

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640063

研究課題名(和文)細胞老化実行遺伝子の同定とその機能解析

研究課題名(英文)Identification and characterization of cellular senescence-specific genes

研究代表者

鎌田 真司(Kamada, Shinji)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授

研究者番号：20243214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA損傷が起きた際の細胞応答機構の一つである細胞老化という現象を分子レベルで解明することを目的とし、細胞老化実行に関する遺伝子の同定とその機能解析を行った。DNA二本鎖切断を引き起こす薬剤であるエトポシドの処理濃度を変えることによって、細胞老化とアポトーシスを選択的に誘導し、DNAマイクロアレイ比較解析によって老化細胞で特異的に高発現する遺伝子を複数同定することに成功した。その中でも特に、プロリン脱水素酵素とD-アミノ酸化酵素について詳細な解析を行い、いずれも代謝副産物として活性酸素種を発生させることにより細胞老化実行に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanisms of cellular senescence when DNA damages occurred, we identified and characterized several genes that are crucial for senescence. By using a developed experimental system in which cellular senescence or apoptosis is induced preferentially by altering the concentration of etoposide, a DNA-damaging drug to induce DNA double-strand breaks, we compared gene expression profiles of senescent and apoptotic cells by microarray analysis and identified several genes specifically upregulated in senescent cells. Among these genes, we focused on proline dehydrogenase and D-amino acid oxidase. It was clarified that both genes played crucial roles in senescence by producing reactive oxygen species as byproducts in amino acid metabolism.

研究分野：分子生物学 細胞生物学

キーワード：細胞老化 DNA損傷 p53 活性酸素 アミノ酸代謝

1. 研究開始当初の背景

細胞老化は 1965 年に初めてヒト正常細胞の分裂寿命という現象として報告され、後に分裂寿命はテロメアの短縮によることが明らかとなった。テロメアの短縮による細胞老化は複製細胞老化 (replicative senescence) と呼ばれ、また、がん遺伝子 ras 等の強制発現によって細胞老化が誘導されることが示され、複製細胞老化と区別し早期細胞老化 (premature senescence) という。その後、がん遺伝子以外にも様々なストレス (酸化ストレス、DNA 損傷ストレス等) によって早期細胞老化が引き起こされることが明らかとなり、更にはテロメアの短縮が DNA 損傷ストレスを引き起こすことが示され、細胞老化誘導の原因として DNA 損傷の重要性に注目が集まってきていた。しかしながら、細胞老化へ至る分子メカニズムは不明のままであり、また、老化細胞の中で起きている生化学的、生理学的変化についてもほとんど解明されていなかった。

我々はそれまでの研究において、正常な p53 遺伝子を持つ肝癌細胞株 HepG2 細胞に DNA 二重鎖切断を引き起こす抗がん剤であるエトポシドを作用させると、低処理濃度では細胞老化が、高濃度処理ではアポトーシスが誘導されることを見出していた。更に、低濃度処理後 24 時間で顕著な p53 タンパク質量の増加が見られ、p53 ノックダウンにより細胞老化が抑制されたことから、細胞の運命決定に p53 が重要な働きをすることを予想した。また、エトポシド処理濃度によって p53 リン酸化状態に差が見られ、エトポシド処理後 24 時間から 36 時間の間の RNA 合成阻害剤処理によって細胞老化が抑制されたため、この間に p53 によって誘導される遺伝子によって細胞老化が実行されると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、我々が確立した実験系を用いて、DNA 損傷が起きた際の細胞応答機構の一つである細胞老化という現象を分子レベルで解明することを目的とした。本実験系を利用してマイクロアレイ比較解析を行い、細胞老化誘導時に特異的に発現が誘導される遺伝子を 20 種類同定した。これら遺伝子の中には、細胞老化実行において重要な役割を果たしている遺伝子が含まれていると予想し、その詳細な解析によって細胞老化実行の分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

すでに同定していた 20 種類の候補遺伝子について、以下の実験を行った。

- (1) エトポシド以外の処理による細胞老化誘導時の mRNA の増加と p53 依存性の確認
- (2) 各遺伝子のクローニング
- (3) 細胞老化誘導時のタンパク質の変化の確認
- (4) 各遺伝子をノックダウンした時の細胞老化への影響
- (5) 各遺伝子を発現させ場合の細胞老化に関連した細胞変化の確認

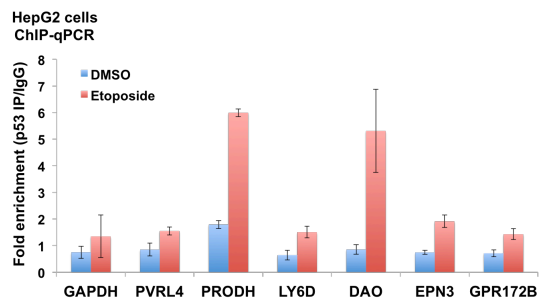
4. 研究成果

(1) 解析候補遺伝子の絞り込み

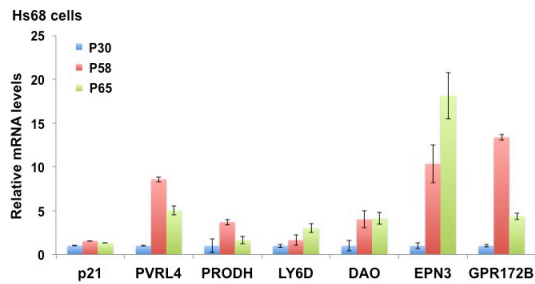
20 種類の候補遺伝子について、まず、その発現が p53 に依存するかどうか検討を行った。その結果、下図に示す 6 遺伝子に依存性が認められた。また、図中には各遺伝子の細胞内で予想される機能を記載している。

	Molecular class
PVRL4	Adhesion molecule
PRODH	Dehydrogenase
LY6D	Adhesion molecule
DAO	Oxidase
EPN3	Unclassified
GPR172B	G protein coupled receptor

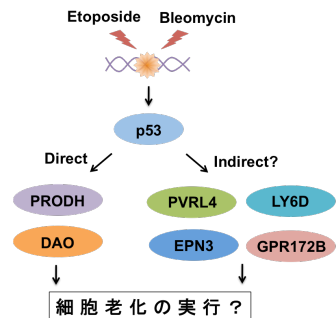
次に、それぞれの遺伝子の発現制御が p53 によって直接行われるかどうかを、クロマチン免疫沈降法によって検討した。その結果、PRODH と DAO は直接 p53 が転写調節領域に結合するのに対し、PVRL4L、Y6D、EPN3、GPR172B は間接的に p53 によって制御されることが示唆された (下図)。



更に、これら遺伝子がテロメアの短縮に伴う複製細胞老化時にも発現が上昇するかどうかを、正常繊維芽細胞を用いて検討した。その結果を次頁図に示しているが、程度の差はあるがいずれの遺伝子においても発現上昇が認められたため、これら遺伝子は生理的な細胞老化誘導時にも重要な機能を果たしている可能性が示唆された。



以上の結果をまとめたのが下図であり、これら6遺伝子について更に詳細な解析を進めることとした。本研究期間では、PRODH (proline dehydrogenase) と DAO (D-amino acid oxidase) について解析を行った。



(2) PRODH の解析

PRODH はプロリン脱水素酵素であり、プロリン代謝に関わる他、脱水素反応の副産物として活性酸素種を発生させることが知られているが、細胞老化との関連は一切知られていなかった。一連の解析により、エトポシドで細胞老化を誘導すると、PRODH の mRNA 量とタンパク量の上昇が見られ、この発現上昇は p53 に依存することが確認できた。更には、PRODH の高発現により細胞増殖能の低下、および細胞老化マーカーである p21 発現上昇や Senescence associated β -Galactosidase (SA- β -Gal) 染色陽性細胞の増加が見られ、細胞老化を誘導することが分かった。また、この際、活性酸素種レベルが増加し、ノックダウンや阻害剤処理により PRODH を抑制した細胞ではエトポシド処理による活性酸素種増加が抑えられたことから、PRODH 活性により生じた活性酸素種が細胞老化を誘導するという可能性が示唆された。

(3) DAO の解析

DAO は D アミノ酸の代謝に関与する酵素である。細胞に DAO を過剰発現させたところ、細胞増殖が抑制され、細胞老化指標である SA- β -Gal の活性が上昇した。一方、DAO の阻害剤 CBI0 を用いて解析を行った結果、SA- β -Gal の活性上昇が抑制され、細胞増殖

能の回復を促すことが分かった。DAO は D-アミノ酸を代謝分解し、副産物として活性酸素種を産生する。そこで活性酸素種含量と酸化ストレス関連分子の発現を解析した結果、DAO 過剰発現細胞では、DNA 損傷時に活性酸素種が上昇し、更に活性酸素種による制御を受け細胞老化を制御する p53 や p21 の発現が上昇していた。逆に、DAO の阻害剤を処理した場合、これらの因子の発現抑制が観察された。また、HepG2 細胞内には L-アルギニンと同程度の D-アルギニンが検出され、DAO の基質となっている可能性が示された。以上の結果から、DAO は DNA 損傷時に p53 依存的に発現上昇し、D-アミノ酸の代謝を介して活性酸素種を産生することによって p53 の正のフィードバック効果を誘導し、細胞老化を促進すると考えられた。

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 7 件)

- ① Tokmakov AA, Iwasaki T, Sato KI, Kamada S. Reprogramming of somatic cells and nuclei by *Xenopus* oocyte and egg extracts. *Int. J. Dev. Biol.* 査読あり 2016 in press
- ② Kawai M, Nakashima A, Kamada S, Kikkawa U. Midostaurin preferentially attenuates proliferation of triple-negative breast cancer cell lines through inhibition of Aurora kinase family. *J Biomed Sci.* 査読あり 22, 2015, 48
doi: 10.1186/s12929-015-0150-2.
- ③ Nakashima, A., Kamada, S., Tamanoi, F., and Kikkawa, U. Fission yeast arrestin-related trafficking adaptor, Arn1/Any1, is ubiquitinated by Pub1 E3 ligase and regulates endocytosis of Cat1 amino acid transporter. *Biol. Open* 査読あり 3, 2014, 542-552
doi: 10.1242/bio.20148367.
- ④ Kobayashi, H., Saito, T., Sato, K., Furusawa, K., Hosokawa, T., Tsutsumi, K., Asada, A., Kamada, S., Ohshima, T., and Hisanaga, S. Phosphorylation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) at

Tyr-15 is inhibited by Cdk5 activators and does not contribute to the activation of Cdk5. *J. Biol. Chem.* 査読あり 289, 2014, 19627-19636
doi: 10.1074/jbc.M113.501148.

- ⑤ Nakano, M., Nakashima A., Nagano, T., Ishikawa, S., Kikkawa, U., and Kamada, S. Branched-Chain Amino Acids Enhance Premature Senescence through Mammalian Target of Rapamycin Complex I-Mediated Upregulation of p21 Protein. *PLoS ONE* 査読あり 8, 2013, e80411
doi: 10.1371/journal.pone.0080411.
- ⑥ Nagano, T., Hashimoto, T., Nakashima, A., Hisanaga, S., Kikkawa, U., and Kamada, S. Cyclin I is involved in the regulation of cell cycle progression. *Cell Cycle* 査読あり 12, 2013, 2617-2624
doi: 10.4161/cc.25623.
- ⑦ Nakashima, A., Tanimura-Ito, K., Oshiro, N., Eguchi, S., Miyamoto, T., Momonami, A., Kamada, S., Yonezawa, K., and Kikkawa, U. A positive role of mammalian Tip41-like protein, TIPRL, in the amino-acid dependent mTORC1-signaling pathway through interaction with PP2A. *FEBS Lett.* 査読あり 587, 2013, 2924-2929
doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.027.

[学会発表] (計8件)

- ① 中嶋 昭雄、山下 郎、大坪 瑤子、鎌田 真司、瓜谷 眞裕、山本 正幸、吉川 潮、減数分裂における分裂酵母 TORC1 の制御と機能、第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会 合同大会、2015.12.4、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ② 山尾 俊介、長野 太輝、吉川 潮、鎌田 真司、新規細胞老化制御因子 D アミノ酸化酵素の機能解析、第 74 回日本癌学会学術総会、2015.10.8、名古屋国際会議場 (愛知県)
- ③ 山尾 俊介、長野 太輝、中嶋 昭雄、吉川 潮、鎌田 真司、新規細胞老化誘導因子としての D アミノ酸化酵素 DAO

の機能解析、第 37 回日本分子生物学会、2014.11.26、パシフィコ横浜 (神奈川県)

- ④ 長野 太輝、山尾 俊介、中嶋 昭雄、吉川 潮、鎌田 真司、プロリン脱水素酵素 (PRODH) は細胞老化誘導に関わる新規因子である、第 37 回日本分子生物学会、2014.11.26、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑤ 長野 太輝、山尾 俊介、吉川 潮、鎌田 真司、プロリン脱水素酵素 (PRODH) は細胞老化誘導に関わる新規因子である、第 73 回日本癌学会学術総会、2014.9.27、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑥ 大西 健悟、長野 太輝、山尾 俊介、中嶋 昭雄、吉川 潮、鎌田 真司、細胞老化制御に関与する遺伝子の同定と機能解析、第 36 回日本分子生物学会、2013.12.3、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑦ 長野 太輝、橋本 季明、中嶋 昭雄、久永 眞市、吉川 潮、鎌田 真司、Cyclin I は細胞周期の進行に関与している、第 36 回日本分子生物学会、2013.12.3、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑧ 長野 太輝、中野 真行、橋本 季明、江成 政人、吉川 潮、鎌田 真司、細胞老化とアポトーシスの運命を決定する遺伝子の同定とその機能解析、第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10.5、パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 真司 (KAMADA, Shinji)
神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授
研究者番号: 20243214

(2) 連携研究者

吉川 潮 (KIKKAWA, Ushio)
神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授
研究者番号: 40150354

中嶋 昭雄 (NAKASHIMA, Akio)
神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授
研究者番号: 70397818