

博士論文審査報告書

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

2019 年 2 月

1. 論文内容の要旨

遺伝情報を担う本体である染色体は、複製された後に娘細胞へと分配される。この過程が繰り返されることで、同一の遺伝情報を持つ細胞が増殖する。このとき、染色体の分配は分裂期に形成される紡錘体と呼ばれる装置によって行われる。申請者が所属する研究室においては分裂酵母を用いた遺伝学的スクリーニングが展開され、その結果、紡錘体の形成に寄与する新規因子が単離されていた。当該因子は、その変異体の表現型から **Kis1 (kinetochore and spindle defective)** と名付けられた。申請者は、当該因子が紡錘体の形成にどのように寄与するのかを解明することを目的として、分子生物学的手法、細胞生物学的手法ならびに生化学的手法を用いて **Kis1** の機能解析を行った。

第一に、*kis1* 変異体における紡錘体の形成不全の表現型を確認した。微小管を緑色蛍光タンパク質 (GFP) で可視化し、分裂前期から後期にかけて経時的に紡錘体を観察した結果、*kis1* 変異体では紡錘体の中央部が脆弱になり、紡錘体が伸長できずに崩壊することが判明した。

第二に、*kis1* 変異体では、染色体のセントロメア領域に動原体が形成される際に、その基点となる **Cnp1/CENP-A** (セントロメア特異的ヒストン **H3** バリエーション)、および動原体の内側に位置する **Mis6/CENP-I** の局在が消失することを発見した。

さらに本研究では、これら 2 現象は互いに独立に起きるものではなく、**Cnp1** がセントロメアから消失することが原因で微小管の脆弱が引き起こされることを明確にした。すなわち、染色体上の動原体を構成する因子の一部が消失すると動原体と紡錘体微小管の結合が不安定になり、その結果、紡錘体微小管が脆弱になることが判明した。

これまでに、動原体の内側を構成する因子が紡錘体の安定化に寄与する報告例はなかった。そこで申請者は、**Cnp1** によるセントロメアの立体構造の正確な形成が、動原体と紡錘体微小管の結合に重要であると予想し、*kis1* 変異体におけるセントロメア構造を顕微鏡観察するとともに、生化学的な実験に基づき解析した。その結果、*kis1* 変異体ではセントロメアから **Cnp1** が消失し、代わりにアセチル化された **H3** が蓄積することで、姉妹染色分体におけるコアセントロメア間の距離が野生型に比べて減少することが判明した。

先行研究では、**Cnp1** は動原体タンパク質 **Mis16** および **Mis18** によってセントロメアに呼び込まれることが報告されていた。したがって、**Kis1** は **Mis16** および **Mis18** と協調的に **Cnp1** の呼び込みに働く可能性があると考え、これを追究したところ、これらが遺伝学的に相互作用することが判明した。

以上の結果から、**Kis1** は **Mis16** および **Mis18** と複合体を形成し、**Cnp1** および **Mis6** のセントロメア局在を促進すること、また、**Cnp1** はセントロメア領域を立体的に正しく構築することで動原体と紡錘体微小管の結合を安定化することが明らかになった。これらを基に、**Kis1** が動原体と微小管の結合を安定化することで紡錘体構造を安定化すると結論づけた。

2. 論文審査結果

2019年1月8日に開催した公聴会では、論文の内容に関する口頭発表とその内容についての議論が行われた。その概要を以下に示す。

- 1) *kis1* 変異体において、紡錘体の中央部が脆弱になる原因について質疑がなされた。申請者は、*kis1* 変異体では紡錘体微小管と動原体の結合が不安定になることに着目し、その状況下で動原体との結合を確立するために紡錘体微小管が重合・脱重合を繰り返す結果、紡錘体の中央部分が脆弱になると考察した。さらに、このような紡錘体微小管のダイナミクスを顕微鏡観察により可視化する手法について議論がなされた。
- 2) *Cnp1* の消失によるセントロメア構造の異常が、紡錘体微小管と動原体の結合を不安定にする原因について議論が行われた。申請者は、姉妹染色分体のそれぞれが有するコアセントロメア間の距離が減少することにより、*AuroraB* が動原体因子を恒常的にリン酸化することで、紡錘体微小管と動原体の結合が不安定化すると考察した。さらに、この仮説を検証するための具体的な実験方法について質疑がなされ、*AuroraB* の阻害剤や変異体を用いることで結合の異常が抑圧される可能性について議論がなされた。
- 3) セントロメアの構造と、コアセントロメアに含まれる *CENP-A* 量が生物種により異なる点が指摘され、両者の関係性について議論が行われた。申請者は、ヒト細胞に比べて分裂酵母では、コアセントロメアに含まれる *CENP-A* 量の比率が高いことから、分裂酵母では *CENP-A* がセントロメア構造に与える影響がより大きいと考察した。さらに、コアセントロメアに含まれるヌクレオソームの総量の違いがセントロメア構造の形成に与える影響について考察がなされた。
- 4) *kis1* 変異体において発現する変異型 *Kis1* タンパク質について議論が行われた。申請者は、制限温度下で変異型 *Kis1* の局在を観察し、その局在が消失することを確認している。*Kis1* に当該変異が生じたことにより *Kis1* と *Mis16* および *Mis18* との相互作用に欠陥が生じた可能性について議論がなされた。
- 5) *kis1* 変異体においては、*Cnp1* および動原体の内側を構築する因子 *Mis6* が局在を消失させるが、微小管が結合する部位である動原体の外側を構成する因子 (*Ndc80* など) は正常に局在することを申請者は観察している。このように外側因子が局在を維持する理由について質疑がなされた。これ

に対して申請者は、既に形成されている動原体から Cnp1 および Mis6 のみが急速に局在を消失したために外側因子が残存した状態にあると考察した。しかしながら、動原体形成の基盤となる Cnp1 が消失した状態のまま次の細胞周期へと進行すると新規の動原体形成ができないため、最終的に外側因子の局在も消失するであろうと推測し、結論づけた。

6) 生物種間で CENP-A がセントロメア領域に呼び込まれる時期が異なる点について議論が行われた。DNA が複製される際に CENP-A 量は半減するため、セントロメアに CENP-A を供給して量を補償する必要がある。CENP-A は分裂酵母では主に細胞周期の G2 期に呼び込まれるのに対して、ヒト細胞では G1 早期にのみ呼び込まれる。このように特定の時期にのみ CENP-A が呼び込まれる生物学的な意義について議論がなされた。

7) 発表内では今後の展望として、セントロメアに呼び込まれた後の Cnp1 が同所に維持される未知の分子機構が存在する点について言及があった。この Cnp1 の維持機構を解明するための具体的な研究手法について疑問があった。Cnp1 の維持に寄与する未知の因子をスクリーニングによって探索する場合、これをどのような手法でおこなうべきか、実験計画の概略についての説明が申請者によってなされた。また、申請者はすでに Cnp1 の維持に寄与する因子の候補を見いだしており、現在当該因子の解析が進行中である旨の説明がなされた。

以上の口頭発表ならびに質疑応答を通して、申請者が十分な学識を有していることが確認された。本研究は、細胞分裂において正確な染色体分配をおこなう分子機構として、セントロメアを介した微小管の安定化機構を新たに提案するものであり、当該研究分野の発展に貢献する研究内容であると考え、博士（理学）の学位論文として相応しいと判断した。

2019 年 2 月

審査員

主査	早稲田大学	教授	博士（理学）	東京大学	佐藤政充
副査	早稲田大学	教授	医学博士	山梨医科大学	大島登志男
副査	東京大学	教授	博士（学術）	埼玉大学	胡桃坂仁志
副査	早稲田大学	教授	理学博士	東京大学	仙波憲太郎