

氏 名	きよ みつ とも み 清 光 智 美
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 132 号
学位授与の日付	平 成 20 年 1 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 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	スピンデルチェックポイント機能を有するヒト動原体因子の同定と機能解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 松 本 智 裕 教 授 西 田 栄 介 教 授 石 川 冬 木

論 文 内 容 の 要 旨

動原体は有糸分裂期 (M期) にセントロメアDNA上に構築される巨大なタンパク質複合体である。この構造体は微小管と相互作用するのみならず、スピンドルチェックポイントを介してM期進行の制御にも関与するため、染色体の均等な分配には極めて重要な役割を持つ。分裂酵母Mis12, SpCENP-Aは共にセントロメア特異的なクロマチン形成に必須であるが、独立な経路でセントロメアに局在するため、質的に異なる動原体構築機能を担っていると考えられている。本研究ではヒトhMis12のノックダウン表現型と結合因子の解析を通して、hMis12がいかにスピンドルチェックポイントに機能するか、特にスピンドルチェックポイントタンパク質Bub1, BubR1との関係について検討した。

hMis12とCENP-Aのノックダウンによる表現型の観察から、hMis12, CENP-Aはそれぞれ動原体構築、正常な染色体分配に必須であることを明らかにした。また両者の動原体局在は互いに依存しなかったことから、分裂酵母同様、ヒト動原体も少なくとも2つの経路から形成されることが示唆された。さらにhMis12はCENP-Aとは独立に、スピンドルチェックポイントタンパク質Bub1, BubR1の動原体局在に必要であることを見出した。酵母ツーハイブリッド法を用いてhMis12結合タンパク質の中から、Bub1, BubR1と直接相互作用するタンパク質を探索したところ、blinkin/AF15q14を同定した。Blinkinはアミノ末端領域と中央領域を介して、Bub1, BubR1と相互作用する一方、カルボキシル末端領域を介してhMis12複合体と相互作用し、動原体に局在した。BlinkinはBub1, BubR1の動原体局在のみならず、スピンドルチェックポイントおよび、動原体-微小管結合に必要な。またBub1, BubR1は保存されたアミノ末端領域のTPR配列を介してblinkinと相互作用することを見出した。TPR変異タンパク質を用いた相補実験から、TPR配列を介したblinkin-Bub1の相互作用が染色体の整列に、blinkin-BubR1の相互作用がスピンドルチェックポイントに機能することが示唆された。さらにblinkinの部分断片を用いた相補実験からも、blinkinはBub1, BubR1と相互作用することを介して、動原体-微小管結合とスピンドルチェックポイントに機能すると考えられた。BlinkinはBub1, BubR1の他、数種類のタンパク質と直接相互作用することから、動原体におけるスピンドルチェックポイントシグナルの生成、動原体構造形成に中心的な役割を持つと示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

動原体はスピンドルチェックポイントタンパク質が局在し、後期抑制シグナルを生成する場として考えられている。しかし、これまでスピンドルチェックポイントタンパク質が直接結合する動原体タンパク質が同定されておらず、スピンドルチェックポイントタンパク質の局在化機構や動原体のスピンドルチェックポイントへの関与については不明な点が多かった。

申請者はhMis12がCENP-Aとは独立にスピンドルチェックポイントタンパク質Bub1, BubR1の動原体局在に必要であることを発見し、それを手がかりにhMis12結合タンパク質の中からBub1, BubR1と直接相互作用するヒト動原体タンパク質blinkin/AF15q14を同定することに成功した。また申請者は酵母ツーハイブリッド法、スリーハイブリッド法を駆使し、12種類のhMis12結合タンパク質の分子間相互作用についてモデルを提唱した。

申請者はRNAi法を用いてblinkinをノックダウンすることにより、blinkinは細胞内においてBub1, BubR1の動原体局在に必要であることを示した。また薬剤を用いた実験や、生細胞観察から、blinkinはスピンドルチェックポイントおよび染色体の整列に機能することを示した。さらにBub1, BubR1のダブルノックダウンの表現型がblinkinノックダウンの表現型と類似することを示し、blinkinはBub1, BubR1の動原体局在のみならず、両者の機能に必須であることを提示した。

申請者はさらに、blinkinとの相互作用に必須なBub1, BubR1のアミノ酸配列を同定した。Bub1, BubR1のアミノ末端側配列に保存されているTPR配列に変異を導入すると、Bub1, BubR1はblinkinとの相互作用を失った。またこれらTPR変異タンパク質はBub1, BubR1ノックダウンによる欠損を相補することが出来ないことを示した。これらの結果から、申請者はblinkinとBub1, BubR1の相互作用がそれぞれの機能に必須であることを提唱した。

申請者は最後にblinkinの各ドメインについて検討した。まずblinkinはC末領域（BLKC）を介してhMis12複合体と相互作用することから、この領域が動原体局在能を持つか検討した。GFP-BLKCの細胞内局在を観察すると、BLKCはM期を通して動原体に局在したので、blinkinのC末領域（BLKC）は動原体局在に十分であると考えられた。次にblinkinはN末（BLKN）、中央領域（BLKM）を介してBub1, BubR1と相互作用することから、この領域でスピンドルチェックポイントと染色体の整列に機能するのではないかと仮説をたてて検証した。Blinkinをノックダウン後、blinkinの部分断片を用いて相補実験を試みた結果、C末領域（BLKC）はスピンドルチェックポイント機能と染色体整列機能を持たないが、中央領域とC末領域（BLKM+C）は部分的にこれらの機能を持つ事を示した。また中央領域とC末領域（BLKM+C）はBub1, BubR1の動原体局在を部分的に回復させる事を示し、blinkinはBub1, BubR1を動原体に局在させることで、スピンドルチェックポイントと染色体の整列に機能することを提唱した。

申請者は以上の結果から、blinkinはBub1, BubR1と直接結合し、スピンドルチェックポイント機能を有するヒト動原体タンパク質であると結論した。

本研究では、1991年に出芽酵母でBub1, BubR1/Mad3が同定されて以来、初めてBub1, BubR1に直接結合するヒト動原体タンパク質blinkinを同定した。またその相互作用にはBub1, BubR1のTPR配列、blinkinのN末（BLKN）、M領域（BLKM）が必要なことも示し、その相互作用が機能に必要なことまで示唆された。この発見は今後、動原体におけるスピンドルチェックポイントシグナルの生成機構の解明に大きく貢献できる仕事であり、十分評価できる。

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19年12月18日、論文内容とそれに関連した試問の結果、合格と認めた。