

博士論文概要

論文題目

紡錘体と動原体の形成を制御する
新規因子 **Kis1** の解析

Analysis of a novel factor, **Kis1**, which
regulates formation of the spindle and
kinetochores

申請者

平井	隼人
Hayato	HIRAI

生命医科学専攻 細胞骨格ロジスティクス研究

2018年12月

遺伝情報を担う染色体は複製された後に娘細胞へと均等に分配される。この過程が繰り返されることで同一の遺伝情報をもつ細胞が増殖する。染色体の不均等な分配は、細胞死あるいは細胞のがん化の原因となり得るため、染色体が均等に分配されるメカニズムを解明することは生物学的にも医学的にも重要な意味をもつ。本研究では、微小管の形成に寄与する新規因子の解析を通じて、染色体を均等に分配するための新たな分子メカニズムの一端を明らかにした。

第1章の序論では、本研究の内容を理解するために必要な知見について記載した。第1節では、複製された染色体が分裂期に娘細胞に分配される概略を説明した。複製された染色体は、分裂期に形成される紡錘体と呼ばれる装置によって分配される。紡錘体の主要な構成因子は細胞骨格のひとつである微小管である。第2節では、微小管からなる紡錘体がどのように形成されるのか概略を説明した。現在までに、紡錘体の形成に寄与する数多くの因子が発見され、機能の解析が行われている。しかしながら、未だに発見されていない紡錘体制御因子が存在すると考えられる。第3節では、そのような紡錘体の形成に寄与する未知の因子を発見するためにどのような研究が国内外でおこなわれているのか、その概略と問題点について述べた。これに対して、申請者が所属する研究室では分裂酵母を用いた遺伝学的なスクリーニングを展開しており、同節でその概略を説明した。スクリーニングでは、分裂酵母細胞内の微小管構造に異常を示す変異体を多数単離しており、そのなかには紡錘体の中央部分が脆弱になる変異体が含まれていた。そのなかのひとつの変異体について原因遺伝子を追究したところ、機能未知の新規遺伝子であることが判明し、当該遺伝子をその変異体の表現型から *kis1* (kinetochore and spindle defective) と名付けた。本研究では *kis1* 遺伝子がコードするタンパク質 (Kis1) が紡錘体の形成にどのように寄与するのかを明らかにする目的で、Kis1 の機能解析を行った。

第2章では、本研究を遂行する上で使用した大腸菌株、分裂酵母株、使用した培地を記載した。また、本研究で用いた実験手法について記載した。

第3章では Kis1 の解析結果について記載した。第1節では、Kis1 が染色体の均等な分配に必要であることを示した。先行研究のスクリーニングの過程で、*kis1* 変異体では染色体不安定性を示すことが示唆されていた。実際に染色体の分配が不均等になるかを調べるため、第2染色体のセントロメア部位が GFP で可視化された株を用いて染色体分配の様子を観察したところ、*kis1* 変異体で染色体が不均等に分配されることが明らかとなった。また、Kis1 は分裂酵母の生育に必須であることが判明したため、進化的に広く保存されている可能性が示唆された。そこで、Kis1 と相同性の高い配列が別の生物種にみられるか検索した結果、分裂酵母の近縁種内に相同性の高い配列が発見されたが、ショウジョウバエ、線虫、ヒトでは相同性のある配列は見つからなかった。

kis1 変異体では紡錘体の中央部が脆弱になる表現型が既に観察されていたが、詳細は明らかになっていなかった。そこで第2節では、分裂前期から後期まで経時的に紡錘体を観察した結果を示した。観察の結果、*kis1* 変異体では分裂中期から後期にかけて、紡錘体の太さを保つことができず、伸長できずに崩壊することが判明した。

第3節では、Kis1の細胞内局在を観察し、その観点から機能を推測した。*kis1* 変異体では紡錘体形成に異常を示したため、Kis1が微小管結合タンパク質である可能性が予想された。そこでKis1とGFP（緑色蛍光タンパク質）の融合タンパク質を細胞内で発現させ、その局在を観察したところ、微小管には局在せず、間期の細胞において1点のドット状に観察された。Kis1の局在箇所を特定したところ、動原体およびSPB（酵母の中心体に相当する器官）が隣接する位置にKis1が局在することが判明した。しかしながら、分裂期にはKis1は局在を消失させた。これらのことから、Kis1は分裂期には機能せず、間期に動原体あるいはSPBに局在することで紡錘体形成に寄与することが示唆された。

これらの結果から、Kis1は間期にSPBあるいは動原体の構築を促すことによって、分裂期の紡錘体形成を促進する可能性が予想された。そこで第4節では*kis1* 変異体においてSPBあるいは動原体を構成する因子の局在に異常がみられるかを検証した。その結果、主要なSPB構成因子はいずれも正常に局在したが、動原体の主要な構成因子のうち、動原体形成の基点となるCnp1/CENP-A（セントロメア特異的ヒストンH3バリエント）、および動原体の内側に位置するMis6/CENP-Iの局在が消失した。以上の結果から、Kis1は間期において動原体タンパク質Cnp1およびMis6の局在化に必要な因子であることが判明した。

第5節では、Kis1とCnp1およびMis6の遺伝学的相互作用を調べた。*kis1* 変異体でCnp1およびMis6の局在異常と、紡錘体形成異常の2つの症状を示すことから、これら2つの異常が独立して生じるのかを追究した。*mis6* 変異体においても*kis1* 変異体と同様に紡錘体の形成異常が観察された。このことからKis1はMis6およびCnp1を局在させることを介して、紡錘体の安定化に寄与していると結論付けた。

Mis6およびCnp1が局在するためには動原体因子のMis16-Mis18複合体が必要であること、およびMis16-Mis18複合体はKis1と同様に間期にのみ局在することが先行研究により明らかとなっていた。そこで第6節において、Kis1とMis16-Mis18複合体の関係性を追究したところ、両者には相互依存関係があることが判明した。さらに、申請者が所属する研究室において、Kis1とMis16-Mis18複合体が結合することが示された。以上のことからKis1はMis16-Mis18と複合体を形成することが判明した。

Kis1は動原体タンパク質Cnp1およびMis6の局在制御を介して紡錘体の安定

化に寄与することが第5節で示された。動原体の内側に位置するこれらのタンパク質がどのように紡錘体の安定化に寄与するのかを次に追究した。*kis1*変異体で紡錘体が不安定になる原因として、動原体と紡錘体微小管の接着が不十分である可能性が挙げられる。

そこで第7節では、動原体と微小管の接着の可否をモニターするために *Dis1* タンパク質の局在に着目した。*Dis1* は微小管結合タンパク質であるが、紡錘体微小管と動原体が結合することで動原体にも局在することが報告されている。*Dis1* の挙動を観察した結果、野生型に比べて *kis1* 変異体においては *Dis1* が動原体に局在しない細胞の割合が増加した。このことから、*kis1* 変異体では微小管と動原体の接着に欠陥があることが示唆された。

しかし、*kis1* 変異体では内側因子が局在を失っても、微小管と結合するために必要な *Ndc80* などの動原体の外側に位置する因子は正常に局在していた。そこで第8節では、*Cnp1* および *Mis6* など内側因子の消失が、なぜ微小管と動原体の接着異常をもたらすのかを追究した。*Cnp1* は動原体が形成されるセントロメア領域のヌクレオソームを構成することから、*Cnp1* の消失によりセントロメアの立体構造が野生型に比べて変形した可能性が挙げられる。そこで、セントロメアの中央領域（コアセントロメア）と周辺領域（ペリセントロメア）を蛍光タンパク質で可視化して、姉妹染色分体におけるこれら2領域の距離を測定した。その結果、姉妹染色分体のコアセントロメア間に生じる距離は野生型に比べて *kis1* 変異体では減少した。また、同一染色体内のコアセントロメア-ペリセントロメア間の距離は野生型に比べて *kis1* 変異体では増加した。このようなセントロメアの立体構造変化は、ヌクレオソームを構成するヒストンの状態が変化したことによると予想した。そこでクロマチン免疫沈降法により、コアセントロメアにおけるヒストンの結合状態を調べたところ、*kis1* 変異体では *Cnp1* 量が減少し、代わりにアセチル化を受けたヒストン H3 量が増加した。アセチル化型 H3 は DNA との静電的結合を弱め、クロマチン構造を弛緩させる可能性が指摘されており、その結果 *kis1* 変異体ではセントロメア構造に歪みが生じた可能性があると考えた。

以上の結果から、*Kis1* は *Mis16* および *Mis18* と複合体を形成して、間期に動原体タンパク質 *Mis6* および *Cnp1* のセントロメア局在を促進する。*Cnp1* はセントロメア構造の維持を介して、紡錘体と動原体の正確な結合に寄与すると結論付け、第4章では、既存の知見を踏まえて、得られた結果に対する解釈を記載した。

本研究では、新規因子 *Kis1* がヒストン H3 バリエーション *Cnp1* のセントロメアへの局在を規定すること、*Cnp1* ヌクレオソームはセントロメア領域を立体的に正しく構築すること、およびセントロメアの立体構造の維持が紡錘体微小管との結合およびその安定性に寄与することで、染色体の正確な分配に重要な役割を担うこと、などの新しい知見が得られ、染色体分配メカニズムの解明に貢献した。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 平井 隼人 印

(2018年 11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	○Hayato Hirai, Kunio Arai, Ryo Kariyazono, Masayuki Yamamoto, Masamitsu Sato The Kinetochore Protein Kis1/Eic1/Mis19 Ensures the Integrity of Mitotic Spindle through Maintenance of Kinetochore Factors Mis6/CENP-I and CENP-A. (PLoS One, 9-11-e111905, 2014)
学会発表	1. ○平井隼人、仮屋園遼、新井邦生、佐藤政充 スピンドル微小管と動原体を制御する新規遺伝子 <i>spm1(kis1)</i> の解析 第 36 回日本分子生物学会、日本・神戸、12 月・2013 年
	2. ○平井隼人、仮屋園遼、新井邦生、佐藤政充 紡錘体と動原体を制御する新規遺伝子 <i>kis1</i> の解析 第 66 回日本細胞生物学会、日本・奈良、6 月・2014 年
	3. ○平井隼人、仮屋園遼、新井邦生、佐藤政充 動原体構造とスピンドル微小管の安定化に寄与する新規因子 <i>kis1</i> の解析 酵母遺伝学フォーラム・第 47 回研究報告会、日本・東京、9 月・2014 年
	4. ○平井隼人、仮屋園遼、新井邦生、佐藤政充 <i>Kis1/Mis19</i> は動原体構造とスピンドル微小管を安定化する 第 32 回染色体ワークショップ、日本・広島、12 月・2014 年
	5. ○Hayato Hirai, Ryo Kariyazono, Kunio Arai, Masamitsu Sato The kinetochore protein Kis1/Eic1/Mis19 ensures the integrity of mitotic spindle through maintenance of kinetochore factor Mis6 and Cnp1 8th International Fission Yeast Meeting, Kobe, Japan, June 2015
	6. ○平井隼人、佐藤政充 分裂酵母 CENP-A がセントロメアに呼び込まれるメカニズムの解明 第 1 回クロマチン動構造ワークショップ、日本・北海道、7 月・2016 年
	7. ○平井隼人、佐藤政充 分裂酵母 CENP-A の呼び込みはヒストン H3 のアセチル化修飾により阻害される 第 34 回染色体ワークショップ、日本・千葉、1 月・2017 年
	8. ○平井隼人、佐藤政充 分裂酵母 CENP-A がセントロメアに呼び込まれる機構の解明 第 2 回クロマチン動構造ワークショップ、日本・北海道、7 月・2017 年

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>9. ○平井隼人、佐藤政充 分裂酵母 Mis6/CENP-I はセントロメアにおける CENP-A の維持に寄与する 第 35 回染色体ワークショップ、日本・愛知、12 月・2017 年</p> <p>10. ○平井隼人、佐藤政充 Mis6/CENP-I はセントロメアからノンコーディング RNA が転写される際に CENP-A を維持する 第 41 回日本分子生物学会、日本・神奈川、11 月・2018 年</p>