

課題番号 1

## 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 15 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 (aneuploid) を持つヒト胎児は妊娠時の少なくとも 10% に達する。これは主に卵成熟の減数分裂過程における染色体の不均等分配に起因する。女性の高齢出産に伴い老化した卵細胞ではこの染色体の不均等分配の頻度が高まり、胎児の異数性は 50% を超える (Nagaoka et al. *Nat Rev Genet* 2012)。

この高齢出産に伴う卵子の染色体分配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、姉妹染色分体を接着させている「コヒーシ複合体」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)」の不全性がその要因として疑われている。紡錘体形成チェックポイントとは、全ての染色体の微小管と二方向性接着を監視し、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り、染色体の異常分配を抑制するのに不可欠である。卵子で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ない (Gui and Homer. *Development* 2012; Kolano et al. *PNAS* 2012)。さらに、卵子の老化に伴い紡錘体チェックポイントが正確に発動しないことが報告されている。しかしながら、それらの分子機構に関しては不明な点が多い。

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。最近、代表者のグループは、TORC1 が DNA 損傷チェックポイント (DNA damage checkpoint) の維持に必要であることを見出した (Miyamoto et al. *BBRC* 2019)。つまり、ラパマイシンで TORC1 を不活性化すると DNA 損傷チェックポイントが作動しなくなった。

それに加えて、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、出芽酵母を用いてこの異常な現象の分子レベルでの詳細な解明、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 APC/C-Cdh1 が時期尚早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った。さら

に、野生株においてもすでに分裂中期で APC/C-Cdh1 がすでにわずかながらも活性を持つことを明らかにした (Nagai and Ushimaru *Cell Signal.* 2014)。

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、APC/C-Cdh1 依存的な 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

本年度は昨年度に引き続き以下の結果を得た。

(1) ノコダゾール処理した metaphase に停止した酵母細胞において APC/C-Cdh1 の活性化に必要なプロテインフォスファターゼ Cdc14 がラパマイシン処理後の mitotic slippage にも必要であった。(2) ラパマイシン処理で核小体で Cdc14 をつなぎとめている Net1 が分解されることがその Cdc14 の活性化と mitotic slippage に必要であった。(3) それに加えて、M 期から G1 期へ脱出するため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、G1 細胞の出現が促進された。

以上のことは、TORC1 不活性化 → Net1 分解 → Cdc14 活性化 → APC/C-Cdh1 活性化 → セキュ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 M 期終了の促進、という一連のイベントを示唆する。しかしこの際、TORC1 不活性化による分裂中期停止の乗り越えは、染色体の不均衡分配と細胞死を増加させた。

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 (一昨年度の共同研究)。しかし酵母とは異なり、この mitotic slippage は Cdh1 には依存せず APC/C-Cdc20 依存的であった。酵母は分裂期に核と核小体を維持したまま染色体分配を起こす。この核小体の存在が M 期における Cdc14 の活性制御に重要である。一方、ヒト細胞では分裂期に核の崩壊を起こすため、酵母とは異なり Cdc14 に依存しない機構で mitotic slippage を起こすものと考えている (図 1)。本共同研究で得られた上記の成果は現在論文にまとめてすでに投稿し、現在そのリバイス中である。

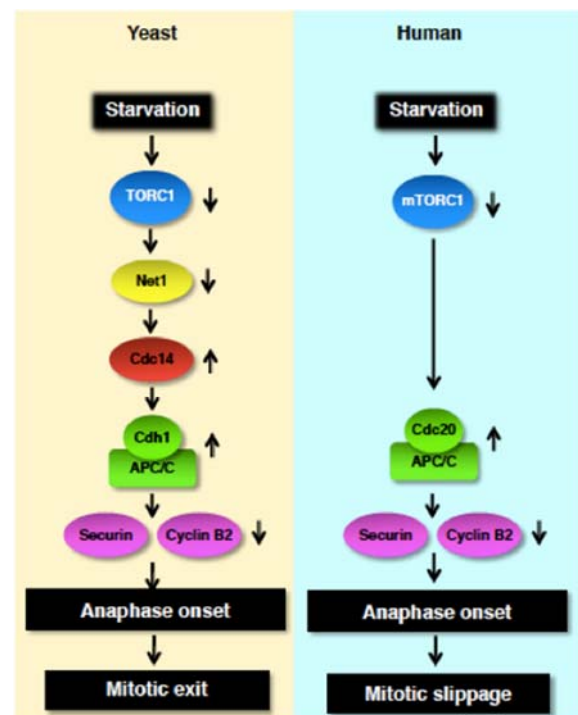


図 2 酵母とヒト細胞での mitotic slippage

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、TORC1 の活性低下が染色体の不均衡分配の頻度を増加させることを示唆する。このことは、TORC1 の活性において、細胞老化と細胞分裂制御がトレードオフの関係にあることを示唆する。つまり、薬剤等による TORC1 シグナル経路の減弱は細胞老化の抑制に寄与するものの、染色体不均衡分配のリスクを増加させる。一方で、老化細胞では TORC1 活性が低下することが報告されている (Zhang et al. *Exp. Cell Res.* 2000)。このことは、老化細胞で TORC1 の機能低下により染色体の不均衡分配が促進される可能性を示唆する。このように、細胞の老化と細胞周期進行における mTORC1 の役割の重要性に関して、本研究は重要な洞察を与える。本研究が、TORC による細胞周期進行制御の新しい研究領域発展の突破口になることを期待する。

### [4] 成果資料

1. Miyamoto, ... Ushimaru (2019) TORC1 regulates the DNA damage checkpoint via checkpoint protein levels. **Biochem Biophys Res Commun.** (In press)
2. Nagai, ... Ushimaru (2018) Cdh1 degradation is mediated by APC/C-Cdh1 and SCF-Cdc4 in budding yeast. **Biochem Biophys Res Commun.** 506:932-938.
3. Mostofa, ... Ushimaru (2018) CLIP and cohibin separate rDNA from nucleolar proteins destined for degradation by nucleophagy. **J. Cell Biol.** 217: 2675-2690.