

機関番号：82612

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590387

研究課題名 (和文) セントロメアタンパク質は細胞の老化を制御する新たな因子となりうるか？

研究課題名 (英文) Do centromere proteins play a crucial role in regulating commitment to the senescent state?

研究代表者

前原 佳代子 (MAEHARA KAYOKO)

独立行政法人 国立成育医療研究センター ・ 周産期病態研究部 ・ 室長

研究者番号：80421311

研究成果の概要 (和文)：セントロメアのタンパク質は、細胞が増殖するときに、染色体を均等分配するという重要な役割を担っている。分裂寿命を持つヒト正常細胞を用いて、キネトコア構造の形成と機能に必須のセントロメアのタンパク質である CENP-A の低下が p53 依存性に老化を導くこと、老化した細胞では、CENP-A の低下とそれに伴うセントロメアのヘテロクロマチン構造の促進 (セントロメアの不活性化) が生じることを明らかにした。本研究の成果は、染色体の機能ドメインであるキネトコアが、テロメア同様に老化を制御する要因となりうることを示している。

研究成果の概要 (英文)：Cellular senescence is an irreversible growth arrest and is presumed to be a natural barrier to tumor development. Like telomere shortening, certain defects in chromosome integrity can trigger senescence. Kinetochores are multi-protein complexes formed on a specialized region of each chromosome, designated the centromere. Kinetochores are essential for the faithful segregation of chromosomes during mitosis and meiosis. I have demonstrated that primary cells appear to induce cellular senescence in response to fatal kinetochores dysfunction in circumstances under which some of key centromere proteins and/or the spindle assembly checkpoint (SAC) proteins are not functioning properly. These observations suggest that, like telomeres, kinetochores may also play a crucial role in regulating commitment to the senescent state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：細胞老化、染色体、セントロメア、CENP-A、CENP-B、ヘテロクロマチン

1. 研究開始当初の背景

1960 年代にヒトの組織から細胞を取り出し培養をすると、細胞は一定の回数分裂を繰り返した後に 2 度と分裂をせず、その

後数ヶ月生き続けるという現象が報告された (Hayflick L & Moorhead PS. Exp. Cell. Res. 25, 585-621, 1961)。今日この現象は細胞老化と呼ばれている。長期間の細胞の培養以外に、テロメアの短縮、がん

遺伝子、酸化ストレスなどによって、細胞周期を制御するp16/RBやp53のシグナル経路が活性化され、細胞が2度と分裂を起こさない状態になることが明らかにされている。染色体末端のテロメア短縮・機能不全等、染色体の構造や機能の変化が老化の内的要因であることが明らかにされているが、染色体を均等に娘細胞に分けるために重要な役割を果たすセントロメアと呼ばれる染色体領域とそこに局在するタンパク質が、老化に関わっているかどうか、詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、老化においてその役割が未知であるセントロメアのタンパク質に焦点をあて、染色体の分配や細胞分裂を制御するタンパク質が細胞の増殖の制御に関与することを検証し、細胞の老化におけるセントロメアタンパク質の新たな役割を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、ヒトの培養細胞ならびに細胞から抽出したDNA・RNA・タンパク質等を試料とする。

(1) RNA 干渉 (RNAi) を用い、セントロメアタンパク質を消失させたときの「細胞の増殖能」、「染色体の構造の変化」、「老化した細胞で観察される細胞の形態の変化」や「老化の指標であるベーターガラクトシダーゼ活性」の評価を行う。

(2) セントロメアタンパク質がどのようなシグナル経路で細胞の老化を引き起こすのか、そのメカニズムを探索する。

(3) 長期の培養や活性化がん遺伝子の導入等で老化したヒトの培養細胞におけるクロマチンタンパク質やセントロメアタンパク質の量的な変化と局在パターンを解析する。

4. 研究成果

(1) 老化したヒト初代培養細胞におけるセントロメアタンパク質の動態

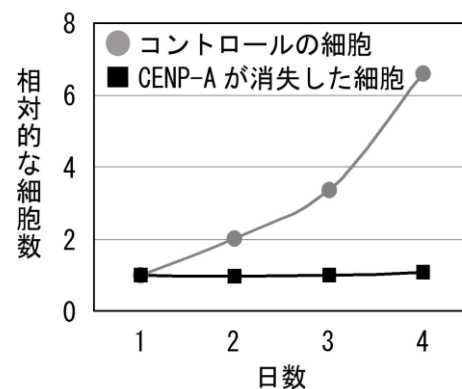
ウェスタンブロット解析により、ヒストンH3 バリエントである CENP-A やスピンドルチェックポイントタンパク質 Mad2、BubR1 やキネトコアタンパク質 Hec1 の低下、セントロメアタンパク質 CENP-B やヘテロクロマチン

タンパク質 HP1 の増加など、多くのタンパク質の量的な変化が老化した細胞で認められた。CENP-A の低下と CENP-B の増加は免疫染色でも同様に観察された。染色パターンの変化から老化した細胞ではセントロメア構造に質的な変化が起きていることが推測された。

(2) shRNA によりセントロメアタンパク質を低下させたヒト初代培養細胞の表現型の解析

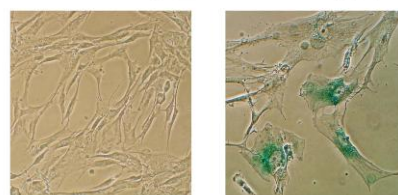
CENP-A, CENP-B, Mad2, BubR1 に対する shRNA をそれぞれ細胞に導入したところ、CENP-A の低下によってヒト正常細胞は増殖を停止し、p16 や p21 の増加、老化関連ヘテロクロマチン構造の形成や老化のマーカーである SA-β-gal 活性の上昇が観察された(下記の図を参照)。CENP-A の低下によりヒト初代培養細胞は老化することが示された。BubR1 の低下でも細胞老化様の表現型が観察されたが、CENP-A の低下に比べ軽度であり、Mad2 や CENP-B の低下では細胞は増殖を停止しなかった。以降の解析は、細胞周期を通じて恒常的にセントロメアに局在し、機能的なセントロメアを決定する CENP-A について行った。

CENP-A タンパク質を消失させたヒトの正常細胞は増殖を停止する



老化マーカーの SA-β-gal 染色

コントロールの細胞 CENP-A が消失した細胞



CENP-A が消失し増殖を停止した正常細胞は、細胞が大型化し、老化の指標であるベーターガラクトシダーゼ活性が上昇し、細胞が青く染まる。

(3) ヒト正常細胞とがん細胞で CENP-A の低下が細胞の増殖に及ぼす影響

ヒトの正常細胞とがん細胞を用いて、CENP-A タンパク質を消失させ、増殖に対する効果を比較した。正常細胞は速やかに増殖を停止するが、がん細胞は増殖を続けることがわかった。CENP-A をノックダウンした細胞の解析は、主にがん細胞を利用し、精力的に行われてきた。本研究ではヒト正常細胞を用い、細胞増殖に対する CENP-A 低下の影響を世界に先駆けて評価した。

(4) CENP-A の低下による増殖停止と p53 の関連

細胞周期を制御する p16/RB や p53 のシグナル経路は、老化を誘導する経路としてよく知られている。どちらの経路が主に働くかは、細胞の種類や老化を誘導するために与えたストレスによって異なる。CENP-A の低下で導かれる老化に、どちらの経路が主に関与するかを調べるために、p16 と p53 のいずれかをあらかじめ不活性化し、その後 CENP-A をノックダウンした。その結果、CENP-A 低下による老化の誘導は、p53 に依存することがわかった。p53 の活性化には、DNA Damage Response (DDR) が関与する事が、過去の論文で報告されているが、CENP-A 低下による p53 の活性化には、DDR の積極的な関与を認めなかった。CENP-A 低下による p53 の活性化には、新規の経路が関与しているのかもしれない。

(5) CENP-A ノックダウンによる細胞老化と p53 の役割について

CENP-A の低下による p53 依存性の細胞老化の生理的な意義を調べるために、生細胞観察を行った。p53 の不活性化により、CENP-A 低下による増殖停止が解除された結果、多くの細胞が染色体分配異常を示すことがわかった。具体的には、染色体が赤道面に揃わず分裂前中期の延長する、赤道面に揃わないまま染色体が分配される結果、微小核を形成する細胞が多く認められた。これらの成果は、ヒト正常細胞には、染色体の均等分配を保障するセントロメア・キネトコアの異常に対して、p53 を介して速やかに増殖を停止させる機構が存在すること、また、セントロメアタンパク質の異常によって引き起こされる老化は、染色体異常を伴う細胞の発生と増殖を抑制するという生理的な役割を持つことを示している。

(6) まとめと今後の展望

セントロメアのタンパク質は、分裂細胞では、染色体を均等分配するという重要な役割を担っている事は、国内外の研究者によって精力的に明らかにされているが、細胞の増殖に与える影響については老化も含めてその詳細は不明であった。その主な理由として、がん細胞を主たる研究材料としていたことが挙げられる。本研究は、分裂寿命を持つヒト正常細胞を用いて、セントロメアタンパク質が、老化（不可逆的な増殖停止）に関与することを検証し、細胞の老化におけるセントロメアタンパク質の新たな役割を明らかにした。これらの成果は、テロメアと同様にセントロメアタンパク質が、老化を制御する因子となりうることを示している。今後は、本研究をさらに発展させ、様々な老化モデル細胞から、ゲノム DNA と RNA を抽出し、DNA のメチル化やヒストン修飾等のエピジェネティックな制御について解析を進める。染色体の機能領域のみならず、ゲノムワイドなエピジェネティック環境に注目し、セントロメアタンパク質の低下・機能不全によって誘導される老化や、複製老化、活性化がん遺伝子で誘導される様々な老化の分子メカニズムの一端を、明らかにする予定である。

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 2 件)

- ① Maehara K. Cellular senescence as a self-defense mechanism against centromere dysfunction. *Biomedical Gerontology* Vol.35, 2011, pp17-23. 査読有
- ② Maehara K., Takahashi K., and Saitoh S. CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 30, 2010, pp2090-2104. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 前原佳代子 動原体機能不全はヒト正常細胞では細胞老化を誘導する 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 8 日 神戸市

- ② 前原佳代子 CENP-A の低下は、p53 依存性の細胞老化を誘導し、染色体分配異常を抑制する 第 33 回日本基礎老化学会 2010 年 6 月 17 日 名古屋市
- ③ 前原佳代子 CENP-A ノックダウンによる細胞老化と p53 の役割 第 27 回染色体ワークショップ 2010 年 1 月 20-22 日 御殿場市
- ④ 前原佳代子 染色体安定分配に必須な動原体タンパク質 CENP-A と細胞老化機構の機能的関連 第 32 回日本基礎老化学会 2009 年 6 月 19-20 日 横浜市
- ⑤ 前原佳代子 CENP-A の低下と細胞老化 第 26 回染色体ワークショップ 2009 年 1 月 26-28 日 姫路市
- ⑥ 前原佳代子 キネトコア機能異常と細胞老化 第 31 回日本基礎老化学会 2008 年 6 月 12-13 日 松本市

[その他]

ホームページ等

<http://ntec.heteml.jp/nch/index.html>

所外セミナー等

- ① 前原佳代子 CENP-A の低下で誘導される p53 依存性細胞老化 京都大学老年科セミナー 2010 年 6 月 21 日 京都市
- ② 前原佳代子 ヒト正常細胞における CENP-A の低下は、p53 依存性細胞老化を誘導する かずさ DNA 研究所セミナー 2010 年 4 月 28 日 木更津市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前原 佳代子 (MAEHARA KAYOKO)
独立行政法人国立成育医療研究センター・
周産期病態研究部・室長
研究者番号：80421311

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：