

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。本研究では、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。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) 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、の具体的なテーマで研究を行っている。技術的な大きな進展としては、分裂酵母細胞におけるメタボローム解析実験技術およびソフトウェアの作成が著しく進展したことである(後述、沖縄科学技術整備機構 G0 研究室との共同研究による)。その結果アセチル CoA 合成に欠損のある変異体での分配異常がメタボローム解析とともに行えた。またヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の染色体分配における効果の解析から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(理研吉田研究室との共同研究)。細胞による栄養源の認知と染色体分配の関わりについては、いくつかの研究が並行して行われている。まず Ssp1 キナーゼと Sds23/PP2A ホスファターゼ複合体が細胞の栄養源であるグルコース検知に拮抗的に関わっている可能性が明らかとなった。また Tor キナーゼ複合体の構成因子を明らかにし、その変異体を取得することにより機能解析をおこなっている。さらに rapamycin 感受性の Tor2 変異を分離してその基本的な表現型を解析する過程で染色体分配因子との関わりを見いだしている。そういうことで栄養シグナルと M 期制御について現在研究は佳境に入っている。また CENP-A を始めとするセントロメアクロマチンタンパク質の取り込みの制御にアセチル化および脱アセチル化酵素が重要な役割を果たしていることも見いだした。

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因子群の包括的同定

分裂酵母は培地中の窒素源が枯渇するとそれを感知し、通常とは異なる分裂サイクルに入る。通常の細胞周期では G2 期に細胞成長が起こるのに対し、窒素源枯渇下では細胞成長を伴わな

いまま2回分裂し、G0期で停止する。窒素源存在下で類似の分裂サイクルに入り、G0期様の表現型を示す変異体として分裂酵母TOR(target of rapamycin)のひとつ、Tor2の遺伝子変異株*tor2-287*を単離し、さらに我々はTOR複合体の構成を明らかにした(Hayashi et al. 2007)。そこでTor1,Tti1,Ste20,Pop3などのTOR複合体因子の分裂酵母変異体を作成しそれらの機能を解析している。*tor2*変異株では窒素源枯渇時と同様にG2期での細胞伸張が起こらないまま細胞分裂が起こり、結果として小さな丸い細胞となる。分裂酵母は通常G2期に細胞成長が起こり、M期に入ると伸張は停止し、染色体分配から細胞分裂まで細胞伸張は起こらない。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ていると考えられるが、TOR経路がこの栄養源利用切り替えに深く関与しているのかもしれない。つまり、M期進入時にTOR経路を負に制御することで細胞伸張に栄養が利用されるのを抑えている可能性が考えられる。また我々は沖縄科学技術研究基盤整備機構との共同研究によりG0期への進入及びG0期での生存率維持に関わる遺伝子のスクリーニングを行い、33個の遺伝子がこの経路に関わることを明らかにした(Sajiki et al. 2009 J.Cell Sci.、文献5)。これらの遺伝子群にはストレスに関与するキナーゼ・代謝関連因子・転写翻訳因子・細胞内輸送因子・染色体構成因子などが含まれており、G0期の進入・維持に様々な遺伝子機能が必要であることが判明した。

グルコースの存在とその濃度、さらには細胞の成長を検知・認識することにより細胞は分裂期制御に入り、染色体分配を行う。分裂酵母では分裂期には細胞の成長が停止する。われわれはこの問題に長年関心をもち研究を行ってきた。タンパク質キナーゼであるSsp1とタンパク質ホスファターゼと関連するSds23の研究からこれらの機構の一端を明らかとした。Ssp1は配列的にはカルモジュリンキナーゼキナーゼ(CAMKK)と似ており、最近われわれはSsp1がCAMKKホモログであるというさらなる証拠を得た。哺乳類CAMKKは14-3-3タンパク質とPKA(cAMP依存性タンパク質キナーゼ)により制御されているが、Ssp1も実際に14-3-3タンパク質に結合し、PKAによるリン酸化のコンセンサス配列を保持している。一方Sds23は質量分析によると複合体形成をしており、結合しているものはPP2Aタイプのホスファターゼであった。さらに生化学的解析からSds23はPP2Aファミリーホスファターゼ活性の負の制御因子であることが判明した。*ssp1*変異体・*sds23*変異体は共に低グルコース下での細胞増殖に欠損があることが明らかとなった。これらのことはSsp1キナーゼとSds23/PP2A複合体が拮抗的にグルコース認知に機能していることを示している(Hanyu et al., 2009 Genes to Cells、文献9)。さらにTOR複合体もグルコース認知に関わっているという証拠がえられつつある。

2. 分配期後期におけるタンパク質分解の統合的解明

DNA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E3ユビキチンリガーゼであるAPC/Cを含む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分解されることにより、姉妹染色分体間の合着が解消され染色体分離が可能になる。染色体分配時、このセキュリンの分解とそれに続くコヒーシンの分解という2段階タンパク質分解がいかんにして調和して起こるか、その統合的理解を押し進めてきた(Yanagida M. 2008 'The Kinetochore'、文献4)。上述の2段階タンパク質分解はスピンドルチェックポイントと呼ばれる機構により厳密に制御されている。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2段階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の同定に成功しその結合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; 清光他、文献7)。またBub1の結晶構造解析の結果をふまえ、Bub1のN末端に存在する3つのTPR motifがBlinkinとの相互作用に必要なことも明らかにした(Bolanos-Garcia et al., 2009 Structure、文献6)。現在さらにBlinkinとBub1、BubR1の相互作用制御、およびBlinkinとその他のセントロメアタンパク質・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ている。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、文献2)。我々は質量分析を用いて、コヒーシサブユニット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ことを見出した(Adachi et al., 2008 Cell Cycle、文献11)。特にDNA損傷依存的なRad21のリン酸化は後期開始時のコヒーシン除去に機能しうと考えられ、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。また我々は分裂酵母セキュリンcut2変異株とtor2変異株が遺伝的に相互作用することを発見した。さらに、cut2変異株の高温感受性は、TORキナーゼ特異的阻害剤ラパマイシンにより抑圧されることも分かった。Cut2タンパク質のリン酸化状態は細胞周期を通じて変動していることが判明しており、TORキナーゼがCut2タンパク質のリン酸化を制御している可能性が示唆された。

3. ヒストン脱アセチル化アセチル化による構築制御

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-Hat1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)。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。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、文献1)。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。また、CENP-Aのセントロメアローディングに作用する分裂酵母Scm3についてもPaul Russell博士と共同研究を行い、Scm3が上述のMis16およびCENP-Aの両方と直接結合することを明らかにした(Williams et al., 2009 Molecular Cell、文献8)。現在、セントロメア上へのCENP-A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に関与する新しい因子の同定と機能解析を行っている。

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(HDAC)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、文献 1)。これらの結果はヒストンのアセチル化制御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に機能していることを示唆する。

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。さらにこれらの変異体が、老化や代謝制御に関わる Sir2 HDAC 変異体と遺伝的相互作用を示すことが明らかとなった。現在 Sir2 が CoA 合成を制御している可能性を検証している。一方、不均等核分裂を示す分裂酵母 *lsd1* 変異体においても、異常に蓄積する極長鎖脂肪酸の代謝に関与する新規因子 Lsd90 の同定に成功した(Yokoyama et al.,2008 J.Biochem、文献 3)。また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。

当研究室が保持している約千株の分裂酵母高温感受性ライブラリーの中には、興味深い表現型を示すものの、原因遺伝子が未同定な株が多数存在する。原因遺伝子を同定するための従来の方法は人的および時間的負担が大きく、また技術的にも困難な場合があった。そこで我々は Rob Martienssen 博士と共同研究を行い、全ゲノム次世代シーケンサーを用いることで、原因遺伝子を短時間で同定する方法を見出した(Irvine et al., 2009 Genome Research、文献 10)。現在さらに興味深い複数の株について原因遺伝子の同定を進めている。

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

- ・ 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)

1. 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(Pt 7):1107-18.
2. 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.
3. Expression of a Novel 90-kDa protein, Lsd90, involved in the metabolism of very long-chain fatty acid-containing phospholipids in a mitosis-defective fission yeast mutant, Yokoyama K, Nakagawa M, Satoh M, Saitoh S, Dohmae N, Harada A, Satoh N, Karasawa K, Takio K, Yanagida M, Inoue K. J Biochem. 143, 369-375, 2008 Aug.
4. The Basics of Chromosome Segregation, Yanagida M. 'The Kinetocore - From Molecular Discoveries to Cancer Therapy' 21-44, Springer-Verlag, 2008 Nov.
5. Genetic Control of Cellular Quiescence in *S. pombe*, Sajiki K, Hatanaka M, Nakamura T, Takeda K, Shimanuki M, Yoshida T, Hanyu Y, Hayashi T, Nakaseko Y, Yanagida M. J Cell Sci., 2009 May 122: 1418-1429.
6. The Crystal Structure of the N-Terminal Region of BUB1 Provides Insight into the Mechanism of BUB1 Recruitment to Kinetochores, Bolanos-Garcia V, Kiyomitsu T, D'Arcy S, Chirgadze D, Grossmann J, Matak-Vinkovic D, Venkitaraman A, Yanagida. Structure, Vol.17, Issue 1, 105-116, 2009 Jan 14
7. 「ブリンキン 紡錘体形成チェックポイントと微小管結合に必要なキネトコア蛋白質 -Blinkin: A kinetochore protein responsible for spindle checkpoint and microtubule-attachment」, 清光智美, 小布施力史, 柳田充弘. 「蛋白質 核酸 酵素」, Vol.54, No.4(2009 Feb)
8. Fission Yeast Scm3 Mediates Stable Assembly of Cnp1/CENP-A into Centromeric Chromatin, Williams J, Hayashi T, Yanagida M, Russell P. Molecular Cell, Vol.33 287-298, 2009 Feb 13.
9. *S. pombe* cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor, Hanyu Y, Imai K, Kawasaki Y, Nakamura T, Nakaseko Y, Nagao K, Kokubu A, Ebe M, Fujisawa A, Hayashi T, Obuse C, and Mitsuhiro Yanagida M. Genes to Cells, May 2009, 14: 539 - 554.

10. Mapping Mutations in Fission Yeast using Whole-Genome Next Generation Sequencing, Irvine D, Goto D, Vaughn M, Nakaseko Y, McCombie W, Yanagida M, Martienssen R. Genome Research, 2009 May 7.

<前年度成果>

11. 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. 2008 Mar 15;765-776

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)