

## 課題番号 9

## 寿命因子 TORC1 が制御する姉妹染色分体接着の制御機構の解明

## [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：宅間 恒行

(静岡大学創造科学技術大学院)

研究費：物件費 13 万円

## [2] 研究経過

分裂期染色体の凝縮、分離等の動態変化は姉妹染色分体の均等分配に必須である。これまでの研究は、分裂に適した条件で培養された細胞を用いて行われており、ストレス下 (例、栄養源飢餓) での分裂期進行に関しては不明な点が多い。同様に、細胞の老化による染色体の不均等分配による染色体異常は知られているものの、その理解は不十分である。

プロテインキナーゼ複合体 TORC1 (target of rapamycin complex 1) (ヒトでの mTORC1) は栄養に応答した細胞機能の切り替えと老化制御を行う最重要のキーファクターである (Kapahi et al. 2010 *Cell Metab*; Harrison et al. 2009 *Nature*)。代表者は、栄養源飢餓時の TORC1 不活性化により、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)、さらに、TORC1 不活性化が酵母とヒト細胞において紡錘体形成チェックポイントによる分裂中期停止を解除してしまうことを明らかにした (Yamada et al. 2022 *iScience*、東北大学加齢医学研究所の田中耕三教授との共同研究成果)。この停止解除は、ヒト細胞ではユビキチンリガーゼ APC/C-Cdc20 依存的であったのに対して、酵母では異常な APC/C-Cdh1 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。

さらに、飢餓による TORC1 不活性化は核小体での rRNA 遺伝子の転写抑制に伴い、rDNA (rRNA 遺伝子) 染色体領域の凝縮を惹起する (Tsang et al. 2003 *EMBO J*; Tsang et al. 2007 *EMBO J*)。代表者与其他の研究グループにより、rDNA 凝縮にはコンデン

シンと Hmo1 が関与し、rDNA を核内膜につなぎとめる cohibin と CLIP 複合体が関与することが明らかとなった (Tsang et al. 2007 *EMBO J*; Wang et al. 2016 *Cell Rep*; Mostofa et al. 2019 *Cell Rep*)。飢餓誘導性の rDNA 凝縮は M 期以外の間期でも起こり、その際の rDNA 凝縮にはコンデンシンは関与せず Hmo1 のみが関与した (Takeichi, 2022 *BBRC*)。このように、飢餓による TORC1 不活性化は染色体分離・凝縮に対して通常とは異なる影響を与える。

代表者は、出芽酵母を用いて、分裂期染色体接着と解離に重要なコヒーシン複合体が TORC1 不活性化により大規模に失われることを見出した (未発表データ)。コヒーシンは Scc1、Smc1、Smc3、Scc3、Pds5 からなる複合体であり姉妹染色分体を繋ぎ止める働きをする。リング状のコヒーシン複合体は姉妹染色分体を接着させているが、分裂後期開始時に分裂期プロテアーゼであるセパラゼ Esp1 により Scc1 が切断されることでコヒーシンリングが開裂し姉妹染色分体が分離可能になる (図 1)。これに加えて、prophase における Scc1 と Smc3 との結合解除が知られているが、コヒーシンが大規模に分解される機構は新規であり、これにより不用意な姉妹染色分体分離が引き起こされることが示唆される。

以上を踏まえて、本共同研究では TORC1 不活性化後の上記因子の動態を検証した。本研究は、所内対応者の田中耕三教授と打合わせを行いつつ行った。

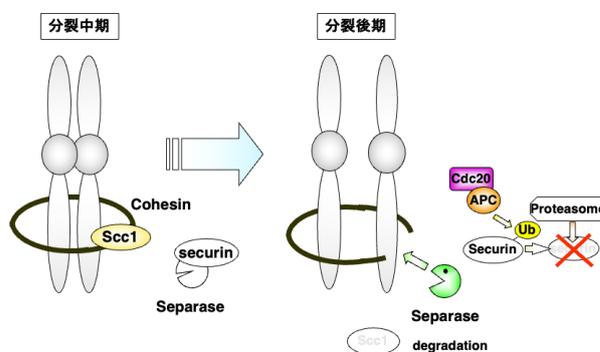


図1. コヒーシンサブユニット Scc1 は分裂後期開始時にセパラゼにより切断を受け分解されることでコヒーシンが開裂し姉妹染色分体が分離可能になる。分裂中期にはセパラゼはセクリンによる結合阻害を受けているが、分裂後期開始時にセクリンがユビキチン化され除去されることで活性化する。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

コヒーシ複合体タンパク質の多くが TORC1 阻害剤であるラパマイシン処理により失われた (図2)。このことは、TORC1 不活性化によりこれらのタンパク質の分解が促進されることを示唆する。本年度は、この中の顕著にタンパク質が減少した Scc3 の分解機構に関して調べた。

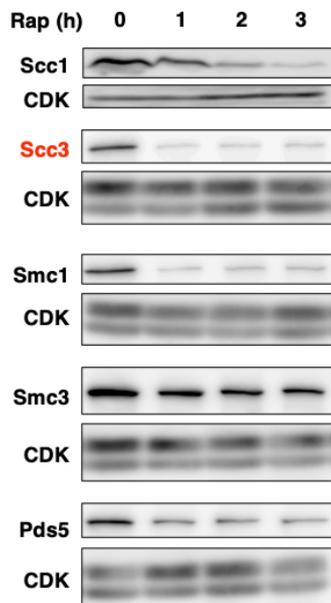


図2. コヒーシンのラパマイシン処理後の減少。

その結果、以下に示す研究成果を得た。

#### (1) Scc3 の分解がユビキチン・プロテアソーム系

(UPS) 依存的に起こる可能性を疑い、これを検証した。野生株 WT ではラパマイシン処理1時間後に Scc1 の顕著な減少がみられたのに対して、プロテアソーム変異株 *pre10-5001* ではその減少がキャンセルされた (図3)。このことは、TORC1 不活性化により染色体分離に必要な Scc3 がプロテアソーム分解を受けて失われることを示す。

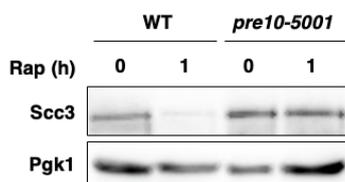


図3. Scc3の細胞周期依存的消長

(2) 次に Scc3 の分解に関与するユビキチンリガーゼ E3 の同定を目指した。M 期因子の分解を担う重要な E3 である APC/C の関与を疑い、これを検証した。しかし、予想に反して、APC/C の変異体 *cdc27-1* でも分解は抑制されなかった (図4)。加えて、APC/C の基質認識サブユニット Cdh1 の欠損株 *cdh1Δ* と、

Cdc20 の変異株 *cdc20-3* でも同様な結果となった (図4, データ示さず)。このことは、APC/C は Scc3 の分解に関与しないことを示唆する。

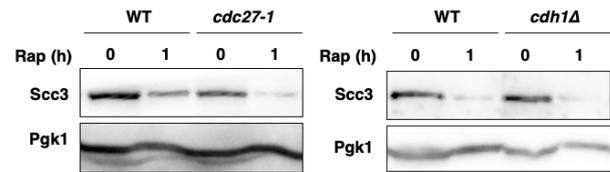


図4. Scc3分解におけるAPC/Cの関与の検証。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、栄養源の低下、および抗がん剤、免疫抑制剤として使用されるラパマイシンの使用が正常細胞において染色体の不安定性をもたらし細胞のガン化を増加させる危険性があることを改めて指摘する。今後はヒト細胞で同様な現象を確認することで、より普遍的な現象の解明を目指す。本研究は、TORC1 を基軸としてストレス、老化、染色体研究を絡めた学際的な研究分野の創生の可能性を持ち、今後、より幅広い関連分野との共同研究を目指す。

#### [4] 成果資料 (代表者が責任著者の査読付き原著論文)

1. Yamada, ..., [Ushimaru\\*](#) (2022) TORC1 inactivation promotes APC/C-dependent mitotic slippage in yeast and human cells. **iScience**. 25:103675.
2. Takeichi, ..., [Ushimaru\\*](#) (2022). Interphase chromosome condensation in nutrient-starved conditions requires Cdc14 and Hmo1, but not condensin, in yeast. **Biochem Biophys Res Commun** 611, 46-52.
3. Mostofa, ..., [Ushimaru\\*](#) (2019). rDNA condensation promotes rDNA separation from nucleolar proteins degraded for nucleophagy after TORC1 inactivation. **Cell Reports** 28, 3423-3434.e3422.
4. Morshed, ..., [Ushimaru\\*](#) (2020). TORC1 regulates G1/S transition and cell proliferation via the E2F homologs MBF and SBF in yeast. **BBRC** 529, 846-853.
5. Miyamoto, ..., [Ushimaru\\*](#) (2019). TORC1 regulates the DNA damage checkpoint via checkpoint protein levels. **BBRC** 510, 629-635.
6. Miyamoto, ..., [Ushimaru\\*](#) (2019) TORC1 regulates the DNA damage checkpoint via checkpoint protein levels. **BBRC** 510, 629-35.
7. Nagai, ..., [Ushimaru\\*](#) (2014) Cdh1 is an antagonist of the spindle assembly checkpoint. **Cell Signal** 26, 2217-22.
8. Toda, ..., [Ushimaru\\*](#) (2012). APC/C-Cdh1-dependent anaphase and telophase progression during mitotic slippage. **Cell Div** 7, 4. 10.1186/1747-1028-7-4.