恒久的細胞周期停止や細胞死を誘導することが明らかになり、さらにこの機構に対するがん抑制遺伝子群の関与が示唆された。DNA 損傷を起点とする細胞周期

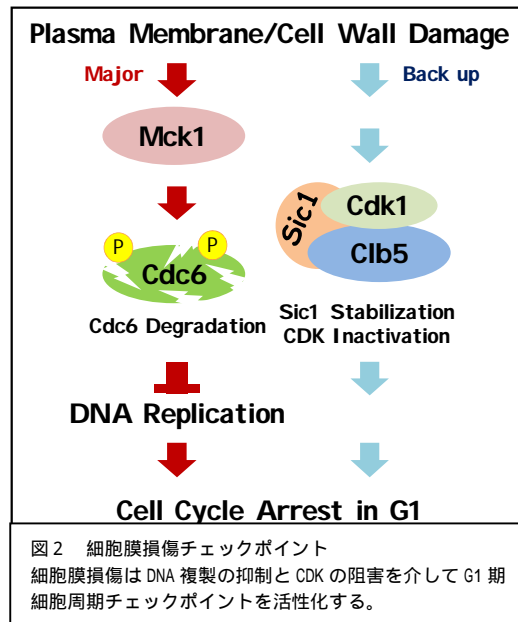
停止については極めて多くの報告があるが、細胞膜損傷を起点とする細胞周期停止には DNA 損傷修復経路は関与しておらず、未解明の分子機構の存在が示唆された。

(3) 細胞膜損傷を起点とする細胞応答の正常細胞とがん細胞における差異

細胞膜損傷を起点とする細胞周期停止にがん抑制遺伝子群の関与が示唆されたため、正常細胞とがん細胞とで細胞膜損傷を起点とする応答に差異がある可能性を検討した。その結果、正常細胞においては細胞膜損傷を起点として細胞周期チェックポイント活性化、細胞老化、細胞死という三つの細胞運命が誘導されたのに対し、あるタイプのがん細胞では細胞老化は誘導されず、細胞膜損傷を起点として細胞周期チェックポイントの活性化か細胞死が誘導された。興味深いことのがん細胞では細胞膜損傷耐性が上昇しており、正常細胞であれば細胞老化する程度の細胞膜損傷条件でも増殖を続けるが、あるポイントを超えると突然アポトーシス様の細胞死が誘導された。これらの運命決定に寄与する因子の候補がいくつか同定されているが、分子機構の全貌解明は今後の課題である。

(4) 細胞膜損傷を起点とする細胞応答の生体内における意義

生体内における細胞膜損傷修復の意義を解明する目的で、マウス個体を用いて細胞膜損傷の痕跡を探索した。具体的には、細胞膜損傷を起点として細胞老化が誘導された場合の分子シグニチャーを示す細胞がマウス個体中に存在するかを検討した。特に生理的条件において細胞膜損傷が頻繁に導入されると考えられる組織を中心に解析した結果、マウス個体においても細胞膜損傷の痕跡を持つ細胞群が見出された。分子基盤や生理的意義の解明にはさらなる解析が必要となるが、このことは細胞膜損傷を起点とする細胞運命変化が生体内において実際に起きている可能性を示唆しており、極めて興味深い知見である。今後はさらに解析を深め、将来的には細胞膜損傷に関連する疾患やがんなどの新規治療法確立に繋がる知見を見出すことを目指したい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 1.Nishimura K, Johmura Y, Deguchi K, Jiang Z, Uchida KSK, Suzuki N, Shimada M, Chiba Y, Hirota T, Yoshimura SH, Kono K, and Nakanishi M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cdk1-mediated DIAPH1 phosphorylation maintains metaphase cortical tension and inactivates the spindle assembly checkpoint at anaphase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41467-019-08957-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kono Keiko, Ikui Amy E.	4. 巻 39
2. 論文標題 A new cell cycle checkpoint that senses plasma membrane/cell wall damage in budding yeast	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 1600210 ~ 1600210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bies.201600210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kono K
2. 発表標題 Cdk1-mediated DIAPH1 phosphorylation maintains metaphase cortical tension and inactivates the spindle assembly checkpoint at anaphase
3. 学会等名 The 16th International Membrane Research Forum, OIST, Okinawa（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kono K
2. 発表標題 Mechanisms and consequences of plasma membrane repair
3. 学会等名 ABiS-GBI-OIST-ResonanceBio Joint Symposium 'Frontiers in Bioimaging', OIST, Onna-son, Okinawa.（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kono K
2. 発表標題 Mechanisms and consequences of cellular wound healing
3. 学会等名 The 1st OIST-OU Joint Symposium on Cell Biology and Immunology, Osaka U, Osaka (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野 恵子
2. 発表標題 創傷治癒の分子機構とその帰結 細胞から組織まで
3. 学会等名 第48回日本創傷治癒学会 イイノホール 東京 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野 恵子、森山 陽介
2. 発表標題 細胞表層の傷による 出芽酵母の運命決定
3. 学会等名 第70回日本生物工学会 関西大学 大阪 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野 恵子
2. 発表標題 酵母で明らかにする傷の治し方
3. 学会等名 第22回酵母合同シンポジウム 九州大学 福岡 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masukagami Y, Moriyama Y, Barbee H, and Kono K
2. 発表標題 The plasma membrane ultrastructure of aged cells
3. 学会等名 The 1st OIST-OU Joint Symposium on Cell Biology and Immunology, Osaka U, Osaka
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masukagami Y, Moriyama Y, Barbee H, Matsui Y and Kono K
2. 発表標題 The plasma membrane ultrastructure of aged cells
3. 学会等名 The 16th International Membrane Research Forum, OIST, Okinawa (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moriyama Y, Masukagami Y, Barbee H, Matsui Y and Kono K
2. 発表標題 The plasma membrane ultrastructure after cellular wound healing
3. 学会等名 The 16th International Membrane Research Forum, OIST, Okinawa (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Kono
2. 発表標題 Plasma membrane damage limits replicative lifespan
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Kono Unit Web Site
<https://groups.oist.jp/memu>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----