

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 18 年度博士課程入学
氏 名 丹野 悠司
指導教員名 渡邊 嘉典

論文題目 ヒト体細胞分裂におけるシュゴシンの機能解析

第 1 章 序論

全ての真核細胞は、自身の染色体を複製することで遺伝情報を倍加し、細胞分裂の際にそれを均等に分配することによって自己複製を完結する。この染色体の均等分配の誤りによって染色体数の異常が生じた場合、細胞死や癌化などが引き起こされることから、染色体分配に関わる分子メカニズムの研究は、基礎生物学とともに医学的な見地からも重要な意味をもつといえる。

DNA 合成期に複製された姉妹染色分体は、コヒーシンと呼ばれるタンパク質複合体により全長に渡って接着が確立される。細胞が分裂期へと進行すると、分裂期キナーゼ Plk1 によるコヒーシンのリン酸化に依存して染色体腕部のコヒーシンが解離することで、腕部における染色体の接着が解消される。一方で、セントロメアでは接着が強固に維持されることにより、姉妹染色分体ペアが維持される。この接着によって、分裂期に形成されるスピンドル微小管が正しい姉妹染色分体ペアを認識することが可能となり、両極側から捕捉された姉妹動原体ペアは細胞赤道面へ整列する。この間、一本の染色体でも正しくスピンドルに捕捉されていなければスピンドルチェックポイントと呼ばれる機構が働き、分裂後期への移行が阻害される。すべての染色体が整列するとスピンドルチェックポイントが解除され、エンドペプチダーゼの 1 種であるセパレーズが活性化し、コヒーシンサブユニット Rad21 を切断することで姉妹染色分体の解離が起きる。

シュゴシンは、ヒトにおいては、Sgo1、Sgo2 の 2 つのパラログが知られており、両者ともに II 型プロテインホスファターゼ PP2A と複合体を形成してセントロメアへと局在し、Plk1 によるコヒーシンのリン酸化に拮抗してセントロメアにおける接着を維持するタンパク質であることが知られている。また、姉妹染色分体が解離せずに進行する減数第一分裂では、シュゴシンはセ

パレースによる切断からコヒーシンを保護する働きがある。しかしながら、体細胞分裂と減数分裂のシュゴシンの分子機能の違いをつくる機構などシュゴシンの働き及びその制御については未知の点が多く残されている。本研究では、体細胞分裂におけるシュゴシンの機能及びその制御機構の解明を目的とし、HeLa ヒト子宮頸がん細胞を用いて解析を行った。

第2章 分裂中期におけるシュゴシンの局在変化

シュゴシンは、姉妹動原体の内側の領域（インナーセントロメア）に局在しコヒーシンを保護することで、姉妹染色分体のセントロメアにおける接着を維持する。シュゴシンによるコヒーシン保護機構がどのように時空間的に制御されているのかについて解析するため、分裂期におけるシュゴシンの局在を Sgo1、Sgo2 の免疫染色を行い詳細に観察した。その結果、分裂前中期においてインナーセントロメアに見られる Sgo1、Sgo2 の局在が、分裂中期において動原体上へと変化することが明らかとなった。微小管脱重合剤であるノコダゾール処理によりスピンドルの形成が阻害された細胞では、Sgo1、Sgo2 の局在はインナーセントロメアに観察された。一方、プロテアソーム阻害剤 MG132 によって分裂中期へと停止させた細胞においては、大部分の Sgo1、Sgo2 が動原体に局在していた。

分裂中期染色体では、スピンドル微小管によって捕捉された姉妹動原体に両極側への張力が生じる。この張力に依存してシュゴシンの局在変化が引き起こされると考えられる。

第3章 シュゴシンの局在変化によるコヒーシン保護機構の解除

本研究により、分裂中期においてシュゴシンの局在がインナーセントロメアから動原体へと変化することが示された。本章では、シュゴシンの局在変化とコヒーシン保護機構との関係について解析を行った。はじめに、コヒーシンサブユニット Rad21 と Sgo1 の共免疫染色を行い、両者の局在を比較した。ノコダゾール処理を行った細胞では、インナーセントロメアにおける Sgo1 と Rad21 の共局在が観察された。これに対して、MG132 処理を行った細胞では、Sgo1 の動原体への局在変化とともに Rad21 シグナルの消失が観察された。

この結果から、シュゴシンが動原体へと局在変化した染色体では、コヒーシンの保護機構が解除されている可能性が考えられた。この可能性について検討するため、ギムザ染色を行った分裂期染色体標本を用いて染色体接着について解析を行った。その結果、ノコダゾール処理を行った細胞では染色体の接着が維持されていたのに対して、MG132 処理により分裂中期へと停止させた細胞では姉妹染色分体の解離が見られた。

次に、分裂後期において人工的にシュゴシンをインナーセントロメアにとどめることで、コヒーシンの保護が起こる可能性について検討を行った。スピンドルチェックポイント制御因子 Mad2 を RNAi によりノックダウンした細胞にノコダゾール処理を行い、スピンドル形成を阻害したまま分裂後期へと進行させ、Sgo1、Rad21 それぞれの局在を免疫染色により解析した。その結果、スピンドル微小管を欠損した分裂後期では、Sgo1 の局在がインナーセントロメアにとどまり、Rad21 のシグナルも残存していた。

以上より、スピンドル微小管が姉妹動原体に及ぼす張力の結果、何らかの分子機構が働いてシュゴシンの局在がインナーセントロメアから動原体へと変化し、コヒーシンの保護機構が解除されたと考えられる。

第4章 染色体の接着と整列における Sgo2 の機能

Sgo1、Sgo2 は、ともに PP2A と相互作用しセントロメアにおける接着を維持する機能を持つ。本章では、これら2つのシュゴシンの間に機能的差異があるかについて検討を行うため、Sgo1、Sgo2 それぞれを RNAi によりノックダウンした細胞の表現型について詳細な解析を行った。まず、分裂期に同調した細胞の染色体接着について経時観察を行った。その結果、Sgo1 RNAi 細胞では分裂期への進行直後に姉妹染色分体の解離が引き起こされたのに対し、Sgo2 RNAi における解離は分裂期への同調から 10 時間後に顕著な増加が観察された。この結果から、Sgo2 RNAi 細胞における姉妹染色分体の解離は、Sgo1 RNAi 細胞と比較して遅れて生じることが明らかとなった。

次に、分裂期を通しての染色体の動態について詳細な解析を行った。ヒストン H2B を緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識した細胞に RNAi を行い、Sgo1 または Sgo2 をノックダウン後、ライブイメージング観察を行った。その結果、Sgo1 RNAi 細胞では、染色体が細胞赤道面に整列するタイミングで姉妹染色分体の解離が見られたのに対し、Sgo2 RNAi 細胞では大部分の染色体が赤道面に整列してから約 5 時間後に解離が観察された。また、Sgo2 RNAi 細胞では、解離が生じるまでの間に染色体の整列に異常が観察された。

以上より、Sgo2 RNAi は、Sgo1 RNAi よりも染色体の解離のタイミングが大きく遅れること、また、Sgo2 は染色体の接着だけでなく整列にも役割を担っていることが明らかとなった。

第5章 Aurora B による Sgo2 のリン酸化は染色体の接着と整列を制御する

先行研究において、Sgo2 が PP2A 及び分裂期セントロメアキネシン (MCAK) のセントロメア局在に必要であることが報告されている。Sgo2 は、PP2A の局在制御を行うことで染色体接着に関する役割を担っている可能性が考えられる。また、MCAK は微小管脱重合活性を持つタンパク質で、スピンドル微小管と動原体の接続を制御し染色体を正しく整列させる因子であることが示されている。このことから、Sgo2 の染色体整列における役割は、MCAK の局在化を通じて行われている可能性が考えられる。これらの可能性について検討するため、まず Sgo2 が PP2A、MCAK をセントロメアへと局在化させる分子機構について解析を行った。これまでに、分裂期キナーゼ Aurora B が、染色体の接着と整列及び MCAK の局在化に必要であることが報告されていた。また、Aurora B を阻害した細胞において、PP2A の局在の減少が見られた。以上より、Aurora B が Sgo2 と PP2A、MCAK との相互作用を制御し、セントロメア局在を促進している可能性を検討した。まず、Aurora B 阻害剤処理を行った細胞を用いて Sgo2 の免疫沈降を行った。その結果、未処理細胞で観察された Sgo2 に対する PP2A、MCAK の共沈降が見られなくなった。

次に、*in vitro* における Aurora B による Sgo2 のリン酸化について解析を行った結果、Sgo2 の

N 末端側と中央領域が Aurora B の基質となることを見出した。見出されたリン酸化部位のうちの 1 つのトレオニン残基に対してリン酸化特異的抗体を作製し、Western blotting を行った。その結果、Sgo2 は、細胞内においても Aurora B によってリン酸化されていることが示された。次に、大腸菌由来のリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* pull-down アッセイにより、Aurora B によりリン酸化された Sgo2 が MCAK、PP2A と直接的に結合する可能性を検討した。その結果、Aurora B によるリン酸化は、Sgo2 と MCAK、及び PP2A サブユニット B56 との結合を促進することが明らかとなった。B56 との相互作用には Sgo2 と B56 両方のリン酸化が必要であった。さらに、Sgo2 の N 末端側の 9 つの Aurora B コンセンサス配列をアラニンに置換した Sgo2-N9A、中央領域の 5 つの *in vitro* における Aurora B リン酸化部位を置換した Sgo2-M5A を用いて pull-down アッセイを行った。その結果、Sgo2-N9A に対する B56 の結合、及び Sgo2-M5A に対する MCAK の結合が弱まった。以上より、Aurora B による Sgo2 の N 末端側のリン酸化は B56 との相互作用を、中央領域のリン酸化は MCAK との相互作用を促進させることが明らかとなった。

次に、Aurora B による Sgo2 の制御機構が細胞内においても機能している可能性について検討を行った。Sgo2 RNAi 耐性サイレント変異を導入した野生型 Sog2 (Sgo2-WT)、Sgo2-N9A、Sgo2-M5A を HeLa 細胞へと発現させ、内在性の Sgo2 を RNAi によりノックダウンした後、PP2A、MCAK のセントロメア局在を免疫染色法により解析した。その結果、Sgo2-WT では PP2A、MCAK のセントロメア局在が観察された。Sgo2-N9A では MCAK のセントロメア局在は見られたが PP2A の局在が減少していた。また、Sgo2-M5A では PP2A のセントロメア局在は見られたが、MCAK の局在が減少した。Sgo2-N9A 発現細胞では姉妹染色分体の解離が観察され、Sgo2 による PP2A のセントロメア局在化が染色体接着に必要であることが示された。一方、Sgo2-M5A 細胞では染色体の整列異常を示す細胞の割合が増加しており、Sgo2 による MCAK の局在化は染色体の整列に寄与することが示唆された。以上より、Aurora B は Sgo2 のリン酸化を通して染色体の接着と整列を制御する可能性が示唆された。

第 6 章 総括

以上の実験結果より、スピンドル微小管による姉妹動原体への張力によってシュゴシンの局在変化が引き起こされ、コヒーシンから物理的に離れることでその保護を解除する可能性が示唆された。また、Sgo2 は分裂期における染色体の接着と整列を担う Aurora B の重要な基質の一つであることが明らかとなった。本研究は、適切な染色体分配を制御する分子メカニズムの一端を解明することにより、染色体の分配異常が原因となって生じる遺伝疾患や癌の理解に役立つことが期待される。