

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

保存されたチェックポイントタンパク質 Mad1 による  
染色体整列機構の解明

(The spindle assembly checkpoint protein Mad1 plays a conserved role  
in chromosome alignment)

氏名 明楽 隆志

### 序

遺伝情報であるゲノム DNA を子孫に正しく引き継ぐためには、分裂期における正確な染色体分配は必須である。染色体は、微小管から構成されるスピンドルと呼ばれる精巧な分裂装置によって、均等に娘細胞へと分配されていく。

染色体分配が正しく行われるためには、染色体上の姉妹キネトコアがそれぞれスピンドルの両極から伸長してきたスピンドル微小管と結合する必要がある。この結合はスピンドル形成を開始する分裂前期から分裂中期の間で徐々に成立するものであり、その過程には、キネトコアとスピンドル微小管とが正しく結合できていない染色体が存在する。このような染色体が正しい結合を作れないまま分裂後期での染色体分配を経ることは、不均等分配へと帰結し、最終的には細胞死、高等生物においては癌化につながる事が知られている。このような事態に陥らないために細胞は Spindle Assembly Checkpoint (SAC) と呼ばれる監視機構を備えている。スピンドル微小管と正しく結合できていないキネトコアが存在する場合、まず SAC の構成因子である Mad1 がそのキネトコアに局在する。次に Mad1 との直接の結合を介して Mad2 がキネトコアへと呼び込まれる。そして Mad2 は後期への移行に必須な APC (Anaphase Promoting Complex) の活性を阻害することにより、細胞周期を一時停止させる。SAC が時間を稼いでいる間に、全ての染色体においてキネトコアとスピンドル微小管との正しい結合が達成されると SAC は解除され、細胞は後期へと進行していく。このように SAC は正確な染色体分配を保障するうえで必須のシステムであり、その中心的な役割を担う Mad1, Mad2 いずれの機能欠損においても SAC の機能は完全に失われてしまう。

一方で、Mad1 には SAC 以外の分裂期の機能がある可能性がいくつかの生物において示唆されていた。例えばハエを用いた研究で、*mad1* 破壊株において *mad2* 破壊株で

は見られない染色体分配異常が顕著に観察されている。この結果は染色体分配における何か特異的な機能が Mad1 に備わっている可能性を示唆している。また分裂酵母を用いた研究で、微小管重合阻害剤である TBZ (Thiabendazole)を含んだ培地上での *mad1* 破壊株の生育が *mad2* 破壊株より悪いことが知られていた。TBZ はスピンドル微小管形成を阻害することで、染色体分配異常を検出しやすくする薬剤である。この結果から分裂酵母においても Mad1 が SAC 以外に染色体分配に特異的な機能をもつ可能性が考えられる。しかし、その機能がどのようなものかはこれまで明らかになっていなかった。

## 結果

### 1. Mad1 は Cut7 と直接結合する

Mad1 は、Mad2 結合ドメイン以外にはこれといった機能ドメインが知られておらず、Mad1 が未知の染色体分配機能を発揮するにあたり、新規相互作用因子と結合する可能性が考えられる。当研究室後藤により、分裂酵母の Mad1 を bait とした酵母 2 ハイブリッドスクリーニングが以前行われていた。私は、その相互作用因子群の中から Cut7/キネシン-5 に注目した。Cut7 は微小管のプラス端に向かって歩くモータータンパク質であり、これまでに双極性スピンドル形成に必須であることが知られていた。Mad1 と Cut7 との結合の意義を知るために Cut7 と結合できない Mad1 変異体を探索した。するとこれまで機能未知であった Mad1 の N 末端領域の変異体(Mad1-KAKA)では、Cut7 との結合がなくなることがわかった。この Mad1-KAKA 変異体は、キネトコア局在や SAC 機能は正常であることから、既知の Mad1 機能には影響しないと言える。

### 2. Mad1 は Cut7 をキネトコアへと局在化させる

次に Cut7 の局在を観察したところ、Mad1 と同様にスピンドル微小管と結合できていないキネトコアに局在することが分かった。微小管に依存せずキネトコアに局在できるキネシンとしては、分裂酵母で初めての発見である。また、同様の観察を *mad1-KAKA* 変異株で行ったところ、Cut7 のキネトコア局在は消失した。したがって Cut7 は Mad1 依存的に微小管未結合のキネトコアに局在することが明らかになった。では、Cut7 はキネトコアでどのような機能を担っているのだろうか。

### 3. Mad1 の新規機能は染色体整列である

高等生物において、CENP-E のように微小管未結合のキネトコアに局在するキネシンは、染色体整列に寄与することが報告されている。そこで、キネトコアに局在する

Cut7 キネシンが同様に染色体整列に寄与している可能性を検討した。タイムラプス観察により、染色体が整列していく過程を追ったところ、野生株では整列できていない染色体は、すぐにスピンドル赤道面に向かって動き、整列を完了した。一方で、Cut7 がキネトコアに局在できない *mad1-KAKA* 変異株では、整列できていない染色体はスピンドル極から動かず、整列は完了しなかった。このことから、Cut7 はキネトコアで染色体整列を促進している可能性が示唆された。さらに、*mad1-KAKA* 変異株において Cut7 を人工的にキネトコアに局在化させ、整列が完了するかを検討した。すると整列できていない染色体は徐々にスピンドル極を離れ、最終的に整列が完了した。

この結果、Mad1 の新規機能が、Cut7 のキネトコア局在化を通じた染色体整列の促進であることが明らかになった。

#### 4. ヒトにおいても Mad1 は染色体整列を促進する

Mad1 は真核生物に広く保存された因子であるため、Mad1 による染色体整列機構も進化的に保存されている可能性がある。この可能性をヒト培養細胞である HeLa 細胞を使って検討したところ、Mad1 をノックダウンした細胞では、整列できていない染色体が多く観察された。したがってヒトにおいても Mad1 は染色体整列に必要であると言える。また、Mad1 は染色体整列に重要な役割を持つ CENP-E キネシンのキネトコア局在に必要であることが明らかになった。以上の結果からヒトにおいては Mad1 が CENP-E キネシンのキネトコア局在化を介して染色体整列を促進していることが示唆された。

#### まとめと展望

本研究により、Mad1 が SAC だけでなく染色体整列に貢献していることが明らかになった。また、Mad1 による染色体整列機構が分裂酵母とヒトの間で保存されたメカニズムであることが分かった。

整列できていない染色体は、ほとんどの場合スピンドル微小管とも正しく結合できていない。つまり、整列しなければいけない染色体は、SAC も活性化しなければならない。この同時に必要性を生じる、「染色体整列」と「SAC」の各々の分子メカニズムの間に Mad1 という共通分子によるリンクが存在することは、極めて合理的であると言える。

染色体分配の異常は、癌において良く観察される。また、Mad1 遺伝子や CENP-E 遺伝子の変異は癌につながる事が報告されている。したがって、本研究が今後、癌の発症メカニズムの解明に繋がる事が期待される。

図. 1

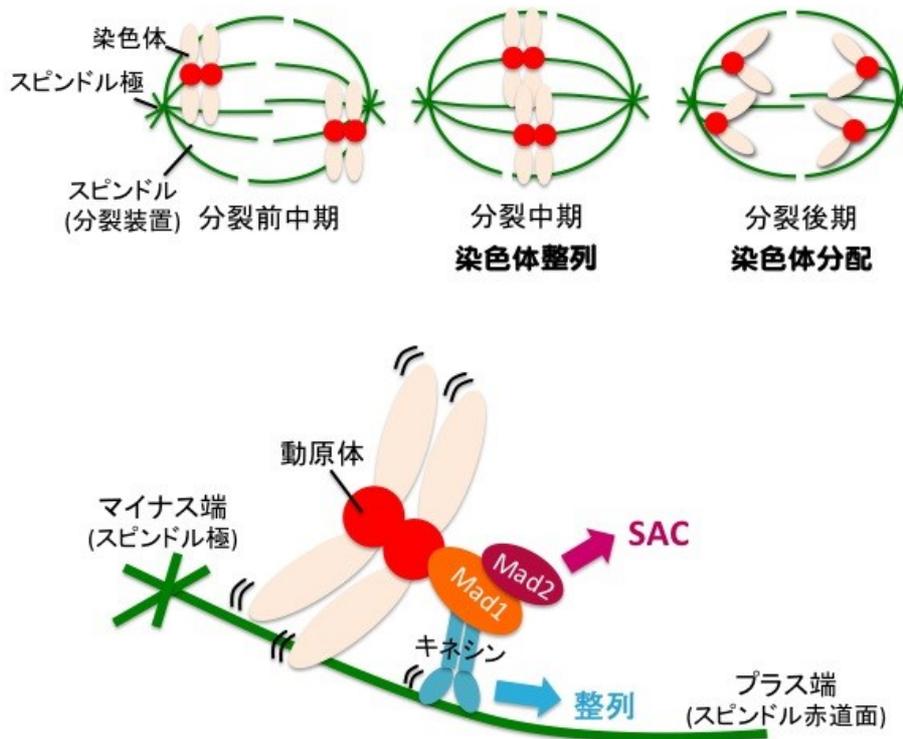


図.1 Mad1 はキネシンのキネトコア局在化を介して染色体整列を促進する  
分裂前中期では整列できていない染色体が多く存在する。整列できていないため微小管とも結合できていない染色体には、Mad1 が局在し SAC を活性化することで時間を稼ぎつつ、キネシンをキネトコアに局在化させ染色体整列を促進する。