

氏 名	ご しま ごう た 五 島 剛 太
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2535 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	染色体の均等分配を保障する動原体クロマチンタンパク質 Mis12 の細胞機能に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 柳田 充 弘 教授 上村 匡 教授 七田 芳 則

論 文 内 容 の 要 旨

ゲノムの安定な継承のために、いかにして染色体の均等分配が保障されているのかを理解することは、生命の継承という観点から、現在の生物学の主要な課題の一つである。申請者は分裂酵母、出芽酵母およびヒト培養細胞を用い、遺伝学的、細胞生物学的、および生化学的手法を組み合わせることで動原体による染色体均等分配保障機構の解明を目指した。

分裂酵母 *mis12* 変異体は姉妹染色分体の不均等分配を高頻度で引き起こし致死となる。Mis12 タンパク質はクロマチン結合タンパク質で、細胞周期を通じて動原体中央領域に局在し、この領域の特殊なクロマチン構造形成に必須であった。*mis12* 変異体における SPB の挙動を生細胞で観察したところ、中期スピンドルが野生株よりも 60% も伸長していることを発見した。別の動原体クロマチン欠損変異体 *mis6* でも中期スピンドル伸長が認められた。動原体クロマチンタンパク質が中期スピンドル長を制御していることが明らかとなった。*mis12* 変異体のサプレッサーとして、Ppel ホスファターゼとその制御因子 Ekcl, さらに Gsk3 キナーゼ等が得られた。*ekcl* 変異は *mis12* の中期スピンドルの長さ、動原体クロマチン構造を正常に戻していた。Gsk3/Ppel によるリン酸化・脱リン酸化の制御が動原体クロマチン構造形成に重要であることが明らかになった。

次に、Mis12 と遺伝的相互作用を示す、微小管結合タンパク質 Dis1 の解析を進めた。クロマチン免疫沈降法により、Dis1 が M 期特異的に動原体中央領域と相互作用することを見出した。動原体との結合には、微小管結合ドメインの含まれないカルボキシル末端断片が必要十分であることも明らかにした。Dis1 が M 期に微小管と動原体の安定な連結に必要であるとのモデルが提示された。

続いて、Mis12 と相同性のある出芽酵母の *MTW1* 遺伝子の解析を行った。CHIP 法および変異体の観察から、Mtw1p もまた染色体の均等分配に必要な動原体タンパク質であることを見出した。GFP を用いた Mtw1p の細胞内局在の決定、および、LacI/LacO システムを用いたセントロメア近傍の DNA の可視化により、出芽酵母の姉妹セントロメア・姉妹動原体が間期の短スピンドル期 (S/G2 期) から既に両極に分離していることを発見した。一方で染色体腕部は M 期中期まで接着を保っていた。このように出芽酵母は細胞周期の早い段階から姉妹動原体の二方向性結合を確立し、M 期後期における染色体の均等分配を保障していることが明らかとなった。さらに、いったん時期尚早に分離した姉妹動原体はその後はほとんど再会合することがないことを、セントロメア DNA の生細胞経時観察等により明らかにした。二方向性結合の確立以降、姉妹動原体間の接着は正確な染色体分配にとってそれほど重要ではないことを意味する。

最後に、データベースサーチにより Mis12 と弱いながら相同性を有するヒト遺伝子 hMis12 を発見した。免疫染色や GFP を用いて局在を調べたところ、hMis12 は細胞周期を通じて CENP-A, C と局在を共にする、内部動原体プレート (inner kinetochore plate) 構成因子であることがわかった。セントロメア DNA の配列・大きさは種によってまったく異なるものの、Mis12 は種を越えて保存された動原体タンパク質であった。

論文審査の結果の要旨

本論文では、新規動原体タンパク質 Mis12 を単離し、これを手がかりに酵母あるいはヒト培養細胞を用いた遺伝学的、細胞生物学的、生化学的研究を展開した。Mis12 は生育に必須であり、機能を失うと高頻度で染色体の不均等分配が引き起こされる。一連の研究結果を踏まえ、申請者は真核生物一般に通じる動原体による染色体均等分配保障機構、あるいは動原体そのものの構造と機能について、以下の7つの新たなモデルを提唱している。

- 1) 動原体クロマチンが中期スピンドルの長さの規定に関わる
- 2) GSK3 キナーゼ, Ppel ホスファターゼが、動原体クロマチン構築に関わる
- 3) ひとつ前の M 期に、次の M 期のための機能を果たすという新たな動原体の細胞周期制御が存在する
- 4) 高度に保存された微小管結合タンパク質 Dis1 が、M 期動原体と微小管の連結に重要である
- 5) 二方向性結合 (biorientation) が染色体均等分配において一義的に重要な点である。その形態、確立時期は種によって異なっている
- 6) 姉妹動原体間の接着は、正確な染色体分配にとって必ずしも重要ではない
- 7) Mis12 は酵母からヒトまで保存された内部動原体クロマチンタンパク質である

1), 3) は分裂酵母 *mis12*, *mis6* 変異体における SPB の生細胞経時観察や同調培養実験を基に明らかにされ、2), 4) は分裂酵母の遺伝学的解析 (サプレッサー・合成致死変異探索) が研究の発端となっている。5), 6) は出芽酵母 Mis12 類似遺伝子 Mtw1p の局在解析を通じて予想外に発見された「姉妹セントロメアの時期尚早な分離」という事実から導き出された概念である。さらに、ヒト Mis12 類似遺伝子 hMis12 の発見により (7), Mis12 の機能、さらには一連の酵母における研究結果が種を越えて保存されていることが強く示唆された。

本研究では進化上保存された新規動原体タンパク質 Mis12 を研究の端緒とし、3つのモデル系 (分裂酵母, 出芽酵母, HeLa 細胞) の利点を最大限に生かし、上のような真核生物一般に通ずる新たな知見, 概念を生みだしている。得られた知見の貢献は、動原体, スピンドル, 染色体分配のみならず細胞周期分野全体に対しても非常に多大なものと考えられる。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文としての価値あるものと認める。

なお、主論文とその基礎になる論文、および参考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諮問した結果、合格と認めた。