

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	伊藤 大一輔
論文題目	スピンドルチェックポイント機能因子を動原体に集積させる機構の解析		

(論文内容の要旨)

スピンドルチェックポイントは、すべての染色体がスピンドル微小管と両極性の接続を確立するまで、有糸分裂後期への進行を遅延させる。このチェックポイントは動原体とスピンドル微小管との接続状態を監視しており、スピンドル微小管に接続していない動原体（未接続動原体）からチェックポイントを活性化させるシグナルが放出されると考えられている。**Mad1**、**Mad2**、**Bub1**などのチェックポイント機能因子は未接続動原体に特異的に集積することが知られているが、これらの因子がどのように未接続動原体を認識して、集積するのかは不明であった。そこで、未接続動原体には「目印」が付けられることで機能因子が集積できるのではないかという仮説を立てた。

分裂酵母では**Mps1 pombe homolog (Mph1)**キナーゼがチェックポイント経路の上流で作用することが知られていたため、**Mph1**が未接続動原体を認識してチェックポイント機能因子を集積させるのではないかと推測し、**Mph1**の機能に着目した。

まず、**Mph1**の細胞内局在を観察したところ、チェックポイント活性化に伴い動原体に局在し、チェックポイントが解除されると動原体から解離することがわかった。そこで、**Mad2**の発現を制御できる株において、動原体タンパク質**Ndc80**と融合させた**Mph1**を発現させて**Mph1**を恒常にセントロメア／動原体に局在させた。この株では**Mad2**の発現を誘導したときにチェックポイント依存的な有糸分裂停止がみられた。一方、**Mad2**の発現を抑制すると**Mph1**がセントロメア／動原体に局在していても細胞周期は正常に進行した。この条件下では**Bub1**は細胞周期を通して**Mph1**と共に局在することがわかり、動原体に局在させた**Mph1**により**Bub1**は動原体に集積できることが示唆された。対照的に、**Mph1**を動原体に局在させても、**Mad2**の発現を抑制したときには**Mad1**は有糸分裂初期に一時的に動原体に集積し、すぐに解離することがわかった。このことから、**Mph1**の動原体局在は**Bub1**を動原体に集積させるために十分であるが、**Mad1**の動原体への集積には他の因子による作用が必要であることが示唆された。

また、**Mph1**はチェックポイントの活性化に伴いリン酸化され、チェックポイントが解除されると脱リン酸化されることがわかった。このリン酸化は、一部は自己リン酸化によるものと考えられ、有糸分裂期への進行に伴いリン酸化状態が亢進した。リン酸化状態の変化は局在の変化と関連する可能性も考えられる。

最後に、**Bub1**を動原体に局在させたときの効果を検証したところ、**Mph1**依存的に有糸分裂停止が起こることがわかった。よって、動原体に集積した**Bub1**は**Mph1**と協調的に機能してスピンドルチェックポイントを活性化させている可能性がある。

Mph1は未接続動原体に特異的に局在することで**Bub1**を集積させるほか、おそらく他の因子の未接続動原体からの解離を阻止することで、チェックポイントを活性化させるのに十分なシグナルの放出を促進していることが示唆される。

(論文審査の結果の要旨)

スピンドルチェックポイントは、染色体分配の正確性を保障し、ゲノムの安定性を維持する重要な細胞周期監視機構である。スピンドル微小管に未接続の動原体には機能因子が集積し、チェックポイントを活性化させるシグナルを放出させると考えられているが、機能因子が未接続動原体を特異的に認識して集積する機構は明らかではなかった。

申請者は、分裂酵母Mph1キナーゼが機能因子を動原体に集積させるために重要な役割を果たすのではないかと考え、Mph1の機能解析を行った。

まず、細胞内局在を観察したところ、Mph1はチェックポイント活性化に伴い動原体に局在し、チェックポイントが解除されると動原体から解離することを示した。そこで、申請者はMph1の動原体局在の意義を検証するために、Mad2の発現を制御できる条件下でMph1をセントロメア／動原体に強制的に局在させたところ、Mad2の発現を誘導したときに細胞周期が有糸分裂中期で停止した。この結果はMph1の動原体局在が、Mad2依存的にチェックポイントの恒常的活性化を誘導することを示している。申請者は、この実験系を利用してチェックポイント機能因子の集積を検証した。機能因子の一つであるBub1は常にMph1と共に局在することを見出し、Bub1はMph1に従属的に動原体に集積することを明らかにした。この集積はMph1のキナーゼ活性が必要であり、おそらく動原体に存在する基質をリン酸化することでBub1を動原体に集積させるものと考えられた。一方で、Mph1を動原体に局在させても、Mad1は有糸分裂期にのみ動原体に集積することを示した。

以上の結果より、申請者はチェックポイント機能因子の動原体への集積機序は、Mph1に依存して動原体に集積する因子（Bub1）と、Mph1に依存せず自律的に有糸分裂期に動原体に集積する因子（Mad1）があることを明らかにした。また申請者は、Mph1は自律的に集積したMad1が動原体から解離するのを抑制することで、チェックポイント活性化シグナルの伝搬を促進するものと推測している。この成果はスピンドルチェックポイント活性化機構の全容解明につながるものであり、今後の当該研究分野の進展に大きく寄与することが期待される。

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た。平成24年1月23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。

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