

## 【総 説】

# 染色体機能ドメインのキネトコアと細胞老化

前原佳代子

国立成育医療研究センター研究所 周産期病態研究部 胎児発育研究室

### 要約

*in vitro*で培養された正常細胞は、ある一定回数分裂した後に増殖を止める。この増殖停止を「細胞老化」という。Hayflickらによって報告された複製老化は、染色体複製と分裂を繰り返すことに伴うテロメアの短縮により誘導される。また、活性化がん遺伝子がもたらす過剰な増殖刺激やDNA損傷や酸化ストレスはストレス誘導性老化の引き金になる。最近、均等な染色体分配を保障するキネトコアの異常が、細胞老化を引き起こすことが報告されている。本稿では、マウスやヒトの正常細胞を利用したキネトコア研究から得られた成果を中心に、キネトコアの機能不全と細胞老化の関係を紹介する。

**キーワード：** CENP-A, kinetochore, p53, SAC, senescence

### 1. はじめに

細胞老化は、正常細胞の非可逆的な増殖停止 (irreversible growth arrest) と定義され、Hayflickらにより提唱された複製老化 (replicative senescence) [1]と、ストレスによって起きるストレス誘導性細胞老化 (stress-induced senescence; SIS) に分類される。1997年にSerranoらが、活性化がん遺伝子*ras*導入によって正常細胞に過剰な増殖刺激が加わるとSISが誘導されること[2]を報告して以降、酸化ストレス、DNA障害など様々なストレスがSISの誘導に関与することが示された (図1A)。細胞周期研究から、がん抑制の主要な経路であるp16-Rb経路とp53経路が、細胞老化という非可逆的な増殖停止に重要な役割を果たすことが明らかにされている[3-6] (図1B)。また、2003年に成田らによって、老化したヒトの線維芽細胞に特徴的なヘテロクロマチン構造が生じることが報告された[7]。Senescence-associated heterochromatic foci (SAHF) と命名されたヘテロクロマチン構造には、ヘテロクロマチンタンパク質1 (Heterochromatin protein 1; HP1)、トリメチルヒストンH3K9 (H3K9me3)、macroH2A、High-Mobility Group A protein (HMGA) が集積する[7-9]。逆に、リンカーヒストンH1は老化した細胞核から消失する[10]。細胞周期進行に必須な転写因子E2F[11]のターゲット遺伝子のプロモーター領域におけるヘテロクロマチン化による発現低下などエピジェネティックな遺伝子発現制御とあわせて、SAHFが非可逆的な増殖停止の確立・維持

に関与することが示唆され、クロマチン構造に着目した細胞老化の研究が芽生えつつある。

さて、細胞核に納められたゲノム情報は、細胞周期のS期で複製され、M期に凝縮した2本の姉妹染色分体になり、それぞれが娘細胞へ均等に分配される。染色体が分配される時に紡錘体が結合する領域には、DNAと複数のタンパク質からなる高次複合体が形成され、この特殊な構造はキネトコア (kinetochore) (動原体) とよばれている (図2A)。キネトコアが形成されるDNAの領域をセントロメア (centromere) という。真核生物の染色体は、セントロメア、テロメア (telomere)、複製起点の3種類のDNA配列があれば、自律的な染色体として細胞で機能する。染色体末端に位置するテロメアは、末端複製問題 (複製の際に完全に複製できずに1細胞世代に50~100bpずつ短くなる) のため、テロメア長を維持するテロメラーゼ (telomerase) 活性がきわめて低いヒト体細胞では、分裂のたびに短縮する。テロメアの短縮とそれに伴う機能不全が複製老化の内的要因であり、テロメアは有力な老化の生物時計と考えられている[5, 12]。それでは、細胞周期と協調的に進行する染色体分配を制御するキネトコアには、細胞が老化する過程で、その構造や機能になんらかの変化が生じるのであろうか? また、キネトコアへのストレスはSISを誘導するのであろうか? ヒトの細胞を使ったキネトコアの機能解析は、HeLa細胞など不死化・がん化した細胞を利用し、精力的に行われている。これらの研究は、M期の染色体分配におけるキネトコアの役割について多くの知見をもたらしたが、キネトコアの機能や構造の変化が増殖にあたえる影響を解析する目的には適さない。本稿では、ヒト・マウスの正常細胞あるいは個体を用いて行われたキネトコア研究をもとに、キネトコアと細胞老化の関連について解説したい。

連絡先：〒157-8535  
東京都世田谷区大蔵2-10-1  
TEL: 03-3416-0181  
FAX: 03-3417-2864  
E-mail: kmaehara@nch.go.jp

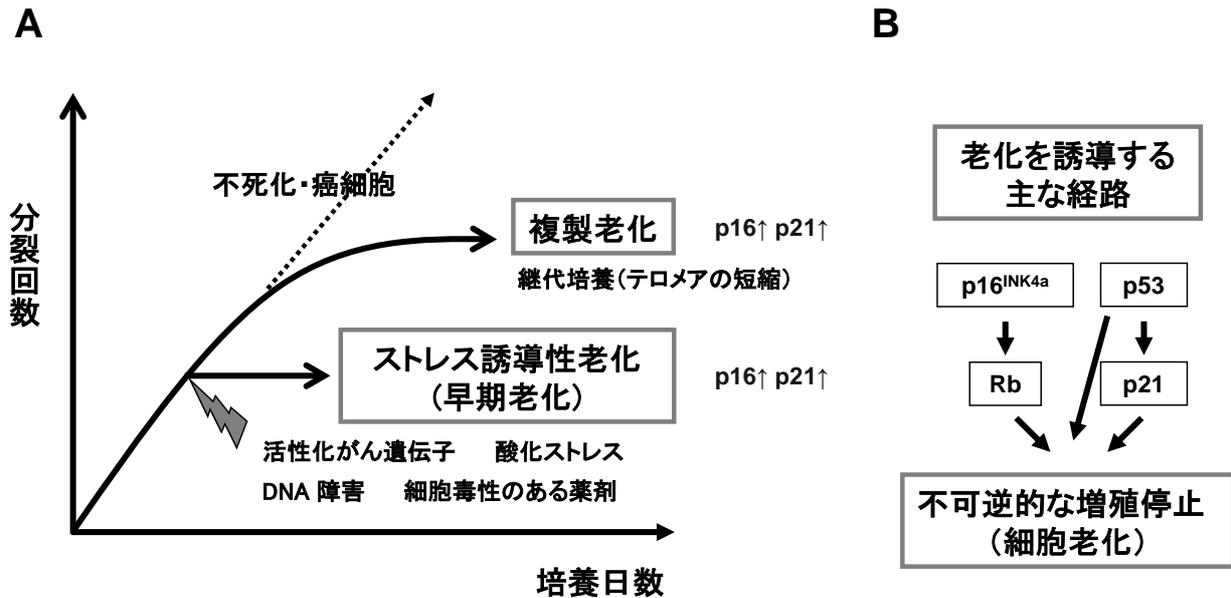


図1 細胞老化

A. 複製老化とストレス誘導性老化(早期老化) B. 老化を誘導する主要な経路 実際にはp16-Rb経路とp53経路はバラレルではなく、クロストークしている。

## 2. セントロメアに局在するタンパク質

出芽酵母のセントロメアは、CDEI、CDEII、CDEIIIと呼ばれる125bpのDNAから構成され、セントロメア領域はDNAの一次配列によって決まる。ところが、高等脊椎動物のセントロメアDNAは、紡錘体が付着して機能するために必要な共通配列を持たない。そのかわりに、セントロメアに局在するタンパク質は、酵母からヒトまで高度に保存され、それらのなかでもcentromere protein A (CENP-A) というヒストンH3バリエーションがセントロメア特異的なヌクレオソームに含まれ、機能的セントロメアを決定する分子であると考えられている[13] (図2B)。CENP-Aのほかに、CENP-B、CENP-C、hMis12などは細胞周期を通じてセントロメアに局在する構成的セントロメアタンパク質である。CENP-BはDNA結合タンパク質であり、セントロメアを形成する $\alpha$  satelliteとよばれる反復配列に存在する17 bpのCENP-B boxに結合し、セントロメアのヘテロクロマチン構造の維持に関わる[14]。G2期からM期にかけて一過性にセントロメアに局在するタンパク質として、モータータンパク質であるCENP-Eや紡錘体チェックポイント(spindle assembly checkpoint; SAC)タンパク質のMad2、Bub1、BubR1などが挙げられる。細胞分裂時に、紡錘体とキネトコアの結合に不具合が生じると、SACが働き、一時的に細胞周期の進行が停止する[15]。したがって、国内外の多くのグループが、染色体の不安定性・異数体形成、そしてがん化との関連という観点から、キネトコアの機能解析を精力的に行っている。

## 3. 老化とともに発現が低下するキネトコアタンパク質

Lyらは、若年、中年、老年そしてHutchinson-Gilford

という稀な早老症の皮膚の線維芽細胞を用い、約6000の遺伝子の発現レベルを高密度オリゴヌクレオチドアレイで解析した[16]。若年と中年の比較で、発現レベルに2倍以上の違いを認めた61遺伝子のうち、細胞周期の進行に関わる遺伝子が15個同定された。そのなかには、CENP-A、CENP-F、kinesin-related proteins、mitotic centromere-associated kinesin (MCAK) など染色体分配に関わるものが含まれる。これらの遺伝子発現の低下は、若年と老年、さらに若年と早老症の比較においても共通して認められ、老化とともに、キネトコアの機能不全が生じうることを示唆している。

## 4. BubR1やRae1/Bub3の低発現マウスは早期に老化する

がん化とSACの関連を解析するために、Mad2、Bub3、BubR1、Bub1などのノックアウトマウスが作成された。Mad2<sup>-/-</sup>、Bub3<sup>-/-</sup>、BubR1<sup>-/-</sup>、Bub1<sup>-/-</sup>はいずれも胎生致死であるため、heterozygous miceやhypomorphic miceが解析に用いられている。それらのSACタンパク質のなかで、BubR1をコードするBub1bの低発現マウス(Bub1b<sup>HM</sup>)が早期老化の表現型を示すことが報告された[17]。続いてRae1/Bub3 double heterozygous miceも早期に老化することが報告された[18]。これらの研究は、一部のSACタンパク質の低下が、個体老化に関与することを示唆する。Bub1b<sup>HM</sup>から得たmouse embryonic fibroblasts (MEF)では、野生型から得られたMEFに比べ、p53、p21、p19<sup>Arf</sup>、p16が高発現している。さらにp16<sup>-/-</sup>とBub1b<sup>HM</sup>、あるいはp19<sup>Arf</sup>とBub1b<sup>HM</sup>を掛け合わせたマウスの解析から、p16の不活性化がBub1b<sup>HM</sup>で観察される早期老化の表現型を軽減させることが示された[19]。ヒトの場合、BubR1をコードするBUB1Bの変異は、

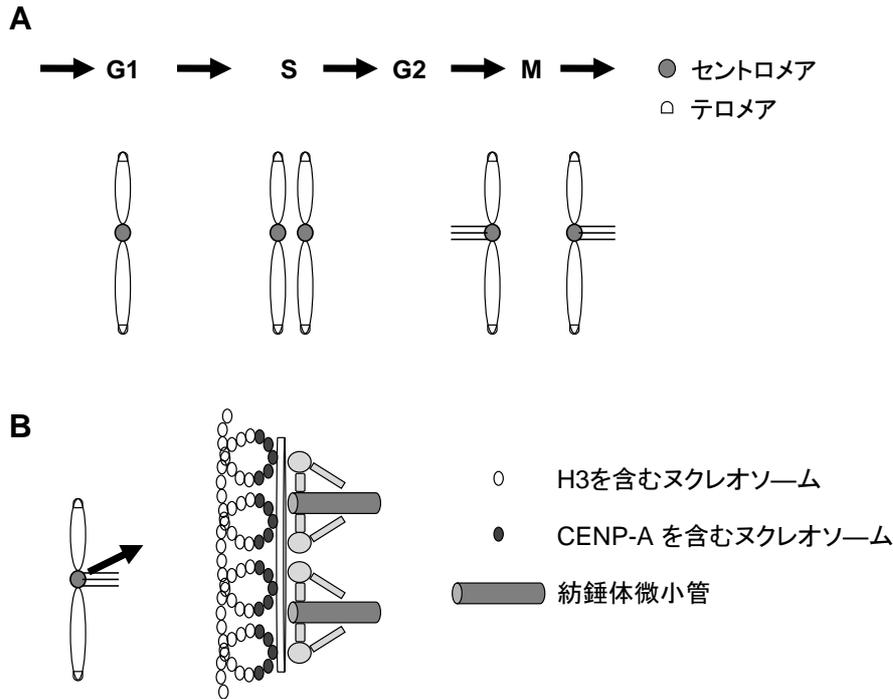


図2 染色体分配を制御するキネトコア

A. 細胞周期（上）と染色体サイクル（下） G2後期からM期にセントロメアDNAに多くのタンパク質がリクルートされ、DNA-タンパク質複合体（キネトコア）が形成される。中心体から伸びてきた紡錘体がキネトコアに付着し、姉妹染色分体が娘細胞に均等分配される。B. キネトコアの拡大図 CENP-Aが機能的セントロメアを決めている。

mosaic variegated aneuploidy (MVA) という疾患を引き起こす[20]。MVAでは、aneuploidy、白内障、発育不全などの症状を認め、SACとがん化の関連を直接示した唯一のヒト疾患であるが、白内障を除く他の老化の表現型は観察されない。*Mad2*、*Bub1*のheterozygous miceやhypomorphic miceは、野生型に比べ、自然発生・発癌物質による腫瘍を生じやすくなるが、明らかな表現型を示さない[21, 22]。Mad2をノックダウンしたヒト正常細胞では、老化の表現型は観察されない（著者ら未発表データ）。その一方で、ヒトの正常細胞で*Bub1*を低下させると速やかに増殖が止まり、老化する[23]。SACは、有糸分裂時にすべての染色体のキネトコアと紡錘体の結合を監視する役割を担い、SACの機能不全は異数体の形成やがん化につながると考えられている。一部のSACタンパク質の低下が個体老化や細胞老化に関与することは興味深い。しかし、先に述べたSACタンパク質の低下による表現型の違いが何に起因するのか、その詳細は明らかでない。

## 5. 構成的セントロメアタンパク質と細胞老化

著者らは、細胞周期を通じてセントロメアに局在する構成的セントロメアタンパク質に老化に特異的な変化が生じるのではないかと考え、ヒトの複製老化細胞と活性化がん遺伝子*ras*を導入しSISをおこした細胞を主たる材料として解析を行っている。その研究過程で、ヒトの複製老化とSISのセントロメア領域に共通して、1)キネトコア構造の「足場」となるCENP-Aタンパク質の量が顕著に減少する、2)セントロメア領域でのヘテロクロマチン化に重要な役割を果たすCENP-Bが増加する、とい

う変化を見出した[24]（図3）。血清飢餓と接触阻害によって得た静止細胞と老化細胞を比較すると、CENP-A mRNAのレベルはともに低下しているが、CENP-Aタンパク質の量的低下は、老化細胞にのみ認められる。CENP-Aタンパク質は非常に安定であるため、老化した細胞では、転写調節以外にタンパク質の分解などの機構が、その量的低下に関与していることが推測される。

また、CENP-Aタンパク質の量を人為的に減少させると、ヒト正常細胞は老化する（図4）。ところが、CENP-AをノックダウンしたHeLa細胞は、染色体の分配異常を生じながら増殖し続ける。ヒト正常細胞であらかじめp53を不活性化すると、CENP-Aの減少で誘導される細胞老化は観察されず、細胞は増殖する。その結果、分裂前中期の延長や染色体分配異常を示す細胞が増加する。この分裂期の染色体分配の異常は、p16-Rb経路とp53経路が機能していないHeLa細胞でのCENP-Aノックダウンの表現型と似ている。これは、p16-Rb経路とp53経路が機能している正常細胞において、CENP-Aの減少がp53に依存して細胞老化を誘導しうることを意味する。

まとめると、著者らが得た結果は2つのことを意味する。ひとつは、老化した細胞では、構成的セントロメアタンパク質のセントロメア上での構成比率が変化し、セントロメアのヘテロクロマチン化が促進すること（セントロメアの不活性化）、もうひとつは、機能的セントロメアを決定しているCENP-Aの低下というキネトコアの構造・機能に重篤な障害を与えうるストレスは、一部のSACタンパク質の低下と同様に、正常細胞をSISに導くことである。

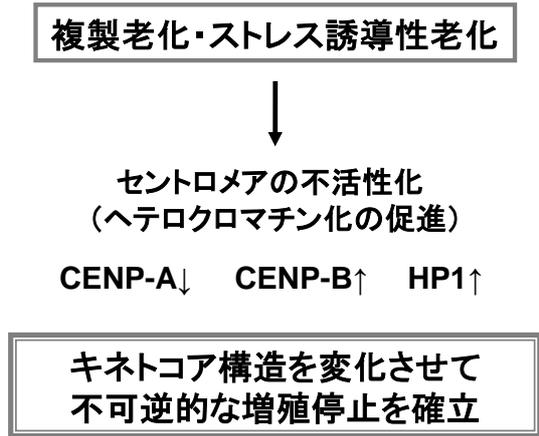


図3 ヒト老化細胞で観察されるセントロメア構造の変化

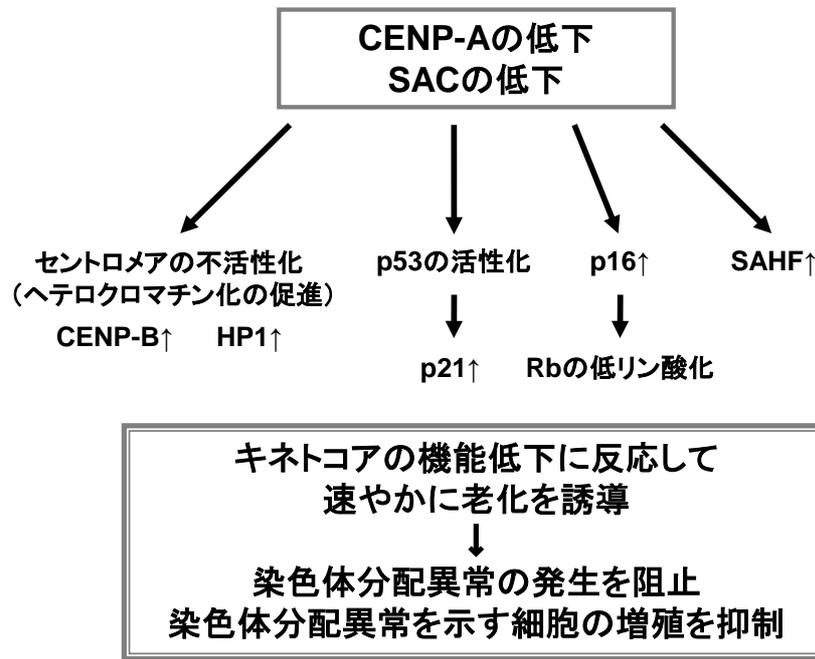


図4 キネトコアの機能の低下は、細胞老化を誘導する

### 6. セントロメアの不活性化の機構

ヒトの場合、本来セントロメアとして機能していた領域とは異なる場所に、機能的セントロメアが形成されることが稀に起こる。新しく形成された機能的セントロメアは、ネオセントロメア (neocentromere) とよばれ、これまでに19本の染色体上に70個のネオセントロメアが報告されている。ネオセントロメアが形成される際には、もともと機能的セントロメアとして染色体分配の制御に関わった領域は不活性化される。1本の染色体につき1つの機能的セントロメアを維持することで、1本の染色体が2本に引き裂かれることがないように、セントロメアの不活性化が起きると考えられている。線虫は、1本の染色体上に複数の機能的セントロメアを持ち、ヒトとは異なる。

舂本らは、ヒト人工染色体 (human artificial chromosome : HAC) を作成し、新規にセントロメアが形成される機構を精力的に研究している。HACが細胞核内

に取り込まれ、ホストゲノムとは独立して維持される場合、CENP-BとCENP-B boxとよばれるCENP-Bの結合配列が必要であり、その両者がHAC上にCENP-Aをリクルートし、HACはセントロメアの機能を獲得する[25]。また、HACがホストゲノムに挿入された場合、CENP-BがHAC周辺のヒストンH3K9のトリメチル化とDNAのメチル化を増強し、ヘテロクロマチン化を促進するため、新規にセントロメア機能を獲得することなく不活性化される。これらの結果は、CENP-Bには、新規にセントロメアの機能を獲得する作用と、セントロメアを不活性化するという作用があり、環境に応じてその作用が使い分けられていることを示唆する。さらに、HAC周辺のエピゲノム環境を人為的に操作することで、新規のセントロメア機能を獲得したHACを不活性化することができる[26, 27]。例えば、セントロメアはCENP-Aを含むヌクレオソームの間にジメチルヒストンH3K4 (H3K4me2) を含むヌクレオソームが散在しているが、

セントロメアからH3K4me2を消失させると、*a* satellite DNAからの転写が著しく低下し、CENP-AのシャペロンであるHJURP[28, 29]がセントロメアに効率よくリクルートされず、その結果CENP-Aのセントロメアへの取り込みが低下し、徐々にセントロメアが不活性化する [27]。これは染色体がおかれたエピゲノム環境によって、機能的セントロメアが不活性化されうること示している。老化した細胞では、構成的セントロメアタンパク質であるCENP-Aの低下とCENP-Bの増加を認め、CENP-Bの増加とともにHP1タンパク質のセントロメアへの局在が促進される[24] (図3)。細胞の老化においても、CENP-Bや、セントロメア周辺のエピゲノム環境(ヒストン修飾の状態やDNAのメチル化)が、CENP-Aのセントロメアへの取り込み低下やヘテロクロマチン化の促進、そしてセントロメアの不活性化に関与している可能性がある。次世代にゲノム情報を継承する必要がなくなった細胞にとって、染色体分配の足場となるセントロメアの不活性化は、SAHFの形成と同様に、非可逆的増殖停止を確立・維持するための老化に特異的な構造の変化であるかもしれない。

## 7. SISを誘導するキネトコア機能不全

分裂寿命を持つ正常細胞では、幾つかのSACタンパク質の低下や構成的セントロメアタンパク質CENP-Aの低下は、老化を誘導する(図4)。これは、染色体分配異常の発生を未然に阻止する、あるいは染色体分配の異常を生じた場合でも、異常な細胞の増殖を阻止する、正常細胞に備わった機構であると推察される。キネトコアとともに染色体の分配装置として重要な役割を果たす中心体に局在するタンパク質transforming acidic coiled coil 3 (TACC3)の低下も速やかに老化様の表現型を示すことが報告された[30]。活性化がん遺伝子による異常な増殖刺激によるSISでは、p53の活性化にDNA damage response (DDR) が関与する事が複数のグループから報告されている[31-33]。しかし、CENP-Aをノックダウンした時には、DDRの関与を積極的に肯定する結果は得られていない[24]。活性化がん遺伝子による過剰な増殖刺激(DNA複製ストレス)と染色体分配を制御するキネトコアや中心体へのストレスでは、ともに老化という表現型に至るが、インプット(ストレス)とアウトプット(老化)の間には、異なる因子や経路が介在しているのかもしれない。キネトコアの機能不全が、どのように監視され、老化の主要な誘導経路であるp16-Rbやp53を活性化するのか、今後の研究に期待したい。

## 8. おわりに

以上、染色体の機能ドメインであるキネトコアと細胞老化・個体老化の関連について概説した。染色体の不安定性に直結するキネトコアへの致命的なストレス(紡錘体付着部の足場を形成する構成的タンパク質の消失や、SACタンパク質の機能不全など)が加わると、正常な細胞では安全装置として速やかに増殖を停止し、老化すると推察される。キネトコアの機能不全が老化を誘導する

詳細な分子メカニズムは、今後の研究によって明らかにされていくと考えられる。また、HACやネオセントロメアの研究からセントロメアの活性化と不活性化に関わる様々な因子が、少しずつ明らかにされてきている。老化で観察されるセントロメアの不活性化にも、これまでに同定された因子が関与しているのか、興味深い課題である。

## 引用文献

1. Hayflick L, and Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621, 1961.
2. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, et al. Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. *Cell* 88:593-602, 1997.
3. Hara E, Smith R, Parry D, et al. Regulation of p16<sup>CDKN2</sup> expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 16:859-867, 1996.
4. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, et al. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13742-12747, 1996.
5. Ben-Porath I, and Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37:961-976, 2005.
6. Collado M, Blasco MA, and Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130:223-233, 2007.
7. Narita M, Nuñez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113:703-716, 2003.
8. Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, et al. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8:19-30, 2005.
9. Narita M, Narita M, Krizhanovsky V, et al. A novel role for High-Mobility Group A proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126:503-514, 2006.
10. Funayama R, Saito M, Tanobe H, et al. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 175:869-880, 2006.
11. Maehara K, Yamakoshi K, Ohtani N, et al. Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J Cell Biol* 168:553-560, 2005.
12. Deng Y, Chan SS, and Chang S. Telomere dys-

- function and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 8:450-458, 2008.
13. Cleveland DW, Mao Y, and Sullivan KF. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112:407-421, 2003.
  14. Masumoto H, Masukata H, Muro Y, et al. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 109:1963-1973, 1989.
  15. Musacchio A, and Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:379-393, 2007.
  16. Ly, DH, Lockhart DJ, Lerner RA, et al. Mitotic misregulation and human aging. *Science* 287:2486-2492, 2000.
  17. Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, et al. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet* 36:744-749, 2004.
  18. Baker DJ, Jeganathan KB, Malureanu L, et al. Early aging-associated phenotypes in Bub3/Rae1 haploinsufficient mice. *J Cell Biol* 172:529-540, 2006.
  19. Baker DJ, Perez-Terzic C, Jin F, et al. Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat Cell Biol* 10:825-836, 2008.
  20. Hanks S, Coleman K, Reid S, et al. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in *BUB1B*. *Nat Genet* 36:1159-1161, 2004.
  21. Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, et al. *MAD2* haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 409:355-359, 2001.
  22. Jeganathan K, Malureanu L, Baker DJ, et al. Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J Cell Biol* 179:255-267, 2007.
  23. Gjoerup OV, Wu J, Chandler-Militello D, et al. Surveillance mechanism linking Bub1 loss to the p53 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8334-8339, 2007.
  24. 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* 30:2090-2104, 2010.
  25. Okada T, Ohzeki J, Nakano M, et al. CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell* 131:1287-1300, 2007.
  26. Nakano M, Cardinale S, Noskov VN, et al. Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Dev Cell* 14:507-522, 2008.
  27. Bergmann JH, Rodríguez MG, MC Martins N, et al. Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J advance online publication* doi:10.1038/emboj.2010.329
  28. Foltz DR, Jansen LE, Bailey AO, et al. Centromere-specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* 137:472-484, 2009.
  29. Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, et al. HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* 137:485-497, 2009.
  30. Schmidt S, Schneider L, Essmann F, et al. The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. *Oncogene* 29:6184-6192, 2010.
  31. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444:633-637, 2006.
  32. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444:638-642, 2006.
  33. Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, and Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 21:43-48, 2007.

# Cellular senescence as a self-defense mechanism against centromere dysfunction

Kayoko Maehara

National Research Institute for Child Health and Development

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 function is essential for the faithful segregation of chromosomes during mitosis and meiosis. Recent studies have demonstrated that primary cells appear to induce cellular senescence in response to fatal kinetochore 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.

Keywords: CENP-A, kinetochore, p53, SAC, senescence