The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Kinetochore assembly requires non-kinetochore component proteins, ASURA and RBMX
Author(s)	Lee, Mei Hann
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/26866
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【40】

氏　　名	Lee Mei Hann（リー メイ ハン）
博士の専攻分野の名称	博　士（工学）
学 位 記 番 号	第　２４９７５　号
学位授与年月日	平成 23 年 12 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学 位 論 文 名	Kinetochore assembly requires non-kinetochore component proteins, ASURA and RBMX （動原体形成には非動原体構成タンパク、ASURA および RBMX を必要とする）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　福井　希一 （副査） 教　授　原島　　俊　　教　授　渡邉　　肇　　教　授　大竹　久夫 教　授　金谷　茂則　　教　授　福崎英一郎　　教　授　紀ノ岡正博 教　授　村中　俊哉　　教　授　仁平　卓也　　教　授　藤山　和仁

論 文 内 容 の 要 旨

We previously identified 107 proteins using highly purified human metaphase chromosomes. Two chromosomal proteins, ASURA (Prohibitin 2) and RBMX (RNA binding motif protein, X-linked) were relatively abundant, suggesting that they play important structural roles in mitotic events. They are known as multi-functional proteins, but the mitotic functions have not been identified well. Our preliminary screening for their mitotic profiles showed that both ASURA and RBMX depletion caused mitotic arrest with chromosome nonalignment, and sister chromatids were separated untimely. In addition to sister chromatid cohesion, chromosome congression requires proper kinetochore formation to achieve stable microtubule attachment. The objective of this study is to clarify whether and how ASURA and RBMX are required for kinetochore assembly.

Localization analysis indicated that ASURA and RBMX do not specifically localize to the kinetochore throughout the cell cycle, and therefore are not thought as the kinetochore proteins that are known to enrich at the kinetochore especially during mitosis. To test whether ASURA and RBMX are required for the localization of kinetochore proteins, siRNA-mediated gene silencing approach was employed. Signal intensity of several outer kinetochore proteins, including Hec1, were decreased significantly after ASURA and RBMX depletion, suggesting that kinetochore formation is impaired.

To further investigate how ASURA and RBMX contribute to kinetochore formation, I adopted electron microscopy for the RNAi analyses. As the defects observed in kinetochore may be derived from disruption of the maturation process, I first ascertained the kinetochore development in HeLa cells. In prophase, the kinetochore is visible on the surface of the primary constrictions as rough circular patches of fine fibrous materials, which gradually differentiated into two layers within the ball and developed finally into the trilaminar structure by late prometaphase. Accordingly, kinetochore assembly was classified into three groups, Class 1 (fibrillar ball), Class 2 (fibrillar ball with a faint outer plate) and Class 3 (trilaminar structure). Kinetochores in control and RNAi treated cultures (ASURA, RBMX and Hec1 RNAi cells) were analyzed and were classified into each of the Class 1, 2 or 3. In contrast to the control with a majority of Class 3 kinetochores, ASURA and RBMX depletion resulted in a significant increase of Class 1 kinetochores. In addition, microtubule attachment was significantly reduced. These phenotypes were similar to that of Hec1 RNAi, suggesting that both ASURA and RBMX are involved in Hec1 targeting. Hec1 is belongs to the CENP-I pathway, therefore, ASURA and RBMX may be involved in this pathway in targeting kinetochore proteins.

These data suggest that in addition to the kinetochore components which are required for its construction, non-kinetochore component proteins, such as ASURA and RBMX, play critical roles in facilitating kinetochore assembly.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、RNA 干渉(RNAi)法により 2 種類の染色体タンパク質、ASURA (Prohibitin 2)および RBMX (RNA binding motif protein, X-linked)をノックダウンし、両タンパク質が細胞分裂期の進行に必要であることおよびその理由として、両タンパク質が動原体の成熟に関係しているという結果について述べている。

まず、ASURA および RBMX 両タンパク質の RNAi 法を行い、細胞分裂時における分裂指数および染色体の赤道板への配列異常を観察している。これにより、120 以上のタンパク質が段階的に結合することにより形成される動原体において異常が生じたことが示唆され、この点についてさらに、免疫染色法を用いて Hec1 や CENP-F などいくつかの動原体タンパク質の局在をみたところ、これらのタンパク質が動原体から失われることを明らかにしている。ASURA および RBMX 両タンパク質は動原体に局在しないことから、これらの結果は ASURA および RBMX がこれらの動原体タンパク質を動原体へリクルートすることを示唆するものである。

さらに透過型電子顕微鏡を用いて、HeLa 細胞における動原体三層構造の発達段階を三段階に定義した上で、ASURA および RBMX を RNAi 法で処理した細胞を詳細に観察するのである。その結果、これらの処理細胞では動原体の多くに三層構造が形成されず、最も初期の発達段階にとどまる事を見出すのである。このことは ASURA および RBMX が三層構造を形成する重要な動原体タンパク質を動原体にリクルートすることにより動原体を形成していることを明らかに示している。

本論文では、動原体に局在する動原体タンパク質のみならず、動原体に局在しない染色体タンパク質が動原体の形成にきわめて重要な機能を有すること、しかも ASURA および RBMX という複数のタンパク質が関与する例を示したものであり、動原体の形成および細胞周期の進行過程に関して重要かつ新規な知見を加え、その理解に大きく寄与するものである。

よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。