

氏名	齋藤成昭
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2092号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	染色体分配あるいは核分裂の均等性を保証する機構に関する研究

(主査)

論文調査委員 教授 柳田充弘 教授 竹市雅俊 教授 西田栄介

## 論文内容の要旨

真核生物の染色体DNAはS期に複製され、M期(有糸分裂期)に娘細胞へと分配される。遺伝情報が損なわれることなく子孫に伝達されるためには、複製された染色体が有糸分裂過程で均等に分配されなければならない。本研究では、核分裂・染色体分配の均等性を保障する機構を解明することを目的とし、分裂酵母*mis 6*、*mis12*および*lsd 1*変異体の解析を進めた。

*mis 6*、*mis12*変異体は、分裂酵母動原体配列を含む人工ミニ染色体を安定に保持できず、かつ温度感受性を示す変異体として単離された。制限温度で培養すると、両変異体では染色体が不均等に分配され、姉妹核の大きさに差異が生じた。この「不均等染色体分配」表現型を*mis 6*変異体が示すには、制限温度でG1/S期を通過することが必要であった。Mis 6タンパク質はG1/S期に機能するのかもしれない。GFP融合タンパクを作製して局在を決定したところ、Mis 6は動原体領域に特異的に局在することが明らかとなった。分裂酵母動原体DNAは配列上の特徴から*cnt*、*imr*、*otr*と呼ばれる3つの領域に区別できる。免疫沈降を応用した解析の結果、Mis 6は動原体の中央に位置する*cnt*、*imr*に結合し、*otr*には結合しないことが明らかとなった。同様の解析で、Mis12もやはり動原体中央(*cnt*、*imr*)に特異的に結合することが明らかとなった。この動原体中央領域のクロマチン構造は特殊であることが知られている。両変異体を制限温度で培養すると、その動原体特異的クロマチン構造が消失した。両タンパクは動原体クロマチンの形成に必須の役割を果たしているものと思われる。免疫沈降でMis 6、Mis12と結合するタンパクを精製したところ、リボソームタンパクL7b、L13がMis 6と結合することが明らかとなった。この驚くべき結果についてはまだ議論の余地があるが、分裂酵母ではリボソームタンパクやtRNAといった一見無関係な分子が動原体クロマチンの構築に流用されているのかもしれない。また、正体は不明であるがMis12も複数のタンパクと結合して複合体を形成しているようであった。Mis 6とMis12は免疫共沈することはなく、*mis12*変異体中でもMis 6は動原体に結合していた。Mis 6とMis12は、それぞれ別の分子複合体に含まれており、独立に機能して動原体クロマチンの構築に関与するのであろう。*mis 6*変異株あるいは野生株をM期中期で停止させて、FISH法により動原体の核内配置を比較したところ、野生株では動原体は紡錘体中央に集結していたのに対し、変異株では核内に散らばっていた。変異体では時期尚早に姉妹動原体が分裂しているような像も観察された。Mis6、Mis12が構築する動原体クロマチンは、M期中期まで姉妹動原体を連結して紡錘体との両方向的結合(Bi-orientation)を保障する「コネクター」として機能するのかもしれない。

一方、*lsd 1*変異体はDAPIを用いた核染色によるスクリーニングで、*mis 6*、*mis12*変異体と類似の不均等核分裂を示す温度感受性変異体として単離された。FISH法で染色体分配の様子を調べたところ、*lsd 1*変異体では染色体は均等に分配されており、姉妹核の大きさの違いは染色体の凝縮状態の差異に起因することが明らかとなった。電子顕微鏡による詳細な表現型解析の結果、*lsd 1*変異体では、異方的な核の伸長や異常な隔壁形成、核内構造の不均等分配などが観察された。*lsd 1*変異体では染色体以外の何らかの核内構造(例えば核膜孔や核骨格)が不均等に分配され、その結果、姉妹核間で染色体の

凝縮状態に違いが生じるらしい。*lsd1*<sup>+</sup>遺伝子を単離したところ、驚いたことにそれは脂肪酸合成酵素の $\alpha$ サブユニットをコードしていた。脂肪酸を培地に添加することで*lsd1*変異は相補され、また抗生物質セルレニンによって脂肪酸合成を阻害すると野生株でも不均等核分裂が誘導された。細胞内の脂肪酸濃度が低下することで不均等核分裂が引き起こされるのだろう。同調培養の結果、脂肪酸合成の阻害はM期特異的に致死的影响を及ぼすことが明らかとなった。脂肪酸は、生体膜の原料やエネルギー貯蔵分子であるばかりでなく、核分裂の均等性を保障する上で重要な役割を担っていると思われる。

## 論文審査の結果の要旨

遺伝情報を欠落させることなく子孫へ伝達するためには、細胞周期M期において姉妹染色体が姉妹細胞へと均等に分配されることが必要不可欠である。申請者は分裂酵母Mis 6、Mis12タンパク質が染色体分配の均等性を保証するために必須であることを示した。それらが動原体特異的クロマチン構造の形成に関与していることを見だし、そのクロマチン構造が姉妹動原体を連結する「コネクター」として機能している可能性を提示した。

申請者は、*mis 6*、*mis12*変異体で観察される不均等な核分裂が、姉妹染色体の不均等分配に起因することを明らかにした。*mis 6*変異体が染色体分配異常を引き起こすためにはG1/S期を制限温度で通過することが必要となることを明らかにし、Mis 6タンパクが細胞周期G1/S期に機能している可能性を示した。

次に申請者はMis 6、Mis12タンパク質が分裂酵母動原体の中央領域へと特異的に結合していることを証明した。分裂酵母動原体へ特異的に結合するタンパクとしては、これらが最初の例である。動原体中央部のクロマチン構造が特殊化していることが知られていたが、申請者はMis 6、Mis12タンパク質がその特殊クロマチン構造の形成/維持に必須であることを明らかにした。さらに、特殊動原体クロマチン構造の崩壊した*mis 6*変異体では時期尚早な姉妹動原体分離、およびM期中期における動原体配置の異常が引き起こされることを発見した。以上の結果は、動原体クロマチン構築の分子機構および細胞周期制御を理解する上で重要な知見であり、さらに、動原体クロマチン構造が染色体均等分配保障のために果たす生体機能に関して重要な示唆を与えたといえる。

続いて申請者は、免疫沈降法を利用してMis 6、Mis12タンパク質と物理的に相互作用する因子の同定を試みた。その結果、両者は互いに独立な分子複合体に属していることを明らかにした。またMis 6とリボソーム構成サブユニットL7b、L13が結合することが明らかにした。これらの結果は、動原体クロマチン構築に複数の分子経路が関与し、さらにその分子経路にリボソーム構成因子が関与するという可能性を示しており、大変興味深い。

また申請者は、*mis 6*、*mis12*変異体と類似の不均等核分裂表現型を示す*lsd1*変異の解析を行った。その結果、*lsd1*変異体では染色体以外の何らかの核内構造が不均等分配されることが明らかにされた。*lsd1*<sup>+</sup>遺伝子は脂肪酸合成酵素をコードすることが明らかとなり、薬剤などを利用した解析から、脂肪酸濃度の低下がM期特異的に致死的影响を及ぼすことを証明した。これらの結果は、脂肪酸が核分裂の均等性を保障する重要な因子として機能していることを意味しており、脂肪酸の役割に関して斬新な可能性を提示する重要な発見である。

以上、申請論文において、染色体分配および核分裂の均等性を保障する因子が同定され、それらの分子機能について解析が進められた。得られた知見は、有糸分裂における染色体分配・核分裂を保障する分子機構の解明に大きく寄与したと考えられる。よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。