

## 課題番号 4

## 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

細胞分裂期の染色体の分離、凝縮等のダイナミックな形態変化の分子機構が明らかになってきているものの、これまでの研究は細胞増殖に適した培養条件で行われてきたものであり、ストレス下 (例えば栄養源飢餓) で分裂期進行がどのように影響を受けるかについては未解明である。老化した卵子における染色体の不均衡分配により染色体異常が生じてしまうが、老化というプロセスがどのような細胞内部ストレスを生じさせるかも今後の課題である。

プロテインキナーゼ複合体 TORC1 (target of rapamycin complex 1) (ヒト mTORC1) は栄養と老化寿命を繋ぐ最重要のキーフaktor 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、東北大学加齢医学研究所の田中耕三教授との共同研究で、TORC1 不活性化が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*、共同研究成果)。興味深いことに、この停止解除は、ヒト細胞ではユビキチンリガー 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*) の活性化が要因であった。

さらに、飢餓、TORC1 不活性化は核小体でのリボソーム合成を即時的に停止させ、rRNA 遺伝子 rDNA の凝縮を伴う核小体の縮退を惹起する (Tsang et al. 2003 *EMBO J*; Tsang et al. 2007 *EMBO J*)。代表者とは

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 期以外の時期、G1 期等の間期でも起き、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、飢餓に伴う TORC1 不活性化は染色体動体に対して既知の機構とは異なるインパクトを持つ。

代表者は予備的研究において、分裂期進行における重要なタンパク質コヒーシンの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)。コヒーシンのサブユニット 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。リング状のタンパク質複合体であるコヒーシンの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)。従来、コヒーシンの染色体からの脱落は、Scc1 切断に加えて、Scc1 を切断なしに Scc1 と Smc3 の結合が解除される prophase pathway が知られているのみであるが、コヒーシン本体が大規模に分解される経路は新規であり、これにより不適切な姉妹染色分体分離を引き起こされることを示唆する。

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。

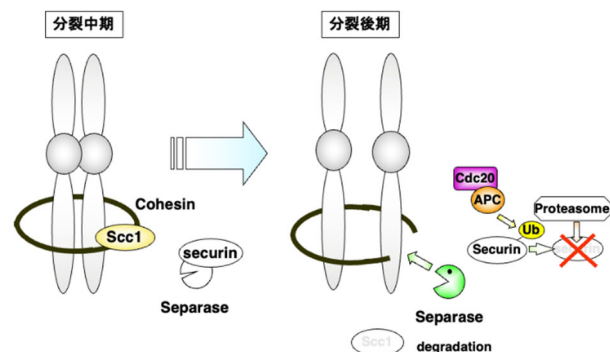


図1. コヒーシンサブユニット Scc1 は分裂後期開始時にセパラゼにより切断を受け分解されることでコヒーシンが開裂し姉妹染色分体が分離可能になる。分裂中期にはセパラゼはセクリンによる結合阻害を受けているが、分裂後期開始時にセクリンがユビキチン化され除去されることで活性化する。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

すでに昨年度の共同研究の成果として、以下の成果を得た。(1) セパラーゼ自身もラパマイシン処理後に減少した。それは分裂中期同調させた細胞でも同様に観察された。(2) セパラーゼ Esp1 に切断されない Scc1 であっても TORC1 阻害剤ラパマイシン処理後に減少した。以上の結果は、Scc1 はセパラーゼによる切断に依存しない形で減少することを示す。

それを受けて本年度は、以下に示す研究成果を得た。

(1) シャットオフ実験により非同調細胞でセパラーゼ Esp1 の分解を調べたところ、Esp1 はラパマイシン非存在下でも速やかに失われる不安定なタンパク質であり、その分解はラパマイシン処理により促進された (図 2A)。コヒーシン分解と姉妹染色分体分離が抑制されている分裂中期に細胞周期を停止させた場合にも同様な結果が得られた (図 2B)。このことから、TORC1 不活性化により染色体分離に必要なセパラーゼが分裂中期に失われること、それにも関わらずコヒーシンが失われることが明らかとなった。

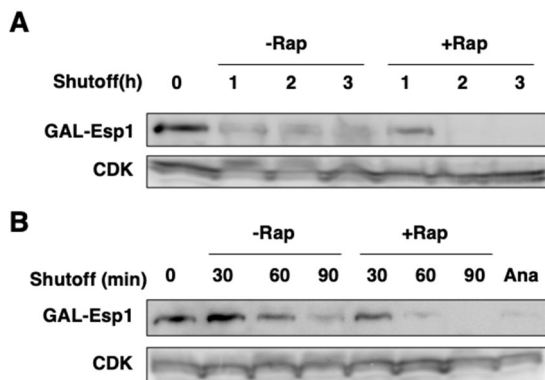


図2. セパラーゼ分解はラパマイシン処理により促進される

(2) 細胞周期依存的な Esp1 の変動を G1 期同調からのリリース実験で調べた。その結果、Esp1 は染色体分離が起こる分裂後期以降に減少することが判明した (図 3)。このセパラーゼ Esp1 の減少パターンはセパラーゼの阻害因子セキュリン Pds1 のそれと類似した。Pds1 は分裂後期開始時に APC/C-Cdc20 により一部ユビキチン化され分解された後、分裂終期に APC/C-Cdh1 によるユビキチン化で分解される。以上の結果は、Esp1 が他の分裂期因子と同様に APC/C-Cdh1 によりユビキチン化され分解されること、TORC1 不活性化がこの分解を促進する可能性を示唆する。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、TORC1 活性低下が染色体の不安定化を増加させることを示唆する。TORC1 の活性化が老化を促進することはよく知られているが、逆に老化した細胞における TORC1 活性がどのように制御されて

いるかは不明である。加えて、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す細胞のガン化を増加させる危険性があることを指摘する。このように、本研究は、TORC1 を基軸とした新たなストレス、老化、染色体、がんを絡めた学際的な研究分野の創生の可能性を提示する。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。

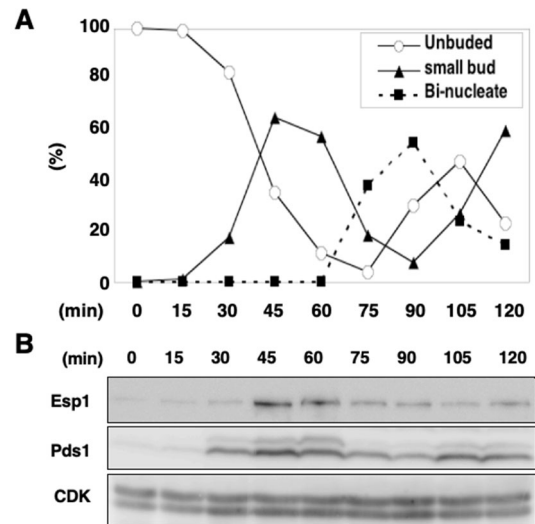


図3. セパラーゼの細胞周期依存的消長

### [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.