

氏 名 天野 美保

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1264 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命体科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Cell Biological Analysis of Protein Complexes Required
for Kinetochores Formation.

論文審査委員 主 査 准教授 田辺 秀之
教授 深川 竜郎
教授 堀内 嵩
教授 胡桃坂 仁志（早稲田大学）

The kinetochore is a specialized structure of each chromosome that is responsible for microtubule attachment and subsequent chromosome movement. The region formed kinetochore is defined as a centromere which consists of a number of protein complexes and centromeric DNA. The centromere's functions include sister chromatid adhesion and separation, microtubule attachment, chromosome movement, and mitotic checkpoint control. Thus, the centromere plays essential roles for accurate transmission of genetic material. Because cell division is an essential process from yeast to human, it is conceivable that the basic mechanisms for cell division machinery are conserved between many species. But analysis of centromeric DNAs in some species revealed that the primary DNA sequences are not conserved. In addition the protein components are relatively divergent. Therefore, we had failed to identify many centromere proteins in higher vertebrate cells, while more than 60 proteins were identified in yeast. Recent proteomic analyses helped to identify additional centromere proteins in vertebrate cells. After identification of proteins it is essential to study organization and functions of these proteins to understand the mechanisms of chromosome segregation.

The constitutive centromere associated network (CCAN) proteins associate with centromere region even in interphase and make a platform for formation of functional kinetochore during mitosis. In previous analyses, our laboratory isolated a multi-subunit complex including the established inner kinetochore components CENP-H and CENP-I, and nine other CCAN proteins (CENP-H/I complex) and demonstrated that the complex is divided into three functional classes (CENP-H class, CENP-M class, CENP-O class) based on genetic analysis (Okada et al., 2006 Hori et al., 2008). Work from others identified CENP-T and CENP-S as additional components of CCAN (Foltz et al., 2006). Both CENP-T and CENP-S have not been identified in our purification with CENP-H, CENP-I, CENP-O, or CENP-P, suggesting that they may represent distinct functional classes. To analyze the function of CENP-T and CENP-S, I characterized CENP-S and CENP-T in DT40 cells by creating loss of function mutants. The purposes of this study are

- (1) identification of new components that associated with CENP-S or CENP-T,
- (2) clarification of relationship between CENP-T or CENP-S with the CENP-H/I complex,
- (3) understanding of function of CENP-T or CENP-S in centromere.

In Chapter I, I characterized CENP-S-deficient cells and found that CENP-S complex is essential for proper mitotic progression. To understand the function of CENP-S in mitosis I tried to identify proteins, which associate with CENP-S. Using biochemical analysis, I identified an additional CCAN component CENP-X, which makes a tight complex with CENP-S. Both CENP-S- and CENP-X-deficient DT40 cells were

viable, but these cells were delayed in G2/M. Moreover, I found that CENP-S deficient cells showed abnormal mitotic progression by living cell observation. Kinetochore localization of CENP-S or CENP-X was abolished in CENP-T or CENP-K-deficient cells, but kinetochore signals of all known kinetochore components were detected in CENP-S-deficient cells. To understand how mitotic defects were caused in CENP-S- or CENP-X-deficient cells, I examined the outer kinetochore structure by electron microscopy. The analysis revealed that the lengths of kinetochore outer plates in CENP-S-deficient cells were smaller than those of wild-type DT40 cells. This result suggests that the CENP-S/CENP-X complex is required for establishment of kinetochore outer plates. Thus, I concluded that the CENP-S/CENP-X complex is essential for proper mitotic progression in DT40 cells.

In Chapter II, I characterized the CENP-T complex. My colleagues and I characterized the CENP-T containing sub-complex and identified CENP-W, which makes a tight complex with CENP-T. To understand the function of the CENP-T/CENP-W complex, I created loss of function mutants of CENP-T. CENP-T-deficient cells accumulate in metaphase and subsequently die, suggesting that CENP-T is essential for cell viability and mitotic progression. Interestingly, both CENP-T and CENP-W contain histone-fold domain and directly bound to centromeric DNA (Hori et al., 2008). Therefore, it was predicted that CENP-T and CENP-W function upstream of other CCAN proteins. In our experiment, kinetochore localization of CENP-T and CENP-W did in fact occur upstream of other CCAN components with the exception of CENP-C, an additional putative DNA binding protein. Consistent with this observation, kinetochore outerplate structure was abolished in CENP-T or CENP-W-deficient cells.

論文の審査結果の要旨

細胞が分裂する際、染色体上のキネトコア（動原体）に紡錘糸が付着し、両極へ牽引され、予め2倍に複製されていた染色体は2つの娘細胞へ均等に分配される。この仕組みにより、染色体上のゲノム遺伝情報はそれぞれの娘細胞へ正確に伝達されるが、染色体分配の中心を担うキネトコアを構成するタンパク質群にはまだ未同定なものが存在すると考えられている。本博士論文は、「キネトコア形成に関わるタンパク質群の細胞生物学的解析」と題して、キネトコアを形成する染色体上のセントロメア領域に存在するタンパク質である CENP-S（第1章）および CENP-T（第2章）に関する細胞生物学的解析を行ったものである。セントロメア領域には DNA とそこに結合するタンパク質群によりネットワーク構造が形成されており、細胞周期を通じてセントロメア領域に結合するタンパク質群を総称して、構成性セントロメア結合ネットワーク（constitutive centromere-associated network ; CCAN）と呼ぶ。CCAN は主として CENP-H/I、CENP-M、CENP-O の3つのクラスに分類されているが、CENP-S および CENP-T は共にどのクラスに所属しているか不明な点もあった。そこで本博士論文では、以下の流れに沿って各解析を行っている。

- 1)免疫沈降法を用いた生化学的精製と質量分析解析により、CENP-S、CENP-T それぞれに堅く結合する新規タンパク質 D9、CUG2 を単離し、アミノ酸配列を同定した。さらに GFP をタグとした局在解析からそれぞれ細胞周期を通じてセントロメア領域に存在する新規 CCAN であることを明らかにし、CENP-X、CENP-W と命名した。
- 2)DT40 細胞を用いることにより、CENP-S、CENP-X、および CENP-T、CENP-W の各ノックアウト (KO) 細胞株を構築した (CENP-T、CENP-W に関しては条件誘導型)。
- 3)KO 細胞の表現型解析から、CENP-S、CENP-X および CENP-T、CENP-W は正常な細胞分裂に必須なタンパク質であることを明らかにした。また、各種 CENP タンパク質の KO 細胞株を組み合わせた免疫蛍光抗体法により、CENP-S、CENP-X は CENP-H より下流に存在すること、CENP-T、CENP-W は CENP-H より上流に存在し、特に CENP-T の C 末端側にヒストンホールドドメインが存在することを見出した。これは CENP-T/CENP-W 複合体が他の CCAN タンパク質と結合しつつ、セントロメア DNA 領域と直接結合していることを示唆するものであり、大変重要な発見となっている。
- 4)電子顕微鏡を用いたキネトコア・アウタープレートの観察を行い、CENP-S-KO 細胞では、アウタープレートの長さが短くなっていること、CENP-W-KO 細胞ではアウタープレートの数が少なくなっていることを見出し、アウタープレート形成過程における機能的な役割が CENP-S と CENP-W でそれぞれ異なっていることを明らかにした。

以上のように、本博士論文では多数の重要な新知見が盛り込まれており、本論文は博士(理学)に十分値するものであると判断した。なお、CENP-T/CENP-W の機能解析に関する部分は、国際学術誌である Cell 誌に掲載済みであり、CENP-S/CENP-X の機能解析に関する部分は、論文の投稿準備中である。

公開講演会では、CENP-S、CENP-T の細胞生物学的な解析結果について、本博士論文のセクションに沿った発表が行われた。特に CENP-S、CENP-T それぞれに堅く結合する

新規タンパク質 CENP-X、CENP-W の同定と特性を示した点、各種 KO 細胞の構築とその表現型解析、CENP-T/CENP-W 複合体の DNA 結合能、キネトコア・アウタープレートの電子顕微鏡観察などはオリジナリティーの高い研究と評価された。公開講演会の質疑においては、CENP-S と CENP-X に関する構造機能の違いや、二重 KO 細胞の表現型解析、CENP-W の DNA 結合ドメインに関する質問がなされたが、それらに対し、明確な対応を行い、質疑応答は充実したものであった。

口頭試問では、審査員の質問やコメントに的確に対応し、特に CCAN における CENP-S、CENP-T の位置づけ、CENP-T/CENP-W 複合体の DNA 結合能、アウタープレートの形成過程に関する考察など、本博士論文には改めて様々な重要な知見が多く盛り込まれていることを印象づけられた。在籍中に多くの実験手法を学び、それらを実行、修得して多くの考察を施した研究態度から今後の発展の可能性を窺うことができた。

語学力に関しては、英文で書かれている本博士論文から、問題ないと判断された。以上の観点から、天野美保さんは総合研究大学院大学 先導科学研究科の課程博士（理学）としての要件を満たし、学位授与に相応しいと判断された。