

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17993

研究課題名(和文) タンパク質合成による細胞老化制御機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism of cellular senescence by protein synthesis and its application

研究代表者

高氏 裕貴 (TAKAUJI, YUKI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・客員研究員

研究者番号：30784144

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)：細胞老化は様々なストレスにより誘導されるが、その増殖停止の機構に関しては解明されていない点が多い。本研究では、細胞老化が過剰なタンパク質の蓄積・凝集によって引き起こされることを検証した。老化細胞において凝集タンパク質が蓄積していることを見出し、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドによって凝集性タンパク質の蓄積を抑制できることを見出した。また、過剰なたんぱく質の蓄積・凝集を抑制する機能性物質のスクリーニングを行い、有望な候補を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化は個体老化やがん化などに深くかかわっていることがわかってきている。また、タンパク質の凝集は様々な疾患の発症に関わっている。本研究では、老化細胞に過剰なタンパク質の蓄積・凝集が見られることを発見した。また、過剰なタンパク質の蓄積・凝集を抑制する機能性物質を発見することもできた。今後、凝集タンパク質による細胞老化誘導機構の解明やタンパク質凝集を抑制する機能性物質の解析によって老化や様々な疾患の予防や治療へとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although cellular senescence is induced by various stresses, the mechanism of highly stable cell cycle arrest is still incompletely understood. In this study, we have examined whether cellular senescence is caused by excessive proteins accumulation and aggregation. We found that accumulation of aggregated proteins in senescent cells, and Cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, can suppress the accumulation of aggregated proteins. We also screened for bioactive compounds that show a inhibitory effect on accumulation of aggregated proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞老化 タンパク質合成 老化 タンパク質凝集 凝集タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞老化は細胞がストレスに曝された際に起こる細胞応答の一つであり、細胞が肥大化・扁平化し、不可逆的に増殖を停止する現象である。また、重要なことに、細胞老化は個体老化やがん化などに深く関わっていることが明らかになってきている。

今までに、多くの細胞種から様々な手段によって細胞老化が誘導されてきたが、すべての老化細胞で DNA 複製の遅滞と細胞肥大は共通して観察される。我々は、これらの現象は古くから知られる不均衡増殖(Unbalanced growth)とよばれる現象に酷似していることに気が付いた。不均衡増殖とは「細胞の DNA 複製が阻害されると、DNA 量に変化はないが、RNA 量とタンパク質量などが数倍に増加し、細胞が肥大化する」現象で、今から 50 年も前に既に報告されている現象である。

この背景をもとに、我々は老化細胞を再度詳細に検証したところ、老化細胞においてタンパク質の過剰な蓄積が起こっており、高分子間の不均衡が生じていることを見出した。さらに、我々はタンパク質合成阻害剤を用いて細胞質での全タンパク質の部分的な合成制限を行うと、細胞の肥大化を抑えられ、細胞老化が抑制されることを明らかにした。これらの結果から、タンパク質の過剰な合成・蓄積が細胞を不可逆的な増殖停止へと誘導することが明らかになった。さらに、興味深いことに、タンパク質の合成制限は線虫などの個体の老化においても寿命延長の効果を示した。

2. 研究の目的

本研究では、過剰なタンパク質の合成・蓄積が、細胞老化、つまり、細胞の「不可逆的」な増殖停止を誘導する機構を解明する。細胞老化は個体老化や様々な疾患の発症に深く関わっていることがわかってきていることから、細胞老化を調節できれば、加齢性疾患の予防を含め、人々の健康長寿に広く貢献することが期待される。

3. 研究の方法

本研究は以下の 2 点を主要な課題として研究を行った。

過剰なタンパク質の合成・蓄積による細胞老化誘導機構の解明

タンパク質の過剰な合成・蓄積が細胞老化を誘導することから、タンパク質の凝集が細胞老化を誘導する可能性を検討するため、タンパク質の凝集が老化細胞で生じていることを調べた。DNA 合成阻害剤によって老化誘導した細胞と継代老化した細胞のタンパク質を抽出し、界面活性剤に不溶性の画分を回収し、SDS-PAGE を行った。また、ProteoStat®を用いて、細胞を染色し、凝集タンパク質を観察した。

また、より自然なタンパク質合成調節法として培地中アミノ酸量の増減による細胞老化へ及ぼす影響を調べた。

線虫を用いた異常タンパク質の蓄積・凝集を抑制する機能性物質の探索

異常タンパク質の蓄積・凝集を抑制する機能性物質は多くの疾患の予防・治療につながるため、その発見が待たれている。本研究では、モデル生物の線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて、インド亜大陸の植物資源の中から異常タンパク質の蓄積・凝集を抑制する植物を探索した。線虫の中でも高温下ではタンパク質ホメオスタシスの異常により麻痺を引き起こすと考えられている温度感受性突然変異体株の HE250 株を用いて、スクリーニングを行った。また発見した有用植物に関して、高温下ではアミロイド ペプチドが産生されて蓄積すると麻痺し動けなくなる CL4176 株や 44 反復ポリグルタミン-YFP 融合タンパクを発現する OG412 株を用いて、凝集性たんぱく質を抑制する効果があるか検証した。

4. 研究成果

過剰なタンパク質の合成・蓄積による細胞老化誘導機構の解明

HeLa 細胞に DNA 合成阻害剤である 5-ブロモデオキシウリジン(BrdU)とカンプトテシン(CPT)を処理することで細胞老化を誘導し、誘導老化細胞のタンパク質を回収した。界面活性剤可溶性画分と不溶性画分を回収し、SDS-PAGE を行った。その結果、無処理の HeLa 細胞と比較して、老化誘導した HeLa 細胞では界面活性剤不溶性タンパク質が顕著に増加した。また興味深いことに、BrdU 処理と CPT 処理で観察された不溶性画分は同一のバンドパターンを示した。また、ProteoStat®を用いて凝集タンパク質を観察すると、老化誘導によって凝集タンパク質の顕著な増加が観察された。

次に、継代老化細胞の不溶性画分を回収し、SDS-PAGE を行った。その結果、若い細胞と比較して、継代老化細胞では界面活性剤不溶性タンパク質が顕著に増加した。

さらに、タンパク質合成制限によって凝集タンパク質が変化するか検証した。その結果、誘導老化細胞にタンパク質合成阻害剤を処理すると顕著に凝集タンパク質を減少させた。

また、培地中アミノ酸量の増減が細胞老化の及ぼす影響を検証した。その結果、必須アミノ酸や非必須アミノ酸を培地に加えると、タンパク質合成量の増加傾向がみられ、老化特異的 -ガラクトシダーゼ陽性細胞数の増加、DNA 損傷マーカーの増加、活性酸素量の増加などが観察され、老化誘導が促進した。また、イーグル MEM 培地の必須アミノ酸量よりも必須アミノ酸を減らした培地で老化誘導を行うと、細胞老化が抑制された。

これらのことから、老化細胞では凝集タンパク質が蓄積し、それが老化を誘導する一因である

可能性が示された。今後、どのようなタンパク質が凝集しているのかを解析するとともに、タンパク質の凝集が不可逆的な増殖停止の原因なのかを解析していく予定である。

線虫を用いた異常タンパク質の蓄積・凝集を抑制する機能性物質の探索

過剰なたんぱく質の蓄積・凝集を抑制する機能性物質を発見できれば、様々な疾患の予防・治療や老化の抑制が期待できる。我々の研究室ではインド亜大陸の伝統医学で使用される有用ハーブを数百種類保有しており、その中から過剰なたんぱく質の蓄積・凝集を抑制するハーブを探索した。温度感受性突然変異体株の HE250 株を用いてスクリーニングを行った結果、数種類のハーブを発見した。それらのハーブについて、アミロイド やポリグルタミンといった凝集性タンパク質の抑制効果について検証した。その結果、アミロイド による線虫の麻痺が抑制され、ポリグルタミンの凝集も抑制されていることを見出した。現在、発見したハーブの有効成分の同定やヒト細胞を用いた解析などを行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 En Atsuki, Takauji Yuki, Miki Kensuke, Ayusawa Dai, Fujii Michihiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Lamin B receptor plays a key role in cellular senescence induced by inhibition of the proteasome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 237 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12775	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 En Atsuki, Takauji Yuki, Ayusawa Dai, Fujii Michihiko	4. 巻 390
2. 論文標題 The role of lamin B receptor in the regulation of senescence-associated secretory phenotype (SASP)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111927 ~ 111927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.111927	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 -
1. 著者名 Yamada Natsuki, Miki Kensuke, Yamaguchi Yoko, Takauji Yuki, Yamakami Yoshimi, Hossain Mohammad Nazir, Ayusawa Dai, Fujii Michihiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Extract of <i>Plumbago zeylanica</i> enhances the growth of hair follicle dermal papilla cells with down regulation of 5 reductase type II	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cosmetic Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jocd.13355	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 -
1. 著者名 Arai R, En A, Takauji Y, Maki K, Miki K, Fujii M, Ayusawa D.	4. 巻 178
2. 論文標題 Lamin B receptor (LBR) is involved in the induction of cellular senescence in human cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mechanisms of ageing and development	6. 最初と最後の頁 25-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mad.2019.01.001.	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 -

1. 著者名 Yamakami Y, Morino K, Takauji Y, Kasukabe R, Miki K, Hossain MN, Ayusawa D, Fujii M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Extract of <i>Embllica officinalis</i> enhances the growth of human keratinocytes in culture.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of integrative medicine	6. 最初と最後の頁 141-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joim.2019.01.004.	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 -

1. 著者名 Takauji Yuki, Kudo Ikuru, En Atsuki, Matsuo Ryo, Hossain Mohammad Nazir, Nakabayashi Kazuhiko, Miki Kensuke, Fujii Michihiko, Ayusawa Dai	4. 巻 95
2. 論文標題 GNG11 (G-protein subunit 11) suppresses cell growth with induction of reactive oxygen species and abnormal nuclear morphology in human SUSM-1 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 517 ~ 523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/bcb-2016-0248	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 -

1. 著者名 高氏裕貴、三木健輔、Mohammad N Hossain、山内正剛、鮎沢大、藤井道彦	4. 巻 48
2. 論文標題 アーユルヴェーダハーブの放射線防御効果	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アーユルヴェーダ研究	6. 最初と最後の頁 32 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 夏井真衣子, 西本暢亮, 高氏裕貴, 山上義巳, HOSSAIN MN, 三木健輔, 鮎沢大, 藤井道彦
2. 発表標題 線虫Caenorhabditis elegansを用いたタンパク質凝集を抑制するアーユルヴェーダハーブの探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井紗恵莉, 高氏裕貴, 藤井道彦
2. 発表標題 細胞老化におけるタンパク質蓄積の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊一皓, 圓敦貴, 堤杏子, 高氏裕貴, 藤井道彦
2. 発表標題 出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における5 - プロモデオキシウリジンの作用機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊一皓, 圓敦貴, 堤杏子, 高氏裕貴, 藤井道彦
2. 発表標題 5 プロモデオキシウリジンによる細胞老化誘導機構の解明
3. 学会等名 第41回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鮎沢大, 山上義巳, 高氏裕貴, 三木健輔, Mohammad N Hossain, 藤井道彦
2. 発表標題 アマラキの細胞増殖促進因子の同定
3. 学会等名 第40回日本アーユルヴェーダ学会金沢研究総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木健輔、高氏裕貴、Mohammad N Hossain、美馬博史、藤井道彦、鮎沢大
2. 発表標題 自然妊娠力を高めるアーユルヴェーダ処方検討
3. 学会等名 第40回日本アーユルヴェーダ学会金沢研究総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高氏裕貴、西本暢堯、夏井真衣子、三木健輔、Mohammad N Hossain、鮎沢大、藤井道彦
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> を用いた老化防止効果を有するアーユルヴェーダハーブの探索
3. 学会等名 第40回日本アーユルヴェーダ学会金沢研究総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 圓敦貴、高氏裕貴、藤井道彦
2. 発表標題 プロテアソーム阻害剤を用いた細胞老化誘導機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高梨朱央、齋藤優樹、高氏裕貴、三木健輔、鮎沢大、藤井道彦
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> の活性酸素感受性変異体の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹本健太郎、圓敦貴、高氏裕貴、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 ヒトSUSM-1細胞株における細胞不死化機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田なつき、高氏裕貴、三木健輔、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 ヒト細胞の増殖を調節するアーユルヴェーダハーブの探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞木啓佑、新井留実、圓敦貴、高氏裕貴、三木健輔、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 Lamin B receptor (LBR)の細胞老化における役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井紗恵莉、高氏裕貴、藤井道彦
2. 発表標題 細胞老化におけるタンパク質恒常性異常の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 夏井真衣子、西本暢亮、高氏裕貴、山上義巳、ホサイン モハマド、三木健輔、鮎沢大、藤井道彦
2. 発表標題 線虫C. elegansを用いたタンパク質凝集を抑制するアーユルヴェーダハーブの探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高氏裕貴、三木健輔、Mohammad N Hossain、山内正剛、鮎沢大、藤井道彦
2. 発表標題 アーユルヴェーダハーブの放射線防御効果
3. 学会等名 共同国際会議2017(第39回日本アーユルヴェーダ学会研究総会) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三木健輔、高氏裕貴、Mohammad N Hossain、藤井道彦、鮎沢大
2. 発表標題 育毛効果を有するアーユルヴェーダ植物の探索
3. 学会等名 共同国際会議2017(第39回日本アーユルヴェーダ学会研究総会) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高氏裕貴、山田なつき、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 培地中アミノ酸量は細胞老化の誘導に影響を与える
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高氏裕貴、山田なつき、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 培地中アミノ酸量は細胞老化の誘導に影響を与える
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田なつき、高氏裕貴、三木健輔、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 がん細胞に高い増殖阻害活性を示すアーコルヴェーダハーブの探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高梨朱央、齋藤優樹、高氏裕貴、三木健輔、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> の活性酸素感受性変異株の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堤杏子、圓敦貴、高氏裕貴、三木健輔、鮎澤大、藤井道彦
2. 発表標題 出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> を用いた5-プロモデオキシウリジン作用機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学長寿科学研究室
<http://antiage.sci.yokohama-cu.ac.jp/>
横浜市立大学長寿科学研究室ホームページ
<http://antiage.sci.yokohama-cu.ac.jp/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----