

「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 特任教授)

「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) セバレース・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

細胞の栄養源利用の切り替えに対して、染色体分配ネットワークがいかに応答するかを解析する。我々の仮説は M 期進入時に「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」というもので、そのために「未知の代謝シグナル」が発生するというものである。この仮説の根拠を以下に簡潔に説明する。分裂酵母は G 2 期に細胞成長がおり、棒状細胞の伸張として測定出来る。M 期に入ると成長はまったく起こらなくなり、染色体分配から細胞分裂まで（この間 G 1 期と DNA 複製の S 期も含む）細胞伸張（成長）は起こらない。M 期ー細胞分裂までの成長停止に欠損を示す変異体を分離したい。このような変異体の欠損表現型としては M 期細胞として染色体分配も起こりつつ（もしくは分配異常を示す）、かつ細胞が（異常）伸張する表現型が想定される。

現在我々は分裂酵母温度感受性変異体ライブラリーの網羅的解析を進めている。その変異体ライブラリーには染色体分配を起こしつつ細胞が伸長しているものが含まれていた。これまでの解析ではこれらの変異体において RNA 核外移行因子、アクチン制御キナーゼ、

MAP キナーゼ等の機能が低下していることが明らかとなった。またこれらの変異体の多くが sds23 と遺伝的相互作用を示した。この sds23 は細胞の栄養状態を感知する AMP 活性化キナーゼ (AMPK) 制御サブユニットと同じドメインを有しており、sds23 自身も何らかのセンサーとして働いている可能性が高い。これらの結果は、sds23 及びその関連因子がM期進入時における栄養源の消費の切り替えに中心的役割を果たしている可能性を示唆している。sds23 に対するプロテオーム・メタボローム解析によりこの栄養源消費の切り替えシステムを明らかにしたい。

(2) セパレーズ・プロテアーゼ活性制御の統合的解明

細胞周期においてコヒーシン複合体は染色体上で出現・消失のサイクルを示す。複製後姉妹染色分体はコヒーシンにより合着する。M期後期に入ると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ン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、2段階タンパク質分解がいかん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、セパレーズ変異体の M 期染色体分離欠損表現型が浸透圧ストレスによって抑制されることを見出した。詳細な解析の結果、セパレーズ阻害因子でありながら活性化因子でもあるセキュリンとセパレーズの複合体形成が浸透圧ストレスにより促進されていることを示し、これが表現型抑制の主な原因であると考えられた。この浸透圧ストレスによるセキュリン・セパレーズ複合体形成促進、および表現型抑制は MAP キナーゼ *spc1/sty1* に依存していた。また、セパレーズ変異体は MAP キナーゼ破壊株と合成生育阻害効果を示した。これらの結果は MAP キナーゼがセパレーズを制御している可能性を示唆しているが、上述のように MAP キナーゼ *spc1/sty1* 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。

(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

セントロメアは染色体を正確に分配するうえで最も肝要な構造体である。間期にはセントロメアとして存在し、M期にはキネトコアタンパク質が集合して精緻な構造体を作る。セントロメアクロマチンの構築は細胞周期毎にある程度更新される。スピンドルチェックポイントによって、キネトコアは微小管との二方向性結合を確立し、正確な分配が可能になる。このセントロメア変換サイクルの制御を追求する。

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った。詳細な解析の結果、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 がパスウェイの最上流因子として浮かび上がってきた。Mis16 がヒストンアセチル化酵素 Hat1 と結合していることを見出し、ヒストンアセチル化の制御が CENP-A のセントロ

メアへの取り込み、そして均等な染色体分配に重要であることを示唆するデータを得た。また、Mis16/RbAp46/48 と相互作用する Mis18 が M 期中期のセントロメアには存在せず、染色体分配後の M 期終期（テロフェーズ）にセントロメアと結合することを見出した。CENP-A が実際に取り込まれるのはセントロメア DNA が複製される S 期以降であると考えられており、Mis18 がセントロメアに局在し始める時期とは大きな隔たりがある。しかし、Mis18 がセントロメアに局在するテロフェーズこそセントロメア更新の最初に起こるイベントの時期であると考えられ、この時期にセントロメア領域のヒストンアセチル化の制御が行われているのかもしれない。

3. 研究実施体制

「京都大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：柳田 充弘（京都大学、研究員(特任教授)）
- ② 研究項目：
 - 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