

課題番号6

寿命制御因子 TORC1 による染色体動態制御機構の解析

[1] 組織

代表者：丑丸 敬史

(静岡大学大学院総合科学技術研究科)

対応者：田中 耕三

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：小池 直暉

(静岡大学大学院総合科学技術研究科)

研究費：物件費 40 万円

[2] 研究経過

トリソミーやモノソミーのような異数性を持つ (aneuploid) 胎児は、ヒトの妊娠の少なくとも 10% に達する。さらにこの異常は、女性の高齢出産においては 50% を超えるとされる (Nagaoka et al. *Nat Rev Genet* 2012)。これは卵成熟 (減数分裂) 過程における不正確な染色体分配に主に起因する。高齢出産に伴い老化の進んだ卵母細胞では卵成熟過程における染色体の不均衡分配の頻度が高まる。異数性を持つ胎児はその発生過程でほとんどが死に流産となるが、例外的にある種のトリソミーでは死を免れ出生しダウン症などの病気となる。

この高齢出産に伴う卵子の染色体異常を増加させる分子機構は未だ不明であるが、いくつかの要因が絡まりあっていると考えられている (Nagaoka et al. *Nat Rev Genet* 2012)。まず、姉妹染色分体間を接着させているコヒーシン複合体の減少がその一因として考えられている (Tsutsumi *PLOS ONE*. 2014)。それに加えて、卵子における紡錘体形成チェックポイント (spindle assembly checkpoint; SAC) の不全性がその要因として考えられている。紡錘体形成チェックポイントとは、全ての染色体が正確に微小管と二方向性接着しているかどうかを監視して、それが未達な場合には分裂後期開始を抑制するシステムである。このチェックポイントは有糸分裂時のみならず減数分裂時にも機能しており、減数分裂時の染色体の異常分配を抑制するに必要不可欠な機構である。卵子においてはこの紡錘体チェックポイントが精子に比べて十分に機能していないことが知られている (Gui and Homer. *Development*. 2012; Kolano et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012)。しかし、細胞老化、特に体細

胞における細胞老化と紡錘体形成チェックポイントとの関連に関してはほとんど解析が進んでいない。

TORC1 (target of rapamycin complex 1) キナーゼ複合体は細胞老化に深く関係している (Kapahi et al. *Cell Metab*. 2010)。栄養がある場合には TORC1 は活性化し、細胞成長を促進する反面、細胞老化、個体老化を促進する。TORC1 の特異的阻害剤ラパマイシンは唯一、最大寿命を延ばすことが報告されている薬剤である (Harrison et al. *Nature*. 2009)。しかし、TORC1 が、細胞増殖において細胞周期チェックポイントにどのように関与するのか、それが細胞老化とどのように関連するのかは不明である。

代表者のグループは最近、紡錘体形成チェックポイントが活性化し分裂中期で停止している出芽酵母をラパマイシン処理すると、分裂停止が解除されて G1 期へ進行する、いわゆる、"mitotic slippage" を起こすことを見出した。しかし、この現象の分子的基盤や生物学的意義、および進化的保存性は明らかではない。

本研究では、この現象の詳細な分子レベルでの解明、およびヒト培養細胞を用いての進化的保存性の検証を目的として研究を進めた。以下、その研究活動の概要を述べる。

酵母細胞のラパマイシン誘導性 mitotic slippage は、通常、分裂後期開始に必要な APC/C の基質認識サブユニット Cdc20 を必要とはせず、代わりに Cdh1 を必要とした。一方、ヒト細胞においても、ラパマイシン誘導性 mitotic slippage が観察され、この現象の保存性が確認された。

対応者である東北大学加齢医学研究所の田中耕三教授とは、第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年 11、12 月、横浜市) にて共同研究の途中経過を確認し、それに基づいて今後の研究方針について議論した。それに加えて、適宜メールにて研究打合わせを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究結果を得た。

酵母細胞を微小管脱重合剤ノコダズールで処理すると紡錘体チェックポイントが活性化し、分裂中期で停止する。しかし、この停止細胞をラパマイシン

ン処理するとこの分裂中期停止が解除された。そのため、紡錘体チェックポイントの不活性化による mitotic slippage を疑った。しかし、紡錘体チェックポイント因子の Mad2 がラパマイシン処理後も依然として動原体に局在していたことから、紡錘体チェックポイントは活性化状態にあるにも関わらず、mitotic slippage が惹起されることが示された。これと一致して紡錘体チェックポイント解除後に活性化して分裂後期を促進する APC/C-Cdc20 の活性を欠く cdc20 変異株でもこの際の mitotic slippage は抑制できなかった。

代表者のグループは最近、分裂終期開始 (mitotic exit) 抑制因子 Bub2 を欠損した細胞では、紡錘体チェックポイントを乗り越えて分裂後期が開始してしまう分子機構を明らかにした (Toda et al. *Cell Div.* 2012)。Bub2 欠損により、タンパク質脱リン酸化酵素 Cdc14 (CDK によるリン酸化を外し、分裂後期終期進行を促進する) が、分裂中期であるにも関わらず時期尚早に活性化してしまい、そのためにユビキチンリガーゼ APC/C-Cdh1 が異常に活性化してしまう結果、セクリンタンパク質 (分裂期プロテアーゼ、セパラゼの抑制因子) が分解され、それにより姉妹染色分体をつなぎとめているコヒーシンがセパラゼにより分解されてしまう。

ラパマイシン処理後の mitotic slippage が Cdc20 に依存しなかったため、この現象が、Bub2 欠損細胞と同様な様式の mitotic slippage を起こしているのではないかと疑った。その結果、Cdh1 欠損細胞ではラパマイシン処理後の mitotic slippage が顕著に抑制されることを見出した。以上の結果は、TORC1 活性が低下すると Cdh1 に依存した mitotic slippage が起きることを示す (図1)。逆に言えば、栄養源が存在する時には TORC1 活性は異常な mitotic slippage を抑制していると言える。

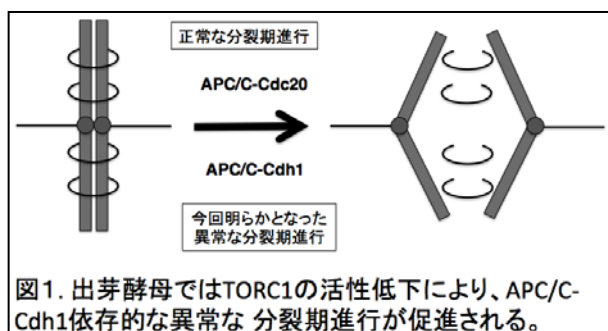


図1. 出芽酵母ではTORC1の活性低下により、APC/C-Cdh1依存的な異常な分裂期進行が促進される。

さらに予備的実験から、Cdh1 の活性化に必要な Cdc14 がラパマイシン処理後の mitotic slippage にも必要であることが明らかとなった。以上のことは、TORC1 の不活性化が、Bub2 欠損株と同様な経路の活性化を招き、それにより mitotic slippage をもたら

したことを示唆する。今後、TORC1 の不活性化がどのように Cdc14 を介して APC/C-Cdh1 の活性化を導くのかに焦点を当てて分子機構の更なる解明を行う予定である。加えて、この現象がどのような生物学的意義を持つのかについても明らかにしたい。もし、老化細胞で TORC1 の活性が低下するようなことがあれば、これが原因で染色体の不均衡分配の頻度が増加する可能性も考えられる。この検証も視野に入れて研究を進めたい。

一方、対応者のグループはヒト培養細胞においても、同様にラパマイシン処理で mitotic slippage が起きるかどうかを検証した。U2OS 株をノコダゾールで処理し分裂中期に同調させた。そこに、ラパマイシンを加えると顕著に mitotic slippage が誘導された。同様な現象は A549 株においても確認された。これらのことは、TORC1 不活性化による mitotic slippage 現象は酵母からヒトまで広く保存されている現象であることを示す。今後、ヒト細胞においても酵母と同様な機構で mitotic slippage が誘導されるのかについても、研究を掘り下げる予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

現在の我が国では、高齢出産傾向が解消される兆しは見られず、卵子成熟過程における染色体異常問題の解決は急務を要する。そのためにも、この分子機構の解明は重要である。本研究は、これまで全く予想されていなかった老化・寿命因子 TORC1 の染色体分配への関与を明らかにしつつあり、この分野に大きなインパクトを与える。染色体の分離分配は、これまでコヒーシンや紡錘体チェックポイント因子といった中心的な因子の動態だけで語られてきたが、今後は TORC1 やサーチュインを含め、老化・寿命因子によるそれらへの影響・働きかけを検証すべき新たな段階に差し掛かっていると言える。

今後、この分野を共同研究対応者の田中耕三教授とともに開拓してゆきたい。まず、第一報を発表し、それを起爆剤としてさらなる大型の科研費等の共同プロジェクトへと発展させてゆく予定である。

[4] 成果資料

現時点での発表論文はないが、足りないデータを充足し来年度中に論文投稿する予定である。