

「生命活動のプログラム」
平成 8 年度採択研究代表者

柳田 充弘

(京都大学大学院生命科学研究科 教授)

「細胞周期における染色体制御に必須な高次複合体の解明」

1. 研究実施の概要

細胞周期M期において起こる染色体分配機構を分子レベルで理解するために、分裂酵母をモデル系として研究を推進した。正確な分配に必須な動原体タンパク質 Mis6, Mis12, Cnp1、姉妹染色分体を結合するコヒージョンタンパク質 Mis4 アドヘリン、凝縮を引き起こすコンデンシン複合体の新たな三つの必須サブユニット、さらに染色体分離を起動する APC / サイクロソームの新規必須ユニットと同定、細胞周期における制御、リン酸化、ユビキチン化修飾の存在を明らかにした。また、Cut1 / セパリンー Cut2 / セキュリン複合体のM期中期後期遷移における機能と制御メカニズムを追及した。また、これらの複合体の細胞周期における作用点がG1期からM期にまでまたがっていることも明らかにした。すなわち新規の概念として、染色体分配は細胞周期を通じて広範に準備を進められていることが把握された。また、これらの必須タンパク質は酵母からヒトまで進化的に保存されている、ことも明らかにした。

2. 研究実施内容

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科遺伝子伝達学部門（平成10年度までは理学研究科生物物理学教室）において実施された。以下に現在まで得られた研究成果について項目ごとに分けて説明したい。

動原体タンパク機能の研究

染色体分配の正確さとタイミングを決定しているのが動原体（キネトコアともいう）であり、この部位に、キネトコア微小管が結合する。Mis12 および Cenp-A に類似した Cnp1 を新たに発見し、これらについて著しい研究の進展があった。Mis12 が動原体タンパクであり、Mis6 とは独立に機能し、なおかつ動原体の二方向性の確立に必須であることを見出した。Mis12 の欠損した変異体細胞では中期のスピンデル長が異常に長くなり、その結果二方向性が失われ、無秩序な染色分体が引き起こされる。細胞周期における作用点は驚いたことに、1 周期前の M 期であった。Mis12 は進化的に遠い出芽酵母においてもホモログがあった。これらの結果は Genes & Development 誌に発表した (Goshima et al., 1999)。さらに、ヒス

トンH3に高度に類似したCnp1タンパクの研究を推進した。出芽酵母のCse4,ヒトのCENP-Aと同様に動原体に局在した。Cnp1の欠失体及び温度感受性変異体では、染色体の異常分配が起こり、その表現型はmis6,mis12変異体と酷似していた。またcnp1変異体では、mis6、mis12変異体と同様に動原体に特異的なクロマチン構造が失われていた。大変興味深いことに、Cnp1タンパク質が動原体に局在するためにはMis6タンパク質の機能が必須であった。しかし、Mis12は必要でない。Mis6とCnp1は協同して、動原体に特異的なクロマチン高次構築を作るのに働いているのであろう。これらの結果はScience誌に投稿中である。このセクションで述べた新たな発見により、姉妹のキネトコアの二方向性を決定するメカニズムが高等動物においても遺伝子レベルで研究する道を切り開いたことになる。動原体の研究はさらなる新展開をしている。それはMis12出芽酵母ホモログであるMtwlpの研究を通じて、出芽酵母の動原体挙動がこれまで考えられていたのとはまったく異なり、姉妹染色分体がS期直後にいち早く分離しており、動原体ではなく腕の部分の結合で二方向性が保たれていることを示した(Cell 誌に発表、Goshima and Yanagida, 2000)。出芽酵母動原体のモデル系の価値と同時にコヒーシンなどの現在の解釈についての疑義も提出している。

染色体凝縮に必須なコンデンシンの分子機能の研究

研究提案時には染色体凝縮に必須な複合体サブユニットのうち、Cut3,Cut14のみについての研究が行われていた。Cut3-Cut14複合体が一本鎖DNAを二重鎖にする強力な再生活性を有することをNature誌に報告した(Sutani and Yanagida,1997)。この活性は変異体タンパクでは失われていた。そこで部分複合体でなく、完全複合体を純粋にして試験管内での反応のを可能にするためにも残りのサブユニットについての研究が重要である。このような観点に立って、残りのサブユニット遺伝子のクローン化とそれらの性状についての解析を行ってきた。複合体(現在ではコンデンシンと呼ぶ)を純粋にして、Cut3,Cut14以外の3つのサブユニットをそれぞれ、Cnd1,Cnd2,Cnd3と名付けた。これらはどれも生存に必須で、遺伝子破壊の表現型を詳しく解析するとどれも染色体凝縮に欠陥があった。Cut3,Cut14の変異体で見られる凝縮欠損の表現型と非常によく似ていた。この結果はSMC以外のサブユニットも凝縮に必須であるという、初めての証拠である。次いで、これらのタンパクが、細胞周期を通じて、どのように局在するのが研究を行った。その結果、大変興味深いことに、複合体はCut3サブユニットCdc2リン酸化部位のリン酸化に依存して、核に局在することが明らかになった。それゆえ、リン酸化部位のアラニン変異体にすると、コンデンシンはM期においても細胞質にとどまり、その結果、染色体凝縮は全く起きない。コンデンシンは、Cdc2キナーゼが不活性化された後もG1期終了まで核にとどまり、S期になると核

外に、輸送される。以上の結果はGenes & Development誌に発表された (Sutani et al., 1999)。現在、コンデンシンがいかにして核クロマチンに組み込まれるのか、この問題についても研究を進めている。また、コンデンシンの5種のサブユニットを大量発現して、複合体を大量に純化することを試みている。

姉妹染色体を結合するアドヘリンとコヒーシン複合体の分子機能の研究

DNA複製をした後の染色体は、2本の同一な姉妹染色分体が何らかの形で結合している。我々は、Mis4が新しい姉妹染色分体の結合タンパク質であることを見出した。姉妹染色体をさらによく理解するために、分裂酵母におけるコヒーシン複合体タンパク質を同定し、それらの性質を明らかにする研究を開始した。SMCサブユニットであるPsm1, Psm2の遺伝子をクローン化し、それ以外のRad21, Psc3などの研究を開始し興味深い結果を得ている。またヒトのMis4/アドヘリンタンパク質を同定し、この性質を現在鋭意検討中である。

染色体分配に起こさせるタンパク質分解に必須な複合体の研究

染色体が細胞周期の制御と協調して起こるためには、APC/サイクロソームによるユビキチン化の制御とCut1-Cut2複合体の役割を理解することが重要であった。APC/サイクロソームの変異体はことごとく、M期中期から後期にかけての欠損を示すが、この性質を利用して新たなAPC/サイクロソームサブユニットを発見した。これらは、Cut20, Cut23, APC10である。Cut23は興味深いことに、ユビキチン化に依存した分解がM期中期から後期にかけておこる。APCサイクロソームサブユニットのどれもが、アミノ酸配列のレベルで高度に類似したものが高等動物においても見出された。この一連の研究は三つのレビューにおいて解説した (Yanagida, 1998; Yanagida et al., 1999; Yanagida, 2000)。

Cut1-Cut2 (セパリン-セキュリン) 複合体の分子機能の解明

我々が分裂酵母において見出したCut1-Cut2複合体が染色分配に重要であることは、まずヒト細胞でもハーバード大学医学部のKirshner研究室において、PTTGというがん抑制遺伝子がCut1に類似したタンパク質と結合すること、PTTGとCut2の配列に相同性はほとんどないものの、破壊ボックスの位置や電荷の分布の類似性が明らかとなった。酵母からヒトまでCut2/Pds1/PTTG/セキュリンを通じて染色体分配の起動メカニズムの類似性が明らかになり、このセキュリン-セパリン複合体の担う、具体的な分子メカニズムの研究に関心が向かっている。我々は、Cut1分子が細胞内で細胞質及びM期のスピンドル極体、及びスピンドルに局在することを見出した (Current Biology, 1998に公表)。さらに、スピンドル局在がM期の後期において続行することから、Cut1がスピンドル機能に深く関わることを示した。一方で、Cut1は種々の遺伝子及びシグナル伝達系因子と強く相互作用することを見出しており、これらの遺伝子群との関係からCut1の機能を明らかに

したい。

DNA損傷・複製チェックポイントの研究

染色体の動態を理解するための一環として、損傷チェックポイントの研究を行ってきた。目的は染色体分配の機構にこのようなDNA損傷チェックポイント制御がかかわるのではないか、という期待があったからである。複製チェックポイントに必須なCut5タンパク質と相互作用するタンパクCrb2を同定した (Saka et al., *Genes & Development*, 1997)。このCrb2タンパク質は損傷チェックポイントに必須で、M期において高度にリン酸化した。実際Cdc2キナーゼによってリン酸化され、それがチェックポイントを脱出するのに必須であることを最近示すことができた (Mol.Cell誌に公表、Esashi and Yanagida,1999)。このCrb2タンパク質はがん抑制遺伝子であるBRCA1と大変似ており、欠失株の中で染色体分配異常が高頻度で起こるので、大変興味深い。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Esashi, F., Yanagida, M. Cdc2 Phosphorylation of Crb2 Is Required for Reestablishing Cell Cycle Progression after the Damage Checkpoint. *Molecular Cell*. 4:167-174(1999)
- Goshima, G., Saitoh, S., Yanagida, M. Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation. *Genes & Development*. 13:1664-1677(1999)
- Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K., Yanagida, M. Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes & Development*. 13:2271-2283(1999)
- Yamashita, Y.M., Nakaseko, Y., Kumada, K., Nakagawa, T., Yanagida, M. Fission yeast APC/cyclosome subunits, Cut20/Apc4 and Cut23/Apc8, in regulating metaphase-anaphase progression and cellular stress responses. *Genes to Cells*.4:445-463(1999)
- Yanagida, M., Yamashita, Y. M., Tatebe, H., Ishii, K., Kumada, K., Nakaseko, Y. Control of metaphase-anaphase progression by proteolysis: cyclosome function regulated by the protein kinase A pathway, ubiquitination and localization. *Philosophical Transactions of the Royal Society*.354:1559-1570(1999)
- Yanagida, M. From Phage to Chromosome Biology: A Personal Account. *J. Mol. Biol.* 293:181-185(1999)
- Machida, M., Yamazaki, S., Kunihiro, S., Tanaka, T., Kushida, N., Haikawa, Y., Yamazaki, J., Yamamoto, S., Sekine, M., Oguchi, A., Nagai, Y., Sakai, M., Aoki, K., Ogura, K., Kudoh, Y., Kikuchi, H., Zhang, Michael Q., Yanagida, M. A38kb segment containing the cdc2 gene from the left arm of fission yeast chromosome II: sequence analysis and characterization of the genomic DNA and cDNAs encoded on the

- segment. *Yeast*. 16:71-80(2000)
- Yanagida, M. Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; Roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes to Cells*. 5:1-8(2000)
 - Goshima, G. , Yanagida, M. Establishing Biorientation Occurs with Precocious Separation of the Sister Kinetochores, but Not the Arms, in the Early Spindle of Budding Yeast. *Cell*. 100:619-633(2000)