

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	北川 哲平
論文題目	CENP-Aの局在をセントロメアの一領域に制限する機構の解明		
(論文内容の要旨)			
<p>セントロメアクロマチンは、有糸分裂期に構築される動原体の基礎的構造をなす。セントロメアのクロマチンにはヒストンH3の派生体であるCenp-Aが特異的に取り込まれる。Cenp-Aを含むセントロメア領域の大きさ、Cenp-Aヌクレオソームの密度、Cenp-AヌクレオソームとH3ヌクレオソームとの比率は、厳密な制御を受けている。セントロメア領域が異常に拡大すれば、そこに構築される動原体も肥大し、異常な紡錘糸接続の原因ともなり得る。また、ヌクレオソームの過密な存在は、動原体領域のクロマチンの適切な弾性を損ない、その結果、紡錘糸接続にともなって発生する張力を察知するスピンドルチェックポイントの機能に支障を来す可能性がある。H3ヌクレオソームがCenp-Aヌクレオソームに置き換わることで、ヒストンH3のメチル化に依存したヘテロクロマチン形成を阻害することも予想される。</p> <p>Cenp-Aを特異的にセントロメア領域へ取り込む一連のメカニズムは、これまでに種々の生物種において活発に研究されてきた。その一方で、Cenp-Aの分布をセントロメアの一領域に制限するメカニズムについての知見は皆無であった。本研究では、分裂酵母モデル系を用いて、Cenp-Aの分布を制限するメカニズムの解明を目指した。Cenp-Aの高発現に依存的に高温感受性を示し、なおかつ、Cenp-Aの細胞内局在に異常を示す変異体の一つ (<i>rpt3-1</i>) について詳細な解析を行なった。遺伝子クローニングの結果、変異の原因遺伝子は 26 Sプロテアソームの19 S Regulatory Particleのサブユニットの1つ (Rpt3) であるAAA型ATPaseをコードすることが判明した。分裂酵母野生型株でのCenp-Aの局在はセントロメアの中央コア領域10-20 kbに制限されているが、<i>rpt3-1</i>変異体においては40-70 kbに広がった。また、<i>rpt3-1</i>変異体で観察される染色体の安定性の低下とセントロメアにおける遺伝子サイレンシングの亢進は、Cenp-Aと拮抗的に作用するヒストンH3を高発現することで緩和された。すなわち、これら2つの表現形はセントロメアにおけるCenp-Aの分布の異常に起因すると考えられる。分裂酵母Rpt3とセントロメアはともに核膜に局在するが、変異型Rpt3-1タンパク質は核膜局在能が低下し、さらにセントロメアクロマチンに対する結合活性も低下していた。Rpt3がセントロメアクロマチンに結合することによってCenp-Aの分布を制御するものと考えられる。また、Cut8タンパク質はプロテアソームの核膜局在に必要であることから、<i>cut8</i>欠損株を用いて解析を行った。その結果、Cut8タンパク質の欠損によりプロテアソームを核膜から解離させることで、<i>rpt3-1</i>変異体と同様の表現型を示すことが明らかになった。</p> <p>以上の結果は、プロテアソーム、または19 S Regulatory ParticleがCut8タンパク質を介して核膜上でセントロメアクロマチンと相互作用することにより、CENP-Aの分布を制御することを示唆する。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

セントロメアクロマチンの際立った特徴は、ヒストンH3のバリエーションであるCenp-Aを含むことである。Cenp-Aを含むヌクレオソームの存在領域の大きさ、その領域におけるヌクレオソームの密度、Cenp-AヌクレオソームとH3ヌクレオソームとの比率は、厳密な制限を受ける。本学位論文は、セントロメアにおけるCenp-Aの分布を制限するメカニズムの一端を解明したものである。

Cenp-Aの高発現に感受性を示す分裂酵母変異体のスクリーニングの結果、プロテアソームの19 S Regulatory Particleのサブユニットをコードする*rpt3+*遺伝子の変異体 (*rpt3-1*) を単離し、この変異体では細胞内のCenp-Aレベルは正常にもかかわらず、Cenp-A がより広範囲に、高密度にセントロメア領域に取り込まれることを示した。その結果、染色体が不安定化し、セントロメア領域のサイレンシング (転写抑制) が亢進することを見いだした。また、セントロメアとプロテアソームが共に核膜上に存在することに着目し解析を行った。プロテアソームを核膜に係留する因子であるCut8タンパク質の機能を阻害し、プロテアソームを核膜から解離させることで、*rpt3-1*変異体と同様の欠損を誘導することを示した。

これら一連の結果は、プロテアソーム、特に19 S Regulatory Particleがセントロメアクロマチンと核膜上で相互作用し、クロマチン中の余剰のCenp-Aを排除することを示唆する。プロテアソームは、タンパク質分解活性に非依存的なクロマチンリモデリング活性により、転写制御やDNA損傷修復に機能することが種々の生物で示されている。おそらく、本研究で示したプロテアソームによるCenp-Aヌクレオソームの分布制御も、類似の作用機序によるものであると考察された。

本研究は、「Cenp-Aヌクレオソームの分布制限」という新規機能を想定し、*rpt3-1*変異体を解析することで、この機能を担う分子メカニズムの一端を見出したものである。論文は終始首尾一貫性をもって記述されており、生命科学の理解や発展に寄与する新たな概念や発見を含んでいた。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た。

(試問結果の要旨)

平成26年6月17日に、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。公聴会での発表は、本研究の結果と意義を明確に示すものであった。また、その後の質疑応答では、モデルの妥当性と将来展望について詳細な議論がなされ、申請者の当該分野における高い学識と考察力、さらに十分な研究経験を示すものであった。以上の結果、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。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日