



Title	Organization of mitotic chromosome scaffold by double-stranded distribution of scaffold proteins
Author(s)	Poonperm, Rawin
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/53996
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Rawin Poonperm)	
Title	Organization of mitotic chromosome scaffold by double-stranded distribution of scaffold proteins (超解像度顕微鏡法を用いた分裂期染色体スキャフォールド二重鎖構造の決定)
Abstract of Thesis Chromosome higher order structure has been an enigma for over a century. The most important structural finding has been the presence of a chromosome scaffold composed of non-histone proteins, so-called scaffold proteins. The structural and functional roles of the major scaffold proteins including condensin, Topoisomerase IIα (Topo II), and kinesin family member 4 (KIF4), have been widely studied, however, it is still unclear how these proteins organize the chromosome scaffold and contribute to chromosome condensation. Here, I used newly developed visualization techniques including three dimensional-structured illumination microscopy (3D-SIM), direct stochastic optical reconstruction microscopy (<i>d</i>STORM) and focused ion beam/scanning electron microscopy (FIB/SEM) to reveal the axial distributions of scaffold proteins in mitotic chromosomes comprising two strands. I found that proper assembly of the scaffold proteins is important for the double-stranded organization of chromosome scaffold as well as chromosome morphology. I also revealed that scaffold protein can adaptably recover its original localization after chromosome reversion in the presence of cations. This reversion to the original morphology underscores the role of the scaffold for intrinsic structural integrity of chromosomes. Therefore a new structural model of the chromosome scaffold that includes twisted double strands, consistent with the physical properties of chromosomal bending flexibility and rigidity, was proposed. The present model provides new insights into chromosome higher order structure. According to the formation of chromosome scaffold by assembly of scaffold proteins, it is important to understand mechanism of recruitment of scaffold proteins to the position of chromosome scaffold. Thus, regulation of KIF4 and condensin I loading to chromosome was investigated. KIF4 and condensin I were found to be interdependently loaded to chromosome. Further analysis showed close relationship between KIF4 and condensin I, but not condensin II and demonstrated that KIF4 assists condensin I loading to chromosome by contribution of protein-protein interaction. Moreover, phosphorylation of KIF4 and condensin I by Aurora B and Plk1 seemed to be important for their recruitment activities. It is shown that by Aurora B inhibition, KIF4 and condensin I were reduced on chromosome, whereas by Plk1 inhibition, KIF4 and condensin I were greater accumulated on chromosome. These suggested that Aurora B regulates association of KIF4 and condensin I to chromosome, while Plk1 regulates dissociation of KIF4 and condensin I from chromosome. Interestingly, these data also indicate that Aurora B and Plk1 kinase presented antagonistic functions on the recruitment of KIF4 and condensin I to chromosome. Thus, mechanism of KIF4 and condensin I localization on chromosome scaffold was postulated as follow. KIF4 and condensin I are essentially localized on chromosome scaffold together, possibly by forming a complex. To promote this event, Aurora B-dependent phosphorylation plays an important role for loading of KIF4 and condensin I to chromosome. In contrast, negative regulator of KIF4 and condensin I localization on chromosome is Plk1 that may phosphorylate KIF4 and condensin I and stimulate dissociation of KIF4 and condensin I from chromosome scaffold. These data showed that phosphorylation is critical factor to control localization of KIF4 and condensin I on chromosome, leading to proper chromosome scaffold construction which later promote proper chromosome organization. Taken together, the present study paves the way for understanding chromosome higher order structure in relation to the structural and functional role of the chromosome scaffold as well as scaffold proteins.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Rawin Poonperm)			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	教授	福井 希一
	副 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	永井 健治
	副 査	教授	仁平 卓也
	副 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	渡邊 肇
	副 査	准教授	杉山 峰崇

論文審査の結果の要旨

本論文は染色体のスキヤフォールドタンパク質が2重らせん構造を形成していることを証明したものであり、緒言（第1章）、本文（第2章、第3章）および結論（第4章）の4章からなる。

第1章は緒論であり、染色体の高次構造が1世紀以上にわたって解明されていない生物学上の重要な謎であることを論じる。こうした中で従来最も重要な染色体構造に関する発見は、非ヒストンタンパク質（いわゆるスキヤフォールドタンパク質）からなる染色体スキヤフォールドの存在が明らかになったことである。主なスキヤフォールドタンパク質である condensin、Topoisomerase II (Topo II) および kinesin family member 4 (KIF4) の構造的、機能的役割は広く研究されている。しかし、これらのタンパク質がどのように染色体スキヤフォールドを構築し、さらには染色体凝縮に貢献するかは現在に至るも不明であることを示す。

第2章は染色体スキヤフォールド構造の三次元構造化照明顕微鏡（3D-SIM）および確率論的光学再構成顕微鏡（dSTORM）、さらには集束イオンビーム/走査型電子顕微鏡（FIB/SEM）を用いた解析である。ここでは、2つの染色体からなる有糸分裂中期染色体の中で軸を形成しているスキヤフォールドタンパク質の3次元構造の解明が試みられる。その結果、スキヤフォールドタンパク質が集合して形成されることが染色体スキヤフォールドがその二本鎖構造の構築ならびに正常な染色体構造にとって重要であることが示される。加えてスキヤフォールドタンパク質が陽イオンの存在下で染色体構造が元の構造に復帰させた場合に、スキヤフォールドタンパク質も当初の位置に適切に復帰することが示された。このような当初の構造への復帰は、染色体が特有の構造を保全するためにスキヤフォールドが重要であることを強調するものである。これらの実験結果により、染色体スキヤフォールドの構造に新しいらせん状の2本鎖による構造モデルが提唱する。これは染色体の曲げに対する柔軟性と染色体の堅さの保持という2つの物性を統合するものでもある。この新しい構造モデルから染色体の高次構造に対する新しい洞察が生まれることが期待される。

第3章は染色体スキヤフォールドの位置にスキヤフォールドタンパク質がリクルートされる機構に関して検討したものである。そこで KIF4 と condensin I の染色体への移動する機構を検討する。その結果、KIF4 と condensin I は染色体に互いに依存して集積することが明らかになる。また KIF4 は condensin I と緊密な関係にあり、タンパク質-タンパク質の相互作用によって染色体への condensin I の集積を助けることが証明される。同時に condensin II は KIF4 と condensin I のような緊密な関係が無いことも明らかになる。さらに、KIF4 と condensin I のオーロラ B キナーゼと Plk1 キナーゼによるリン酸化が集積するために重要とみられる結果を得ている。オーロラ B キナーゼを阻害することにより、KIF4 と condensin I は染色体上での存在量が大きく減じることが示される。一方、Plk1 キナーゼを阻害

すると、KIF4 と condensin I は染色体上により多く集積することが明らかになる。このことからオーロラ B キナーゼが KIF4 と condensin I の染色体への集積を制御していることは明らかである。一方、Plk1 キナーゼは染色体から KIF4 と condensin I が離脱することを制御する。オーロラ B キナーゼと Plk1 キナーゼは染色体に KIF4 および condensin I を移動させることに関して拮抗的な機能を示したことをこのデータが示す。これらの結果からは KIF4 と condensin I の染色体スキャフォールド上への局在化させる機構として以下のようなものを示す。おそらく複合体を形成しつつ、KIF4 と condensin I は共に染色体スキャフォールドに共局在すると考えらる。染色体スキャフォールドに KIF4 と condensin I を移動させるために、オーロラ B 依存的リン酸化が重要な役割をはたす。これとは対照的に、染色体スキャフォールドからの KIF4 と condensin I の非局在化が Plk1 キナーゼによって制御されているとみられる。

第 4 章は結論であり、重要な点の要約と結論が述べられる。結論としては、染色体スキャフォールドが二重らせん構造を取っていると考えられる新しい構造モデルを提唱したこと、リン酸化が染色体スキャフォールド上にスキャフォールドタンパク質である KIF4 と condensin I の局在化を制御する重要な要因であること、を述べる。以上のように、本論文は染色体構造研究に新しいモデルを提示し、その機構についても検討して新しい結果を得た重要な研究である。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。