

氏 名 鈴木 應志

学位 (専攻分野) 博士 (理学)

学位記番号 総研大甲第 1344 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 24 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 Ultrastructural analysis of kinetochore

論文審査委員 主 査 教授 荒木 弘之  
教授 仁木 宏典  
教授 角谷 徹仁  
教授 広海 健  
部長 広田 亨 (癌研究所)

Chromosome segregation during cell division is essential for maintenance of life including reproduction and development in all organisms. Center to accurate chromosome segregation is the assembly of kinetochore on chromosome that forms a dynamic interface with microtubules from the mitotic spindle. Centromere is a specialized region of chromosome that directs kinetochore assembly and plays an important role for accurate chromosome segregation.

A tri-lamina plate structure including an inner plate, an outer plate, and an inter zone is observed in the kinetochore by electron microscopy. Many proteins have been mapped in the tri-lamina structure of kinetochore. However, it is still unclear how these proteins are involved in formation of the plate structure. Therefore, I tried to observe the plate structure in chicken DT40 cells with knockout of various kinetochore proteins, including CENP-H, CENP-C, CENP-T/W, Knl1, Mis12, and Ndc80. I did not detect any plate structure in Ndc80 (Hec1)-deficient cells, suggesting that Ndc80 itself or Ndc80 interacting proteins can play critical role for formation of the outer plate structure.

CENP-S/X complex is recently found as a component of constitutive centromere associated network (CCAN) protein complex. Interestingly, we found that CENP-S/X-deficient DT40 cells are viable. However, we observed defects during progression of mitosis in CENP-S/X-deficient cells. Therefore, I am interested to examine the outer plate structure in the CENP-S/X-deficient cells. I found that the outer plate length was shorter and intra-kinetochore distance was increased in CENP-S/X-deficient cells without tension, suggesting that CENP-S/X complex is involved in stable assembly of the outer plate. Consistent with my observation, amount of Ndc80 and KNL1, which are located at outer plate, was decreased. Thus, I concluded that the CENP-S/X complex is an important CCAN component involved in formation of outer kinetochore structure.

Ultrastructural analysis of kinetochore has lasted over 50 years, because kinetochore is unique. Kinetochore locates primary constriction of condensed chromosomes and it directly interacts with microtubules. Kinetochore has a tri-lamina structure I mentioned above. Although we could observe electron dense outer plate structure in mitotic chromosomes without microtubules, it is difficult to observe outer plate structure in mitotic chromosome under tension. In addition, it is also difficult to detect inner plate structure because of technical limitations. As inner plate locates within electron dense chromatin regions, it is difficult to distinguish inner plate from chromatin by conventional electron microscopy observation. As a result, the structural

dynamics within the kinetochore during mitosis is still unclear. To address this question, I examined the kinetochore dynamics in details by immuno-electron microscopy analysis.

CENP-T is a component of constitutive centromere associated network (CCAN) proteins and has associated with centromeric DNA. I firstly determined localization of CENP-T in the kinetochores of DT40 cells treated with nocodazole. I found that CENP-T localize ~100 nm inside the outer plate, suggesting that CENP-T localizes into the inner kinetochore. I then used CENP-T to visualize the inner plate structure and measured length and width of the inner plate. Interestingly, I found that width of the inner plate was increased, treating cells with MG132, in which microtubules attach to the kinetochore and pull chromosomes with tension. These results suggest that the inner kinetochore is stretched under tension caused kinetochore-microtubule interaction. I also measured length and width of Ndc80 staining, which is an outer kinetochore protein and observed that width of the outer plate is not increased in cells treated with MG132, suggesting that the outer plate structure is stable even under tension.

I also examined that this structural change within inner kinetochore was occurred in various knock out cell lines of representative kinetochore proteins. I found that kinetochore-microtubule binding was essential for the inner kinetochore stretching, because I could not detect it in Ndc80-deficient cells. However, I found that the inner kinetochore stretching was not required for cohesion. By contrast, the structural change within inner kinetochore was not observed in cells expressing a mutant form of Ndc80, which shows low affinity with microtubules and these cells were arrested at mitosis by activation of the spindle assembly checkpoint (SAC). I proposed that the structural change within inner kinetochore is essential for faithful chromosome segregation and required for proper kinetochore-microtubule binding and inactivation of SAC.

## 博士論文の審査結果の要旨

細胞分裂時に、染色体が娘細胞に正確に分配されることは、生命の維持に必須である。この際、紡錘糸が染色体上の動原体に結合し、染色体は娘細胞へと分配されていく。動原体はセントロメアにタンパク質が結合したもので、近年多くの構成タンパク質が同定されてはいるが、詳細な構造及び構造と機能の関係については明らかになっていない。鈴木應志君は、遺伝子改変が容易なニワトリ DT40 細胞を材料に電子顕微鏡観察法を駆使し、動原体の微細構造と機能の関係に迫った。本博士論文は 2 章からなり、第 1 章では outer plate, middle layer, inner plate の三層からなる動原体の outer plate 形成の機序について、第 2 章では染色体分配時に起こる動原体の形態変化について述べられている。

第 1 章では、セントロメアに常時結合する一群のタンパク質である Constitutive Centromere Associated protein Network (CCAN) と KMN タンパク質群 (Knl1, Mis12, Ndc80) に依存して outer plate が形成されることを示した。まず DT40 細胞の動原体の電子顕微鏡観察法を確立し、outer plate の構造と大きさは染色体間で差がないことを明らかにした。さらに、outer plate の形成効率が、CCAN に属する CENP-T/W 複合体、CENP-H/I 複合体、CENP-C の変異細胞や、KMN タンパク質の欠損で低下していることを示した。この結果は、KMN タンパク質の局在が CCAN タンパク質に依存することから、KMN タンパク質やそれに結合するタンパク質が outer plate を形成していることを示唆している。一方、CCAN に属する CENP-S/X 複合体欠損細胞では、outer plate は形成されるが短く、outer plate と染色体の間隔が広がっていた。そのため、CENP-S/X は機能的な outer plate を形成する調節タンパク質ではないかと考察している。

第 2 章では、動原体と紡錘糸の結合により生じる張力に依存して inner plate と outer plate の間隔が広がること、そしてそれが inner plate の伸長によることを示した。まず、免疫電顕法により CENP-T が inner plate に、Ndc80 が outer plate に局在することを示し、これらを指標として動原体の微細構造を調べた。その結果、プロテアゾーム阻害剤 MG132 処理した細胞（動原体に紡錘糸が結合し張力が生じる状態で停止）では微小管重合阻害剤ノコダゾールにより処理したもの（動原体に紡錘糸が結合せず張力なし）より inner plate と outer plate の間隔が広がっていることが分かった。ノコダゾール処理細胞では、CENP-T (inner plate) は染色体上に長形状（長軸が染色体長軸と平行）に局在するが、MG132 処理では局在域の長軸は短くなり短軸は伸長し楕円形の局在となった。Ndc80 (outer plate) ではこのような変化は観察されないことから、inner plate の伸長により outer plate との間隔が広がったと結論している。さらに、outer plate が出来ないために紡錘糸が動原体に結合しない Ndc80、CENP-H の欠損細胞や、紡錘糸との結合能が低下した変異型 Ndc80 (AuroraB キナーゼによりリン酸化されるアミノ酸残基をアスパラギン酸残基に置換したもの) では inner plate は伸長しないことから、動原体と紡錘糸の結合による張力の発生が inner plate の伸長に必要であることが強く示唆された。また、CENP-T の局在変化が起こらない変異細胞ではスピンドルチェックポイント (SAC) が活性化されないため、この変化と SAC の関係を示唆している。

本研究は DT40 細胞の動原体の微細構造を初めて明らかにしたものであり、変異細胞を用いることにより動原体形成の機序を電子顕微鏡レベルで示したものである。また、

動原体の inner plate が outer plate と紡錘糸の結合から発生する張力により伸長するという発見は、動原体構造と機能の研究に新たな知見を加え、今後の関連分野の発展に大きく寄与するものである。以上の理由から、鈴木應志君の学位提出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。