

「生命活動のプログラム」
平成8年度採択研究代表者

柳田 充弘

(京都大学大学院生命科学研究科 教授)

「細胞周期における染色体制御に必須な高次複合体の解明」

1. 研究実施の概要

細胞周期M期において起こる染色体分配機構を分子レベルで理解するために、分裂酵母をモデル系として研究を推進した。今年度の研究のハイライトはMis6タンパク質がCENP-Aのrecruitment因子であることの発見であった。つまりmis6変異体細胞のなかではCENP-Aタンパク質は動原体クロマチンに取り込まれない。CENP-Aの温度感受性株の表現型からも、Mis6のみならずCENP-Aタンパク質は染色体の均等分配に必須であることが明らかであった。ヒストンが染色体の均等分配に必須であることを示せたことは大変大きい。この研究成果は高橋と陳を中心によって得られたものでScience誌に公表され、大きな反響が得られた。前年度から今年度にかけて、出芽酵母のMis12ホモログであるMtw1がやはり動原体タンパクであること、しかも細胞周期のかなり早い時期に姉妹動原体が分離してしまうという驚くべき発見がなされこれを公表した。この研究で大学院生の五島は出芽酵母の動原体の奇妙なふるまいを完全に証明し、これを説明するモデルを提示できた。この研究はCellに公表され大きな反響があった。また分裂酵母のコヒーシン複合体についての最初の報告をGenes & Developmentに朝長を筆頭著として発表した。これまでに公表された出芽酵母とは類似点もあるが、むしろ相違点が目立った。またCut8タンパク質がプロテアソームの細胞内局在の決定因子であるとの発見をCurrent Biologyに建部を筆頭著者として公表した。プロテアソームの細胞内局在の決定因子として初めてのものである。ほかに未発表の興味深い発見がいくつかなされたがそれらは2001年に発表予定である。

以下に研究実施内容を記載する。

2. 研究実施内容

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科遺伝子伝達学部門(平成10年度までは理学研究科生物物理学教室)において実施された。以下に現在までに得られた研究の成果について項目ごとに分けて説明したい。

染色体分配を起こさせる蛋白分解に必須な複合体の研究

染色体の分離には、Cut2/Securinタンパク質がM期中期にAPC/サイクロソー

ム複合体により、ユビキチン化され、26Sプロテアソームにより分解される事が必要である。我々は中期から後期への移行に欠損を示す変異体の解析から、Cut8タンパク質が26Sプロテアソームの核膜局在に機能するのに重要であることを発見した (Tatebe et al., 2000)。これは26Sプロテアソームの局在に關与するタンパクとして最初の発見であり、現在さらなる解析をおこなっている。また、APC/サイクロソームのサブユニットのうち、ユビキチンライゲース活性の中心として働くと考えられるApc11, Apc2タンパク質の解析を行い、Apc11タンパク質が生育に必須であることを示した。また*apc 2* の変異株を取得し、現在解析中である。

染色体凝縮に必須なコンデンシンの分子機能の研究

我々は、染色体凝縮に必須なコンデンシン複合体のサブユニットのうち、研究申請時から研究の行われていたSMCサブユニットのCut3, Cut14に加えて、新たに同定した3つのnon-SMCサブユニット (Cnd1, Cnd2, Cnd3) が全て染色体凝縮および生存に必須であることを初めて明らかにし、Genes & Development誌に発表した (Sutani et al., 1999)。一方、生化学的な解析も進めており、Cut3-Cut14複合体は、一本鎖DNAを二本鎖にする強力な再生活性を有することをNature誌に報告した (Sutani & Yanagida, 1997)。現在、この活性に必要な部位の解析を進めており、いくつかの知見を得ている。さらに我々は、コンデンシンの5種全てのサブユニットを分裂酵母中で大量発現させ、完全複合体を純化することに成功した。興味深いことに、完全複合体ではCut3-Cut14部分複合体に比べて非常に弱いDNA再生活性およびDNA結合能のみが見られた。non-SMCサブユニットによる活性の制御を示唆する意義深い結果である。共同研究による原子間力顕微鏡を用いた観察からも興味深い結果を得ている。また、non-SMCサブユニットであるCnd2の機能を調べるため、*cnd 2* の温度感受性変異株を単離し、解析を開始したところ、Cnd2がM期染色体凝縮だけでなく、間期にも必須であることを示唆する結果が得られた。現在、間期におけるCnd2の機能についてさらに研究を進めている。

姉妹染色体を結合するアドヘリンとコヒーシン複合体の分子機能の研究

DNA複製をした後の染色体は、分裂期後期にスピンドルによって両極に分配されるまでの間、2本の姉妹染色分体が結合していなくてはならない。我々は、姉妹染色分体間結合の機構を理解するために、分裂酵母におけるコヒーシン複合体タンパク質を同定し、それらの性質を明らかにする研究を進めてきた。SMCサブユニットであるPsm1, Psm3、およびPsc3の遺伝子をクローン化し、これらがRad21とともに複合体を形成していることを示した。出芽酵母ではコヒーシンはM期中期 - 後期移行時に染色体から解離することが知られていたが、驚いたことに分裂酵母においてはコヒーシンは細胞周期を通じて染色体に結合していた。しかし、出芽酵母Scclと同様に、Rad21はM期中期 - 後期移行時に少量分解されて

おり、この分解がM期後期の正常な進行に必須であることを明らかにした。少量のRad21のみが機能に必須であることを示唆するこれらの結果から我々は、コヒーシスが現在広く信じられているような構造タンパク質としてではなく、触媒的に機能するという新たな可能性を提示した。以上の結果はGenes & Development誌に発表された (Tomonaga et al., 2000)。また、我々の見出したもう一つの姉妹染色分体間結合に必須なMis4(アドヘリン)の研究からも、新たな知見を得ている。mis4の高温感受性変異株は、S期を制限温度で通過すると続くM期の進行が遅延する表現型を示すが、この遅延が紡錘体チェックポイント因子であるMad2、Bub1に依存することが明らかとなった。この現象を解析することは姉妹染色分体間結合が、動原体微小管と姉妹動原体との二極性の結合に果たす役割を明らかにするものと期待して現在さらに解析を進めており、論文投稿準備中である。

キネトコアと相互作用するDis1の研究

分裂酵母Dis1はヒトCh-TOG、アフリカツメガエルXMAP215等を含む遺伝子ファミリーに属するタンパク質であり、我々はこれまでにDis1が微小管に結合するタンパク質あり、細胞内で微小管、およびスピンドル極体と共局在することを明らかにした (Nabeshima et al., 1995, Nakaseko et al., 1996)。我々はさらに解析を進展させるため、生細胞中でDis1の動態をタイムラプスで可視化する系を確立した。その結果 Dis1は間期には細胞質微小管と酷似した挙動を示すが、分裂期においては動原体DNA、および動原体タンパク質と極めて類似の挙動を示すことを見出した。この結果は抗チューブリン抗体を用いた間接蛍光抗体法の結果とも一致し、Dis1が分裂中期に動原体に局在が変化することが明らかとなった。さらにクロマチン免疫沈降法の結果、Dis1は分裂期特異的に動原体DNAと物理的相互作用することが明らかとなった。これらの結果、Dis1は間期には微小管に、分裂期には動原体に相互作用するというこれまでに見られなかった興味深い細胞周期依存的な挙動を示すタンパク質であることが明らかとなった (Current Biology誌に発表 Nakaseko et al., 2001)。

染色体分配をダイナミックに制御するpassenger蛋白Bir1/Cut17蛋白質の分子機能の研究

われわれは分裂酵母においてクロマチン蛋白であるCut17蛋白質がM期特異的にキネトコアと相互作用し、姉妹染色体分体間結合の解消に依存して染色体からスピンドルの中央領域に局在を変化させる、いわゆるpassenger蛋白であることを見いだした。Cut17蛋白質は進化的に高度に保存された蛋白質であり、多くの研究者の興味を引いている。この蛋白質はDNA損傷修復、染色体凝縮、スピンドル伸長、さらにAuroraキナーゼの局在に必須であり、M期前期においては染色体

凝縮に必須なコンデンシン複合体の核への蓄積に必須であることを明らかにした。これらの現象がCut17蛋白質のどのような機能、活性を通じて保証されているのか明らかにするために現在Cut17蛋白質関連遺伝子のスクリーニングをおこなっており、これら遺伝子群の解析を通じてCut17の機能を明らかにしたい。

Cut1-Cut2(セパリン-セキュリン)複合体の分子機能の解明

我々が分裂酵母において見出した染色体分配に必要なCut1-Cut2タンパク質複合体の重要性は、ヒトを含む高等生物でもPTTGというがん遺伝子がCut1に類似したタンパク質と結合すること、PTTGタンパク質もCut2タンパク質と同様に破壊ボックスを持ち、そのタンパク質分解が姉妹染色体の分配に必要であることから明らかとなった。これらから酵母からヒトまでCut2/Pds1/PTTG/セキュリンを通して同様の染色体分配の起動メカニズムが存在することが明らかとなってきた。また最近出芽酵母Esp1タンパク質(Cut1相同タンパク)に、姉妹染色体分体間の結合にかかわるScc1タンパク質を切断する活性が存在することが明らかとなった。しかし我々はCut1タンパク質が、間期には細胞質微小間様に、M期においてはスピンドルに局在することを見出し、またこのスピンドル局在がM期後期においても続行することから、Cut1がスピンドル機能に深く関わることを示した(Kumada et al., Current Biology 1998に公表)。最近になり出芽酵母Esp1もスピンドルに局在することがしめされている。さらに我々はCut1の大量発現時の表現形から、Cut1タンパク質が微小管のダイナミクスに関与していることが示唆されることも見出しており、Cut1-Cut2タンパク質複合体が姉妹染色体の分配において、姉妹染色分体の解離、スピンドルにおける姉妹染色体の分配をどのように行っているのかを現在研究を行っている。

DNA損傷・複製チェックポイントの研究

DNA損傷が存在するときに、細胞分裂期への進入を抑制するチェックポイント機構は、正常な染色体を娘細胞に分配するために重要な役割を担っている。Crb2は、ヒト乳ガン遺伝子BRCA1と類似した配列、すなわちBRCTモチーフを持っており、このタンパク質が損傷チェックポイントの確立とチェックポイント停止からの脱出に必須であることをこれまでに示した(Saka et al., Genes&Dev, 1997; Esashi and Yanagida, Mol Cell, 1999)。さらに我々は、Crb2がCdc2活性制御に直接関わる進化的に保存されたチェックポイントキナーゼChk1、およびヒトATMキナーゼのホモログであるRad3と物理的に直接相互作用することを見出している。興味深いことに、DNA損傷を与えることによってこれらのタンパク質間相互作用に変化が認められた。Crb2が、Rad3およびChk1両キナーゼの活性制御因子である可能性を考慮に入れ、これらのタンパク質間相互作用の生理的な意義を細胞分子生物学的・生化学的手法を用いて詳細に解析している。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Yanagida, M. Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation ; Roles of Cut 1 /separin and Cut 2 /securin. *Genes to Cells*. 5 : 1-8(2000)

Takahashi, K. , Chen, E. S. , Yanagida, M. Requirement of Mis 6 Centromere Connector for Localizing a CENP-A-Like Protein in Fission Yeast. *Science*. 288 : 2215-2219(2000)

Takahashi, K. , Yanagida, M. Replication Meets Cohesion. *Science*. 289 : 735-736 (2000)

Kondoh, H. , Yuasa, T. , Yanagida, M. Mis3 with a conserved RNA binding motif is essential for ribosome biogenesis and implicated in the start of cell growth and S phase checkpoint. *Genes to Cells*. 5 : 525-541(2000)

Tatebe, H. , Yanagida, M. Cut8, essential for anaphase, controls localization of 26S proteasome, facilitating destruction of cyclin and Cut2. *Current Biology*. 10 : 1329-1338(2000)

Tomonaga, T. , Nagao, K. , Kawasaki, Y. , Furuya, K. , Murakami, A. , Morishita, J. , Yuasa, T. , Sutani, T. , Kearsey, S. E. , Uhlmann, F. , Nasmyth, K. , Yanagida, M. Characterization of fission yeast cohesin : essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes & Development*. 14 : 2757-2770 (2000)

Tatebe, H. , Goshima, G. , Takeda, K. , Nakagawa, T. , Kinoshita, K. , Yanagida, M. Fission yeast living mitosis visualized by GFP-tagged gene products. *Micron*. 32 : 67-74(2001)

Nakaseko, Y. , Goshima, G. , Morishita, J. , Yanagida, M. M phase-specific kinetochore proteins in fission yeast : Microtubule-associating Dis 1 and Mtc 1 display rapid separation and segregation during anaphase. *Current Biology*. 11 : 537-549(2001)