

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 30 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到に起因する。高齢出産に伴い老化の進んだ卵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、酵母で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。

酵母細胞を微小管脱重合剤ノコダゾ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処理するとこの分裂中期停止が解除された。しかし、紡錘体チェックポイント因子の Bub1 および 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かかわらず 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う結果、APC/C-Cdh1 が

異常に活性化してしまい、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。事実、Cdh1 欠損細胞で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。逆に言えば、栄養源が存在する時には TORC1 は mitotic slippage を抑制していると言える。

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。

(1) 酵母 APC/C-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を明らかにした。(2) さらに、核小体で Cdc14 をつなぎとめている Net1 が分解されることがその Cdc14 の活性化に必要であることを見出した。

(3) 加えて、この Net1 の分解が mitotic slippage に重要であることを見出した。(4) 一方、G1 期へ向かうための telophase の開始に必要なサイクリン B の分解も APC/C-Cdh1 の活性化により促進され、ノコダゾール処理した metaphase 細胞にラパマイシン処理を行うと G1 細胞の出現が促進された。

以上のことは、TORC1 の不活性化が、Net1 分解 → Cdc14 活性化 → APC/C-Cdh1 活性化 → セクリンおよびサイクリン B の分解 → 姉妹染色分体染色体の解離と mitotic slippage の促進、という一連のイベントをもたらしたことを示す。

しかしこの際、TORC1 の不活性化による metaphase 停止の乗り越えが起こったことで、染色体の不均衡分配の頻度が増加し、その結果、細胞死が増加した。

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 が起きることをヒト培養細胞で確認していたが(昨年度共同研究)、この現象が酵母とは異なり、APC/C-Cdc20 依存的であることを見出した。ヒト細胞は分裂期に核と核小体の崩壊を起こすため、酵母とは異なる方法で mitotic slippage を起こしているものと考えられた(図1)。

この現象がヒト細胞でどのような生物学的意義

を持つのかは現在のところ不明であるが、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。老化した体細胞で、細胞周期チェックポイントが十分機能するのかが今後の重要な課題である。さらには、細胞周期進行における老化細胞のストレス(栄養源飢餓元ストレスも含め)応答機構がどのようにになっているのか、本研究は、これらの諸問題全てに関連する結節点とも言える。今後は、これらの検証を視野に入れて研究を進める予定である。

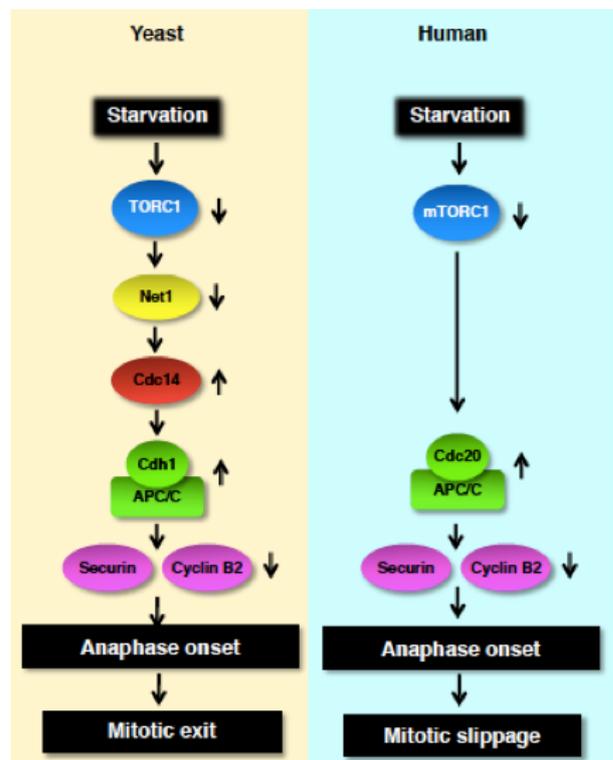


図2 酵母とヒト細胞での mitotic slippage

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、細胞には分裂期進行経路が2つあり、その2つが栄養の有無によって使い分けられていることを明らかにしたという意味においてインパクトは極めて大きい。これは、ストレス、老化に応じた様々な細胞周期進行の経路があることを示唆しており、新しい研究領域を開拓した。今後、他のグループと共に新研究領域の発展が期待される。

[4] 成果資料

本共同研究で得られた成果は現在論文投稿中である。