

氏 名 香川 尚子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1458 号

学位授与の日付 平成 23 年 9 月 30 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 Functional analyses of the CENP-O complex in mice

論文審査委員 主 査 教授 城石 俊彦
教授 荒木 弘之
教授 相賀 裕美子
助教 小久保 博樹
准教授 佐渡 敬 （九州大学）

During cell division, it is important to ensure that the genomic information is faithfully transmitted to daughter cells. To achieve correct segregation of chromosomes, specialized apparatus are built and complexly regulated during eukaryotic cell division. The kinetochore is one of these apparatus. The kinetochore forms a large structure on centromere DNA and plays important roles in mitotic progression by microtubule attachment. The kinetochore of higher eukaryotes has a trilaminar structure that consists of the inner plate, outer plate and midzone. The inner plate functions as the foundation of kinetochore formation. While a large number of proteins that localize to the inner kinetochore have been identified recently, precise functions of each kinetochore protein are poorly understood and little is known about their functional role especially in organismal context.

The CENP-O complex that consists of CENP-50/U, O, P, Q, and R constitutively localizes into the kinetochore and is required for recovery from spindle damage in chicken DT40 cells. While DT40 cells with KO of most proteins localized in inner kinetochore die, DT40 cells lacking CENP-O class proteins are still viable. Therefore, we focus on functional role of the CENP-O class proteins in organismal context.

Previous study showed that mouse ES cells and mice lacking CENP-50/U die within several days and early development, respectively, while chicken DT40 cells with KO of CENP-50/U are viable. This observation suggests that the CENP-O complex plays an essential role in early development of mice. Notably, knockout phenotype of CENP-R in DT40 cells is different from that of other CENP-O complex proteins in some aspects and kinetochore localization of CENP-R occurs downstream of other complex proteins. CENP-R may play a different role from that of other CENP-O complex proteins. It is important to examine function of CENP-O class proteins including CENP-R in organismal context.

In this study, ES cell lines and mice lacking CENP-R were created to elucidate the function of CENP-O class proteins in mice, and their phenotypes were compared with that of CENP-50/U.

Although mice with knock out of CENP-50/U were not viable, and died within early embryogenesis, CENP-R null mice were viable and normally produced offspring, suggesting that CENP-R is not essential in mice and has different role from that of other CENP-O complex proteins.

To elucidate that the lethality of CENP-50/U deficient mice is caused at a cellular level, ES cells lacking CENP-50/U or R was generated. Although ES cells with KO of CENP-50 /U were not viable and died within several days, ES cells lacking CENP-R normally propagated. In addition, mitotic index and the number of anaphase with lagging chromosomes were increased in ES cells lacking CENP-50/U. These results

suggest that the lethality of mice lacking CENP-50/U is caused at a cellular level, and each cell in mice lacking CENP-50/U dies due to some mitotic defects. I also confirmed that the kinetochore structure and the dependencies of kinetochore localization of CENP-O class proteins are conserved between chicken DT40 cells and mice ES cells. Chicken DT40 cells are derived from chicken B cells, and DT40 cells lacking CENP-50/U are viable. Therefore, I expected that the viabilities of mice cells lacking CENP-50/U are different among cell types. To examine that, I generated inducible knockout mice in which CENP-50/U is removed by ERT2-conjugated Cre recombinase. I isolated mouse embryonic fibroblast cells and B-cells from adult inducible knockout mice of CENP-50/U. As a result, both mouse B cells and mouse embryonic fibroblast cells were viable and normally propagated when CENP-50/U was removed from kinetochore after OHT addition although ES cells lacking CENP-50/U are lethal. I concluded that the importance of CENP-50/U in mitosis is different among cell types in mice.

In living organism, there are various cell divisions such as meiosis, segmentation of fertilized egg or asymmetric cell division in which machinery of chromosome segregation, growth rate, mitotic regulation and other aspects are different in detail. In addition, the frequency of chromosome missegregation is different among cell types. It is possible that the kinetochore has a function in strict regulation of these particular cell divisions, however, little is known about kinetochore functions and variety in organismal context. In this study, I showed that the importance of CENP-50/U differs among cell types. From this result, I suggested that CENP-50/U may be required for these strict regulations of mitosis in mice.

博士論文の審査結果の要旨

細胞分裂において複製された染色体を娘細胞に正確に伝達することは重要な細胞機能である。これを達成するために、キネトコアと呼ばれる巨大構造がセントロメア領域に形成される。キネトコアは、M期には姉妹染色体接着、分配、微小管と染色体間接着、微小管アセンブリ、チェックポイントの維持に関与する。キネトコアに存在するタンパク質群は階層構造をとり、キネトコア構築の土台を形成する部分はインナーキネトコアと呼ばれている。この領域には、多くのタンパク質が存在するが、その詳細な機能は未解明である。CENP-O複合体は、CENP-O, -P, -Q, -U/50, -Rのサブユニットより構成されており、細胞周期を通じてインナーキネトコアに局在し、ニワトリDT40細胞ではスピンドルダメージからの回復に必要である。他のインナーキネトコアに存在するタンパク質を欠損させたDT40細胞は、分裂停止と致死という表現型を示すのに対し、CENP-O複合体の各サブユニットの欠損型DT40細胞は致死性を示さず、分裂に必須でないことがわかっている。一方、CENP-50/U 欠損マウスは胎生致死であり、CENP-50/Uが初期発生において重要な役割を果たすことが示されている。以上から、CENP-O複合体の機能は個体を構成する細胞の種類によって異なる可能性が考えられた。そこで、香川さんは、本学位論文においてCENP-O複合体のサブユニットの内、50/UとRの二つを対象にマウスを材料として個体レベルでの機能を比較解析した。

香川さんは、まずCENP-Rの欠損ES細胞およびマウスを作製し、その表現型をCENP-50/Uと比較した。この結果、CENP-50/U欠損ES細胞および変異マウスが致死性を示すのに対し、CENP-R欠損ES細胞や変異マウスは致死性を示さず、妊性を含めて変異マウスには大きな表現型異常は認められなかった。したがって、CENP-Rは通常の飼育条件下でのマウスの発生、生育には必須ではないと考えられた。またCENP-R欠損マウスとCENP-50/U欠損マウス間で大きく表現型が異なることから、CENP-RはCENP-O複合体の中でも他のサブユニットとは違う役割を果たしていることが示唆された。CENP-50/U欠損ES細胞の細胞学的解析から、M期細胞の割合と染色体不分離発生頻度が上昇しており、CENP-50/Uマウスの致死性が、M期の異常と関係していることが示唆された。

香川さんは、次にCENP-50/U欠損細胞の表現型が、DT40細胞と、ES細胞で異なることに着目し、CENP-50/U欠損細胞の致死性がマウスの細胞種間で共通かどうか解析した。このために、OHT誘導性のCENP-50/U欠損マウスを樹立し、マウス胎児線維芽細胞とB細胞を単離した。CENP-50/U欠損ES細胞が致死であるのに対して、これらの細胞は、OHTによりCENP-50/Uを破壊した後も正常に増殖し、CENP-50/Uが細胞増殖に必須でないことが分かった。したがって、CENP-50/Uの細胞分裂における重要性

は、細胞種によって異なることが明らかになった。

動物個体は、減数分裂や非対称分裂など異なった分裂様式を示す細胞から構成されている。また、分裂速度や制御様式の異なる多様な細胞分裂が存在し、染色体異常の起きやすさも細胞種によって異なる可能性がある。この学位論文は、インナーキネトコアを構成するCENP-50/Uサブユニットの染色体分離の制御に関与する機能が細胞の種類によって異なる可能性をはじめて示したものであり、今後の関連分野の研究に大きな貢献をなし得るものとして評価できる。