

課題番号 6

分裂期進行を制御する寿命制御因子 mTOR 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 20 万円

[2] 研究経過

ヒト胎児における染色体数異常は少なくとも 10% に達する。これは主に卵成熟過程における減数分裂時の染色体の不均衡分配に起因する。女性の高齢出産では老化した卵細胞における染色体数異常の増加により、胎児の異数性は 50% を超える (Nagaoka et al. *Nat Rev Genet* 2012)。老化した卵子の染色体分配異常増加の要因の 1 つとして、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疑われている (Nagaoka et al. *Nat Rev Genet* 2012)。SAC 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染色体分離 (分裂後期開始) を抑制するシステムであり、SAC は染色体の異常分配を抑止するのに不可欠である。卵子では SAC が精子に比べて十分に機能しない上に、卵子の老化に伴い SAC がより正常に作動しなくなる (Gui and Homer. *Development* 2012; Kolano et al. *PNAS* 2012)。

TORC1 (target of rapamycin complex 1) プロテインキナーゼは TOR (哺乳類では mTOR) を触媒サブユニットとする細胞老化に深く関係する複合体である (Kapahi et al. *Cell Metab.* 2010)。栄養やインシュリン等の成長ホルモンで TORC1 は活性化し同化作用を促進し細胞成長を促す。しかしその反面、細胞の活動度を高め、細胞・個体の老化を促進する。TORC1 の特異的阻害剤ラパマイシンは唯一のマウスの最大寿命延長剤である (Harrison et al. *Nature* 2009)。最近、代表者は、TORC1 が S 期の DNA 複製を促進すること (Yamamoto et al. *BBRC* 2018)、DNA 損傷チェックポイントの保持に必要であることを見出した (Miyamoto et al. *BBRC* 2019)。そのため代表者は、TORC1 の他の細胞周期進行、チェックポイントへの

関与を疑い、TORC1 活性が SAC の機能、および分裂期進行に影響することを見出した。それを受けて、代表者は加齢医学研究所の田中耕三教授との共同研究を開始し、昨年度までに以下の成果を得た。

1) 代表者による酵母を用いた研究概要

酵母を微小管脱重合剤ノコダゾールで処理すると SAC 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、分裂中期停止が解除された (mitotic slippage)。通常の分裂後期開始に働く APC/C-Cdc20 を失活させた *cdc20* 変異株でもこの mitotic slippage は抑制できなかったため、Cdc20 のホモログである Cdh1 の関与を疑った。代表者は最近、APC/C-Cdh1 を介した異常な分裂後期期進行を見出した (Toda et al. *Cell Div.* 2012; Nagai and Ushimaru *Cell Signal.* 2014)。APC/C-Cdh1 が時期尚早な活性化により、分裂後期開始抑制因子セキュリンが分解され姉妹染色分体が分離する。事実、この mitotic slippage は Cdh1 欠損で抑制された。さらに、Cdh1 活性化因子の Cdc14 フォスファターゼはラパマイシン処理で活性化し、Cdc14 を欠損させると mitotic slippage が抑制された。さらに、Cdc14 抑制因子 Net1 がラパマイシン処理で分解された。この際、染色体の不均衡分配と細胞死が増加した。以上のことから、TORC1 の活性低下が異常な分裂期進行を招き、染色体の異数性が増加する可能性が示唆された。

2) 対応者によるヒト細胞を用いた研究概要

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 が起きることを見出した。しかし予想外のことに、siRNA で Cdh1 のレベルを低下させてもこの現象は抑制されなかった。これは、ヒト細胞での TORC1 不活性化による mitotic slippage は Cdh1 には依存しないことを示唆する。

以上の研究は、対応者の田中耕三教授と適宜メール等により打合わせを行いつつ行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

上記の経緯を受け、本年度は以下の結果を得た。

1) 代表者による酵母を用いた研究概要

1-1) Net1 の喪失による mitotic slippage 誘導

Net1 に auxin-induced degron (aid) タグを付与した *net1-aid* 株を作成しオーキシン添加により Net1 が喪失させたところ、セキュリンの分解と mitotic slippage

(姉妹染色分体分離)が惹起された。これらのことは、Net1の分解、低下がTORC1不活性化後のキーイベントであるというモデルを支持する。

1-2) TORC1不活性化によるG1進行

TORC1不活性化によるmitotic slippageに伴いG1細胞が増加することを、顕微鏡観察とフローサイトメトリーの両方で検証し確認した。

2) 対応者によるヒト細胞を用いた研究概要

2-1) mitotic slippageにおけるCdc20依存性

siRNA実験でCdh1を喪失させてもmitotic slippageはキャンセルされなかった一方で、Cdc20を喪失させるとmitotic slippageがキャンセルされた。このことは、酵母と異なり、ヒト細胞ではmitotic slippageが通常の分裂期進行に働くAPC/C-Cdc20を介することを示す。

2-2) TORC1不活性化と細胞死

分裂中期停止細胞でのラパマイシン処理は分裂期細胞死をわずかながら減少させた。一方、ラパマイシン処理は分裂期停止時間には大きな影響を与えなかった。

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を起こす機構を獲得したものと推測される。

本共同研究で得られた上記の成果は論文として雑誌投稿し、現在そのリバイスを行っている。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、TORC1の活性低下が異常な染色体分離を促進し、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のみならず、アンチエイジング剤として期待されているラパマイシンの安易な使用は染色体の不均衡分配による細胞のがん化促進という副作用を生み出す危険性を指摘する。一方、老化細胞ではTORC1活性が低下することが報告されており(Zhang et al. *Exp. Cell Res.* 2000)、老化細胞でのmTORC1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本研究は示唆する。このように、本研究は、細胞の老化と細胞周期進行を結ぶ因子としてのmTORC1の重要性に関して貴重な洞察を与える。

本共同研究を通して、学外研究者との共同研究が促進され、上記の成果を得ることができた。本研究は、「老化に伴うTOR1による細胞周期進行制御」という新たな研究領域の創生を提示する。本研究を起点として今後の大きな発展が期待される。

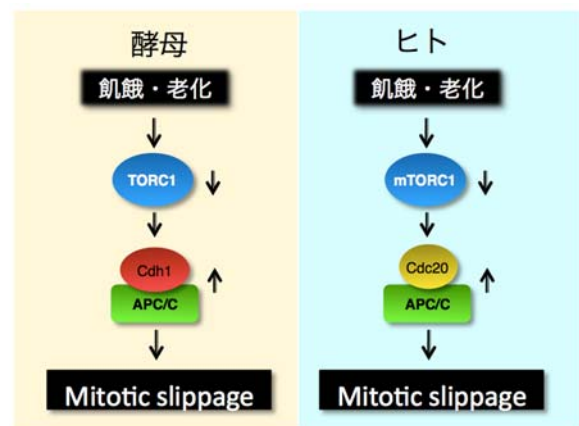


図1 酵母とヒト細胞でのmitotic slippage

[4] 成果資料

- Hatano...Ushimaru (2016). Positive feedback promotes mitotic exit via the APC/C-Cdh1-separase-Cdc14 axis in budding yeast. *Cell Signal* 28, 1545-54.
- Kondo...Ushimaru, T. (2018). Cdc14 Phosphatase Promotes TORC1-Regulated Autophagy in Yeast. *J Mol Biol* 430, 1671-84.
- Miyamoto...Ushimaru (2019). TORC1 regulates the DNA damage checkpoint via checkpoint protein levels. *Biochem Biophys Res Commun* 510, 629-35.
- Mostofa...Ushimaru (2019). rDNA Condensation Promotes rDNA Separation from Nucleolar Proteins Degraded for Nucleophagy after TORC1 Inactivation. *Cell reports* 28, 3423-34.
- Mostofa...Ushimasru (2018). CLIP and cohibin separate rDNA from nucleolar proteins destined for degradation by nucleophagy. *J Cell Biol* 217, 2675-90.
- Nagai...Ushimaru (2018). Cdh1 degradation is mediated by APC/C-Cdh1 and SCF-Cdc4 in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 506, 932-8.
- Nagai...Ushimaru, T. (2014). Cdh1 is an antagonist of the spindle assembly checkpoint. *Cell Signal* 26, 2217-22.
- Shimizu...Ushimaru (2016). Elucidation of novel budding yeast separase mutants. *Biosci Biotechnol Biochem* 80, 473-8.
- Suda...Ushimaru, T. (2019). TORC1 regulates autophagy induction in response to proteotoxic stress in yeast and human cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 511, 434-9.
- Toda...Ushimaru (2012) APC/C-Cdh1-dependent anaphase and telophase progression during mitotic slippage. *Cell Div* 7, 4.
- Yamamoto...Ushimaru (2018) CDK phosphorylation regulates Mcm3 degradation in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 506, 680-4.