OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The role of phosphorylation in modulation of chromosomal proteins in mitosis
Author(s)	Equilibrina, Ilma
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54000
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

Form 3

Abstract of Thesis

Name (Ilma Equilibrina)	
Title	The role of phosphorylation in modulation of chromosomal proteins in mitosis (細胞分裂中期における染色体タンパク質の機能発現に関するリン酸化の役割)

Abstract of Thesis

Mitosis is the essential part of cell growth and differentiation cycle (Nigg, 2001). Proper chromosome segregation as one important event in mitosis is achieved by the formation of well-condensed chromosome with distingushed paired sister chromatids, followed by faithful connection between kinetochores and spindle microtubule (Belmont, 2006). In the previous attemp to elucidate mitotic chromosome structure, Uchiyama et al. identified and classified global protein compositions of human metaphase chromosomes into four groups based on their compositional characterizations and localizations as chromosome coating proteins (CCPs), chromosome peripheral proteins (CPPs), chromosome structural proteins (CSPs), and chromosome fibrous protein (CFPs) (Uchiyama et al., 2005; Fukui and Uchiyama, 2007; Takata et al., 2009). Subsequent analyses of these proteins using biochemical and knockdown approaches revealed novel and essential roles of CSPs and CPPs in mitosis. During mitosis, it has been widely shown that chromosomal proteins are dynamically phosphorylated or dephosphorylated. Such changes in the phosphorylation states modulate the activity and tertiary structure of chromosomal proteins (Lane et al., 2013). However, how phosphorylation regulates chromosomal proteins in mitosis is not elucidated yet. Thereby in this study, I aimed to investigate the functional importance of phosphorylation of CSPs and CPPs in mitosis.

Previously, Uchiyama et al. identified a multifuctional protein, Asura as a CPP with relatively abundant amount. Interestingly, although Asura is localized in multiple cellular compartments, it also localizes on the chromosome (Uchiyama et al., 2005). Subsequently, it was revealed that Asura is crucial for mitotic progression and sister chromatid cohesion (Takata et al., 2007). Present co-immunoprecipitation analysis revealed Asura interacted with a cohesin (protein complex that mediates sister chromatid cohesion) subunit, Scc1 *in vivo*. Present observation using Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) system indicated that Asura was indispensible for mitotic progression. Furthermore, conserved PHB domain involving T169 of Chk1 kinase motif was identified as the domain responsible for its targeting to chromatin. Substitution of the T169 to alanine residue inhibited Asura from complete binding to chromatin and mitotic progression. These results indicate that the role of Asura in mitosis is mediated by its binding to chromatin through phosphorylation of Asura T169.

Histone H3 is one of constituents of CSPs and phosphorylation of histone H3 at serine 10 (H3S10p) is a well-known marker of chromosome condensation, however, the molecular mechanism underlying chromosome condensation modulated by H3S10p is unclear. I found that inhibition of H3S10p through inhibition of Aurora kinase B prevents chromosome condensation, indicating that H3S10p was required for the formation of condensed chromosome. *In vitro* study using reconstituted chromatin containing H3 serine 10 mutated to aspartic acid (H3S10D), showed indirect role of H3S10p as no significant changes in the higher-order chromatin structure were observed. These results suggested that H3S10p might act as a mark to recruit chromatin remodeling factors that are important for chromosome condensation. Interestingly, I showed that the maintenance of H4K16 hyperacetylation as one of possible mechanism of H3S10p

downstream mechanism, produced high percentage of elongated and less rigid chromosome morphology, suggesting H4K16Ac is required for chromosome condensation. In conclusion, these studies clearly showed that phosphorylation is essential for functional regulation of the chromosomal proteins in both CPP and CSP in mitosis.

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

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

論文審査の結果の要旨

本研究は染色体構成タンパク質、CSP および CPP の役割、そしてそれらのリン酸化がどのように機能を調節するについての分析を行っている。その結果、これらの染色体タンパク質のリン酸化は有糸分裂中の異なるイベントでの役割を調節していることが明らかとなる。研究成果は、緒論（第１章）、本文（第２章、第３章）、結論（第４章）の４章からなっている。

第１章は本研究の背景説明として、現在までに知られている染色体構成タンパク質、CSP および CPP の役割、そして、 それらのリン酸化がこれらタンパク質の機能発現上重要と考えられることを述べている。

第２章は CPP の一つである Asura が姉妹染色分体の結合と有糸分裂の進行にどのような役割と機構を持っているかを評価するものである。その結果、Asura が Cohesin のサブユニット（Scc1）と相互作用することが明らかになる。さらに、配列が保存されている PHB 領域は、T169 で Chk1 キナーゼのモチーフを含むのであるが、Asura がクロマチンに局在するための必須領域であることを示す。このアミノ酸のリン酸化されないアミノ酸への置換は Asura がクロマチンに結合することおよびそれ以降の有糸分裂の進行を妨げる。これらの結果から Asura は有糸分裂と姉妹染色分体の結合を T169 のリン酸化による Asura のクロマチンへの相互作用により制御しているものであることが明らかになる。

第 3 章では CSP の 1 つである H3S10 のリン酸化を阻害すると、カリキュリン A で処理した細胞でも早期染色体凝縮（PCC）が阻害されることが明らかになる。すなわち染色体の凝縮に H3S10p が極めて重要であることが示されるのである。しかし、もう一つのオーロラ B の基質である Condensin I とその他のスキャフォールドタンパク質は早期染色体凝縮の誘導には不可欠ではないことが明らかになる。ただし、これらのタンパク質の欠損により染色体の形態が大きく損なわれるため、これらのタンパク質の役割は染色体の凝縮に関与するというより、染色体の凝縮構造を形作る役割があることが示される。H3S10p がヌクレオソーム配列構造を変化させることにより、染色体凝縮を促進する上で直接的な役割を果たすのかどうかを、野生型と H3S10D（H3S10p を模擬）の再構成クロマチンを用いた *in vitro* の研究で確認する。その結果、野生型と H3S10D ヌクレオソーム配列間でクロマチンの高次構造上の大きな変化は認められないのである。これにより、H3S10 のリン酸化は凝縮染色体の構築には間接的に関与していること、例えば染色体凝縮のために重要な他のクロマチン制御因子を呼び込むための目印としての役割を果たしていることが考えられる。H3S10p がクロマチンの折りたたみと凝縮を促進する課程において H4K16Ac の脱アセチル化の役割を果たしている可能性があることから、クロモソームの凝縮に関係する H3S10p の下流の機構についてさらに検討をするのである。有糸分裂の間に H4K16Ac が保持されると高頻度で長いが硬くない染色体が観察される。このことは

H4K16Ac が高度に凝縮した染色体の構築を妨げていることを示す。これらの結果は H4K16Ac の脱アセチル化が完全に凝縮した染色体の形成に寄与することを示している。H3S10 のリン酸化の程度は早期染色体凝縮（PCC）における染色体の凝縮の程度に反映される。それゆえに、H3S10p は早期染色体凝縮（PCC）の全過程において必要とされると考えられる。低濃度の ZM447439 と H4K16 の過剰なアセチル化により、部分的に凝縮した染色体がは作られることから H3S10p が凝縮の後期の段階で効果を発揮することが考えられる。すなわち H3S10p が染色体凝縮の後期の過程では H4K16Ac の脱アセチル化通じて染色体凝縮を促進するのである。以上により、H3S10p 染色体凝縮の後期と初期過程においての２つの役割を持つことが考えられる。そこで H3S10p と H4K16Ac の役割を早期染色体凝縮の過程および有糸分裂過程で明らかにするため、H3S10p と H4K16Ac の程度とヒストン脱アセチル化酵素のリクルートメントについては今後明らかにしていく必要がある。現在までの結果から非常に凝縮した中期染色体はクロマチンの階層的な折り畳みにより構築されると考えられる。ここでの結果は染色体の短縮と凝縮が複数の段階を経て生じることを明解に示している。さらに既報の結果と同様に、前期染色体の注意深い形態観察の結果から前期から中期の染色体への凝縮過程において凝縮中間体を経ることが明らかとなる。そこでは漸進的な染色体長の収縮と染色体の直径の増加による染色体の凝縮が生じる。H3S10 のリン酸化、H4K16 のアセチル化およびコンデンシンの阻害により、異常な形態や部分的に凝縮した染色体が生じることは染色体の凝縮がヒストンのリン酸化、脱アセチル化、そしてコンデンシンが関係する階層的な折り畳みによるものであることを示すものである。

第４章は第２章および第３章を中心に、本研究の結果を取りまとめたものである。

以上述べてきたように、本論文はリン酸化が有糸分裂における染色体構成タンパク質の働きを制御することを示している。特に Asura の T169 におけるリン酸化が Asura がクロマチンに結合した後、有糸分裂の進行に関与することを示すものである。そして H3S10 のリン酸化は染色体の凝縮に、H4K16Ac の脱アセチル化酵素の呼び込みの目印となることにより、間接的に役割を果たしていることを示す重要な結果を示す。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。