

「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

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

本研究は細胞分裂にともなう正確な染色体分配の背後にあるメタボリズムの制御に着眼し、制御の存在自体および制御のしくみを解明しようとするものである。研究チームは3つの主課題、すなわち

- (1) 染色体分配を導く栄養源切り替えおよび代謝回路変動、
- (2) 分配期後期におけるタンパク質分解の統合的解明、
- (3) ヒストン脱アセチル化アセチル化による構築制御、

の解析をおこない原著論文 7 報を公表した (Developmental Cell 2 報^{1),3)}, Journal of Cell Biology 1 報⁷⁾, Genes to Cells 2 報^{2),5)}, Journal of Cell Science 1 報⁸⁾, Cell Cycle 1 報⁴⁾)。phosphatidylinositol キナーゼ関連キナーゼ (PIKK) が染色体分配にいかに関わるかは極めて興味ある問題だが、今年度はその方向への研究の基盤となる発見、すなわち Tel2, Tti1 複合体が Tor1, Tor2, Rad3/ATR, Tel1/ATM, Tra1, Tra2 と結合することを見だし、また rapamycin 感受性の Tor2 変異を分離しその基本的な表現型を解析した。栄養シグナルと M 期制御について今後も研究を続ける。ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) が染色体分配に欠損を示す変異に対して抑制もしくは超感受性を引き起こすことを出発点に脱アセチル化酵素が染色体分配に重要な役割を果たすことを証明できた。またセントロメアへのヒストン H3 変種である CENP-A への取り込みが Mis16/RbAp46/48, Mis18 を必要とすることは既に示していたが、今回 TSA の添加がこれらの機能欠損を抑制することを発見した。すなわち CENP-A 取り込みの制御にアセチル化脱アセチル化酵素が重要な役割を果たしているので、今後の研究の展開に努めたい。ヒト細胞の染色体分配にともなうタンパク質分解制御のメカニズムのうち特にキネトコアタンパク質ブリンキンがチェックポイントタンパクである Bub1, BubR1 と直接相互作用することを示し、この直接的な結合がセキユリン、サイクリンなどのタンパク質分解を抑制するのに必須であることも示した。スピンドルチェックポ

イント、キネトコア、タンパク分解の関係をさらに把握すべく研究を推進する。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

1. 染色体分配を導く栄養源利用切り替えおよび代謝回路変動の関連解析

細胞周期は幾つかの時期に分類されており、S 期に染色体 DNA の複製が起こり、分裂酵母においては続く G2 期において細胞が伸長する。M 期進入に伴い細胞伸長は停止し、複製された染色体が2つの娘細胞に分配される。このように細胞周期においては時期特異的に様々な現象が発生することから、これまでに判明しているタンパク質の量的変化・修飾の変化に加えて、代謝物の変動も発生し細胞周期制御に重要な機能を果たしていることが期待される。特に G2 期から M 期にかけては、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システムが存在し、それに伴い代謝物の変動も起こるのではないかと考えている。我々は 1015 株からなる分裂酵母温度感受性変異体ライブラリーを網羅的に解析することにより多数の栄養源感知及び代謝関連遺伝子の変異体を取得した。それらの内まず、栄養源の感知・細胞成長に深く関わるとされる TOR タンパク質の解析を行った。分裂酵母の TOR のひとつ Tor2 の遺伝子変異株が完全培地中でも窒素源枯渇時のような G0 期様の表現型を示すことを見出した。また、Tor2 およびもう一つの TOR である Tor1 の結合タンパク質を質量分析機によって同定し、分裂酵母における TOR 複合体の構成を明らかにした。さらに Tel2 タンパク質が分裂酵母に存在するすべての PIKK ファミリーのタンパク質 (Tor2、Tor1、Rad3、Tel1、Tra1、Tra2) と相互作用することを発見し、栄養に対する反応、DNA 損傷チェックポイント、転写制御が Tel2 によって結びつけられている可能性が示唆された (Hayashi et al. 2007)⁵⁾。この研究によって栄養源がもたらす染色体分配への影響を調べるための基盤が出来たと考えている。さらに我々はタンパク質のアセチル化や細胞内の様々な代謝に必須な CoA 及びアセチル CoA 生合成酵素変異体の一部が M 期において染色体不均等分配を引き起こすことを見いだした。これらの変異体が既知のセントロメアタンパク質 Mis6・Mis12 変異体と合成致死性を示しことから、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が強く示唆された。さらに我々は分裂酵母から効率よく代謝物を抽出し高性能質量分析機により同定する方法を確立した。この方法を用いて CoA 及びアセチル CoA 生合成酵素変異体中では、実際に最終産物である CoA 及びアセチル CoA 量が著しく減少しており中間代謝物の量にも変動が見られることを発見した。またこの方法を用いることにより CoA・アセチル CoA に加えて ATP・GTP・NAD など様々な代謝物を同時に測定する事が可能となった。現在、数千の代謝物ピークを検出可能となったが、その多くは未同定であり、また、代謝変動を解析するためには膨大なデータを処理する必要がある。これら高性能質量分析機によって得られる大量のメタボロームデータ解析を効率的に行なうためのソフトウェアを開発中である。また現在プロテオーム、トランスクリプトーム解析から様々なタンパク質の細胞周期における変動が報告さ

れている。これらに加えてメタボローム解析で得られる代謝物の変動データを統合的に解析し、代謝回路変動の網羅的解析を可能とするソフトウェアの開発を開始している。

2. Anaphase タンパク質分解制御の統合的解明

染色体数恒常性には細胞分裂期後期開始時における一連のタンパク質分解の厳密な制御が必須である。染色体分配はセキュリンの分解と、その後活性化されたセパレーズによる染色体合着因子コヒーシンの切断により開始され、M期脱出はサイクリンの分解によるCdc2キナーゼの不活化により誘導される。セキュリンとサイクリンはE3ユビキチンライゲースAPC/Cにより同時に認識されユビキチン依存的に分解されるため、染色体分配とM期脱出が協調して進行する。APC/Cの活性はスピンドルチェックポイントにより抑制され、チェックポイントは動原体により制御されるため、チェックポイント機能を制御する動原体因子の同定は一連の後期タンパク質分解制御の理解に必須である。我々はスピンドルチェックポイントタンパク質Bub1、BubR1と直接結合するヒト動原体タンパク質blinkinの同定に成功し、blinkinと、Bub1、BubR1に保存されたTPR配列の直接的相互作用が、染色体の整列とスピンドルチェックポイントの確立に必須であることを発見した(Kiyomitsu et al., 2007 Dev Cell)³⁾。今年度はさらにblinkinとBub1、BubR1の相互作用制御、及びblinkinとその他のチェックポイントタンパク質との関連を解析し、動原体におけるチェックポイント活性化制御の分子的理解を進めたい。また我々はCdc2キナーゼのM期標的分子としてコンデンシンを同定し、コンデンシンの動原体およびrDNA領域への集合がCdc2キナーゼを含む多段階の制御を経て達成されること、またその局在が染色体の均等分配に必須であることを発見した(Nakazawa et al., 2008 JCB)⁷⁾。一方、我々は質量分析を用いてセパレーズの基質であるコヒーシンサブユニットRad21の複数部位が細胞周期特異的あるいはDNA損傷依存的にリン酸化修飾を受ける事を見出した(Adachi et al., 2008 Cell cycle)⁴⁾。中でもDNA損傷依存的なRad21のリン酸化はAnaphase開始時のコヒーシン除去に機能しうると考えられ、DNA損傷後のM期コヒーシン除去に新たなモデルを提唱した。今年度はセパレーズ自身や、セパレーズと物理的、または遺伝学的相互作用をもつセキュリン、AAA ATPase Cdc48などによるセパレーズ活性制御の統合的理解を進めたい。

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証する特殊なクロマチン構造体である。我々は、ヒトや分裂酵母で細胞周期におけるヒストンアセチル化及び脱アセチル化の制御が動原体/セントロメア機能構造の形成に重要な役割を担っており、ヒトにおいてはhMis18 $\alpha \cdot \beta$ 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うことでCENP-Aの局在化を可能にすることを明らかにした(Fujita et al., 2007 Dev Cell)¹⁾。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局在化機能を代替えするような働きを持つことを示

した。また、分裂酵母において、CENP-A のセントロメア局在化因子である Mis6/CENP-I の温度感受性変異体が TSA に感受性を示すことを発見した (Kimata et al., 2008 JCS)⁸⁾。これら一連の結果は、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動原体/セントロメア機能構造の形成に重要な役割を持ち、それは進化的に保存されていることを示している。今年度は CENP-A のセントロメア上へのデポジットに関わるヒストンアセチル化及び脱アセチル化関連因子の同定と機能解析を試みたい。また、CENP-A のセントロメアローディングに作用する Scm3 についても Paul Russell 博士との共同研究を進めている(投稿準備中)。

また、分裂酵母においてコヒーシンローディング因子である Mis4/Adherin/NIPBL のタンパク質量や APC/Cyclosome の複合体形成はヒストン脱アセチル化酵素によって制御されていることを明らかにした (Kimata et al. 2008 JCS)⁸⁾。これらの結果はヒストン脱アセチル化、アセチル化がセントロメア構築だけでなく、M 期染色体メタボリズムを制御していることを示唆する。今年度はこれらの制御機構も詳細に調べたい。

3. 研究実施体制

(1)「柳田」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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- 1) Priming of Centromere for CENP-A Recruitment by Human hMis 18α, hMis18β, and M18BP1, Fujita, Y., Hayashi, T, Kiyomitsu, T., Toyoda, Y., Kokubu, A., Obuse, C., Yanagida, M., Developmental Cell 12, 17-30, January 2007
- 2) Two-step, extensive alterations in the transcriptome from G0 arrest to cell division in *Schizosaccharomyces pombe*., Shimanuki M, Chung SY, Chikashige Y, Kawasaki Y, Uehara L, Tsutsumi C, Hatanaka M, Hiraoka Y, Nagao K, Yanagida M., Genes Cells. 2007 May;12(5):677-92.
- 3) Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1., Kiyomitsu T, Obuse

C, Yanagida M., *Developmental Cell* 13(5):663-76, Nov.2007

- 4) Cut1/separase-dependent roles of multiple phosphorylation of fission yeast cohesin subunit Rad21 in post-replicative damage repair and mitosis., Adachi Y, Kokubu A, Ebe M, Nagao K, Yanagida M., *Cell Cycle*. 2007 Dec 29;7(6)
- 5) Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe* tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits., Hayashi T, Hatanaka M, Nagao K, Nakaseko Y, Kanoh J, Kokubu A, Ebe M, Yanagida M, *Genes Cells*. 2007 Dec;12(12):1357-70.
- 6) Tel2: a common partner of PIK-related kinases and a link between DNA checkpoint and nutritional response?, Kanoh J, Yanagida M., *Genes Cells*. 2007 Dec;12(12):1301-4. Review.
- 7) Dissection of the essential steps for condensin accumulation at kinetochores and rDNAs during fission yeast mitosis, Nakazawa N, Nakamura T, Kokubu A, Ebe M, Nagao K, Yanagida M. *J Cell Biol*. 2008 Mar 24;180(6):1115-31.
- 8) Diminishing HDACs by drugs or mutations promotes normal or abnormal sister chromatid separation by affecting APC/C and adherin, Kimata Y, Matsuyama A, Nagao K, Furuya K, Obuse C, Yoshida M, Yanagida M.. *J Cell Sci*. 2008 Apr 1;121(7):1107-18.