

氏 名 西 橋 藍

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大乙第118号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 Genetic Approach To Study Centromere Function In
Vertebrate Cells : CENP-I is essential for
centromere assembly in vertebrate cells.

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 城石 俊彦
教授 佐々木 裕之
助教授 角谷 徹仁
助教授 奥村 克純 (三重大学)
助教授 仁木 宏典 (国立遺伝学研究所)

論文内容の要旨

細胞の分裂では、微小管が染色体の特殊領域であるキネトコアに結合し、染色体が娘細胞へと正確に分配されることによって正確な染色体分配機構が保証されている。キネトコアが構成される領域はセントロメアという言葉で定義され、そこに存在する DNA とタンパク質の複合体を指している。セントロメアは、単にキネトコア形成の場であるのみならず、姉妹染色体の対合や分離、染色体の移動、M 期チェックポイントタンパク質の制御に直接関与している。染色体分配の異常は、染色体の異数化、がん化、細胞死を招くが、高等脊椎動物のセントロメア形成機構に関する分子機構については不明な点が多い。したがって、高等脊椎動物のセントロメアの形成機構を研究する意義は大変大きい。

高等脊椎動物のセントロメアタンパク質のうち、CENP-A は細胞増殖に必須のタンパク質でありその機能的なホモログが酵母からヒトまで広く存在している。CENP-A はヒストン H3 のバリエーションで、セントロメア特異的にヒストン H2A, H2B, H4 とヌクレオソームを形成する。CENP-A がセントロメア特異的なヌクレオソームを形成することから、CENP-A の局在機構がセントロメア形成の引き金になると予想されている。分裂酵母では、Mis6 というタンパク質が CENP-A の局在に関与するという報告があるが、出芽酵母では、Mis6 のホモログである Ctf3 は CENP-A の局在に関与しない。本論文では、高等脊椎動物のセントロメア形成機構を理解するために、高等動物の Mis6 相同タンパク質について研究した。

DT40 は、ニワトリ B リンパ細胞株で、相同組換えが高率で起り、標的遺伝子破壊のシステムが確立されており、核型が安定で導入した変異の表現型が安定であることから、条件的ノックアウト株を用いた研究が広く行われている。このため、本論文では DT40 細胞を用いてセントロメアタンパク質の研究を行った。

はじめに、分裂酵母の Mis6 の配列を参考に Mis6 と相同性を示すニワトリ遺伝子のクローニングを試みた。本研究でクローニングしたニワトリ Mis6 は、分裂酵母 Mis6 とアミノ酸レベルで 25%の相同性を示した。この遺伝子の C 末端に GFP を結合させたプラスミドを構築し、DT40 細胞に導入した。Mis6-GFP のシグナルと複数のセントロメアタンパク質に対する抗体を用いた多重免疫染色の実験結果から Mis6 は CENP-A, C, H という構成的セントロメアタンパク質と同様に細胞周期を通じてセントロメアに局在するセントロメアタンパク質であることが示された。そこで、ニワトリ Mis6 を CENP-I と命名して、その機能解析を行った。

CENP-I のセントロメアでの機能を調べるため、テトラサイクリン誘導プロモーターを応用した CENP-I の条件的ノックアウト細胞株を作成した。本細胞株では、テトラサイクリンの添加によって CENP-I の発現を完全に抑えることができる。ノックアウト株にテトラサイクリンを添加してウェスタンブロッティング解析を行うと、12 時間後に CENP-I のシグナルは検出されず、CENP-I のターンオーバーは比較的早いことが示唆された。CENP-I 欠損下では、細胞は約 2.5 回の細胞周期を経て増殖速度の低下を示した後死滅し、CENP-I が細胞増殖に必須のタンパク質であることが示された。FACS 解析では、CENP-I 欠損細胞はテトラサイクリン添加 24 時間後から G2/M 期に蓄積し、36 時間後で 60%に達した。48, 60 時間後には 8N DNA が認められ、72, 96 時間で DNA の多くは分解していた。細胞生物学的観察ではテトラサイクリン添加 24 時間後から M 期の形態異常を示す細胞が増加し、48 時

間後で約 40%の細胞が異常な染色体形態を示した。48 時間後で分裂後期の細胞は観察されず、FACS 解析で示された G2/M 期の細胞の蓄積は G2 期より M 期での蓄積であり、分裂後期の前で遅延していることが示された。分裂中期で遅延している細胞では染色体の過凝縮が見られ、複数の染色体が分裂中期の赤道面に並んでいなかった。48, 72 時間後にはスピンドルの異常も観察され、72 時間後の細胞の多くはアポトーシスを起こして死滅していた。分裂酵母 Mis6 は G1/S 期で作用し、G1/S 期での Mis6 欠損が続く M 期に影響を与えると報告されている。そこで、CENP-I 欠損細胞の M 期での遅延が、G1/S 期の通過が関係しているかを FACS で解析した。CENP-I 欠損で G1/S 期を通過させなかった細胞では M 期の遅延が認められなかったが、G1/S を通過させた細胞では M 期遅延が観察された。これらの結果は、分裂酵母 Mis6 と類似して、CENP-I 欠損細胞の M 期での遅延は、CENP-I 欠損の状況で G1/S 期を通過することが原因であると結論づけた。

CENP-I 欠損細胞の染色体数を FISH で解析したところ、テトラサイクリン添加 24 時間後から異数性を示す細胞が増加し、CENP-I 欠損による M 期の遅延が染色体数にも影響を与えていることが示唆された。CENP-I 欠損細胞の M 期の遅延と微小管の動きをリアルタイムで観察するために、GFP を結合させた α -tubulin を CENP-I 条件的ノックアウト細胞株に導入した。この細胞株の DNA を Hoechst 33342 で染色し、37°C の条件下でタイムラプスの蛍光顕微鏡観察を行った。CENP-I 欠損下で細胞は染色体の形態異常を示し約 800 分の M 期での遅延が観察された。その後 α -tubulin は間期様の形態を示し細胞は分裂なしに細胞周期が進行し、アポトーシスを起こして死滅した。

CENP-I 欠損細胞におけるスピンドルチェックポイント蛋白 BubR1 の局在を免疫染色で観察したところ、テトラサイクリン添加 48 時間後には弱いながらもシグナルが認められたが、60, 72 時間後になるにつれて BubR1 の局在は消失した。この結果から CENP-I 欠損細胞の M 期の遅延はスピンドルチェックポイントの活性化によるものであり、チェックポイント制御が失われることで細胞周期の進行が起こることが示された。

CENP-I 欠損細胞を CENP-A, CENP-C, CENP-H に対する抗体で免疫染色した結果、CENP-A の局在には影響を与えなかったが、CENP-C と CENP-H の局在が変化した。また、CENP-H の欠損細胞を各種セントロメアタンパク質に対する抗体で染色した結果、CENP-A の局在に影響を与えなかったが、CENP-C と CENP-I の局在が変化した。以上の結果を合わせて考えると、CENP-I は、CENP-H, CENP-C のセントロメアの局在に必要であり、CENP-A の局在には関与しないことが示された。また、CENP-H の条件的ノックアウト株を用いた免疫染色の結果と合わせて、CENP-I は CENP-H と相互依存的にセントロメアに局在し、これが CENP-C のセントロメアへの局在に必要であることが示された。

論文の審査結果の要旨

セントロメアは、姉妹染色体の対合や分離、染色体の移動、M期チェックポイントの制御に直接関与している染色体領域である。

西橋さんは、不明の点の多い高等脊椎動物のセントロメア形成機構を理解するために、分裂酵母においてセントロメアタンパクとして機能することが報告されている Mis6 タンパク質のニワトリの相同遺伝子を同定し、相同組み換えが高頻度に起こる DT40 細胞株を用いて、その機能解析を行った。その結果、以下の重要な発見をした。

- (1) この遺伝子産物が CENP-A, C, H という既知の構成的セントロメアタンパク質と同様に細胞周期を通じてセントロメアに局在するセントロメアタンパク質であること示し、このタンパク質を CENP-I と命名した。
- (2) CENP-I の条件的ノックアウト細胞株を作成し機能解析を行った結果、CENP-I 欠損細胞は、分裂後期に細胞周期の進行が遅延し、染色体過凝縮、分裂中期の赤道面での配列異常を示した後アポトーシスによって死滅すること、この M 期の遅延が CENP-I 欠損の状態でも G1 期を通過する必要があること、M期チェックポイント依存的であることを明らかにした。
- (3) CENP-I 及び CENP-H の欠損細胞を用いて解析した結果、CENP-I は CENP-H と相互依存的にセントロメアに局在し、これが CENP-C のセントロメアへの局在に必要であることを示した。

これらの研究成果は、高等脊椎動物細胞のセントロメアの構造と機能の解明に重要な知見を与えるものであり、細胞周期調節機構をはじめとする細胞生物学に大きな貢献を果たしたものとして評価できる。

公開発表とそれに続く非公開の審査において、西橋さんは、多くの質問に対して的確に回答し、学位を受けるに相応しい学力をもっていることを示した。また、本論文の主要な成果についてすでに一流の国際誌に発表しており、英語で論文を作成する十分な能力を持っていることがわかった。以上、総合的にみて、本論文は学位を受ける水準に達しているものと審査員一同で判断した。