

氏 名	とよ だ ゆう すけ 豊 田 雄 介
学 位 の 種 類	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 2 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 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	姉妹染色分体合着に必須な Mis4, Rad21 の S 期および M 期進行における分子機能の探求

論文調査委員 (主 査) 教 授 柳 田 充 弘 教 授 西 田 栄 介 教 授 石 川 冬 木

論 文 内 容 の 要 旨

姉妹染色分体合着は複製された姉妹染色分体をつなぎとめることで M 期における染色体分配を保障する機構であり、細胞の安定な増殖にとって必須な機構である。Rad21/Scc1 は姉妹染色分体合着を担うコヒーシン複合体の構成因子であり、Mis4/Scc2/ アドヘリンはコヒーシンをクロマチンへ結合させるのに必須であることが知られている。申請者は分裂酵母およびヒト培養細胞を用いて、正常な細胞周期進行における Mis4/ アドヘリンおよび Rad21 の分子機能を探求した。

まず分裂酵母高温感受性変異体 *mis4*, *rad21* の制限温度での表現型を詳細に解析することで、*mis4*, *rad21* 変異体はスピンドルチェックポイントタンパク質 Mad2, Bub1 に依存して M 期遅延を引き起こすことを見出した。*mis4* 変異体で Bub1-GFP 融合タンパク質の詳細な生細胞経時観察を行った結果、微小管が形成されるにも関わらず微小管と結合していない動原体が長時間残存した。さらに *mis4*, *rad21* 変異体は微小管重合阻害剤チアベンダゾールに感受性を示しただけでなく、M 期特異的に動原体に局在し動原体と微小管を連結すると考えられている Dis1 と Mis4 が遺伝的相互作用を示した。以上の結果から、分裂酵母 *mis4*, *rad21* 変異体では微小管と動原体との相互作用が減退していることが明らかとなり、姉妹染色分体合着が M 期初期における微小管と動原体の相互作用に必要であるというモデルを提示した。

次に、Mis4, Rad21 のヒトホモログ hMis4, hRad21 を RNAi (干渉法) によりノックダウンして表現型を観察した。驚いたことに hMis4, hRad21 をノックダウンしても M 期細胞の蓄積は見られなかった。ノックダウン細胞を微小管重合阻害剤存在下で培養すると、G2/M 期細胞だけでなく G1/S 期細胞の蓄積も見られた。さらにノックダウン細胞ではサイクリン B1 局在を持たない細胞が増加していたので、G1 から S 期初期にある細胞の増加が示唆された。一方、生細胞経時観察の結果、M 期細胞自体が少ないながらも M 期にあるノックダウン細胞の約 50% が M 期進行遅延を示し、染色体の整列に欠損を示した。以上の結果から hMis4, hRad21 ノックダウン細胞は第一に G1/S 期進行に欠損を示し、第二に一部の細胞で M 期遅延を起こすことが明らかとなった。ヒト hMis4, hRad21 が M 期のみならず S 期進行にも機能するという全く新しい可能性を提示した。

最後に、分裂酵母 Mis4 の分子機能の理解を目的として、Mis4 部分欠失シリーズを作製しその機能解析を行った。その結果、Mis4 には複数の機能ドメインを持つことが分かり、アミノ末端、カルボキシ末端のいずれを欠いても機能的ではなかった。Mis4 はクロマチン領域に斑状に局在するが、精製した Mis4 タンパク質は *in vitro* で DNA と結合しなかった。Mis4 と遺伝的相互作用する因子を網羅的に探索した結果、意外にも姉妹染色分体の分離に必須な Cut1/セパレーズおよび染色体凝縮に必須なコンデンシン複合体のサブユニット Cut14/Smc2 の変異体が単離された。*mis4* 変異体は紫外線照射などの DNA 損傷に感受性を示す。以上の結果に加えて、同様の感受性が最近 Cut1/セパレーズ, Cut2/セキュリンやコンデンシン構成因子の変異体についても報告されつつあるという知見から、Mis4 とこれらの因子が協調して DNA 損傷修復に機能するという新しい可能性を他に先駆けて提示した。

論文審査の結果の要旨

姉妹染色分体合着は、クロマチン・細胞周期研究の重要な一分野である。この機構はS期に複製された姉妹染色分体をつなぎ止めることで続くM期における均等な染色体分配を保障している。染色体の不均等な分配は発生上の障害やガン化につながる事が知られていることから、この分野の研究は医学的にも極めて重要である。姉妹染色分体合着はコヒーシンというタンパク質複合体によって担われており、Mis4/アドヘリンはコヒーシンをクロマチンへ結合させる。分裂酵母コヒーシン構成因子であるRad21や、Mis4の変異体は姉妹染色分体合着に欠損を示し、続くM期で致死となることが知られていた。

まず申請者は、これらの変異体が示すM期表現型を詳細に観察することで、*mis4*、*rad21* 変異体ではスピンドルチェックポイントが活性化してM期遅延を起こしていることを示した。どのような欠損がM期遅延を引き起こすかを明らかにするため、スピンドルチェックポイントタンパク質Bub1の局在をGFPを用いて詳細に生細胞経時観察した。その結果、*mis4* 変異体ではM期初期における微小管と動原体の相互作用が減退していることが明らかとなった。これは、姉妹染色分体合着はM期後期に解消されるだけでなく、M期初期の細胞周期進行に積極的に機能することを示した重要な知見である。

次に申請者は、Mis4、Rad21ヒトホモログが分裂酵母と同様に細胞周期進行に機能する可能性をRNAi（干渉法）を用いて検討した。その結果、驚いたことに、個々のRNAi細胞はM期遅延を起こしうが、全体としてはM期細胞の蓄積は見られなかった。そこで細胞周期の挙動を解析したところ、RNAi細胞はG1～S期にかけて遅延することが示唆された。対照的に、ヒト細胞を用いたドミナントネガティブなhRad21タンパク質の発現による解析ではS期進行の欠損は見出されず、M期遅延のみが報告されていた。本研究はhMis4、hRad21がM期のみならずG1～S期進行にも必要であるという全く新しい可能性を提示しただけでなく、S期進行におけるMis4、Rad21の分子機能の解明のために欠失変異体が重要である可能性を指摘した。

さらに、申請者は分裂酵母Mis4の分子機能の分子機能を明らかにするために、ドメイン解析を行った。その結果、Mis4は複数の必須な機能領域から構成され、アミノ末端、カルボキシ末端のいずれを欠いても機能を失うことが示された。さらに、Mis4と遺伝的相互作用を示す因子を網羅的に探索することによっても分子機能を理解しようとした。その結果、驚いたことに、M期後期にRad21を切断するCut1/セパレーズや、M期における染色体凝縮に必須なコンデンシン複合体の構成因子Cut14の変異体の高温感受性が、Mis4を発現する多コピープラスミドpMIS4により相補された。一方で、pMIS4を持つ*cut14*変異体はそのM期表現型が相補されなかった。ごく最近*cut1*、*cut2*や*cut14*変異体は、*mis4*変異体と同様に紫外線照射等のDNA傷害に感受性を示すことが示されてきている。これらの結果および知見を考え合わせ、Mis4がCut1とその結合因子Cut2や、コンデンシンと協調してDNA損傷修復に機能するという仮説を提示した。

本研究で得られた成果は、間期およびM期の正常な細胞周期進行が保障される機構の理解に大きく寄与するものと言える。

以上より本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成16年1月26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。