

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 17 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 研究員)

「染色体分配メタボリズムを支える分子ネットワークの解析」

## 1. 研究実施の概要

細胞の恒常性は一定染色体数維持によって支えられる。真核生物は細胞周期のS期複製とM期分配により、細胞増殖しつつ染色体数を正確に守り、子孫細胞へ継承する。その乱れは多くの疾病の原因となり、癌化の原因ともなる。一方で倍数体は有用植物体の創成につながる。本研究では、染色体数恒常性をメタボリズムと捉え、遺伝子産物群の分子間相互作用、分子修飾、転換、分解を統合的に解析することを目的としている。染色体分配メタボリズムを支える分子ネットワーク解析のために、(1)分裂期進入決定に関わる未知制御因子群の包括的同定、(2)セパレーズ・プロテアーゼ活性制御の統合的理解、(3)ヒストン脱アセチル化・メチル化によるセントロメア構築制御の解明、以上3つの具体的テーマで研究を行っている。これらのテーマが順調に進展すれば、染色体分配の研究分野に新天地の創造と、斬新な基盤技術の創成が起これと期待される。

## 2. 研究実施内容

### 1. 染色体分配を導く栄養源利用切り替え因子群の包括的同定

我々は細胞周期進行のM期進入時に「細胞が、栄養源の消費を細胞成長からM期進行・細胞分裂へ切り替える」という仮説に基づき、その切り替えのために発生する「未知の代謝シグナル」を探索することを指針に研究を進めている。分裂酵母はG 2 期に細胞が成長し、M期進入から染色体分配を経て細胞分裂までの間（この間G 1 期と DNA 複製の S 期も含む）には細胞の伸張（成長）はまったく起こらない。そこでM期から細胞分裂までの成長停止に欠損を示す変異体を分離し、この栄養源利用を切り替える因子の同定を進めてきた。分裂酵母温度感受性変異体ライブラリーの網羅的解析の結果、M期進行および染色体分配を起こしつつ細胞が伸長する変異体をいくつか見出し、その変異体の多くが CBS ドメインを有してヌクレオチドと結合すると想定される Sds23 と遺伝的相互作用を示すことを明らかにした。Sds23 は細胞のエネルギー状態を感知する AMP 活性化キナーゼ (AMPK) 制御サブユニットと相同性を示し、Sds23 自身の破壊株においても異常な細胞伸長が起こる。Sds23 の CBS ドメインに置換変異を導入することにより、このドメインが Sds23 の

機能に重要であることを示した。Sds23 の増量によって相補される変異体の一部について遺伝子本体をハプロイダイゼーションによって同定したところ、アクチン制御キナーゼでヒト LKB と類似する Ssp1、Pol IIC 末端反復リン酸化部位のホスファターゼ Fcp1 に変異が起きていることが明らかになった。また Sds23 のプロテオーム解析によって Sds23 が 2A 型セリンスレオニンホスファターゼと直接的な相互作用を示すことも見いだした。これらの結果は Sds23 とその関連因子がリン酸化及び脱リン酸化反応の制御を通して細胞内エネルギー・栄養源利用を切り替える代謝シグナルの中心的役割を担っていることを示すものと考えている。

## 2. セパレーズ・プロテアーゼ活性制御の統合的解明

細胞周期において姉妹染色体の分配制御には二段階のタンパク質分解が重要である。染色体複製後、姉妹染色分体はコヒーシにより合着している。M 期後期に進入すると、まず、ユビキチン依存性タンパク質分解によりセキュリンが分解されセパレーズが活性化する。この活性化セパレーズのプロテアーゼ活性によってコヒーシが切断されることにより、姉妹染色体間の合着が解消され染色体分離が可能となる。染色体分配時、二段階タンパク質分解がいかにして調和して起こるか、その統合的理解を推し進める。我々は、セパレーズ、セキュリン複合体の変異株の温度感受性は高浸透圧・高塩ストレスなど細胞外環境ストレスにより抑圧される事実を見だし、解析を行った。その結果、これら細胞外環境ストレスはセパレーズ、セキュリンの複合体を安定化すること、さらにこの安定化作用には環境ストレスをシグナル伝達する MAP キナーゼを必要とすることを明らかとした。上述のように MAP キナーゼ Spc1/Sty1 タンパク質は M 期進入時の栄養源利用切り替えに関与している可能性があることを考えると大変興味深い。また、分解標的タンパクである Rad21 タンパク質の修飾変化について詳細な解析を進めている。特に、Polo キナーゼによる Rad21 タンパク質のリン酸化修飾がコヒーシ複合体と染色体の相互作用に対して、既知の知見を上回る様々な影響を与えることを示唆する結果を得ている。そのほかにも、我々はこの二段階分解に AAA ATPase である Cdc48 タンパク質が関与することを見いだした。Cdc48 タンパク質は保存されたタンパク質であり、小胞体ストレス経路への関与等様々な機能が報告されている。興味深いことに、いくつかの Cdc48 の変異体ではセパレーズタンパク質が不安定化しており、染色体分配に異常を示すことを発見した。この AAA ATPase がどのようにして二段階タンパク質分解による染色体分配制御に関与するのか、その機構を明らかにしていきたい。

## 3. ヒストン脱アセチル化、メチル化によるセントロメア構築制御の解明

動原体/セントロメアは M 期において微小管との二方向性結合を確立し、染色体の均等分配を保障する特殊なクロマチン構造体である。我々はこれまでに、CENP-A (セントロメア特異的ヒストン H3) をセントロメアに取りこむために必須な、進化的に保存されたタンパ

ク質の網羅的スクリーニングを行い、セントロメアヒストン脱アセチル化状態維持に必須な Mis16/RbAp46/48、Mis18 を CENP-A 局在化の最上流因子として同定した (Hayashi et al. 2004 Cell)。分裂酵母において Mis16 がヒストンアセチル化酵素 Hat1 と結合していること、また、*mis16* 変異株に過剰量の *hat1* 遺伝子を導入すると染色体分配異常を引き起こすことを見出した。ヒト細胞においては、Mis18 $\alpha$ ・ $\beta$  及び M18BP1 複合体が RbAp46/48/Mis16 とともに動原体/セントロメアのプライミングを行い、その結果 CENP-A の局在を可能にすることを明らかにした。さらに、注目すべきことに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA (Trichostatin A) 添加が Mis18 の CENP-A 局在化機能を代替するような働きを持つことを示した (Fujita et al. 2007 Dev Cell)。これら一連の結果は、ヒトや分裂酵母でヒストンアセチル化及び脱アセチル化の細胞周期における制御が CENP-A のセントロメアへの取り込み、動原体/セントロメア機能構造の形成に決定的な役割を持つことを示すものと考えている。そのほか、タンパク質のアセチル化に必須な代謝物であるアセチル CoA の生合成経路に関わる因子の遺伝解析を開始したところ、変異体の一部が著しい染色体不均等分配を引き起こすことを見いだした。これらの変異体は既知のセントロメアタンパク質 Mis6・Mis12 の遺伝子変異体と合成致死性を示し、また実際にこれらの変異体中ではヒストンアセチル化の著しい減少が起きていた。これらの結果は CoA 生合成経路の欠損によるアセチル化状態の変化に伴い動原体/セントロメアに異常が生じていることを強く示唆するものと考えている

### 3. 研究実施体制

柳田 充弘(京都大学)グループ

研究項目

- ・分裂期進入決定に関わる未知制御因子群の包括的同定
- ・セパレーズ・プロテアーゼ活性制御の統合的理解
- ・ヒストン脱アセチル化・メチル化によるセントロメア構築制御の解明

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

- Histone H2B Mutations in Inner Region Affect Ubiquitination, Centromere Function, Silencing and Chromosome Segregation., Maruyama, T., Nakamura, T., Hayashi, T., and Yanagida, M., *EMBO J.*, 25, 2420 - 2431 (07 Jun 2006) Article
- Cdc48 is Required for the Stability of Cut1/separase in Mitotic Anaphase, Ikai, N., Yanagida, M., *J.Structural Biol.*, 156, 50-61, 2006
- Fission Yeast MAP Kinase is Required for the Increased Securin-Separase Interaction that Rescues Separase Mutants Under Stress, Kawasaki, Y., Nagao, K., Nakamura, T., Yanagida, M., *Cell Cycle*, 5:16, 1831-1839, 2006

- Cdc2 Phosphorylation of the Fission Yeast Dis1 Ensures Accurate Chromosome Segregation, Aoki, K., Nakaseko, Y., Kinoshita, K., Goshima, G., Yanagida, M., *Current Biology*, 16, 1627-1635, 2006
- Coordinated Requirements of Human Topo II and Cohesin for Metaphase Centromere Alignment under Mad2-dependent Spindle Checkpoint Surveillance, Toyoda, Y., and Yanagida, M., *Mol. Biol. Cell* 17: 2287-2302; 2006
- The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase, Kumada, K., Yao, R., Kawaguchi, T., Karasawa, M., Hoshikawa, Y., Ichikawa, K., Sugitani, Y., Imoto, I., Inazawa, J., Sugawara, M., Yanagida, M., and Noda, T., *The Journal of Cell Biology*, Volume 172, Number 6, 835-846, 2006
- Priming of Centromere for CENP-A Recruitment by Human hMis 18  $\alpha$ , hMis18  $\beta$ , and M18BP1, Fujita, Y., Hayashi, T., Kiyomitsu, T., Toyoda, Y., Kokubu, A., Obuse, C., Yanagida, M., *Developmental Cell* 12, 17-30, January 2007
- Ribonuclease Activity of Dis3 is Required for Mitotic Progression and Provides a Possible Link between heterochromatin and Kinetochores Function, Murakami, H., Goto, D., Toda, T., Chen, E., Grewal, S., Martienssen, R., Yanagida, M., *PLoS ONE* v.2(3) e317, March 2007,