

(続紙 1 )

|   |                                  |    |       |
|---|----------------------------------|----|-------|
| 京都大学  | 博士 (生命科学)                        | 氏名 | 白岩 善治 |
| 論文題目  | 分裂酵母Mis17の解析によるセントロメア複合体の新規機能の探索 |    |       |
| (論文内容の要旨)   |                                  |    |       |
| <p>セントロメアは、細胞周期のM期において正確な染色体分配のためのキネトコア構造が構築される染色体ドメイン配列である。セントロメア特異的なクロマチン構造の形成には、セントロメアのエピジェネティックマーカーであるCENP-Aヌクレオソームの形成が必要である。分裂酵母Mis6複合体はCENP-Aヌクレオソームの形成に必要であることが分かっているものの、未だその機能は生物種間での保存性も含めて不明確である。そこでMis6複合体の構成因子であるMis17タンパク質の解析を通してMis6複合体全体の機能の理解を試みた。</p> <p>Mis6-FLAG、Mis17-FLAGによる共沈物の質量分析結果から、Mis6、Sim4、Mal2、Mis15、Mis17、Cnl2、Fta1、Fta2、Fta3、Fta4、Fta6、Fta7がMis6複合体の構成因子として同定された。これらのタンパク質のうち9種類についてはヒトにおいてもホモログタンパク質が存在し、いずれも細胞周期を通じてセントロメアに局在する。Mis17タンパク質のドメイン解析から、カルボキシ末端側1/2の領域がセントロメア結合を、アミノ末端側1/2の領域が制御的側面を担うことが示唆された。アミノ末端側1/2の領域を野生株内で大量発現すると高頻度の染色体分配異常が観察され、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤TSAに対する超感受性もみられた。Mis17タンパク質は高度にリン酸化されており、アクチン骨格、グルコース代謝などの制御に関わるプロテインキナーゼの破壊株 (<math>\Delta</math> ssp2、<math>\Delta</math> ppk9、<math>\Delta</math> ppk15、<math>\Delta</math> ppk30、<math>\Delta</math> lsk1、<math>\Delta</math> wis4) においてはアミノ末端側1/2の領域の大量発現による毒性効果の著しい緩和がみられた。Mis17タンパク質は細胞骨格や栄養条件と機能的関連を持つのかもしれない。Mis17タンパク質のアミノ末端側1/2の領域の大量発現によって高頻度で染色体分配異常がみられる状況下においても、Cnp1/CENP-Aのセントロメア結合が維持されていた。これはCnp1/CENP-Aのセントロメア結合が失われるmis17-362高温感受性変異株とは対照的な結果である。Mis17タンパク質のアミノ末端側1/2領域大量発現下の野生株細胞を0.5M NaClで洗浄処理した後もCnp1/CENP-Aのセントロメア結合が維持されていたことから、CENP-Aヌクレオソーム形成過程がMis17タンパク質のアミノ末端側1/2領域によって阻害されている可能性は低い。</p> <p>以上の結果からmis17-362変異株の変異部位にあたるMis17タンパク質のカルボキシ末端側を介したセントロメア結合がCENP-Aヌクレオソーム形成に必要であり、アミノ末端側領域がCENP-Aヌクレオソーム形成以外の未同定セントロメア機能を担っている可能性が示された。このことはMis6複合体のCENP-Aヌクレオソーム形成以外の新規セントロメア機能の存在を初めて示した結果と言える。</p> |                                  |    |       |

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、分裂酵母Mis6セントロメア複合体の構成因子Mis17タンパク質の解析を通してMis6複合体の新規機能の探索を試みた研究成果を論述している。CENP-Aは、真核生物種間で保存されたセントロメア特異的ヒストンH3バリエーションタンパク質である。分裂酵母における近年の研究から、Mis6複合体は、ヒストンシャペロンScm3およびMis16-Mis18セントロメア複合体とともに、セントロメア特異的なCENP-Aヌクレオソームの形成に機能することが分かっている。申請者は、Scm3およびMis16-Mis18複合体とは異なりCENP-Aヌクレオソームの形成以外の時期にもMis6複合体が細胞周期を通してセントロメアに局在することに着目し、Mis6複合体の構成タンパク質であるMis17の解析を通してMis6複合体全体の機能のより深い理解を試みた。

Mis17タンパク質は特にそのアミノ末端側領域に多くのセリン残基を含み、フォスファターゼ処理実験の結果、高度にリン酸化修飾されたタンパク質であることが判明した。リン酸化修飾は細胞周期を通して変化を示した。Mis17タンパク質のカルボキシ末端側領域にはコイルドコイル領域がみられ、カルボキシ末端側1/2領域をmis17-362高温感受性変異株内で大量発現すると、高温感受性が強く相補された。一方で、アミノ末端側1/2領域を野生株内で大量発現すると高頻度の染色体分配異常が観察された。アミノ末端側1/2領域の大量発現による染色体の不均衡分配の場合、制限温度のmis17-362変異株における不均衡分配とは異なり、Cnp1/CENP-Aのセントロメア局在は失われなかった。また、Mis6複合体構成因子である内在性Mis17タンパク質およびMis6、Mis15タンパク質のセントロメア局在も、Mis17タンパク質のアミノ末端側1/2領域の大量発現下で維持されていた。このことから大量発現したMis17タンパク質のアミノ末端側1/2領域はCENP-Aヌクレオソーム形成以外のMis6複合体のセントロメア機能を阻害している可能性が考えられる。cdc25-22変異株細胞内でMis17タンパク質のアミノ末端側1/2の領域を発現、蓄積させて制限温度においてG2期に細胞周期を同調ののち許容温度にリリースした場合、直後のM期から高頻度の染色体分配異常が観察される結果からも、CENP-Aヌクレオソームの形成がなされるS期以外の時期にMis17タンパク質のアミノ末端側1/2領域の大量発現による阻害的作用点が存在すると考えられる。また、プロテインキナーゼ破壊株( $\Delta$  ssp2、 $\Delta$  ppk9、 $\Delta$  ppk15、 $\Delta$  ppk30、 $\Delta$  lsk1、 $\Delta$  wis4)においてMis17タンパク質のアミノ末端側1/2の領域の大量発現による毒性効果の著しい緩和がみられたことは、細胞骨格および栄養条件とMis6複合体の関連を示唆している。アミノ末端側1/2の領域を野生株内で大量発現するとヒストン脱アセチル化酵素阻害剤TSAに対する超感受性がみられることも考え合わせると、Mis6複合体はMis17タンパク質のアミノ末端側のリン酸化やアセチル化などの修飾を介して制御されているのかもしれない。

以上のことから、Mis17タンパク質の解析を通してCENP-Aヌクレオソーム形成という既知のセントロメア機能以外にも新規の未同定機能をMis6複合体が担っている可能性が初めて示された。分裂酵母Mis6複合体および他生物種におけるホモログタンパク質はCENP-Aヌクレオソームの形成以外の時期にも細胞周期を通してセントロメアに局在する。本研究はその機能的意義の説明の端緒になる可能性が期待される成果ととらえることが出来、生命科学研究に重要な貢献をするものと判断された。試問にあたっての公聴会発表の内容は、基本的に論文内容が過不足なくまとめられ、申請者の論旨が明確に示されていたと判断する。また、試問における答弁には申請者の研究対象に対する真摯な展望も見受けられた。よって本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認められた。平成23年6月6日に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られた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日