

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「代謝調節機構解析に基づく細胞機能  
制御基盤技術」

研究課題  
「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」

研究終了報告書

研究期間 平成17年 9月～平成 23年 3月

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

## § 1 研究実施の概要

細胞の恒常性は一定染色体数の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物質代謝メタボリズムの制御に着眼し、新規制御メカニズムの存在を発見し、それら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因子群の包括的同定、(2)染色体分配期後期におけるセパレーズ・プロテアーゼ活性制御の統合的解明、(3)ヒストンの脱アセチル化およびアセチル化による染色体・動原体クロマチンの構築制御のサブテーマで研究を行った。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おり今後大きな発展を期待している。これまで、原著論文(国際誌、peer reviewあり)として30報を公表したが、多くの研究成果の公表はどうしても終了後2年ほどの期間を必要とする。以下に研究成果の要旨を箇条書きする。(1-1)メタボローム解析法の導入に成功した。沖縄科学技術整備機構G0研究室の質量分析機を用いた研究の寄与が大きく、数千のピークの検出と130種の代謝物を同定した。網羅的測定により、増殖時・静止G0時の遷移における非常に大きなメタボリックな変動が明らかとなった。(1-2)限定グルコース濃度下でM期進入に必須となるSsp1キナーゼとSds23ホスファターゼ阻害因子を発見し生理的意義を解明した。Ssp1はグルコース認知とM期進入の鍵を握る重要因子であり、TORやCDKとの関わりもあった。(1-3)グルコース各濃度に対するバイオマーカーの存在を見いだした。グルコース絶食下での細胞寿命は飢餓前処理によって著しく延長する。グルコース飢餓では抗酸化ストレス物質の産生が著しく、酸化ストレスに対応することが細胞寿命と直結すること、またグルコース飢餓が細胞静止の理解に役立つことを見いだした。(1-4)低グルコース下でも増殖可能とするLGS遺伝子群の同定。Ssp1やSds23はLGSの最初の2例であるが、多数のLGS遺伝子を同定した(久留米大斉藤グループとの共同研究)。(1-5)窒素源認識の制御因子TORC1複合体の機能同定と、TORのみならずATM/ATRやTRAなどのPIKK巨大複合体と結合するTel2・Tti1などの発見とその機能解析。すなわち新規に見いだされたTel2, Tti1複合体がTor1, Tor2, Rad3/ATR, Tel1/ATM, Tra1, Tra2などのPIKKキナーゼのすべてと結合することを見いだした。(1-6)TORC2複合体の機能解析でTORC1とは非常にことなることを見いだした。(1-7)窒素源枯渇下に生存性維持に必須となるスーパーハウスキーピング遺伝子群の同定。ヒトにも保存される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。(2-1)浸透圧ストレスがセキュリン・セパレーズ機能に影響を与えることを見いだした。(2-2)AAA ATPaseであるCdc48はセキュリン・セパレーズの安定化因子である。(2-3)TOR複合体は上述のように栄養源感知・細胞成長に関わる最重要キナーゼであることはよく知られているが、我々はTORキナーゼと染色体分配の中心的プレイヤーであるセキュリンとセパレーズが機能的に結びつくことを明らかにした。(2-4)コヒーシサブユニットRad21とセキュリン/Cut2のリン酸化と生理的意義。(2-5)アナフェーズ開始に必須なタンパク分解の統合的理解。プリンキン機能の発見、コンデンシン機能の理解の進展。(3-1)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アセチル化酵素や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。ヒストンアセチル化と脱アセチル化によるセントロメア/キネトコアクロマチン構築形成の制御。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(3-2)アセチルCoAの生合成からみたキネトコア形成;温度感受性株を用いたアセチルCoA合成系酵素系の細胞機能と染色体分配への関与。

## § 2. 研究構想

### (1) 当初の研究構想

細胞の持つ恒常性は一定染色体数の維持によって支えられている。種に固有の染色体数が一定でない異数体が生じ、細胞は死滅もしくは病的症状を呈する。不死化、癌化することもある。この一定染色体数は生物ホメオスタシスの範疇に入る。ホメオスタシスとは環境変化に対して堅固に恒常性を保つための生物体(細胞)のレスポンスである。染色体数異常は、DNA 損傷修復、チェックポイント制御などの細胞レスポンス、および細胞周期において適切な時期に DNA 複製、染色体分配が起こることによって最小になっている。染色体分配異常やゲノム不安定化などが広範な腫瘍形成を引き起こしうる。それゆえ、一定染色体数を保証し、乱れの起こる状況を回避する細胞レスポンス機能を理解し、関連した基盤技術を創成することは人類にとって最重要課題の一つであろう。植物では倍数体が栽培植物に多く利用され、染色体数にかかわる基盤技術開発は植物体に新機能を付与するうえでも大切である。中核となる分配メカニズムは、**栄養条件、環境ストレスや細胞内外の刺激にさらされるが、細胞はそれらへの対応能力を有している。ただ、これまでくみが多様な分子が関わっていると予想されて、栄養や環境などへの展開は殆ど研究されなかった。**オーケストラメンバーのような多様な分子群の作る機能ネットワークの統合的な解明が染色体分配機構の次なる最大の課題であろう。そしてそのためには、解析の基盤技術の発展が最重要であろう。さいわい、関与する遺伝子の大半は動物、植物、菌類など真核生物に保存されている。それゆえ創成される基盤解析技術の普遍性は高いと考えられる。

本研究を開始するまでの我々のアプローチは、個々の問題を深く解析する傾向が強かったが、染色体分配の細胞機能そのものが環境変化や培地条件、細胞内外の刺激、代謝変化に変化・対応していることも常に意識していたことは事実である。セキュリン、セパレーズ変異が浸透圧ストレスで完全に抑制される驚くべき発見は詳しく解析しているが、MAP キナーゼ(Sty1/Spcl)制御と関わる事が明らかである。HDAC 欠失やその阻害剤トリコスタチン A は染色体分配変異の抑制に強力に作用する。つまりアセチル化の昂進で染色体は分離しやすくなっている。メタボリックな酵素である Cut6 (acetyl CoA carboxylase), Lsd1 (脂肪酸合成酵素)の変異や脂肪酸合成酵素の阻害剤セルレニンが染色体分配、核分裂異常を引き起こすことも以前から見いだしてきた。**染色体分配を支える分子ネットワーク、分配メタボリズムと呼べるような細胞制御システム、が存在するという感はますます強い。それをいかにして統合的、網羅的に把握し、解析する為の基盤技術を発展するか、それが本構想の主たるポイントであった。**これまで染色体数恒常性を支える複雑な分子反応を、統合的・網羅的に解析しようとする試みはほとんどなされていなかった。ポストゲノム的な種々の high throughput 法によって多くの有用知見が得られており、我々も無関心ではない。

本研究を開始する頃に、沖縄での「GO細胞」プロジェクトにおいて、関西先端センター平岡泰博士（現大阪大学教授）等との共同研究でトランスクリプトーム解析により興味深い結果を得た。プロテオーム解析も、研究開始以前に当ラボに在籍していた小布施博士（現北海道大学教授）と開始しており新規複合体発見に大きな威力を発揮した。当初のテーマにおいて、メタボローム解析の適用を真剣に考慮した。また鈴木紘一総括のもとでの本領域発展にも貢献したかった。鈴木総括の死去はなにものにも比較しようがないほどの衝撃であり残念なことであるが、本研究のこれまでのご支援にこころからの感謝の言葉をのべご冥福を祈りたい。

## (2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

《研究を進めていく中での新展開から生まれた新たな研究計画や目標等、あるいは修正を行った点など、簡潔に記述》

三つの具体的なサブテーマを当初提示したが、以下に述べるようにそれぞれについて研究の展開とともに変更や修正を行った。

### 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

本サブテーマでM期進入決定に関わる未知制御因子群の包括的同定を試みた。この5年間われわれはこのサブテーマを主たる課題として研究を行ってきた。問題ははまだ集約しておらず複数の問題として存在する。また一筋縄ではいかない困難さがあるので、いくつかのアプローチをとらざるを得なかった。我々の作業仮説は分裂酵母のM期進入時には「外界栄養源の消費を細胞成長（伸長）からM期進行と細胞分裂へ切り替える」というものであった。そのために「未知の代謝シグナル」が発生するという仮説を立てた。その詳細な根拠は申請書に書いたが、細胞伸長がM期から染色体分配、細胞分裂まで（G1期とS期も含む）起こらないことにかかわる遺伝子群を同定しようとした。そのため、分裂期で細胞伸張を続ける表現型を指標に変異株を分離した。もっとも頻度高く分離されたのが、Ssp1（カルシウム、カルモジュリン依存性キナーゼCaMKK）とMAPキナーゼSty1の変異株であった。Ssp1はAMP活性化キナーゼ（AMPK）Ssp2（分裂酵母のAMPKのホモログ）やPP2Aホスファターゼ阻害因子Sds23とも機能的に深く関連した。Ssp1は低グルコースで細胞分裂が不能となりG2/M進行が遅延を示した。Ssp1, Ssp2, Sty1, Sds23のどれも低グルコース下でのM期の開始と進行に関与するので今後も研究を進める。また、この表現型に触発されて、低グルコース下での細胞増殖を可能とする遺伝子群LGS(low glucose survival)の組織的な同定と体系的な解析という大きなプロジェクトを開始することが可能になった。

温度感受性株の中で窒素源の存在を認識できなくなる変異体の分離を試みた。その結果TOR(target of rapamycin)複合体に欠損をしめすtor2変異体を分離できた。興味深いことにTOR複合体のシステムは染色体分配ともまたDNA損傷修復ともかかわっていることが研

究の進行により分かってきた。TORのみならずATM/ATRなどとも安定に結合するTel2やTti1タンパク質の発見は窒素源認識が欠損した変異体の研究を契機として見つかった。Tel2-Tti1複合体の機能は大変興味深いのが、突然変異体を分離して表現型を解析すると、染色体分配に関わるというよりも、細胞成長の根幹的なシグナリングに関わるものと思われる。TORを含むPIKKといわれる複合体の機能を統合的に理解しようとする現在のトレンドはこの窒素源シグナリング認識の研究から出たTel2-Tti1複合体の発見を契機としている。研究当初はまったく未知であったM期進入時の「栄養源の成長から分裂へ切り替える分子ネットワーク」の存在は未発表データの蓄積もあり当初に比し飛躍的に明確になってきたことは以下に記述するとおりである。われわれはSsp1にかぎらずLGS遺伝子群とTORの制御系の体系的理解がこの課題の研究発展に肝要と考えている。一方でこれらの変異体はメタボローム研究の好個の対象となってきた。ここで扱った問題は従来Cdc2キナーゼ関連因子の同定によって解明されると考えられてきたが、まだ関わりについての研究には着手していない。

## 2. セパレーズ・プロテアーゼ活性制御の統合的解明

セキュリン・セパレーズ複合体は染色体分配と細胞分裂に中心的な役割を果たす。分裂期の機能が強調されがちであるが、実際には間期でもDNA損傷修復やセントロソームの倍加など必須機能を担っている。当初の研究計画では染色体分配時の2段階のタンパク質分解（セキュリン/Cut2とScc1/Rad21）がいかにして調和して起こるか、その背景にあるメタボリックな制御の理解を推し進めようとした。セパレーズに欠損を示す変異体が、PKAキナーゼ欠損（cAMP濃度低下）、脱アセチル化能低下（トリコスタチンA添加）、浸透圧ストレス上昇などのメタボリックな変化によって相補されることを見いだしていたのでそれらを手がかりにしようとした。またセキュリンやセパレーズと相互作用する新規因子を同定しようとした。そのひとつ、AAA ATPaseであるCdc48がセパレーズの安定化因子であるという驚くべき実験結果を説明すべく努力した（Cdc48はタンパク質のクオリティコントロール制御にかかわる）。その結果、セパレーズ・セキュリンとプロテアソーム、APC/C、Cdc48の間に新規制御系の存在が予測できるようになった。セキュリン・セパレーズの背後にある制御系のひとつがTOR複合体であることが判明した。現在の一つの課題はTORキナーゼがかけるセキュリン、セパレーズ機能は直接的なリン酸化機能なのか、それとも間接的なものか、さらにはTORC複合体サブユニット機能とかかわるのかを解明することにある。質量分析の解析からセキュリンとセパレーズに結合している多数のタンパク質の解析も進めている。特に、RNA結合性タンパク質、エネルギー代謝関連因子は解析を進めている。これらの結合タンパク質は現在の既知のセキュリン、セパレーズ機能とは直ちには結びつ

かないのでまったく思いもよらない方向においてこれらが分裂期にかかわっていることが判明するかもしれない。今後セパレース・セキュリンの細胞機能は一段と広がりのある世界になることは間違いないとおもわれる。

### 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/キネトコ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。セントロメア構築は細胞周期毎にある程度更新される。キネトコアは微小管との二方向性結合を確立し、正確な分配を可能にする。このセントロメア変換サイクルのメタボリックな制御を追求してきた。われわれは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詳細な解析を行い、セントロメアヒストンの脱アセチル化状態維持に必須な因子群（Mis16/RbAp46、Mis18等）を重要因子として同定した。ヒストンのアセチル化と脱アセチル化はセントロメア構築の更新と深く関わることを見いだした。それゆえ、セントロメア特異的クロマチン変化のダイナミクスの解析を推し進めてきた。当初の計画になかったものとしてアセチルCoAの生合成にかかわる必須酵素PANK、PPCSなどの研究も進めてきた。これらは予想外なほど深く染色体分配機能とかかわってきた。また非分裂細胞の寿命の問題とも関わってきた。われわれはタンパク質のアセチル化による制御はアセチル化のドナーであるアセチルCoAの生合成制御の理解を必要とするのではないかと考えたからである。その結果、興味深い結果が得られつつある。またヘテロクロマチンタンパク質であるHP1がMis12複合体と相互作用することを見いだして、その機能的な意義の理解を推し進めた。後者のMis12のクロマチンとの関わりはヒト細胞を用いた系で著しく進展して姉妹キネトコアを結びつけるinner centromere形成への寄与も明らかにすることができた。また本研究のメタボリックな目的とはややずれるもののコンデンシンやコヒーシンの分子機能やキネトコアの形成やチェックポイント機構にせまる研究もあわせて活発に行ってきた。

### §3 研究実施体制

(1)

A.「柳田」グループ(京都)

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
柳田 充弘	京都大学	研究員(特任教授)	H17.10～H23.3
中村 隆宏	沖縄科学技術研究基盤整備機構	研究員(共同研究者)	H17.10～H23.3
藤田 陽太	京都大学	研究員(産官学連携)	H17.10～H22.6
川寄 洋祐	〃	研究員(産官学連携)	H17.10～H21.3
渡並(村上) 優子	〃	研究員(産官学連携)	H19.12～H20.12
清光 智美	〃	特定研究員(産官学連携)	H17.10～H22.3
林 武志	沖縄科学技術研究基盤整備機構	研究員(共同研究者)	H17.10～H23.3
大田 久美子	〃	研究員(共同研究者)	H21.3～H23.3
今井 久美子	京都大学	産学官連携研究員	H18.4～H20.3
青木 敬太	〃	産学官連携研究員	H17.10～H20.2
木下 和久	〃	産学官連携研究員	H18.10～H19.10
Rajesh Mehrotra	〃	産学官連携研究員	H17.10～H19.8
松村 拓洋	〃	産学官連携研究員	H22.12～H23.3
中沢 宜彦	沖縄科学技術研究基盤整備機構	研究員(共同研究者)	H17.10～H23.3
白岩 善治	京都大学	研修生	H17.10～H23.3
猪飼 信康	〃	特定研究員(産官学連携)	H17.10～H23.3
安達 陽	〃	D3(学振 DC1)	H17.10～H20.3
羽生 雄一郎	〃	D3	H18.4～H21.3
丸山 雄史	〃	D5	H17.10～H18.9
村上 博昭	〃	D4	H17.10～H18.3
赤井 祐子	〃	教務補佐員	H17.10～H23.2
岩崎 治	〃	教務補佐員	H18.1～H18.4
江部 正弘	〃	教務補佐員	H18.4～H23.3
塩野 敬子	沖縄科学技術研究基盤整備機構	研究補助員	H18.4～H23.3
畠中 内子	京都大学	教務補佐員	H20.4～H21.3
藤澤 飛鳥	〃	教務補佐員	H20.4～H21.3
柴田 瑛莉	〃	教務補佐員	H21.5～H23.3
高橋麻由美	〃	事務補佐員	H17.10～H18.3
田島 由理	〃	技術補佐員	H19.2～H21.3
片山 啓	〃	技術補佐員	H19.2～H19.5
泉 はるか	〃	オフィス・アシスタント	H20.6～H22.1
川合 宏武	〃	オフィス・アシスタント	H20.6～H22.1
北村 友里奈	〃	オフィス・アシスタント	H20.6～H23.2
笹 友香子	〃	オフィス・アシスタント	H20.6～H23.3
青木 愛	〃	オフィス・アシスタント	H21.3～H22.3
坂田 ゆず	〃	オフィス・アシスタント	H21.3～H23.3
森田 真紀子	〃	オフィス・アシスタント	H21.3～H23.3

田中 惇子	〃	オフィス・アシスタント	H21.3～H23.3
中小司 由香里	〃	オフィス・アシスタント	H22.2.21～H23.3

B.「柳田」グループ(沖縄)

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
柳田 充弘	科学技術研究基盤整備機構	主任研究員	H21.4～H23.3
Tomas Pluskal	沖縄科学技術研究基盤整備機構	技術員	H21.4～H23.3
Alejandro Villar Briones	沖縄科学技術研究基盤整備機構	技術員	H21.4～H23.3

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 研究実施内容及び成果

### 4.1 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

#### (1) 研究実施内容及び成果

##### <1> 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 (Shimanuki et al., 2007 Genes Cells; Hayashi et al., 2007 Genes Cells; 未発表) が、本研究の大きな進展をもたらすためには低分子量化合物を包括的に解析するメタボローム技術の導入と利用が不可欠であった。ただ、この技術は研究当初は未熟な段階で、本格的導入は容易でないと想定した。しかし、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た。その結果、実験的にもソフトウェア的にも非常に信頼性の高いものを生み出すことができ、基本的な論文を公表する段階にこぎつけた (Pluskal et al., 2010 Mol BioSyst)。これほど確固とした方法を報告した論文は分裂酵母においてはなく、他の生物でも少ない。生物学的な課題への適用のパイロット実験として、プロテアソームやオートファジーの変異体を利用して酸化ストレスにレスポンスする代謝物を定量することに応用し、成果をあげることもできた (Takeda et al., 2010 PNAS)。

方法は具体的には分裂酵母の代謝物の再現性の高い抽出方法を確立し、HPLC カラムによる高解像のコンパウンドの分離、フーリエ変換型質量分析機による多数の代謝物の検出ピークの意義を徹底的に検討して、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。詳細に研究していくと、実際にはそれらピーク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・ビタミンなど多岐にわたっている。さらに沖縄での GO 研究室の技術員が改良した解析ソフトウェア (MZMine 2; Pluskal et al., 2010 BMC Bioinformatics) 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。これら質量分析装置を使ったメタボローム解析の実験の多くは沖縄において行った。しかし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、まず温度が 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。一方で鉄代謝と関わるフェリクローム合成に必須な遺伝子の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(以下で詳述)。ところが HMG-CoA 合成酵素変異体 *hcs1* の細胞中では HMG-CoA 量の減少に加えて尿素サイクル代謝物の減少やアセチル化合物の増大など、二次的に大きな変動が見られた。このようにメタボローム解析では遺伝子欠損によるプライマリーな変化とそれ以外の二次的、三次的な変化が生じるので実際には複合的にして複雑なデータを取り扱う面もある。しかしながら、今後細胞周期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、上述のような問題を克服していけば、細胞周期のエネルギー的側面、メタボライトの側面などの不可欠にして極めて有効な情報がえられるであろう。また本方法は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ている。

#### <2>限定グルコース濃度下で M 期進入に必須となる Ssp1 キナーゼと Sds23 ホスファターゼ阻害因子の発見とその生理的意義の解明

これまで当研究室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 (Hanyu et al., 2009 Genes Cells)。Ssp1 を研究してきた理由は温度感受性変異株が上で述べた細胞周期を認知しつつ栄養源利用のきりかえに関与するのではないか、と予想される表現型を示したからである。すなわち、通常培地で欠損すると G2 期で遅延すること、M 期に進入した変異細胞が細胞伸張を続行するという事実があった。さらに M 期におけるアクチン局在の異常であった。本研究で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 (0.08%; 通常培地は 2% グルコースを含む) 下では細胞増殖の停止が起きた。さらに許容温度でも低グルコースならば細胞伸張が起こり G2 で遅延する。この Ssp1 キナーゼは配列の類似性のみならず 14-3-3 様タンパク質の結合などの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) に欠損を示すことが知られている。実際に分裂酵母の *ssp1* 変異細胞ではグルコースの消費速度は低下していたので Ssp1 がグルコース利用に関わることは間違いない。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保存された短い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

ことをわれわれは示した。

Ssp1 キナーゼと深く関与する Ssp2 遺伝子産物の同定を行った。その結果 Ssp2 は AMP 依存性のタンパク質キナーゼの触媒サブユニットであることも判明した(Hanyu et al., 2009 Genes Cells)。分裂酵母にはもう一種類 AMPK (Ppk9)があることも判明した。さらに質量分析の結果から二種類の制御サブユニットも同定され、一つは Cbs2 と名付けた。Ssp1 は Ssp2 の上流で働く可能性が高いが実際にそうであるかどうか検証している。

Sds23 遺伝子は Ssp1 の変異の多コピーサプレッサーとして同定された。もともとは M 期制御因子として1型のタンパク質ホスファターゼや APC/C ユビキチンリガーゼと関わることで同定された (M 期から脱出に必須な因子として発見された)。本研究で、質量分析と生化学解析から Sds23 が2A 型様の脱リン酸化酵素の制御サブユニットと安定に結合しさらに活性を阻害する因子であることを示した。Sds23 が欠損するとオカダ酸に感受性の PP2A 様の脱リン酸化活性が異常に高まった。また、グルコース消費がほとんど起こらなくなった。つまり sds23 変異細胞では低グルコースになるとまったく細胞増殖がおこらない。これらの結果を総合して、Ssp1/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し、Sds23 は脱リン酸化酵素の負の制御因子であると結論した。今後の課題は 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の問題については既に多くの研究があるがかならずしも明解でないので、今後の課題であろう。

この Hanyu et al (2009) の研究によってわれわれはグルコース濃度が細胞周期と M 期進行に重大な影響をもたらすことに気づき、この問題を組織的に調べることを決めた。そのうちの一つは以下にのべるように、分裂酵母の異なったグルコース濃度でのレスポンスの違いを追求することであった。すなわち、グルコースを過剰からダイエツト、飢餓、さらには絶食までのいくつかの異なった培地条件での分裂酵母のレスポンスを種々の細胞パラメーターとメタボローム解析を行って調べたものである。もうひとつは、低グルコース濃度でも細胞増殖を可能にする遺伝子 LGS (low glucose survival) の同定であった。Ssp1 と Sds23 は最初に見つかった lgs 変異である。

### <3>グルコース各濃度に対するバイオマーカーの存在;グルコース欠損下での細胞寿命は飢餓体験によって著しく延長する

グルコースは細胞のエネルギー産生に不可欠である。グルコースの濃度によって分裂酵母細胞の増殖と静止がいかに定まるかをしらべた。そのために、分裂タイミングの正確さ、一時的な増殖停止時間、グルコース欠損下の細胞寿命を調べた。分裂酵母はヒト血液のグルコース濃度程度でも十分に増殖できる。ダイエツト濃度 (グルコース 4.4 mM, 80 mg/dl) でも細胞増殖はグルコース過剰 (111 mM, 2000 mg/ml) の場合のパターンとほとんど遜色なく起こることが判明した。但し、細胞の大きさは小さくなっているため分裂時間は節約できる。飢餓条件 (2.2 mM 以下、40

mg/dl)となると、静止状態に近づき分裂は低頻度ではおこるものかなりストカスティックになっていった。グルコースを欠損絶食させると、細胞の生存率は一日以内で著しく失われた。しかしながら、細胞を前もってグルコース飢餓で前処理すると細胞の寿命は飛躍的に伸びた。われわれはメタボローム解析により各グルコース濃度に特異的に増加、減少するコンパウンドを同定することが出来た。トレハロースと抗酸化ストレス効果のあるエルゴチオネイン、メチル化合物が飢餓条件下で著しく増大した。絶食下では細胞分裂はもちろんおきないが、リン脂質の前駆体が著しく増加した。抗酸化ストレスコンパウンドやヌクレオチド三リン酸は著しく減少し生存率の低下を説明出来た。もしも細胞を絶食前に飢餓にしばらくおいておくと、これらグルタチオンとか ATP 濃度はかなり高いままで推移できた。その結果寿命のある期間にはこのような抗酸化化合物や ATP が一定濃度で存在していた。以上の結果からわれわれはグルコース飢餓では酸化ストレスの産生が著しく、それに対応することが細胞寿命と直結すること、またグルコースが細胞の静止の条件の一つともなり得ること、などを示すことが出来た。この研究は現在投稿準備中(Pluskal, Hayashi et al., )である。

#### 〈4〉低グルコース下で増殖可能とする LGS 遺伝子群の同定

先に述べた通り *ssp1*、*sds23* 変異細胞は低グルコース培地で増殖できない。この発見を契機として、われわれは LGS 遺伝子の網羅的なスクリーニングを試みた。LGS 遺伝子の機能が損なわれると細胞は低グルコース培地中で正常な分裂増殖ができなくなる。2800 株の遺伝子欠失株ライブラリー (Bioneer 社) および 1015 株の温度感受性株ライブラリー (Hayashi et al. 2004 Cell) に含まれる変異株のそれぞれを、ラボオートメーションシステムを利用して高グルコース、低グルコース含有固形培地にスポットし、低グルコース培地での生育が特異的に悪くなる変異株を組織的に同定した。一連のスクリーニングによって温度感受性株ライブラリーから約 70 の lgs 変異株が同定されたが、そのうち約 40 については変異遺伝子がすでに決定されているかもしくは特定可能であった。欠失株ライブラリーからは約 90 株が同定されたが、そのすべてについて欠失遺伝子は明らかである。

決定された LGS 遺伝子群の生理機能は多岐にわたっていた。*ssp1* や *sds23* をはじめとするリン酸化シグナル、ミトコンドリア機能、小胞輸送、細胞骨格、RNA 代謝などに関連する遺伝子が多数含まれていた。これらの LGS 遺伝子がどのようなメカニズムによって低濃度グルコース環境下での細胞増殖を可能にしているのかについて、現在解析を進めている。なお、LGS 遺伝子群の同定と機能解析は、久留米大学分子生命科学研究所の齋藤成昭 博士グループ (研究補助員: 増田史恵、副島朗子の2名を含む) と沖縄 G0 研究室の森、上原技術員によって遂行された。

#### <5>窒素源認識の制御因子 TORC1 複合体の機能同定とそれに結合する Tel2・Tti1 などの発見

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栄養源感知及び代謝関連遺伝子の変異体を取得すべく努力した。その一環として富窒素源の培地下であたかも窒素源枯渇下のように細胞が増殖停止する変異体を取得した。それが、Tor2 の遺伝子変異株 *tor2-28* であった (Hayashi et al., 2007 Genes Cells)。TOR 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。われわれはこの *tor2-28* がラパマイシンに超感受性であることを見いだした。さらに富窒素源で増殖を停止して G0 期様への移行がおこり一方で G0 期からの脱出が温度感受性的に起こらないことも示した。詳細な質量分析の結果から、分裂酵母の TOR キナーゼ複合体 TORC1 と TORC2 の異なる構成サブユニットを確定した。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 ((Tor2、Tor1、Rad3、Tel1、Tra1、Tra2)) 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、すなわち栄養に対する反応、DNA 損傷チェックポイント、転写制御など、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 Genes Cells; Kanoh and Yanagida, 2007 Genes Cells)。ヒト細胞でも同様な因子が存在することが見いだされている。現在 Tel2-Tti1 複合体の機能を明らかにするために温度感受性 *tii1* 変異株を作成し解析を行い、興味深い結果を得ている。この変異体を利用する研究成果によって窒素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。

#### <6>TORC2複合体の TORC1 と著しく異なる表現型の違いと TORC2 の機能解析

分裂酵母の TORC2 の触媒サブユニットは Tor1 であるがこれまで変異体は、遺伝子破壊株しかなかった。われわれは Tor2 との比較もあり、温度感受性の変異体の取得を目指した。*tor2-28* の変異体は保存されたアミノ酸が変異していたので、類似の変異を Tor1 遺伝子に導入した。その結果温度感受性が取得できた。変異体の表現型は制限温度下で欠失株に類似はしていた。また従来の温度感受性株のコレクションの中に TORC2 サブユニット変異である *ste20* を見いだした。現在これら *tor1*、*ste20* の変異体を利用して現在 TORC2 の機能解析を行っている。表現型は TORC1 と TORC2 は著しく異なる。

#### <7> 窒素源枯渇下に生存性維持に必須となるスーパーハウスキープング遺伝子群の同定

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 (Sajiki et al., 2009 J Cell Sci)。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。遺伝子のほとんどは脊椎動物にも保存されていた。G0 期導入時には7 遺伝子を同定し、これらの遺伝子はその報告されている機能により3 つのグループに分ける事が出来た。1 つ目はストレス応答 MAP キナーゼ経路に関わる遺伝子、*wis1*, *sty1* であり、これらの変異株の解析からストレス応答 MAP キナーゼ経路は G0 期導入時に細胞成長と細胞周期の両方を制御している事が示唆された。2 つ目は小胞膜融合に関わる遺伝子、*vam6*, *vps11*, *ypt5* で、これらの変異株の解析から G0 期導入時には活発な小胞合成が起きている可能性が示唆され、小胞を融合して処理する経路の重要性が示された。3 つ目はエンドサイトーシスに関わる遺伝子、*end4*, *wsp1* でこれらの変異株の解析からエンドサイトーシスが浸透圧の変化に対する耐性獲得に必須ではないかと考えられた。また、G0 期維持時には 26 遺伝子を同定した。その機能は細胞周期制御、コヒージョンとクロマチンリモデリング、ATP 代謝、小胞輸送、細胞壁合成、RNA 合成・代謝等、多岐に渡っており、この事からも G0 期維持時にも活発な細胞内活動は起きており、積極的に G0 期が維持されている様子が想像された。さらに本研究では、その中から特に Fcp1 に注目した。Fcp1 は RNA ポリメラーゼ II、CTD の脱リン酸化酵素であり、転写機構そのものに作用するため、その影響は転写全般に及ぶものと予測された。しかしながら、トランスクリプトーム解析を行うと、この変異株中では遺伝子によって発現の変動が様々であり、遺伝子特異的に影響が出ている事が確認された。更に、増殖期と G0 期で影響を受ける遺伝子の種類が全く異なっていた。変異株中での遺伝子の発現量の変化が表現型にも反映されていた事から、Fcp1 が増殖期と G0 期の差異を転写レベルで制御している可能性が示された。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。経費はかかるものの変異遺伝子同定までの期間的な短縮が大きい。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。本研究は沖縄で主におこなわれており G0 細胞確立の理解のためにおこなっているが、本研究への波及効果が研究期間中にたいへん大きかったのでここで記述しておく。なお Ssp1 はスーパーハウスキーピング遺伝子でもあった。そのグルコース利用の必須性、G0 停止での必須性など今後の大きな課題である。

## (2)研究成果の今後期待される効果

静止細胞がいかに形成しいかにされ維持されているかについてその仕組みをメタボリックな側面も含めて考察し、総説を発表した(Yanagida M. 2009 Trends Cell Biol)。体細胞の大部分が分裂しない事実を考慮すれば非分裂細胞の寿命の研究の意義は極めて深いものがある。しかも分裂細胞と非分裂細胞が可逆的に変換する分裂酵母は極めて秀れたモデル系であるにちがいない。本研究の課題は実は幹細胞の理解のための直近にある研究である。モデル生物を使った意

義については、これまでのこの分野の研究の画期的な発見がまずモデル生物で為されたことから明らかであろう。幹細胞の研究者の中にはわれわれの研究に大きな関心を向けられているかた達が実際おられる。たとえばこの11月にある幹細胞の国際会議ではわれわれのモデル細胞での研究をぜひ話して欲しいとの招請があった。

生命体にとって細胞を増殖するか、増殖を停止して G0 期に入るかを決定するのは非常に重要な選択である。G0 期での細胞は細胞周期を停止するのみならず、分化やアポトーシス、老化の前段階にあると考えられ、G0 期の研究は生物学的、医学的に大きな重要性を持っている。しかしながら、これまでの細胞周期の研究は増殖期に重点が置かれ、G0 期導入や維持の機構や、そこに関わる遺伝子はほとんど明らかにされてこなかった。私達は分裂酵母が、培養液中から窒素源を枯渇させる事で容易に G0 期に誘導される点に注目し、このモデル系を使って G0 期の導入や維持に必須な遺伝子を同定する事とした。特に分裂期において、増殖を続けるのか、それとも G0 期に進入するのかを決める、その要因の一つが栄養条件であることはいままでもない。そのため本研究の発展性は極めて高いと思われる。

われわれとしては具体的に人間を対象とした研究に発展させたいと思っている。現在京大医学研究科とのヒトを対象としたメタボローム解析による共同研究を開始すべく準備を進めている。今後のわが国での長寿社会を考慮したときに医療費の増大、医療施設の拡充の問題を考えたときに幹細胞と非分裂細胞の長寿のしくみを研究することの意義はますます高まるであろう。

またこれまでの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、多数の変異体の原因遺伝子の特定を行っている。ひとつの例として論文として公表したものは、Cold Spring Harbor 研究所の R. Martienssen 博士との共同研究であった。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 (Irvine et al., 2009 Genome Res)。

## 4.2 セパレーズ・プロテアーゼ活性制御の統合的解明

### (1)研究実施内容及び成果

第二のサブテーマでは、セパレーズ・セキュリン複合体がどのように働いて染色体分配が可能となるのか、その統合的理解を推し進めることを目標とした。この複合体の標的としてもっともよく知られているのはタンパク質複合体のコヒーシンである。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される。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。しかしセパレーズ機能はこれだけではない。広がりのある機能を持つと考えられるがプロテアーゼ活性に比べると知見は極めて乏しい。本研究では、セパレーズ・セキュリン複合体のメタボリックな性質の解明を課題とした。

#### <1> 浸透圧ストレスがセキュリン・セパレーズ機能欠損をレスキューする

我々は、セパレーズ変異体の M 期染色体分離欠損表現型と温度感受性が高浸透圧ストレスや高塩ストレスなど細胞外環境ストレスによってほぼ完全に抑制すなわちレスキューされることを見出した(Kawasaki et al., 2006 Cell Cycle)。詳細な解析の結果、セパレーズの阻害因子でありながら同時にシャペロンの安定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が判明した。つまり浸透圧の効果はセキュリン-セパレーズを通じて発揮された。このことが表現型抑制の分子レベルでの主な原因であろう。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 にある程度依存していた。また、セパレーズ変異体は MAP キナーゼ破壊株と合成致死的な生育阻害効果を示した。これらの結果は MAP キナーゼが直接間接的にセパレーズを制御している可能性を示唆している。セキュリンは高度リン酸化タンパク質であり、リン酸化サイトを多数質量分析法により同定した。試験管内反応でセキュリンが実際にリン酸化されるかをカリフォルニア大学 Davis の塩崎教授にお願いして調べたが今日まで直接的なリン酸化の可能性についてポジティブな結果は得られていない。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間接的な影響と考えるのが妥当かもしれない。浸透圧ストレスがなぜセキュリン・セパレーズ変異をレスキューできるのか、その生理的意義も含めてほとんど今日も理解されていない。

## <2> AAA ATPase である Cdc48 はセキュリン・セパレースの安定化因子である

セキュリン・セパレースの安定化に AAA ATPase である Cdc48 タンパク質が関与することを見いだした (Ikai et al., 2006 J Structural Biol)。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。我々が分離した Cdc48 の変異体ではセパレース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 *cdc48* 変異体の染色体分配の異常はセパレース変異の異常と酷似していた。さらにセパレース Cut1 を大量発現するとこの *cdc48* 変異はレスキューされた。しかしセキュリンの大量発現は逆に毒性効果があった。なおこの Cdc48 の関与はセキュリン・セパレースでは深いものの、サイクリン CDK ではまったくなかった。それゆえ Cdc48 の関与はセキュリン・セパレースにより選別的なものである。

## <3> コヒーシンサブユニット Rad21 とセキュリン/Cut2 のリン酸化と生理的意義

一方、我々は質量分析を用いてセパレース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)。中でも DNA 損傷依存的な Rad21 のリン酸化は M 期後期の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。

## <4> アナフェーズ開始に必須なタンパク分解の統合的理解

染色体数の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ス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 がヒト動原体タンパク質 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)。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., 2009 Structure)。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が明らかとなった (Bolanos-Garcia et al., 2009 Structure)。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 (Kiyomitsu et al., 2010 J Cell Biol)。

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 J Cell Biol)。

## (2)研究成果の今後期待される効果

セパレーズは染色体分配に中心的な役割を果たすものとして理解されているが、実はその機能の多くはいまだ未知であるというのがわれわれの考えである。セパレーズというタンパク分解活性にのみ関心が向けられているが、実際には非タンパク分解活性の機能は極めて重要であろうと予想している。この観点での研究は今後も発展していきたい。すなわち栄養的、メタボリックな影響が染色体分配に現れる点でも興味深い。セキュリンのリン酸化と脱リン酸化もそこにかかわるタンパク質キナーゼの同定も含め今後の発展が期待される。セパレーズ、セキュリンはまだこれから発展する可能性のある研究対象で、TOR とか MAPK との関わりがより明らかになれば生物学的な意義の理解は深まるであろう。

## 4.3 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

### (1)研究実施内容及び成果

#### 〈1〉ヒストンアセチル化と脱アセチル化によるセントロメア/キネトコアクロマチン構築形成の制御

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した。セントロメアは M 期において染色体の均等分配を保証する特殊なクロマチンを有する。我々はこれまでに、CENP-A (Cnp1, 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 がパソウ

エーの最上流因子として浮かび上がってきた (Hayashi et al., 2004 Cell; Fujita et al., 2007 Dev Cell)。これら以外に Mis6-Sim4 複合体と通常呼ばれる一10種のサブユニットからなる分子機能不明の複合体が CENP-A のリクルートに必要であるが、これらはこれまでの研究から Mis16, Mis18 の下流にあることが明らかであった (Hayashi et al., 2004 Cell)。

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いることを本研究期間で確立した。ヒトにおいては hMis18 $\alpha$ ・ $\beta$  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、Mis16 はヒストンアセチル化酵素 Hat1 と直接結合している。分裂酵母において *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。そういうわけで Hat1 が Mis16/RbAp と共同してヒストン H4 のセントロメアへのリクルートに関わることは明らかとなった。Mis16 が Hat1 と直接結合することからも、このリクルートにヒストン(たぶん H4)のアセチル化が関わるのだろう。

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(トリコスタチン 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。つまり Mis18 はあたかもヒストン脱アセチル化の阻害因子のような働きをしていた。Mis16 と Mis18 がセントロメアヒストンのアセチル化と深く関わることは(直接、間接的に)間違いないだろう。また、分裂酵母においては、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 J Cell Sci)。(この実験結果の解釈は、Mis16 変異で TSA を添加するとアセチラーゼ活性が過剰になると仮定すると理解出来る。すなわち Mis16 がアセチル化酵素の阻害因子なのかもしれない。)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 タンパク質についても Paul Russell 博士と共同研究を行った。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、それにより CENP-A のセントロメア局在に必須であることを示した。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た (Williams et al., 2009 Mol Cell)。

さらに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。鍵になる結果のひとつは、Mis16/RbAp46/48 と相互作用する Mis18 が分裂期 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)になって始めてセントロメアと結合することである。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隔たりがあるようにも見える。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。このような分裂期に動原体に局在せずにテロフェーズになって始めてセントロメアに結合するタンパク質としてあらたに Mis19 と Mis20 を分裂酵母において同定した。これらは Mis18, Mis16 と直接相互作用する。局在について同様な挙動をする Mis18, Mis16, Scm3 タンパク質と共にこれらふたつの新規セントロメアタンパク質の機能を追求している。

また、分裂酵母においてコヒーシロードィング因子である 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 J Cell Sci)。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。

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、セントロメアタンパク質の変異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)。コンデンシン複合体の非 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 (Yanagida M. 2009 Nat Rev Mol Cell Biol)。

## <2> アセチル CoA の生合成からみたキネトコア形成; 温度感受性株を用いたアセチル CoA 合成系酵素系の細胞機能と染色体分配への関与の解析

上述の結果からセントロメアの維持にはアセチル化と脱アセチル化の反応がカップルして関わることは明らかである。この問題を理解するためにわれわれはもっと基本的な知見を得るべく努力した。すなわちアセチル化の基質を提供するアセチル CoA がいかに合成され、その合成に異常があった時にセントロメア維持は正常だろうか、という疑問を解くべく研究を開始した。

我々は CoA 及びアセチル CoA 合成に関わる新たな遺伝子機能の発見を目的として、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用いて網羅的な解析を行ったところ、この変異体ライブラリー中には CoA 及びアセチル CoA 合成に関わる酵素変異体が含まれていることが明らかとなった。CoA はパントテン酸を材料として 5 段階の酵素反応を経て合成される。変異体解析により、パントテン酸キナーゼである PANK (pantothenate kinase) 遺伝子とホスホパントテノイルシステイン合成酵素遺伝子 PPCS (phosphopantothenoylcysteine synthetase) の二種の変異体の取得に成功した。CoA からアセチル CoA をつくるには幾つかの経路があるが、酢酸と CoA から

アセチル CoA を合成する酵素アセチル CoA 合成酵素遺伝子 ACS(Acetyl-CoA synthetase)の変異体の取得にも成功した。これらの酵素が実際に染色体恒常性維持に関与するかを検証した。またヒトの PANK2 は発症機構の不明な神経変性疾患である PKAN(pantothenate kinase associated neurodegeneration)の原因遺伝子として同定されている。本研究は発症機構の手がかりを与えることが期待された。まず我々は確立したメタボローム技術を用いてこれらの変異体中での CoA・アセチル CoA 量の測定を試みた。PANK・PPCS 変異体中では CoA・アセチル CoA の著しい減少が観察された。また PANK によって合成され PPCS によって消費される中間代謝物 4'-Phosphopantothenate は PANK 変異体中では減少しており、一方 PPCS 変異体中では増加していることが確認された。これらの結果は PANK と PPCS 温度感受性変異体中ではそれぞれの酵素活性が低下している事を示した。さらに ACS 変異体中ではアセチル CoA 量が若干減少していることが観察された。さらに変異体中ではヒストンアセチル化の低下が観察された。変異体細胞の染色体を観察したところ PANK・PPCS 変異体中では染色体分配に欠損が発生していることが明らかとなった。また両変異体はセントロメア・アセチル化制御に関わる Mis16・18 変異体と合成致死性を示した。さらにミニ染色体の高頻度での脱落が PANK・PPCS・ACS 変異体では観察された。これらの結果は CoA・アセチル CoA 生合成という必須な代謝経路の欠損により実際にアセチル化状態の変化が発生し、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した。変異体に対するヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤の効果を解析したところ、クラス I・II HDAC 阻害剤である TSA(トリコスタチン A)やクラス III HDAC 阻害剤であるニコチンアミドに強い感受性を示した。HDAC 阻害剤は抗ガン剤として注目されており、classIII HDAC である Sir2 ファミリーHDAC は細胞老化・代謝制御に関わることが知られている。

## (2)研究成果の今後期待される効果

本サブテーマではメタボリックな観点特にアセチル化脱アセチル化に焦点を合わせて、セントロメア・キネトコアの形成と維持について研究を行ってきた。セントロメア特異的なヒストン H3 である CENP-A のローディングは実に複雑な径路と多数のタンパク質を必要とすることが我々の研究から明らかとなってきた。特にこの径路の最上流に位置する Mis18 と Mis16 は直接間接にヒストンアセチラーゼと脱アセチラーゼと相互作用することにより機能することを我々はセントロメアクロマチンのプライミングというしくみで説明した。この研究の意義はわれわれがヒトと分裂酵母の両方で研究を行ったことであり、しくみの保存されている部分とそうでない部分を明確に示しながら研究を行うことにより、深い理解を可能にした。さらに研究はアセチル CoA の生合成のしくみに発展した。アセチル CoA の合成に欠損を示す変異体は明確に動原体機能に欠損があり、しかもクロマチンのアセチル化に異常を示した。なおメチル化のほうは研究の進展がなかった。

## § 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 1件、国際(欧文)誌 36件)

H17年度 該当なし

H18年度

1) Maruyama, T., Nakamura, T., Hayashi, T., and Yanagida, M., Histone H2B Mutations in Inner Region Affect Ubiquitination, Centromere Function, Silencing and Chromosome Segregation., *EMBO J.*, 2006

2) Ikai, N., Yanagida, M., Cdc48 is Required for the Stability of Cut1/separase in Mitotic Anaphase, *J.Structural Biol.*, 156, 50-61, 2006

3) Kawasaki, Y., Nagao, K., Nakamura, T., Yanagida, M., Fission Yeast MAP Kinase is Required for the Increased Securin-Separase Interaction that Rescues Separase Mutants Under Stress, *Cell Cycle*, 5:16, 1831-1839, 2006

4) Aoki, K., Nakaseko, Y., Kinoshita, K., Goshima, G., Yanagida, M., Cdc2 Phosphorylation of the Fission Yeast Dis1 Ensures Accurate Chromosome Segregation, *Current Biology*, 16, 1627-1635, 2006

5) Toyoda, Y., and Yanagida, M., Coordinated Requirements of Human Topo II and Cohesin for Metaphase Centromere Alignment under Mad2-dependent Spindle Checkpoint Surveillance, *Mol. Biol. Cell* 17: 2287-2302; 2006

6) Kumada, K., Yao, R., Kawaguchi, T., Karasawa, M., Hoshikawa, Y., Ichikawa, K., Sugitani, Y., Imoto, I., Inazawa, J., Sugawara, M., Yanagida, M., Noda, T., The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase, *The Journal of Cell Biology*, Volume 172, Number 6, 835-846, 2006

7) Fujita, Y., Hayashi, T., Kiyomitsu, T., Toyoda, Y., Kokubu, A., Obuse, C., Yanagida, M., Priming of Centromere for CENP-A Recruitment by Human hMis 18 $\alpha$ , hMis18 $\beta$ , and M18BP1, *Developmental Cell* 12, 17-30, January 2007

8) Murakami, H., Goto, D., Toda, T., Chen, E., Grewal, S., Martienssen, R., Yanagida, M., Ribonuclease Activity of Dis3 is Required for Mitotic Progression and Provides a Possible Link between heterochromatin and Kinetochore Function, *PLoS ONE* v.2(3) e317, March 2007

H19年度

9) Shimanuki M, Chung SY, Chikashige Y, Kawasaki Y, Uehara L, Tsutsumi C, Hatanaka M, Hiraoka Y, Nagao K, Yanagida M., Two-step, extensive alterations in the transcriptome from G0 arrest to cell division in *Schizosaccharomyces pombe*., *Genes Cells*. May;12(5):677-92. 2007

10) Kiyomitsu T, Obuse C, Yanagida M., Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1., *Developmental Cell* 13(5):663-76, Nov.2007

- 11) Kanoh J, Yanagida M., Tel2: a common partner of PIK-related kinases and a link between DNA checkpoint and nutritional response?, *Genes Cells*. Review. Dec;12(12):1301-4. 2007
- 12) Hayashi T, Hatanaka M, Nagao K, Nakaseko Y, Kanoh J, Kokubu A, Ebe M, Yanagida M, Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe* tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits, *Genes Cells*. Dec;12(12):1357-70. 2007
- 13) Adachi Y, Kokubu A, Ebe M, Nagao K, Yanagida M., Cut1/separase-dependent roles of multiple phosphorylation of fission yeast cohesin subunit Rad21 in post-replicative damage repair and mitosis., *Cell Cycle*. Mar 15;7(6) 2008
- 14) Nakazawa N, Nakamura T, Kokubu A, Ebe M, Nagao K, Yanagida M., Dissection of the essential steps for condensin accumulation at kinetochores and rDNAs during fission yeast mitosis, *J Cell Biol*. Mar 24;180(6):1115-31. 2008

#### H20年度

- 15) Kimata Y, Matsuyama A, Nagao K, Furuya K, Obuse C, Yoshida M, Yanagida M., Diminishing HDACs by drugs or mutations promotes normal or abnormal sister chromatid separation by affecting APC/C and adherin, *J Cell Sci*. Apr 1;121(Pt 7):1107-18. 2008
- 16) Yokoyama K, Nakagawa M, Satoh M, Saitoh S, Dohmae N, Harada A, Satoh N, Karasawa K, Takio K, Yanagida M, Inoue K., 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, *J Biochem*. 143, 369-375, Aug. 2008
- 17) Yanagida M., The Basics of Chromosome Segregation, 'The Kinocore - From Molecular Discoveries to Cancer Therapy' 21-44, *Springer-Verlag*, Nov. 2008
- 18) Bolanos-Garcia V, Kiyomitsu T, D'Arcy S, Chirgadze D, Grossmann J, Matak-Vinkovic D, Venkitaraman A, Yanagida M., The Crystal Structure of the N-Terminal Region of BUB1 Provides Insight into the Mechanism of BUB1 Recruitment to Kinetochores, *Structure*, Vol.17, Issue 1, 105-116, Jan 14 2009
- 19) 清光智美, 小布施力史, 柳田充弘. 「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須なキネトコア蛋白質-Blinkin: A kinetochore protein responsible for spindle checkpoint and microtubule-attachment」, 「蛋白質 核酸 酵素」, Vol.54, No.4(2009 Feb)
- 20) Williams J, Hayashi T, Yanagida M, Russell P., Fission Yeast Scm3 Mediates Stable Assembly of Cnp1/CENP-A into Centromeric Chromatin, *Molecular Cell*, Vol.33 287-298, Feb 13. 2009
- 21) Irvine D, Goto D, Vaughn M, Nakaseko M, McCombie W, Yanagida M, and Martienssen R., Mapping epigenetic mutations in fission yeast using whole-genome next-generation sequencing., *Genome Research*, 19(6): 1077-83., doi:10.1101/gr.089318.108, March, 2009

#### 21年度

- 22) Sajiki K, Hatanaka M, Nakamura T, Takeda K, Shimanuki M, Yoshida T, Hanyu Y, Hayashi Y, Nakaseko Y and Yanagida M. , Genetic control of cellular quiescence in *S. pombe*., *Journal of Cell Science*, 122(Pt 9): 1418-29., doi: 10.1242/jcs.046466, April 2009
- 23) 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., *S. pombe* cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor., *Genes to Cells*, 14: 539-554. , doi:10.1111/j.1365-2443.2009.01290.x, May 2009

24) Yanagida M. , Clearing the way for mitosis: is cohesin a target?, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol.10.489-496. , doi:10.1038/nrm2712, July 2009,

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

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

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

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

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

#### 22年度

30) Takeda K, Yanagida M. , In quiescence of fission yeast, autophagy and the proteasome collaborate for mitochondrial maintenance and longevity, *Autophagy*. 2010 May 1;6(4).

31) Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A and Orešič M, MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC Bioinformatics*, 11:395, doi:10.1186/1471-2105-11-395, Jul. 23 2010

32) Yanagida M., Mostly DNA, a bit of glucose, and the next 50 years, *Mol Biol Cell*, vol.21(22):3826, doi:10.1091/mbc.E10-04-0367, Nov. 15, 2010

33) Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, and Orešič M., MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC Bioinformatics*, 2010; 11: 395., doi: 10.1186/1471-2105-11-395, Nov. 2010

34) Kiyomitsu T, Murakami H, and Yanagida M., Protein interaction domain mapping of human kinetochore protein Blinkin reveals a consensus motif for binding of spindle assembly checkpoint proteins Bub1 and BubR1, *Mol. Cell. Biol.* Volume; 31, Issue; 5, doi:10.1128/MCB.00815-10MS#; MCB 0815-10, March 2011

35) Nakazawa N, Mehrotra R, Ebe M, and Yanagida M., Condensin phosphorylated by aurora B-like Ark1 is continuously required till telophase in the mode distinct from Top2, *Journal of Cell Science*, 2011, In press.

36) Pluskal T, Hayashi T, Shigeaki Saitoh S, Fujisawa A, and Yanagida M., Specific biomarkers for stochastic division patterns and starvation-induced quiescence under limited glucose levels in fission yeast, *FEBS Journal*, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08050.x, online: March 10, 2011

37) Shiroya Y, Hayashi T, Fujita Y, Villar- Briones A, Ikai N, Takeda K, Ebe M, and Yanagida M., Mis17 is a regulatory module of the Mis6-Mal2-Sim4 centromere complex that is required for the recruitment of CenH3/CENP-A in fission yeast, *PLoS ONE*, online March 21, 2011

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

#### 21年度

- 1) 柳田充弘・西田栄介・野田亮 編、「分子生物学 第2版」、東京科学同人、2009年7月(改訂加筆版)

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 15 件、国際会議 34 件)

#### H17 年度

1) 柳田充弘(京都大学) “Toward Understanding Universal Mechanism of Centromere/Kinetochore Formation” ETH Hoenggerberg, Institute of Biochemistry Seminar, Zurich, Switzerland March 15, 2006.

2) 柳田充弘(京都大学) “Universal Centromere/Kinetochore Mechanism” Stanford University Scholl of Medicine Biomedical Seminar, USA, March 22, 2006

#### H18 年度

3) 柳田充弘(京都大学) “Chromosome Structure and Segregation”, 2006 FASEB Summer Research Conferences, Yeast Chromosome Structure Replication and Segregation, Indian Wells, California, USA, June 28, 2006

4) 柳田充弘(京都大学) “Renewing Centromere and Making Kinetochore for Mitotic Check in Human Cells” President’s Research Seminar, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 417 East 68th Street - Room Z-1365, New York, NY 10021, USA January 17, 2007

#### H19 年度

5) 柳田充弘(京都大学) “分裂しない G0 細胞はいかにして生き続けるか?” 大阪大学フロンティアバイオサイエンスコロキウム 大阪大学生命機能研究科 平成 19 年 4 月 11 日

6) 柳田充弘(京都大学) “Universal Centromere/kinetochore mechanism” 第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会 合同大会シンポジウム 平成 19 年 5 月 29 日

7) 柳田充弘(京都大学) “Non-dividing *Pombe* Enlightened in a Tropical Island” (Special session), Fourth International Fission Yeast Meeting, Copenhagen, June 11-16, 2007

8) 柳田充弘(京都大学) ”Centromere/kinetochore Mechanism for Cenp-A Recruitment and Spindle Checkpoint Protein Association”, 7<sup>th</sup> International Chromosome Segregation and Aneuploidy Workshop, Naantali, Finland, June 16-20, 2007

9) 柳田充弘(京都大学) ”Metabolic Aspects of the Chromosome Segregation and Cell Cycle Control in Fission Yeast”, XXIII International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Melbourne, Australia, July 1-6, 2007

10) 柳田充弘(京都大学) ”染色体の継承メカニズム” 「第二回産業医科大学大学院シンポジウム」 北九州市 福岡 平成 19 年 7 月 24 日

11) 柳田充弘(京都大学) ”プロテオーム解析による細胞増殖・分化メカニズム理解の推進” 「日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会」 未来科学館 東京 平成 19 年 7 月 30-31 日

12) 柳田充弘(京都大学) ”Essential Centromere/kinetochore Architecture for CENP-A Loading and Mitotic Checkpoint”, EMBO Workshop ”Molecular Mechanisms of Cell Cycle Control in Normal and Malignant Cells”, Spetses Island, Greece, October 5-8, 2007

13) 柳田充弘(京都大学) ”Pursuing Gene Networking Required for Entering, Maintaining and Exiting from the G0 Cell State of *S. pombe*”, Cellular Responses to DNA Damage in Schizosaccharomyces Pombe, Oslo, Norway, October 1-4, 2007

14) 柳田充弘(京都大学) ”増殖する酵母と増殖しない酵母” NBRP シンポジウム 「生命科学の未来を拓くバイオリソース」プログラム 如水会館 東京 平成 20 年 3 月 10 日

15) 柳田充弘(京都大学) ”G0 細胞生存維持遺伝子ネットワークの包括的アプローチによる研究” 「生活習慣病の転写・シグナルネットワーク研究会」 鎌倉プリンスホテル 神奈川県 平成 20 年 3 月 22 日

#### H20 年度

16) 柳田充弘(京都大学) ” Genes networks for the cell survival under nutritional stress in fission yeast”, Institute de Biologie de Lille, Lille, France, April 25, 2008

17) 柳田充弘(京都大学) ”DNA replication and chromosome cohesion”, The Cell Cycle and Genomic Stability, Conferences Jacques-Monod, Roscoff, France, April 26-30, 2008

18) 柳田充弘(京都大学) “Control of Mitosis and Centromere/Kinetochore Formation”, International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise 2008, ホテル近鉄 アクアヴィラ伊勢志摩 三重 平成 20 年 5 月 28-30 日

19) 柳田充弘(京都大学) “分裂しない分裂酵母”, 「第 18 回 酵母合同シンポジウム」, 甲南大学 甲友会館 兵庫 2008 年 6 月 5 日

20) 柳田充弘(京都大学) “トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム法による G0 細胞進入・維持・脱出機構解析”, 「第 6 回ライフサーベイヤシンポジウム」, 大阪大学銀杏会館 大阪 平成 20 年 6 月 26 日

21) 柳田充弘(京都大学) ”Chromosome Dynamics and Centromere / Kinetochore Formation

in the cell cycle” , IRIC Seminar, University of Montreal, Montreal, Canada, July 18, 2008

22) 柳田充弘(京都大学) Lee Hartwell Lecture, Yeast 2008 Genetics and Molecular Biology Meeting, University of Toronto, Toronto, Canada, July 22-26, 2008

23) 柳田充弘(京都大学) Centromeres and Kinetochores in Fission Yeast and Human Cells”, CHROMOSOME SEGREGATION: Centromeres & Kinetochores Meeting, Palais des Congres, Arcachon, Bordeaux, France, Sept. 27-Oct. 2, 2008.

24) 柳田充弘(京都大学) “分裂する細胞としない細胞の生き様の違い：代謝特性の観点より”, 「第5回京都心血管代謝セミナー」, 芝蘭会館別館国際交流会館 大阪 平成20年12月1日

25) 柳田充弘(京都大学) “コンデンシン複合体の機能解析 Functional Analysis of Condensin Complex”, 「第31回日本分子生物学会」, 神戸国際会議場 兵庫 平成20年12月10日

26) 柳田充弘(京都大学) “代謝特性の観点より見た、分裂する細胞としない細胞の生き様の違い”, 「第1回 NAGOYA グローバルリトリート」特別講演, あいち健康プラザ、愛知 平成21年2月20日

#### H21年度

27) 柳田充弘(京都大学) “How life is inherited ? : Control of Chromosome Segregation”, 北京生命科学研究所(National Institute of Biological Sciences), 北京, 中国, April 9, 2009

28) 柳田充弘(京都大学) “Clearing the Way for Mitosis : Is Cohesin the Target?”, 北京大学(Peking University), 北京, 中国, April 10, 2009

29) 柳田充弘(京都大学) “How life is inherited ? : Control of Chromosome Segregation”, Institute of Biochemistry and Cell Biology, 上海, 中国, April 13, 2009

30) 柳田充弘(京都大学) “Clearing the way for mitosis“, Biozentrum University, Basel, Switzerland, May 13, 2009

31) 柳田充弘(京都大学) “Nutritional Control of Chromosome/Chromatin Dynamics in Fission Yeast (Plenary Lecture)”, Switzerland-Japan Joint Meeting on the Molecular Mechanisms Regulating Chromosome Dynamics and Genome Stability, Villars-sur-ollon, Switzerland, May 14, 2009

32) 柳田充弘(京都大学) “Requirement of CTD Phosphatase Fcp1 and type 2A-like phosphatase inhibitor Sds23 for nutritional control of quiescence and proliferation in *S. pombe*”, EMBO Conference “Protein Phosphatases in Development & Disease”, Egmond aan Zee, The Netherlands, July 14-18, 2009

33) 柳田充弘(京都大学) “Biorientation Road from Innercentromere to Kinetochores Microtubule”, FASEB Summer Research Conferences, Mitosis: Spindle Assembly and Function, Il Ciocco Resort, Lucca, Tuscany, Italy, Aug.30-Sept.4, 2009.

34) 柳田充弘(京都大学) “Nutritional Control of Chromosome Segregation”, Cell Cycle Regulation and Tumorigenesis Symposium, Aspiration Theatre, Singapore, Sept.6-8, 2009

35) 柳田充弘(京都大学) “Quiescent Fission Yeast, Diabetic S.Pombe(SS2)”, 「The 5<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting “Pombe2009”」、国立オリンピック記念青少年総合センター、東京 平成 21 年 10 月 26 日-31 日

36) 柳田充弘(京都大学) “細胞の増殖と静止のしくみ: 限定グルコースと窒素源枯渇の分子細胞生物学的研究による新たな展開”、東京大学大学院セミナー、東京、平成 21 年 12 月 15 日

#### H22 年度

37) 柳田充弘(京都大学) “Condensin and Clearing Mitosis”, Seminar, ZMBH(ハイデルベルク分子生物学センター), University Heidelberg, Germany, Jun. 16, 2010

38) 柳田充弘(京都大学) “Metabolic Control of Quiescence, Aging and Lifespan in Fission Yeast”, IGMM Distinguished Seminars, Institute of Genetics and Molecular Medicine, Edinburgh, England, Jun.17, 2010

39) 柳田充弘(京都大学) “On clearing mitosis”, EMBO Workshop Chromosome Segregation & Aneuploidy, The Surgeons Hall, The Royal College of Surgeons of Edinburgh, Edinburgh, England, Jun. 23-24, 2010

40) 柳田充弘(京都大学) “The G-zero project: How fission yeast survive starvation”, Cancer Research UK Seminar, London, England, Jun. 24, 2010

41) 柳田充弘(京都大学) Chair: “Getting Chromosomes Apart”, Yeast Genetics & Molecular Biology Meeting, University of British Columbia, Vancouver, Canada, Jul. 27-31, 2010

42) 柳田充弘(京都大学) Chair: Session “RNA and one on Development”, The EMBO members’ workshop, Heidelberg, Germany, Oct. 27-29, 2010

43) 柳田充弘(京都大学) “Genetic control of reversible cellular quiescence”, Symposium in Stem., Bangalore, India, Nov. 12-14, 2010

44) 柳田充弘(京都大学) “Cell Division and Metabolism”, Cellular Dynamics and Chemical Biology, Hefei, China, Nov. 19-22, 2010

45) 柳田充弘(京都大学) “Mostly DNA, a Bit of Glucose, and the Next 45 Minutes”, The Hunt Symposium, London, England, Dec. 9, 2010

46) 柳田充弘(京都大学) Seminar “Metabolic control of chromosome dynamics and cell division”, The Vienna Biocenter, Vienna, Austria, Jan. 20, 2011

47) 柳田充弘(京都大学) “Metabolic control of chromosome dynamics and cell division”, Bratislava, Slovakia, Jan. 21, 2011

48) 柳田充弘(京都大学)「分裂しない(quiescent)な細胞はどうして生き続けられるのか」, 研究会 FANTASY, 鎌倉プリンスホテル、2011年2月5日

49) 柳田充弘(京都大学) “Control of Chromosome Dynamics by Condensin and Metabolism”, FEBS Advanced Lecture Course “Trends in Genetics: Genomic Instability and Pathways of Response”, Yerevan, Armenia, Feb. 20-26, 2011

②口頭講演 (国内 8件、国際 5件)

#### H19年度

1) 清光智美(京都大学)“ヒト Blinkin/AF15q14 は Bub1、BubR1 との相互作用を介して、スピンドルチェックポイントと染色体の整列に機能する” 「第25回染色体ワークショップ」静岡県熱海市泉ウェルシティ湯河原平成20年1月31日

2) 清光智美(産学官連携研究員)“Human Blinkin/AF15q14 Is Required for Chromosome Alignment and the Mitotic Checkpoint through Direct Interaction with Bub1 and BubR1” 「第6回国際シンポジウム」京都大学芝蘭会館平成20年3月5日

#### H20年度

3) 清光智美(産学官連携研究員)“ Human kinetochore protein, blinkin/AF15q14, is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1 ”, Seminar, Marie Curie Institute, England, May 6, 2008

4) 林 武志 (共同研究者)“ 分裂酵母 TOR 複合体とラパマイシン感受性” , 「第31回日本分子生物学会」, 神戸国際会議場 兵庫 平成20年12月10日

#### H21年度

5) 中沢宜彦(特定研究員)“Fission Yeast Condensin and DNA Topoisomerase II are required for Chromosome Segregation Throughout Mitosis”, Switzerland-Japan Joint Meeting on the Molecular Mechanisms Regulating Chromosome Dynamics and Genome Stability, Villars-sur-ollon, Switzerland, May 14, 2009

6) 中沢宜彦(特定研究員)“Fission Yeast Condensin and DNA Topoisomerase II are required for Chromosome Segregation Throughout Mitosis”, フランス国立科学研究センター (CNRS), Toulouse, France, May 18, 2009

7) 清光智美(特定研究員)「ヒトキネトコアタンパク質 hMis14 と HP1 の直接結合が M 期染色体のインナーセントロメア形成に必要である」, 第8回核ダイナミクス研究会、静岡 2009年6月18-19日

8) 清光智美(特定研究員)「キネトコアとインナーセントロメア形成の相互依存性」, 第24回内藤コンファレンス Nuclear dynamics and RNA II、札幌 北海道、2009年6月23-25日

9) 清光智美(特定研究員) “Functional analysis of hMis12 interacting proteins”, European Institute of Oncology, Milan, Italy, Sep. 5, 2009

10) 林 武志(共同研究者)“ Tel2-Tti1 複合体による分裂酵母 TOR 経路の制御機構の解析” , 「第

32 回日本分子生物学会」、神奈川 平成 21 年 12 月 9 日～12 日

#### H22 年度

11) 林武志 (共同研究者) 「TOR 経路を制御する分裂酵母 Tel2-Tti1 複合体の解析」, 「第 34 回日本分子生物学会」、神戸国際会議場、神戸、平成 22 年 12 月 7 日～10 日

12) 中沢宜彦 (共同研究者) “Phosphorylation of Cnd2/Barren by aurora B-like Ark1 ensures continuous requirement of condensin till telophase in the mode distinct from Top2”, FEBS Advanced Lecture Course “Trends in Genetics: Genomic Instability and Pathways of Response”, Armenia, Feb. 20-26, 2011

13) 中沢宜彦 (共同研究者) “Condensin phosphorylated by aurora B-like Ark1 is continuously required till telophase in the mode distinct from Top2 (口頭発表)”, 第 9 回国際学生セミナー, 京都大学芝蘭会館, 京都, 平成 23 年 3 月 7～9 日

③ポスター発表 (国内 23 件、国際 10 件)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

#### H17 年度

1) 青木敬太 (京都大学) “Cdc2 phosphorylation of fission yeast Dis1 similar to XMAP215/TOG ensures segregation accuracy via metaphase kinetochore localization”, 「Cell Regulations in Division and Arrest Workshop」 沖縄県沖縄市ホテルグランメール 平成18年3月7日

2) 川寄洋祐 (京都大学) “Sty1/Spc1 MAP Kinase Enhances Securin/Separase Interaction that Facilitates Sister Chromatid Separation under Osmostress”, 「Cell Regulations in Division and Arrest Workshop」 沖縄県沖縄市ホテルグランメール 平成18年3月7日

3) 白岩善治 (京都大学) “The Amino Terminal Region of the Mis6 Complex Component Mis17 is Hyper-Phosphorylated and Plays a Role in Kinetochore Function”, 「Cell Regulations in Division and Arrest Workshop」 沖縄県沖縄市ホテルグランメール 平成18年3月7日

#### H18 年度

4) 川寄洋祐 (京都大学) “Sty1/Spc1 MAP Kinase Enhances Securin/Separase Interaction that Facilitates Sister Chromatid Separation under Osmostress” 「第 20 回国際分子生物学会」京都市国際会議場 平成 18 年 6 月 23 日

5) 猪飼信康 (京都大学) “Cdc48 Is Required for the Stability of Cut1/Separase in Mitotic Anaphase” 「第 20 回国際分子生物学会」京都市国際会議場 平成 18 年 6 月 23 日

6) 中沢宣彦 (京都大学) “Condensin localizes to kinetochores at early M phase and is required for chromosome segregation even in anaphase” 「第 20 回国際分子生物学会」京都市国際会議場 平成 18 年 6 月 23 日

7) 川寄洋祐 (京都大学) “Fission Yeast MAP Kinase Is Required for the Increased Securin-Separase Interaction that Rescues Separase Mutants under Stresses” 「日本分子生物学会 2006 フォーラム」愛知県名古屋市長久国際会議場 平成 18 年 12 月 6 日

8) 青木敬太 (京都大学) “Cdc2 Phosphorylation of the Fission Yeast Dis1 Ensures

Accurate Chromosome Segregation” 「日本分子生物学会 2006 フォーラム」愛知県名古屋市名古屋国際会議場 平成 18 年 12 月 6 日

9) 藤田陽太 (産学官連携研究員) ” Priming of Telophase Centromere for CENP-A Recruitment by Human hMis18 $\alpha$ ,  $\beta$  and M18BP1 that Form the Stable Complex” 「日本分子生物学会 2006 フォーラム」愛知県名古屋市名古屋国際会議場 平成 18 年 12 月 6 日

10) 中村隆宏 (京都大学) ” CoA biosynthesis enzyme is required for faithful chromosome segregation in *S. pombe*” 「日本分子生物学会 2006 フォーラム」愛知県名古屋市名古屋国際会議場 平成 18 年 12 月 6 日

11) 中沢宣彦 (京都大学) ” Condensin localizes to kinetochores at early M phase and is required for chromosome segregation even in anaphase” 「日本分子生物学会 2006 フォーラム」愛知県名古屋市名古屋国際会議場 平成 18 年 12 月 7 日

12) 清光智美 (京都大学) ” Interaction between HP1 and the DC8 subunit of hMis12 centromere/kinetochore complex ensures normal chromosome segregation” 「日本分子生物学会 2006 フォーラム」愛知県名古屋市名古屋国際会議場 平成 18 年 12 月 7 日

#### H19 年度

13) 藤田陽太 (産学官連携研究員) ” Priming of Centromere for CENP-A Recruitment by Human hMis18 $\alpha$ ,  $\beta$  and M18BP1” 「Epigenetics: Regulation of Chromatin Structure in Development and Disease」デンバー 平成 19 年 4 月 12 日

14) 中村隆宏 (産学官連携研究員) ” ENZYMES FOR COA (COENZYME A) BIOSYNTHESIS ARE REQUIRED FOR FAITHFUL CHROMOSOME SEGREGATION IN *S. POMBE*” Fourth International Fission Yeast Meeting コペンハーゲン 平成 19 年 6 月 12 日

15) 林 武志 (共同研究者) “Proteomic Comparison between *S. Pombe* G0 Cell and Rapamycin-Sensitive TORC1 Mutant Reveals Similar but Distinct Nitrogen Metabolic Regulations”, Forth International Fission Yeast Meeting, コペンハーゲン, 平成 19 年 6 月 14 日

16) 猪飼信康 (京都大学) ” Cdc48 is required for the stability of Cut1/separase in Mitotic Anaphase” 「第 7 回国際 AAA タンパク質学会」王立農大 サイレネスタール イギリス 平成 19 年 9 月 10 日

17) 清光智美 (京都大学) ” Human Blinkin/AF15q14 Is Required for Chromosome Alignment and the Mitotic Checkpoint through Direct Interaction with Bub1 and BubR1” 「第 47 会アメリカ細胞生物学会」ワシントン DC, アメリカ 平成 19 年 12 月 3 日

#### H20 年度

18) 清光智美 (産学官連携研究員) ” Human kinetochore protein, blinkin/AF15q14, is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1 ”, 「Cell Regulations in Division and Arrest Workshop」恩納村、沖縄県 OIST シーサイドハウス 平成 20 年 4 月 6-10 日

19) 中村隆宏 (産学官連携研究員) ” Construction of gene network based on comprehensive analysis of *S. pombe* temperature sensitive mutant library”, 「Cell Regulations in Division

and Arrest Workshop」 恩納村、沖縄県 OIST シーサイドハウス 平成 20 年 4 月 6-10 日

20) 清光智美(産学官連携研究員)” Human kinetochore protein, blinkin/AF15q14, is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1 1”, The Cell Cycle and Genomic Stability, Conferences Jacques-Monod, Roscoff, France, April 26-30, 2008

21) 清光智美(産学官連携研究員)” Human kinetochore protein, blinkin/AF15q14, is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1”, Cambridge Univ., England, May 3, 2008

22) 中沢宜彦(京都大学)”Dissection of the essential steps for condensing accumulation at kinetochores and ribosomal DNAs during fission yeast mitosis”, The Cell Cycle Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A, May 14-18, 2008

23) 川寄洋祐(産学官連携研究員)” Software Development of Metabolic Pathway Change Visualization and Analysis“, 第5回植物メタボローム国際会議(ICPM2008), パシフィコ横浜アネックスホール、 神奈川 平成 20 年 7 月 15-18 日

24) 林 武志 (共同研究者) ” Identification of Novel Centromere Proteins Mis19 and Mis20 as Mis18-Interacting Partners in Fission Yeast ” , CHROMOSOME SEGREGATION:Centromeres & Kinetochores Meeting, Palais des Congres, Arcachon, Bordeaux, France, Sept. 27-Oct. 2, 2008.

25) 川寄洋祐(産学官連携研究員) ” メタボリックパスウェイ変動の解析および可視化” , 「第 31 回日本分子生物学会」, 神戸ポートアイランド 兵庫 平成 20 年 12 月 9 日

#### H21 年度

26) 清光智美(特定研究員) “Inner centromere formation requires trident-binding kinetochore protein, hMis14, that specifically recruits HP1 in human chromosome”, FASEB Summer Research Conferences, Mitosis:Spindle Assembly and Function, Il Ciocco Resort, Lucca, Tuscany, Italy, Aug.30-Sept.4, 2009.

27) 中沢宜彦(特定研究員) “Fission Yeast Condensin and DNA Topoisomerase II are required for Chromosome Segregation Even After Entry into Anaphase”, 「The 5<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting “Pombe2009”」、国立オリンピック記念青少年総合センター、東京 平成 21 年 10 月 26 日-31 日

28) 中村隆宏(特定研究員) “CoA Synthesis Pathway Affects Chromosome Segregation Through Protein Acetylation in S.Pombe”, 「The 5<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting “Pombe2009”」、国立オリンピック記念青少年総合センター、東京 平成 21 年 10 月 26 日-31 日

29) 猪飼信康(特定研究員) “In Vitoro Kinase Assay of Two Tor Complexes in S. Pombe and Construction of a Temperature-Sensitive Tor1 Mutant”, 「The 5<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting “Pombe2009”」、国立オリンピック記念青少年総合センター、東京 平成 21 年 10 月 26 日-31 日

30) 赤井祐子(教務補佐員) “Condensin May Remove PRA Through The DNA Re-Annealing Activity Before Mitosis In Schizosaccharomyces Pombe”, 「The 5<sup>th</sup> International Fission Yeast

Meeting “Pombe2009”」、国立オリンピック記念青少年総合センター、東京 平成 21 年 10 月 26 日-31 日

31) 大田久美子(共同研究者)“Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor are required to use limited glucose under proliferation and quiescence”、 「The 5<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting “Pombe2009”」、国立オリンピック記念青少年総合センター、東京 平成 21 年 10 月 26 日-31 日

32) 中沢宜彦(特定研究員)“Fission Yeast Condensin and DNA Topoisomerase II are required for Chromosome Segregation Even After Entry into Anaphase”、The fourth International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, 沖縄 平成 21 年 11 月 29 日～12 月 3 日

33) 中村隆宏(特定研究員・共同研究者) ”CoA Synthesis Pathway Affects Chromosome Segregation Through Protein Acetylation in S.Pombe”, The fourth International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, 沖縄 平成 21 年 11 月 29 日～12 月 3 日

#### H22 年度

34) 猪飼信康(特定研究員) , “In Vitoro Kinase Assay of Two Tor Complexes in S. Pombe and Construction of a Temperature-Sensitive Tor1 Mutant” , 「JST CREST 第三回公開シンポジウム」、東京大学弥生講堂、東京、平成 22 年 10 月 21 日

35) 林 武志(共同研究者)、「Tel2-Tti1 複合体による分裂酵母 TOR 経路の制御機構の解析」 「JST CREST 第三回公開シンポジウム」、東京大学弥生講堂、東京、平成 22 年 10 月 21 日

36) 中村 隆宏(共同研究者)、“CoA biosynthesis pathway is regulated by Sir2 and affects chromosome segregation through protein acetylation”、 「JST CREST 第三回公開シンポジウム」、東京大学弥生講堂、東京、平成22年10月21日

37) Tomas Pluskal(共同研究者)、“Fission yeast metabolites implicated in stress response, nutrient starvation and longevity”、 「JST CREST 第三回公開シンポジウム」、東京大学弥生講堂、東京、平成22年10月21日

38) 中沢宜彦(共同研究者) , “Phosphorylation of Cnd2/Barren by aurora B-like Ark1 ensures continuous requirement of condensin till telophase in the mode distinct from Top2” , 「第 34 回日本分子生物学会」 、神戸国際会議場、神戸、平成 22 年 12 月 7 日～10 日

39) 猪飼信康(特定研究員) , “In vitro kinase assay of two TOR complexes 3) in S. pombe and construction of a temperature-sensitive tor1 mutant” , 「第 34 回日本分子生物学会」 、神戸国際会議場、神戸、平成 22 年 12 月 7 日～10 日

40) 中沢宜彦(共同研究者) , ” Condensin phosphorylated by aurora B-like Ark1 is continuously required till telophase in the mode distinct from Top2 (ポスター)” , 第 9 回国際学生セミナー, 京都大学芝蘭会館, 京都, 平成 23 年 3 月 7～9 日

(4)知財出願

①国内出願 (0 件)

②海外出願 (0 件)

(5)受賞・報道等

① 受賞

H22 年度

1. 英国生物学会「名誉フェロー」称号授与 柳田充弘 平成 22 年 9 月

② マスコミ(新聞・TV等)報道

H21 年度

新聞報道 (4件)

1. 読売新聞 平成 22 年 2 月 2 日「細胞の生命維持仕組み発見 神経死滅 解明に期待…京大など」
2. 京都新聞 平成 22 年 2 月 2 日「細胞が寿命を延ばす仕組み解明 京大の柳田充弘特任教授ら」
3. 沖縄タイムズ 平成 22 年 2 月 3 日「細胞の生死 酵素が関与」

H22 年度

4. 日刊工業新聞 平成 22 年 9 月 17 日「柳田充弘博士 英国生物学会名誉フェロー授与」

(6)成果展開事例

①**実用化に向けての展開**

該当無し

②**社会還元的な展開活動**

該当無し

## § 6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

H17 年度

1) 外国人招聘(共同研究): なし

2) 招聘セミナー開催

- ① Dr.Aaron Bensimon(コールドスプリングハーバー研究所 教授、アメリカ)、「Structural and Functional Analysis of Genome Maintenance:A single DNA molecule Approach」、2006 年 11 月 10 日
- ② Dr.Iain Cheeseman(カリフォルニア大学サンディエゴ校がん研究ルードヴィヒ研究所 研究員、アメリカ)、「Molecular Dissection of the Metazoan Kinetochore」、2006 年 6 月 13 日
- ③ Dr.James Haber(ブランディーズ大学 教授、アメリカ)、「Checkpoint response during repair of a double-strand chromosome break」、2006 年 5 月 20 日

## H18 年度

1) 外国人招聘(共同研究): なし

### 2) 招聘セミナー開催

- ① 田中耕三博士(ダンディー大学研究員、イギリス)、「Mechanisms of microtubule-dependent kinetochore transport」、2006年8月31日
- ② 五島剛太博士(カリフォルニア大学 研究員、アメリカ)、「Mechanisms of mitotic spindle assembly」、2006年9月26日
- ③ Dr.Don Cleveland(カリフォルニア大学 教授、アメリカ)、「Guarding the genome:The Epigenetic Centromere and The Mitotic Checkpoint」、2006年10月18日
- ④ Dr.Alain Verreault(Institute for Research in Immunology and Cancer, 研究員、カナダ)、「Histone H3 lysine 56 acetylation and genome stability」、2006年12月28日
- ⑤ Dr.Anthony Hyman(マックスプランク分子細胞生物学研究所、教授、ドイツ)、「Centriole Assembly in C.Elegance」、2006年3月30日

## H19 年度

1) 外国人招聘(共同研究): なし

### 2) 招聘セミナー開催

- ① Dr.Iain Hagan(マンチェスター大学 パターソン癌研究所 グループリーダー、イギリス)、「The Yeast Spindle Pole Co-ordinates Cell Cycle Control with Environmental Stimuli」、2007年4月18日
- ② Dr.Paul Russell(スクリップス研究所 分子生物学科 教授、アメリカ)、「Regulation of DNA Repair During the Cell Cycle」、2007年4月20日
- ③ Dr.Camilla Sjogren(カロリンスカ研究所 分子・細胞生物学科 副科長、スウェーデン)、「The SMC Protein Complexes-Connecting Chromosome Segregation and Repair」、2007年11月6日
- ④ Dr.Jeremy Hyams(マッセイ大学 分子生命科学研究所 教授、ニュージーランド)、「Cell cycle regulation of organelle biogenesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton and dynamin-related proteins」、2007年11月13日

## H20 年度

1) 外国人招聘(共同研究):

- ① Dr.Rajesh Mehrotra (バナーラス・ヒンズー大学 准教授、インド)、2008年6月2日～7月25日、2008年12月19日～2009年1月13日
- ② Dr.Monica Gullerova(オックスフォード大学、研究員、イギリス)、2008年6月2日～7月25日
- ③ Rishabh Khandelwal (The Institute of Technology、インド)、2008年12月12日～12月26日

### 2) 招聘セミナー開催

- ① 山野博之博士(マリー・キュリー研究所 細胞周期制御研究室室長、イギリス)、「Proteolysis and genome stability」2008年5月23日
- ② Dr.Charlie Boone(トロント大学、教授、カナダ)、「Global Mapping of Genetic and Chemical-Genetic Networks in Yeast」、2008年11月17日

## H21 年度

1) 外国人招聘(共同研究):

① Dr.Rajesh Mehrotra (バナーラス・ヒンズー大学 准教授、インド)、2009年6月1日～7月15日

2) 招聘セミナー開催

① 山野博之博士(マリー・キュリー研究所 細胞周期制御研究室室長、イギリス)、「タンパク質の寿命を決める酵素が働く仕組み」2009年11月5日

② Dr.Li-Lin Du(北京生命科学研究所 准教授、中国)、「A Proteomic Screen Revealing New Proteins Involved in DNA Damage Response in Fission Yeast」、2009年12月4日

3) 生命科学講義:柳田充弘(京都大学)

対象:京都教育大学附属桃山中学の生徒(若干名)対象(全4回)

第1回:平成21年11月6日、第2回:平成21年11月13日、

第3回:平成21年12月18日、第4回:平成22年1月14日

H22年度

1) 外国人招聘(共同研究):

① Romanas Chaleckis(研究員、リトアニア)、2010年12月3日～2011年3月11日

2) 招聘セミナー開催

## §7 結び

**研究の目標等から見た達成度:**当初の研究目標から考えたら三つのサブテーマどれを見ても想像できないほどの進展があった。研究目標はなかなか困難なものであった。メタボロームという我々にとってはまったく未知の技術を必要とする研究であった。運良く沖縄での研究ユニットで質量分析機を購入でき有能な技術員を得ることができた。3年目くらいから、なんとか方法を駆使して5年目にやっと大きな成果があがりだしたところである。また、メタボリックな観点で細胞分裂や染色体分配を解析するというのもまったく未知な世界であり、慣れるまでに2年ほどかかった。まいにち化合物名とその量を示す表を眺める日々が続いたものである。やっと心身ともにメタボロームの研究になじんだところである。あと2年研究期間があればいまよりはるかに満足のいく成果を得られたのではないかとおもう。そういう意味で、研究成果は最高の達成とはいえないかもしれない。しかし当初の目標からみたら最高の達成度であった。

**得られた成果の意義等の自己評価、今後の研究の展開:**意義についてはもしもヒトなどでの具体的な知見の適用などを考慮するという狭い意味でのものであれば、これまでは準備期間で、まさにこれからの課題であろう。ただ、われわれの研究はまだ十分に論文発表をしていないが昨年 Trends in Cell Biology に総説を書いて以来、国内国外からも幹細胞のシンポジウムや細胞の寿命の国際シンポジウムなどからの招請があり、モデル系としてかなり注目されている手ごたえがある。今後は京大医学研究科との共同研究を軌道に乗せるべく努力したい。

