

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660055

研究課題名(和文)核形態チェックポイント：核形態異常によりもたらされる核分配停止機構の解明

研究課題名(英文)Nuclear morphology checkpoint: analysis of the nuclear division arrest caused

研究代表者

井上 善晴 (Yoshiharu, Inoue)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70203263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メチルグリオキサール(MG)は解糖系から派生する。出芽酵母をMGで処理すると核分配が阻害された。このとき、ホスファチジルイノシトール3,5-ビスリン酸(PI(3,5)P2)レベルが上昇し、液胞の肥大化と核形態変化が起こった。Fig4やVac14欠損株ではMG処理によるPI(3,5)P2レベルの上昇が起こらず、核分配阻害も起こらなかった。また、PI(3,5)P2結合タンパク質Atg18はMG処理により液胞膜に蓄積し、Atg18欠損株ではMGによる核分配阻害が起こらなかった。一方、MG処理によりDNA損傷チェックポイントが活性化され、コヒーシンの分解と姉妹染色分体の分離が阻害された。

研究成果の概要(英文)：Methylglyoxal (MG) is derived from glycolysis. We found that MG inhibited the nuclear division in yeast. MG treatment changed yeast vacuole to a single enlarged shape, which altered the nuclear morphology to one with a central depression aligned with the mother-bud axis, which we referred to as a “jellybean-like shape” nucleus. We showed that the levels of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P2) were increased with MG treatment. PI(3,5)P2 levels did not increase in mutants defective in Fig4 or Vac14 following treatment with MG, and these mutants did not show the MG-induced nuclear division arrest. Atg18, a PI(3,5)P2-binding protein, was enriched on the vacuolar membrane with MG treatment, and the deletion of ATG18 suppressed the inhibitory effect of MG on nuclear division. We showed that MG activated the DNA damage checkpoint. Degradation of cohesin was inhibited in the presence of MG, which indicated that sister chromatid segregation was stalled.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：メチルグリオキサール 酵母 核分裂 ホスファチジルイノシトール3.5-ビスリン酸 核形態 液胞 DNA損傷チェックポイント

1. 研究開始当初の背景

核の分配は、ゲノムを次世代に継承するという、生物にとって極めて重要なステップであることから、厳密に制御される必要がある。高等真核生物では、核分裂の際に核膜が消失する。これに対し酵母では、細胞周期を通して核膜は消失しない (closed mitosis)。酵母の核分裂では、微小管形成中心であるスピンドル極体 (SPB) (酵母における中心体) が S 期に複製され、両 SPB から核内に向けて伸びた微小管 (動原体微小管: スピンドル) が動原体に結合し、染色分体を互いに反対方向に引っ張る張力を発生させる。一方、SPB から細胞質側へ伸びた星状体微小管は、最終的に母細胞側と娘細胞側で両 SPB を引き離すような張力を生じさせ、SPB を対極へと移動させる。Closed mitosis を行う酵母では、SPB は核膜に埋まり込んでいるため、SPB の動きにつれて核が伸張する。酵母において核形態が変化するのは、唯一このときだけであり、核分裂期以外で、核の形態が変化するという現象はこれまで報告されていない。ミトコンドリアや液胞などの他のオルガネラの形態が、環境ストレスや栄養状態によってダイナミックに変化するのとは対照的である。

私は、解糖系から派生する 2-オキソアルデヒドである代謝性のストレス因子メチルグリオキサール (MG) の生理機能を解析する過程で、MG は酵母の核形態をジェリービーンズのように扁平に変形させることを発見した。さらに、このような細胞では、bud (娘細胞) が十分成長しているにもかかわらず、核が娘細胞に分配されていなかった。しかもこのとき、核は必ず bud neck 近傍に局在し、しかも成長軸に対して垂直に扁平していた。複製された 2 つの SPB は成長軸 (スピンドルオリエンテーション) に沿って整列していたことから、成長軸は正常であることがわかる。さらに、核以外のオルガネラ (ミトコンドリア、液胞、小胞体など) は MG 存在下でも正しく bud 内へ輸送されていたことから、核を含むオルガネラ全般の輸送に関わるアクチンケーブルや Myo2 の形成や機能は正常であると考えられる。これらの事実は、核の形態変化が核分配の停止とリンクしている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点について検討することで、MG による核分配阻害のメカニズムを明らかにすることを目的とした。すなわち、MG 存在下で核形態がジェリービーンズのような形態に変化する際の応力の発生機構と、それに関わる因子の同定、ならびにそれらの因子の欠損株における MG 存在下での核分配を明らかにする。また、MG が核分裂マシナリーに及ぼす影響を明らかにする。

これらの解析を通して、核形態と核分配との相関性に関する基礎的な知見の集積を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 核染色ならびにオルガネラの形態観察

核 DNA、ならびに核を含むオルガネラの形態は、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。核 DNA は Hoechst 33342 を用いて染色した。液胞は FM4-64 を用いて染色した。核形態は Nup116-GFP を用いて観察した。

(2) 核分配

Hoechst 33342 で核を染色した後、娘細胞が母細胞の 2/3 以上の大きさに出芽している細胞をカウントし、そのとき核分配が起こっていない細胞の割合を算出した。1 回の観察につき 100 個以上の細胞をカウントした。

(3) ホスファチジルイノシトールの定量

myo-[2-³H]イノシトールを含む最少培地で酵母を 20 時間培養し、MG を添加してさらに 1 時間培養した。既報 (Methods, 20, 465-473, 2000) に従いホスファチジルイノシトールを抽出し、メチルアミンで脱アシル化した後、HPLC でイノシトールリン酸を分取し、放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

(4) DNA 損傷チェックポイントの活性化の検討

Chk1 ならびに Pds1 のリン酸化は、それぞれ遺伝子に HA タグを付加した株を用い、ウエスタンブロッティングにおけるバンドシフトで観察した。また、コヒーシンの切断は、コヒーシンサブユニットの一つである Scc1 に HA タグを付加した株を用い、セパラーゼによる Scc1 切断断片をウエスタンブロッティングで検出した。

4. 研究成果

(1) 細胞内 MG 濃度と核形態変化の相関性

MG 処理による核形態変化が、細胞内 MG レベルの上昇によりもたらされるのか、あるいは細胞外 MG が何らかのシグナル伝達経路を活性化することで引き起こされるのかについて検討するため、MG を代謝する酵素が欠損した変異株 (*glo1Δgre2Δgre3Δ*) に対して、細胞に取り込まれて非酵素的に MG に変換されるジヒドロキシアセトン (DHA) を添加することで検討を行った。その結果、DHA 処理によっても、MG の場合と同様にジェリービーンズ型核形態変化が観察され、核分配が阻害された (図 1)。このことから、細胞内 MG レベルの上昇が、核形態変化ならびに核分配阻害を引き起こしていると考えられた。

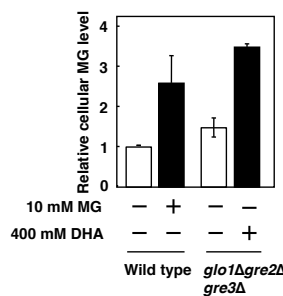


図 1. DHA による核分配阻害

(2) 核形態変化を引き起こす応力としての液胞形態

核形態に影響を与える応力を発生させる可能性のある要因として、液胞形態に着目した。液胞は NVJ (nucleus-vacuole junction) を介して核と接触していることから、NVJ を形成する Nvj1 と Vac8 をそれぞれ欠損させた株について核形態を観察したところ、Nvj1 欠損株では野生株と同じように MG により核形態変化と核分配阻害が起こったが、Vac8 欠損株ではこれらの表現型がやや抑制された (図 2A)。このとき、液胞の形態を観察すると、Vac8 欠損株では液胞が若干シュリンクした形態をしていた (図 2B)。MG 処理により液胞が融合し、一つの大きな液胞に変化していた。このことが、核形態を変化させる応力を発生させている可能性が考えられたので、液胞融合に関与する HOPS 複合体のうち、Vps41 ならびに液胞膜の t-SNARE の Vam3 が欠損した株について、液胞形態と核形態、ならびに核分裂について検討を行った。その結果、液胞の融合ができないこれらの株では、MG 処理でも液胞の融合 (肥大化) は観察されず、ジェリービーンズ型核形態変化、ならびに核分配阻害は観察されなかった (図 2C)。従って、MG による核形態変化は液胞が肥大化することが応力となっていることが明らかとなった。

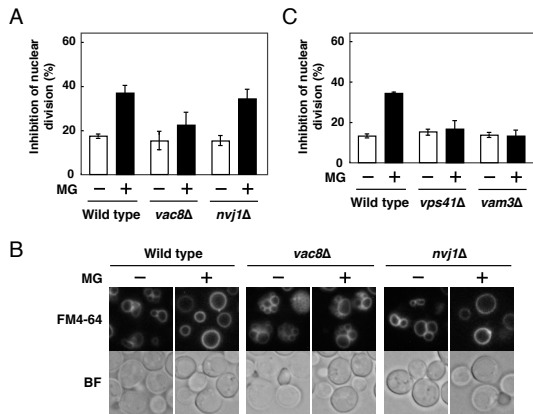


図 2. 液胞形態が核分配に及ぼす影響

(3) MG とホスファチジルイノシトール代謝

MG 処理によって起こる液胞の肥大化が核形態を変化させる要因であることを明らかになったことから、液胞の融合などに関与するホスファチジルイノシトール代謝に及ぼす MG の影響について検討を行った。その結果、MG 処理によりホスファチジルイノシトール 3,5-ビスリン酸 (PI(3,5)P₂) レベルが上昇することを見いだした。PI(3,5)P₂ 合成に関与する Fab1 複合体の構成因子の一つである Fig4 の欠損株では、MG 処理により PI(3,5)P₂ レベルが上昇しなかった。Fig4 欠損株は MG 処理をしない状態でも肥大化した液胞形態を示すにもかかわらず、MG 処理による核分配の停止が起こらなかった。さらに、別の Fab1 複合体の構成因子である Vac14 の欠損

株では、PI(3,5)P₂ がほとんど検出されず、また肥大化した液胞を持つにもかかわらず、MG 処理による核分配停止が起こらなかった。これらのことから、MG 処理により PI(3,5)P₂ レベルが上昇することが、核分配停止と関連すると考えられた。

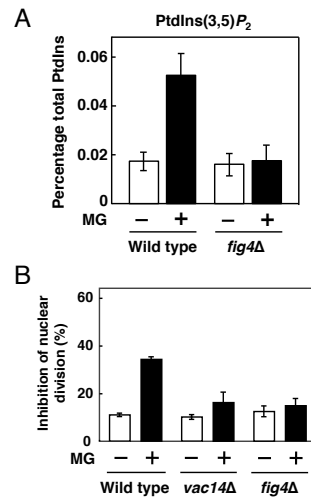


図 3. PI(3,5)P₂ レベルと核分配阻害

(4) 核分配阻害における Atg18 の関与

MG によって PI(3,5)P₂ レベルが上昇することが核分配阻害と関連したことから、*S. cerevisiae* においてこれまでに報告されている PI(3,5)P₂ 結合タンパク質 (Atg18、Atg21、Hsv2、Ent3/5、Tup1) と MG による核分配阻害との関係について解析を行った。その結果、Atg18 欠損株では MG 処理により液胞の肥大化が起こっても核分配阻害は起こらなかった (図 4A)。また、Atg18-GFP を用いて局在性を観察したところ、MG 処理により液胞膜に Atg18-GFP が蓄積することが分かった (図 4B)。Fig4 や Vac14 が欠損した株では、MG 処理による Atg18-GFP の液胞膜局在は観察されなかった。これらのことから、MG 処理により液胞膜での PI(3,5)P₂ レベルが上昇し、PI(3,5)P₂ 結合タンパク質である Atg18 が液胞膜に局在することが、核分配停止のための必要条件であると考えられた。

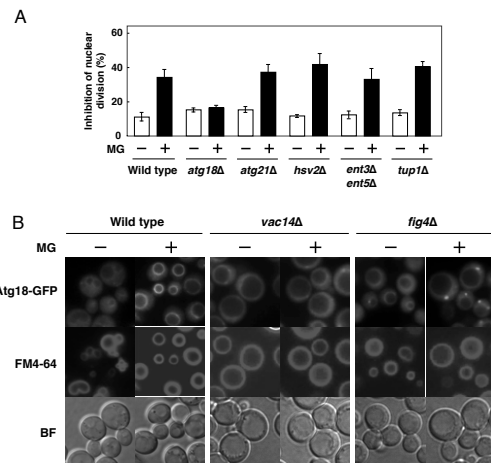


図 4. MG による核分配阻害における Atg18 の役割

(5) MG による DNA 損傷チェックポイントの活性化と核分裂阻害

MG による核分配阻害の分子機構を明らかにすることを目的として、染色体分配に関わるマシナリーへの影響の観点から検討を行った。その結果、*S. cerevisiae* のチェックポイントキナーゼの一つである Chk1 (図 5A)、ならび Chk1 によりリン酸化されるセキュリン (Pds1) (図 5B) のリン酸化が亢進した。また、ヒドロキシウレア処理で細胞周期を S 期で停止させた後、MG を含む培地と含まない培地にリリースした後のコヒーシンの分解について検討した。コヒーシンは、姉妹染色分体を核分裂が起きるまでつなぎ止めておく役割を担う。その結果、MG を含む培地にリリースすると、コヒーシンサブユニットの一つである Scc1 の切断が阻害された(図 6)。すなわち、MG 存在下では姉妹染色分体の分離が阻害されていると考えられた。これらのことから、MG 存在下では DNA 損傷チェックポイントが活性化されて姉妹染色分体の分配が阻害されており、そのことが MG により核分配が阻害される原因の一つである可能性が示唆された。

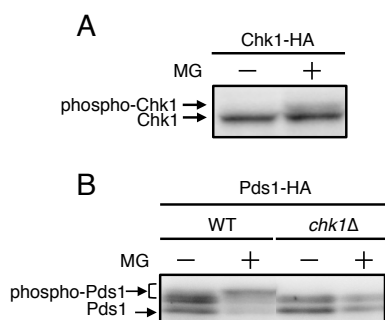


図 5. MG による Chk1 と Pds1 のリン酸化

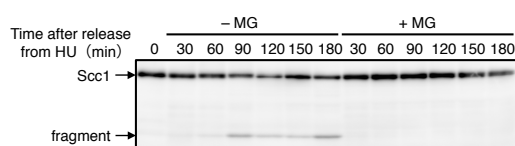


図 6. MG によるコヒーシンの切断阻害

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nomura, W, and Inoue, Y. Methylglyoxal activates target of rapamycin complex 2-protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 査読有り、Vol. 35, No. 7, 2015, pp.1269-1280
doi: 10.1128/MCB.01118-14
- ② 野村 亘、井上善晴. 代謝ストレスによる TOR シグナルの活性化. *化学と生物*, 査読有り、Vol. 54, No. 4, 2016, pp.273-279

[学会発表] (計 5 件)

- ① 野村 亘、河田照雄、井上善晴、解糖系代謝物による TORC2 シグナルの活性化、第 36 回日本分子生物学会ワークショップ (TOR ROAD-TOR への道、TOR からの道)、2013 年 12 月 5 日、神戸国際会議場 (神戸市)
- ② 野村 亘、河田照雄、井上善晴、Pkc1 の C1 領域が TORC2-Pkc1 シグナルに及ぼす影響、第 46 回酵母遺伝学フォーラム、2013 年 9 月 8 日、東北学院大学 (仙台市)
- ③ 野村 亘、河田照雄、井上善晴、TORC2-Pkc1 シグナル経路の DNA 損傷応答への関与、第 47 回酵母遺伝学フォーラム、2014 年 9 月 1~3 日、東京大学 (東京都)
- ④ 野村 亘、井上善晴、Pkc1 のリン酸化状態における turn motif の役割、第 48 回酵母遺伝学フォーラム、2015 年 8 月 31~9 月 2 日、広島大学 (広島県)
- ⑤ 塩尻敦史、野村 亘、井上善晴、メチルグリオキサールによる酵母 DNA 損傷チェックポイントの活性化、日本農芸化学会関西支部第 493 回講演会、2016 年 2 月 6 日、楽友会館 (京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 善晴 (INOUE, Yoshiharu)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：70203263

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし