

課題番号 1

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

(静岡大学理学部生物科学科)

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所)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

通常の分裂期の染色体の分離・凝縮等の動態の分子機構に関してはその全貌が明らかになりつつある。一方、細胞がストレス下（例えば栄養源飢餓下）で分裂期を迎えた場合の染色体動態に関する研究はほとんど進んでおらず未解明の課題である。

老化・寿命に深く関与する 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・個体の老化を促進する (Kapahi et al. 2010 *Cell Metab*)。そのため、TORC1 の特異的阻害剤ラパマイシンはマウスの最大寿命を延長することができる (Harrison et al. 2009 *Nature*)。代表者は、酵母 TORC1 が G1/S 期進行を促進すること、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 (Moshed et al. 2020 *BBRC*; Miyamoto et al. *BBRC* 2019)、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を示した。

その一方、TORC1 は栄養源飢餓で不活性化し細胞成長を停止させる。代表者は、それに加えて DNA ダメージ、タンパク質毒性ストレスも TORC1 活性を低下させることを明らかにした (Ueda et al. 2019 *Cell Signal*; Suda et al. 2019 *BBRC*)。これらのことは、TORC1 が細胞内環境をモニターし適切に細胞成長を制御することを示す。

代表者は予備的研究において、出芽酵母 TORC1 の活性低下が分裂期の進行、および分裂期の染色体動態に大きな影響を及ぼすことを見出した。

上記の予備的知見を受け、本助成を受けつつ、東北大学加齢医学研究所の田中耕三教授にヒト細胞での共同研究を進めていただいた。

1) 代表者による酵母を用いた研究概要

微小管脱重合剤ノコダゾールで処理し分裂中期で停止させた酵母にラパマイシンを処理すると、分裂中期停止が解除された (mitotic slippage) (図1)。この停止解除は通常とは異なり APC/C-Cdh1 を介した経路 (Toda et al. 2012 *Cell Div*; Nagai and Ushimaru 2014 *Cell Signal*) の活性化によるものであった。

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。しかし酵母の場合と異なり、ヒト細胞での TORC1 不活性化による mitotic slippage は Cdh1 に依存しなかった。

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。

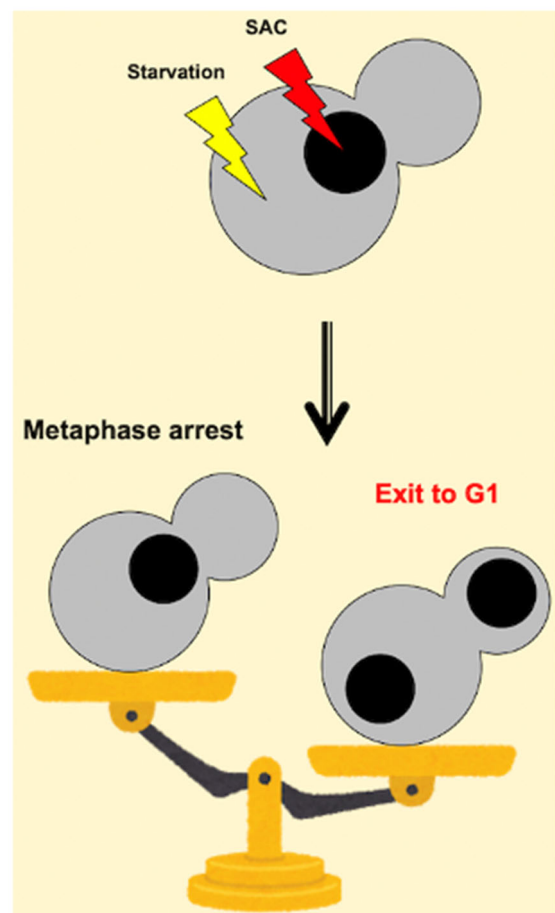


図1 分裂中期に停止した細胞が飢餓ストレスを受けた場合に、細胞は細胞周期進行を再開する。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

昨年度、論文を投稿したが、リバイス要請があり、本年度はそれに対する実験を適切に行い再投稿し、アクセプトされた (Yamada et al. 2020 **iScience**)。

1) 代表者による酵母を用いた研究の成果

TORC1 不活性化後、プロテアソームによる核小体タンパク質 Net1 の分解 → Cdc14 フォスファターゼ → Cdh1 活性化 → APC/C-Cdh1 によるセクリンのユビキチン化による分解 → 姉妹染色分体の分離が起こる一方、APC/C-Cdh1 による B 型サイクリンのユビキチン化による分解 → 分裂期からの脱出が起こり、mitotic slippage に至ることを示した。蛍光顕微鏡観察における再実験だけでなく、新たな追加実験を行った。

2) 対応者によるヒト細胞を用いた研究の成果

一方、ヒト細胞では TORC1 不活性化により APC/C-Cdh1 を介さない mitotic slippage が惹起され、分裂期様式の異なる生物 (酵母では核膜が崩壊しない closed mitosis、ヒト細胞では核膜が崩壊する open mitosis) では異なる様式で TORC1 不活性化後の mitotic slippage が起こることを示した。モデルを補完するため、ラパマイシン処理後の spindle assembly checkpoint の関連分子等のレベルを調べた。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、ストレスによる TORC1 活性低下が染色体分配不全を増加させることを示唆し、抗がん剤として使用されているラパマイシンの使用が正常細胞において逆に染色体の不均等分配を介してガン化を増加させる危険性があることを指摘した。ラパマイシンはアンチエイジング剤として期待されるが、本実験結果はラパマイシンの安易な使用に対して警鐘を鳴らすものでもある。さらに、本研究は TORC1 活性が低下する老化細胞では TORC1 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。

本研究は、TORC1 を基軸にした新たなストレス、老化、がん、染色体を絡めた壮大な研究分野の創生を提示した。本研究を起爆剤として今後より一層の関連研究の発展を目指す。

[4] 成果資料 (査読付き論文、代表者が責任著者)

1. Yamada, ..., **Ushimaru*** (2022) TORC1 inactivation promotes APC/C-dependent mitotic slippage in yeast and human cells. **iScience**. 25:103675. (本共同研究成果)
2. Tasnin, ..., **Ushimaru*** (2022) The PI3 kinase complex II-PI3P-Vps27 axis on vacuolar

membranes is critical for microautophagy induction and nutrient stress adaptation. **J Mol Biol**. 434:167360

3. 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.
4. Daicho, ..., **Ushimaru*** (2020) TORC1 ensures membrane trafficking of Tat2 tryptophan permease via a novel transcriptional activator Vhr2 in budding yeast. **Cell Signal**. 68:109542.
5. 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.
6. Suda, ..., **Ushimaru*** (2019) TORC1 regulates autophagy induction in response to proteotoxic stress in yeast and human cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 511, 434-9.
7. Ueda, ..., **Ushimaru*** (2019) TORC1, Tel1/Mec1, and Mpk1 regulate autophagy induction after DNA damage in budding yeast. **Cell Signal**. 62:109344.
8. Mostofa, ..., **Ushimaru*** (2019) rDNA Condensation Promotes rDNA Separation from Nucleolar Proteins Degraded for Nucleophagy after TORC1 Inactivation. **Cell reports** 28, 3423-34.
9. Miyamoto, ..., **Ushimaru*** (2019) TORC1 regulates the DNA damage checkpoint via checkpoint protein levels. **Biochem Biophys Res Commun** 510, 629-35.
10. Yamamoto, ..., **Ushimaru*** (2018) CDK phosphorylation regulates Mcm3 degradation in budding yeast. **Biochem Biophys Res Commun** 506, 680-4.
11. Nagai, ..., **Ushimaru*** (2018) Cdh1 degradation is mediated by APC/C-Cdh1 and SCF-Cdc4 in budding yeast. **Biochem Biophys Res Commun** 506, 932-8.
12. Mostofa, ..., **Ushimaru*** (2018) CLIP and cohibin separate rDNA from nucleolar proteins destined for degradation by nucleophagy. **J Cell Biol** 217, 2675-90.
13. Kondo, ..., **Ushimaru*** (2018) Cdc14 Phosphatase Promotes TORC1-Regulated Autophagy in Yeast. **J Mol Biol** 430, 1671-84.
14. Shimizu, ..., **Ushimaru*** (2016) Elucidation of novel budding yeast separase mutants. **Biosci Biotechnol Biochem** 80, 473-8.
15. Hatano, ..., **Ushimaru*** (2016) Positive feedback promotes mitotic exit via the APC/C-Cdh1-separase-Cdc14 axis in budding yeast. **Cell Signal** 28, 1545-54.
16. Nagai, ..., **Ushimaru*** (2014) Cdh1 is an antagonist of the spindle assembly checkpoint. **Cell Signal** 26, 2217-22.
17. Toda, ..., **Ushimaru*** (2012) APC/C-Cdh1-dependent anaphase and telophase progression during mitotic slippage. **Cell Div** 7, 4.