

氏名	いわさき おさむ 岩崎 治
学位(専攻分野)	博士 (生命科学)
学位記番号	生博第25号
学位授与の日付	平成17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	生命科学研究所統合生命科学専攻
学位論文題目	染色体均等分配を保障する Mis12 複合体の動原体局在化機構

論文調査委員 (主査) 教授 柳田 充弘 教授 石川 冬木 教授 松本 智裕

### 論文内容の要旨

有糸分裂において娘細胞へ染色体を均等に分配することは、遺伝情報を正確に維持するために極めて重要なプロセスである。真核生物では、セントロメアが有糸分裂期における正確な染色体分配に中心的な役割を担う。セントロメアはあらゆる染色体上に一カ所ずつ形成されるが、セントロメア特異的ヒストン H3 バリエント CENP-A がセントロメアの位置を規定していると広く考えられている。しかし、進化上高度に保存された動原体タンパク質 Mis12 は CENP-A と独立の経路で動原体に取り込まれることが、分裂酵母とヒトで示されている。Mis12 の機能欠損は、高頻度の染色体不均等分配を引き起こし致死となる。本研究では、Mis12 がどのようなメカニズムで CENP-A とは独立に動原体にロードされ、染色体均等分配に必須の機能を果たすかを知るために、分裂酵母とヒトで Mis12 と相互作用するタンパク質を同定し解析を進めた。

まず、分裂酵母 *mis12-537* 温度感受性変異体のマルチコピーサプレッサー遺伝子を取得したところ、3つの新たな動原体タンパク質 (Mis13, Mis14, Spc7) を同定した。Mis13, Mis14, Spc7 は、Mis12 と物理的に相互作用していた。*mis13-1*, *mis14-271* 温度感受性変異体では、動原体特異的クロマチン構造が消失し、高頻度の染色体不均等分配が引き起こされた。Mis12, Mis13, Mis14, Spc7 が、動原体で複合体を形成し、染色体均等分配に必須の機能を果たすと考えられる。Mis12 複合体の動原体ローディング機構について理解を深めるために、これら4つのタンパク質間の動原体局在依存性を調べた結果、Mis12, Mis14, Mis19 の動原体局在が Mis13 に依存することがわかった。逆に Mis13 の動原体局在は Mis12, Mis14 に依存しない。これらの結果は、Mis13 が Mis12, Mis14, Spc7 の上流で動原体局在化経路を規定することを示している。Mis13 は DNA と *in vitro* で結合する。そして、Mis13 の進化上保存されたアミノ末端が DNA 結合に必須であることを示した。Mis13 がセントロメア DNA と直接相互作用して、Mis12, Mis14, Spc7 を動原体にロードする可能性が示唆された。

つぎに、ヒト培養細胞で免疫沈降により hMis12 複合体を精製し、マスマスペクトロメトリーにより hMis12 複合体の構成因子を同定した結果、分裂酵母 Mis12 複合体と相同な新たな動原体複合体を単離した (分裂酵母/ヒト; Mis12/hMis12, Mis13/c200rf172, Mis14/DC8, Nnf1/PMF1, Spc7/KIAA1570)。RNAi 法を用いて c200rf172 をノックダウンすると染色体分配異常が引き起こされた。ヒトでは、分裂酵母で見つかった Mis12 複合体構成因子に加えて、動原体外層タンパク質 Zwint-1, ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 $\alpha$ ,  $\gamma$  が相互作用していた。hMis12 の複合体の構成タンパク質は動原体内部コアに局在し、すべてコイルドコイル構造を有していることから、hMis12 が長く伸びた構造をとってセントロメアヘテロクロマチン領域と動原体外層をつないでいるかもしれない。HP1 $\alpha$ ,  $\gamma$  を RNAi 法を用いてノックダウンすると、hMis12 複合体の動原体局在が消失する。HP1 $\alpha$ ,  $\gamma$  が足場となることで、CENP-A とは独立の hMis12 動原体骨格が形成される可能性について考察する。

Mis12 の機能解析を進める別のアプローチとして分裂酵母 *mis12* 変異体のサプレッサー変異 (*ekc1*, *ekc2* 変異) の解析を進めた。*ekc1*, *ekc2* 変異体の原因遺伝子をクローニングした結果、*mis12* 変異体が Ppe1/PP6 ホスファターゼの活性低

下により抑制されることがわかった。Ppe1/PP6 ホスファターゼの活性低下は、変異 Mis12 タンパク質の動原体局在を回復することで、*mis12* 変異の温度感受性を抑制していた。Ppe1/PP6 がクロマチン結合性ホスファターゼで、その変異は微小管重合阻害剤の存在下で染色体不均等分配を引き起こす。Ppe1/PP6 ホスファターゼが、Mis12 を含む動原体をリン酸化制御して、Mis12 タンパク質の動原体局在化と染色体均等分配に機能する可能性について考察する。

#### 論文審査の結果の要旨

染色体分配の研究は、遺伝情報の継承という細胞増殖の最も基本的な課題に関わるため細胞研究の主要な分野の一つである。細胞分裂における染色体分配異常は異数体を生み、癌進行の主要な要因だと考えられている。真核生物ではセントロメアが染色体均等分配の保障に中心的な役割を果たすが、なかでも CENP-A はセントロメア特異的ヒストン H3 バリエーションであることから、セントロメア特異的なヌクレオソームを形成することでセントロメアの位置を規定していると広く考えられている。それに対して、進化上高度に保存された動原体タンパク質 Mis12 は CENP-A と独立の経路で動原体に取り込まれることが分裂酵母とヒトで示されているが、Mis12 がどのようなタンパク質と相互作用し、どのようなメカニズムで動原体に取り込まれるかは不明であった。

申請者はまず分裂酵母で遺伝的スクリーニング後、免疫沈降実験をおこなうことにより、次に HeLa 細胞において hMis12 タンパク質を免疫沈降後、マスマスペクトロメトリー解析をすることにより、染色体均等分配に必須で進化上保存された 5 つのタンパク質から成る Mis12 動原体複合体が存在することを示した。これら今回同定された 4 つのタンパク質は、これまで動原体機能が報告されていない新規のタンパク質であり重要な知見である。また、これらのタンパク質の配列上の保存性と分裂酵母温度感受性変異体の変異部位の決定により、コイルドコイル構造が Mis12 複合体の機能に重要であることを示した。ヒト hMis12 が動原体外層タンパク質 Zwint-1, HEC1, ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 と相互作用していることを示したことは、hMis12 複合体が長く伸びたコイルドコイル構造をもつことで、多層構造に分かれた高等動物の動原体をタンパク質-タンパク質相互作用によってつなぐことを想像させるに十分な結果であり、動原体研究全体に大きな刺激を与えることが期待される。それに加えて、hMis12 複合体の動原体局在に HP1 が必須であることを示したことは、HP1 とセントロメアヘテロクロマチンが染色体分配に必須であることが明らかであるにもかかわらずその機能機序が不明であっただけに大きな進展であった。また、CENP-A と HP1 が独立の分子メカニズムで局在することが示されていることから、hMis12 複合体が CENP-A と独立に動原体に取り込まれるメカニズムを考える上でも重要な進展であったと考えられる。

以上より本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成17年2月2日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。