

氏名(本籍)	須賀田直子(千葉県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2545号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Molecular Characterization of a Novel Kinetochore Protein CENP-H (新規キネトコア蛋白CENP-Hのクローニングと機能解析)
主査	筑波大学教授 理学博士 宗像英輔
副査	筑波大学教授 農学博士 馬場忠
副査	筑波大学教授 農学博士 深水昭吉
副査	筑波大学教授 農学博士 田仲可昌

論文の内容の要旨

キネトコア(動原体)は細胞分裂期に紡錘糸が結合する染色体の一次狭窄部(セントロメア)に形成されるDNA-蛋白質複合体であり、分裂期のヘテロクロマチン構造維持や正常な姉妹染色体分配到に重要な役割を持つ。キネトコアに存在する蛋白質はその一部が同定されているものの、個々の分子の機能や細胞分裂の制御機構はほとんど解明されていない。

本研究ではまず新たなキネトコア蛋白質CENP-H(後に命名)遺伝子を単離同定した。CENP-Hはマウス細胞株SKT6から新規遺伝子探索の過程で単離し、さらにマウス遺伝子をプローブとしてヒトCENP-Hをクローニングし配列決定した。二者の相同性はアミノ酸レベルで67%でcoiled-coil構造を保存していた。既知の遺伝子との相同性は見出されなかった。RT-PCRによりマウス各組織での発現レベルを解析し、増殖組織で発現が高い傾向が見られた。

抗マウスCENP-H抗体を作製し、そのウェスタンブロット解析からマウス細胞抽出液において33kDaの蛋白質を特異的に検出した。次にこの抗体を用いてCENP-Hの細胞内局在を免疫染色で検討し、CENP-Hが細胞周期の間期には核内に斑点状に存在し、分裂期には染色体上の狭窄部に点状ペアとして局在することを発見した。抗セントロメア抗血清との二重染色ではCENP-Hの局在が細胞周期を通じてセントロメア領域と一致することを同定した。これまでにキネトコア蛋白質としてCENP-AからCENP-Gまでが報告されていることから、この新規蛋白質をCENP-Hと命名した。

続いてキネトコア/セントロメアの研究が進んでいるヒト細胞で解析を行うため抗ヒトCENP-H抗体を作製し、CENP-Hの局在と既知蛋白質のキネトコア内での微小局在を共焦点レーザー顕微鏡にて比較した。CENP-Hの局在はCENP-B(ヘテロクロマチン領域に局在)とは両端でのみ一致し、またキネトコアfibrous coronaに局在するCENP-Eとは僅かに相違が見られた。一方CENP-A及びCENP-C(inner plateに局在)とは細胞周期を通じて完全に一致した。これらの結果からCENP-Hはキネトコアinner plate領域に局在するものと同定した。

さらにセントロメアの機能とCENP-Hの局在との関係を明らかにする目的で、特殊なセントロメアを持つ染色体を材料にして実験を行った。一つはネオセントロメア染色体で、切断により生じた染色体断片が新たに機能的なセントロメアを獲得したものである。この染色体を含む二細胞株では分裂期染色体の全てのネオセントロメア上でCENP-Hが検出された。もう一つは二染色体が融合した結果、一染色体が二つのセントロメアを保持したダ

イセントロメア染色体で、通常一方が不活性することで機能的にモノセントロメアとなる。二細胞株を調べ、CENP-Hはダイセントロメアのうち常に機能的な側のみ局在が観察され、不活性化した側では消失していた。これらの結果からCENP-Hの局在は染色体のDNA配列に依存するのではなく、セントロメアの機能、すなわちキネトコア形成能に密接に関係することが示唆された。

最後にCENP-Hと相互作用する蛋白質を明らかにするためCENP-Hと局在の近いセントロメア/キネトコア蛋白質を中心にCENP-H自身を含むキネトコア蛋白質との*in vitro*結合実験を行い、CENP-Hがヘテロクロマチン領域に存在するMCAK (Mitotic Centromere-Associated Kinesin) と結合すること、またCENP-H分子が相互作用することを明らかにした。さらにHAタグ及びFlagタグ付きCENP-Hを共発現した細胞抽出液での免疫沈降によりCENP-Hの多量体形成は*in vivo*においても証明された。

本研究で単離した新規キネトコア蛋白質CENP-Hは常時セントロメア/キネトコアに局在する第四の蛋白質の発見である。本研究ではその局在がキネトコア inner plateにあること、局在とセントロメア機能が密接な関係にあることを証明し、さらに他のキネトコア蛋白質との相互作用やCENP-H自身の多量体形成を明らかにした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

キネトコア (動原体) は細胞周期分裂期に紡錘糸が結合する染色体の一次狭窄部 (セントロメア) に形成されるDNA-蛋白質複合体であり、分裂期のヘテロクロマチン構造維持や、正常な姉妹染色体分配に重要な役割を持つ。キネトコアに存在する多数の蛋白質は、その一部が同定されているものの、個々の分子機能やキネトコア全体の制御機構は今日までほとんど解明されていない。

本研究ではまず新たなキネトコア蛋白質CENP-H (後に命名) 遺伝子を単離同定しているが、これはマウス細胞株SKT6から新規遺伝子探索の過程で単離され、241アミノ酸で新規の核蛋白質であった。さらにマウス遺伝子をプローブとしてヒトCENP-HのcDNAを単離し配列決定したところ、相同性はアミノ酸レベルで67%で、核移行シグナルとcoiled-coil構造を保存していたが、既知の遺伝子との相同性は見出されなかった。

抗マウスCENP-H抗体を用いたwestern blot解析からマウス細胞抽出液において33kDaの蛋白質を特異的に検出した。またマウスCENP-HのcDNA全長をヒト培養細胞に導入発現し、検出される蛋白質が内在性のものと同サイズであることを確認した。

次にCENP-Hの細胞内局在を免疫染色を行い、CENP-Hが細胞周期の間期には核内に斑点状に存在し、分裂期には染色体上の狭窄部に点状ペアとして局在することを見いだしている。そして抗セントロメア抗血清との2重染色を行い、CENP-Hの局在が細胞周期を通じてセントロメア領域と一致することを同定した。これまでに既知のキネトコア蛋白質としてCENP-AからCENP-Gまでが報告されていることから、この新規セントロメア蛋白質をCENP-Hと命名している。

続いて既知のセントロメア蛋白質が多く単離されているヒト細胞で研究を行うことを目的し、抗ヒトCENP-H抗体を作製し、キネトコア内でのCENP-Hの局在と、既知セントロメア蛋白質の局在を比較した。CENP-Hの局在は、CENP-B (ヘテロクロマチン領域) の両端でのみ一致し、CENP-E (fibrous corona 領域) とはわずかな相違が見られたが、CENP-A及びCENP-C (inner plate 領域) とは細胞周期を通じて完全に一致した。この結果から、CENP-Hがキネトコアのinner plate領域に存在することを示唆するものであった。

次に、キネトコアの機能性とCENP-H局在との関連性を調べるため、染色体異常により形成された2種の染色体を材料に用いて研究を行っている。neocentromereは、染色体異常により、通常存在しない染色体領域に新たに形成された機能的セントロメアであり、またdicentromereは1本の染色体に2つのセントロメアが形成された状態 (通常どちらか1つだけが機能的でもう1方は不活性状態) を示し、CENP-Hの局在は、セントロメア配列が存在しないneocentromere上でも検出されることが判明した。またdicentromere染色体上では、CENP-Hの局在が2つ

のセントロメアのうち機能的な側にのみ観察されることが示されたことから CENP-H の局在がセントロメア機能に密接に関連することが示唆された。

さらに、CENP-H と既知のキネトコア蛋白質の *in vitro* 結合実験を行い、CENP-H がヘテロクロマチン領域に存在するセントロメア蛋白質 MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) と結合する可能性を示した。また、CENP-H 自身は、*in vitro*、*in vivo* ともに多量体を形成していることを明らかにしている。本研究は細胞分裂の制御機構や染色体構造維持に解明の研究に寄与するところはきわめて大きいと思われる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。