

## 8.

# 染色体DNAの合着・凝縮・分配を制御する超分子複合体

柳田 充弘

京都大学生命科学研究科 遺伝機構学

研究開始時点での研究目標は以下のようなものであった。ゲノム維持と染色体伝達は細胞周期制御と深く関わるので、これらは統合して理解されるべきである。子孫細胞への染色体の不正確な伝達は、がんや多くの先天性疾病を引き起こすことから、染色体制御機構の理解は大きな意義がある。本研究では、真核細胞において普遍的に保存される有糸分裂期（M期）におこる染色体の子孫細胞への分配がいかに空間、時間的に協調して正確に起こるか、制御機構を明らかにしたい。そのために、染色体分配を制御している因子としてわれわれが見いだした必須分子の研究を推進する。興味深いことにそれぞれが分子複合体のサブユニットとして存在していた。細胞周期のステージ特異的にユビキチン依存的なタンパク質分解を誘導する20Sサイクロソーム/APC、タンパク質の脱リン酸化ホロ酵素、染色体分配に必須なCut1-Cut2（セキュリン—セパリン）複合体、染色体凝縮をおこすSMC複合体であるコンデンシン、動原体クロマチンと特異的に結合するMis6分子集合体、複製および損傷チェックポイントに必須なCut5-Crb2-Chk1複合体などであった。これらがなぜ複合体として存在しているのかを明らかにすべく研究を進めたい。これらを深くかつ統合的に研究するなら、真核細胞制御に新しい概念と天地をもたらすであろう。以下に研究成果を要約する。

### 中期後期遷移：APC/cyclosomeとセキュリン—セパリン複合体

染色体の分配を起動する分裂酵母遺伝子産物Cut 2 タンパク質の分解が分配に必須であり、もしも分解しないと染色体分配が起動しないことを証明した（8）。さらに分解にはポリユビキチン化が必須で、その機構は破壊ボックスを必要とするが（11）、B型サイクリンの破壊ボックスでも代用出来ることを示した。これらの結果は細胞周期と染色体分配のカップリングがサイクリンとCut 2 タンパク質の細胞周期ステージ特異的な分解に依存していることを明解に示した極めて意義深いものである。Cut 2 タンパク質が染色体分配の制御において中心的な役割を果たすことが確定した。

Cut2タンパク質は進化的に保存され、ヒトにもあり（PTTGという）現在は総称してセキュリンと呼ばれている。Cut2がCut1タンパク質と複合体を作っていることも証明した。Cut1とCut2の機能的な深い相互関連は1990年Uzawa et alがしめしたが、これらが安定に複合体を形成することもわれわれの研究が最初に示したものである（10）。その後Cut1タンパク質がプロテアーゼであるというF.UhlmannとK. Nasmythの重要な発見があり、Cut 2 の阻害因子としての生理的意義も別のグループにより試験管内反応として証明された。Cut 2 の分解によってCut1の活性化が起こり、標的であるコヒーシン複合体サブユニットの一つを分解して（34）、染色体分配の起動が可能となる、これが現在到達しているモデルである（5は総説）。

今日Cut1の出芽酵母ホモログであるEsp1が染色体の合着に必須であるコヒーシンサブユニットに対するプロテアーゼ活性があることを証明した研究により、Esp1/Cut1ホモログは総称してセパレーズと呼ばれている。セキュリン—セパレーズ複合体は分裂酵母においてスピンドルに蓄積しており（13）、そのこととコヒーシンを基質とすることの関係が不明であったが、出芽酵母でも複合体が主と

してスピンドルにあることが明らかとなりさらに、スピンドルやキネトコアに基質があることも判明し、セキュリン—セパレーズ複合体の細胞周期進行にともなう活性制御は広範な基質を対象にしていることが判明してきた。

Cut 2 / セキュリンの分解に必要なポリユビキチン化を行うのが20Sのサイクロソーム/APC複合体である。これらは12種のサブユニットからなり、どれが欠けてもM期の中期・後期遷移が起こらないことが判明している (9、12)。20SサイクロソームのアセンブリーはサブユニットCut 4 やCut 9 の欠失下では起こらないが、この時タンパク質キナーゼPKAを減少させるとアセンブリーが起こることを見いだした (9、14)。PKAパスウェーがサイクロソームの活性化を通じて細胞周期のM期中期後期進行を負に制御していることが示した。培地中に環状AMPをいれるとアセンブリーが阻害される。

Cut 8 タンパク質の機能についても重要な進展があった。Cut8タンパク質は26Sプロテアソーム(ユビキチン化タンパク質を分解する)の細胞内局在を決定する因子であった (15)。cut 8 変異体では核内にあるプロテアソームがほとんど失われて、細胞質にいつてしまう。その結果cut 2 / セキュリンとサイクリンの分解が著しく遅延し、染色体の分配異常が起こる (15)。Cut 8 タンパク質はプロテアソームの細胞内局在を決定する因子として始めてのものであることで、関心を持たれている。Cut8タンパク質の分子的な機能は核孔に相互作用してプロテアソームの選択的核内移行を高めることを示唆するデータがある。

### スピンドル装置、スピンドルダイナミックス、核構造関係

本研究の過程でGFP標識した動原体DNAを観察することが米国のAndrew Murray研との共同研究で可能となった (17、19)。高感度での顕微鏡観察により、またスピンドル極体やスピンドル微小管の標識を併用することから、生細胞でこれらの構造体の動的な変化を追求できるようになった。その結果、分裂酵母のM期にphase 1 (prophaseに相当)、phase 2 (prometaphase-metaphaseに相当) と phase 3 (anaphase AとBに相当) の三つの時期が定まった時間で存在することが判明した。dis1変異体ではphase1のみが延長していること、その原因が動原体微小管の異常であることも明らかとなった (20)。Dis1タンパク質が動原体と結合し、さらに動原体微小管とも結合していることを見いだした (20)。Dis1のキネトコアと動原体微小管先端での働きは大変興味深く、現在これと安定に結合するタンパク質を同定しようとしている。

Cut17変異はM期での染色体分配異常のみならず、許容温度で紫外線やDNA合成阻害剤に超感受性を示すので、DNA合着因子ではないかと予想したが、実際には異なって既に部分的に調べられていたBir1/Pbh1であった (21)。ほ乳類のsurvivinと類似して、パッセンジャータンパクのような挙動を示し、auroraキナーゼ局在に必須なことが線虫で示されていた。Cut17/Bir1は染色体凝縮、スピンドル伸長そして意外なことにDNA損傷修復に必須なことが判明した。さらに新規の発見として、興味深いことに、これがM期でキネトコアに存在するためには染色体の合着が必須であった。染色体の合着を必須とするタンパク質局在はこれが初めての例である。染色体の構築異常と核内の物理的環境の異常の2点で分離されたcrml1変異 (1989年に公表) がタンパク質の核外排出機能の欠失によることが、西田栄介研究室によって見いだされた。この研究の過程でわれわれの研究グループも実験面でのサポートやリエジェントの提供などで協力し共同研究を行った (16)。

### 動原体の機能複合体

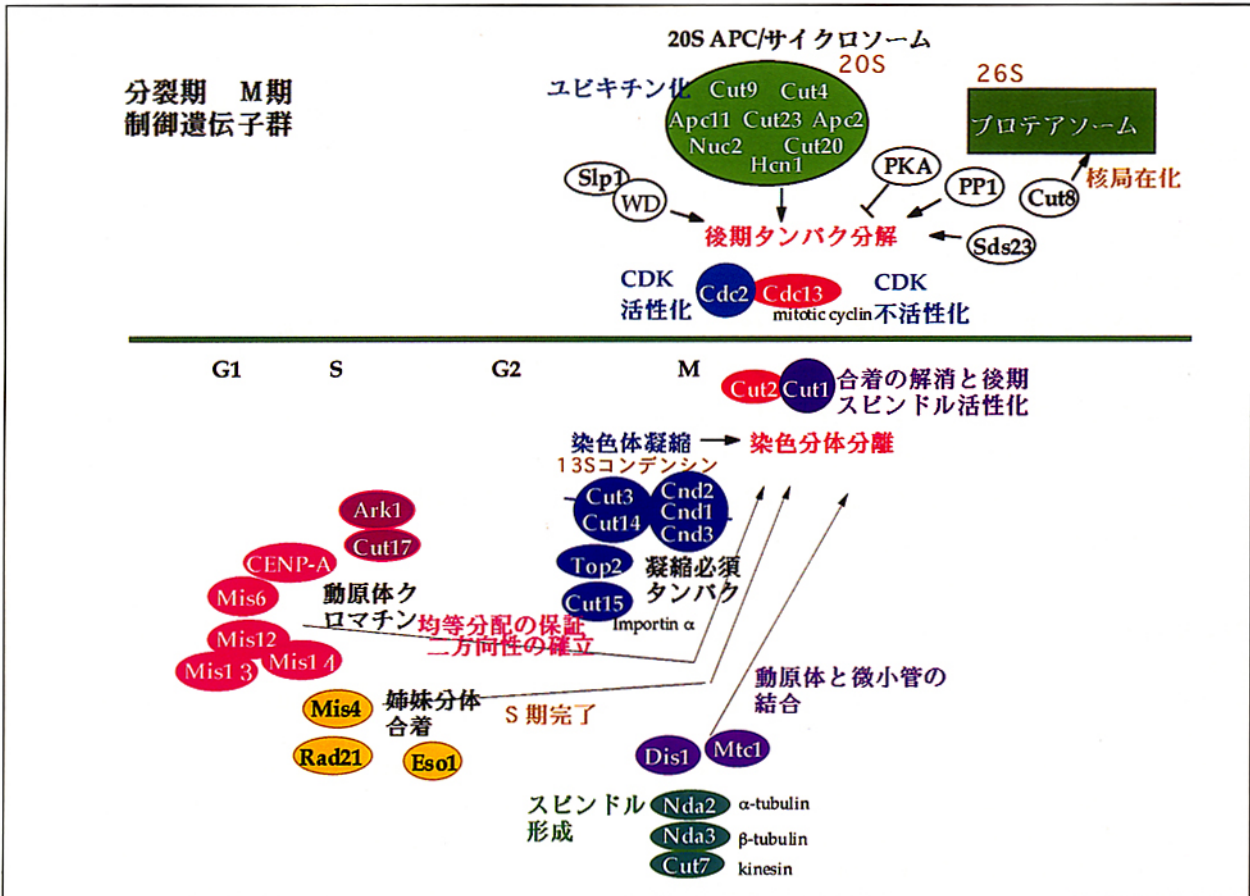
分裂酵母の動原体 (キネトコア) のタンパク質遺伝子の変異は染色体分配の正確さと細胞周期過程

で分配が起こるタイミングに影響を与える。分裂酵母の動原体は巨大であること（出芽酵母のそれと比較して）そして、分裂酵母の動原体構造は二つの主たるドメイン、すなわち中央ドメインと外側の反復ドメインからなることをわれわれは既に示していた。ちなみに高等生物の動原体でも同様な2ドメイン構造を考える研究者が最近でてきている。M期の前中期になると、動原体部位にキネトコア微小管が結合するようになる。その正確な部位は長らく不明であったが、動原体微小管タンパク質Dis1は中央ドメインに局在することが明らかとなった（20）。中央ドメインが必須というミニ染色体の安定性の解析の結果とも良く合う。

研究申請の段階では、動原体機能に必要なMis6タンパクの理解を押し進めることを課題としたが、その後Mis12およびCENP-Aに類似したCnp1を新たに発見し、これらについても著しい研究の進展があった。Mis6が失われると、姉妹動原体がM期において正確にスピンドル両極に対峙しなくなり、その結果いわゆる動原体の二方向性が失われるようになる。これを原因として分配の正確さが失われるのではないかと報告した（22）。Mis6タンパク質は中央ドメインにあり、外側の反復ドメインに全くなかった。動原体の2ドメイン構造が塩基配列やクロマチン構造（球菌nuclease消化実験）のみならず、特異的タンパク質の局在としても証明された。Mis6の細胞周期におけるクロマチンへの作用時期はG1/S期であった。またMis6に類似したヒトのホモログの存在も報告した。遺伝研の深川らは最近ニワトリのMis6タンパク質を同定してその動原体局在を明確に示した。

次いで、Mis12が同様に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（23）。Mis12もMis6同様に中央ドメインに局在して、特有のクロマチン構造の形成に必要であった。Mis12の欠損した変異体細胞では中期のスピンド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。さらに最近ヒトにもあることが明らかとなった（五島、未発表）。出芽酵母のホモログMtw1の配列を出発点として、このタンパク質が出芽酵母でいかに振る舞うかを調べた。まず局在は予想通り動原体DNAに結合した。しかし局在を調べると最初はスピンドル極体と同一と錯覚を感じるほどで、ほとんどの細胞でふたつに分離していた。しかし、既知のスピンドル極体タンパク質であるγチューブリンとは確実に異なるので、極体にはない。どのような状況がおきているのか詳細に調べ、出芽酵母の動原体の挙動について予想してない結論に至った（詳しくは24、26を参照）。内容をかいつまんで述べると、出芽酵母の姉妹動原体DNAは複製直後に分離して（しかし腕部DNAは合着している）その後もずっと別れたままになっていた（26参照）。なぜこのような時期尚早に動原体は分離してしまったのか。説明としては動原体DNAが微小管と早い時期に固定的に結合してそのままM期までその状態で進行すると考えるのが一番わかりやすい（24）。実際動原体よりすこし離れたところにある、腕部のDNAはM期後期開始時点まで合着していた。簡単にいえば、腕部の合着が動原体の2方向性を保っているというのが、この例外的に特殊な出芽酵母の動原体の特徴である。

ヒストンH3と高度に類似した動原体特異的ヒストン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を作ったところ、染色体の異常分配が起こり、その表現型は*mis6*、*mis12*変異体と酷似した。出芽酵母の*cse4*変異のチェックポイント停止の表現型とは著しく異なった。また重要な観察として*cnp1*変異体では、*mis6*、*mis12*変異体と同様に動原体中央ドメインに特異的クロマチン構造が失われていた。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る（25）。CENP-Aが動原体特異的なヌクレオソームを形成しても、動原体クロマチンにloadされる



ためには、さらにMis6タンパク質が必要である。Mis6タンパク質は他の動原体タンパク質と複合体を形成している。

### 染色体凝縮と合着関係複合体

1986年にcut3、cut14変異体として分離し、94年に変異体で染色体凝縮欠損があることを示し、遺伝子産物も同定したCut3、Cut14タンパク質複合体の追求は本研究の中心的課題であった。研究申請時には必須な5つのコンデンシンサブユニットのうち、SMCサブユニットであるCut3、Cut14のみについて研究が行なわれていた。(SMCとは両端が球状で中央がコイルドコイルで、さらに中央付近にヒンジのあるタンパクの総称。コンデンシンやコヒーシンに含まれる)。Cut3-Cut14ヘテロ2量体の複合体が一本鎖DNAを二重鎖にする強力な再生活性を有することを報告した(30)。この活性は変異体タンパクでは失われていたので、染色体凝縮に深くかかわる可能性がある。さらにコヒーシンSMC複合体では、DNA再生反応が起きないので、この考えをサポートしている。

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、これらをクローン化しそれらの性状について解析を行なった。コンデンシン5量体のうちSMCでない3つのサブユニットをそれぞれ、Cnd1、Cnd2、Cnd3と名付けた。どれも生存に必須で、遺伝子破壊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(33)。SMC変異体で見られる凝縮欠損の表現型とよく似ていた。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かの研究を行った。その結果、複合体はCut3サブユニットの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

となった。リン酸化部位をアラニン変異体にする、コンデンシンはM期においても細胞質にとどまり、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。現在、コンデンシンについては構造生物学的な研究が京大竹安研究室との共同研究で進行している。またコンデンシンの間期機能、DNA修復機能やチェックポイントとの関わりを明らかにしつつある。

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、研究を進める過程でインポーチン $\alpha$ のホモログであるCut15がやはり染色体凝縮に必須であることを見出した。(31)。

DNA複製後の染色体は、姉妹染色分体が何らかの形で結合している。Mis4が姉妹染色分体の合着に必須なタンパク質であり、コヒーシン複合体のloaderであることを見出した(32)。姉妹染色分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Rad21のごく一部が切断すること、この切断が必須であるという結果を得ている(34)。

## 論文リスト

### 総説

1. Nakaseko, Y., Yanagida, M. A telomerase mutant defective in sister chromatid separation at mitosis. **BioEssays**. 19: 557-559(1997)
2. Yanagida, M. Fission yeast cut mutations revisited: control of anaphase. **Trends in Cell Biol.** 8: 144-149(1998)
3. 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. **Phil Trans Royal Society**. 354: 1559-1570(1999)
4. Yanagida, M. From Phage to Chromosome Biology: A Personal Account. **J. Mol. Biol.** 293: 181-185(1999)
5. Yanagida, M. Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; Roles of Cut1/separin and Cut2/securin. **Genes to Cells**. 5:1-8(2000)
6. Takahashi, K., Yanagida, M. Replication Meets Cohesion. **Science**. 289: 735-736(2000)
7. Nakaseko, Y., Yanagida, M. Cytoskeleton in the cell cycle. **Nature** 412:291-292. (2001)

### 中期後期遷移：APC/cyclosomeとセキュリン—セパリン複合体関係

8. Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., Yanagida, M. Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. **Nature**. 381: 438-441(1996)
9. Yamashita, Y., Nakaseko, Y., Samejima, I., Kumada, K., Yamada, H., Michaelson, D., Yanagida, M. 20S cyclosome complex formation and proteolytic activity inhibited by the cAMP/PKA pathway. **Nature**. 384: 276-279(1996)
10. Funabiki, H., Kumada, K., and Yanagida, M. Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. **EMBO J** 15, 6617-6628. (1996)
11. Funabiki, H., Yamano, H., Nagao, K., Tanaka, H., Yasuda, H., Hunt, T., Yanagida, M. Fission yeast Cut2 required for anaphase has two destruction boxes. **EMBO J**.16: 5977-5987(1997)
12. Yamada, H., Kumada, K., Yanagida, M. Distinct subunit functions and cellcycle regulated phosphorylation of 20S APC/cyclosome required for anaphase in fission yeast. **J Cell Sci**. 11: 1793-1084(1997)
13. Kumada, K., Nakamura, T., Nagao, K., Funabiki, H., Nakagawa, T., Yanagida, M. Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. **Current Biology**. 8: 633-641(1998)
14. 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)
15. Tatebe, H., Yanagida, M. Cut8, essential for anaphase, controls localization of 26S proteasome, facilitating destruction of cyclin and Cut2. **Current Biology**. 10: 1329-1338(2000)

## スピンドル装置、スピンドルダイナミックス、核構造関係

16. Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., Nishida, E. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the unclear export signal. **Nature**. 390: 308-311(1997)
17. Nabeshima, K., Nakagawa, T., Straight, A. F., Murray, A., Chikashige, Y., Yamashita, Y. M., Hiraoka, Y., Yanagida, M. Dynamics of Centromeres during Metaphase-Anaphase Transition in Fission Yeast: Dis1 Is Implicated in Force Balance in Metaphase Bipolar Spindle. **Mol Biol Cell**. 9: 3211-3225(1998)
18. Kondoh, H., Yuasa, T., Yanagida, M. Mis3 with a conserved RNA binding motif is essential for ribosome biogenesis and implicated in the start of cell growth and S phase checkpoint. **Genes to Cells**. 5: 525-541(2000)
19. Tatebe, H., Goshima, G., Takeda, K., Nakagawa, T., Kinoshita, K., Yanagida, M. Fission yeast living mitosis visualized by GFP-tagged gene products. **Micron**. 32: 67-74(2001)
20. Nakaseko, Y., Goshima, G., Morishita, J., Yanagida, M. M phase-specific kinetochore proteins in fission yeast: Microtubule-associating Dis1 and Mtcl1 display rapid separation and segregation during anaphase. **Current Biology**. 11:537-549(2001)
21. Morishita, J., Yanagida, M. Bir1/Cut17 moving from chromosome to spindle upon the loss of cohesion is required for condensation, spindle elongation and repair. **Genes to Cells**. 6:743-763(2001)

## 動原体関係

22. Saitoh, S., Takahashi, K., Yanagida, M. Mis6, a Fission Yeast Inner Centromere Protein, Acts during G1/S and Forms Specialized Chromatin Required for Equal Segregation. **Cell**. 90: 131-143(1997)
23. 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)
24. 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)
25. Takahashi, K., Chen, E.S., Yanagida, M. Requirement of Mis6 Centromere Connector for Localizing a CENP-A-Like Protein in Fission Yeast. **Science**. 288: 2215-2219 (2000)
26. Goshima, G., Yanagida, M. Time course analysis of precocious separation of sister centromeres in budding yeast: continuously separated or frequently reassociated? **Genes to Cells**. 6:765-773 (2001)

## DNAチェックポイント関係

27. Saka, Y., Esashi, F., Matsusaka, T., Mochida, S., Yanagida, M. Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif, with Cut5 and Chk1. **Genes & Development**. 11: 3387-3400 (1997)
28. 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)
29. Esashi, F., Mochida, S., Matsusaka, T., Obara, T., Ogawa, A., Tamai, K., Yanagida, M. (2000). Establishment of and recovery from damage checkpoint requires sequential interactions of Crb2 with protein kinases Rad3, Chk1, and Cdc2. **Cold Spr Harb Symp Quant Biol**. 65: 443-449. (2001)

## 染色体凝縮と合着

30. Sutani, T., Yanagida, M. DNA renaturation activity of the SMC complex implicated in chromosome condensation. **Nature**. 388: 798-801(1997)
31. Matsusaka, T., Imamoto, N., Yoneda, Y., Yanagida, M. Mutations in fission yeast Cut15, an importin  $\alpha$  homolog, lead to mitotic progression without chromosome condensation. **Current Biology**. 8: 1031-1034, S1-2(1998)
32. Furuya, K., Takahashi, K., Yanagida, M. Faithful anaphase is ensured by Mis4, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase. **Genes & Development**. 12: 3408-3418(1998)
33. 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)
34. Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Yuasa, T., Sutani, T., Kearsey, S. E., Uhlmann, F., Nasmyth, K., Yanagida, M. Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. **Genes & Development**. 14: 2757-2770(2000)