

「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。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セントロメア構築制御、の具体的テーマで研究を行っている。まず、メタボリズム制御の理解を目的として分裂酵母のメタボローム技術の確立および解析ソフトウェアの作成を行い、論文を公表した(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、代謝物の網羅的測定およびその変動の検出が可能となり、増殖時・非増殖時の変動の解析も行った。メタボローム技術を用いて大きな発展が期待され、既に多数の変異体の解析を行い興味深い結果を得ている(準備中)。栄養源認知と染色体分配に関わる分裂酵母のカルシウムカルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ CaMKK のホモログである Ssp1 キナーゼと PP2A 関連ホスファターゼ阻害因子 Sds23 がグルコース利用において相助的に関わっていることを明らかにした(論文公表した)。Ssp1 は栄養源認知と M 期進入の鍵を握る最重要因子であり、CDK との関わりを今後明らかにしたい。分裂酵母は窒素源飢餓により G0 期に入る。G0 期進入と維持に必須な遺伝子機能を網羅的にスクリーンし、増殖にも G0 期にも共に必須な遺伝子をスーパーハウスキーピングと命名した(論文公表した)。興味深い遺伝子が多数含まれ、窒素源飢餓応答機構解明に重要な貢献をした。これら遺伝子が窒素源飢餓応答時の染色体分配にいかに関わるか今後の課題とする。TOR 複合体は栄養源感知・細胞成長に関わる最重要キナーゼで、我々は TOR と染色体分配の関係を明らかにするために、これまでに分裂酵母 TOR キナーゼ複合体の構成因子ならびに制御因子の同定を行ってきた。本年度はこの TOR 複合体の制御因子 Tti1 などの機能解明に向けて主たる結果を得た(準備中)。ヒト培養細胞系の実験を開始することによりヒト TOR キナーゼ複合体の構成因子の同定にも成功した。セントロメア領域のヒスト

ンアセチル化を制御している Mis16/RbAP、Mis18 と相互作用する新規遺伝子を数種類発見し、セントロメア構築機構における機能を追求した(準備中)。次年度は、最終年度でもありメタボロームによる増殖・非増殖細胞の解析のまとめを行う。また栄養認知、利用にかかわるキナーゼやホスファターゼ阻害因子(TOR、Ssp1、Sds23)とこれまで当研究グループが長年にわたって研究してきた細胞周期や染色体分配の重要制御因子について直接的な相互作用を通じた「しくみの理解」に向けて中心的な成果があげられるように努力する。

§ 2. 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、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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(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

メタボローム解析法の導入の成功

我々はすでにトランスクリプトームとプロテオーム技術に習熟・利用してきたが、本研究の大きな進展をもたらすためにはメタボローム技術の導入と利用が不可欠であった。ただ、この分野は極めて未熟な段階であり、技術の本格的導入は容易でなかった。しかしながら、基礎の土台から技術を構築するために数年間努力を傾けてきた。その結果、最初の論文を公表する段階にこぎつけた(文献5、Pluskal et al., 2009 Mol BioSyst)。さらに、個々の生物的問題に応用して大きな成果をあげることもできた(文献7、Takeda et al., 2010 PNAS)。分裂酵母細胞の代謝物の再現性の高い抽出方法の検討、HPLC カラムによる高解像の分離、フーリエ変換型質量分析機による多数の検出ピークの意義を徹底的に検討し、分裂酵母におけるメタボローム解析技術の確立を目指した。その結果、十分に自信のもてるデータの獲得と解釈が可能になった。ポジティブイオンモードにおいて 2354 個、ネガティブイオンモードにおいて 1942 個という多数の代謝物ピークの測定に成功した。実際にはそれらの多くは同一メタボライトの派生物であることも明らかにした。これら多数のピークに関して標準物との比較による同定も進め 123 物質の同定に成功した。数は非常に少ないようであるが、標準物質が稀少であること、一つの物質が数十のピークを生み出す事実を考慮すれば大きな成果である。同定された代謝物は ATP などのエネルギー代謝に関わる物質・糖・アミノ酸・ピタ

ミンなど多岐にわたっている。さらにこの方法と我々が改良した解析ソフトウェアを用いることにより定量的かつ網羅的解析が可能となり、細胞内の代謝変化を詳しく検証することが可能となった。これらメタボローム解析実験は沖縄において行った。試料の調製のかかなりの部分は京都で行った。

今後多数の変異体での解析を予定しているので、温度感受性の変異体の解析の準備のためにも、まず26度と36度でのメタボロームの違いを徹底的に調べた。実際、温度変化により細胞内の代謝物の相当な変動が発生した。これらは再現性も高いので、将来的に変異遺伝子に起因する変化とそうでないものの区別が容易になるだろう。一方でフェリクローム合成に必須な遺伝子欠失株では野生株と同一温度で比較すると、違いはフェリクローム前駆体の蓄積以外は微小であった。つまり大半のメタボロームパターンは維持されていて、遺伝子特異的な小さな変化のみが検出された。

パイロット的に温度感受性変異体も調べた。必須遺伝子である CoA 合成酵素変異体中では実際に CoA とアセチル CoA の量が著しく減少していた。これは予想された結果であった。予想外なのは、さらに中間代謝物量にも大きな変動が見られることであった。また HMG-CoA 合成酵素変異体中では HMG-CoA 量の減少に加えて尿素サイクル代謝物にもセカンダリな変動が見られることが明らかとなった。今後有糸分裂や染色体分配に欠損を示す分裂酵母変異体の解析においてもメタボロームを用いたアプローチが有効であろうことを示した。またヒト培養細胞においても適応可能であり、ヒト培養細胞の代謝物の測定にも成功した。

限定グルコース濃度下で必須となる Ssp1 と Sds23 遺伝子機能の発見とその生理的意義の解明

今年度、これまで長年研究してきた Ssp1 キナーゼと機能不明の Sds23 タンパク質について画期的な進展がもたらされた（文献3、Hanyu et al, 2009）。Ssp1 を研究してきた理由は欠損すると G2 期で遅延すること、M 期進入した細胞は細胞伸張を引き起こすという事実、さらに M 期におけるアクチン局在の異常であった。本年明らかになったことは、ssp1 変異は培地の低グルコース濃度下により細胞増殖の停止が起こることであった。さらにこの Ssp1 は配列類似のみならず種々の証拠からカルシウムカルモジュリン依存性キナーゼ CaMKK であると判明した。ほ乳類細胞では CaMKK はグルコース利用（取り込み）に欠損を示す。実際に ssp1 変異細胞ではグルコースの利用は低下していた。Sds23 は質量分析と生化学解析から 2A 型様の脱リン酸化酵素と結合して阻害する因子であることが示された。Sds23 が欠損するとオカダ酸に感受性の脱リン酸化活性が異常に高まり、グルコース利用がほとんど起こらなくなった。これらの結果から CaMKK と 2A 型脱リン酸化酵素はグルコース利用に拮抗的に機能することが明らかとなった。

Ssp1 と哺乳類 CaMKK のアミノ酸配列は類似しており、キナーゼドメインとカルモジュリン結合ドメイン間に存在する高度保存された短配列が正常なグルコース応答機能に必須であることも示した。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 14-3-3 タンパク質に結合し、PKA コンセンサス配列を含む複数のサイトがリン酸化されることを示した。

Ssp1 タンパク質は栄養増殖期と停止期においてリン酸化状態および 14-3-3 タンパク質との親和

性が異なることが明らかとなった(未発表)。また、Ssp1 によるグルコース検知機構は増殖期と停止期で異なるのかもしれない。今後の検討課題である。これからの最重要課題は Ssp1 がいかにサイクリン依存性キナーゼ活性制御と関連するかである。栄養源の認識と細胞周期制御のカップリングは極めて重要な課題であり、この大きな問題の一端の手がかりを本年度はつかんだので、今後この問題を大きく発展させていきたい。また Ssp1 キナーゼの基質を発見することも極めて重要であろう。

窒素源枯渇下に生存性維持に必須となる遺伝子群の同定

分裂酵母は窒素源枯渇シグナルを迅速に感知して、成長無しで2回有糸分裂しG0期で停止する。分裂しないG0期への進入及びG0期での生存率維持に関わる遺伝子を同定する目的で、610株の温度感受性変異株の解析を行い、その結果、この経路に関わる33個の遺伝子を同定した(文献2、Sajiki et al. 2009)。これらの遺伝子群は静止細胞、増殖細胞共に必須なのでスーパーハウスキーピング遺伝子と命名した。広い細胞機能をカバーする遺伝子が含まれていた。シグナリング、代謝制御、転写、翻訳、細胞内輸送、クロマチン動態、染色体構築制御因子などが含まれていた。遺伝子のほとんどは脊椎動物にも保存されていた。

ストレス応答キナーゼであるMAPKおよびMAPKK変異株では、細胞成長の停止が起こらずに、致命的な有糸分裂をしてしまうことがわかった。また、小胞体、Golgi、液胞、エンドソームなどの動態に関わるタンパク質遺伝子変異が、窒素源枯渇後の染色体分配を含む細胞の基本的性質に影響を及ぼすことも判明した。これらの中には、G0期進入時に必要な細胞分裂が起こらず、生存率を低下させるものもあった。現在スーパーハウスキーピング遺伝子をさらに多数同定している。方法は次世代DNA sequencerを用いている。経費はかかるもの変異遺伝子同定までの期間的な短縮が大きい。本研究期間中に100以上のスーパーハウスキーピング遺伝子の同定をめざし染色体分配にかかわるものが若干数含まれるのを期待している。

分裂酵母の静止細胞がいかに形成しいかに維持されているかについてその仕組みを考察し、総説を発表した(文献6、Yanagida M. 2009 Trends Cell Biol)。本総説では、分裂しない長寿細胞がいかに維持されるかを論じた。分裂酵母が極めて秀れたモデル系であることを主張した。

TOR (target of rapamycin)キナーゼの栄養認知と細胞機能

TORタンパク質は栄養源の感知、細胞成長に関わる重要なタンパク質キナーゼで、PIKKファミリーに属する。ほかのいくつかのサブユニットと共に複合体を形成する。栄養源と有糸分裂の関係を論じるならTOR複合体を無視できない。われわれは分裂酵母のTORキナーゼTor2、Tor1複合体の構成因子を確定し、さらにこれらと結合するTel2、Tti1が、TORだけでなく、PIKKファミリーに属する他のATM、ATR、TRAなどのタンパク質と結合することを明らかにした。これらPIKKによってカバーされる広範な細胞機能がTel2-Tti1複合体によって結びつけられている可能性を示した(Hayashi et al. 2007)(文献9、Yangida et al.)。

Tel2-Tti1 複合体の機能を明らかにするために温度感受性 *tti1* 変異株を作成し解析を行い、興味深い結果を得た。近いうちに論文公表をする予定である。

上述した多くの遺伝学的解析は、当研究室が保有する 1015 株の分裂酵母温度感受性変異株ライブラリーを用いて行われている。これまでに約 204 株の原因遺伝子が特定されてきており、栄養源感知・細胞成長に関与していると期待されるものが多数同定された。しかしながら、残りについてはその原因遺伝子が不明である。今回、我々は既存の方法では決定できなかった温度感受性変異株ゲノムの変異部位を次世代型シーケンサー（イルミナ、Genome Analyzer）を用いて網羅的に解読し、原因遺伝子の特定を行っている。ひとつの例として、我々は Cold Spring Harbor 研究所の R. Martienssen 博士との共同研究で、温度感受性変異株のゲノムシーケンス結果の一部を発表しており、従来法に代わる新しい変異部位特定法を提案した（文献1、Irvine et al., 2009 Genome Res）。

(2) 分配期後期におけるタンパク質分解の統合的解明

染色体分配に必須なセクリンの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制御されている。我々はスピンドルチェックポイントタンパク質 Bub1、BubR1 が Blinkin/Sp105 と直接結合することを証明し、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)。今年度は、Blinkin と Bub1 結合最小断片を同定し、ケンブリッジ大の共同研究者との協力によりこれら複合体の結晶作成に成功した(Bolanos-Garcia et al., Jan. 2009 Structure)。今後の解析が期待される。また、Blinkin の動原体局在に必須なカルボキシ末端配列を同定し、それが hMis12 複合体因子 hMis14 と直接結合することを明らかにした。さらに hMis14 はヘテロクロマチンタンパク質 HP1 と異なる領域で直接結合し、両者の結合が姉妹動原体を結ぶインナーセントロメア構造形成に必須であることも明らかにした（文献8、Kiyomitsu et al., 2010 JCB）。

(3) ヒストン脱アセチル化アセチル化によるセントロメア構築制御

動原体/セントロメアは M 期において二方向性を確立し、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、Mis16-Mis18 複合体による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、セントロメア特異的ヒストン H3 である CENP-A のセントロメア局在に重要な役割を持ち、それが進化的に保存されていることを示してきた。今回、新たに Mis16、Mis18 と相互作用するタンパク質 Mis19、Mis20 を同定した。さらに、Mis16 がヒストン H4 と直接結合することを示し、その結合能が Mis16 の機能に重要であることを明らかにした。また分裂酵母 Scm3 について Paul Russell 博士と共同研究を行い、Scm3 が CENP-A と直接結合出来ること、CENP-A のセントロメア局在に必須であることを示した。Scm3 は Mis16 と直接結合できることを示し、Scm3 が Mis16-Mis18 複合体によるセントロメアクロマチンのプライミングと CENP-A のヌクレオソームへの取り込みを結び付ける因子である可能性を示し論文を Molecular Cell 誌に公表した(Williams et al., Feb 13, 2009 Mol Cell)。

我々は染色体凝縮に必須なコンデンシン複合体がセントロメアに局在しており、セントロメア異常によりその局在が消失する事を示してきた(Nakazawa et al., 2008 J Cell Biol)。本年度はコンデンシン複合体非 SMC サブユニットの分裂期特異的リン酸化を質量分析によって同定し、このリン酸化が分裂期を通じたコンデンシンの染色体結合と染色体の安定な分配に寄与することを明らかにした。さらに、In vivo 及び in vitro の実験からコンデンシンが DNA 結合タンパク質 RPA の除去に関わる事を発見した。また、M 期染色体凝縮の前段階としてコンデンシンは染色体上から不要な因子を除去しているというモデルを打ち立てた(文献4、Yanagida M. 2009 Nat Rev Mol Cell Biol)。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1) Mapping epigenetic mutations in fission yeast using whole-genome next-generation sequencing., Irvine D, Goto D, Vaughn M, Nakaseko M, McCombie W, Yanagida M, and Martienssen R., *Genome Research*, March 2009, 19(6): 1077-83., doi:10.1101/gr.089318.108

2) Genetic control of cellular quiescence in *S. pombe*., Sajiki K, Hatanaka M, Nakamura T, Takeda K, Shimanuki M, Yoshida T, Hanyu Y, Hayashi Y, Nakaseko Y and Yanagida M. , *Journal of Cell Science*, April 2009, 122(Pt 9): 1418-29., doi: 10.1242/jcs.046466

3) *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 Yanagida M., *Genes to Cells*, May 2009, 14: 539-554. , doi:10.1111/j.1365-2443.2009.01290.x

4) Clearing the way for mitosis: is cohesin a target?, Yanagida M. , *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, July 2009, Vol.10:489-496. , doi:10.1038/nrm2712

5) Cellular quiescence: are controlling genes conserved?, Yanagida M., *Trends in Cell Biology*, December 2009, Vol.19:705-715., doi:10.1016/j.tcb.2009.09.006

6) Metabolic profiling of the fission yeast *S. pombe*: quantification of compounds under different temperatures and genetic perturbation., Pluskal T, Nakamura T, Villar-Briones A, and Yanagida M., *Mol. Bio Syst.*, 2010, 6, 182-198., doi: 10.1039/b908784b

7) Synergistic roles of the proteasome and autophagy for mitochondrial maintenance and chronological lifespan in fission yeast, Takeda K, Yoshida T, Kikuchi S, Nagao K, Kokubu A, Pluskal T, Villar-Briones A, Nakamura T, and Yanagida M., *PNAS(Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, February 23, 2010, vol. 107 no. 8, 3540-3545., doi: 10.1073/pnas.0911055107

8) Inner centromere formation requires hMis14, a trident kinetochore protein that specifically recruits HP1 to human chromosomes, Kiyomitsu T, Iwasaki O, Obuse C and Yanagida M., *The Journal of Cell Biology*, 22 March 2010; Vol.188, No.6., doi:10.1083/jcb.200908096

9) Structure of TOR Complexes in Fission Yeast, Yanagida M and Kanoh J., *THE ENZYMES, Vol.XXVII, Structure, Function nad Regulation of TOR complexes from Yéasts to Manmmals*, PART A, Part 14, 271-284, Elsevier Inc., March 2010, doi: 10.1016/S1874-6047(10)27014-2