

研究終了報告書

「細胞老化の鍵を握る脂質新機能の光操作による解明」

研究期間：2016年10月～2020年11月（コロナ延長支援：2021年5月まで延長）

研究者：河野 恵子

1. 研究のねらい

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。従って細胞膜の損傷を修復する機構は生命誕生からほどなくして獲得されたと考えられる。細胞膜の物理的損傷とその修復は、筋収縮、各種上皮細胞の物理的傷害を始め、様々な生理的条件下で惹起される。細胞膜損傷修復機構の欠損は筋ジストロフィー症などの疾病に関与するが、細胞膜損傷を起点とする細胞の運命変化とその生体内における意義に関してはほぼ未解明である。我々はこれまでに細胞膜損傷が細胞老化（細胞の不可逆的増殖停止）を誘導すること、またその細胞老化が細胞膜上の脂質構成の変化（「傷跡」の蓄積）と関連していることを見出してきている。そこで本研究では傷跡の形成・除去過程を詳細に解析すると共に、光操作を用いて傷跡除去タンパク質を操作し、細胞膜損傷を起点とする細胞老化の分子基盤を解明することを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

出芽酵母において傷跡除去タンパク質を過剰発現したところ、出芽酵母の分裂寿命が延長した（老化が遅延した）。このことは傷跡除去が細胞の寿命延長（老化遅延）と関連していることを示唆している。そこで光操作により傷跡除去タンパク質を細胞膜へ強制的に局在させた結果、出芽酵母の増殖が抑制された。

次に、ヒト培養細胞でも光操作を行った。本領域の吉井達之研究者らの開発による DHFR に傷跡除去タンパク質を融合させ、光操作により強制的に細胞膜移行させた。その結果、細胞膜に突起様構造を形成させ、小胞様構造を遊離させることに成功したが、この操作は最終的に細胞死を誘導した。酵母の結果とヒト培養細胞の結果を考え合わせると、傷跡除去タンパク質の細胞膜への強制移行は、細胞の増殖に対しては負の影響があると考えられる。

次に傷跡蓄積が細胞老化に及ぼす影響について検討した。様々な細胞老化誘導刺激の構成要素として、細胞質カルシウムイオンの急激な上昇があることが知られている。そこで傷跡の少ないヒト正常細胞と、傷跡が多いものの未だ分裂停止には至っていない（老化していない）ヒト正常細胞を用いて、カルシウムシグナルに対する応答を検討した。その結果、傷跡の多い細胞の方がカルシウムシグナルに対する応答が顕著に早かった。このことから、傷跡蓄積は老化誘導シグナルへの耐性を失わせることに寄与すると考えられる。

以上より、傷跡除去タンパク質の発現量と傷跡形成、そして細胞老化の間には極めて深い関連があり、傷跡除去そのものは細胞老化抑制に十分ではないものの、傷跡蓄積は老化を促進すると結論付けられる。

本研究の過程で、細胞膜損傷により細胞周期チェックポイントが活性化し細胞周期が一時的に停止することや、様々な細胞運命変化が誘導されること、また細胞膜損傷を経験した細胞

が老化個体で蓄積していることなどが明らかになった。今後は細胞膜損傷を起点とする様々な細胞運命変化の分子基盤を追及するとともに、それぞれの事象の生理的意義を解明し、将来的にはヒトにおける個体老化の抑制というゴールを見据え、その基盤となる研究を進める予定である。

(2) 詳細

(1) 出芽酵母における光操作

研究代表者(河野)は以前に、出芽酵母では細胞膜損傷により細胞周期チェックポイントが活性化されること(Kono et al., 2016)や、分裂寿命が短縮すること(Kono et al., submitted)を見出してきている。特に分裂寿命の短縮は傷跡(損傷部位に形成される脂質構成が変化した細胞膜の一部)の蓄積と関連しており、傷跡除去タンパク質の過剰発現は寿命延長を誘導した(Kono et al., submitted)。これらの結果から、傷跡蓄積が分裂寿命の短縮に寄与する可能性が考えられた。しかしながら傷跡除去タンパク質は多機能であるため、傷跡除去タンパク質の過剰発現が傷跡除去を介して寿命延長を導いているのか、その他の経路を介しているのかは不明であった。そこで本研究では光操作を用いることとした。まず LOV-ePDZ システムを利用して、傷跡除去タンパク質を細胞膜へ強制的に局在する実験系を構築した。その結果、青色光照射により傷跡除去タンパク質を細胞膜の一部に局在させることに成功した。この応答は速く(照射後約 5 秒で局在)、可逆的であった(照射後約 35 秒で脱局在)(図1)。

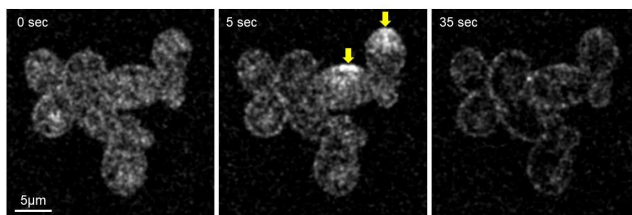


図1 傷跡除去タンパク質と ePDZ-mCherry との融合タンパク質並びに Mid2-GFP-LOV を出芽酵母野生株に共発現させ、青色光を局所的に照射した。図は mCherry シグナル(傷跡除去タンパク質)を示す。

続いてこの酵母株の増殖を検討した。その結果、コントロール株と比較して青色光照射条件のみにおいて顕著な増殖抑制が認められた(図2)。この結果より傷跡除去タンパク質の細胞膜への強制局在は増殖を抑制することが明らかになった。

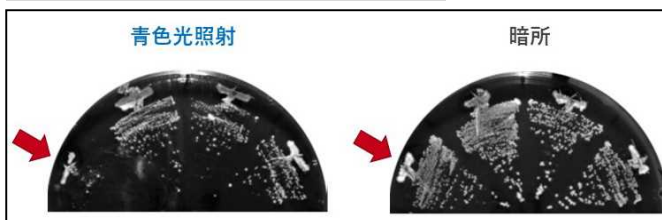


図2 傷跡除去タンパク質と ePDZ-mCherry との融合タンパク質並びに Mid2-GFP-LOV を出芽酵母野生株に共発現させた出芽酵母株は青色光照射条件下でのみ増殖抑制が認められた(赤矢印)。

(2) ヒト培養細胞における光操作

(2)-1 ヒト培養細胞における傷跡形成・除去過程の解析

ヒトがん細胞株である HeLa 細胞を用いて、傷跡の形成および除去を検討するために低濃度界面活性剤に暴露させと、処理後 1 時間で傷跡の数が最大となり、24 時間でほぼ全ての傷跡が除去された(図3)。このことは HeLa 細胞の細胞膜修復能力が高いことを示しており、HeLa 細胞が細胞膜損傷による細胞老化に抵抗性を有することとよく一致している。

一方、ヒト正常細胞で同様の処理を行ったところ、処理後1時間で傷跡の数が最大となることは HeLa 細胞の場合と同様であったが、24 時間経過しても約 40 個の傷跡は細胞膜に残存していた。また、老化したヒト正常細胞には約 150 個の傷跡が存在していた。これらの結果は傷跡の蓄積と細胞老化との間に深い関連があることを示している。

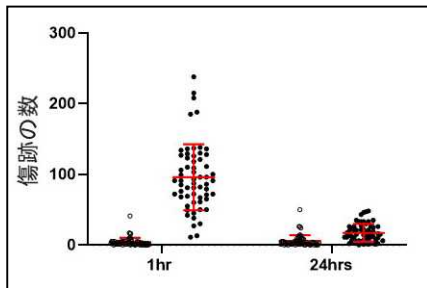


図3 HeLa 細胞を、低濃度界面活性剤を含む培地へ移し培養した。処理後1時間と24時間で細胞を固定し、傷跡を染色し、顕微鏡にて観察した後、ソフトウエア上で解析した。白丸は未処理群、黒丸は細胞膜損傷処理群。

また、老化したヒト正常細胞には約 150 個の傷跡が存在していた。これらの結果は傷跡の蓄積と細胞老化との間に深い関連があることを示している。

(2)ー2 ヒト培養細胞における光

操作

さらにヒト培養細胞でも光操作を行った。本領域の吉井達之研究者らの開発による DHFR に傷跡除去タンパク質を融合させ、光操作により強制的に細胞膜移行させる実験系を確立した。まずポジティブコントロール化合物を用いて細胞膜全体に傷跡除去タンパク質を局在させ

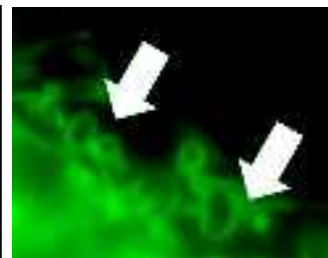
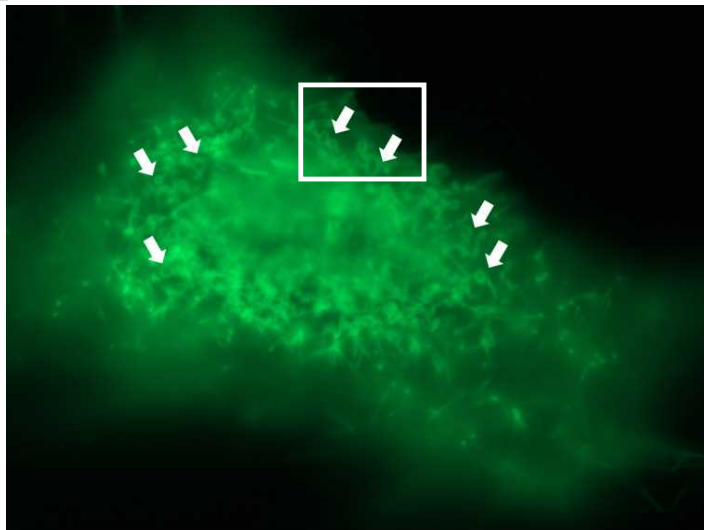


図4 DHFR-GFPに傷跡融合タンパク質を融合させ、ポジティブコントロール化合物にて処理した 20 分後、蛍光顕微鏡にて観察した。白四角の拡大図が右上。白矢印はループ状構造を示す。

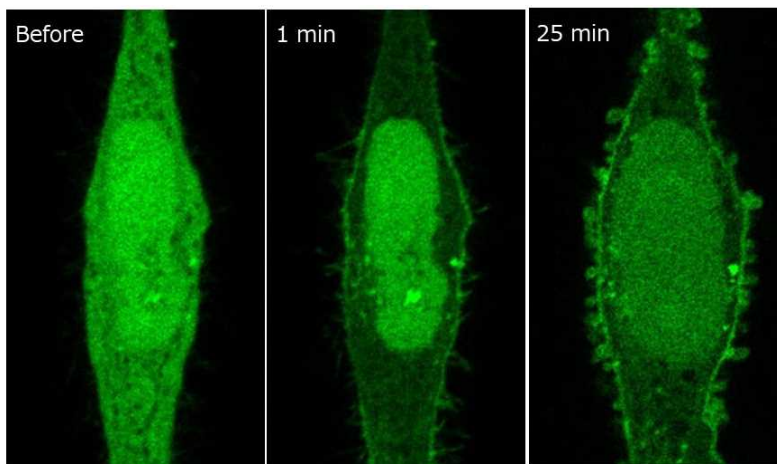


図5 図4と同様の実験条件で、共焦点顕微鏡にて観察した。処理後1min未満で細胞質のDHFR-GFP-VPS4は細胞膜へ移行し、20-25min程度で多数の小胞が細胞膜上に形成され、次いでリリースされた。コントロールとして、DHFR-GFPのみを発現した細胞にて同様の処理を行った場合では、小胞形成は認められなかった。

ると、細胞膜上で多数のループ状構造が観察され(図4、5)、その後多数の小胞が放出されることに伴って細胞死が誘導された。この結果は傷跡除去タンパク質の細胞膜への強制移行は細胞膜からの小胞様構造の放出に十分であり、光操作が成功したことを示している。またこの操作は細胞の増殖に対しては負の影響があることを示している。次に局所的に青色光照

射を行って傷跡除去タンパク質を局所的に細胞膜局在させたところ、照射箇所特異的に細胞膜の変形が認められたが、細胞死は誘導されなかったことから、ループ状構造の形成と小胞放出は傷跡除去タンパク質の細胞膜移行の結果であり、細胞死による二次的な影響ではない。

(3) 傷跡蓄積の細胞老化に対する影響

様々な細胞老化誘導刺激において、カルシウムイオンを介したシグナル伝達経路が鍵を握ることが知られている。そこで次に、傷跡の蓄積がカルシウムイオンに対する応答に影響を及ぼすかを検討した。若く傷跡の蓄積していないヒト正常細胞と、傷跡が蓄積しているもののまだ老化に至っていないヒト正常細胞を用い、カルシウムプローブを導入して、 Ca^{2+} シグナルを誘導した。その結果、傷跡が蓄積している細胞の方が顕著に早く応答した(図6)。この結果は傷跡の蓄積により環境からの老化誘導刺激が容易に細胞内へ到達することを示唆している。

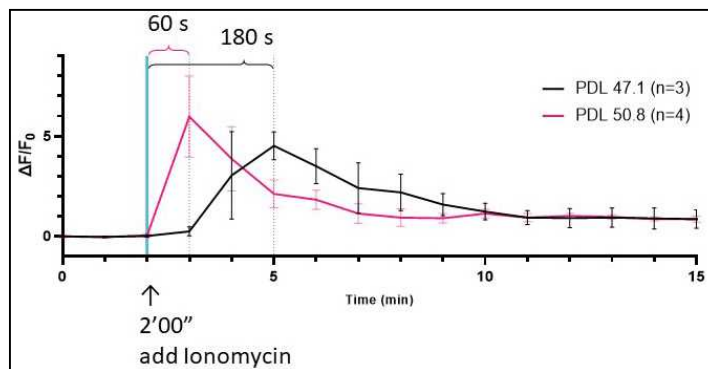


図6 傷跡の少ないヒト正常線維芽細胞(黒)と傷跡が蓄積したヒト正常線維芽細胞(マゼンタ)を刺激しシグナル強度を定量した。傷跡の少ない細胞では刺激後約180秒で細胞質のカルシウムイオン濃度がピークを迎えたのに対し、傷跡の多い細胞では刺激後約60秒でピークを迎えた。

以上より、傷跡の蓄積は細胞膜のバリア機能の低下を誘導し老化誘導刺激に対する耐性を失わせることにより、細胞老化を促進していると考えられる。

3. 今後の展開

上記のように、さきがけ研究を基盤として、細胞膜損傷を起点とする様々な細胞応答の分子基盤と生理的意義を解明する学問分野として展開していく基礎が構築されつつある。特に細胞膜損傷を起点とする老化細胞特有のマーカーを同定し、それを手掛かりにマウス個体のどこに細胞膜損傷による老化細胞が存在するかを明らかにすることで、生体内における意義を解明すべく解析を進めている。

4. 自己評価

研究開始当初の達成目標である「光操作を用いて傷跡仮説を検証する」という目的については、予定通り達成した。得られた結果は傷跡仮説を支持するものではなかったが、細胞膜損傷による細胞老化の分子基盤として別の機構が複数明らかになったほか、細胞膜損傷を起点として、細胞老化だけでなく様々な細胞応答が誘起されること、細胞膜損傷を経験した細胞が生体内に存在することを示唆する結果が得られた。また、論文として発表するに至らずとも、将来の発展が見込める興味深い知見が多数得られた。また光操作領域のさきがけ研究者(吉井達之研究者、丸山剛研究者、野間健太郎研究者、高山和雄研究者)との共同研究も行った。以上よ

り、将来の研究の発展につながる成果があったと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 3件

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[#]. Cdk1-mediated DIAPH1 phosphorylation maintains metaphase cortical tension and inactivates the spindle assembly checkpoint at anaphase. (2019) *Nat. Commun.* 10: 981. **#Co-corresponding authors**

アクチン重合因子の不活性化を抑制することで細胞膜を硬化させると、細胞周期チェックポイント(スピンドルチェックポイント)の活性化が誘導され、分裂後期で細胞周期が一時停止することを見出した。

2. Hatakeyama R, **Kono K** and Yoshida S. Ypk1/Ypk2 kinases maintain Rho1 at the plasma membrane by flippase-dependent lipid remodeling after membrane stresses. (2017) *J. Cell. Sci.* 130: 1169-1178.

細胞膜損傷部位における脂質構成の変化が細胞膜修復因子の損傷部位への維持に寄与することを明らかにした。

3. **Kono K** and Ikui AE. A new cell cycle checkpoint that senses plasma membrane/cell wall damage in budding yeast. (2017) *BioEssays.* 39(4): 1600210. **Featured on the cover. Corresponding author**

全ての生物に先駆けて出芽酵母で見出された細胞膜損傷により誘起される細胞周期チェックポイントについて報告した。雑誌表紙。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表(全て招待による)

1. **Kono K**. “Down-regulating cortical tension ensures timely chromosome segregation” (2020 June) The 72nd Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Online, **Symposium**

2. **Kono K**. “Cdk1-mediated DIAPH1 phosphorylation maintains metaphase cortical tension and inactivates the spindle assembly checkpoint at anaphase” (2019 Mar) The 16th International Membrane Research Forum, OIST, Okinawa

3. **Kono K**. “Mechanisms and consequences of wound healing, from single cells to tissues” (2018 Nov) The 48th Japanese Society for Wound Healing, Iino Hall & Conference Center, Tokyo, **Educational Keynote**

4. **Kono K**. “Cell surface damage determines cell destiny in budding yeast” (2018 Sep) The 70th Society for Biotechnology Japan Annual Meeting, Kansai University, Osaka, **Workshop**

5. **Kono K**. “Yeast as a tool to reveal wound healing mechanisms” (2018 Sep) The 22nd

Yeast Joint Symposium, Kyusyu University, Fukuoka, **Symposium**

6. Kono K. “Plasma membrane damage limits replicative lifespan” (2017 Dec) ConBio2017,

Kobe Port Island, Hyogo, **Workshop**