

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03440

研究課題名(和文)細胞膜損傷を引き金とする細胞老化の分子基盤と生体内における意義の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms and in vivo significance of the plasma membrane damage-dependent cellular senescence

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は出芽酵母とヒト培養細胞を用いて細胞の細胞膜損傷応答を検討した結果、新たな膜修復因子としてフリッパーゼを同定し、その輸送にクラスリン依存的な膜輸送が寄与することを見出した。また細胞膜損傷は、個体老化の一因である細胞老化をCa²⁺-p53経路を介して誘導すること、細胞膜の修復を亢進させることで細胞老化を抑制できることなどを明らかにした。また細胞膜損傷による老化細胞のトランスクリプトームはヒト生体内の創傷周辺にある老化細胞と極めてよく似ていた。これらの結果は細胞膜損傷がヒト生体内の創傷周辺で生じる老化細胞の原因である可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの老化の一因は細胞の老化であることが分かり始めている。老化細胞は様々なストレスにより誘導されるが、生体内における細胞老化の原因は未だはつきりしない。実験室内、試験管内での細胞老化の主要な原因は、テロメア短縮、DNA損傷、ガン遺伝子活性化、エピジェネティックな変化など、最終的にはDNAの変化、染色体の変化が細胞の運命を老化へと決定すると理解されてきた。しかし本研究では細胞膜損傷というDNAの変化とは独立の現象が、DNAの変化とは別のメカニズムで細胞老化を誘導し、実際にその細胞とよく似た細胞がヒト生体内にあることを示した。本研究は新たな老化治療戦略提案の基盤となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using budding yeast and normal human fibroblasts, we investigated the cellular response to the plasma membrane damage. We identified flippase as a membrane repair factor, and found that the clathrin-dependent membrane trafficking contributes to its transport. We also found that the plasma membrane damage induces cell senescence via the Ca²⁺-p53 pathway. Conversely, upregulation of plasma membrane repair suppresses cellular senescence. The transcriptomic analysis suggests that the plasma membrane damage-dependent senescent cells are analogous to the senescent cells around wounds in a human body near the cutaneous wound site. These results suggest that plasma membrane damage may explain the cause of senescent cells around wounds in humans.

研究分野：生命科学

キーワード：細胞老化 細胞膜損傷 細胞膜修復

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全ての細胞は脂質二重膜からなる細胞膜で包まれている。細胞膜は細胞内部と環境を区切る重要な構造だが、その厚みは 5 μm しかなく、シャボン玉の膜の厚みの 1/20 程度である。従って細胞膜の損傷は筋肉の収縮を始めとする様々な過程で頻繁に起こる。細胞膜の傷を修復する細胞創傷治癒機構に欠損があると筋ジストロフィー症など様々な疾病を誘起するが、細胞創傷治癒の分子メカニズムの全貌は未だ不明であり、生体内における重要性の理解は遅れている。申請者はこれまでに出芽酵母を用いて細胞創傷治癒に關与する遺伝子を網羅的に同定した結果、プロテアソームによるタンパク質分解が修復反応の開始に必須であること、細胞膜損傷が細胞周期チェックポイントを活性化することなどを全ての生物に先駆けて明らかにしてきたほか、細胞膜損傷チェックポイントなどのメカニズムの少なくとも一部はヒト培養細胞まで進化的に保存されていることを示してきている。

2. 研究の目的

以下の三つの問いに答えることを目的とする。

- (1) 細胞膜の微小な傷はどのように修復されるか
- (2) 細胞膜損傷はいかにして細胞老化を誘導するか
- (3) 細胞膜損傷による細胞老化の個体レベルでの意義は何か。

3. 研究の方法

出芽酵母を用い、レーザーや界面活性剤などで細胞膜損傷を導入し、損傷部位に集積してくる修復因子候補タンパク質を同定した。また、出芽酵母とヒト培養細胞を用い、レーザー、界面活性剤、細菌毒素(Streptolysin O)、シリカ(微小なガラス片)などで一過的に処理して細胞膜損傷を導入し、その後、細胞膜損傷のない培養条件に戻して細胞老化が誘導される過程を解析した。また細胞膜損傷による老化細胞の経時的 mRNA-seq を行い、活性化したり不活性化したりしているパスウェイを決定した。さらにその結果をヒトやマウス個体の RNA-seq、single cell RNA-seq などの公開データと比較して、細胞膜損傷による老化細胞か個体レベルで果たす生理的・病理的意義について推測した。

4. 研究成果

細胞膜の傷を修復するには、損傷部位に修復タンパク質を輸送する必要がある。しかし出芽酵母の細胞膜の 20-50% は小胞体に覆われており、修復タンパク質を効率的に損傷部位へ運ぶには細胞膜から小胞体を剥がす必要がある。小胞体を細胞膜から剥がすことは、細胞膜修復の過程だけではなく、極性切り替えの様々なプロセス(出芽や Mating projection formation 等)で起こっている。そこで出芽酵母が出芽する時期をモデルとして小胞体を細胞膜から剥がす仕組みを追求した。その結果、(1) Exocytosis により新たな膜が供給されること、そして(2) 小胞体と細胞膜をアンカーする膜貫通タンパク質、という二つの要素が小胞体を細胞膜から剥がし、その場に新たな極性を確立させる時に寄与することが明らかになった(Sugiyama and Kono, Science Advances, 2024, 図 1)。

細胞膜から小胞体を剥がした後、損傷部位に修復タンパク質を輸送するメカニズムは何だろうか。我々は出芽酵母を用いて、リン脂質フリッパーゼを細胞膜修復因子として初めて報告し、さらにその輸送にクラスリンを介した膜輸送メカニズムが寄与することを明らかにした(Yamazaki and Kono, BBRC, 2022, 図 2)。フリッパーゼ

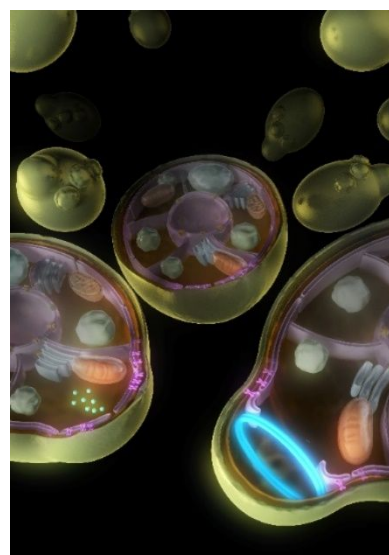


図 1 細胞膜から小胞体を剥がし新たな極性を確立する仕組み
出芽酵母において、細胞膜(黄)から小胞体(紫)を剥がすには Exocytosis (緑の粒子)とアンカータンパク質(ピンク)が寄与する(Sugiyama and Kono, Science Advances, 2024)。

遺伝子を破壊すると、損傷部位への Exo70 局在が著しく損なわれた。これらの結果から、リン脂質フリッパーゼのクラスリンを介した輸送は、損傷部位への Exo70 局在に重要であると考えられる。クラスリンとフリッパーゼを介してエクソシスト局在を制御するメカニズムは、極性細胞における効果的な細胞膜修復を担保している可能性がある。これらの研究成果に加え、細胞膜損傷により誘起される液液相分離に関連した総説を執筆した(Sugiyama et al., The Journal of Biochemistry, 2023).

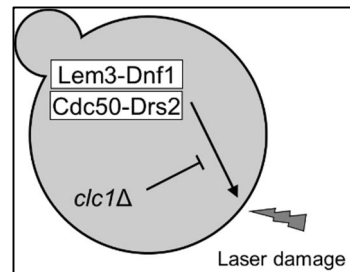


図2 修復因子の輸送機構
出芽酵母を用いて同定された新規細胞膜修復因子フリッパーゼの損傷部位への輸送は、クラスリン(Clc1)依存的なエンドサイトーシスとその後の膜輸送により行われる(Yamazaki and Kono, BBRC, 2022).

細胞膜損傷は、環境の擾乱や細胞の自律的な活動により、あらゆる種類の細胞で起こる。しかし、細胞膜損傷の長期的結果は、回復か死かを除いてほとんど不明であった。本研究では、出芽酵母と正常ヒト線維芽細胞を用いて、生体の老化に寄与する安定な細胞周期の停止である細胞老化が、細胞膜損傷の長期的な結果であることを見いだした。細胞膜損傷その主要なメカニズムは正常ヒト線維芽細胞では、PMD は Ca²⁺-p53 軸を介して早期老化を誘導するが、

主要な老化経路である DNA 損傷応答経路は誘導しない (Suda et al., Nature Aging, 2024、図3)。また、細胞膜修復因子である ESCRT-III (CHMP4B) を一過的に発現上昇させると、細胞膜損傷による細胞老化は抑制された。

さらに、細胞膜損傷による老化細胞を用いて経時的なトランスクリプトーム解析を行った結果、細胞膜損傷による老化細胞は他のタイプの老化細胞とは異なり、細胞老化の初期に GPVI 経路が顕著に不活性化されることが明らかになった(Suda et al., Nature Aging, 2024)。GPVI 経路の不活性化は組織の創傷治癒の際に必要なことが知られている。また組織の創傷部位に老化細胞が存在し、傷の効率的な治癒に寄与することも知られている。これらの知見から、細胞膜損傷による老化細胞がヒト生体内、特に組織の創傷部位に存在して傷の効率的な治癒に寄与するという可能性を検討した。その結果、実際に細胞膜損傷による老化細胞は試験管内における創傷治癒を促進すること、また細胞膜損傷による老化細胞のトランスクリプトームはヒト生体内の創傷部位の老化細胞と非常に似ていることが明らかになった。

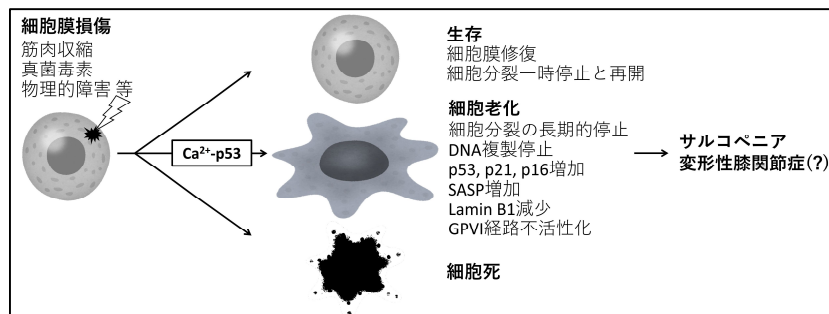


図3 細胞膜損傷は三つの細胞運命を導く

細胞膜損傷はその強度により、一時的増殖停止、炎症を伴う長期的な増殖停止である細胞老化、細胞死を導く(Suda et al., Nature Aging, 2024).

以上の結果から、細胞膜損傷は長期的細胞運命として細胞老化を誘導すること、また細胞膜損傷により誘導された老化細胞がヒト生体内に存在し、様々な生理的・病理的プロセスに寄与する可能性が示唆された。

本研究成果は nature aging 2024 年 3 月号に掲載され、表紙に採用されたほか(図4)、同号 News and Views に注目記事として紹介された。表紙のモチーフは金継ぎである。金継ぎとは、陶器のひび割れを漆と金で補修し使い続けるための日本の伝統的な技術である。ひび割れは修復されるものの、完全に元通りになるわけではなく、元の陶器とは異なる古びた風合いをもたらす。ここでは、細胞膜が傷つき修復されるものの、細胞の性質は不可逆的に変化し異なる振る舞いをするを金継ぎになぞらえて表現している。



図4 nature aging2024 年 3 月号表紙。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suda Kojiro, Moriyama Yohsuke, Razali Nurhanani, Chiu Yatzu, Masukagami Yumiko, Nishimura Koutarou, Barbee Hunter, Takase Hiroshi, Sugiyama Shinju, Yamazaki Yuta, Sato Yoshikatsu, Higashiyama Tetsuya, Johmura Yoshikazu, Nakanishi Makoto, Kono Keiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Plasma membrane damage limits replicative lifespan in yeast and induces premature senescence in human fibroblasts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 319 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43587-024-00575-6	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 Sugiyama Shinju, Kono Keiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Exocytic plasma membrane flows remodel endoplasmic reticulum?plasma membrane tethering for septin collar assembly	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adj1512	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 Sugiyama Shinju, Suda Kojiro, Kono Keiko	4. 巻 175
2. 論文標題 Cytoplasmic zoning by protein phase transition after membrane permeabilization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 147 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad094	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 河野恵子	4. 巻 -
2. 論文標題 酵母にみるキズの治し方	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本醸造協会誌	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) なし	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 Yuta Yamazaki, Keiko Kono	4. 巻 -
2. 論文標題 Exocyst live-cell imaging during plasma membrane repair in yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	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) 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 -

1. 著者名 Yuta Yamazaki, Keiko Kono	4. 巻 606
2. 論文標題 Clathrin-mediated trafficking of phospholipid flippases is required for local plasma membrane/cell wall damage repair in budding yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 156 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.03.129	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 -

[学会発表] 計23件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 13件)

1. 発表者名 Keiko Kono
2. 発表標題 Plasma membrane damage limits replicative lifespan in yeast and induces premature senescence in human fibroblasts
3. 学会等名 A3 Foresight program, Cellular Senescence: from Pathophysiology to Treatment. (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Keiko Kono
2. 発表標題 Exocytic plasma membrane flows remodel endoplasmic reticulum-plasma membrane tethering for septin collar assembly
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia conference on Yeast and Life Sciences, Shimane (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kojiro Suda, Yohsuke Moriyama, and Keiko Kono
2. 発表標題 細胞膜損傷依存性老化におけるCa ²⁺ を介した小胞体とミトコンドリアのクロストーク
3. 学会等名 日本生理学会 第101回大会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Keiko Kono
2. 発表標題 Plasma membrane damage-dependent cellular senescence is mediated by mitochondrial Ca ²⁺ accumulation
3. 学会等名 第96回日本生化学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keiko Kono
2. 発表標題 細胞膜損傷を起点とする細胞質ゾーニングの変化
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kono K
2. 発表標題 How do our cells age?
3. 学会等名 Interdisciplinary Science Conference in Okinawa (ISCO 2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Moriyama Y and Kono K
2. 発表標題 Plasma membrane damage, immune response, and cellular senescence
3. 学会等名 The 28th East Asia Joint Symposium on biomedical Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kono K
2. 発表標題 Plasma membrane damage limits replicative lifespan in yeast and induces premature senescence in human fibroblasts
3. 学会等名 The 23rd Northeastern Asian Symposium Cellular Senescence: From Pathophysiology to Treatment (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Barbee H, Moriyama Y, and Kono K
2. 発表標題 Plasma membrane damage-induced senescent cells accelerate wound healing via extracellular vesicles and soluble molecules
3. 学会等名 Cell Bio 2022 (ASCB/EMBO meeting) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamazaki Y, and Kono K
2. 発表標題 Clathrin-mediated trafficking of phospholipid flippases is required for local plasma membrane/cell wall damage repair in budding yeast
3. 学会等名 Cell Bio 2022 (ASCB/EMBO meeting) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suda K, Moriyama Y, Razali N, Chiu Y, and Kono K
2. 発表標題 Plasma membrane damage limits replicative lifespan in yeast and induces premature senescence in human fibroblasts
3. 学会等名 EMBO Workshop 2022 The DNA damage response, immunity and aging, Singapore (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Razali N, Moriyama Y, Chiu Y, Suda K, Turkki T, and Kono K
2. 発表標題 Time-resolved transcriptomic profiling of senescence-associated secretory phenotype (SASP) in multiple senescent cell subtypes
3. 学会等名 EMBO Workshop 2022 The DNA damage response, immunity and aging, Singapore (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Grasic J, Suda K, Razali N, and Kono K
2. 発表標題 Time-resolved proteomic profiling of plasma membrane damage-induced senescent cells
3. 学会等名 The 7th international Cell Senescence Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎裕太、河野恵子
2. 発表標題 出芽酵母の細胞膜修復因子の輸送はエンドサイトーシスとリサイクル経路を介する
3. 学会等名 第55回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keiko Kono, Koutarou Nishimura, Yoshikazu Johmura, Makoto Nakanishi
2. 発表標題 Down-regulating cortical tension ensures timely chromosome segregation
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Kono
2. 発表標題 Cortical tension and chromosome segregation
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎裕太、河野恵子
2. 発表標題 出芽酵母の細胞膜修復におけるクラスリンの役割
3. 学会等名 第54回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山伸樹、河野恵子
2. 発表標題 出芽酵母の細胞極性形成部位における 小胞体-細胞膜接着因子の排除
3. 学会等名 第54回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yohsuke Moriyama, Razali Nurhanani, Yatzu Chiu, Kojiro Suda, and Keiko Kono
2. 発表標題 Plasma membrane damage limits replicative lifespan in yeast and induces premature senescence in normal human fibroblasts
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nurhanani Razali, Yohsuke Moriyama, Yatzu Chiu, Keiko Kono
2. 発表標題 Plasma membrane damage induces wound-healing SASPs in normal human fibroblasts
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yatzu Chiu, Yohsuke Moriyama, Nurhanani Binti Razali, Keiko Kono
2. 発表標題 The miRNA Signature Associated with Plasma Membrane Damage-dependent Senescence
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kojiro Suda, Yatzu Chiu, Nurhanani Razali, Yohsuke Moriyama, Keiko Kono
2. 発表標題 Plasma membrane damage limits replicative lifespan in budding yeast and human fibroblasts
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野恵子
2. 発表標題 細胞膜張力制御と染色体分配
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Annual Report 2023 https://groups.oist.jp/memu/fy2023-annual-report Annual Report 2022 https://groups.oist.jp/memu/fy2022-annual-report Annual Report2021 https://groups.oist.jp/memu/fy2021-annual-report Annual Report2020 https://groups.oist.jp/memu/fy2020-annual-report
--

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
研究分担者	森山 陽介 (Yohsuke Moriyama) (00452532)	沖縄科学技術大学院大学・サイエンステクノロジーグループ・サイエンス・テクノロジーアシエイト (38005)	
研究分担者	杉山 伸樹 (Sugiyama Shinju) (70868687)	沖縄科学技術大学院大学・膜生物学ユニット・ポスドクトラルスカラー (38005)	
研究分担者	RAZALI Nurhanani・Binti (Razali Nurhanani) (70902667)	沖縄科学技術大学院大学・膜生物学ユニット・ポスドクトラルスカラー (38005)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	枡鏡 優美子 (Masukagami Yumiko) (10839848)	沖縄科学技術大学院大学・膜生物学ユニット・研究員 (38005)	削除：2020年12月4日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関