

Title	Comparative proteome analysis of human metaphase chromosomes and functional analyses of chromosomal proteins using RNAi methods
Author(s)	高田, 英昭
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/48476
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	高 田 英 昭
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 21126 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Comparative proteome analysis of human metaphase chromosomes and functional analyses of chromosomal proteins using RNAi methods (ヒト分裂期染色体の比較プロテオーム解析および RNAi 法を用いた染色体タンパク質の機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 福井 希一 (副査) 教授 関 達治 教授 卜部 格 教授 塩谷 捨明 教授 小林 昭雄 教授 原島 俊 教授 大竹 久夫 教授 金谷 茂則 教授 仁平 卓也 教授 清水 治 教授 四方 哲也

論文内容の要旨

本研究では、ヒト分裂期染色体のプロテオーム解析を行うことにより染色体蛋白質を網羅的に同定し、さらに種々の方法を用いて調製した染色体間で蛋白質組成の比較を行うことにより染色体の構造・機能に必須な蛋白質を明らかにすることを目的とした。また、同定された蛋白質に対して RNAi (RNA interference) 法を用いた解析を行うことにより蛋白質の染色体における機能を解明することも試みた。

【ヒト分裂期染色体の単離方法、染色体蛋白質の調製方法の確立】

ヒト培養細胞である BALL-1 株 (ヒト B 細胞白血病株) と HeLa S3 株 (ヒト子宮頸癌細胞) から大量に染色体を調製するため、微小管重合阻害剤であるコルセミドを添加することで細胞の分裂期への同調を行った。細胞からの染色体単離はポリアミンバッファーを用いた調製法、およびグリセロール密度勾配遠心とパーコール密度勾配遠心を組み合わせた調製法の 2 種類の手法を用いて行い、得られた染色体をそれぞれポリアミン染色体 (PA 染色体)、パーコール染色体 (PG 染色体) とした。単離した染色体はいずれも染色体に特徴的な形状を維持しており、形態上に大きな差はない事が光学顕微鏡および電子顕微鏡で確認でき、染色体の形態を維持した染色体を大量に調製することに成功した。さらに、酢酸法を用いることにより、染色体蛋白質を可溶化し、電気泳動によって分離可能な系を構築した。

【ヒト分裂期染色体の比較プロテオーム解析】

ヒト培養細胞から単離した染色体から抽出した蛋白質を電気泳動によって分離後、MALDI-TOF MS を用いて蛋白質の同定を行ったところ BALL-1 株から単離した PA 染色体からは 158 個、HeLa S3 から単離した PA 染色体からは 189 個、PG 染色体からは 107 個の蛋白質が同定され、そのうち各染色体に共通して存在する蛋白質は 59 個存在した。また、各染色体間での蛋白質の量の比較を行ったところ、染色体間で量比が保存されている蛋白質、HeLa S3 から単

離した PA 染色体で特に量が多く存在する蛋白質、各染色体間で量が大きく異なる蛋白質という 3 つの傾向を認めた。特に染色体間で量が保存されている蛋白質の中には、既知の染色体構造に関与する蛋白質が多く含まれていることから、こうした傾向を示す蛋白質は染色体構造との関連が大きいことが示唆された。

【リンカーヒストン H1.X の機能解析】

リンカーヒストン H1.X は染色体プロテオーム解析において同定された蛋白質の一つであり、染色体上でヒストン H4 の 5 % ほどの量を有しており存在量が多いことから染色体において重要な機能を有していると予想される。H1.X の細胞内局在を間接蛍光抗体法によって調べたところ、H1.X は主に核小体に局在し、さらに分裂期においては主に染色体の表面に局在したことから、主に核小体を除く核質と染色体全体に局在する他の H1 サブタイプとは異なる性質を有することが示された。次に、H1.X の分裂期における機能を調べるために RNAi を行ったところ、H1.X のノックダウンにより染色体が中期板へと整列しない表現型が頻繁に観察された。さらに、紡錘体チェックポイント機構が活性化され分裂期の進行に著しい遅れが生じることが明らかとなった。紡錘体の形態への異常も多く観察され、キネトコア-微小管間の結合にも異常がみられたことから、中期における染色体の不整列はキネトコアと微小管の相互作用の異常によって引き起こされたと考えられる。これらの結果から、H1.X は染色体表層領域において微小管とキネトコアの相互作用を制御しており、染色体を正しく分配するために必要な機能を有していることが示された。

論文審査の結果の要旨

本論文はヒト分裂期染色体を構成する蛋白質を同定し、さらに同定された蛋白質の染色体構造に関する機能について解析したものである。

第一章では本研究の背景である染色体構造に関するこれまでの知見について述べている。

第二章では従来は困難であったヒト分裂期染色体を大量に単離するための条件検討について述べている。ヒトの培養細胞に対して、微小管重合阻害剤であるコルセミドを用いて細胞周期を中期に同調し、ポリアミンバッファーを用いて単離を行うことで、染色体の形態を維持したまま大量に染色体を調製できることが電子顕微鏡観察により確認されている。また、酢酸法を用いることで染色体から蛋白質を効果的に可溶化できる点についても述べられている。

第三章では単離染色体を構成する蛋白質を、プロテオーム解析の手法を用いることで、網羅的に同定している。染色体から抽出した蛋白質は一次元、および二次元電気泳動によって分離後、質量分析機を用いた同定を行い、200 個を超える蛋白質が同定されている。さらに、性質の異なる二種類の細胞株間から単離した染色体、および単離方法の異なる二種類の染色体間で、同定された蛋白質の種類や量を比較することにより染色体構造に重要な蛋白質を 59 個に絞り込んでいる。

第四章では第三章において同定した蛋白質の一つであるヒストン H1.X に着目し、RNA 干渉法を用いることにより H1.X の染色体に関する機能を解析している。その結果、H1.X は分裂期において染色体の表面に局在し、微小管-動原体間の相互作用に関与することで、分裂期における染色体の動態を制御することを明らかにしている。

第五章では本論文の結果をまとめ、それに基づいた考察を述べている。

以上のように、本論文はヒト分裂期染色体を構成する蛋白質を網羅的に明らかにし、さらに染色体の構造・機能と密接に関わる新規染色体蛋白質の同定に成功しており、染色体構造に関する新規かつ重要な知見を示している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。