

学位論文

コヒーシンサブユニット Pds5 による姉妹染色分体間接着および
染色体両方向性結合制御機構の研究

(The study of the mechanism regulating sister chromatid cohesion and
chromosome bi-orientation by cohesin subunit Pds5)

平成 28 年 12 月博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

後藤 祐平

要旨

正確な染色体分配を保証するためには、複製された姉妹染色分体が分裂中期まで接着され、細胞の両極から伸長するスピンドル微小管により正しく捉えられる必要がある。姉妹染色分体間の接着は、リング状のタンパク質複合体であるコヒーシンによって担われている。一方、Aurora B キナーゼは、誤った微小管結合を解消することにより姉妹染色体の両方向性結合を確立させる働きがある。ヒストン・キナーゼ Hrk1/Haspin は、セントロメアへ局在し、Aurora B キナーゼをセントロメアへと呼び込む働きがある。コヒーシンサブユニットのひとつである Pds5 は、Hrk1/Haspin との相互作用が示唆されていたが、その相互作用の様式、及び重要性についてはよく分かっていなかった。本研究では、酵母ツーハイブリッド法を用いて、Pds5 との結合に必要な Hrk1 の配列、PIM (Pds5 Interacting Motif) 配列を同定した。さらに、Pds5 側の相互作用部位として、進化的に保存された HIM (Haspin Interacting Motif) 配列も同定した。これらのモチーフ配列のいずれかに変異を入れると Pds5 と Hrk1 との結合が失われ、Hrk1 はセントロメアへと局在できなくなった。その結果、Aurora B をセントロメアに呼び込むことができなくなり、染色体分配の異常を引き起こした。興味深いことに、Pds5 のパートナーとして知られていたコヒーシン制御因子 Eso1 と Wpl1 のいずれにも、PIM 様の配列が存在していた。それらの配列への点変異の導入によって Pds5 との結合が失われ、姉妹染色体間接着制御に異常がでることが分かった。本研究により、Pds5 は保存された結合モチーフを使って、細胞内の複数の制御因子と相互作用することで、正確な染色体分配を保証していることが明らかになった。

Abstract

Sister chromatid cohesion is established by the cohesin complex in S phase and persists until metaphase, when sister chromatids are captured by microtubules emanating from opposite poles [1]. The Aurora B-containing chromosome passenger complex (CPC) plays a crucial role in achieving chromosome bi-orientation by correcting erroneous microtubule attachment [2]. The centromeric localization of the CPC relies largely on histone H3-T3 phosphorylation (H3-pT3), which is mediated by mitotic histone kinase Haspin/Hrk1 [3-5]. Hrk1 localization to centromeres depends largely on the cohesin subunit Pds5 in fission yeast [5]; however, it is unknown how Pds5 regulates Haspin localization. Here we identify a conserved Hrk1-interacting motif (HIM) in Pds5 and a Pds5-interacting motif (PIM) in Hrk1 in fission yeast. Mutations in either motif result in the displacement of Hrk1 from centromeres. We also show that the mechanism of Pds5-dependent Haspin recruitment is conserved in human cells. Notably, the PIM in Haspin is reminiscent of the YSR motif found in the mammalian cohesin destabilizer Wapl and stabilizer Sororin, both of which bind PDS5 [6-12]. Similarly, and through the same motifs, fission yeast Pds5 binds to Wpl1/ Wapl and acetyltransferase Eso1/Eco1 in addition to Hrk1. Thus, we have identified a protein-protein interaction module in Pds5 that serves as a chromatin platform for regulating sister chromatid cohesion and chromosome bi-orientation.

目次

序.....	2
材料と方法	7
結果と考察	26
1. Hrk1 は保存されたモチーフである PIM を用いて Pds5 と相互作用する	26
2. Pds5 は保存されたモチーフである HIM を用いて Hrk1 と相互作用する	27
3. Pds5 と Hrk1 の相互作用は Hrk1 のセントロメア局在に必要である ...	28
4. セントロメアに局在する Hrk1 が CPC のセントロメア局在を規定する ..	29
5. Top2/ Topoisomerase II は Pds5 を介した Hrk1 のセントロメア局在をサポートしている	31
6. コヒーシン解離因子 Wpl1/Wapl も保存された PIM を用いて Pds5 の HIM と結合する.....	32
7. 分裂酵母のコヒーシン安定化因子 Eso1 も PIM を用いて Pds5 の HIM と結合する	35
8. Pds5 は HIM を介して姉妹染色分体間接着を制御する.....	37
まとめと展望.....	40
引用文献.....	44
謝辞	51
図	52

序

細胞が増殖する際に行う体細胞分裂では、複製した染色体 DNA を正確に娘細胞に分配することが必要である。体細胞分裂期における染色体分配の異常は、細胞死やがん化、がんの悪性化に寄与すると考えられている。このように染色体分配の異常は、重篤な結果を引き起こすために、細胞は正確に染色体を分配する精巧な機構を備えている。

体細胞分裂過程において、S 期で複製された姉妹染色分体は、コヒーシンと呼ばれるタンパク質複合体によって接着される(Nasmyth, 2005)。コヒーシンは、Psm1/Smc1、Psm3/Smc3、Psc3/Scs3/SA、そして Rad21/Scs1 という 4 つのコアサブユニットが環状の複合体構造をとり、姉妹染色分体を囲うことで接着を担っていると考えられている(図 1A)。複製された姉妹染色分体が分裂期までコヒーシンによって接着されることにより、すべての姉妹染色分体のペアが分裂中期のスピンドルに両極から捉えられ、分裂後期に正確に娘細胞へと分配される。また、コヒーシンには 4 つのコアサブユニットに加えて、Pds5 という保存されたアクセサリサブユニットがあり、姉妹染色分体の接着を制御している(図 1A)。

正確な染色体分配を達成するために、コヒーシンは細胞周期の各時期において厳密な制御を受けている(図 1B)。コヒーシン複合体は、コヒーシンローダーである Mis4/ Scs2 と Ssl3/ Scs4 複合体により、G1 期に染色体上へと局在する(Ciosk et al., 2000; Murayama and Uhlmann, 2015)。S 期において姉妹染色分体が複製されると協調して、コヒーシンによる姉妹染色分体間接着が確立される。Eso1/ Eco1 アセチルトランスフェラーゼは、S 期に Psm3 サブユニッ

トをアセチル化 (K105acK106ac) することでコヒーシンのリングが容易に開環しないように ‘ロック’ する(Ben-Shahar et al., 2008; Feytout et al., 2011; Tanaka et al., 2000; Unal et al., 2008)。Eso1/Eco1 は複製フォーク複合体の PCNA との相互作用が示唆されており、Psm3 のアセチル化は主に複製と協調して起きると考えられている(Moldovan et al., 2006)。Eso1/Eco1 が機能するためには Pds5 サブユニットが必要であることも複数の生物種で報告されている(Carretero et al., 2013; Chan et al., 2013; Kagami et al., 2011; Minamino et al., 2015; Tanaka et al., 2001; Vaur et al., 2012)が、Eso1 とコヒーシンまたは Pds5 の相互作用およびその重要性については不明である。

コヒーシンによる姉妹染色分体間の接着は Wpl1/Wapl によって解消されるということがわかっている。Wpl1/Wapl は、Pds5、Scc3、Scc1 などのコヒーシンサブユニットと相互作用し、コヒーシンを染色体から乖離させる機能をもつ(Gandhi et al., 2006; Huis in 't Veld et al., 2014; Kueng et al., 2006; Murayama and Uhlmann, 2015; Ouyang et al., 2016; Rowland et al., 2009; Sutani et al., 2009)。Eso1/Eco1 による Psm3/Smc3 のアセチル化は Wpl1/Wapl の働きに拮抗していると考えられており、分裂酵母及び出芽酵母において、Eso1/Eco1 の欠失変異体は致死となるが、Wpl1 を同時になくすことで細胞は生育可能となる。このように、Eso1/Eco1 と Wpl1/Wapl は姉妹染色分体間接着について、反対の役割を持っているのだが、Pds5 はその両方の機能に必要だということがわかっている。Pds5 と Eso1/Eco1、また Pds5 と Wpl1/Wapl の相互作用の様式について詳細は分かっておらず、どのように Pds5 が姉妹染色分体間接着を両方向に制御しているのかは明らかではない。

分裂期に入ると、コヒーシンによって接着された姉妹染色分体は、細胞の両極から伸長してきたスピンドル微小管によって動原体部分が捉えられる。すべての姉妹染色分体の動原体がスピンドル微小管によって捉えられ、姉妹染色分体が赤道面へと整列する（分裂中期）と、コヒーシンによる接着が解け姉妹染色分体は細胞の両極へと分配される（分裂後期）。この過程は様々な分子メカニズムにより精密に制御されている。分裂の初期においては、動原体とスピンドル微小管の間に、姉妹動原体が同方向から伸びたスピンドル微小管に捉えられるシンテリック結合や、1つの動原体が両方向から伸びたスピンドル微小管に捉えられるメロテリック結合などの誤った結合が多数存在する。姉妹染色分体を赤道面に整列するためには、このような誤った結合を修正し、正しい両方向性結合を確立する必要があるが、その中心を担うのが CPC (Chromosomal Passenger Complex) である(Watanabe, 2012)。CPC は、Ark1/Aurora B、Bir1/Survivine、Pic1/INCENP、Nbl1/Borealin という進化的に保存された4つのサブユニットからなるタンパク質複合体であり、特にこの中で、Ark1/Aurora Bキナーゼによって担われるリン酸化がCPCの働きに必須である。分裂前中期から中期にかけてセントロメアに局在したCPCは、動原体とスピンドル微小管との結合に関わるKNL1、Dsn1、Ndc80などの動原体タンパク質をリン酸化することにより、誤った微小管結合を選択的に不安定化する(Cheeseman et al., 2006; Welburn et al., 2010)。これにより、正しい両方向性結合が導かれると考えられている。CPCが誤った結合の修正という機能を果たすためには、セントロメアに局在することが必須である(Watanabe, 2012)。CPCのセントロメア局在には、動原体局在キナーゼBub1によるヒストンH2Aのリン酸化が重要である。

ン酸化 (H2A-pS121)、およびヒストンキナーゼ Hrk1/Haspin によるヒストン H3-T3 のリン酸化 (H3-pT3) が必要であるということが知られている (Kawashima et al., 2010; Yamagishi et al., 2010)。Bub1 キナーゼは、スピンドルチェックポイントキナーゼである Mph1/Mps1 によるリン酸化を受けた動原体タンパク質 Spc7/Knl1 を足場として動原体へと局在する (Yamagishi et al., 2012)。Hrk1/Haspin については、先行研究から、分裂酵母において Hrk1 のセントロメア局在が Pds5 に依存することおよび、Pds5 と Hrk1 が相互作用することが示されていた (Yamagishi et al., 2010)。しかし、Pds5 と Hrk1 の相互作用の様式やその重要性は分かっていなかった。また、ヒト培養細胞を用いた実験から高等動物においても、Haspin の局在にコヒーシが必要であることが示唆されている (Carretero et al., 2013; Yamagishi et al., 2010) ため、Hrk1/Haspin のセントロメア局在制御機構は進化的に保存された機構である可能性が考えられる。本研究では、進化的に保存された、Hrk1/Haspin の局在制御メカニズムを明らかにするために、酵母ツーハイブリッド法を用いて Hrk1-Pds5 の相互作用部位を同定した。その結果、真核生物間で高度に保存されたタンパク質結合モジュールである PIM と HIM を発見した。これらのモチーフを介した Hrk1-Pds5 の相互作用は、Hrk1 のセントロメア局在に必須であり、また、その下流である Ark1/Aurora B の局在にも必要であった。さらに、Pds5-HIM は、Hrk1 の局在制御だけではなく姉妹染色分体間接着にも必要であることが分かった。姉妹染色分体間接着を制御する因子である Eso1 及び Wpl1 も Hrk1 と同様に PIM を持っており、PIM-HIM の相互作用モジュールを利用して Pds5 と相互作用することで染色体上での機能を果たすことが分かった。本

研究により、Pds5 上の進化的に保存された HIM は、PIM をもつ様々な相互作用因子が染色体上で働くための足場となっていることが示唆された。

材料と方法

1. 大腸菌株

本研究で行った大腸菌株の取扱は以前に報告されていたもの(山岸有哉, 2011; 明楽隆志, 2015)を改変し行った。本研究では表 1 に示した大腸菌株を用いた。分裂酵母からのプラスミド DNA の回収、プラスミドの構築、一般的な遺伝子操作には DH5 α を用いた。大腸菌は 2xYT 培地(1.6% Bacto TRYPTONE, 1% Yeast extract, 0.5 % NaCl [pH ~7.2])で培養した。培地には、必要に応じて終濃度 40 $\mu\text{g/ml}$ ampicilin、35 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin を添加して用いた。寒天培地(プレート)として使用する際には、1 リットル当たり 20g の寒天を添加した。

表 1. 本研究に用いた大腸菌株とその遺伝子型

DH5 α *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*(rk-mk+), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, Δ (*lac ZYA-argF*)U169,
 $\phi 80$ *lacZ* Δ *M15*, F-, λ -

2. 大腸菌プラスミドと組換え DNA 操作

DNA の制限酵素による切断、結合、平滑末端化、アガロースゲル電気泳動、大腸菌の形質転換などの操作は、標準的なプロトコルに従っておこなった (Sambrook et al., 1989)。プラスミドベクターとして pUC119、pCR2.1、pBluescript-KS+および pBluescript-SK+ (Stratagene) を使用した。大腸菌の形質転換は 18°C法(Inoue et al., 1990)により行った。

3. 分裂酵母株

本研究で行った分裂酵母株の取扱は以前に報告されていたもの（山岸有哉, 2011; 明楽隆志, 2015）を改変し行った。本研究で用いた分裂酵母の菌株とその遺伝子型を表 2 に示す。本研究で作製した細胞株以外の研究室ストックには株番号にアスタリスク*を示す。

表 2. 本研究で用いた分裂酵母の菌株とその遺伝子型

JY	450*	<i>h90</i>	<i>ade6-M216 leu1</i> <i>h- leu1 ark1-GFP<<kan</i>
PA	292	<i>h-</i>	<i>z::Padh13-mCherry-atb2<<hyg hrk1::nat</i> <i>c::Phrk1-hrk1-pim-Thrk1<<hyg</i> <i>leu1 z::Padh13-mCherry-atb2<<hyg hrk1::nat</i>
PA	293	<i>h-</i>	<i>c::Phrk1-hrk1-pim-Thrk1<<hyg</i> <i>ade6-M216 leu1 hrk1::natr</i>
PA	254	<i>h+</i>	<i>c::Phrk1-hrk1(4A)-Thrk1<<hyg</i>
PA	242	<i>h+</i>	<i>ade6 nda3-KM311 hrk1-GFP<<hyg pds5-13myc<<bsd</i>
PA	299	<i>h+</i>	<i>ade6 nda3-KM311 hrk1-GFP<<hyg</i> <i>pds5-him-13myc<<bsd</i>
PA	242	<i>h+</i>	<i>ade6 nda3-KM311 hrk1-GFP<<hyg pds5-13myc<<bsd</i> <i>ade6 nda3-KM311 hrk1::nat</i>
PD	557*	<i>h+</i>	<i>c::Phrk1-hrk1-Thrk1<<hyg pds5-13myc<<bsd</i> <i>ade6 nda3-KM311 hrk1::nat</i>
PD	558*	<i>h+</i>	<i>c::Phrk1-hrk1-GFP<<kanhyg pds5-13myc<<bsd</i> <i>leu1? cut9-665 cen2-GFP wpl1::hygr</i>
PH	227*	<i>h+</i>	<i>z::Padh15-mCherry-atb2<natr</i> <i>ade6 leu1 pds5::hyg z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i>
PJ	350*	<i>h90</i>	<i>ark1-GFP<<kan</i>
PJ	209*	<i>h90</i>	<i>ade6-M216 leu1 z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i>
PJ	283*	<i>h-</i>	<i>ade6-M216 leu1 hrk1::hyg</i>

			<i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i>
PJ	349*	<i>h-</i>	<i>ade6 leu1 pds5::kan z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i>
PJ	280*	<i>h+</i>	<i>ade6-M216 leu1 hrk1::nat</i>
PJ	395*	<i>h-</i>	<i>ura4-D18 leu1 pds5::ura4</i>
PJ	222*	<i>h90</i>	<i>ade6-M216 leu1 hrk1-GFP<<hyg</i> <i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i>
PJ	355*	<i>h+</i>	<i>leu1 cut9-665 cen2-GFP</i> <i>z::Padh15-mCherry-atb2<<nat pds5::hyg</i>
PJ	330*	<i>h+</i>	<i>leu1 cut9-665 cen2-GFP</i> <i>z::Padh15-mCherry-atb2<<natr hrk1::hygr</i>
PL	874*	<i>h90</i>	<i>ade6-M216 leu1 ark1+-GFP<<kan</i> <i>z::Padh15-mcherry-atb2+<<nat</i>
PP	338*	<i>h90</i>	<i>ade6-M216 leu1 ark1-GFP<<kan</i> <i>z::Padh15-mCherry-atb2<<hyg hrk1::nat</i>
PP	101*	<i>h-</i>	<i>leu1 wpl1::hyg</i>
YW	14	<i>h-</i>	<i>eso1-H17 wpl1::natr leu1 pREP81-mCherry</i>
YW	15	<i>h-</i>	<i>eso1-H17 wpl1::natr leu1 pREP81-wpl1-mCherry</i>
YW	16	<i>h-</i>	<i>eso1-H17 wpl1::natr leu1 pREP81-wpl1-pim-mCherry</i>
YW	8	<i>h90 or h+</i>	<i>ade6 leu1 wpl1::hyg psm3-FLAG'<<kan</i> <i>eso1-GFP<<kan pds5-13myc<<bsd</i>
YW	9	<i>h90 or h+</i>	<i>ade6 leu1 wpl1::hyg psm3-FLAG'<<kan</i> <i>eso1-pim-GFP<<kan pds5-13myc<<bsd</i>
YW	6	<i>h90 or h+</i>	<i>ade6 leu1 wpl1::hyg psm3-FLAG'<<kan</i> <i>eso1-GFP<<kan pds5-him-13myc<<bsd</i>
YW	27	<i>h?</i>	<i>pds5-GFP z::Padh13-mCherry-atb2<<nat ade6 leu1</i>
YW	75	<i>h+</i>	<i>ade6-M216 nda3-KM311 hrk1-GFP<<hyg</i> <i>top2-12KR-3FLAG<<kan</i>
YW	85	<i>h+ or h-</i>	<i>ade6-M216 nda3-KM311 hrk1-GFP<<hyg</i> <i>top2-12KR-3FLAG<<kan pds5-him-13myc<<bsd</i> <i>ade6-M216 leu1 ark1+-GFP<<kan</i>
YW	73	<i>h90</i>	<i>z::Padh15-mcherry-atb2<<nat</i> <i>top2-12KR-3FLAG<<bsd</i>

			<i>ade6-M216 leu1 ark1-GFP<<kan</i>
YW	98	<i>h- or h+</i>	<i>z::Padh15-mcherry-atb2<<nat</i> <i>top2-12KR-3FLAG<<bsd pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	432	<i>h+</i>	<i>ade6 leu1 nda3-KM311 hrk1::nat</i> <i>c::Phrk1-hrk1-pim-GFP<<kanhyg pds5-13myc<<bsd</i>
YZ	433	<i>h+</i>	<i>ade6 leu1 nda3-KM311 hrk1::nat</i> <i>c::Phrk1-hrk1-GFP<<kanhyg pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	404	<i>h90</i>	<i>ade leu1 ark1-GFP<<kan pds5-him-13myc<<bsd</i> <i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i>
YZ	405	<i>h90</i>	<i>ade leu1 pds5-him-13myc<<bsd</i> <i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i> <i>ade leu1 ark1-GFP<<kan pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	461	<i>h+</i>	<i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i> <i>lys1::Padh41-CFP-2CD<<hyg</i> <i>ade leu1 ark1-GFP<<kan pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	466	<i>h+</i>	<i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i> <i>c::Padh41-hrk1-CFP-2CD<<hyg</i> <i>ade leu1 ark1-GFP<<kan pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	484	<i>h+</i>	<i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i> <i>c::Padh41-hrk1-pim-CFP-2CD<<hyg</i> <i>ade leu1 ark1-GFP<<kan pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	489	<i>h+</i>	<i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i> <i>c::Padh41-hrk1(KR)-CFP-2CD<<hyg</i> <i>ade leu1 pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	468	<i>h90</i>	<i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i> <i>lys1::Padh41-CFP-2CD<<hyg</i> <i>ade leu1 pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	473	<i>h90</i>	<i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i> <i>c::Padh41-hrk1-CFP-2CD<<hyg</i> <i>ade leu1 pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	482	<i>h90</i>	<i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i> <i>c::Padh41-hrk1-pim-CFP-2CD<<hyg</i>

			<i>ade leu1 pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	487	<i>h90</i>	<i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i> <i>c::Padh41-hrk1(KR)-CFP-2CD<<hyg</i>
YZ	407	<i>h-</i>	<i>ade leu1 pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	592	<i>h+ or h-</i>	<i>leu1 eso1-GFP<<kan</i>
YZ	593	<i>h+ or h-</i>	<i>leu1 eso1-pim-GFP<<kan</i>
YZ	587	<i>h-</i>	<i>leu1 wpl1::hygr eso1-GFP<<kan</i>
YZ	588	<i>h-</i>	<i>leu1 wpl1::hygr eso1-pim-GFP<<kan</i>
YZ	438	<i>h90 or h-</i>	<i>ade leu1 eso1-GFP<<kan</i> <i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i>
YZ	440	<i>h90</i>	<i>ade leu1 wpl1-GFP<<hyg</i> <i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i>
YZ	404	<i>h90</i>	<i>ade leu1 ark1-GFP<<kan pds5-him-13myc<<bsd</i> <i>z::Padh13-mCherry-atb2<<nat</i>
YZ	575	<i>h+</i>	<i>ade6-M216 nda3-KM311 hrk1-GFP<<hygr</i> <i>top2-13myc<<bsd</i>
YZ	426	<i>h+ or h-</i>	<i>ade leu1 cut9-665 cen2-GFP</i> <i>z::Padh15-mCherry-atb2<<nat pds5-13myc<<bsd</i>
YZ	427	<i>h+</i>	<i>ade leu1 cut9-665 cen2-GFP</i> <i>z::Padh15-mCherry-atb2<<natr pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	490	<i>h+ or h-</i>	<i>leu1 cut9-665 cen2-GFP</i> <i>z::Padh15-mCherry-atb2<<natr eso1::ura4 wpl1::hyg</i>
YZ	491	<i>h+ or h-</i>	<i>leu1 cut9-665 cen2-GFP</i> <i>z::Padh15-mCherry-atb2<<natr eso1::ura4 wpl1::hyg</i> <i>pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	504	<i>h90 or h+</i>	<i>ade leu1 nda3-KM311 eso1-GFP<<hyg</i> <i>pds5-13myc<<bsd</i>
YZ	505	<i>h90 or h+</i>	<i>ade leu1 nda3-KM311 eso1-GFP<<hyg</i> <i>pds5-him-13myc<<bsd</i>
YZ	521	<i>h90 or h+</i>	<i>ade leu1 nda3-KM311 wpl1-GFP<<hyg</i> <i>pds5-13myc<<bsd</i>
YZ	522	<i>h90 or h+</i>	<i>ade leu1 nda3-KM311 wpl1-GFP<<hyg</i>

pds5-him-13myc<<bsd

4. 分裂酵母培養のための培地

分裂酵母の通常の培養には、完全栄養培地として YEA, YPDA を、最少合成培地として SD または MM を用いた。分裂酵母の接合および胞子形成を誘導する際には SSA または SPA 培地を用いた。各培地の組成(1 リットル当たり)を以下に示す。プレートを作製する際には 20 g(SPA 培地の場合は 30g)の寒天を添加した。

・ YEA : 完全培地. kan^r 遺伝子挿入株の選択時には、G418(Geneticin)を終濃度 0.1 mg/ml になるように添加して用いた。 hyg^r 遺伝子挿入株の選択時には、Hygromycin-B(Wako)を終濃度 0.3 mg/ml になるように添加して用いた。 nat^r 遺伝子挿入株の選択時には、ClonNat(重松貿易)を終濃度 0.1 mg/ml になるように添加して用いた。 bsd^r 遺伝子挿入株の選択時には、Blastcidine (フナコシ)を終濃度 0.1mg/ml になるように添加して用いた。ウラシル要求性株を選択する際には、5-FOA を終濃度 0.5 mg/ml 加えた。染色体分配の異常を培地上で可視化するために、微小管重合阻害剤である Thiabendazole (TBZ)を終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で加えた。

Yeast extract	5 g	0.5 % (w/v)
グルコース	30 g	3 % (w/v)
アデニン	50 mg	0.005 % (w/v)

・ YPDA : 完全培地. チューブリン低温感受性変異株である *nda3-KM311* を制限温度化で、分裂期に細胞周期を停止させる際に用いる。

Yeast extract	5 g	0.5 % (w/v)
ポリペプトン	20 g	2 % (w/v)
グルコース	20 g	2 % (w/v)
アデニン	50 mg	0.005 % (w/v)

・ SD : 合成選択培地. アミノ酸類が含まれておらず、菌株の栄養要求性を用いた選択に用い、形質転換体を選択にも使用した. 栄養要求性株の培養の際には、必要な栄養素(*1)を添加して用いた。

Yeast nitrogen base without amino acids	6.7 g	0.67 % (w/v)
グルコース	10 g	1 % (w/v)

分裂酵母では頻繁に *nmt* プロモーター(後述)を有する発現ベクターが用いられるが、SD 培地はこのプロモーターを抑制する。

・ MM(MM+N) : 最少選択培地。この培地はチアミンを含有しないため、*nmt* プロモーターは脱抑制され、下流につないだ遺伝子の発現を誘導することができる。また、MM 培地にチアミンを添加することによって *nmt* プロモーターを抑

制することができる。

フタル酸水素カリウム	3 g	14.7 mM
Na ₂ HPO ₄	2.2 g	15.5 mM
NH ₄ Cl	5 g	93.5 mM
グルコース	20 g	2 % (w/v)
50×Salt stock(*2)	20 ml	
10,000×Mineral stock(*3)	0.1 ml	
1,000×Vitamin stock(*4)	1 ml	

・ SSA : 合成孢子形成培地

20×SSA(*5)	50 ml	
グルコース	10 g	1 % (w/v)
1M CaCl ₂	0.68 ml	
1N NaOH	4.2 ml	(pH ~5.9)

・ SPA : 合成孢子形成培地

グルコース	10 g	1 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	1g	
1000×Vitamine stock(*6)	1ml	

*1 培地に添加した栄養素

(終濃度)

アデニン	50 μ g/ml
ウラシル	50 μ g/ml
L-ロイシン	200 μ g/ml
リジン塩酸塩	200 μ g/ml

*2 50 \times Salt stock :

(1 l 当たり)

MgCl ₂ · 6H ₂ O	53.3 g	260 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.735 g	5.00 mM
KCl	50 g	670 mM
Na ₂ SO ₄	2 g	14.1 mM

*3 10,000 \times Mineral stock :

(100 ml 当たり)

H ₃ BO ₃	500 mg	80.9 mM
MnSO ₄ · 4H ₂ O	530 mg	23.7 mM
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	400 mg	13.9 mM
FeCl ₃ · 6H ₂ O	200 mg	7.40 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	1000 mg	2.47 mM

KI	100 mg	6.02 mM
CuSO ₄ · 5H ₂ O	40 mg	1.60 mM
クエン酸	1000 mg	47.6 mM

*4 1,000×Vitamin stock :

(100 ml 当たり)

パントテン酸	100 mg	4.20 mM
ニコチン酸	1000 mg	81.2 mM
イノシトール	1000 mg	55.5 mM
ビオチン	1 mg	40.8 μM

*5 20×SSA :

(1 l 当たり)

L-アスパラギン酸	10 g	75.1 mM
KH ₂ PO ₄	40 g	294 mM
Na ₂ HPO ₄	4 g	28.2 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 g	40.6 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	40 g	303 mM
trace elements(*6)	2 ml	

*6 trace elements :

(100 ml 当たり)

H ₃ BO ₃	500 mg	80.9 mM
CuSO ₄ · 5H ₂ O	40 mg	1.60 mM
KI	100 mg	6.02 mM
FeCl ₃ · 6H ₂ O	200 mg	7.40 mM
MnSO ₄ · 4H ₂ O	530 mg	23.7 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1000 mg	2.47 mM
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	400 mg	13.9 mM

6. 分裂酵母の一般的な取扱いと遺伝学的解析

分裂酵母の一般的な遺伝学的解析は Gutz らの方法に従った(Gutz et al., 1974)。

分裂酵母の形質転換は岡崎らにより改良された酢酸リチウム法(Okazaki et al., 1990)を改変しておこなった。YEA 液体培地で培養した細胞を遠心集菌した後、酢酸リチウム-TE 溶液(0.1 M Lithium-acetate、10mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA)に懸濁した。懸濁液を 0.05 ml ずつマイクロチューブに分注し、DNA (0.1-1 μg)、サケ精子 DNA(キャリア DNA として)および 300μl の 40 % (w/v) ポリエチレングリコール(#4000)-酢酸リチウム-TE 溶液を添加して室温で 1 時間インキュベートした。さらに、35 μl の dimethylsulfoxide (DMSO)を加えて混合し、42°Cで 5 分間熱ショックを与えた。熱ショック後上清を遠心除去し、細胞を YEA に懸濁して非選択培地に広げた。32°Cで 1 日インキュベーション (温度感受性変異株は 26.5°C) したあと、選択培地にレプリカする。

ランダムスポア処理は、以下のように行った。孢子形成しているプレート上の細胞を掻き取り、滅菌水に懸濁した後、グルスラーゼ(NEN)により孢子嚢を溶

解し、胞子を遊離させた。胞子を適当量の YEA 液体培地に懸濁し、適当な培地に胞子をまいた。

7. 分裂酵母のベクタープラスミド

分裂酵母の形質転換には下記のシャトルベクターを用いた。

pREP1(Maundrell, 1990) series , pNATZA1 series

(pREP1, 41, 81) : *nmt1* プロモーターの下流にマルチクロニングサイトが存在し、*leu1* 変異を相補する出芽酵母 LEU2 遺伝子をマーカーとして持つ pUC119 由来のベクターで、分裂酵母内では分裂酵母由来の自律複製配列(*ars1*)によって複製される。*nmt1* プロモーターはチアミン存在下で発現が抑制され、チアミン非存在下で下流の遺伝子発現が誘導される。野生型の *nmt1* プロモーターは極めて強力であるため、TATA ボックスに人為的に変異を導入し、発現量を抑えたプロモーターが作製されている。pREP1 は本来の *nmt1* プロモーター、pREP41 は変異を導入して発現量を約 8 分の 1 に抑えたもの、pREP81 は発現量を約 80 分の 1 に抑えたものである。チアミン存在下ではそれぞれ非存在下の転写量の 100 分の 1 ほどの活性しかない。*nmt1* プロモーターによる転写量の活性は、チアミン除去後細胞分裂を約 5 回(野生型を 30°C で培養すれば 15 時間)行ったところに最大となる。

(pNATZA13, 15) : 極めて強力かつ恒常的に発現が誘導される *adh* プロモーターの TATA ボックスに人為的に変異を導入し、発現量を抑えたプロモーターである *adh13* 及び *adh15* プロモーターの下流にマルチクロニングサイトが存在し、*clonNAT* 耐性遺伝子をマーカーとして持つ pUC119 由来のベクターである。

また、hygromycine B 耐性遺伝子をもつ pHBZA シリーズおよび、kanamycine 耐性遺伝子を持つ pKNZA シリーズ、blastcidine 耐性遺伝子を持つ pBSDZA シリーズも適宜使用した。プラスミド中に分裂酵母 *zfs1* 遺伝子近傍のゲノム配列が挿入されており、Apa I で切断後に分裂酵母にトランスフォームすることで *zfs1* 遺伝子近傍にプラスミドを挿入することができる。同様に、*lys1* 遺伝子内に挿入される pNATK シリーズ、C locus 近傍に挿入される pNATC シリーズも適宜使用した。

8. 分裂酵母の遺伝子改変

分裂酵母の内在性遺伝子の改変は、相同組換えによる遺伝子置換を利用した。遺伝子の C 末端領域にタグ (GFP, 3FLAG, 13myc) を融合するために、内在性遺伝子との相同領域、タグ遺伝子、*adh* ターミネーターおよび薬剤耐性遺伝子発現カセット (*kan+*, *nat+*, *hyg+*, *bsd+*) を PCR によって作製し、分裂酵母に形質転換した。その後、薬剤耐性により目的箇所にタグが挿入された細胞を選択した。遺伝子破壊も同様に、目的遺伝子上流及び下流の相同配列と薬剤耐性遺伝子発現カセットを PCR で作製し分裂酵母に形質転換した。C 末端タグ融合および、遺伝子破壊は該当部位に設計したプライマーによる PCR によって、正しく組換えが行われているのを確認した。

内在性遺伝子への点変異導入は C 末端領域にタグを付加する際に、相同領域に点変異を導入し、薬剤選択後に、相同組換えにより置換されたものを DNA シーケンシングによって選択した。

9. 分裂酵母からの DNA の調製

分裂酵母のゲノム DNA およびプラスミド DNA の回収には以下の方法を用いた。1.5~5 ml の培地で培養した細胞を回収し、0.2 ml の breaking buffer (1% SDS, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA)、0.3 g のガラスビーズ ($\phi=0.5$ mm)、および 0.2 ml のフェノール/クロロホルムを加え、2 分間激しく攪拌して細胞を破碎した。その後、室温で 5 分間遠心し、上清を回収した。エタノール沈殿を行って DNA を沈降させ、風乾後、50 μ l TE に溶解して DNA 溶液とした。

10. 減数分裂の誘導

一倍体細胞を減数分裂へ誘導する場合は、対数増殖中の細胞を遠心回収し、上清を取り除いた後、ロイシン溶液(20mg/ml)(ロイシン非要求性株の場合は水)に懸濁し、SPA プレート上で 26.5 度にて培養した。h⁺株と h 株を掛け合わせて観察する場合は、懸濁液を等量ずつ混合して SPA プレート上にスポットした。

11. Primestar Mutagenesis による変異導入

組換え遺伝子への目的変異の導入は主に Prime Star Max (Takara)を用いて行った。変異導入部位を含む 15bp~のオーバーラップと、テンプレートの DNA と相補的な 18bp のオリゴを組み合わせて、PrimeStar Max により PCR 反応でプラスミドに点変異、欠失変異を導入した。PCR 産物は DH5 α コンピテントセルに形質転換し、プラスミドを回収した。

12. In fusion 法による plasmid 作成

一部プラスミドは In Fusion (Clontech)を用いて作成した。15bp のオーバーラップを持つ Vector 断片およびインサート断片を PCR によって作成し、In Fusion 反応後 DH5 α コンピテントセルに形質転換し、プラスミドを回収した。

13.細胞の停止法

分裂前中期に細胞を停止させるため、*nda3-KM311* 株(Hiraoka et al., 1984)を用い、17°Cで 12~13 時間 YPD 液体培地中で培養した。分裂中期に細胞を停止させるため、*cut9-665* 株を用いて 37°Cで 4 時間 YEA 液体培地中で培養した。

14. ウェスタン解析

分裂酵母においては、細胞を遠心回収後、HB buffer(25mM MOPS, 15mM EGTA (pH6.9), 15mM MgCl₂, 60mM β -glycerophosphate, 15mM p-nitrophenylphosphate, 0.1mM sodium vanadate, 1% Triton X-100)を添加して、5 分間煮沸した。その後約 1ml のガラスビーズを加え、Multi bead shocker (Yasui Kikai)によって細胞を破砕した。チューブの底に注射針で穴を開け、新しいチューブに重ねて遠心して細胞破砕液を回収した。その後 SDS-PAGE buffer (終濃度 2% SDS, 0.1M DTT, 50mM Tris-HCl(pH6.8), 0.1% Bromophenol Blue, 10% Glycerol)を添加して加熱処理した。また、免疫沈降に用いたサンプルについては次の項目に処理方法を記す。

サンプルを SDS-PAGE した後、タンパク質を PVDF Immobilon (MILLIPORE)メンブレンに転写した。メンブレンを 30 分、5%スキムミルク(ナカライ)-TBST (0.9% NaCl, 20mM Tris-Cl (pH7.4), 0.05% Tween-20)でブロッキングした後、1%ス

キムミルク-TBST に一次抗体を適量加えて室温 2 時間~1 晩インキュベートした。TBST で 3 回洗浄後、1%スキムミルク-TBST に二次抗体を適量加えて室温で 1 時間インキュベートした。TBST で 3 回洗浄後、Clarity ECL substrate (BIORAD) により検出した。一次抗体は、以下の濃度で用いた。マウス抗チューブリン抗体 B-5-1-2(Abcam) 1:5000、ゴート抗 GFP 抗体(handmade) 1:5000、マウス抗 myc 抗体 9E10(Santa Cruz) 1:1000、マウス抗 FLAG-M2 抗体 (Sigma) 1:1000、ラビット抗アセチル化 K106Psm3 抗体(handmade) 1:500。

15. FLAG 免疫沈降法

Psm3 のアセチル化を検出するために以下の免疫沈降法を用いた。分裂酵母細胞を HB buffer(25mM MOPS, 15mM EGTA (pH6.9), 15mM MgCl₂, 60mM β-glycerophosphate, 15mM p-nitrophenylphosphate, 0.1mM sodium vanadate, 1% Triton X-100, 1mM PMSF)で wash した後、HB Buffer に 1mM PMSF、complete protease inhibitors (Roche)を加えた buffer に懸濁し、Multi bead shocker (Yasui Kikai)によって細胞を破砕した。細胞抽出液に FLAG-M2 conjugated beads (Sigma) を加え、4°C で 2 時間反応した。HB Buffer で wash 後、SDS-PAGE およびウェスタンブロットティング法により、免疫沈降物を解析した。

16.クロスリンク免疫沈降法

共免疫沈降をするために以下の方法を用いた。酵母の培養液に、終濃度 1%になるようにホルムアルデヒドを加え、10 分培養し、その後氷上で 50 分固定し、氷冷した buffer 1 (50mM Hepes-KOH(pH7.5), 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton

X-100, 0.1% Na-Deoxycholate)で4回洗浄した。その後、complete mini (Roche) と 1mM PMSF を加えた buffer 1 に懸濁し、約 1mg のガラスビーズを加え、Multi bead shocker (Yasui Kikai)によって細胞を破碎した。このチューブの底に注射針で穴を開け、新しいチューブに重ねて遠心して細胞破碎液を回収した。上清で沈殿を再懸濁し、超音波処理を施した(氷上で1分間の冷却を挟みながら、10秒間の処理を3回繰り返した)。遠心して沈殿物を沈降させた後、上清を回収し、抗 GFP 抗体を加え、4℃で1時間反応した後、Protein G Dynabeads (Thermo Fisher Scientific)を加えさらに2時間4℃でインキュベートした。Buffer1 で wash 後、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング法により、免疫沈降物を解析した。

17. ChIP 法

齊藤博士らの方法に改良を加えて行った(Saitoh et al., 1997)。

酵母の培養液に、終濃度 1%になるようにホルムアルデヒドを加え、10分培養し、その後氷上で50分固定し、氷冷した buffer 1 (50mM HEPES-KOH(pH7.5), 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-Deoxycholate)で4回洗浄した。その後、complete mini (Roche) と 1mM PMSF を加えた buffer 1 に懸濁し、約 1mg のガラスビーズを加え、Multi bead shocker (Yasui Kikai)によって細胞を破碎した。このチューブの底に注射針で穴を開け、新しいチューブに重ねて遠心して細胞破碎液を回収した。上清で沈殿を再懸濁し、超音波処理を施した(氷上で1分間の冷却を挟みながら、15秒間の処理を4回繰り返した)。遠心して沈殿物を沈降させた後、上清を回収し、2 μ g の抗 Bir1 抗体、抗 AcK106-Psm3 抗体、抗 Cnp1 抗体、抗 GFP 抗体(Clonetech)、抗 FLAG-M2 抗体(Sigma)、抗 myc 抗体(Santa

Cruz)、抗 H3 抗体(Abcam)、抗 H3pT3 リン酸化特異的抗体 (UPSTATE)、コントロールラビット IgG (Sigma)のいずれかを加え、4°Cで1時間混和した。その後、protein A sepharose を加えてさらに4°Cで2時間混和した。遠心によりビーズを回収し、buffer 1、buffer 1' (50mM Hepes-KOH(pH7.5), 500mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-Deoxycholate)、buffer 2 (10mM Tris-HCl(pH8.0), 0.25M LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholate) でそれぞれ洗浄した。さらに TE (10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA) で洗浄したのち、SDS Elutin Buffer (1% SDS, 10mM Tris-HCl(pH7.5), 1mM EDTA)に懸濁して65°Cで30分間反応させビーズから免疫沈降産物を溶出した。さらに、さらに上清を75°Cで8時間以上静置することで、ホルムアルデヒド架橋の解消および、RNA の分解を行った。Qiagen PCR purification kit により DNA を回収した。全細胞抽出液(WCE)に対しても、同様に処理し、DNA を回収した。続いて、得られた DNA に対して LightCycler 480 Cyber Green I Master (Roche)と LightCycler 480 system (Roche)を用いて定量的 PCR を行った。PCR の結果得られた ChIP(%)をコントロールである rIgG による ChIP(%)の値で差し引いたものを各抗体による ChIP 効率(%)とした。プライマーセットとして、動原体形成領域(*cnt1*, *imr1*)、セントロメアのヘテロクロマチン領域(*dh*, *dg*)、mating type ヘテロクロマチン領域 (*mat*)、サブテロメアヘテロクロマチン領域 (*subtel*)、染色体腕部(*zfs1*, *mss1*, *mes1*, *56F2*)をそれぞれ用いた。プライマーの配列は以下の論文で報告されたものである(Kawashima et al., 2010; Kitajima et al., 2003; Yamagishi et al., 2010; Yokobayashi and Watanabe, 2005)

18. 蛍光タンパク質のセントロメアシグナルの定量化

Ark1-GFP のイメージを Axio Vision (Carl Zeiss)を用いて撮り、細胞内のセントロメアシグナルの平均値から、バックグラウンドである細胞質周辺の平均シグナルを差し引いた値を、各タンパク質のセントロメアにおけるシグナルとして定量化した。

19. 酵母ツーハイブリッド法

検定を行う各遺伝子の ORF 全長あるいは断片を PCR により増幅し、pBTM116 (LexA DNA 結合ドメイン融合タンパク質を発現) もしくは pGBKT7 (GAL4 DNA 結合ドメイン融合タンパク質を発現) と pGADT7(Gal4 転写活性化ドメイン融合タンパク質を発現)にクローニングした。これらのプラスミドを出芽酵母 L40 株(pBTM116)もしくは、AH109 (pGADT7) に形質転換した。pBTM116-Ras 及び pVP16-Raf、 もしくは pGBKT7-p53 及び pGADT7-T-antigen をコントロールとして用いた。選択培地としては SD – His、 SD-Ade-His 培地を用いた。-His による選択性を強くするために 1mM の 3-AT を適宜添加した。

結果と考察

1. Hrk1 は保存されたモチーフである PIM を用いて Pds5 と相互作用する

Hrk1 と Pds5 の相互作用部位を特定するために、断片化した Hrk1 を用いて酵母ツーハイブリッド法により Pds5 との相互作用を検証した (図 3A)。先行研究の通り、Hrk1 はその N 末断片で Pds5 と相互作用し、また、更に N 末端の 10bp を欠失することで相互作用を失った (図 3B)。そこで、Hrk1 の N 末端について様々な真核生物の Hrk1/Haspin のアミノ酸配列を比較したところ、種間で保存されたペプチドモチーフを発見した (図 3C)。このペプチドモチーフをアラニンに置換したところ Hrk1 と Pds5 の相互作用が失われた (図 3D) ことから、このモチーフが Hrk1 の Pds5 との結合に必要なものであると考え、PIM (Pds5-Interacting Motif) と名付けた。また、これ以降 PIM のアラニン変異体を *pim* と表記する。前述のように、Hrk1 の PIM は酵母からヒトまで真核生物で広く保存されていたので、ヒト Haspin (hHaspin) および Pds5 (hPds5B) との相互作用にも PIM が必要であるかを検証した。酵母ツーハイブリッド法により hHaspin の N 末断片と hPds5B の N 末断片が相互作用し、また、その相互作用は *hHaspin-pim* の変異体で失われた (図 3E)。植物や出芽酵母の Hrk1/Haspin においては、N 末端の完全に相同な位置には PIM は発見できなかったが、N 末端近傍に PIM に類似した配列が確認できた (図 3F)。これらの結果から、Hrk1/Haspin の PIM は、Pds5 との結合に必要な進化上保存されたモチーフであることが示唆された。

2. Pds5 は保存されたモチーフである HIM を用いて Hrk1 と相互作用する

Hrk1 同様に Pds5 についても、Hrk1 との相互作用領域を特定するために断片化した Pds5 を用いて Hrk1 との相互作用を検証した (図 4A)。Pds5 の N 末端 200 アミノ酸が Hrk1 との結合に必要な最小領域であることが分かり、これ以上の断片化は Hrk1 との相互作用を失ったので、Hrk1 は Pds5 の N 末端 200 アミノ酸の複数の領域と相互作用している可能性が考えられる (図 4B)。様々な真核生物において、Pds5 のアミノ酸配列を比較したところ、特に種間で相同性が高い領域を発見した (図 4C)。その領域のアミノ酸をアラニンに置換した変異体では Pds5 と Hrk1 の相互作用が失われたことから、その領域を HIM (Hrk1-Interacting Motif) と名付けた (図 4D)。また、これ以降 HIM のアラニン変異体を *him* と表記する。*pds5-him* は Hrk1 との相互作用を低下させるが、コヒーレンサブユニットの一つである Rad21 との相互作用には影響しないことから (図 4D)、Hrk1 結合特異的な変異体であることが示唆される。Hrk1/Haspin 同様に、Pds5 の HIM は酵母からヒトまで真核生物で保存されていたので、hHaspin および hPds5B との相互作用に HIM が必要であるかを検証した。酵母ツーハイブリッド法により hHaspin の N 末断片と hPds5B の N 末断片の相互作用は *hPds5B-him* の変異体で失われた (図 4E)。これらの結果から、Pds5 の HIM は、Hrk1/Haspin との結合に必要な進化上保存されたモチーフであることが示唆された。

Hrk1 および Pds5 の相互作用を分裂酵母の生体内で検証するために、分裂酵母細胞抽出液を用いて共免疫沈降実験を行った。分裂期に停止させた細胞由来の細胞抽出液では、Hrk1 によって Pds5 が共免疫沈降された、非同調の細胞抽

出液（対数増殖期の分裂酵母の大半は G2 期）でも共免疫沈降が見られた（図 4F）。次に、この相互作用が PIM および HIM の相互作用モジュールに依存しているかを検証するために *hrk1-pim* 及び *pds5-him* を用いて共免疫沈降実験を行った。これらの変異体では、分裂期に停止した細胞抽出液からでも Pds5 は Hrk1 によって共免疫沈降されてこないことがわかった（図 4G）。これらの結果から、分裂酵母生体内において Hrk1 と Pds5 が相互作用するのに、PIM と HIM がそれぞれ必要であるということが分かった。

3.. Pds5 と Hrk1 の相互作用は Hrk1 のセントロメア局在に必要である

Hrk1 と Pds5 の相互作用が Hrk1 のセントロメア局在に必要であるかどうかを調べるために、分裂酵母の内在性 Hrk1 タンパク質に GFP タグを融合して（Hrk1-GFP）細胞内局在を観察した。先行研究より、Hrk1-GFP は分裂期に停止した細胞でドット状のセントロメア局在を示すということが知られていた（Yamagishi et al., 2010）。*hrk1-pim* および *pds5-him* いずれの変異導入によっても、Hrk1-GFP のドット状の局在が失われた（図 5A）。さらに詳細な Hrk1 の染色体局在を調べるために ChIP 法による局在解析を行った。Hrk1-GFP と同時に、Pds5-13myc（内在性 Pds5 に 13myc タグ融合）、Hrk1 の基質である H3-pT3、CPC の構成因子のひとつである Bir1 についても ChIP 解析を行った（図 5B）。先行研究から、Pds5 はコヒーシンと同様の局在を示すことが分かっており、野生型だけでなく *hrk1-pim*, *pds5-him* 細胞においてもコヒーシンが多いとされる領域に集積していた。野生型の細胞において、Hrk1 はペリセントロメアのヘテロクロマチン (*dg,dh*) および、*mat* locus (*mat*)、サブテロメア領

域のヘテロクロマチン(*tel*)へと集積し、また、染色体腕部のユークロマチンでもコヒーシが多い領域 (*msh1, 56F2*) には比較的多く集積していた。Hrk1 のコヒーシ様の局在は、*hrk1-pim* および *pds5-him* 細胞で大きく低下した。Hrk1 の局在量の低下に応じて、そのリン酸化基質である H3-pT3 のリン酸化や、CPC のサブユニットのひとつである Bir1 の局在も低下したことから、PIM と HIM に依存した Hrk1-Pds5 の結合は、Hrk1 の局在化を通して CPC のセントロメア局在を促進していることが分かった。

また、CPC のサブユニットである Ark1 に GFP を融合し、非同調の細胞において分裂前中期の細胞でそのセントロメアへの局在を観察した (図 5 C)。野生型の細胞では Ark1-GFP のセントロメア局在はスピンドル微小管上にドット状に見られるが、*hrk1-pim* 及び *pds5-him* 細胞においてはその局在量が低下していた。Ark1-GFP の局在量は、完全な破壊株である *hrk1 Δ* や *pds5 Δ* 細胞と同等であったことから、PIM と HIM に依存した Hrk1 と Pds5 の結合は、Hrk1 が CPC をセントロメアに局在化させるのに必須であることが分かった。

4. セントロメアに局在する Hrk1 が CPC のセントロメア局在を規定する

CPC のセントロメア局在の低下は、メロテリック結合などの誤った微小管結合を修正することができなくなり、染色体分配の異常を誘発する。微小管重合阻害剤である TBZ を添加すると、分裂期スピンドル微小管の機能が部分的に阻害され、染色体分配機構に異常のある変異体は生育が抑制される。TBZ 存在下では、*hrk1-pim* および *pds5-him* 細胞は生育が抑制されることが分かった (図 6A)。

分裂酵母においては、CPC の局在低下は、分裂期後期のラギング染色体（片方の姉妹染色分体がメロテリック結合により細胞の両極から引っ張られ、娘細胞へと分配されずに赤道面に残ってしまう現象）を引き起こすことが知られている。分裂期後期の細胞の DNA を観察したところ、*hrk1-pim* 及び *pds5-him* 細胞ではラギング染色体の頻度が増加していた（図 6B）。これらの変異体で Hrk1 の局在量が低下したことにより、CPC のセントロメア局在が低下し染色体分配の異常を引き起こしているのだとしたら、Hrk1 を強制的にセントロメア領域へと局在化させることで CPC の局在低下や染色体分配異常を抑圧できるのではないかと考えた。そこで、Hrk1 の C 末端にヘテロクロマチンタンパク質 HP1/Swi6 の局在化ドメイン（CD: クロモドメイン）を融合させた Hrk1-CD を作成した（図 6C）。実際、細胞に発現させた Hrk1-CD は間期において単一のドット状に見え、主にペリセントロメアのヘテロクロマチンに局在していると考えられる（図 6D）。Hrk1-CD を *pds5-him* 細胞に発現させたところ、低下していた Ark1-GFP のセントロメア局在が野生型と同じ水準まで回復した（図 6E）。また、Hrk1 の PIM に変異の入った Hrk1-pim-CD を発現させることでも Ark1-GFP の局在量は回復したが、Hrk1 のキナーゼドメインに変異の入った Hrk1-KR-CD の発現では Ark1-GFP の局在を回復できなかった。さらに、*pds5-him* 細胞におけるラギング染色体の頻度の増加は、Hrk1-CD によって Hrk1 を強制的にセントロメアへと局在化させることで抑圧された（図 6F）。以上の結果より、PIM と HIM に依存した Hrk1-Pds5 の相互作用は、CPC のセントロメア局在という観点においては、Hrk1 の局在化だけに働いていると考えられる。

5. Top2/ Topoisomerase II は Pds5 を介した Hrk1 のセントロメア局在をサポートしている

近年のアフリカツメガエルおよび出芽酵母を用いた研究で、セントロメアに局在する DNA トポイソメラーゼ II α (分裂酵母 Top2)の C 末端が SUMO 化されたときに、Haspin の足場となることが報告されている(Edgerton et al., 2016; Yoshida et al., 2016)。そこで、分裂酵母においても、Top2 が Hrk1 のセントロメア局在に必要かどうか調べるために Top2 の SUMO 化サイトの変異体を作成した。先行研究より、分裂酵母における SUMO 化のプロテオミクス解析から、Top2 の C 末端には 12 箇所の SUMO 化されるリジン残基が存在することが分かっていたので(Kohler et al., 2015)、これら 12 箇所のリジン残基をアルギニンに置換した *top2-12KR* 変異体を作成した。ChIP 解析により、Hrk1 及び H3-pT3、CPC(Bir1)の局在を、*top2-12KR*、*pds5-him*、および *top2-12KR pds5-him* の 3 つの変異体で比較した (図 7A)。Hrk1 の局在は、*top2-12KR* 細胞でわずかに減少した。また、*pds5-him* 細胞で大きく減少していた Hrk1 の局在は、*pds5-him top2-12KR* 二重変異細胞ではほぼ完全に失われた。

また、これらの変異体において Ark1-GFP の局在を観察したところ、*top2-12KR* 細胞では Ark1-GFP のセントロメア局在は部分的に減少した (図 7B)。しかし、*pds5-him top2-12KR* 二重変異体では、Ark1-GFP の局在が *pds5-him* 単独変異細胞と同程度にしか減少しなかったことから、Pds5 と Top2 は Ark1 の局在化に同じ経路で働いていることが考えられる。

Top2 の分裂期での局在を ChIP 解析により見たところ、コアセントロメア領域 (*cnt1*, *imr1*) に局在していることが分かった (図 7C)。この Top2 の局在は、

Pds5(コヒーシン)やそれに伴う Hrk1 の局在とは異なっており、Top2 が Hrk1 の直接の足場となっているとは考えにくい。そこで、ChIP 解析によって *pds5-him* 変異体での Hrk1 の局在を詳細に解析したところ、驚いたことに、コアセントロメア領域において、Hrk1 の局在が野生型よりも増加していることが分かった (図 7D)。さらに、*top2-12KR pds5-him* 二重変異細胞ではその局在が低下したことから、*pds5-him* 細胞でのコアセントロメア領域の Hrk1 の増加は Top2 に依存していることが分かった。これらの結果から、Top2 は Hrk1 を染色体上 (特にコアセントロメア) に効率よく呼び込むのに必要であるが、呼び込まれた Hrk1 は Pds5 と相互作用することで染色体上 (特にペリセントロメア) に蓄積するというモデルが考えられた (図 7 E)。

6. コヒーシン解離因子 Wpl1/Wapl も保存された PIM を用いて Pds5 の HIM と結合する

ここまでの研究で、Pds5 が Hrk1 をセントロメアへ局在化させる分子機構の詳細が明らかになった。しかし、Pds5 は Hrk1 の局在化以外に姉妹染色分体間接着の制御にも必要であることがわかっている。特に、コヒーシン解離因子である Wpl1/Wapl は Pds5 と相互作用して働いていることが分かっている。Wapl は酵母からヒトまで保存されたタンパク質であるにも関わらず、Pds5 との相互作用様式の保存性は未だ分かっていない。

そこで、分裂酵母 Wpl1 が Hrk1 同様に PIM-HIM の相互作用モチーフを使って Pds5 と相互作用している可能性を考えた。分裂酵母 Wpl1 のアミノ酸配列を探索したところ、Hrk1 の PIM と相同性のある配列を発見した (図 8A)。また、

様々な真核生物の Wapl の多重アラインメントから、Wpl1/Wapl の PIM 配列は進化的に保存されていることが分かった。そこで、Wpl1 の PIM と Pds5 の HIM が Pds5-Wpl1 の相互作用に必要であるかどうか、酵母ツーハイブリッド法を用いて検証した。Wpl1 の N 末端断片は Pds5 と相互作用したが、その相互作用は *wpl1-pim* および、*pds5-him* の変異で失われた (図 8B)。したがって、Pds5 と Wpl1 の相互作用も PIM-HIM のタンパク質相互作用モジュールに依存していることが明らかになった。

次に、分裂酵母細胞内において PIM と HIM に依存した Pds5-Wpl1 の相互作用が Wpl1 の機能に必要かどうかを検証した。Eso1 の温度感受性変異体である *eso1-H17* は高温 (32°C) で生育が阻害されるが、拮抗する機能を持つ Wpl1 を破壊することで温度感受性が抑圧される。これを利用して、*eso1-H17 wpl1 Δ* 二重変異細胞に野生型及び、PIM 変異型 (*wpl1-pim*) を発現して、高温下での生育を確認した。野生型の Wpl1 を発現すると、*eso1-H17 wpl1 Δ* 二重変異細胞は高温で生育が阻害されるが、Wpl1-*pim* を発現しても細胞は高温感受性を示さなかった (図 8C)。したがって、PIM は Wpl1 の機能に必須であることが示された。

また、非同調 (主に G2 期) および M 期同調細胞を用いて共免疫沈降実験を行ったところ、Pds5 はどちらの条件においても Wpl1 に共免疫沈降されてきたことから (図 8D)、Wpl1 は細胞周期を通じて Pds5 と相互作用しているということが示唆された。また、共免疫沈降されてくる Pds5 の量は *pds5-him* 細胞を用いると野生型より減少することから、分裂酵母細胞内においても HIM は Pds5 と Wpl1 の相互作用に重要であることが分かった (図 8D)。 *pds5-him* 細胞にお

いてもまだ共免疫沈降されてくる Pds5 は、先行研究で報告されているように Pds5 以外のコヒーシンスブユニットと Wpl1 の相互作用を介して間接的に複合体を形成しているのではないかと考えられる(Hara et al., 2014; Ouyang et al., 2013)。

Wpl1 の PIM は真核生物でよく保存されていたために、ヒト Wapl も同様の結合様式を用いているかを検証した。先行研究より、ヒト Wapl は FGF モチーフと呼ばれる 3 つの相互作用モチーフで Pds5 と相互作用していることが示唆されていた(Nishiyama et al., 2010; Shintomi and Hirano, 2009)。しかし、脊椎動物以外の Wapl には FGF は見つかっておらず、進化的に保存された結合様式は不明であった。最近の研究により、ヒト Wapl1 は FGF に加えて YSR モチーフという相互作用モチーフを用いて Pds5 と相互作用することが報告されていた(Ouyang et al., 2016)。この YSR モチーフは、Wpl1 の PIM と相同のものであり、ヒト Wapl においても PIM を用いた相互作用様式が保存されていることを示唆している。実際、酵母ツーハイブリッド法により、ヒト Wapl の PIM (YSR モチーフ) が Pds5 との相互作用に必要なことが分かった (図 8E)。一方、FGF モチーフの変異では、Wapl と Pds5 の相互作用にほとんど影響が見られなかった (図 8E)。PIM (YSR モチーフ) が進化的に保存された Wapl-Pds5 の結合を主として引き受けていることが示唆され、FGF モチーフは高等動物においてその結合を補助するものであることが考えられる。

7. 分裂酵母のコヒーシ安定化因子 Eso1 も PIM を用いて Pds5 の HIM と結合する

Pds5 の下流でコヒーシを制御しているものとして、Eso1/ Eco1/ Escal が知られている。近年の研究により、ヒト Escal は Pds5 と相互作用することが示されたが、その Escal 側相互作用ドメインは脊椎動物感のみで保存されている (Minamino et al., 2015)。それに反して、分裂酵母 Eso1 や出芽酵母 Eco1 などその働きは Pds5 に依存しており、また、その相互作用も報告されているが、詳細な相互作用部位は明らかになっていない。Pds5-HIM の変異体である *pds5-him* 細胞で姉妹染色分体間接着に異常が起きうる (図 11) ことから、Eso1 も Pds5 の HIM を利用して相互作用しているのではないかと仮説を立てた。そこで、まずは Eso1 に PIM 様配列があるのではないかと考え探索した。Eso1 は N 末領域が種間によって大きく異なり、C 末端領域は Zinc Finger とアセチル基転移活性ドメインが高度に保存されている。分裂酵母 Eso1 の Zinc Finger 上流に、*Schizosaccharomyces* 属で保存された PIM 配列を発見した (図 9A)。これは先行研究 (Tanaka et al., 2000) で Pds5 との相互作用に十分な領域であると報告されていた部位に含まれており、変異を入れた Eso1-pim は Pds5 と相互作用しないことが分かった (図 9B)。また、Pds5-him も同様に Eso1 との相互作用を失ったことから、Eso1 も PIM-HIM の結合モチーフを使い Pds5 と相互作用していることが示唆された。

分裂酵母 *eso1-pim* 細胞では、高温及び微小管重合阻害剤 TBZ に感受性を示した (図 9C)。これらの感受性は *wpl1 Δ* 変異を導入することで抑圧されたので、*eso1-pim* 細胞では Eso1 の機能が低下しているということが分かった。

Eso1 はこれまで、コヒーシサブユニットのひとつである Psm3/ Smc3 をアセチル化することで、姉妹染色分体間接着を確立するということが分かっていた(Feytout et al., 2011; Kagami et al., 2011; Vaur et al., 2012)。そこで、*pds5-him* および *eso1-pim* の細胞抽出液から Psm3 を免疫沈降してきて、Psm3 のアセチル化特異的抗体 (anti-Ac106-Psm3) によりアセチル化状態を検出したところ、野生型と比較してそれらの変異体では Psm3 のアセチル化が減少していた (図 9D)。したがって、PIM-HIM を介した Pds5 と Eso1 の相互作用は Eso1 が Psm3 をアセチル化するのに必要であることが示された。

Eso1 の PIM は *Schizosaccharomyces* 属内でしか保存されておらず、出芽酵母 Eco1 には見つからなかった。出芽酵母 Eco1 は、DNA 複製装置と相互作用し、DNA 複製と協調してコヒーシをアセチル化することが知られている (Ben-Shahar et al., 2008; Lengronne et al., 2006)。Eco1 は PIP (PCNA-Interacting-Motif) をもち、PCNA と相互作用することでコヒーシのアセチル化を行う。この PIP は分裂酵母 Eso1 にも保存されており、PIM による Pds5 との相互作用との関係を調べるために PIP 変異体 (*eso1-PIP2A*) を作成した。それぞれの変異体の致死性をテトラド解析により検証した (図 9E)。Eso1 がなくても生存できる *wpl1* 破壊細胞 (*wpl1* Δ) において、それぞれの変異体を作成し、野生型の細胞と掛け合わせることで、Wpl1 存在下で Eso1 変異体が致死となるかを調べた。図 9C で示したように、*eso1-pim* 細胞は、Wpl1 存在下でも生育できたのに対し、*eso1-PIP2* 及び、*eso1-PIP2A-pim* 二重変異細胞は Wpl1 存在下で致死となった。この結果より、分裂酵母においても Eso1 と DNA 複製装置との相互作用は生存に必須であり、PIM による Eso1 と Pds5 の

相互作用は DNA 複製とは独立に、G2 期のコヒーシンのアセチル化の維持などに寄与している可能性が考えられる。

これまでの結果より、分裂酵母 *Eso1* も PIM-HIM の結合モチーフを使って *Pds5* と相互作用していることがわかったが、*Eso1* の PIM は *Schizosaccharomyces* 属内でしか保存されておらず、脊椎動物の *Esco1* は別のモチーフを用いて *Pds5* と相互作用している (Minamino et al., 2015)。高等動物においては、*Esco1* の他にも *Sororin* と呼ばれるタンパク質が *Wapl* と拮抗することで姉妹染色分体間接着を正に制御している (Nishiyama et al., 2010)。この *Sororin* の中にも保存された PIM 配列を見出した (図 10)。ヒト *Sororin*-PIM に変異をいれると、*Sororin* と *Pds5B* の相互作用が失われたことから、高等動物においては *Sororin* も PIM-HIM の相互作用モチーフを使っているということが示唆された。*Sororin* はヒト *Wapl* 同様に FGF モチーフを持ち、*Wapl* と排他的に *Pds5* と相互作用することが示唆されている (Nishiyama et al., 2010)。酵母ツーハイブリッドの結果では、FGF モチーフの変異は、わずかに *Pds5B* との相互作用を弱めることから、ヒト *Sororin* は PIM および FGF という 2 つのモチーフを用いて *Pds5* と相互作用していることが考えられる。

8. *Pds5* は HIM を介して姉妹染色分体間接着を制御する

Pds5 が HIM を介して *Wpl1* および *Eso1* と相互作用していることを示したが、姉妹染色分体間接着にはどのような影響を与えているだろうか。それぞれの変異体において、姉妹染色分体間接着の強度を測定するために、分裂期中期に停止した細胞において、姉妹セントロメア間の距離を測定した。APC/C のサブユ

ニットである *Cut9* の温度感受性変異株 *cut9-665* によって細胞を分裂中期に停止し、姉妹染色体間に張力が発生している状態で、二番染色体のセントロメア近傍を *LacO*、*GFP-lacI* で標識し (*cen2-GFP*)、その距離を測定した (図 11A)。野生型細胞では、*cen2-GFP* の距離は、 $0.5\mu\text{m}$ 以下だったのに対して、*pds5* Δ 細胞では平均 $1.5\mu\text{m}$ ほどになり、姉妹染色分体間の接着が弱くなっていることが分かった。同様に、*pds5-him* 細胞でも姉妹染色分体間接着が弱くなっていたが、一方で *hrk1* Δ や *hrk1-pim* 細胞では野生型と同等、*cen2-GFP* 間の距離は $0.5\mu\text{m}$ ほどであった。よって、*Pds5* の *HIM* は *Hrk1* の局在化以外にも姉妹染色分体間接着に必要であるということがわかった。さらに、*eso1* Δ *wpl1* Δ や *eso1* Δ *wpl1* Δ *pds5-him* 細胞も *pds5-him* 単独の細胞と同程度の姉妹染色分体間接着の異常を引き起こしたために、これらは同一経路でコヒーシンの制御に関わっているということが示唆された。

これまで、*Pds5* は *HIM* を介して、*Hrk1*, *Wpl1*, *Eso1* など複数の因子と相互作用することが分かった。それらが細胞内で競合的に結合しているのかを調べるために、それぞれのタンパク質の核内での量を測定した。内在性の *Pds5*, *Eso1*, *Wpl1*, *Hrk1* に *GFP* タグを融合し、*GFP* の蛍光強度でタンパク質量を比較した。その結果、間期および分裂期どちらにおいても、*Pds5* は他の 3 つより過剰に存在することが分かった (図 12)。*Hrk1* は、先行研究(Matsuyama et al., 2006)で示唆されていたとおり間期では核内に存在しておらず、また *M* 期の細胞においてもほとんど核内局在は見られなかった。*nda3-KM311* 細胞を用いて分裂期に長く停止させるとセントロメア局在が可視化できる (図 5A) ことから、非同調の細胞の分裂期では極めて少ない量の *Hrk1* が一過的にセントロメアに局在

しているのではないかと推測される。これらの結果より、Pds5 は PIM をもつパートナータンパク質よりも過剰量存在しているために、細胞内では Pds5-HIM への結合に競合は起こらず、それぞれの因子が Pds5 と相互作用し働くことができると考えられる。

まとめと展望

本研究から、コヒーシアクセサリサブユニットである Pds5 は、真核生物 Pds5 に広く保存された HIM というモチーフを用いて、Hrk1, Eso1、そして Wpl1 という複数の因子が染色体上で働くための足場となり、染色体分配の正確性を保証していることが分かった (図 13)。また、Pds5-HIM と結合するタンパク質は、共通の PIM というモチーフを持っていることがわかった。Hrk1 と Pds5 の相互作用は、Hrk1 を染色体上へと局在化させるのに必要であり、染色体上に局在化した Hrk1 はヒストン H3-T3 をリン酸化し、それが CPC/ Aurora B キナーゼの直接の足場となる。PIM-HIM を介した結合様式は、ヒト Haspin および Pds5B との相互作用にも保存されており、本研究の分裂酵母による解析をもとにして、当研究室の丹野、川村の手により、ヒト培養細胞においても Haspin のセントロメア局在は Pds5 および PIM-HIM の相互作用に依存していることが分かった。したがって、コヒーシサブユニット Pds5 による CPC 局在制御機構は真核生物において進化的に保存された分子機構であると考えられる。一方、アフリカツメガエルおよび出芽酵母において Haspin キナーゼの局在制御への関与が報告されており (Edgerton et al., 2016; Yoshida et al., 2016)、また、ヒト培養細胞においても Topoisomerase II が Aurora B のセントロメア局在に必要であることが示唆されていた (Coelho et al., 2008)。本研究では、分裂酵母の Topoisomerase II (Top2) は、Hrk1 の直接の足場というよりも、Pds5 による Hrk1 の局在化を助ける補助因子であることが示唆された。この機構も進化的に保存されているのではないかと考えられる。

先行研究 (Yamagishi et al., 2010) および、本研究での ChIP 解析 (図 5B) か

ら、Hrk1はコヒーシが多い場所へと局在化するのに対して、その基質であるH3-pT3はヘテロクロマチン領域のみに集積し、ユークロマチン領域には見られない。先行研究により、Hrk1とヘテロクロマチンタンパク質であるSwi6との相互作用が報告されており、これらの相互作用もしくはヘテロクロマチンの他の性質がHrk1のキナーゼ活性を制御している可能性が考えられる。Hrk1/Haspinキナーゼの活性制御機構については、脊椎動物において自己不活性化ドメインが知られている(Ghenoiu et al., 2013)のみであり、ヘテロクロマチンによる活性制御を知ることでHrk1/Haspinのより詳細な分子制御を理解できることが期待される。

本研究では、CPCの局在制御を担うHrk1との相互作用の他に、姉妹染色分体間接着制御因子であるWpl1, Eso1とPds5の相互作用もPIM-HIMに依存していることを発見した。Wpl1のPIMは真核生物でよく保存されており、本研究において分裂酵母で、また、先行研究(Ouyang et al., 2016)においてヒト培養細胞でWpl1/Waplのコヒーシン解離作用に必須であることが示された。Pds5-HIMを含む領域は、最初に出芽酵母においてEco1の温度感受性変異体を抑圧する変異体として単離され(Rowland et al., 2009)、Wpl1の働きに必要なドメインであることが示唆された。近年のX線結晶構造解析を用いた解析により、ヒトWaplのYSRモチーフ(PIM相当領域)とPds5-HIM近傍が直接結合することが示された(Ouyang et al., 2016)。高等動物WaplはさらにN末端領域にFGFモチーフを持ち、これもPds5との相互作用を担い、同じくFGFモチーフをもつSororinと排他的に結合することが示唆されている(Nishiyama et al., 2010; Shintomi and Hirano, 2009)。分裂酵母を始めとする原始的な真核生

物には Wpl1 の FGF モチーフおよび Sororin タンパク質自体が存在しない。高等動物の Pds5 に特有の FGF モチーフは、より複雑な姉妹染色分体間接着制御を作り出すために進化の過程で獲得されたものと考えられる。

分裂酵母 Eso1 も PIM をもち、Pds5-HIM と相互作用することでコヒーシサブユニット Psm3 をアセチル化し、姉妹染色分体間接着を安定化させることが分かった。Hrk1, Wpl1 と違い、Eso1 の PIM は *Schizosaccharomyces* 属のみで保存されており、出芽酵母や脊椎動物など他の真核生物には発見できず、脊椎動物 Esco1 は、PIM ではない別のモチーフを用いて Pds5 と相互作用することが報告されている (Minamino et al., 2015; Rahman et al., 2015)。先に述べたように、高等動物には姉妹染色分体間接着安定化因子として Sororin が存在し、PIM によって Pds5 と相互作用している。これらの事実から、分裂酵母 Eso1 は、PIM をもつ Sororin と、アセチル基転移酵素活性をもつ Esco1 とに進化の過程で別れたのではないかと推測される。また、出芽酵母 Eco1 および脊椎動物 Esco2 は複製装置 (PCNA や pre-RC) と相互作用し、複製と協調してコヒーシンのアセチル化を行うことが報告されている (Ben-Shahar et al., 2008; Higashi et al., 2012; Moldovan et al., 2006)。分裂酵母 Eso1 も PCNA と相互作用する PIP (PCNA-Interacting-Peptide) を持ち、PIP 変異体は致死であったことから、複製装置との相互作用は Eso1 の機能に必須であることが考えられる。Eso1-PIM 変異体は致死にはならないが、コヒーシン Psm3 のアセチル化は大きく減少するので、S 期に複製と協調したコヒーシンのアセチル化を効率よく行うため、あるいは G2 期のコヒーシンのアセチル化を維持する役割があるのではないかと考えられる。

PIM-HIM を介した Pds5 との結合は、Hrk1 により姉妹染色分体の両方向性を担い、Eso1, Wpl1 により姉妹染色分体間接着を制御することを本研究で示したが、これらの他にも PIM をもち Pds5-HIM を染色体上の足場としているタンパク質が存在している可能性も考えられる。Pds5 破壊株は染色体分配の異常のみならず、DNA ダメージへの感受性や低栄養状態からの回復に異常が見られる (Wang et al., 2002)。これらの生命現象に関わる因子も、Pds5 の HIM を介して染色体上で機能している可能性が今後の展望として考えられる。

引用文献

- Ben-Shahar, T.R., Heeger, S., Lehane, C., East, P., Flynn, H., Skehel, M., and Uhlmann, F. (2008). Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* (80-). *321*, 563–566.
- Carretero, M., Ruiz-Torres, M., Rodriguez-Corsino, M., Barthelemy, I., and Losada, A. (2013). Pds5B is required for cohesion establishment and Aurora B accumulation at centromeres. *EMBO J* *32*, 2938–2949.
- Chan, K.L., Gligoris, T., Upcher, W., Kato, Y., Shirahige, K., Nasmyth, K., and Beckouet, F. (2013). Pds5 promotes and protects cohesin acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 13020–13025.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., and Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* *127*, 983–997.
- Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., and Nasmyth, K. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol Cell* *5*, 243–254.
- Coelho, P.A., Queiroz-Machado, J., Carmo, A.M., Moutinho-Pereira, S., Maiato, H., and Sunkel, C.E. (2008). Dual role of topoisomerase II in centromere resolution and aurora B activity. *PLoS Biol* *6*, e207.
- Edgerton, H., Johansson, M., Keifenheim, D., Mukherjee, S., Chacon, J.M., Bachant, J., Gardner, M.K., and Clarke, D.J. (2016). A noncatalytic function of the topoisomerase II CTD in Aurora B recruitment to inner centromeres

during mitosis. *J Cell Biol* 213, 651–664.

Feytout, A., Vaur, S., Genier, S., Vazquez, S., and Javerzat, J.P. (2011).

Psm3 acetylation on conserved lysine residues is dispensable for viability in fission yeast but contributes to Eso1-mediated sister-chromatid cohesion by antagonizing Wpl1. *Mol Cell Biol*.

Gandhi, R., Gillespie, P.J., and Hirano, T. (2006). Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr. Biol.* 16, 2406–2417.

Ghenoiu, C., Wheelock, M.S., and Funabiki, H. (2013). Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis. *Mol Cell* 52, 734–745.

Hara, K., Zheng, G., Qu, Q., Liu, H., Ouyang, Z., Chen, Z., Tomchick, D.R., and Yu, H. (2014). Structure of cohesin subcomplex pinpoints direct shugoshin-Wapl antagonism in centromeric cohesion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 864–870.

Higashi, T.L., Ikeda, M., Tanaka, H., Nakagawa, T., Bando, M., Shirahige, K., Kubota, Y., Takisawa, H., Masukata, H., and Takahashi, T.S. (2012).

The prereplication complex recruits XEco2 to chromatin to promote cohesin acetylation in *Xenopus* egg extracts. *Curr. Biol.* 22, 977–988.

Huis in 't Veld, P.J., Herzog, F., Ladurner, R., Davidson, I.F., Piric, S., Kreidl, E., Bhaskara, V., Aebersold, R., Peters, J.-M., Huis, P.J., et al. (2014). Characterization of a DNA exit gate in the human cohesin ring. *Science* 346,

968–972.

Kagami, A., Sakuno, T., Yamagishi, Y., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Shirahige, K., Tanaka, K., and Watanabe, Y. (2011). Acetylation regulates monopolar attachment at multiple levels during meiosis I in fission yeast. *EMBO Rep* 12, 1189–1195.

Kawashima, S.A., Yamagishi, Y., Honda, T., Ishiguro, K., and Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science* (80-). 327, 172–177.

Kitajima, T.S., Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Watanabe, Y. (2003). Distinct cohesin complexes organize meiotic chromosome domains. *Science* (80-). 300, 1152–1155.

Kohler, J.B., Tammsalu, T., Jorgensen, M.M., Steen, N., Hay, R.T., and Thon, G. (2015). Targeting of SUMO substrates to a Cdc48-Ufd1-Npl4 segregase and STUbL pathway in fission yeast. *Nat Commun* 6, 8827.

Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B.H., Lipp, J.J., Schleiffer, A., Mechtler, K., and Peters, J.M. (2006). Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 127, 955–967.

Lengronne, A., McIntyre, J., Katou, Y., Kanoh, Y., Hopfner, K.P., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2006). Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell* 23, 787–799.

Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., et al. (2006).

ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* *24*, 841–847.

Minamino, M., Ishibashi, M., Nakato, R., Akiyama, K., Tanaka, H., Kato, Y., Negishi, L., Hirota, T., Sutani, T., Bando, M., et al. (2015). Esco1 Acetylates Cohesin via a Mechanism Different from That of Esco2. *Curr Biol* *25*, 1694–1706.

Moldovan, G.L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2006). PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell* *23*, 723–732.

Murayama, Y., and Uhlmann, F. (2015). DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism. *Cell* *163*, 1628–1640.

Nasmyth, K. (2005). How might cohesin hold sister chromatids together? *Philos. Trans. R. Soc. London - Ser. B Biol. Sci.* *360*, 483–496.

Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A.A., Mechtler, K., et al. (2010).

Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell* *143*, 737–749.

Ouyang, Z., Zheng, G., Song, J., Borek, D.M., Otwinowski, Z., Brautigam, C.A., Tomchick, D.R., Rankin, S., and Yu, H. (2013). Structure of the human cohesin inhibitor Wapl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 11355–11360.

Ouyang, Z., Zheng, G., Tomchick, D.R., Luo, X., and Yu, H. (2016).

Structural Basis and IP6 Requirement for Pds5-Dependent Cohesin

Dynamics. *Mol Cell* 62, 248–259.

Rahman, S., Jones, M.J., and Jallepalli, P. V (2015). Cohesin recruits the Esc1 acetyltransferase genome wide to repress transcription and promote cohesion in somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11270–11275.

Rowland, B.D., Roig, M.B., Nishino, T., Kurze, A., Uluocak, P., Mishra, A., Beckouet, F., Underwood, P., Metson, J., Imre, R., et al. (2009). Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol Cell* 33, 763–774.

Shintomi, K., and Hirano, T. (2009). Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev* 23, 2224–2236.

Sutani, T., Kawaguchi, T., Kanno, R., Itoh, T., and Shirahige, K. (2009). Budding Yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 Complex Counteracts Sister Chromatid Cohesion-Establishing Reaction. *Curr. Biol.* 19, 492–497.

Tanaka, K., Yonekawa, T., Kawasaki, Y., Kai, M., Furuya, K., Iwasaki, M., Murakami, H., Yanagida, M., and Okayama, H. (2000). Fission yeast Eso1p is required for establishing sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell Biol* 20, 3459–3469.

Tanaka, K., Hao, Z., Kai, M., and Okayama, H. (2001). Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *EMBO J.* 20, 5779–5790.

Unal, E., Heidinger-Pauli, J.M., Kim, W., Guacci, V., Onn, I., Gygi, S.P., and

- Koshland, D.E. (2008). A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science* (80-). *321*, 566–569.
- Vaur, S., Feytout, A., Vazquez, S., and Javerzat, J. (2012). Pds5 promotes cohesin acetylation and stable cohesin–chromosome interaction. *EMBO Rep.* *13*, 645–652.
- Wang, S.-W., Read, R.L., and Norbury, C.J. (2002). Fission yeast Pds5 is required for accurate chromosome segregation and for survival after DNA damage or metaphase arrest. *J Cell Sci* *115*, 587–598.
- Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 370–382.
- Welburn, J.P., Vleugel, M., Liu, D., Yates 3rd, J.R., Lampson, M.A., Fukagawa, T., and Cheeseman, I.M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell* *38*, 383–392.
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* (80-). *330*, 239–243.
- Yamagishi, Y., Yang, C.H., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2012). MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat Cell Biol* *14*, 746–752.
- Yokobayashi, S., and Watanabe, Y. (2005). The kinetochore protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* *123*,

803–817.

Yoshida, M.M., Ting, L., Gygi, S.P., and Azuma, Y. (2016). SUMOylation of DNA topoisomerase IIalpha regulates histone H3 kinase Haspin and H3 phosphorylation in mitosis. *J Cell Biol* *213*, 665–678.

謝辞

本研究は東京大学分子細胞生物学研究所 渡邊研究室において行われました。熱心に指導して下さった渡邊嘉典先生に感謝申し上げます。

研究室の中では、たくさんの先輩や同期、後輩に研究の進め方、実験手法の手ほどきなどをしていただき大変感謝いたします。特に、修士課程で入学したときから山岸有哉博士には大変多くのことを学ばせていただき感謝いたします。丹野悠司博士、作野剛士博士には実験以外にも精神的な支えになって下さり感謝しています。また、明楽隆志博士とは研究室内でも近い分野で、普段からたくさん議論していただき大変お世話になりました。新富（川村）美雪氏には、ヒト培養細胞を用いて本研究の進化的保存性を示すのに重要な実験をしていただき感謝します。

また、分生研白鬚研究室所属の須谷尚史博士には ChIP 解析の助言をいただき、南野雅博士にはコヒーシン制御について深い議論をしていただき大変感謝しております。

最後に、家族や友人など平素から支えてくださっている皆様に感謝の意を遅らせていただきます。

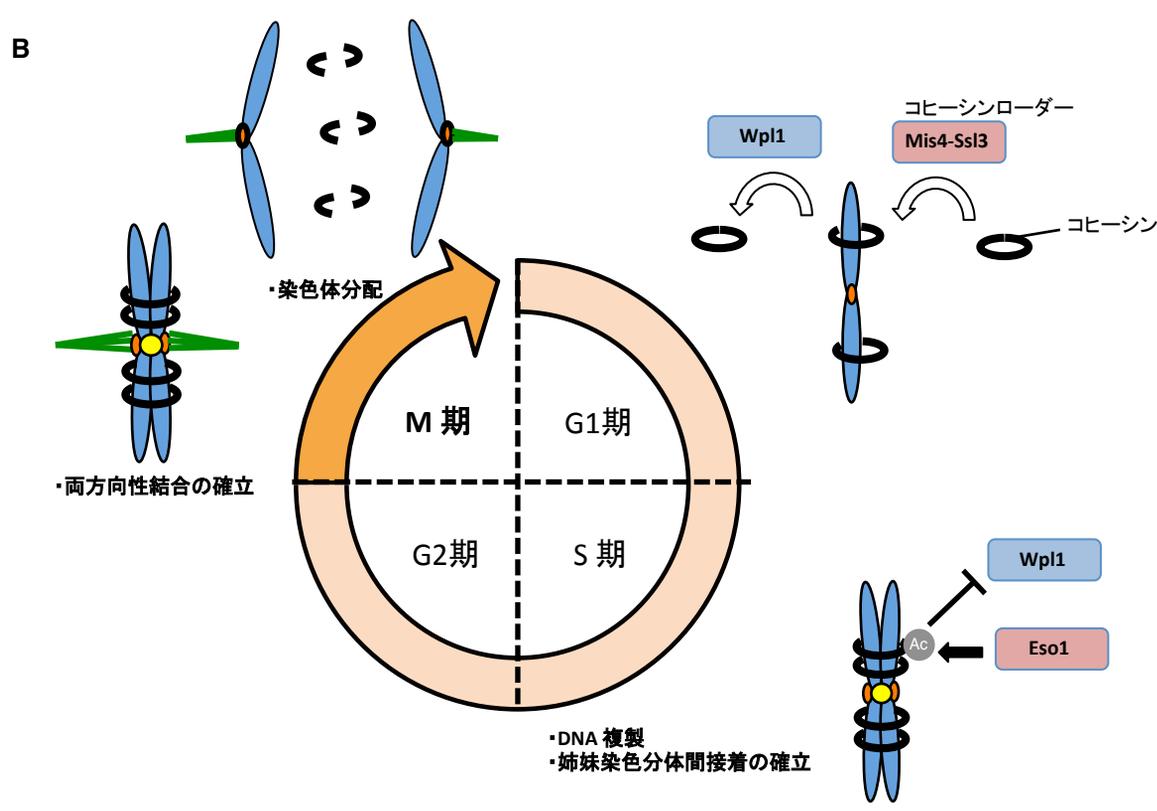
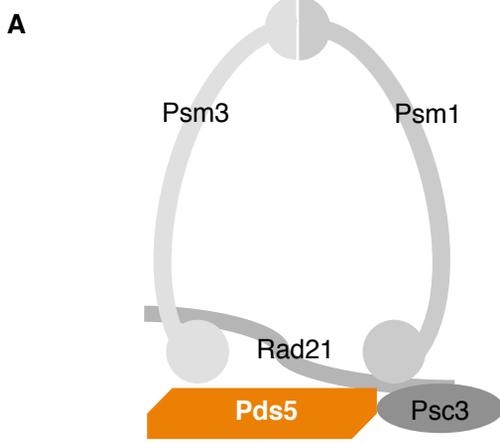


図1 コヒーシンによる姉妹染色分体接着と分裂期の染色体動態

- (A) コヒーシン複合体の模式図。コヒーシン複合体は、Smc (Structural maintenance complex)サブユニットであるPsm1, Psm3、およびKleisinサブユニットであるRad21、SAサブユニットであるPsc3からなるリング状のタンパク質複合体である。さらに、コヒーシンの機能を助けるアクセサリサブユニットとしてPds5がある。Pds5はその他のコアサブユニットと違い、分裂酵母では生存に必須ではないがコヒーシンの様々な機能に関わっている。
- (B) 細胞周期における染色体動態とコヒーシン。G1期には、コヒーシンローダーであるMis4-Ssl3によってコヒーシンが染色体にローディングされてくる一方、Wpl1/Waplによってコヒーシンは染色体から解離する。S期ではDNA複製と協調して、Eso1アセチルトランスフェラーゼによるコヒーシンのアセチル化が起きる。コヒーシンのアセチル化は、Wpl1の機能と拮抗し、姉妹染色分体間の接着が確立する。M期に入ると姉妹染色分体は両方向から伸長してきたスピンドル微小管によって捉えられる。その後、コヒーシンがセパレーゼによって切断されることで、姉妹染色分体は娘細胞へと分配される。

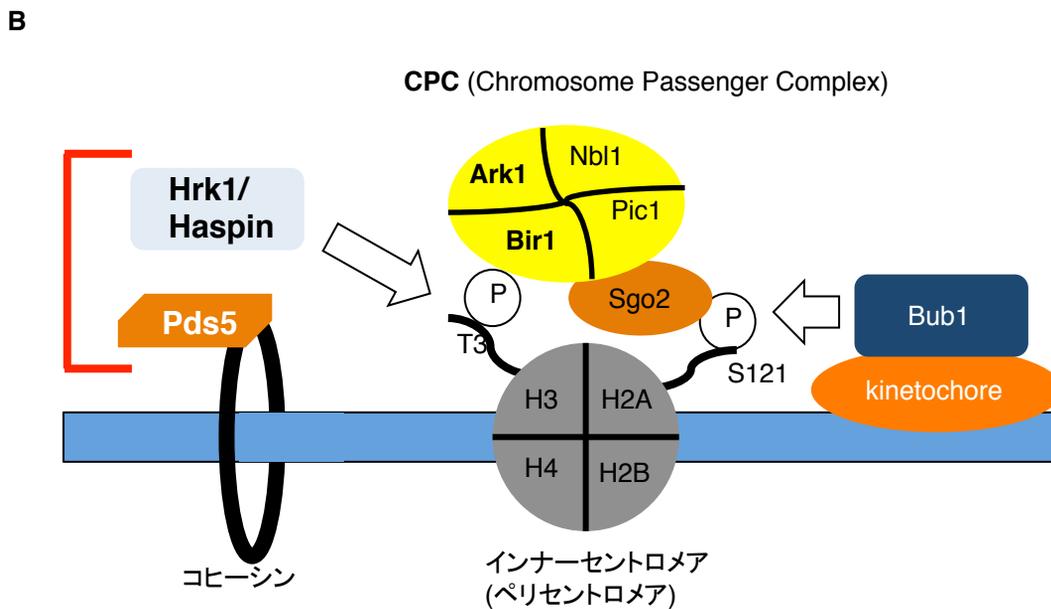
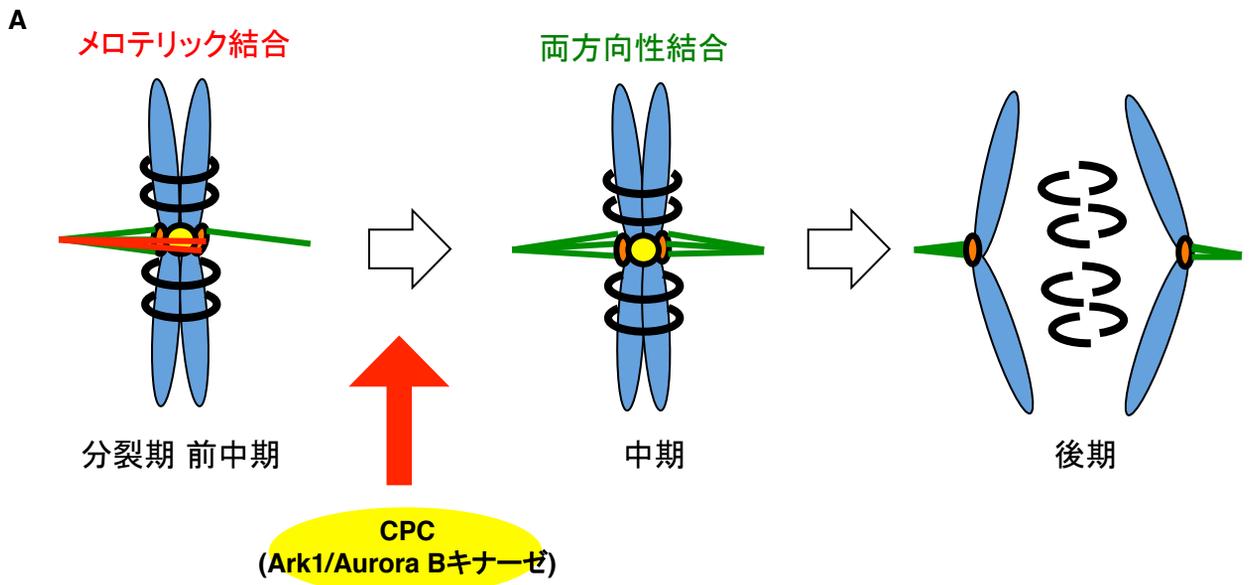


図2 CPC/Aurora Bキナーゼによる姉妹染色体両方向性結合確立とCPC局在化分子機構

- (A) Aurora Bキナーゼによる両方向性結合の確立。分裂期初期(前中期)には、コヒーシンによって束ねられた姉妹染色分体の動原体が間違った方向からスピンドル微小管によって捉えられるメロテリック結合(赤線)が多く見られる。しかし、これらの誤った微小管結合はAurora Bキナーゼを含むCPC(Chromosome Passenger Complex)によって選択的に不安定化され、分裂中期には両方向から捉えられる2方向性結合が確立する。その後、分裂後期へと進行することで、姉妹染色分体は正確に娘細胞へと分配される。
- (B) CPCは、キネトコア局在キナーゼであるBub1(図右)とHrk1/Haspinキナーゼ(図左)によるヒストンの2箇所のリン酸化によってセントロメア領域へと局在化することができる(Yamagishi et al., 2010)。Bub1は分裂期にキネトコア上に局在し、キネトコア近傍のヒストンH2AS121をリン酸化する。リン酸化H2AにはシュゴシンSgo2が結合し、そこにCPCが直接結合する。また、Hrk1/Haspinはコヒーシン近傍(染色体軸上)のヒストンH3T3をリン酸化し、そこにCPCが直接結合する。これら2つのリン酸化の交差する部分(インナーセントロメア)にCPCは集積する。

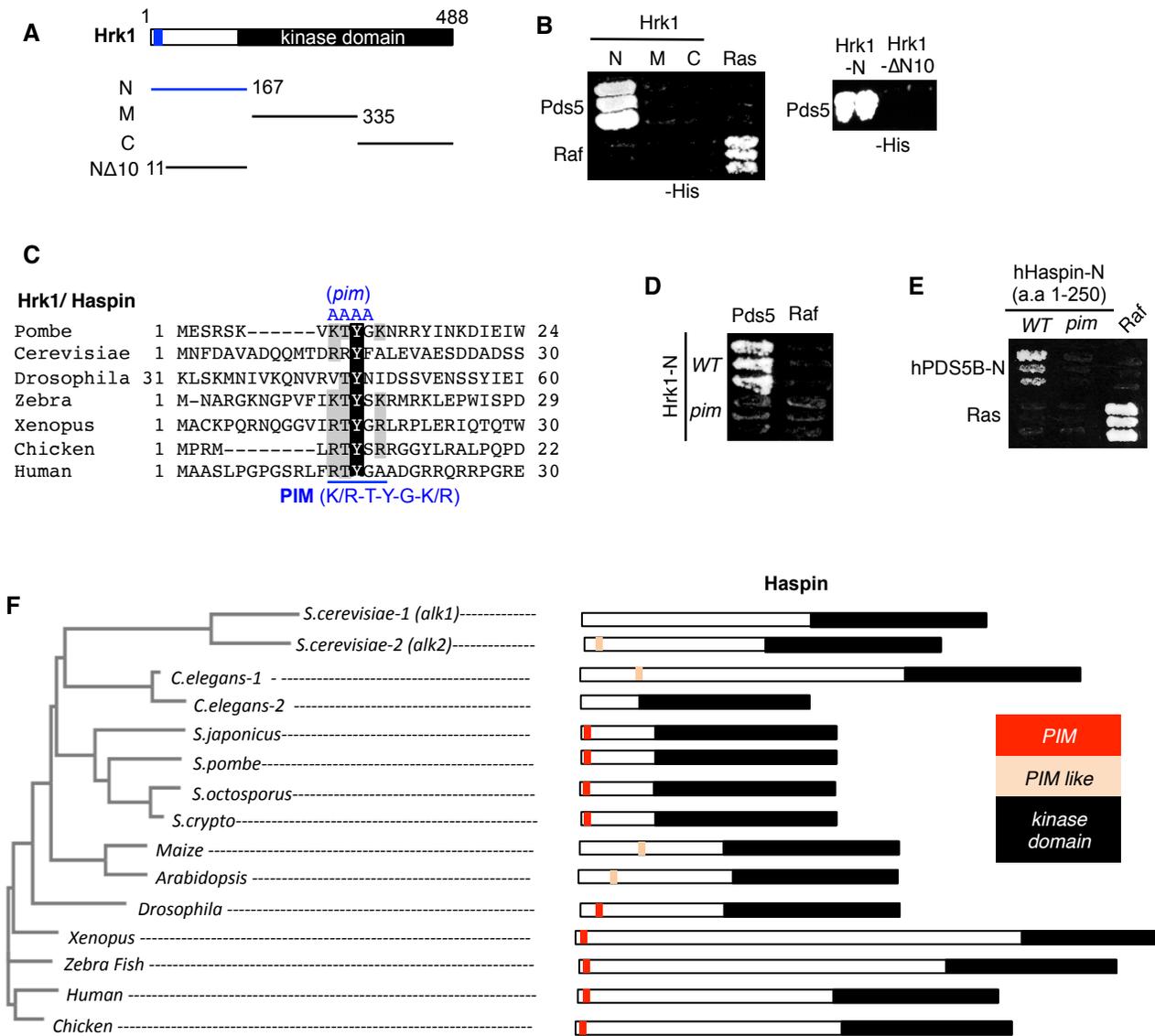


図3 Hrk1/Haspinは保存されたPIM: Pds5-Interacting-Motifを介してPds5と結合する

- (A) 分裂酵母Hrk1の模式図と酵母ツーハイブリッド法に用いた断片。黒色はキナーゼドメイン、青色はPds5との相互作用に必要な領域を示している。
- (B) 酵母ツーハイブリッド法によってPds5とHrk1の相互作用を検証した。BaitにHrk1の断片、PreyにPds5の全長を用いた。RasおよびRafはコントロールとして用いている。
- (C) 真核生物でのHrk1/HaspinのN末端領域の多重アラインメントおよび、PIM配列。
- (D) 酵母ツーハイブリッド法によってHrk1のN末端の野生型 (*WT*) 及び変異体 (*pim*) のPds5への相互作用を検証した。
- (E) ヒトHaspin-N (aa. 1-250) およびヒトPds5B-N (aa. 1-400) の相互作用およびPIM依存性を酵母ツーハイブリッド法を用いて検証した。
- (F) Hrk1/Haspinのキナーゼドメインの多重アラインメントをもとにした系統樹。および、各生物種におけるHaspinのドメイン模式図。PIM like配列は以下の通りである。 *S.cerevisiae* alk2: aa.14-RRYFA-, *C.elegans*-1: aa.156-REYHD-, *Maize*: aa.114-KAYFE-, *Arabidopsis*: aa.78-RAYVN-.

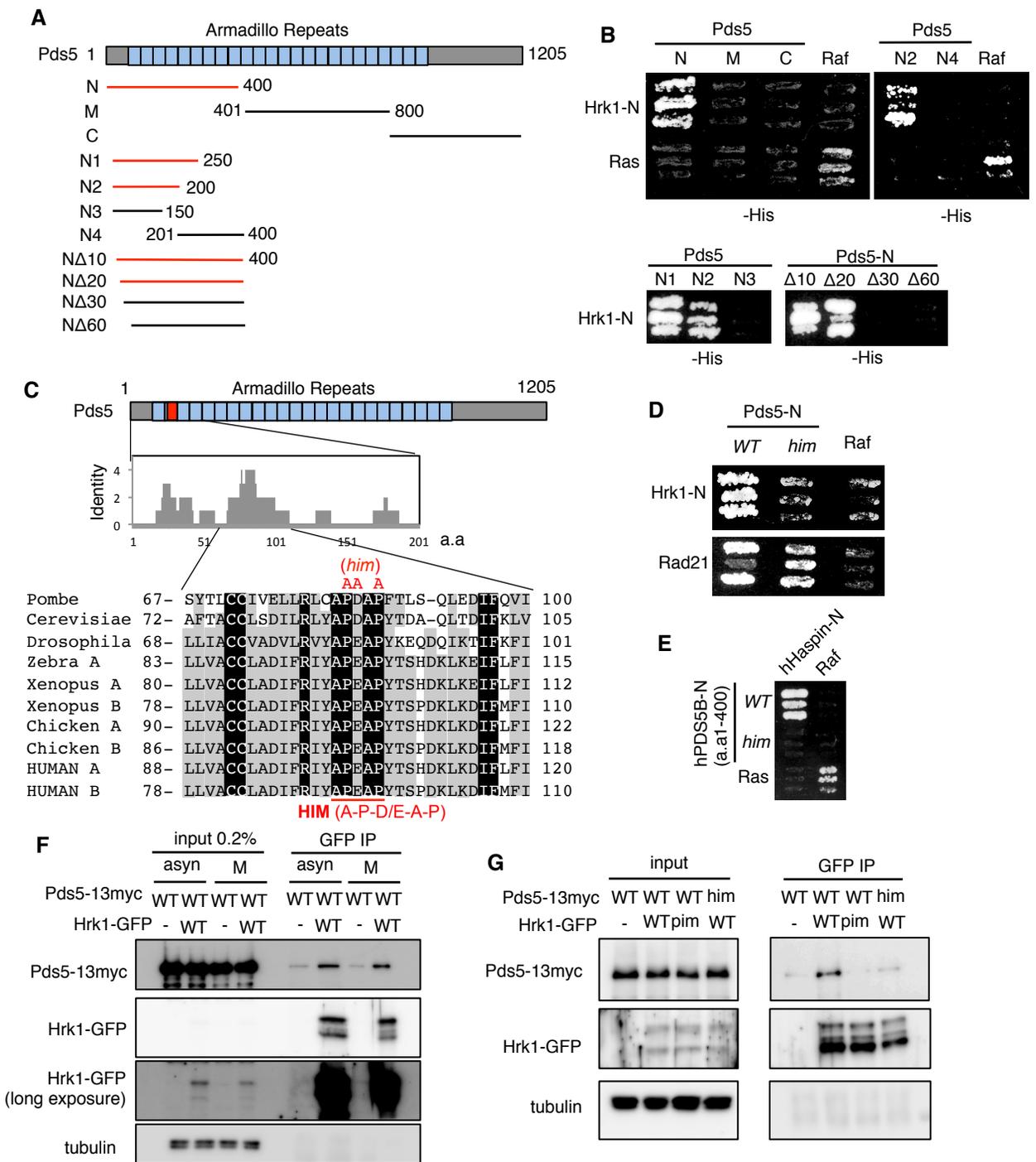


図4 Pds5は保存されたHIM: Haspin-Interacting-Motifを介してHrk1と結合する

- (A) 分裂酵母Pds5の模式図と酵母ツーハイブリッド法に用いた断片。赤色は(B)において、Hrk1のN末端断片と相互作用したPds5の断片を示している。
- (B) 酵母ツーハイブリッド法によってPds5断片とHrk1の相互作用を検証した。BaitにHrk1のN末端断片、PreyにPds5の断片を用いた。RasおよびRafはコントロールとして用いている。
- (C) 真核生物でのPds5のN末端領域の保存性の高さを、種間でのアミノ酸配列の同一性によりスコア化した。最も保存性が高い部分について多重アラインメントを示した。HIM配列を赤字で示す。
- (D) 酵母ツーハイブリッド法によってPds5の野生型 (*WT*) 及び変異体 (*him*) のHrk1N末端断片への相互作用を検証した。
- (E) ヒトHaspin-N (aa. 1-250) およびヒトPds5B-N (a.a 1-400) の相互作用およびHIM依存性を酵母ツーハイブリッド法を用いて検証した。

図4 (続き)

(F) 分裂酵母抽出液を用いて、Hrk1-GFPの免疫沈降を行った。ウエスタンブロッティングによりHrk1-GFPおよび共免疫沈降されてくるPds5-13mycの検出を行った。asynは非同調の細胞(多くはG2期)、Mlは*nda3-KM3111*によって分裂期前中期に停止した細胞を示す。チューブリンは共免疫沈降のネガティブコントロールとして検出した。

(G) *nda3-KM3111*によって分裂前中期に停止した野生型及び、Hrk1-pim-GFPおよびPds5-him-13myc発現細胞の細胞抽出液からHrk1-GFPを免疫沈降して(F)と同様の検出を行った。

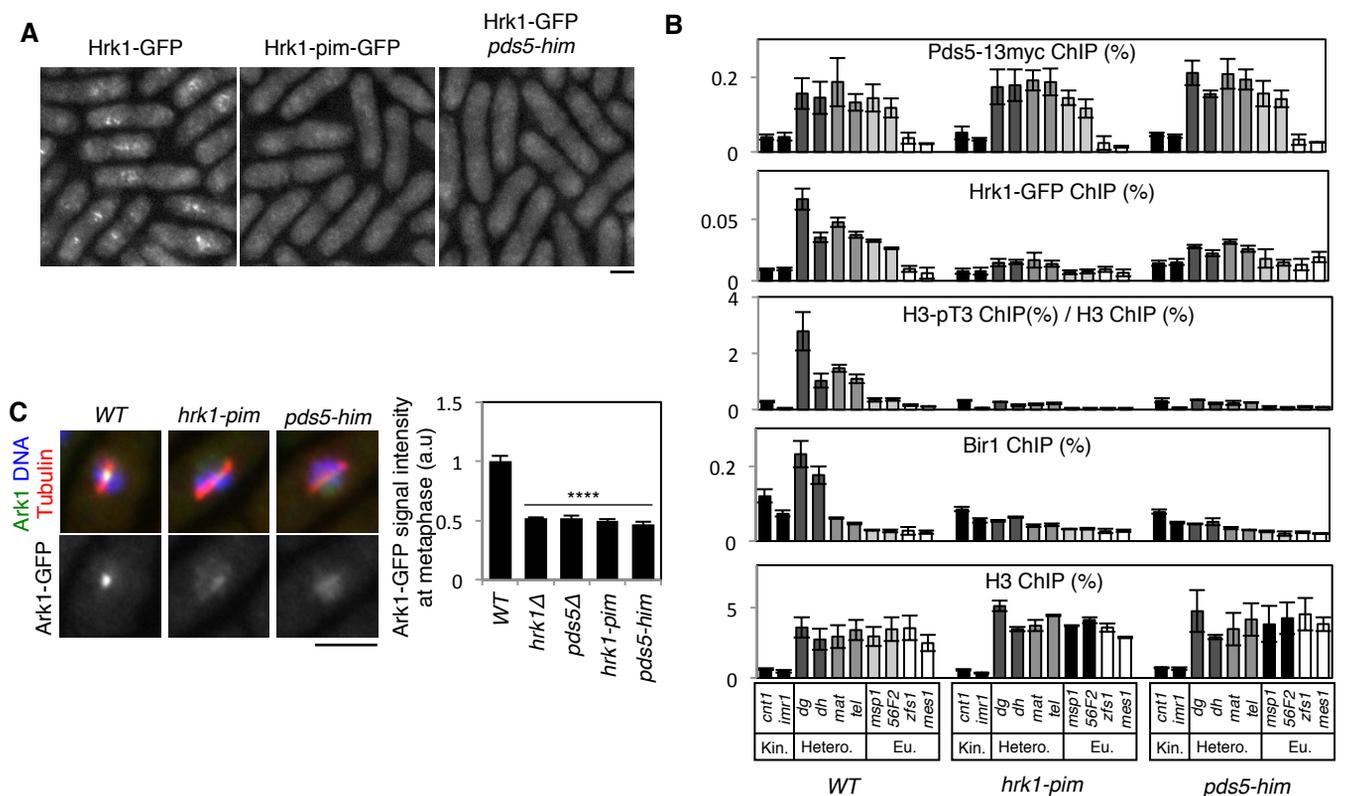


図5 Pds5とHrk1の相互作用はHrk1の染色体局在に必要である

- (A) 内在性のHrk1のC末端にGFPタグを融合してHrk1の細胞内局在を可視化した。B-チューブリンの低温感受性変異株である*nda3-KM311*によってスピンドル微小管を破壊することで細胞を分裂期で停止させている。
- (B) Pds5-13myc、Hrk1-GFP、H3-pT3、Bir1 (CPCの一つ)、およびヒストンH3の各染色体上におけるChIP-qPCRの結果を示している。*cnt1*、*imr1*はコアセントロメア領域、*dg*、*dh*はペリセントロメアのヘテロクロマチン領域、*mat*はmating type locusのヘテロクロマチン領域、*tel*はサブテロメア領域のヘテロクロマチン領域、その他はユークロマチン領域を示している。ユークロマチン領域の中でも、*msp1*および56F2はコヒーシが多い領域、*zfs1*および*mes1*はコヒーシが少ない領域を示している。
- (C) 内在性のArk1の局在をC末端にGFPを融合することで観察した。非同調の細胞で、分裂中期のものをスピンドルの形状およびDAPIの形状で判別した。グラフは分裂中期のArk1-GFPのシグナル強度を定量したものであり、それぞれの遺伝子型を持つ細胞を20細胞カウントするのを1つの実験とし、3回の独立した実験の平均およびSDを示している。有意差検定は、one-way ANNOVAを用い、Bonferroniの多重検定補正を行うことにより野生型(WT)とその他の株との間の有意差を検定した(**** $p < 0.001$)。

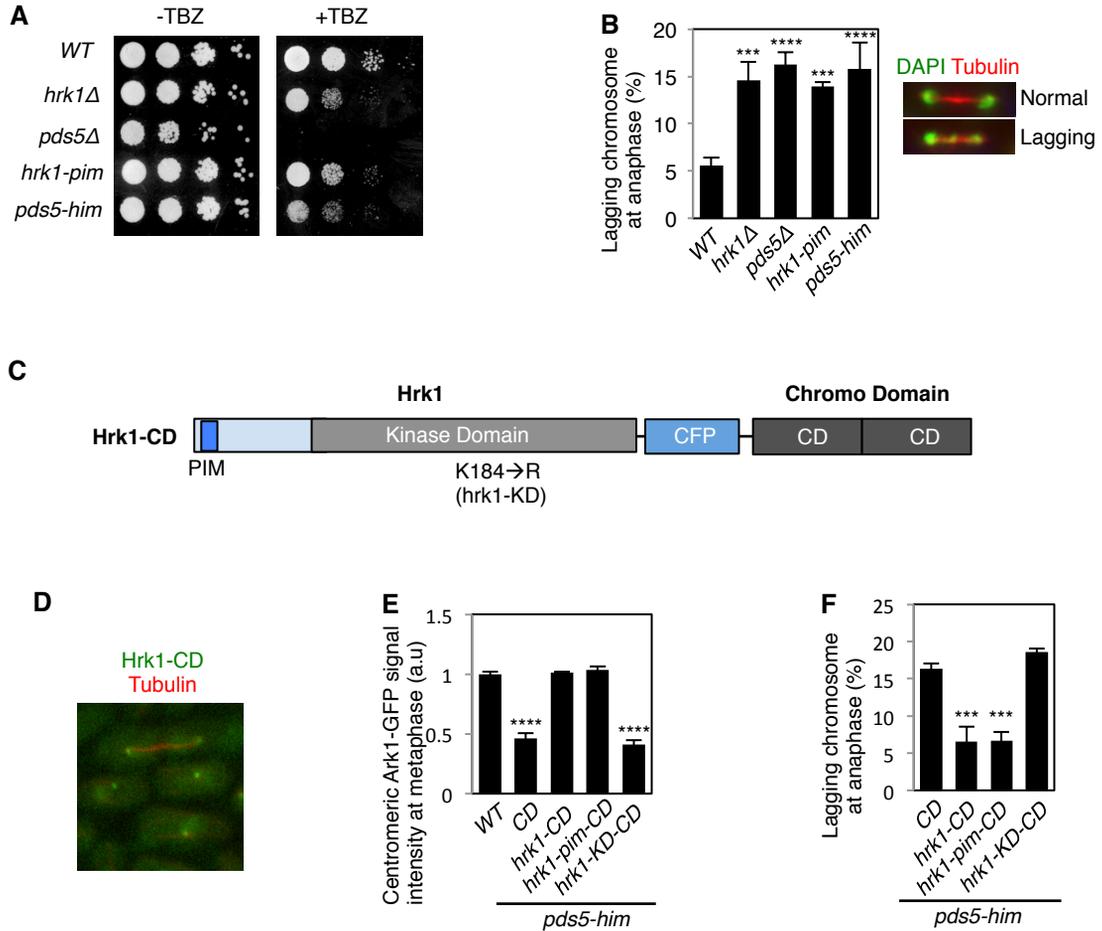


図6 Hrk1のセントロメアへの強制局在はCPCの局在に必要十分である

- (A) 微小管重合阻害剤TBZへの感受性を、プレート上での細胞の生育で比較する。TBZ+には15 μ g/mlのTBZが含まれている。
- (B) それぞれの遺伝子型を示す株において、分裂後期の細胞でラギング染色体(Lagging Chromosome)が観察される頻度を定量化した。右代表図で示すように、分裂後期の細胞はスピンドル微小管の長さで判断し、ラギング染色体はDAPI染色により判断した。それぞれの遺伝子型につき、分裂後期の細胞を100以上測定するのを1つの実験とし、3回の独立した実験の平均およびSDを示している。
- (C) Hrk1-CDの模式図。Hrk1のC末端に、CFPを挟んでSwi6のクロモドメインCDを融合した。K184はHrk1キナーゼドメインの活性中心の残基であり、アルギニンに置換することでキナーゼ不活性化型(kinase dead, KD)となる。
- (D) Hrk1-CDの局在を観察した。Hrk1-CDはHrk1とCDのリンカーとして用いているCFPによって可視化し、同時にmCherry-Atb2 (tubulin)によって間期か分裂期かを判別している。
- (E) Hrk1-CDを*pds5-him*の細胞に発現させた時の、分裂中期のArk1-GFPのシグナル強度を定量化した。それぞれの遺伝子型を持つ細胞を20細胞カウントするのを1つの実験とし、3回の独立した実験の平均およびSDを示している。
- (F) Hrk1-CDを*pds5-him*の細胞に発現させた時の、分裂後期の細胞でラギング染色体(Lagging Chromosome)が観察される頻度を定量化した。それぞれの遺伝子型につき、分裂後期の細胞を100以上測定するのを1つの実験とし、3回の独立した実験の平均およびSDを示している。
- (B),(E),(F)の有意差検定は、one-way ANNOVAを用い、Bonferroniの多重検定補正を行うことにより野生型(WT)とその他の株との間の有意差を検定した(***) $p < 0.05$, (****) $p < 0.001$ 。

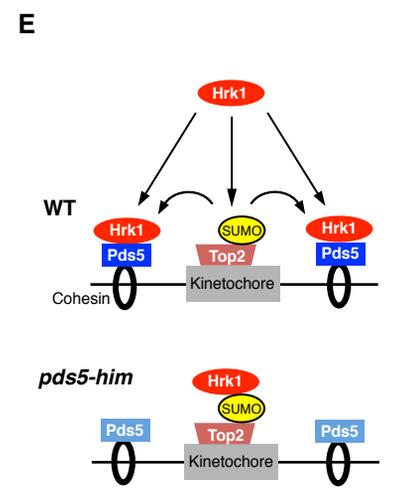
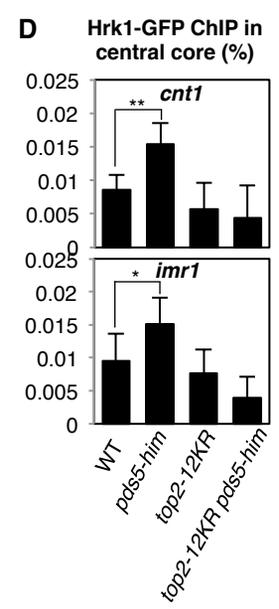
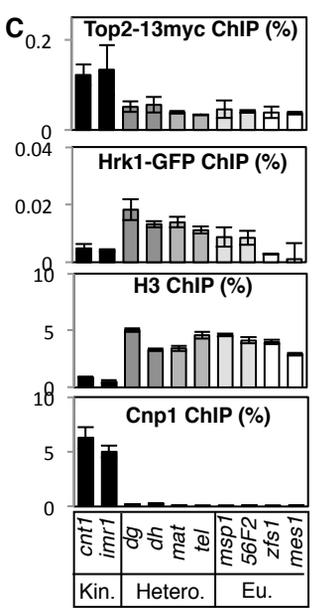
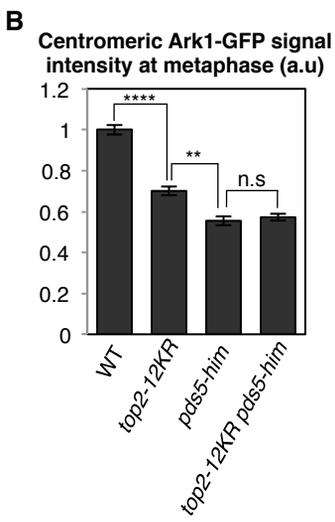
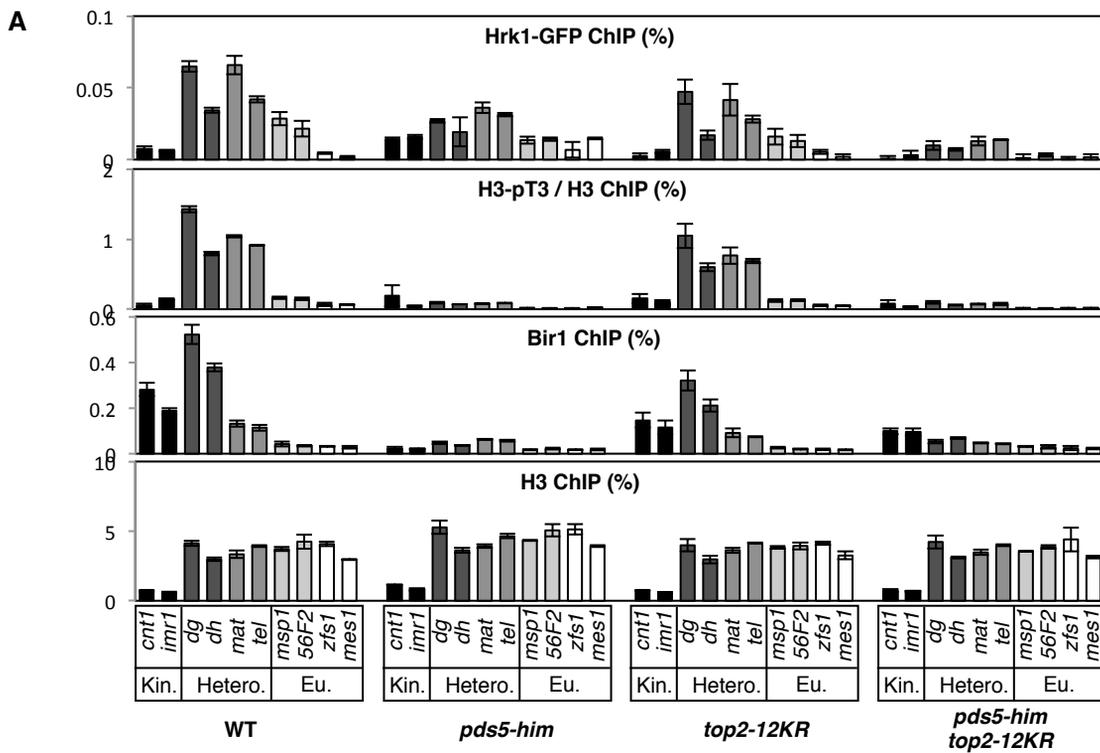


図7 Top2/ Topoisomerase II はPds5を介したHrk1のセントロメア局在を助ける

(A) 野生型、*pds5-him*、*top2-12KR*および二重変異株について、Hrk1-GFP、H3-pT3、Bir1、およびヒストンH3の各染色体上におけるChIP-qPCRの結果を示している。

(B) 野生型、*pds5-him*、*top2-12KR*および二重変異株について、分裂中期のArk1-GFPのシグナル強度を定量した。それぞれの遺伝子型を持つ細胞を20細胞カウントするのを1つの実験とし、3回の独立した実験の平均およびSDを示している。

(C) 野生型における、Hrk1-GFP、およびTop2-13mycの染色体上におけるChIP-qPCRの結果を示している。ヒストンH3は染色体腕部、Cnp1(分裂酵母CENP-Aホモログ)はセントロメア領域のコントロールとして用いている。

(D) 野生型、*pds5-him*、*top2-12KR*および二重変異株について、Hrk1-GFPのコアセントロメア領域におけるChIP-qPCRの結果を示している。3回の独立したChIPおよび、それぞれについて3回のPCR全ての平均値とSDを示している。

(E) SUMO化されたTop2がセントロメアへとHrk1を呼び込み、それを安定的な足場であるPds5へと受け渡すことでHrk1は効率よく染色体上のセントロメア領域へと局在化することができる。

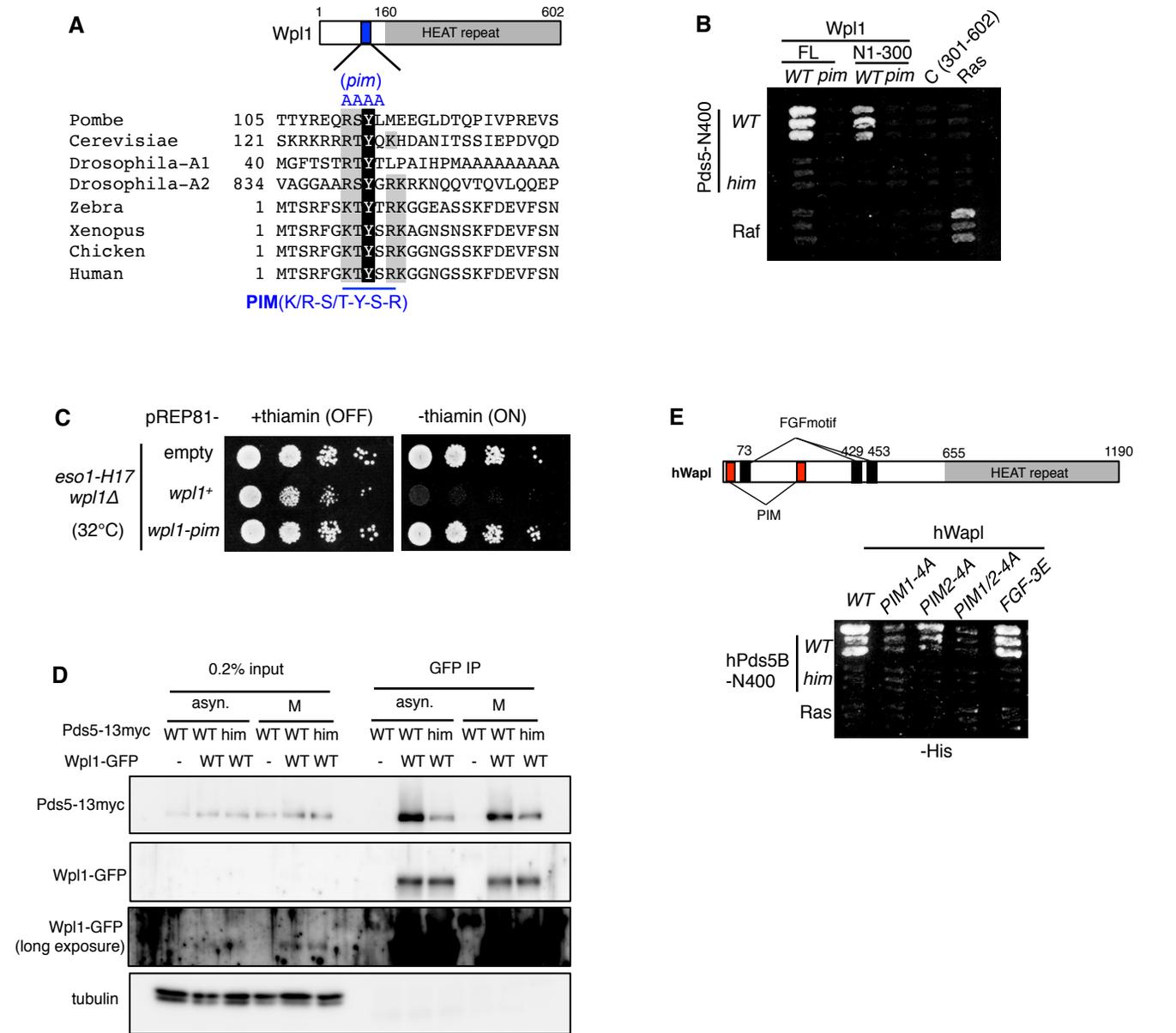


図8 コヒーシン解離因子Wpl1/Waplも保存されたPIMを用いてPds5のHIMと結合する

- (A) 分裂酵母Wpl1の模式図とPIM配列の多重アラインメント。
 (B) 酵母ツーハイブリッド法によってPds5とWpl1の相互作用を検証した。BaitにWpl1の断片および変異体、PreyにPds5の全長を用いた。RasおよびRafはコントロールとして用いている。
 (C) *eso1-H17wpl1Δ* の細胞にpREP81ベクターにより野生型のWpl1(*wpl1+*)および変異型のWpl1 (*wpl1-pim*)を発現させた。左側のプレートでは、培地にチアミンを加えることによりWpl1の発現を抑えている。右側のプレートでは、培地からチアミンを除去することによりWpl1の発現を誘導している。32°Cで静置することで*eso1-H17*の温度感受性を検証している。
 (D) 分裂酵母抽出液を用いて、Wpl1-GFPの免疫沈降を行った。ウエスタンブロッティングによりWpl1-GFPおよび共免疫沈降されてくるPds5-13mycの検出を行った。asynは非同調の細胞(多くはG2期)、MIは*nda3-KM3111*によって分裂期前中期に停止した細胞を示す。チューブリンは共免疫沈降のネガティブコントロールとして検出した。
 (E) ヒトWapl (hWapl)およびヒトPds5Bの相互作用およびPIM-HIM, FGFモチーフ依存性を酵母ツーハイブリッド法を用いて検証した。

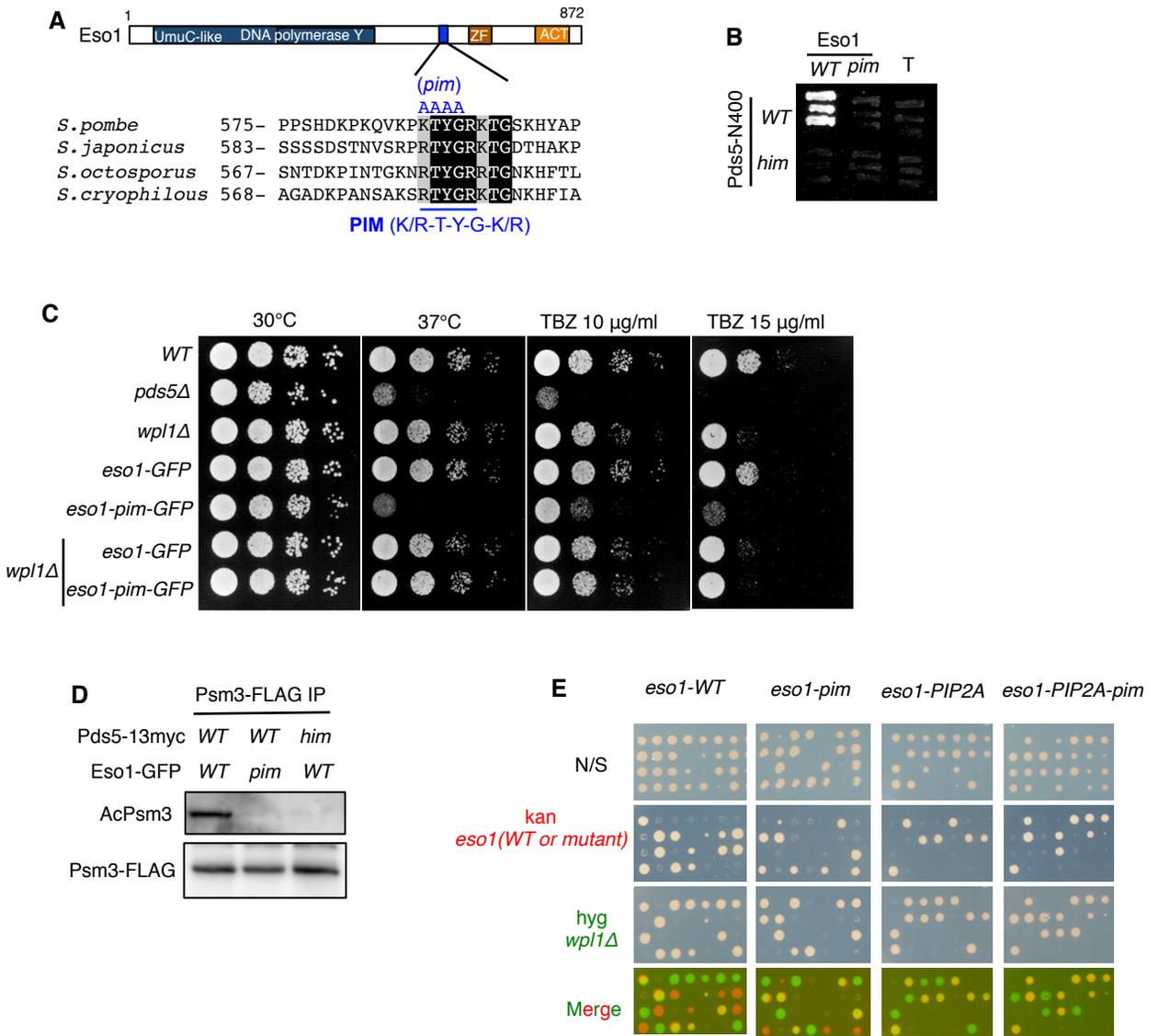


図9 分裂酵母のコヒーシン安定化因子であるEso1もPIMをもちPds5と結合する

- (A) 分裂酵母Eso1の模式図と*Schizosaccharomyces*属Eso1のPIM配列周辺の多重アラインメント。ZFはジンクフィンガー、ACTはアセチル基転移酵素活性化ドメインを示す。
- (B) 酵母ツーハイブリッド法によってPds5とEso1の相互作用を検証した。BaitにEso1の断片および変異体、PreyにPds5の全長を用いた。p53およびT-antigenはコントロールとして用いている。
- (C) 内在性のEso1をeso1-pimの変異体で置換した細胞の温度感受性および、微小管重合阻害剤TBZ感受性をプレート培地上の生育で示している。
- (D) 非同調の分裂酵母抽出液(主にG2期)からコヒーシンサブユニットPsm3をFLAGタグにより免疫沈降してきて、AcPsm3(抗アセチル化K106-Psm3)抗体でウェスタンブロットングによりアセチル化を検出している。
- (E) テトラド解析により、Eso1変異体の致死性を確認した。それぞれの列が減数分裂の結果生じた四孢子由来のコロニーを示す。カナマイシン耐性(kan、赤色)はEso1野生型および各変異体を、ハイグロマイシン耐性(hyg、緑色)がwpl1Δを示す。

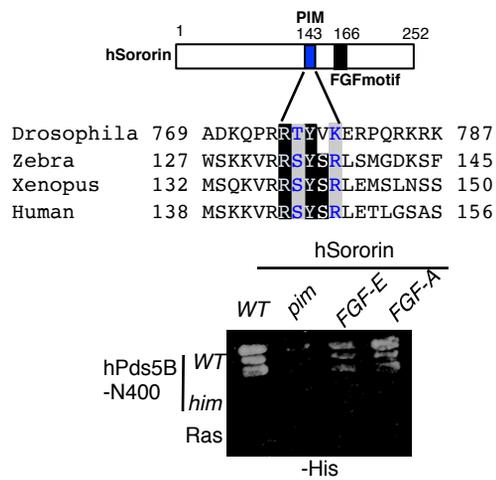


図10 コヒーシン安定化因子であるヒトSororinもPIMをもちPds5と結合する
 ヒトSororinの模式図および、高等動物SororinのPIM周辺多重アラインメント。ヒトSororinおよびヒトPds5Bの相互作用およびPIM-HIM, FGFモチーフ依存性を酵母ツーハイブリッド法を用いて検証した。FGF-EおよびFGF-Aは、ヒトSororin-FGFモチーフ内のG167をそれぞれグルタミン酸(E)またはアラニン(A)に置換した変異体である (Nishiyama et al.,2010)。

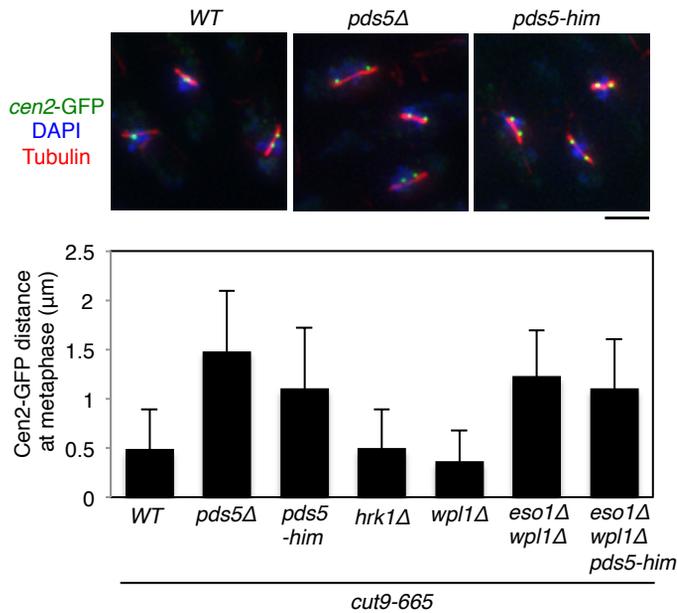


図11 Pds5はHIMを介して姉妹染色分体間接着を制御する

分裂中期に停止した細胞で姉妹染色分体間接着を観察した。APC/Cサブユニットの一つであるCut9の温度感受性変異株 *cut9-665*の制限温度で細胞を分裂中期に停止し、分裂酵母2番染色体のセントロメアをlacO, GFP-lacIIにより可視化(*cen2*-GFP)。姉妹染色分体の*cen2*-GFPドット間距離を測ることにより姉妹染色分体間距離を求めた。各細胞株において、20細胞のセントロメア間距離の平均値とSDを示した。

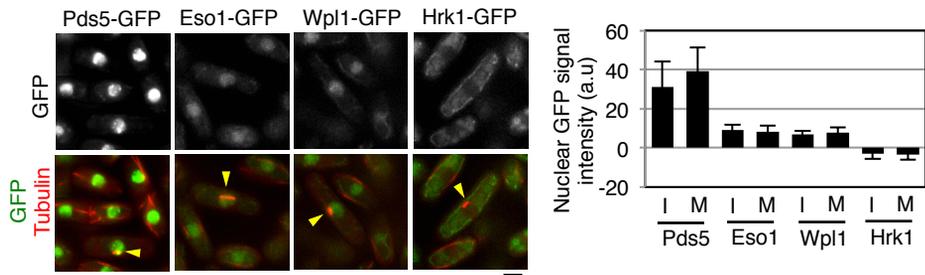


図12 Pds5は染色体上での足場タンパク質として過剰量存在する
Pds5, Eso1, Wpl1およびHrk1のC末端にGFPタグを付加し核内タンパク質量を定量した。mCherry-Atb2(tubulin)の形状により、間期(I, Interphase)および分裂期(M, M phase)を区別した。20細胞の平均値とSDをグラフに示した。

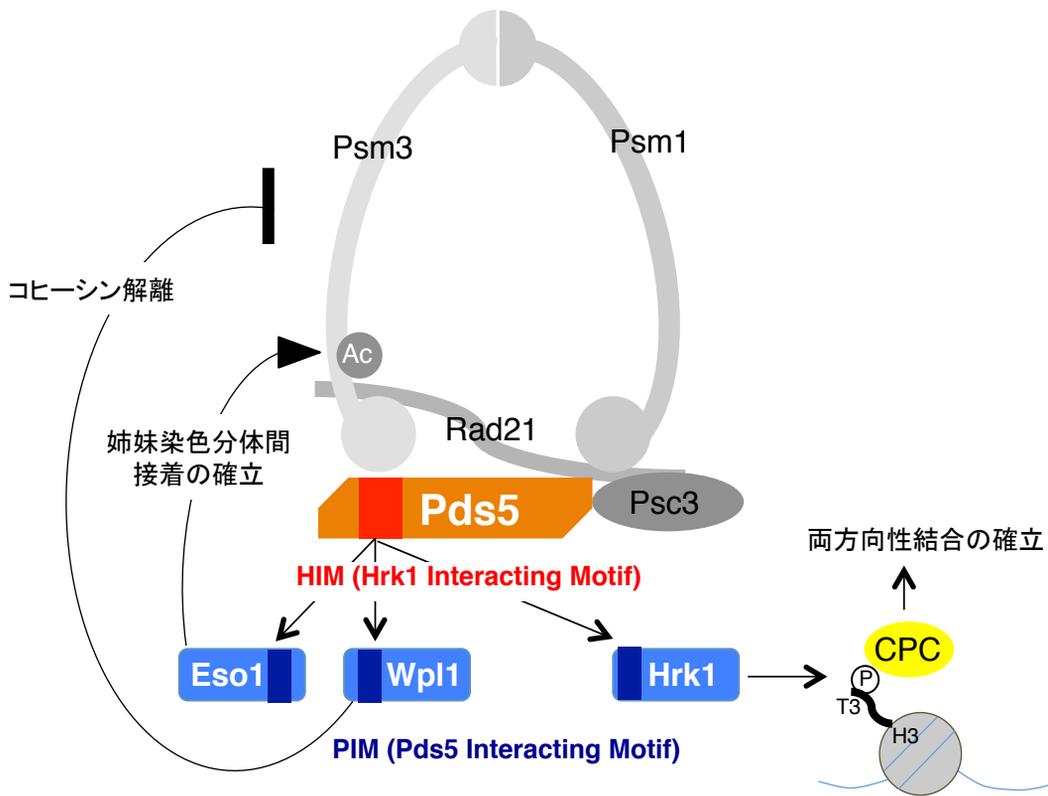


図13 Pds5は保存された相互作用モチーフを介して染色体分配を制御する

Pds5は保存された結合モチーフHIM (Haspin-Interacting-Motif、赤色)を用いて、PIM(Pds5-Interacting-Motif)をもつ因子が染色体上で働くための足場となっている。Hrk1は、Pds5との相互作用により、セントロメア領域でヒストンH3-T3をリン酸化しCPCの局在化を制御する。また、コヒーシン解離因子であるWpl1が働くためにもPIM-HIMを介してWpl1とPds5が相互作用する必要がある。逆に、コヒーシン安定化因子であるEso1アセチルトランスフェラーゼが、コヒーシンサブユニットPsm3をアセチル化してWpl1に拮抗するのにEso1とPds5との相互作用が必要である。