OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Functional studies of human scaffold attachment factor A (SAF-A)
Author(s)	森本, 晃弘
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58335
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

【56】

氏名	森本晃弘（もりもとあきひろ）
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	第 24541 号
学位授与年月日	平成23年3月25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	Functional studies of human scaffold attachment factor A (SAF-A) （ヒトscaffold attachment factor A (SAF-A)の機能に関する研究）
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 清水 浩　教授 四方 哲也 教授 仁平 卓也　教授 藤山 和仁

論文内容の要旨

細胞分裂期において染色体の動原体と微小管が正しく結合することは、染色体の正確な分配に欠くことができない。さらに最近の当研究室の研究により、chromosomal periphery regionに存在するchromosomal periphery protein (CPP)が、染色体と微小管の結合（動原体微小管の形成）に必要であることが明らかになってきた。CPPとしてはnucleolin、B23、RRS1、fibrillarin等が知られているが、近年これらのCPPと相互作用するタンパク質として、scaffold attachment factor A (SAF-A)が報告された。SAF-AはX染色体の不活性化やWilms腫瘍形成に関与することが知られているが、分裂期においてどのような機能を有しているのかは知られていない。そこで本研究では、HeLa細胞を用いてSAF-Aの細胞分裂期における機能解明を目的とした。

HeLa細胞の分裂期における微小管動態を観察するために、偏光顕微鏡 (LC-PolScope, Abrio)を用いた。偏光顕微鏡を用いた生細胞観察により、分裂中期の細胞において紡錘体（動原体微小管束）を明瞭に可視化することができた。一方、分裂後期以降に形成される中心体間微小管束は、蛍光顕微鏡では可視化されるのに対し、偏光顕微鏡では可視化されなかった。この結果より、動原体微小管束に含まれる微小管の方が、より秩序よく束ねられている可能性が示唆された。続いて細胞質分裂時の細胞を偏光顕微鏡を用いて観察した。その結果、娘細胞間の分裂溝に収縮環が観察された。この結果から、アクチン繊維（収縮環の構成因子）は数本の大きな繊維束に束ねられることにより、収縮環として機能していることが明らかとなった。

SAF-Aは間期の細胞において、CPP (nucleolin, B23, fibrillarin)と相互作用することが明らかとなっていた。そこで次に分裂期におけるCPPとの相互作用を解析するために、分裂期のHeLa細胞を用いて免疫沈降を行ったところ、分裂期においてもSAF-AはCPP (nucleolin, B23, fibrillarin) と複合体を形成していた。次に分裂期におけるSAF-Aの局在を免疫染色法で解析したところ、SAF-Aは紡錘体に局在することが示された。またSAF-Aは微小管のプラス末端でouter-kinetochoreであるCENP-Fと共局在していることが分かった。したがって微小管プラス末端に局在するSAF-Aは、chromosomal periphery regionにおいてCPPと相互作用していると考えられる。

次にRNA interference (RNAi)法を用いたSAF-Aのノックダウンを行った。SAF-Aをノックダウンした細胞では、染色体の中期板への整列異常が見られた。また染色体の整列異常の見られた細胞ではチェックポイントの活性化が見られた。続いて紡錘体形成におけるSAF-Aの機能について検討した。微小管伸長実験によって紡錘体の形成過程を調べたところ、中心体およびクロマチンからの微小管伸長は、コントロール細胞とSAF-Aをノックダウンした細胞とで差は無かった。一方、微小管の動原体への結合はSAF-Aをノックダウンした細胞で大きく損なわれた。以上の結果から、SAF-Aは微小管と動原体の接着を通じて染色体の中期板への整列に関与していることが示された。

SAF-Aは分裂期において紡錘体に局在することから、他の紡錘体タンパク質と相互作用していることが予想された。そこで免疫沈降によりSAF-Aと相互作用しているタンパク質の同定を行った。その結果TPX2およびAurora Aと複合体を形成していることが明らかとなった。TPX2またはAurora Aをノックダウンした細胞ではSAF-Aの紡錘体への局在は阻害されたことからSAF-Aの紡錘体への局在にはTPX2およびAurora Aと複合体を形成することが重要であると考えられた。一方SAF-Aをノックダウンした細胞では、Aurora Aの紡錘体微小管への局在が阻害された。Aurora Aは紡錘体形成に重要なキナーゼであるため、SAF-AはAurora Aを紡錘体に局在させることで、紡錘体の正常な形成に関与していると示唆された。

本研究では偏光顕微鏡を用いた分裂期細胞の可視化実験により、動原体微小管束を特異的に可視化することに成功し、またSAF-Aが動原体微小管の形成に関与する新規紡錘体タンパク質であり、染色体の整列や分離において重要な働きを有していることを示した。

論文審査の結果の要旨

本論文では、偏光顕微鏡を用いた分裂期 HeLa 細胞の解析、およびヒト scaffold attachment factor A (SAF-A)の局在・機能解析を行った結果について述べている。

ここで用いた偏光顕微鏡は、生体内の複屈折性を有する物質を非侵襲的に可視化することができる顕微鏡であり、分裂期の HeLa 細胞を偏光顕微鏡で観察すると、動原体微小管束が特異的に可視化されること示し、それにより動原体微小管束と中心体間微小管束との構造の差異を示唆するものである。

続いて行った分裂期における SAF-A の機能解析においては、まず免疫沈降法により、SAF-A が分裂期において chromosome peripheral proteins と相互作用しているとこを示し、また免疫染色法および緑色蛍光タンパク質を用いた可視化実験により、SAF-A が新規の紡錘体タンパク質であることを明らかにしている。次に RNA 干渉法による内在性 SAF-A のノックダウンを行い、分裂期における SAF-A の機能を解析したところ、SAF-A をノックダウンした細胞では微小管の接着異常が見られ、このことは SAF-A が微小管の動原体への接着に不可欠であることを示すのである。

本論文では、chromosome peripheral proteins およびその相互作用因子たる SAF-A の機能解析に主眼を置くことにより、従来の動原体タンパク質の機能解析とは異なる視点から、染色体の均等な分配に不可欠であるところの微小管の接着機構に関して、重要かつ新規な知見を加えること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。