

## 細胞創傷治癒の分子基盤とその帰結

河野 恵子

この世界で最初の細胞は、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の成立により誕生した。したがって、細胞膜の傷を修復する「細胞創傷治癒」の仕組みは生命誕生の瞬間から必要とされただろう。細胞創傷治癒の欠損は筋ジストロフィー症など、さまざまな疾病に関与するが、そのメカニズムは未だ不明な点が多く残されている。筆者らは出芽酵母を用いて細胞創傷治癒に関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、分裂寿命の短縮を誘導することなどを明らかにした。また細胞膜損傷チェックポイントや分裂寿命の短縮はヒト培養細胞まで進化的に保存されていることなどが明らかになりつつある。

### 細胞創傷治癒機構の概要

**高等真核生物の細胞創傷治癒機構** 細胞膜は物理的傷害だけでなく、筋肉の収縮など生理的な活動によっても傷つく。そのような傷は数秒から数分のうちに修復される。これまでに、細胞膜の傷の周りにアクチンや微小管、Rho型GTPase、膜小胞などが集まり、細胞質分裂とよく似た様式で修復されること、この仕組みに欠損があるとデュシェンヌ型筋ジストロフィー症を発症することなどが知られている。特に2014年Jimenezら<sup>1)</sup>の報告以降、ESCRT複合体が損傷した膜の根元にコイルのような構造を作り、損傷部位を縊り切ることで修復するというメカニズムが目覚ましいスピードで解明されつつある。一方で、細胞全体が細胞膜損傷に対しどのように応答するかについては理解が遅れている。そこで筆者らは、医学・生物学の歴史の中で「新たな現象に関与する遺伝子を網羅的に同定する」という局面で重要なツールとなってきた酵母遺伝学を用いて、細胞創傷治癒機構の全貌を解明することを目指した。

**出芽酵母の細胞創傷治癒機構** まず、出芽酵母が高等真核生物と類似の細胞創傷治癒機構を有するかを検討する目的で、レーザー光で細胞表層を局所的に傷つけ、ライブセルイメージングで修復過程を観察するレーザーダメージ実験系を確立した<sup>2)</sup>。この実験により出芽酵母細胞にも細胞創傷治癒機構が存在することを示したほ

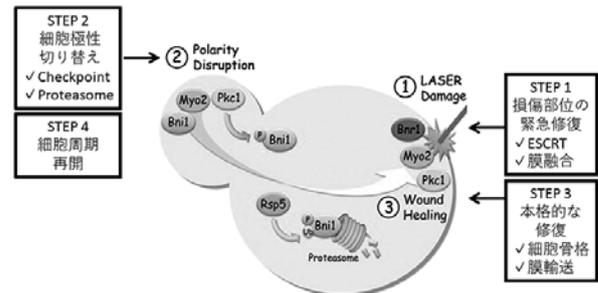


図1. 出芽酵母における細胞創傷治癒機構。細胞表層に局所的損傷を受けると、1) 損傷部位の緊急修復、2) 娘細胞から損傷部位への細胞極性切り替え、3) 損傷部位の本格的な修復、4) 修復完了後の細胞周期再開、の四段階を経て通常の増殖に復帰する。

か、娘細胞への細胞極性を失わせ、損傷部位に新たな極性を確立して修復反応を開始するためにプロテアソームによる細胞極性制御タンパク質の分解が必須であることを示した<sup>3)</sup>。さらに、細胞膜の局所的損傷はDNA複製を抑制するとともにサイクリン依存性キナーゼを不活性化し、細胞周期をG1期で一時停止させることを見いだした(細胞創傷治癒チェックポイント)<sup>4)</sup>。

さらなる解析により、出芽酵母の細胞創傷治癒機構は1) 損傷部位の緊急修復、2) 娘細胞から損傷部位への細胞極性切り替え、3) 損傷部位の本格的な修復、4) 修復完了後の細胞周期再開、の四段階からなることが明らかになった。これまでに報告したプロテアソームによる細胞極性切り替えと細胞創傷治癒チェックポイントはいずれも2)に含まれる。1)にはESCRT複合体や細胞質カルシウムイオンに依存した膜融合機構、3)には細胞骨格や膜輸送機構が重要であることが示唆されている(図1)。

### 細胞膜損傷は老化を誘導する

**細胞膜損傷は出芽酵母の分裂寿命を短縮する** 以上のように出芽酵母にも高等真核生物と類似の細胞創傷治癒機構が存在することが明らかになったので、出芽酵母の遺伝子ノックアウトライブラリーを用いて細胞膜損傷後の生存に必須な遺伝子のスクリーニングを行った。驚いたことに、筆者らのスクリーニングで同定された遺伝子を機能グループに分類すると、半数以上が「分裂寿命(一つの細胞が増殖停止までに分裂する回数)」の維持に

必要な遺伝子の機能グループと重複していた。このことは細胞創傷治癒と分裂寿命の短縮との間に未知の深い関わりがあることを示唆している。

分裂寿命とは1960年代にHayflickらが確立した概念である。ヒト正常細胞を培養皿で培養すると、約50回分裂して増殖を不可逆的に停止する。Hayflickはこの不可逆的な増殖停止を細胞老化と定義し、増殖停止するまでの分裂回数を分裂寿命と呼んだ<sup>5)</sup>。当時、がん細胞の研究を基にした「ヒト細胞は理想的な培養条件の下では無限に増殖する」という考えが支配的であったため、Hayflickの結果は当初アーティファクトであるとみなされたが、その後テロメアの短縮などメカニズムの詳細が解明されるにつれ、細胞老化という概念も受け入れられた。現在ではテロメアの短縮に加え、DNA損傷、ミトコンドリア機能低下、酸化ストレス、代謝異常など、さまざまなストレスが細胞老化を促進することが知られているほか、細胞老化が個体老化に寄与することもマウスを用いた実験により明らかになっている<sup>6,7)</sup>。

出芽酵母も約30回分裂すると増殖を不可逆的に停止することが知られている。そこで、細胞創傷治癒と分裂寿命との関わりを説明する作業仮説として、「細胞表層が傷つくと分裂寿命が短縮する」という可能性を考えた。まず筆者らのスクリーニングで同定された出芽酵母遺伝子破壊株で分裂寿命を測定したところ、多くの株で分裂寿命が短縮していた。次に野生型の出芽酵母に細胞膜損傷を与え分裂寿命を測定したところ、1/3程度に短縮していた。これらの結果より、細胞表層の損傷は出芽酵母の分裂寿命を短縮すると考えられる。

**細胞膜損傷はヒト正常細胞の老化を誘導する** 次に進化的保存性について検討した。ヒト正常繊維芽細胞に細胞膜損傷を与えた後、通常の培養条件に戻し増殖を再開させると、細胞膜損傷の強度に応じて分裂寿命が短縮した。半数の細胞が致死となる程度の細胞膜損傷を与えると、生き残った細胞は増殖を即時停止し、各種細胞老化マーカーの発現などを含む急性の細胞老化様の表現型を示した。したがって、細胞膜損傷による分裂寿命短縮は進化的に保存された現象であることが示唆された。

### Scar 仮説

**細胞膜上の突起状構造 Scar (傷跡)** 細胞膜損傷による分裂寿命の分子基盤を追及するため、細胞膜損傷後の細胞と老化細胞の共通点を探索した結果、どちらも細胞膜上にフォスファチジルセリンを露出した突起状構造

(Scar)を持つことが明らかになった。フォスファチジルセリンは細胞膜の内膜側に少量存在し、アポトーシスなどの際に外膜側に露出することが知られているが、細胞膜損傷による Scar 形成はアポトーシスとは独立に起こっていた。そこで「Scar 形成が分裂寿命短縮に寄与する」という作業仮説を検討する目的で、出芽酵母から遺伝学的操作により Scar を除去したところ、分裂寿命が延長した。この結果は筆者らの作業仮説を支持しているが、現在までのところ Scar 除去が直接的に寿命延長に寄与するか否かは結論が出ていない。今後さらなる解析が必要である。

Scar が分裂寿命短縮を誘導する分子基盤として、Scar 形成による細胞膜の流動性の低下などを介して非ストレス条件下でも細胞質への  $H^+$  や  $Ca^{2+}$  などの流入が促進され、タンパク質、脂質、各種オルガネラなどにストレスを与えることで細胞老化を加速する可能性が考えられる。実際、筆者らがこれまでに解析したヒト不死化細胞では Scar が蓄積しないことから、Scar が何らかの形で増殖停止を促し、細胞老化を促進する作用を有する可能性は高い。

### 細胞膜損傷の帰結

**細胞膜損傷は細胞に三つの運命を導く** これまでの解析から、細胞膜損傷を受けた細胞の運命は、1) 細胞周期チェックポイントの活性化(増殖の一時停止)、2) 細胞老化(増殖の恒久的停止)、3) 細胞死、の三つに帰結することが明らかになりつつある。1) と 2) のメカニズムは徐々に解明されつつあるものの、現在までのところ 3) に関してはまったく不明である。今後は細胞創傷治癒の分子基盤の全貌解明とともに、細胞膜損傷後の細胞運命決定機構、さらにそれぞれの運命の生体内における意義を解明することを目指したい。

### 文 献

- 1) Jimenez, A. J. *et al.*: *Science*, **343**, 1247136 (2014).
- 2) Kono, K. *et al.*: *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2016**, 8 (2016).
- 3) Kono, K. *et al.*: *Cell*, **150**, 151 (2012).
- 4) Kono, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 6910 (2016).
- 5) Hayflick, L. and Moorhead, P. S.: *Exp. Cell Res.*, **25**, 585 (1961).
- 6) Baker, D. J. *et al.*: *Nature*, **479**, 232 (2011).
- 7) Baker, D. J. *et al.*: *Nature*, **530**, 184 (2016).