

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：

勝田 晴子 (静岡大学大学院総合科学技術研究科)

研究費：物件費 3 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% に達するが、この主要因は卵成熟過程における減数分裂時の染色体分配異常である。女性の高齢出産では老化卵細胞において染色体数異常が増加し胎児の異数性は 50% を超える (Nagaoka et al. *Nat Rev Genet* 2012)。卵子では SAC が精子に比べて十分に機能しない上に、老化卵子では紡錘体形成チェックポイント (spindle assembly checkpoint; SAC) の機能が低下する (Gui and Homer. *Development* 2012; Kolano et al. *PNAS* 2012; Nagaoka et al. *Nat Rev Genet* 2012)。しかし、この分子基盤は不明である。

TORC1 (target of rapamycin complex 1) (ヒト mTORC1) プロテインキナーゼ複合体は栄養・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反面、細胞・個体の老化が結果的に促進される (Kapahi et al. *Cell Metab.* 2010)。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、代表者のグループは出芽酵母を用いて、TORC1 が G1/S 期進行を促進すること (Moshed et al. *BBRC* 2020)、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)。このように TORC1 は様々な細胞周期進行、チェックポイントに関与することが明らかになりつつある。代表者はさらに、出芽酵母を用いて TORC1 が M 期進行、染色体分配、チェックポイントに関与することを示唆する予備的知見を見出した。そのため、代表者は加齢医学研究所の田中耕三教授に共同研究を依頼し、ヒト細胞での同様な研究を進めていただい

た。経緯を簡単に記す。

1) 代表者 (丑丸) 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。これに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* 変異株でもこの現象は抑制できず、APC/C-Cdh1 を介した異常な分裂後期期進行 (Toda et al. *Cell Div.* 2012; Nagai and Ushimaru *Cell Signal.* 2014) が活性化していた。これは Net1 と Cdc14 フォスファターゼに依存した。

2) 対応者 (田中) 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。しかし酵母の場合と異なり、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 (図 1 参照)

本年度は以下に示す研究成果を得た。

1) 代表者による酵母を用いた研究の成果

1-1) 出芽酵母 auxin-induced degron (AID) システムを用いて、ノコダゾール処理による分裂中期停止細胞で Net1 の強制的分解を誘導すると、Cdc14 の核小体からの遊離、および姉妹染色体の分離、つまり mitotic slippage が引き起こされた。これは、ラパマイシン処理によるその後の現象と極めて類似し、TORC1 不活性化による mitotic slippage は Net1 分解が仲介するというモデルを支持する。

1-2) ノコダゾール処理による分裂中期停止細胞にラパマイシン処理、もしくは窒素源飢餓処理を行うと、実際に M 期を脱出した G1 期細胞が観察された。この mitotic slippage において、染色体の不均衡分配と細胞死が増加した。このことは、TORC1 の活性低下が染色体の異数性の増加を伴う分裂期進行が誘発されることが示す。

2) 対応者によるヒト細胞を用いた研究の成果

2-1) Cdh1 を喪失させてもラパマイシン処理後の mitotic slippage はキャンセルされなかったことから、Cdc20 の関与を疑い検証した。その結果、Cdc20 をノックダウンはこれをキャンセルした。このことは、ヒト細胞ではラパマイシン処理による mitotic slippage が通常の分裂期進行と同様に APC/C-Cdc20 が仲介することを示す。

2-2) ノコダゾール処理による SAC の活性化により分裂中期に細胞を停止し続けさせると細胞死が惹起される (mitotic cell death)。Cdc20 をノックダウンさせた場合、ラパマイシン処理の有無に関わらず Cdc20 のノックダウンでの mitotic slippage 減少したこともあり、mitotic cell death の出現が顕著に減少した。
本共同研究で得られた本成果は論文として雑誌投稿し、リバイスを行った後再投稿中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、TORC1 活性低下が染色体不均等分配頻度を増加させることを示唆し、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使用は正常細胞において染色体の不均等分配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 (Zhang et al. *Exp. Cell Res.* 2000)。老化細胞での mTORC1 の機能低下による染色体の不均等分配が促進される可能性を示唆する。

TORC1 は飢餓のみならず DNA ダメージ、タンパク質毒性ストレスでも活性が低下する。本共同研究成果は、TORC1 を介して、ストレスによる染色体動態制御という新たな研究領域の創生を提示する。本研究を起爆剤として今後の大きな発展が期待される。

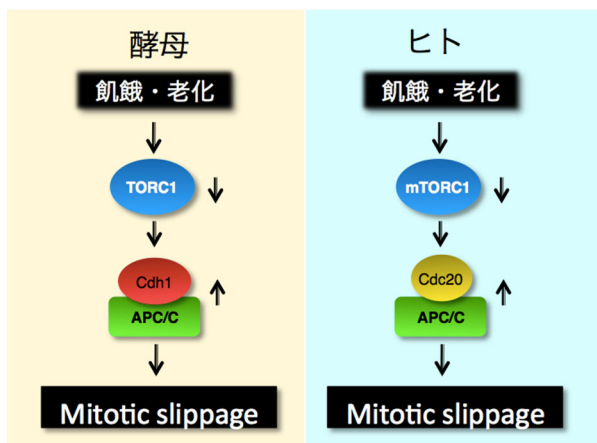


図1 酵母とヒト細胞でのmitotic slippage

[4] 成果資料

1. Toda...Ushimaru (2012) APC/C-Cdh1-dependent anaphase and telophase progression during

mitotic slippage. *Cell Div* 7, 4.

2. Nagai...Ushimaru, T. (2014) Cdh1 is an antagonist of the spindle assembly checkpoint. *Cell Signal* 26, 2217-22.

3. Hatano...Ushimaru (2016) Positive feedback promotes mitotic exit via the APC/C-Cdh1-separase-Cdc14 axis in budding yeast. *Cell Signal* 28, 1545-54.

4. Shimizu...Ushimaru (2016) Elucidation of novel budding yeast separase mutants. *Biosci Biotechnol Biochem* 80, 473-8.

5. Kondo...Ushimaru, T. (2018) Cdc14 Phosphatase Promotes TORC1-Regulated Autophagy in Yeast. *J Mol Biol* 430, 1671-84.

6. Mostofa...Ushimaru (2018) CLIP and cohibin separate rDNA from nucleolar proteins destined for degradation by nucleophagy. *J Cell Biol* 217, 2675-90.

7. Nagai...Ushimaru (2018) Cdh1 degradation is mediated by APC/C-Cdh1 and SCF-Cdc4 in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 506, 932-8.

8. Yamamoto...Ushimaru (2018) CDK phosphorylation regulates Mcm3 degradation in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 506, 680-4.

9. Miyamoto...Ushimaru (2019) TORC1 regulates the DNA damage checkpoint via checkpoint protein levels. *Biochem Biophys Res Commun* 510, 629-35.

10. Mostofa...Ushimaru (2019) rDNA Condensation Promotes rDNA Separation from Nucleolar Proteins Degraded for Nucleophagy after TORC1 Inactivation. *Cell reports* 28, 3423-34.

11. 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.

12. Mostofa...Ushimaru (2020) Cdc14 protein phosphatase and topoisomerase II mediate rDNA dynamics and nucleophagic degradation of nucleolar proteins after TORC1 inactivation. *Cell Signal.* 79, 109884.

13. Morshed...Ushimaru (2020) ESCRT machinery plays a role in microautophagy in yeast. *BMC Mol Cell Biol.* 21: 70.

14. Morshed...Ushimaru (2020) TORC1 regulates G1/S transition and cell proliferation via the E2F homologs MBF and SBF in yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 529(3):846-853.

15. Daicho...Ushimaru (2020) TORC1 ensures membrane trafficking of Tat2 tryptophan permease via a novel transcriptional activator Vhr2 in budding yeast. *Cell Signal.* 68:109542.