

氏 名 Nagpal, Harsh

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1957 号

学位授与の日付 平成29年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 The Interaction Network between Centromeric Proteins
during Kinetochore Formation

論文審査委員 主 査 教授 木村 暁
教授 荒木 弘之
教授 澤 斉
准教授 島本 勇太
部長 広田 亨 公益財団法人がん研究会

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

In eukaryotes, the kinetochore forms on the centromere to attach the microtubules from the mitotic spindle and is essential for chromosomal segregation. The centromere is specified by a sequence-independent epigenetic mechanism in most eukaryotes and the centromere specific histone H3 variant CENP-A is the primary candidate as the epigenetic marker for kinetochore specification. Once the centromere is specified, various proteins are assembled on the centromere to establish the functional kinetochore. As these proteins associate with the centromere throughout the cell cycle, they are called the Constitutive Centromere Associated Network (CCAN) proteins. CCAN proteins also create a scaffold for the formation of the kinetochore and subsequently recruit outer kinetochore components that bind to the microtubules. Whereas considerable progress has been made in understanding the relation between CCAN components as well as between the inner and outer kinetochores, the exact temporal order, dependencies and the functional roles of each component are still unclear. While it has also been shown that CENP-C and CENP-T form two distinct associations with centromeric chromatin, questions remain as to whether there is any connection or interdependency between these pathways. Similarly, CENP-C and CENP-T form the two pathways for recruiting the outer kinetochore and subsequent microtubule attachment, yet it remains unknown whether they actively stabilize outer kinetochore–microtubule interaction or mainly function as platforms. Therefore, it is essential to clarify the organization of the CCAN proteins and the functional role of the CCAN in recruiting the outer kinetochore. The aim of this thesis is to study the various interaction networks during kinetochore formation to elucidate; (i) How the CCAN components are organized during the recruitment of the kinetochore? (ii) Whether the CCAN proteins affect outer kinetochore–microtubule binding?

To answer these questions, I used chicken DT40 cells as a model system and first concentrated on the interactions between CENP-C and other CCAN components. I expressed various deletion mutants of CENP-C in CENP-C deficient cells and found that CENP-C appeared to localise to the centromere through multiple binding pathways. The middle region of CENP-C was essential for its localization to the centromere in a CCAN dependent manner whereas the CENP-C C-terminus localized to the centromere in a CCAN independent manner. I demonstrated that CENP-C localized to the centromere through direct interaction with CENP-A through its C-terminal region during M-phase, but also that it localized to the centromere via the CCAN during interphase. To analyse CENP-C interactions *in vitro* I used a biochemical approach and found a weak interaction of CENP-C with CENP-N/L.

(別紙様式 2)

(Separate Form 2)

Subsequent 2-D NMR experiments confirmed the interaction between these proteins. I found that CENP-C lacking the middle region, which is suspected of being the interaction domain with CENP-N/L, could not rescue CENP-C deficient cells. In addition, cells expressing this deletion mutant showed a marked reduction in CENP-H localization to the centromere. These results suggest that CENP-C middle region is essential for centromere localization through interaction with other CCAN components including CENP-L/N and CENP-H in interphase, while CENP-C C-terminus largely contributes to centromere localization during mitosis via direct interaction with the CENP-A nucleosome. I propose that this dynamic change of CENP-C interaction may be essential for the formation of a functional kinetochore.

The second question is whether the CCAN proteins affect outer kinetochore-microtubule binding. For this question, I focused on the role of the Mis12 complex which is recruited by the CENP-C pathway and CENP-T on stabilizing the Ndc80 complex-microtubule interaction. Our laboratory has previously shown that CENP-C and CENP-T induce the formation of an artificial kinetochore when these proteins are localized to an ectopic site on chromosomes, whereas the Ndc80 complex does not induce an artificial kinetochore. In this study, I show that members of the chicken Mis12 complex did not induce an artificial kinetochore suggesting that a CCAN dependent pathway for the Ndc80 complex is required to form a functional kinetochore. Then, I prepared human CENP-T, and Mis12 complex *in vitro* and tested whether these proteins affect the Ndc80 complex-microtubule binding based on single molecule total internal reflection microscopy (smTIRF), I demonstrate that both the Mis12 complex and CENP-T can enhance the microtubule binding ability of the Ndc80 complex. Thus, I show that a mechanism exists to regulate kinetochore-microtubule binding through CCAN components.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

真核細胞が分裂する際には染色体を適切に娘細胞に分配することが重要である。この時、染色体上のセントロメア領域に動原体と呼ばれる多数のタンパク質からなる構造体が形成される。動原体は紡錘体微小管と染色体の結合を仲介し、染色体分配を可能にする。動原体を構成するタンパク質群のうち、細胞周期を通じて常にセントロメア領域に会合しているタンパク質群は CCAN (Constitutive Centromere Associated Network) と呼ばれ、動原体の内層を構築する。ヒトやニワトリでは 16 種類のタンパク質が CCAN に属し、それらのタンパク質は複数のサブ・グループに分類できることが明らかになりつつある。これらのサブ・グループが、お互いあるいはセントロメアクロマチンにどのように作用するのかを明らかにすることは動原体構造を理解するための重要な課題である。

Nagpal さんの学位論文では、2 つの研究テーマについての解析結果が報告されている。第一のテーマでは、動原体構築の最もベースにあるとされる CENP-C に注目し、CENP-C がどの CCAN 構成分子と相互作用するのか、細胞生物学的手法や生化学的手法により解析した。多くの生物種でセントロメア領域を特徴づけるのは、セントロメア特異的なヒストンである CENP-A タンパク質がヌクレオソームに含まれていることであるが、CENP-C はその CENP-A と結合する活性を有する。Nagpal さんはニワトリ由来の培養細胞を用いて、CENP-C のどの領域がセントロメア領域への会合に必要なかを検討した。その結果、細胞分裂(M)期では CENP-C の C 末側領域が、間期ではその中央領域がセントロメアと会合することを見つけた。これは、細胞周期で CCAN とセントロメアの会合様式が変化することを示す重要な発見である。Nagpal さんは CENP-C は、M 期では CENP-A に直接結合すること、他方間期では CENP-H グループに含まれる CENP-N を介してセントロメアと会合することを突き止めた。さらに、CENP-N との結合に関わる CENP-C のドメインを NMR 解析により同定し、そのドメインが生物種を超えて保存されていることも見出した。CENP-N も CENP-A を介してセントロメアに会合する活性を有していることから、Nagpal さんの研究は CENP-C が異なる細胞周期でセントロメアに会合する際の異なる分子間相互作用を明らかにしたことになる。Nagpal さんはこの結果を、筆頭著者として国際的な専門誌に発表している。

第二のテーマでは、CCAN による動原体内層の構築が、外層による微小管結合にどのような影響を与えうるのか、*in vitro* での一分子観察によって解析した。Nagpal さんは、動原体の微小管結合を担う Ndc80 複合体を精製し、蛍光標識した Ndc80 複合体がガラス基板に固定した微小管上に結合する様子を全反射顕微鏡で観察する系を構築した。この実験系において、CENP-T や Mis12 といった CCAN あるいはその関連分子を加えると Ndc80 の微小管上への滞在時間が有意に長くなることを見出した。つまり、Mis12 や CENP-T が単に微小管とセントロメア間の橋渡しをしているだけではなく、動原体の微小管への結合を安定化している可能性を示す結果を得た。M 期で起こる動原体と微小管の相互作用は、Nagpal さんが第一のテーマで明らかにした細胞周期による動原体の形成様式の違いと関連する可能性もあり、今後の解析が待たれる示唆に富む知見である。

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

Nagpal さんは一連の研究で、セントロメア領域が細胞周期を通じて CCAN と会合する様式、さらには M 期で微小管と動原体タンパク質の相互作用が制御されるしくみ、を明らかにした。これらは染色体分配メカニズムの理解を深化させる優れた研究成果である。以上のことから、本論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。