

保存されたタンパク質シュゴシンは

姉妹セントロメア間の接着を保護する

The conserved protein shugoshin protects centromeric cohesion of sister chromatids

北島 智也

目次

要旨		1
第一章	序	3
第二章	材料と方法	10
第三章	減数第一分裂における相同染色体の分離には セパレーズによる Rec8 の切断が必要である	35
第四章	シュゴシンは減数第一分裂において セントロメア Rec8 をセパレーズによる切断から保護する	48
第五章	ヒトシュゴシンは体細胞分裂における 姉妹セントロメア間の接着の保護に必要である	63
第六章	ヒトシュゴシンは PP2A と協同して 姉妹セントロメア間の接着を保護する	79
第七章	まとめと展望	88
参考文献		93
本研究の内容に関わる論文		103
謝辞		104

要旨

減数分裂は、生殖細胞が一回の染色体複製の後に二回の連続した染色体分配を行うことにより、半数体の配偶子を形成するための過程である。DNA 合成期において複製された姉妹染色分体の間には、コヒーシン複合体によって直ちに接着が確立される。さらに、相同染色体の間にも組み換えにより形成されたキアズマによってつながりが生まれ、これらが減数第一分裂中期まで維持される。第一分裂後期になると、コヒーシン複合体が染色体の腕部から解離し、キアズマを支えていた腕部の接着が失われることによって相同染色体が分離し、反対方向に分配されるが、一方で、セントロメアにおいてはコヒーシン複合体が残存し、姉妹セントロメア間の接着が維持されるため姉妹染色分体は分離せず、これらは第二分裂で初めて分離して分配される。私は分裂酵母を用いて、減数第一分裂における相同染色体の分離には、セパレーズと呼ばれるプロテアーゼがコヒーシン複合体の減数分裂特異的サブユニット Rec8 を染色体腕部で切断することが必要であることを示した。さらに、遺伝学的スクリーニングから新規タンパク質シュゴシン Sgo1 を同定し、これが減数第一分裂においてセントロメアで Rec8 をセパレーズから保護し、姉妹セントロメア間の接着を維持するのに必要な因子であることを明らかにした。シュゴシンはあらゆる真核生物に保存されたタンパク質であり、ヒトホモログである hSgo1、hSgo2 はいずれも体細胞分裂において姉妹セントロメア間の接着の保護に必要であった。これらのことから、シュゴシンは機能的にも高度に保存された姉妹セントロメア間の保護因子であると考えられる。さらに、ヒトシュゴシンは II 型プロテインフォスファターゼ(PP2A)と複合体を形成して機能することから、シュゴシンがフォスファターゼ活性を利用して姉妹セントロメア間を保護することが示唆された。

Abstract

Meiosis consists of two rounds of chromosome segregation following a single replication of the DNA to produce haploid gametes. Cohesion between sister chromatids is established by cohesin complex during S phase, and homologous chromosomes are also physically linked by chiasmata, which are formed by recombination. At the anaphase onset of meiosis I, cohesin is released from chromosome arms to destroy cohesion along the chromosome arms, leading to resolving chiasmata, and thereby homologous chromosomes segregate to the opposite sides. However, at centromeres cohesin complex is retained to maintain centromeric cohesion of sister chromatids until meiosis II, when sister chromatids are segregated. I show that cleavage of a meiosis-specific cohesin subunit Rec8 by a protease separase is required for the separation of homologous chromosomes during meiosis I in fission yeast. Furthermore, I identified a novel protein Sgo1 (shugoshin), which is required for retention of centromeric cohesion of sister chromatids by protecting Rec8 from separase at centromeres during meiosis I. Shugoshin is widely conserved among various eukaryotes, and I found that each of two human shugoshins hSgo1 and hSgo2 is required for protection of centromeric cohesion during mitosis in human cells. From these results, shugoshin is defined as a functionally conserved protector of the centromeric cohesion of sister chromatids. Since shugoshin functions as a complex with type II protein phosphatase 2A (PP2A), shugoshin may utilize its phosphatase activity to protect centromeric cohesion.

第一章 序

真核生物はその目的に応じて二つの異なる細胞分裂様式を使い分けている。一つは増殖するときに用いられる体細胞分裂であり、もう一つは生殖細胞が半数体の配偶子を形成するときに用いられる減数分裂である。体細胞分裂のときに染色体分配に失敗して娘細胞に染色体の過不足が起こると、細胞は遺伝子発現のバランスを失ってほとんどの場合死に至るか、そうでなければ癌細胞となる可能性が高い。また、生殖細胞における染色体の過不足は、ダウン症やターナー症、クラインフェルター症といった先天性の疾患の原因になりうる。このため、いずれの場合においても、染色体分配はきわめて正確に行われる必要がある。染色体分配の制御機構を理解することは、細胞がいかに遺伝情報を受け継ぐかという生物学的に基本的な問題を明らかにするのみならず、医学的にも大きな意義があると考えられる。

体細胞分裂の過程においては、DNA 合成期に複製されてできた姉妹染色分体の間には直ちにコヒーシンと呼ばれるタンパク質複合体によって接着が確立される。体細胞分裂におけるコヒーシン複合体は主に 2 つの SMC (structural maintenance of chromosome)タンパク質 Psm1/Smc1、Psm3/Smc3 と、クライシンファミリータンパク質 Rad21/Sccl/Mcd1、および Psc3/Sccl/SA の合計 4 つのサブユニットから構成され、これらはあらゆる真核生物の間で高度に保存されている。Smc1 および Smc3 はそれぞれ分子内 coiled-coil を形成して棒状の構造をとり、二つが末端で会合する。さらに、もう一方の末端には Rad21 がそれぞれを橋渡しするように結合することにより、コヒーシン複合体は環状の構造をとることが分かっている。これらのことから、環状のコヒーシン複合体が姉妹染色分体ペアを囲い込むようにして接着させるというモデルが提唱されている(図 1a)(Nasmyth and Haering, 2005)。分裂期に入ると、スピンドルの両極から伸びた

微小管が姉妹染色分体間の接着を感知することで姉妹染色分体のペアを認識し、姉妹動原体を正しく反対方向から捕らえ、分裂中期までに染色体を細胞の赤道面に整列させようとする。このとき、染色体が正常に整列するまでの間、細胞はその過程に異常がないかをスピンドルチェックポイントと呼ばれる機構により監視している。もし例えば、姉妹染色分体間の接着に欠損があると、スピンドル微小管は正しい姉妹染色分体ペアを認識できず、その結果、姉妹動原体をランダムな方向から捕らえてしまう。このような異常が起こると、細胞は Mad2 などのスピンドルチェックポイントタンパク質を活性化し、Mad2 は分裂後期への進行に必要な APC (anaphase-promoting complex、分裂後期促進複合体) に結合して阻害する(Peters, 2002)。すべての染色体がスピンドル微小管により正しく捕らえられ、染色体が赤道面に整列すると、スピンドルチェックポイントはオフになり、これにより APC が活性化する。APC はセパレーズのシャペロンであるセキュリンを分解することで、セパレーズを自由にして活性化する(Yanagida, 2000)。セパレーズはプロテアーゼの一種であり、特異的にコヒーシンサブユニット Rad21 を認識して切断する。その結果、コヒーシン複合体による姉妹染色分体間の接着が解除され、これが引き金となって姉妹染色分体が分離する(図 1b)(Hauf et al., 2001; Tomonaga et al., 2000; Uhlmann et al., 2000)。そして、これらが二つの娘細胞に均等に分配され、さらに生まれた娘細胞がまた染色体の複製と分配を繰り返すことによって、細胞が増殖していく。

以上のように、体細胞分裂は一回の複製の後に一回の染色体分配を行い、同数の染色体を持つ娘細胞を生み出して増殖する過程であるが、これに対し減数分裂は、一回の複製の後に二回の染色体分配を行うことにより半数体の配偶子を形成する過程である。DNA 合成期において複製された姉妹染色分体の間にはやはりコヒーシン複合体によって接着が確立するが、このとき、減数分裂特異的な Rad21 相同因子である Rec8 が、Rad21 に置き換わってコヒーシン複合体

(Rec8 コヒーシン)を構成する(Klein et al., 1999; Watanabe and Nurse, 1999)。さらに、相同染色体の間で組み替えを起こることによりキアズマと呼ばれる構造体が形成され、相同染色体間にも物理的なつながりが生じる。減数第一分裂の中期にかけて、体細胞分裂時とは異なり、スピンドル微小管は姉妹動原体を一方向から捕らえ、さらにキアズマを介した相同染色体間の連結力を利用して相同染色体ペアを反対方向に引っ張り、染色体を赤道面に整列させる。後期になると、Rec8 コヒーシンは染色体腕部から解離し、キアズマを支えていた腕部における姉妹染色分体間の接着が失われ、相同染色体が反対方向に分離する。ところが一方で、セントロメアにおける Rec8 コヒーシンは残存し、姉妹セントロメア間の接着は維持される。そして、続いて起こる減数第二分裂の後期において初めて、セントロメアの Rec8 コヒーシンが解離し、姉妹染色分体間の接着が完全に消失してこれらが反対方向に分離する。このように減数分裂においては、複製の間に確立された染色体間の接着を、第一分裂時に腕部で、第二分裂時にセントロメアで段階的に解除することにより、第一分裂で相同染色体を、第二分裂で姉妹染色分体をそれぞれ分配させることを可能にしている(図 1c)。

分裂酵母においては、減数第一分裂後期に Rec8 コヒーシンが染色体腕部から解離することが分かっていたが、どのようなメカニズムで起こるのかは知られていなかった。しかし、体細胞分裂時には Rad21 がセパレーズによって切断されることから、減数分裂時にも Rec8 がセパレーズによって切断されることでコヒーシン複合体が解離するのではないかと考えられた。実際に、Rad21 のセパレーズに認識される部位によく似た配列が Rec8 にも見出されていた(Uhlmann et al., 1999)。

また、減数第一分裂において、染色体腕部では Rec8 コヒーシンは解離するのに対し、セントロメアでは残存して姉妹セントロメア間の接着を維持する。このことは、減数分裂における段階的な染色体分離を考える上でもっとも重要な

問題点であるが、その分子メカニズムはほとんど分かっていなかった。

分裂酵母のセントロメアは、哺乳動物などと同じようにリピート配列で構成され、中央領域と周縁ヘテロクロマチン領域に分けられるが、特に周縁ヘテロクロマチン領域が姉妹セントロメア接着に重要である(Nonaka et al., 2002) (Bernard et al., 2001)。減数第一分裂前に Rec8 コヒーシンの染色体上の局在量を調べると、Rec8 は染色体腕部に比べてセントロメアの中央領域と周縁ヘテロクロマチン領域の両方に濃縮されており(Watanabe et al., 2001)、周縁ヘテロクロマチン領域への局在は HP1 (heterochromatin protein 1)の分裂酵母ホモログである Swi6 に依存している。周縁ヘテロクロマチンへの Rec8 コヒーシンの濃縮が失われた *swi6* 遺伝子破壊株における減数分裂では、減数第一分裂後に維持されるべき姉妹セントロメア間の接着が失われてしまう(Kitajima et al., 2003)。このことは、減数第一分裂前に周縁ヘテロクロマチンへ Rec8 コヒーシンが濃縮されることが、第一分裂において姉妹セントロメア間の接着の維持する上で必要であることを示している。

しかしながら、Rec8 コヒーシンの濃縮だけでは姉妹セントロメア間の接着の維持を達成するのには十分ではない。なぜなら、体細胞分裂において Rec8 を強制的に発現させることにより Rec8 コヒーシンを機能させると、やはり Rec8 コヒーシンは分裂前に Swi6 依存的に周縁ヘテロクロマチン領域に濃縮されるにもかかわらず、分裂後期に Rec8 がセントロメアで残存することは見られないためである。このことは、減数第一分裂時に Rec8 コヒーシンがセントロメアで維持されるためには、体細胞分裂では発現していない、Rec8 を解離から保護する減数分裂特異的な因子が存在することを示唆している。

そのような因子の候補として、出芽酵母 Spo13 とショウジョウバエ Mei-S332 が挙げられる。Spo13 は減数分裂特異的に発現するタンパク質であり、*SPO13* 遺伝子破壊株においては、減数第一分裂後に接着が維持されるべき姉妹染色分

体が分離してしまう。また、Spo13 と Rec8 を体細胞分裂時に強制発現させると分裂後期における Rec8 の分解が阻害されることから、Spo13 は Rec8 の保護因子である可能性が示唆された(Shonn et al., 2002)。しかし、Spo13 は Rec8 のみならず Rad21 の分解をも阻害する(Lee et al., 2002)ことや、Spo13 の局在がセントロメア特異的ではないこと、Spo13 は動原体の方向性の制御にも深く関わっている(Katis et al., 2004; Lee et al., 2004)ことなどから、セントロメアの Rec8 を特異的に保護する因子とは考えにくい。また、他の真核生物において Spo13 のホモログは見出せない。ショウジョウバエ Mei-S332 は減数分裂における姉妹セントロメア間の接着の維持に必要であり、減数第一分裂前期から第二分裂中期までセントロメアに局在し、姉妹セントロメアが分離する第二分裂後期になると消失するタンパク質であることから、セントロメア Rec8 の保護因子として魅力的な候補である(Kerrebrock et al., 1995)。しかしながら、Mei-S332 は他の真核生物にホモログが見出せず、また、ショウジョウバエにおいては Rec8 ホモログの存在がはっきりと分からない(Heidmann et al., 2004)ことから、真核生物に共通した現象である姉妹セントロメア間の接着の保護の分子機構を理解する段階には至っていなかった。分裂酵母における研究からは、保存された動原体タンパク質である Bub1 キナーゼが減数第一分裂におけるセントロメア Rec8 の維持に必要であるという報告がなされた(Bernard et al., 2001)。しかしながら、Bub1 は減数分裂特異的なタンパク質ではなく、体細胞分裂時にも発現し、分裂期においてスピンドルチェックポイントに必須であり、動原体が微小管を捕らえる機能にも寄与していることが分かっている(Bernard et al., 1998; Bernard et al., 2001)。これらのことから、Bub1 キナーゼは分裂期のセントロメアにおいて複数のターゲットを有するタンパク質であることが示唆され、Rec8 の特異的な保護因子とは考えにくい。

哺乳動物における体細胞分裂では、減数分裂に似た姉妹セントロメア間の接

着の維持が見られる。すなわち、DNA 複製の後の間期には染色体全長にわたってコヒーシン複合体が局在し接着を確立しているが、分裂期の前期から前中期にかけて、大部分のコヒーシン複合体は染色体腕部から解離し、セントロメアでは残存する。これにより、中期までに姉妹染色分体の腕部での接着は緩むが、姉妹セントロメア間の接着は強固に維持される(Waizenegger et al., 2000)(図 20a)。続いて起こる後期には、セントロメアで残存したコヒーシン複合体の Rad21 サブユニットをセパレーズが切断して姉妹染色分体を分離させる。このような哺乳動物における分裂前期から前中期にかけての染色体腕部のコヒーシン複合体の解離は、酵母における体細胞分裂ではほとんど起きないと考えられている。

哺乳動物の分裂前期から前中期におけるコヒーシン複合体の染色体腕部からの解離は、Polo キナーゼと Aurora B キナーゼに依存しており(Losada et al., 2002; Sumara et al., 2002)、特に最近では Polo キナーゼがコヒーシンサブユニットの一つ SA をリン酸化することが重要であるという報告がなされた(Hauf et al., 2005; Sumara et al., 2004)。Polo キナーゼは *in vitro* で SA サブユニットをリン酸化し、また、リン酸化部位に変異を導入した SA サブユニットを発現させると、分裂前期および前中期においてコヒーシン複合体が染色体腕部から解離できなくなる。これらのことは、分裂前期および前中期にはセントロメアでコヒーシン複合体を Polo キナーゼによる解離から保護する因子が存在することを示唆している。

私は、まず分裂酵母における Rec8 コヒーシンの解離のメカニズムについて解析した。減数第一分裂時に Rec8 がセパレーズに依存して切断を受けていることを示し、また、Rec8 の中にセパレーズに認識される配列を二ヶ所(うち一ヶ所が予測されたもので、一ヶ所は未知のもの)見出し、これらに変異を導入した非切断型の Rec8 を発現させた減数分裂では、第一分裂で相同染色体の分離が起こらないことを示した(第三章)。

さらに、減数第一分裂において腕部の Rec8 がセパレーズによって分解される一方でセントロメアの Rec8 が分解されないことに着目し、いまだ同定されていない、真核生物に保存された姉妹セントロメア接着の保護因子を同定することを試みた。分裂酵母において遺伝学的スクリーニングを行い、新規遺伝子を同定してこれを *sgo1*⁺(シュゴシン)と命名した。Sgo1 は減数分裂特異的なタンパク質であり、減数第一分裂のセントロメアにおいて Rec8 コヒーシンをセパレーズから保護する因子であることを明らかにした(第四章)。

また、ホモロジー解析から、シュゴシン様の配列を持つタンパク質があらゆる真核生物に存在することを見出した。さらに、哺乳動物までその機能が保存されていることを示すため、ヒトシュゴシンの解析を行った。ヒトシュゴシンは、分裂酵母 Sgo1 とは異なり体細胞分裂時にも発現しており、体細胞分裂における分裂前期から前中期にかけて姉妹セントロメアの接着を保護していることを明らかにした(第五章)。

最後に、シュゴシンが姉妹セントロメア接着を保護する分子メカニズムについて理解するため、共同研究によりシュゴシンと物理的相互作用をするタンパク質を探索し、シュゴシンは PP2A と複合体を形成することを見出した。PP2A は分裂期においてシュゴシンとともにセントロメアに局在し、姉妹セントロメア間の接着に必要なことを示した(第六章)。

第二章 材料と方法

1. 大腸菌株

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 XL1-Blue を用いた。部位特異的突然変異導入の際には RZ1032 を用いた。大腸菌に組換えタンパク質を発現させる際には BL21(DE3)を用いた。大腸菌は LB 培地(1 % Bacto TRYPTONE, 0.5% 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 µg/ml ampicilin、35 µg/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 15 g 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

菌株	遺伝子型
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi-1 relA1 lac/F'</i> [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI^f lacZΔ M15::Tn10(tec')</i>]
RZ1032	Hfr <i>thi-1 relA1 spoT1 dut-1 ung-1 zbd-279::Tn10 supE44</i>
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSb (rB-mB-) gal (λcI857 ind1 Sam7 nin5</i> <i>lacUV5-T7gene1) dcm(DE3)</i>

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、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

本研究で用いた分裂酵母の菌株とその遺伝子型を表 2 に示す。

表 2. 本研究で用いた分裂酵母の菌株とその遺伝子型

strain	genotype
JY334	<i>h⁺ leu1 ade6-M216</i>
JY362	<i>h⁺/h⁻ leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216</i>
PY344	<i>h⁹⁰ rec8::kan^r ura4-D18</i>
PY452	<i>h⁹⁰ mei4::ura4⁺ cut3⁺ <<lacO his7⁺ <<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS leu1</i>
PY577	<i>h⁺/h⁻ rec8⁺-GFP<<kan^r/rec8⁺-GFP<<kan^r mei4::ura4⁺/mei4::ura4⁺ ade6-M210/ade6-M216</i>
PY929	<i>h⁹⁰ rec8::kan^r <<ura4⁺ <<P_{rec8-rec8⁺}-GFP<<kan^r ura4-D18</i>
PY964	<i>h⁹⁰ rec8::kan^r <<ura4⁺ <<P_{rec8-rec8-RD1}-GFP<<kan^r ura4-D18</i>
PY990	<i>h⁹⁰ rec8::kan^r <<ura4⁺ <<P_{rec8-rec8-RDRD}-GFP<<kan^r ura4-D18</i>
PZ44	<i>h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 rec8::kan^r <<ura4⁺ <<P_{rec8-rec8⁺}-GFP<<kan^r/rec8::kan^r <<ura4⁺ <<P_{rec8-rec8⁺}-GF P<<kan^r ade6-M210/ade6-M216 ura4-D18/ura4-D18</i>
PZ45	<i>h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 rec8::kan^r <<ura4⁺ <<P_{rec8-rec8-RD1}-GFP<<kan^r/rec8::kan^r <<ura4⁺ <<P_{rec8-rec8- RD1}-GFP<<kan^r ade6-M210/ade6-M216 ura4-D18/ura4-D18</i>
PZ47	<i>h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 rec8::kan^r <<ura4⁺ <<P_{rec8-rec8-RDRD}-GFP<<kan^r/rec8::kan^r <<ura4⁺ <<P_{rec8-rec8-}</i>

- 8-RDRD-GFP<<kan^r ade6-M210/ade6-M216 ura4-D18/ura4-D18
- PZ50** *h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114*
rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RD2-GFP<<kan^r/rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RD2-GFP<<kan^r ade6-M210/ade6-M216 ura4-D18/ura4-D18
- PZ52** *h⁹⁰ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RD2-GFP<<kan^r ura4-D18*
- PZ90** *h⁺/h⁺ cut1-206/cut1⁺ pat1-114/pat1-114 lys1⁺<<lacO/lys1⁺<<lacO*
his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS/his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS ade6-M210/ade6-M216 leu1/leu1⁺ ura4-D18/ura4⁺
- PZ91** *h⁺/h⁺ cut1-206/cut1-206 pat1-114/pat1-114 lys1⁺<<lacO/lys1⁺<<lacO*
his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS/his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS ade6-M210/ade6-M216 leu1/leu1⁺ ura4-D18/ura4⁺
- PZ94** *h⁹⁰ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8⁺-FLAG<<kan^r lys1⁺<<lacO*
his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS ade6-M216 leu1 ura4-D18
- PZ97** *h⁹⁰ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RDRD-FLAG<<kan^r lys1⁺<<lacO*
his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS ade6-M216 leu1 ura4-D18
- PZ110** *h⁹⁰ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RDRD-FLAG<<kan^r lys1⁺<<lacO*
his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS mes1-B44 ade6-M216 leu1 ura4-D18
- PZ134** *h⁹⁰ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RDRD-FLAG<<kan^r cut3⁺<<lacO*
his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS ade6 leu1 ura4-D18
- PZ140** *h⁹⁰ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RDRD-FLAG<<kan^r cut3⁺<<lacO*
his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS rec11-156::LEU2 ade6 leu1 ura4-D18⁺
- PZ146** *h⁹⁰ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RDRD-FLAG<<kan^r cut3⁺<<lacO*
his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS rec12-152::LEU2⁺ ade6 leu1 ura4-D18
- PZ166** *h⁻ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8⁺-FLAG<<kan^r leu1 ura4-D18*
- PZ167** *h⁻ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RDRD-FLAG<<kan^r leu1 ura4-D18*

- PZ168** *h⁻ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RDRD-FLAG<<kan^r rec12-152::LEU2⁺ leu1
ura4-D18*
- PZ169** *h⁻ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RDRD-FLAG<<kan^r rec11-156::LEU2⁺ leu1
ura4-D18*
- PZ170** *h⁺ rec8::kan^r cen2<<lacO<<ura4⁺<<kan^r his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS leu1*
- PZ171** *h⁺ rec8::kan^r rec12-152::LEU2⁺ cen2<<lacO<<ura4⁺<<kan^r
his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS leu1*
- PZ172** *h⁺ rec8::kan^r rec11-156::LEU2⁺ cen2<<lacO<<ura4⁺<<kan^r
his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS leu1*
- PZ687** *h⁻ cen2-GFP leu1 rec8::P_{adh1}-rad21⁺-FLAG<<kan^r P_{nmt1}-sgo1⁺<<kan^r*
- PZ688** *h⁻ cen2-GFP leu1 rec8::P_{adh1}-rad21⁺-FLAG<<kan^r*
- PZ689** *h⁺ cen2-GFP leu1 P_{adh1}-rec8⁺-HA<<ura4⁺ P_{nmt1}-sgo1⁺<<kan^r*
- PZ690** *h⁺ cen2-GFP leu1 P_{adh1}-rec8⁺-HA<<ura4⁺*
- PZ694** *h⁻ P_{adh1}-rec8⁺-GFP<<kan^r rad21::ura4⁺ leu1 ade6-M216*
- PZ695** *h⁻ P_{adh1}-rec8⁺-GFP<<kan^r rad21::ura4⁺ P_{nmt1}-sgo1⁺<<kan^r leu1 ade6-M216*
- PZ809** *h⁻ cen2<<lacO<<kan^r<<ura4⁺ his7⁺<<P_{dis1}-GFP-LacI-NLS leu1 ade6*
- PZ855** *h⁻ sgo1::kan^r cen2<<lacO<<kan^r<<ura4⁺ his7⁺<<P_{dis1}-GFP-LacI-NLS leu1 ade6*
- PZ856** *h⁺ sgo1::kan^r leu1 ade6-M216*
- PZ858** *h⁹⁰ sgo1::kan^r cen2<<lacO<<kan^r<<ura4⁺ his7⁺<<P_{dis1}-GFP-LacI-NLS
mes1-B44 leu1 ade6*
- PZ887** *h⁺/h⁻ sgo1::kan^r/sgo1::kan^r rec8⁺-GFP<<kan^r/rec8⁺-GFP<<kan^r
mei4::ura4⁺/mei4::ura4⁺ ade6-M210/ade6-M216*
- PZ924** *h⁹⁰ sgo1⁺-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 ura4-D18 pREP81(CFP-mis6⁺)*
- PZ955** *h⁺/h⁻ sgo1⁺-FLAG-GFP/sgo1⁺-FLAG-GFP kan^r<<P_{rad21}-slp1⁺/kan^r<<P_{rad21}-slp1⁺
ade6-M210/ade6-M216*

PZ962	<i>h⁺ rec8::kan^r rec11-156::LEU2⁺ psc3-2T-HA<<kan^r cen2<<lacO<<ura4⁺<<kan^r his7⁺<<P_{dis1}-GFP-lacI-NLS leu1</i>
PZ985	<i>h⁹⁰ rec8⁺-GFP<<kan^r leu1 ade6-M216 pREP81(CFP-atb2⁺)</i>
PZ986	<i>h⁹⁰ sgo1::ura4⁺ rec8⁺-GFP<<kan^r leu1 ade6-M216 pREP81(CFP-atb2⁺) ura4-D18</i>
PZ987	<i>h⁹⁰ bub1::ura4⁺ rec8⁺-GFP<<kan^r leu1 ade6-M216 pREP81(CFP-atb2⁺) ura4-D18</i>
PZ988	<i>h⁹⁰ sgo1⁺-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 pREP81(CFP-atb2⁺)</i>
PZ990	<i>h⁹⁰ bub1::ura4⁺ sgo1⁺-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 pREP81(CFP-atb2⁺)</i>
PZ992	<i>h⁻ rec8::kan^r<<ura4⁺<<P_{rec8}-rec8-RDRD-FLAG<<kan^r rec11-156::LEU2⁺ psc3-2T-HA<<kan^r leu1 ura4-D18</i>

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 を、最少合成培地として SD または MM を用いた。窒素源飢餓を行わせる際には、SD 培地で前培養し、MM-N 培地へ移した。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。ウラシル要求性株を選択する際には、5-FOA を終濃度 1 mg/ml 加えた。

Yeast extract*	5 g	0.5 % (w/v)
グルコース	20 g	3 % (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 *nmf* 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、*nmf* 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。

フタル酸水素カリウム 3 g 14.7 mM

Na₂HPO₄ 2.2 g 15.5 mM

NH₄Cl 5 g 93.5 mM

グルコース 10 g 1 % (w/v)

50×Salt stock(*2) 20 ml

10,000×Mineral stock(*3) 0.1 ml

1,000×Vitamin stock(*4) 1 ml

・MM-N：窒素源飢餓培地。接合、胞子形成を誘導するときや、増殖を G1 期停

止させるときなどに使用した。MM 培地から NH_4Cl のみを取り除いた培地である。

・ 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_2PO_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 $\mu\text{g/ml}$
ウラシル	50 $\mu\text{g/ml}$
L-ロイシン	200 $\mu\text{g/ml}$

*2 50× Salt stock :

	(11 当たり)	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	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×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_2PO_4	40 g	294 mM
Na_2HPO_4	4 g	28.2 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g	40.6 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40 g	303 mM
trace elements(*6)	2 ml	

*6 trace elements :

(100 ml 当たり)

H_3BO_3	500 mg	80.9 mM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	40 mg	1.60 mM
KI	100 mg	6.02 mM
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200 mg	7.40 mM
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	530 mg	23.7 mM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	1000 mg	2.47 mM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400 mg	13.9 mM

5. 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)。

分裂酵母の胞子はアミロース様の多糖類を蓄積するので、ヨウ素蒸気処理により胞子を含むコロニーは茶褐色に染色される。この性質を利用して胞子形成能を検定した。

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 または SD の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 300 μl 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、40 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 SD に懸濁して選択培地に広げた。

h^+/h の二倍体細胞を作成する際には *ade6* 変異をマーカーとして利用した。アデニン要求性変異である *ade6-M210* 変異と *ade6-M216* 変異は同一遺伝子座の変異であるが、相互に相補し合い、この二つのアリルを同時に細胞内に有する株はアデニン非要求性となる(遺伝子内相補)。*ade6-M210* 変異を持つ株と *ade6-M216* 変異を持つ株とを交配し、アデニン非要求性の細胞を選択することで二倍体を得た。

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、孢子を遊離させた。孢子を適当量の SD に懸濁し、適当な培地に孢子をまいた。生存率を測定する場合は、YEA に孢子をまいた。

6. 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, 41, 81, 3 (Maundrell, 1990)

pGFT81, pGFT82

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(pREP1, 41, 81)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。pREP3 は *nmt1x* プロモーターが使われており、pREP81 程度の発現量を誘導できる。pGFT81 は *nmt81* プロモーター下に GFP が挿入されたプラスミドであり、pGFT82 は pGFT81 の *LEU2* マーカーが *ura4⁺* マーカーに置き換わったものである。*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 度で培養すれば 15 時間)行ったところに最大となる。

7. 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、5 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、滅菌水に溶解して DNA 溶液とした。

8. 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)に懸濁し、SPA プレート上で 26.5 度で培養した。*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。減数第一分裂後に停止させる場合は *mes1* 変異を導入した細胞を用いた。

二倍体 h^+/h^- 細胞を減数分裂へ誘導する場合は、MM-N 液体培地を用いた。MM(NH₄Cl 5g/l)培地で $\sim 5 \times 10^6$ cells/ml になるまで培養し、遠心回収した。細胞を MM-N で 2 度洗浄した後、 $\sim 1 \times 10^7$ cells/ml になるように MM-N 培地に懸濁して培養した。減数第一分裂前期で停止させる場合は *mei4* 変異を導入した細胞を用いた。また、減数第一分裂中期に細胞を停止させる場合は、減数第一分裂の中期から後期への移行に必要な遺伝子である *slp1*⁺(*CDC20* の分裂酵母ホモログ)のプロモーターを、減数分裂において発現が抑制される *rad21*⁺プロモーター(*P_{rad21}*)に置換した株を用いた。

細胞を同調的に減数分裂へ誘導させるためには、二倍体の *pat1-114* 高温感受性変異株(Iino and Yamamoto, 1985)を用いた。二倍体 h^-/h^- もしくは h^+/h^+ の *pat1-114* 株を MM(NH₄Cl 5g/l, 1%YE を含む)培地で 25°C で $\sim 2 \times 10^6$ cells/ml になるまで培養し、遠心回収した。細胞を MM-N で 2 度洗浄した後、前培養と等量の MM-N 培地に懸濁し 25°C で 16 時間培養することで細胞を G1 期に同調した。その後、NH₄Cl (終濃度 0.1g/l)を添加して制限温度である 34°C で培養し、Pat1 を不活化することで減数分裂に誘導した。減数分裂の進行をモニターするため、細胞に-20°C に冷えたメタノールを加えることにより固定し、DAPI で染色することで細胞内の核数を数えた。

9. 一本鎖 DNA の調製および部位特異的突然変異導入(Kunkel, 1985)

DNA 配列に変異を導入する目的で用いた。大腸菌ベクター pUC119, pBluescript、にクローニングした遺伝子に対しておこなった。これらのプラスミドで大腸菌株 RZ1032 を形質転換し、形質転換体をウリジン(2 μg/ml)、およびヘルパーファージ M13KO7 を含む 1.5ml の LB 培地で 1 時間培養した後、カナマイシンを添加してファージの感染した菌を選択し、37 度で 2 日間培養した。遠心分離により沈殿した大腸菌を捨て、上清に PEG-NaCl (20 % PEG (#6,000), 2.5 M NaCl) を 300

μl 添加し、4°C に 30 分間静置することでファージを沈殿させた。遠心により上清を除いた後、TE に懸濁し、フェノール抽出および行ってタンパク質を除去した。最後にエタノール沈殿により DNA を回収し、50μl の滅菌水に溶解させた。これにより、ウリジンを含有した ssDNA を得た。

次に、ssDNA に T4 polynucleotide kinase (Takara) を用いて末端をリン酸化した変異オリゴ DNA をアニールさせ、残りの一本鎖部分を T4 DNA polymerase (Takara) を用いて二本鎖とした後、最後に T4 DNA ligase (Takara) によりニックのない二本鎖 DNA プラスミドとして大腸菌株 XL1-Blue に形質転換した。正しく変異が入っていることは、XL1-Blue 株より回収したプラスミド DNA の配列を決定することにより確認した。

10. 酵母株の作製

1) *rec8* 変異株の作製

pUC119 ベクターに G418 耐性遺伝子である *kan^r* と *ura4⁺* をクローニングし、さらに GFP もしくは FLAG をコードする DNA 配列を挿入した。*rec8* ORF とそのプロモーター領域を含む DNA 断片を PCR により増幅し、同時に *SalI* と *BglII* 制限酵素サイトをそれぞれ 5' と 3' 末端に付加した。DNA 断片を制限酵素処理した後、これらを上記のプラスミドに GFP および FLAG と in frame になるように挿入した(pUK-*P_{rec8}-rec8⁺-GFP* (or *-FLAG*))。このプラスミドから、*rec8⁺* 内の *ApaI-NotI* DNA 断片(75-561 アミノ酸に対応する)を制限酵素処理により切り出し、pBluescript SK+に挿入した。このプラスミド上で Kunkel 法(前述)により変異を導入した。変異が導入された *ApaI-NotI* 断片を元のプラスミド(pUK-*P_{rec8}-rec8⁺-GFP* (or *-FLAG*))へ *ApaI-NotI* を利用して入れ替えることにより、変異型の *rec8* を含む pUK-*P_{rec8}-rec8^{*}-GFP* (or *-FLAG*)を得た。また、体細胞分裂において Rec8 の発現を極力抑えるため、体細胞分裂において mRNA を不安定化することが分かって

いる *spo5⁺* 遺伝子の 3'UTR を GFP もしくは FLAG の 3'側に挿入した。*kan^r* 内の *NruI* サイトでプラスミドを線状化した DNA を *rec8::kan^r ura4-D18* 株に導入した。安定なウラシル非要求性のコロニーを選択し、PCR により適切に遺伝子組み換えが起こったことを確認した。

2) *sgo1Δ*株の作製

Bahler らによる方法(Bahler et al., 1998)により、マーカー遺伝子を持つプラスミドである pFA6a-*kan^r* または pKS(FAura4)を鋳型として、*sgo1⁺* ORF の 5'側と 3'側にそれぞれ相同な配列 80 base を持つプライマーセットを用いて PCR によりマーカー DNA 断片を増幅し、野生株に導入した。安定な G418 耐性あるいはウラシル非要求性のコロニーを選択し、適切な組み換えが起こったことを、それぞれゲノム DNA を鋳型にした PCR より確認し、*sgo1::kan^r* 株と *sgo1::ura4⁺* 株を得た。

3) *sgo1⁺-GFP* 株の作製

まず、Bahler らによる方法(Bahler et al., 1998)により、pFA6a-FLAG'-*kan^r* を鋳型として、*sgo1⁺* ORF の 3'末端と 3'UTR にそれぞれ相同な配列 80 base を持つプライマーセットを用いて PCR により DNA 断片を増幅し、野生株に導入した。安定な G418 耐性のコロニーを選択し、適切な組み換えが起こったことを、ゲノム DNA を鋳型にした PCR とウェスタン解析により確認し、*sgo1⁺-FLAG<<kan^r* 株を得た。また、同様に次に、*sgo1⁺-FLAG<<kan^r* 株のゲノム DNA を鋳型とし、*sgo1⁺-FLAG<<kan^r* の 5'上流 400bp から FLAG までを PCR で増幅し、同時に *SalI* と *BglII* をそれぞれ 5'側と 3'側に付加した。これらを、pGFT81 の *SalI-BamHI* サイトに導入し、pGFT81(*P_{sgo1}-sgo1⁺-FLAG-GFP*)を得た。さらに、GFP の 3'側に位置する *XhoI-SacI* サイトを用いて、ゲノムから PCR で増幅した *sgo1⁺* の 3'UTR を

導入した。得られたプラスミドを *Sall*-*SacI* により消化し、DNA 断片を *sgo1::ura4⁺* 株を用いて形質転換した。5-FOA を含む培地上でウラシル要求性のコロニーを選択し、PCR により適切に遺伝子組み換えが起こったことを確認し、*sgo1⁺-FLAG-GFP* 株を得た。本論文では FLAG タグを利用した実験を行っていないため、「結果と考察」ではこれを *sgo1⁺-GFP* と記す。

4) Sgo1 強制発現株の作製

Bahler らによる方法(Bahler et al., 1998)で行った。*nmt1* プロモーター配列を持つプラスミド pFA6a-*kan^r*-P2*nmt1* を鋳型として、*sgo1* ORF の 400bp 5'上流と 5'末端にそれぞれ相同な配列 80 base を持つプライマーセットを用いて PCR により DNA 断片を増幅し、野生株に導入した。安定な G418 耐性のコロニーを選択し、適切な組み換えが起こったことを、ゲノム DNA を鋳型にした PCR により確認し、*P_{nmt1}-sgo1⁺* 株を得た。

11. Rec8 と共発現したときに細胞が致死になる遺伝子のスクリーニング

まず、*rec8⁺* ORF を pGFT82 の *Sall*-*BamHI* サイトにクローニングし、pGFT82(*rec8⁺*)を得た。これを *h-leu1 ura4-D18* 株に導入し、スクリーニングのホスト株とした。ホスト株に、cDNA ライブラリー(減数分裂中の細胞から調製された cDNA を pREP3 (LEU2 マーカー、*nmt1x* プロモーター)に挿入したライブラリー)(山本研究室、秋吉修士論文)を導入し、*nmt* プロモーターの発現を抑制する SD 培地にまいた [Rec8 の発現 OFF、ライブラリーの発現 OFF]。コロニーが形成されたら、これらを二種類の培地にレプリカした。

培地 1 : MM+N [Rec8 の発現 ON、ライブラリーの発現 ON]

培地 2 : MM+N + Ura + 5-FOA [Rec8 の発現 OFF、ライブラリーの発現 ON]

どちらの培地もチアミンを含まないので、*nmt* プロモーターが脱抑制されて発

現が誘導される。ただし、Ura⁺の細胞は 5-FOA を含む培地に生育できないので、培地 2 では pGFT82(*rec8*⁺)を失った細胞が選択されてコロニーを形成する。このため、培地 2 では Rec8 は発現しない。

また、1 mg/l の Magdala Red(ナカライ)を培地に添加しておいた。これにより、死細胞を多く含むコロニーはより赤く染まる。両者の培地に形成されたコロニーを見比べ、培地 2 よりも培地 1 の方でより赤く染まったコロニーをピックアップした。これらの細胞からライブラリー由来のプラスミド DNA を回収(前述)し、配列を決定した。

12. 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, 1mM PMSF)を添加して、5 分間煮沸した。その後約 1mg のガラスビーズ(φ= 0.5 mm)を加え、20 秒間激しく攪拌して細胞を破碎し、1 分間氷上に静置した後、再び 20 秒間激しく攪拌した。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碎液を回収した。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。

HeLa 細胞においては、細胞を回収後、PBS で一回洗浄して SDS-PAGE buffer に懸濁した後、5 分間煮沸した。

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 1 時間、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 4 度で 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、ECL plus (Amersham)により検出した。一次抗体は、以下の濃度で用いた。ウサギ抗 Rec8 抗体 1:1000、マウス抗チューブリン抗体 TAT-1(分裂酵母の実験について使用) 1:5000、ウサギ抗 Sgo1 抗体 1:1000、ウサギ抗 hSgo2 抗体 1:1000、マウス抗 Bub1 抗体(MBL, 1:1000)、マウス抗チューブリン抗体 DM1A (Sigma, HeLa 細胞の実験について使用) 1:5000、ウサギ抗 hSgo2 抗体 1:1000、ヤギ抗 PP2A-A 抗体(Santa Cruz) 1:2000。

13. ChIP 法

斉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 3%になるようにパラホルムアルデヒドを加え、18°Cで30分固定し、終濃度 0.125Mになるように 2.5M Glycin を加えた。細胞を回収し、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度洗浄した。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($\phi=0.5$ mm)を加え、20秒間激しく攪拌して細胞を破碎し、1分間氷上に静置した。さらにこれを3回繰り返した。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、1 μ l の抗 GFP 抗体(BD Biosciences)を加え、4°Cで2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3回ずつ洗浄した。さらに TE (10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA) で2回洗浄したのち、TER (TE + 10 μ g/ml RNaseA)

に懸濁して 37°C で 15 分間反応させ、RNA を消化した。さらに、0.25% SDS と 250µg/ml proteinase K を添加して 37°C で 8 時間以上静置した。続いて 65°C で 6 時間保温することによりホルムアルデヒド架橋を解消した。フェノール・クロロホルム抽出の後、エタノール沈殿を行って DNA を回収した。全細胞破碎液に対しても、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-DNA Master SYBR Green I kit (Roche) と LightCycler (Roche) を用いて定量的 PCR を行った。プライマーセットとして、セントロメアの中央領域(*cnt*、*imr*)、セントロメアの周縁ヘテロクロマチン領域(*dh*、*dg*)、染色体腕部(*lys1*、*mes1*)、セントロメア以外のヘテロクロマチン領域(*mat*; mating-type locus、*TAS*; テロメア)をそれぞれ用いた。プライマーの配列は *mat* (5'-GTATGTGGAACAAGAGAAG-3' 5'-CTCGCCTGCTTACATTTTAAGG-3') を除いて報告されたものを用いた (Yokobayashi et al., 2003)。

14. 分裂酵母における抗体染色

細胞を回収したのち、3%パラホルムアルデヒドを含む PEM buffer (100mM PIPES, 1mM EGTA, 1mM MgSO₄, pH6.8)に懸濁し、1 時間室温でインキュベートすることにより固定した。その後、PEMS buffer (PEM + 1.2M sorbitol, 0.5% β-mercaptoethanol)に懸濁し、終濃度 0.1mg/ml の Zymolyase 20T を加えて 37°C で 30 分間インキュベートし、細胞壁を消化した。洗浄後、1% Triton-X100 を含む PEM に懸濁して 1 分間混和した後、PEMBAL (PEM + 1% BSA, 0.1% NaN₃, 1.5% L-lysine)に再懸濁して 30 分間混和した。その後、1 次抗体を PEM 中で一晩反応させた。1 次抗体としてマウス抗チューブリン抗体 TAT-1 (1:200)、ウサギ抗 Sgo1 抗体 (1:100)、ウサギ抗 GFP 抗体(BD Biosciences、1:100)をそれぞれ用いた。PEMBAL で 3 回洗浄後、PEMBAL 中で 2 次抗体と 1~2 時間反応させた。2 次抗

体として Cy3 抗マウス抗体(Chemicon、1:100)、Alexa488 抗ウサギ抗体(Molecular Probes、1:100)を使用した。DNAを染色するために DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)を用いた。

15. HeLa 細胞の培養

HeLa 細胞は 10% FBS と 0.03% L-グルタミンを含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、ニッスイ)を用いて、37°C、5% CO₂の下で培養した。myc-Rad21 を発現誘導可能な HeLa 細胞株(IMP、Jan-Michael Peters 博士より供与)(Hauf et al., 2001)は 200µg/ml G418 (invitrogen)と 100µg/ml ハイグロマイシン B を加えた培地で培養した。myc-Rad21 の発現は 2µg/ml Doxycyclin (Sigma)を加えて 48 時間培養することにより誘導した。

16. RNAi

効率的にノックダウンできる siRNA の配列をデザインするために、Dharmacon 社によるプログラム(<http://www.dharmacon.com/sidesign/>)を利用し、さらに、報告されていたガイドライン(Ui-Tei et al., 2004)を参考にして標的配列を決定した。日本バイオサービス社に依頼し、標的配列に対するセンス鎖とアンチセンス鎖の RNA を合成した。以下に今回の実験において用いたセンス鎖の配列について示す。

hSgo1 (5'-GUCUACUGAUA AUGUCUUATT-3')

hSgo2 (5'-GCACUACCACUUUGAAUAATT-3')

Bub1 (5'-CCAGUGAGU UCCUAUCCAATT-3')

PP2A-A α (5'-AGACUUGACAUGUUGGUUGTT-3')

PP2A-A β (5'-UUUCUACUCCAAGUGCUAGTT-3')

Mad2 については既に報告のある配列を用いた(Luo et al., 2004)。

annealing buffer (100 mM potassium acetate, 15 mM HEPES-KOH pH 7.4, 1 mM magnesium acetate)でセンス鎖とアンチセンス鎖を最終濃度が 20 μ M になるように混合し、90°C で 1 分間過熱後、37°C で一時間静置してアニールさせ、siRNA duplex とした。

20 μ l の siRNA duplex を 160 μ l の Opti-MEM (invitrogen)に希釈し、また、4 μ l の Oligofectamine (invitrogen)を 16 μ l の Opti-MEM に懸濁し、15 分間静置した。両者を混合し、さらに 15 分間静置した後、これを直径 3.5cm のディッシュ上に 0.8ml の Opti-MEM のもとで培養された 20%コンフルエントの HeLa 細胞に加えた。さらに 37°C で 6 時間培養した後、20% FBS を含む DMEM 培地 1ml を加えた。2 日間培養後に細胞を回収して解析を行った。コントロールのサンプルとして siRNA の代わりに H₂O を用いた。

17. HeLa 細胞における抗体染色

1) myc-Rad21、PP2A-A、PP2A-C の染色

Waizenegger らによる方法(Waizenegger et al., 2000)に改良を加えて行った。直径 10cm のディッシュで培養したおよそ 80%コンフルエントの HeLa 細胞から、mitotic shake-off により分裂期の細胞を回収した。細胞を遠心して 1ml の PBS で洗浄した後、0.1ml と PBS に懸濁し、cytospin (Shandon)で 15,000rpm、15 分遠心することよりスライドガラス上に細胞を付着させた。0.1% Triton X-100 を含む PBS で 2 分間処理することにより細胞を pre-extract し、1 分間 PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS の中で 15 分間固定した。PBS で洗浄後、再度 0.1% Triton X-100 を含む PBS で 5 分間処理し、PBS で洗浄した後、ブロッキング溶液(3% BSA (Roche)を含む PBS)の中で 30 分間静置した。一次抗体と二次抗体の反応はブロッキング溶液中で行った。一次抗体反応を 2 時間行い、PBS で洗浄後、二次抗体反応を 1 時間行った。一次抗体はウサギ抗 myc 抗体 CM-100

(Gramsch, 1:1000)、ヒト ACA 抗体(順天堂大、高崎博士より供与、1:1000)、ヤギ抗 PP2A-A 抗体(Santa Cruz, 1:1000)、マウス抗 PP2A-C 抗体(BD Biosciences, 1:1000)、ウサギ抗 hSgo1 抗体(1:1000)、ウサギ抗 hSgo1 抗体(1:1000)を用いた。二次抗体は Alexa488 抗ウサギ抗体(Molecular Probes, 1:1000)、Cy3 抗ヒト抗体(Jackson ImmunoResearch, 1:1000)、Alexa488 抗ヤギ抗体(Molecular Probes, 1:1000)、Cy3 抗ウサギ抗体(Chemicon, 1:1000)、Alexa488 抗マウス抗体(Molecular Probes, 1:1000)を用いた。3 μ g/ml の Hoechst33342 で DNA を染色した。

2) hSgo1、hSgo2、PP2A-B56 α 、Bub1、チューブリン、Cyclin B の染色

Liu らによる方法(Liu et al., 2003)に改良を加えて行った。カバーガラス上で培養したおよそ 80%コンフルエントの HeLa 細胞を PBS で一回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS の中で 7 分間固定した。PBS で洗浄後、0.2% Triton X-100 を含む KB (10mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.1% BSA(Roche))で 5 分間処理し、KB で洗浄した。一次抗体と二次抗体の反応は KB で行った。一次抗体反応を 2 時間行い、KB で洗浄後、二次抗体反応を 1 時間行った。一次抗体はウサギ抗 hSgo1 抗体(1:1000)、ウサギ抗 hSgo2 抗体(1:1000)、マウス抗 Bub1 抗体(MBL, 1:1000)、マウス抗チューブリン抗体 DM1A(Sigma, 1:1000)、マウス抗 PP2A-B56 α 抗体(BD Biosciences, 1:1000)、マウス抗サイクリン B1 抗体 GNS-1(Santa Cruz, 1:1000)を用いた。二次抗体は Alexa488 抗ウサギ抗体(Molecular Probes, 1:1000)、Cy3 抗マウス抗体(Chemicon, 1:1000)、Cy3 抗ウサギ抗体(Chemicon, 1:1000)、Alexa488 抗マウス抗体(Molecular Probes, 1:1000)を用いた。3 μ g/ml の Hoechst33342 で DNA を染色した。

18. 染色体スプレッドとギムザ染色

Hauf らによる方法(Hauf et al., 2003)を参考にして行った。直径 10cm のディッ

シュで培養したおよそ 80%コンフルエントの HeLa 細胞から、mitotic shake-off により分裂期の細胞を回収した。細胞を含む 2ml の培地に対し 2ml のミリ Q 水を加えて素早く混合し、5 分 30 秒静置した。Carnoy's solution (75%メタノール、25%酢酸)を 10ml 加えて細胞を固定し、遠心により細胞を回収して Carnoy's solution で 3 回洗浄した後、最終的に 100 μ l に懸濁した。この溶液をスライドガラスに 20cm 以上の距離から落とすことで、染色体をスプレッドした。スライドガラスが十分に乾いた後、5%ギムザ溶液(Merck、pH6.8)に浸して 7 分間染色した。水で 3 回洗浄し、常温に放置してスライドガラスを乾かせた。最後に、Entellan (Merck)を用いてマウントした。

19. セントロメアシグナルの定量化

HeLa 細胞について免疫染色を行った後、一つのサンプルに対し 20 の分裂前中期の細胞を MetaMorph imaging software (Universal Imaging)を用いて撮影した。一つの細胞について、セントロメアにおけるシグナルの中で最も強いシグナルの強度を測定し、さらにその近傍の領域のシグナル強度を測定してバックグラウンドの値とした。セントロメアシグナル強度からバックグラウンドのシグナル強度を引いた値をそれぞれ測定し、平均値と標準偏差を求めた。コントロール RNAi の値を 100%としてグラフに示した(図 31)。

20. hSgo1 のクローニング

データベース上に登録された Q9BVA8 (hSgo1)の cDNA は 5'側が欠けており、ORF の全長を含んでいなかったため、以下の方法で全長の hSgo1 ORF を含む cDNA をクローニングした。

human Testis cDNA ライブラリー(BD Biosciences)から、hSgo1 cDNA の 5'側を増幅するため、ライブラリーベクターのクローニングサイトの 5'側の配列を認

識するプライマー(5'-CTCGGGAAGCGCGCCATTGTG-3')と、Q9BVA8 cDNA に含まれる hSgo1 の既知配列を認識するプライマー(5'-CAGATTTAGATTCTAAAATG-3')を用いて PCR を行った。この PCR 産物を鋳型として、予測される PCR 産物のより内側を認識するプライマー(5'-GCCATTGTGTTGGTACCCGGG-3') と(5'-GGTCCTTGCTCCATTGACAAGCA-3')を用いて nested PCR を行った。得られた PCR 産物を TOPO TA cloning kit (invitrogen)を用いてクローニングし、独立な複数のクローンについて配列を決定した。その結果、hSgo1 ORF は 527 アミノ酸をコードすることが明らかになった。得られた配列情報は DDBJ に登録した。

21. 抗体の作製

1) 大腸菌を用いた組換えタンパク質の作製

sgo1⁺ 遺伝子の ORF 全長を pGEX4T-2 (Pharmacia)と pET19b (Novagen)にクローニングし、大腸菌 BL21(DE3 c+)に導入して GST(glutathione-S transferase)融合あるいは His 融合組み換えタンパク質を発現させた。大腸菌を LB 培地で 37°C で OD₆₀₀=0.4 に達するまで培養し、終濃度 0.2mM となるように IPTG を添加して 25°C に移した。さらに 4 時間培養後、細胞を遠心回収し、可溶化 buffer (40mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM EDTA, 1% Triton X-100 + complete mini (Roche))に懸濁し、ソニケーションを 20 秒、3 回行った。遠心して沈殿物を取り除き、上清をグルタチオンセファロース 4B (Amersham) あるいは Ni-NTA セファロース (Novagen) と 4°C で 2 時間混和し、その後ビーズを wash buffer (40mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM EDTA)で洗浄した。GST-Sgo1 を 20mM 還元型グルタチオン溶液(50mM Tris-HCl, pH7.5)を用いて、His-Sgo1 を 0.25M イミダゾール溶液(50mM Tris-HCl, pH7.5)を用いてそれぞれ溶出した。溶出した GST-Sgo1 を PBS で透析処理した後、キアゲン社に依頼して GST-Sgo1 をウサギに免疫した。His-Sgo1 は coupling buffer

(0.1M NaHCO₃, 0.5M NaCl pH8.3)に透析した。

血清から抗 Sgo1 抗体を精製するため、CNBr-activated Sepharose (Pharmacia) に His-Sgo1 を結合させた。CNBr-activated Sepharose (Pharmacia Biotech) 1g を 1mM HCl により洗浄した後、coupling buffer に透析された His-Sgo1 を加えて 4°C で 1 晩混合した。coupling buffer で洗浄した後、0.1M Tris-HCl pH8.0 で 2 時間静置した。その後、acetate buffer (0.1M acetic acid, 0.5M NaCl, pH4.0) で洗浄し、次に Tris buffer (0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.0) で洗浄した。これを 3 回繰り返し、最後に PBS で洗浄して、His-Sgo1 結合ビーズを得た。

ウサギから得られた抗血清は、等量の飽和硫酸溶液を加えて 4°C で 1 時間静置し、遠心を行って沈殿を PBS で懸濁した。さらにもう一回硫酸沈殿を行って PBS に溶解した後、PBS で透析した。その後、His-Sgo1 結合ビーズを加え、室温で 1 時間混合した。ビーズを wash buffer (20mM Tris-HCl pH7.5, 0.5M NaCl) で洗浄し、0.2M Glycine-HCl pH2.4 を加えることで溶出した。溶出液はすぐに 2M Tris-HCl pH8.4 を 1/10 量加えることで pH を中性に戻した。得られた抗体溶液を PBS で透析した。

また、Rec8 (全長)、hSgo1(109-491 アミノ酸)、hSgo2 (331-631 アミノ酸)に対応する cDNA をそれぞれクローニングし、同様の方法でそれぞれに対する抗体を精製した。

22. 酵母 two-hybrid 法

Matchmaker Two-Hybrid system (Clontech 社)を酵母 two-hybrid 法を行った。検定を行う各遺伝子の ORF 全長を PCR により増幅し、pGBKT7(DNA 結合ドメイン融合タンパク質を発現)と pGADT7(転写活性化ドメイン融合タンパク質を発現)にそれぞれクローニングした。これらのプラスミドを用いて、出芽酵母 AH109 株を形質転換した。ポジティブコントロールとして、pGBKT7-p53 および

pGADT7-T-antigen を使用した。選択培地には、SD-His + 1mM 3-AT を用い、それぞれ3つの独立な形質転換体について検定した。

第三章 減数第一分裂における相同染色体の分離にはセパレーズによる Rec8 の切断が必要である

減数分裂前の DNA 合成期において複製された姉妹染色分体間には Rec8 コヒーシンによって接着が確立され、さらに相同染色体間にもキアズマを介した物理的相互作用が生まれる。これらの接着は減数第一分裂中期まで維持されるが、後期になると Rec8 コヒーシンは染色体腕部から解離する。すると、キアズマを支えていた腕部の接着が解除されて相同染色体が分離する。これらのことから、Rec8 コヒーシンの染色体腕部からの解離が第一分裂における相同染色体の分離に必要と考えられたが、Rec8 コヒーシンがどのようなメカニズムで染色体から解離するのかについては分かっていなかった。

体細胞分裂におけるコヒーシン複合体の解離は、Rec8 と相同なサブユニット Rad21 がセパレーズに認識され、切断されることによって起こる(Hauf et al., 2001; Tomonaga et al., 2000; Uhlmann et al., 2000)。分裂酵母 Rec8 の中でも、セパレーズによって認識される配列に似た配列が存在しており(Uhlmann et al., 1999)、Rec8 も Rad21 と同様に減数第一分裂後期にセパレーズによって分解される可能性が考えられた。

結果

Rec8 は減数分裂においてセパレーズ Cut1 に依存して分解される

Rec8 がセパレーズによって分解される可能性について検討するため、まず Rec8 のタンパク質を検出できる抗体を作製した。大腸菌に発現させた組み換え Rec8 タンパク質をウサギに免疫し、ウサギ抗 Rec8 抗体を精製した(材料と方法を参照)。作製した抗体が分裂酵母の細胞抽出液内で Rec8 を認識するかを調べる

ため、ウエスタン解析を行った。細胞抽出液は、減数第一分裂前期の進行に必要な *mei4⁺* 遺伝子(Horie et al., 1998)の変異株を窒素源飢餓により減数分裂に誘導し、減数第一分裂前期に同調させた細胞から作製した。ウエスタン解析の結果、抗 Rec8 抗体はいくつかのバンドを検出し、そのうち 80kDa 付近の複数のバンドは *rec8* 遺伝子破壊株では検出されなかった(図 2a、データは示さない)。Rec8 は 80kDa 付近にリン酸化を受けて複数のバンドを示すことが分かっており(Parisi et al., 1999)、これらのバンドが Rec8 に対応すると結論した。また、43kDa のバンドは *rec8Δ*株においても検出されたので、抗体のクロスリアクトによるものと考えられた。

続いて、減数分裂の進行に伴って Rec8 タンパク質の量がどのように変化するかを調べた。分裂酵母においては、*pat1-114* 高温感受性変異株を制限温度に温度シフトすることで極めて同調的な減数分裂を誘導することができる(Iino and Yamamoto, 1985)。減数分裂誘導後、一時間おきに細胞を回収してウエスタン解析用にサンプルを調整し、またそれと同時に DAPI 染色を行って細胞内の核数を数えることにより、減数分裂の進行をモニターした。減数分裂誘導後、4-5hr で減数第一分裂(1 核から 2 核への移行)、5-6hr で第二分裂(2 核から 4 核への移行)のピークが見られた(図 2b)。精製した抗 Rec8 抗体を用いてウエスタン解析を行ったところ、Rec8 は 2-3hr で蓄積し始め、第一分裂および第二分裂が起こる 4-6hr にかけて分解されていくことが分かった(図 2c)。さらに、5hr に 63kDa のバンドが特異的に検出され、これは Rec8 の切断産物に対応する可能性が考えられた。

次に、Rec8 の分解がセパレーズに依存している可能性を調べるため、分裂酵母セパレーズ Cut1 に変異のある *cut1-206* 温度感受性変異(Uzawa et al., 1990)を導入した株を作製し、制限温度下で同調的な減数分裂を誘導した。その結果、*cut1⁺* 株に比べ、*cut1-206* 株では核分裂が著しく阻害されることが判明した(図 2b)。さらに、ウエスタン解析により Rec8 の量の変化を調べると、*cut1-206* 株では *cut1⁺*

株に比べて Rec8 の分解が著しく阻害されていた(図 2c)。分解されずに残存した Rec8 は脱リン酸化を受けており、これは、第一分裂と第二分裂において積極的に Rec8 をリン酸化していたキナーゼが、分裂後に不活性化されたためかもしれない。また、63kDa のバンドがこの株では薄くなっていたことから、このバンドは Rec8 の切断産物に対応すると考えられた(図 2c)。cut1⁺株において Rec8 の切断産物は 5hr で検出され、その後すぐに消失するが、このことはセパレーズによる Rad21 の切断産物が出現後すぐに消失することと一致しており(Tomonaga et al., 2000; Uhlmann et al., 1999)、コヒーシンの切断産物が積極的に分解されるメカニズムがあることを示唆している。これらの結果から、減数分裂において Rec8 の分解は主にセパレーズ依存的に起こり、また、セパレーズは核分裂に必要であることが分かった。Rec8 の分解がセパレーズの不活性化によって完全には阻害されなかったため、マイナーに Rec8 の分解に寄与するセパレーズ非依存的な機構が存在するかもしれない。

セパレーズは Rec8 の 2 つのサイトを認識して切断する

分裂酵母 Rec8 には、セパレーズによって認識されて切断されるコンセンサス配列に似た配列が存在することが指摘されていた(図 3, site 373)(Uhlmann et al., 1999)。本研究室の宮崎は、この部位に変異を導入した *rec8-RD1* 株を作製したが、*rec8-RD1* 変異は Rec8 の分解に部分的にしか影響を及ぼさなかった(宮崎、修士論文)。そこで、この部位の近傍にさらに切断され得る配列を探索したところ、これまで知られたコンセンサス配列と部分的に類似した配列を見出した(図 3, site384)。これらの配列が Rec8 の分解に必要なかを調べるため、site384 に変異を導入した *rec8-RD2*、site373 と 384 の両方に導入した *rec8-RDRD* をそれぞれ作製し(図 3)、C 末端に GFP(green fluorescent protein)を融合させて、染色体上の *rec8*⁺ 遺伝子と置き換えた。コントロールとして *rec8*⁺-GFP 株を同様に作製し、

この株では、*rec8Δ*株における表現型である姉妹染色分体間の早期分離と孢子生存率の低下が見られない(図 4d)ことから、Rec8-GFP タンパク質が機能的であることを確認した。

それぞれの株で *pat1-114* 変異を用いて同調的に減数分裂を誘導し、核分裂の進行と Rec8 タンパク量の変化を調べた。*rec8⁺-GFP* 株では、核分裂は 5-7 時間に起こり(図 4a)、その間に Rec8-GFP の分解が起こっていた(図 4b)。ここで Rec8 抗体により検出された切断産物の泳動度が C 末端に GFP を融合させたものとうでないものとの変化がなかったため(図 2c、4b)、検出された切断産物は N 末端側であったと考えられる。C 末端側の断片は検出されなかったが、出芽酵母 Rad21 のセパレーズによる C 末端側の切断断片は N-end rule pathway (Bachmair et al., 1986)により迅速に分解されることが知られており(Rao et al., 2001)、分裂酵母 Rec8 の C 末端側の切断断片も同様の機構で迅速に分解されることが考えられる。

site373 に変異を導入した *rec8-RD1-GFP* 株では、核分裂は正常な速度で進行し(図 4a)、Rec8-RD1-GFP の分解は一時間ほど遅れるものの、最終的には分解された(図 4b)。切断産物は *rec8⁺-GFP* 株の場合と同じく 5hr に現れたが、その泳動度はわずかに速くなっていた。これらのことは、Rec8-RD1-GFP は *site373* よりも N 末端側で切断を受けたことを示唆している。

そこで、*site373* に加え *site384* に変異を導入した *rec8-RDRD-GFP* 株について調べてみると、Rec8-RDRD-GFP は分解が著しく阻害され、切断産物は検出されなかった。また、核分裂も起こりにくくなっていた(図 4a&b、*rec8-RDRD-GFP*)。*site384* のみに変異を導入した *rec8-RD2-GFP* では Rec8-GFP の分解と核分裂ともに影響がなかった(図 4a&b、*rec8-RD2-GFP*)。

これらの結果は、セパレーズは減数分裂において Rec8 の *site373* および *site384* を認識して切断し、分解していることを示している。*Rrec8⁺-GFP* 株では *site373* で切られた切断産物が検出されることから、通常は二つの配列のうち主に

site373 で切断が起こると考えられる。また、*rec8-RDRD* 株では核分裂が著しく阻害されることから、Rec8 の分解は減数分裂における核分裂に必要であることが分かった。

これらの結果をさらに確認するため、*pat1-114* 変異による人為的な減数分裂ではなく、より生理的な条件である窒素源飢餓による減数分裂を行わせ、減数分裂終了後に Rec8-GFP のシグナルを観察した。分裂酵母では、減数分裂によって4つの核に均等に染色体が分配され、最終的にその周りに均等大きさの4つの胞子が形成される。*rec8⁺-GFP* 株では、減数分裂が終了したことを示す胞子の形成が起こった細胞で、Rec8-GFP のシグナルは完全に消失していた。これに対し、*rec8-RDRD-GFP* 株では、Rec8-GFP が残存していた(図 4c)。この結果は、図 4b の結果と一致する。さらに、*rec8-RDRD-GFP* 株では核分裂の失敗を反映して大きさが不均等な胞子が形成されていた(図 4c)。これらの胞子についてランダムスポア解析を行ったところ、*rec8⁺-GFP*、*rec8-RD1-GFP*、*rec8-RD2-GFP* 株における胞子は 60~70%の生存率であったのに対し、*rec8-RDRD-GFP* 株における胞子は、2%しか生育できなかった(図 4d)。このことから、Rec8 のセパレーズによる分解は生存可能な配偶子の形成に必須であることが分かった。

非切断型 Rec8-RDRD は染色体の不分離を引き起こす

rec8-RDRD-GFP 株では、核分裂が著しく阻害されるものの、依然として~60%の細胞で分裂した核が見られる(図 4a)。これらの核分裂が、相同染色体あるいは姉妹染色分体の分離を反映したものかを調べるため、特定の染色体上の領域を GFP でマークする手法を用いた。

分裂酵母では、染色体上の特定の領域に LacO リピート配列を挿入し、さらに LacO 配列を認識して結合する LacI タンパク質に GFP と核移行配列(NLS)を融合させた LacI-NLS-GFP を細胞内で発現させることにより、その領域を GFP シグ

ナルにより可視化することができる(図 5b)。この実験では、I 番染色体のセントロメア近傍(セントロメアから 30kb)に位置する *lys1* 遺伝子座を GFP でマークした株(以下、*cen1*-GFP と呼ぶ)を用いた。これにより、III 番まである分裂酵母の染色体のうち、I 番染色体が形成する一つの相同染色体ペアに含まれる 4 本の染色体のみを可視化することができ、これらが分離するかどうかを解析することができる。

cen1-GFP 株の染色体上の *rec8*⁺ 遺伝子を *rec8*⁺(コントロール)および *rec8*-RDRD に置き換え、窒素源飢餓により減数分裂を誘導した。一日培養後、多くの細胞が減数分裂を終了したことを確認して細胞を回収した。まず DAPI 染色により細胞内の核数を観察すると、*rec8*⁺ 株では～80%の細胞が 4 つの均等な核を持ち、減数分裂が正常に終了したことを示していた。残りの～20%は減数分裂の途中の細胞で、減数分裂誘導の同調が完全ではないことを示している。それに対し、*rec8*-RDRD 株ではやはり核分裂が著しく阻害されていたが、～40%で分離した核が観察された(図 5a)。この結果は、図 4a における *pat1-114* 変異によって誘導した減数分裂の結果とほとんど一致している。

次に、これらの細胞において *cen1*-GFP を観察することにより、一つの相同染色体ペアに含まれる 4 本の染色体について、これらが分離したかどうかを調べた。図 5b において、強い GFP のドット状のシグナルが染色体上の *cen1* 領域を示すものであり、その周囲を囲う弱いシグナルは LacI-NLS-GFP が核内に拡散したものであり、核を示す。*rec8*⁺ 株では、～80%の細胞でドット状の *cen1*-GFP シグナルが 4 つの核に 1 つずつ均等に存在し、2 組の姉妹染色分体(4 本の姉妹染色分体)が減数分裂を経て均等に 1 本ずつ分配されたことを示していた。残りの～20%は、減数分裂途中の細胞である。ところが *rec8*-RDRD 株では、ほとんどすべての細胞で *cen1*-GFP ドットが 1 つのみの核内にとどまっており、相同染色体のペアに含まれていた染色体がほとんど分離しなかったことを示していた(図

5b)。このことは、*rec8-RDRD* 株において観察された分裂した核(図 5a)は、相同染色体のペアの中の染色体が分離したことで生まれたものではないことを示している。分裂した核は、もともとつながりのない異なる相同染色体のペア(たとえば I 番染色体のペアと II 番染色体のペア)が、減数分裂中にスピンドル微小管によってそれぞれ移動させられて形成されたものと考えられる。以上より、セパレーズによって切断される部位に変異を導入した *Rec8-RDRD* を発現する減数分裂では、相同染色体の分離が起こらないと結論した。

キアズマの除去により *Rec8-RDRD* による相同染色体の不分離が解消される

減数第一分裂の前まで相同染色体間の接着を担っているのは、染色体腕部において組み換えによって形成されたキアズマと、それを支える *Rec8* コヒーシ複合体である。もし、減数第一分裂における相同染色体の分離が、染色体腕部の *Rec8* が切断されてキアズマが解消することによって引き起こされるとすれば、キアズマが形成されない変異体においては非切断型 *Rec8-RDRD* による相同染色体の不分離は見られないはずである。そこで、キアズマの形成に必要な遺伝子である *rec12⁺* 遺伝子(Young et al., 2002)の破壊株(*rec12Δ*)に *rec8-RDRD* 変異を導入し、減数分裂における染色体分配を調べた。

この目的のため、II 番染色体の腕部に位置する *cut3* 遺伝子座を GFP でマークし、減数分裂後にこれらが分配されたかを観察した。*rec8-RDRD* 株では、ほとんどの細胞で *cut3*-GFP ドットは一つの核に留まっており、染色体が分離しなかったことを示していた(図 6a)。この結果は、I 番染色体について同様に行った図 5b における結果と一致している。これに対し、キアズマが形成されない変異株である *rec8-RDRD rec12Δ* 株においては、およそ半数(56%)の細胞で *cut3*-GFP ドットが二つの核に分配されていた(図 6a)。このことは、*rec12Δ rec8-RDRD* 株の減数分裂においては、染色体分配が一回のみ起こったことを示している。

rec12Δ rec8-RDRD 株で見られた一回の染色体分配が、相同染色体の分離によるものか、それとも姉妹染色分体の分離によるものかを調べるため、以下の実験を行った。分裂酵母では、それぞれ h^+ と h の接合型を持つ一倍体細胞を混ぜて窒素源飢餓条件下におくと、これらが接合して核融合を起こし、それぞれの細胞由来の相同染色体どうしが組み換えを起こしてペアを形成する。このことを利用し、 h^+ 細胞のみに II 番染色体のセントロメア近傍をマークする *cen2-GFP* を持たせ、これと h 細胞を掛け合わせることで、II 番染色体の相同染色体ペアのうち、片方のみ(したがって 2 本の姉妹染色分体)を *cen2-GFP* で可視化することができる(図 6b)。この系において、野生株に減数分裂を行わせた後、GFP シグナルを観察すると、ほとんどの細胞で 2 つの *cen2-GFP* ドットが 2 つの核に分配されていた(図 6b、*rec8⁺ wild-type*)。ここで *cen2-GFP* ドットが 1 つの核内に留まっていた少数の細胞は、減数分裂がまだ完了していない細胞であると考えられる。これに対し、*rec8-RDRD* 株においては、ほとんどすべての細胞で *cen2-GFP* の分配が起こっておらず、姉妹染色分体が分離しなかったことを示していた。この結果は、図 5b および図 6a の結果と一致している。キアズマが形成されない *rec8-RDRD rec12Δ* 株においては、*rec8-RDRD* 株と同様に *cen2-GFP* は分配されずに一つの核内にとどまっておき、姉妹染色分体が分離しなかったことを示していた。このことから、図 6a で観察された *rec8-RDRD rec12Δ* 株における一回の染色体分配は、姉妹染色分体ではなく相同染色体が分離したものであったと結論した。図 6a の *rec8-RDRD rec12Δ* 株においておよそ半数の細胞でしか *cut3-GFP* の分配が見られなかったのは、*rec12Δ* 株では減数第一分裂中期において相同染色体間のつながりを欠くため、微小管が正しい相同染色体のペアを認識できず、その結果、相同染色体をランダムな方向に引っ張って分配してしまったためと考えられる。これらの解析結果から、*Rec8-RDRD* により引き起こされる相同染色体の不分離は、キアズマが解消されないことが原因となって起きていたこと

が分かった。

染色体腕部の Rec8 コヒーシンの除去により Rec8-RDRD による相同染色体の不分離が解消される

減数分裂時における Rec8 コヒーシン複合体は動原体部位と染色体腕部でその組成が異なっており、動原体部位では主に Psc3 が、染色体腕部では Psc3 に代わってその減数分裂特異的な相同因子である Rec11 が主にサブユニットとして機能していることが明らかになっている。*rec11⁺* 遺伝子破壊株(*rec11Δ*)においては、減数第一分裂の前に Rec8 コヒーシンが染色体腕部に局在できず、一方でセントロメアにおいては Psc3 をサブユニットとして用いることで局在することができる。(Kitajima et al., 2003)。コヒーシン複合体は、減数第一分裂の後期では染色体腕部でのみ消失し、セントロメアではその局在を残す。このことは、減数第一分裂における相同染色体の分離が、染色体腕部における Rec8 の切断が引き金となって起こる可能性を示唆している。もしそうであれば、染色体腕部で姉妹染色分体間の接着を担っている Rec8-Rec11 コヒーシン複合体を *rec11⁺* 遺伝子破壊により除去することで、Rec8-RDRD による相同染色体の不分離が解消されるはずである。

そこで、*rec8-RDRD rec11Δ* 株の減数分裂終了後に *cut3-GFP* を観察することで、相同染色体が分離したかを調べた。すると、*rec8-RDRD* 株ではほとんどの細胞で *cut3-GFP* ドットは一つの核内に留まったままであったのに対し、*rec8-RDRD rec11Δ* 株では、およそ35%の細胞で *cut3-GFP* ドットが2つの核に分配されている様子が観察された(図 6a)。このことは、*rec8-RDRD rec11Δ* 株において、一回のみの染色体分配が起こったことを示している。この一回の染色体分配が相同染色体の分離によるものか姉妹染色分体の分離によるものかを調べるため、*cen2-GFP* を相同染色体のペアのうち片方だけにマークして姉妹染色分体の分配

を調べたところ、*rec8-RDRD rec11Δ* 株では姉妹染色体は分配されていなかった(図 6b)。よって、*rec8-RDRD rec11Δ* 株において観察された一回のみの染色体分配は、相同染色体の分離によるものであることが分かった。これらのことから、染色体腕部における Rec8 切断が減数第一分裂の相同染色体分離の引き金になるということが強く示唆された。およそ35%の細胞でしか染色体分配が見られなかったのは、以下の2つの理由のためと考えられる。まず、*rec11Δ* 株では減数第一分裂中期において、キアズマを支える染色体腕部の姉妹染色分体間の接着力を欠くので、その結果、スピンドル微小管が相同染色体間のつながりを十分に感知できず、相同染色体をランダムな方向に引っ張ってしまったことが考えられる(この場合 70%の細胞でランダムな分配が起きたことになる)。また、*rec11⁺* が破壊されて染色体腕部の Rec8-Rec11 コヒーシン複合体が失われると、主にセントロメアで機能する Rec8-Psc3 複合体が染色体腕部にも部分的に局在して接着をサポートすることが分かっている。したがって、*rec11Δ* 株においては染色体腕部における Rec8 が完全には除去されておらず、そのためおよそ 30%の細胞では相同染色体の分離が積極的に阻害されたと考えられる。

また、これらの結果は、*rec8-RDRD rec11Δ* 株では姉妹染色分体の分離が起こらないことを示している(図 6b)。このことは、染色体腕部における Rec8 コヒーシンの除去は減数第一分裂における相同染色体の分離には十分であるものの、第二分裂における姉妹染色分体の分離には十分でないことを示している。そこで、*rec11Δ rec8-RDRD* 株で姉妹染色分体の不分離が起きたのは、セントロメアにおいて非切断型の Rec8-Psc3 コヒーシン複合体が姉妹染色分体間の接着を持続したためであると考えた。もしこの考えが正しければ、Psc3 をさらに不活性化することで姉妹染色分体の分離が引き起こされるはずである。そこで、*psc3⁺* 遺伝子の温度感受性変異 *psc3-2T* をさらに導入した *rec8-RDRD rec11Δ psc3-2T* 株を用いて、減数分裂における姉妹染色分体の分配を観察した。すると、この株

では 38%の細胞で *cen2*-GFP が 2 つの核に分配されており(図 6b)、姉妹染色分体の分離が引き起こされたことを示していた。姉妹染色分体の分配が 38%の細胞でしか起こらなかったのは、姉妹染色分体間の接着が失われたためにスピンドル微小管がランダムに引っ張ってしまったことと、*psc3-2T* 変異による Psc3 の不活性化が部分的であったことが重なったためと考えられる。これらのことから、セントロメアにおける非切断型の Rec8-Psc3 は姉妹染色分体の不分離を引き起こすことが分かった。このことは、減数第二分裂において、セパレーズがセントロメアの Rec8 を切断することが、姉妹染色分体の分離に必要であるということを示唆している。

考察

これらの結果から、減数第一分裂において Rec8 はセパレーズによって切断されること、またそれが相同染色体間のつながりであるキアズマを解消することで相同染色体を分離させることに必要であることが明らかになった。これらの結果は、出芽酵母における解析の報告と一致する(Buonomo et al., 2000)。また、染色体腕部の Rec8 コヒーシンを遺伝学的に取り除くことによって非切断型 Rec8-RDRD による相同染色体の不分離が解消されたことから、減数第一分裂における相同染色体の分離は、染色体腕部の Rec8 が切断されることが引き金になって起こることが強く示唆された。セパレーズの活性が減数第一分裂における相同染色体の分離に必要であることは、線虫とマウスにおいても示されている(Siomos et al., 2001; Terret et al., 2003)。ただし、カエルの卵子における実験では、セパレーズの活性化に必要な APC が第一分裂の相同染色体の分離に必要ないという可能性が示唆されており(Peter et al., 2001)、染色体腕部の Rec8 コヒーシンを解離させるセパレーズ非依存的な機構が存在しているのかもしれない。

続いて起こる減数第二分裂における姉妹染色分体の分離については、*rec8-RDRD rec11Δ*株においてセントロメアに残った Rec8-RDRD が姉妹染色分体の不分離を引き起こした(図 6b)ことから、やはり第二分裂においてもセパレーズがセントロメアの Rec8 を切断することが必要であることが示唆された。しかしながら、*rec8-RDRD rec11Δ*株における Rec8-RDRD の局在が、野生株の減数第二分裂における Rec8 の局在を完全にミミックしていた確証はないことから、これを結論することはできない。例えば、減数第一分裂においてある程度の量のセントロメア Rec8 がセパレーズによって切断されることが重要であり、続く第二分裂では残存した Rec8 がセパレーズ非依存的な機構によってセントロメアから解離させられている可能性も考えられる。

第二分裂においてセパレーズがセントロメア Rec8 を切断し、それが姉妹染色分体の分離に必要であることを証明するためには、第一分裂後から第二分裂が起こるまでの間にセパレーズを特異的に不活性化しなくてはならない。しかしながら、分裂酵母における第一分裂から第二分裂までの時間は 1 時間程度と短く、この間に同調的にセパレーズを不活性化することは技術的に非常に困難である。マウスやカエルなどにおける卵子では、減数第二分裂の前に細胞周期が一旦停止するので、そのときに抗体をインジェクションするなどしてセパレーズの機能を阻害し、第二分裂における姉妹染色分体の分離を観察することが可能かもしれない。

セパレーズは、実際に第一分裂のみならず第二分裂においても活性化されているのだろうか。体細胞分裂の分裂期においては、中期にセパレーズはセキュリンと複合体を形成してスピンドル微小管上に局在し、後期になるとセキュリンが分解され、それによりセパレーズが自由になることで活性化することが知られている(Yanagida, 2000)。減数分裂においては、分裂酵母と出芽酵母の研究から、第一分裂中期にセキュリンはスピンドル微小管に局在し、第一分裂後期に

消失した後、続いて起こる第二分裂中期に再度スピンドル微小管上に局在し、また第二分裂後期に消失することが観察されている(Salah and Nasmyth, 2000)(宮崎、修士論文)。これらのことは、減数分裂において、第一分裂と第二分裂のそれぞれの後期にセパレーズが特異的に活性化されることを示唆しており、第二分裂における姉妹染色分体の分離はセパレーズがセントロメア Rec8 を切断することで起こるという考えを支持している。

したがって、減数分裂の染色体分離は、次のようなメカニズムで起こると考えられる。減数第一分裂において活性化されたセパレーズは、染色体腕部の Rec8 を切断することで相同染色体を分離させる。続いて起こる減数第二分裂では、おそらく、再度セパレーズが活性化し、セントロメアに残った Rec8 を切断して姉妹染色分体を分離させると考えられる。(図 6c)。

ここで、減数第一分裂においてセパレーズが染色体腕部の Rec8 を切断して分離させるのに対し、なぜセントロメアの Rec8 は残存するのかという大きな疑問が生じる。第四章において、この問題について解析を行う。

第四章 シュゴシンは減数第一分裂においてセントロメア Rec8 をセパレーズによる切断から保護する

減数第一分裂において、染色体腕部の Rec8 がセパレーズによって切断されて相同染色体の分離が起こるが、一方で、セントロメアの Rec8 は残存し、姉妹セントロメア間の接着を維持する。セントロメアで姉妹染色分体ペアがつなぎとめられることにより、続いて起こる第二分裂において、スピンドル微小管が正しく姉妹染色分体ペアを認識してこれらを反対方向に均等に分配することができると考えられる。減数第一分裂において、Rec8 がセントロメアでのみ残存するメカニズムは、分かっていなかった。

結果

セントロメア Rec8 を保護する因子のスクリーニング

体細胞分裂において、Rec8 を強制発現させることで Rec8 コヒーシン複合体を Rad21 コヒーシン複合体に置き換えて機能させることができる。すると、分裂後期に Rec8 は第一分裂後期と同様にセパレーズによる分解を受けるが、染色体腕部の Rec8 のみならずセントロメアの Rec8 も切断を受けてしまい、姉妹染色分体は分離して娘細胞に均等に分配される(図 7b、後述)。このことは、減数第一分裂時には Rec8 をセントロメアでセパレーズによる切断から保護している因子が存在し、それは体細胞分裂時には発現していないという可能性を示唆している。そこで、体細胞分裂において Rec8 と未知なる保護因子を共発現させると、Rec8 が分裂後期にセントロメアで保護され、姉妹染色分体の不分離が引き起こされると考えた(図 7c)。このような細胞では、細胞分裂において姉妹染色分体を均等に分配できず、多くが死に至るはずである。そこで、体細胞分裂において Rec8

と共発現させると細胞を致死にする遺伝子を、減数分裂中の細胞から作製された cDNA ライブラリー(山本研究室、秋吉修士論文)から探索した。

具体的には、*rec8*⁺ 遺伝子を *ura4*⁺ マーカーのプラスミドに挿入し、これを *ura4* 欠損株に形質転換した。*Rec8* の発現は *nmt81* プロモーター(チアミン除去で誘導可能)で制御できるようにした。このプラスミドを保持した分裂酵母に、さらに *nmt1x* プロモーター(チアミン除去で誘導可能)で発現を制御できる cDNA ライブラリー(*LEU2* マーカーのプラスミド)を導入し、チアミンを加えたプレート培地上でコロニーを形成させた [Rec8 の発現 OFF、ライブラリーの発現 OFF]。コロニー形成後、これを二種類のプレート培地にレプリカした。一つは、チアミンを含まない培地(培地 1)であり、もう一つは、チアミンを含まず、5-fluoroorotic acid (FOA)を加えた培地(培地 2)である。5-FOA を加えた培地では、細胞は *ura4*⁺ マーカーのプラスミドを保持できないので、これを失った細胞が選択されてコロニーが形成される。したがって、培地 1 上では [Rec8 の発現 ON、ライブラリーの発現 ON]、培地 2 上では [Rec8 の発現 OFF、ライブラリーの発現 ON] となる。今回の目的は、Rec8 と共発現したときのみ致死にする遺伝子の探索なので、培地 1 上でのみ死細胞が多くなるコロニーをピックアップした。死細胞が多いコロニーは培地中に加えたフロキシシン B によって赤く染まるので、これを指標にした。

ライブラリーサイズ 65 万のライブラリーからおよそ 70 万のコロニーを探索し、そのうち再現性のある 65 のクローンを得た。シーケンス解析から、これらは 18 種類の遺伝子由来の cDNA を含んでいることが分かった。これらのうち、機能が未知であった遺伝子について遺伝子破壊株を作製したところ、SPBP35G2.03c の遺伝子破壊株において減数分裂特異的な表現型が見られたので、これを *Rec8* の保護因子をコードする候補遺伝子として *sgo1*⁺(シュゴシン)と命名し、さらなる詳細な解析を行った。

体細胞分裂における Rec8 と Sgo1 の共発現は姉妹染色分体の不分離を引き起こす

Rec8 と Sgo1 の共発現が細胞を致死にすることを確認するために、Rec8 と Sgo1 をそれぞれ *ADH1* プロモーターと *nmt1* プロモーターにより体細胞分裂において強制発現させた。すると、それぞれ一方のみの強制発現では生育にほとんど影響せず、また、Rec8 の代わりに体細胞分裂型の相同因子である Rad21 を Sgo1 と共発現させても影響がなかった。ところが、Sgo1 と Rec8 を同時に発現させると、細胞は生育できなくなった(図 8a)。このことは、Sgo1 が Rad21 ではなく、Rec8 と共に特異的に機能するタンパク質であることを示唆している。

次に、実際に分裂後期において Sgo1 が Rec8 を保護し、姉妹染色分体の不分離を引き起こしているかどうかを調べた。この目的のため *cen2*-GFP 株を用い、マークされた II 番染色体の姉妹染色分体のペアが細胞分裂において分配されたかを調べた。Sgo1 の発現を誘導して 15 時間後、分裂後に形成されたセプトラムを持つ細胞において *cen2*-GFP シグナルを観察した。すると、Rec8 と Sgo1 の片方のみを発現した株では、ほとんどの細胞において 2 つの *cen2*-GFP ドットはセプトラムを挟んだ 2 つの娘細胞の一つずつ均等に分配されていたのに対し、Rec8 と Sgo1 を共発現した株では、~60%の細胞で 2 つの *cen2*-GFP ドットが 2 つの娘細胞のうち一方に入ってしまった様子が観察された(図 8b)。これは、*cen2*-GFP でマークされた姉妹染色分体のペアが分裂期に分離しなかったことを強く示唆している。

Sgo1 と Rec8 の共発現株で見られた姉妹染色分体の不分離が、分裂後期において Sgo1 が Rec8 を保護したために起こったものであるのかを調べるため、免疫染色を行って Rec8-GFP の局在を観察した。分裂の時期を示すために抗チューブリン抗体でスピンドル微小管を染め、また DNA を同時に染色した。分裂前の間

期の核において、Rec8 はドット状の局在を示した(図 8c)が、これは Rec8 がセントロメアに多くリクルートされるためである(Watanabe and Nurse, 1999)。間期において Rec8-GFP の局在に Sgo1 の発現は影響を及ぼさなかったが、スピンドル微小管が伸長して染色体が分離した時期である分裂後期の核を観察すると、Sgo1 を発現していない細胞では Rec8-GFP のシグナルが消失しており、また、均等な量の染色体が反対方向に分離している様子が観察されたのに対し、Sgo1 が発現している細胞では、84%の分裂後期で Rec8-GFP のセントロメアと思われるドット状のシグナルが残存し、また、一部の染色体が分離に失敗しスピンドルの中央に留まる様子が高い頻度で観察された(図 8c)。これらのことは、Sgo1 を体細胞分裂において強制発現すると、Sgo1 が分裂後期にセントロメアで Rec8 をセパレーズによる分解から保護し、その結果、姉妹セントロメア間の接着が解除されずに姉妹染色分体の不分離を引き起こしたことを強く示唆している。

Sgo1 は減数第一分裂においてセントロメア Rec8 の維持に必要である

異常の解析は、体細胞分裂細胞に Rec8 と Sgo1 を強制発現した人為的な系で行ったものである。続いて、Sgo1 が実際に減数分裂過程で Rec8 を保護する機能を果たしているかを調べるために、*sgo1* 遺伝子破壊株(*sgo1Δ*)を作製した。*sgo1Δ* 株の生育はあらゆる条件において完全に正常であり、Sgo1 は体細胞分裂には必要でないことが分かった(データは示さない)。次に、*cen2*-GFP 株を用い、*sgo1Δ* 株の減数分裂において II 番染色体がどのように分配されるかを観察した。ここでは、II 番染色体の相同染色体ペアのうち、片方のみを *cen2*-GFP でマークした。野生株に減数分裂を行わせると、減数第一分裂で相同染色体は分配されるが姉妹染色分体は同じ方向に移動する。したがって、姉妹染色分体上の 2 つの *cen2*-GFP シグナルは同一方向に移動し、続いて起こる第二分裂で姉妹染色分体が分配されるのに伴い、*cen2*-GFP が反対方向に移動する。これにより、減数分

裂終了後に形成される4つの核における *cen2*-GFP のパターンは、(1, 1, 0, 0) となる(図 9a)。ところが、*sgo1*Δ株における減数分裂の染色体分配をこの系により観察すると、~50%の細胞で正常な(1, 1, 0, 0)のパターンが見られるものの、残り~50%の細胞では(2, 0, 0, 0)あるいは(0, 2, 0, 0)のパターンが見られた(図 9a)。このことは、減数第一分裂では正常に姉妹染色分体が同じ方向に移動したものの、第二分裂において、姉妹染色分体の分配が完全にランダムになってしまったことを示している。

減数第二分裂では、第一分裂後も姉妹染色分体のペアがセントロメアで接着されたままに維持されることで、スピンドル微小管が正しい姉妹染色分体ペアを認識することができ、したがってこれらを正確に反対方向に分配することができると考えられている(図 1c)。このことから、*sgo1*Δ株で第二分裂における姉妹染色分体の分配がランダムになったのは、第一分裂後に維持されるべき姉妹セントロメア間の接着が失われていたためと考えられる。この可能性を直接検討するため、*cen2*-GFP でマークした株を減数分裂へと誘導し、減数第二分裂への進行に必要な遺伝子である *mes1*⁺ 遺伝子(Izawa et al., 2005)の変異を用いて減数第二分裂の前に細胞周期を停止させた。これらの細胞を観察すると、野生株では減数第一分裂終了後に形成された2つの核のそれぞれの中で、姉妹染色分体ペアに由来する2つの *cen2*-GFP シグナルは二点が重なってほぼ一点に観察されたことから、姉妹セントロメア間の接着が維持されていることが分かる。ところが、*sgo1*Δ株では、これらの *cen2*-GFP シグナルが高頻度に離れてしまっている様子が観察された(図 9b)。このことは、*sgo1*Δ株では減数第一分裂後に維持されるべき姉妹セントロメア間の接着が失われてしまったことを示している。

以上の結果は、*sgo1*Δ株では減数第一分裂後にセントロメアで残存するべき Rec8 が失われてしまった可能性を支持するものである。そこで、*sgo1*Δ株の減数分裂において Rec8 の染色体上の局在の変化を調べた。

まず、セパレーズの活性化が起こる減数第一分裂後期より前の Rec8 の局在量を定量的に調べるため、二倍体の *rec8⁺-GFP* 株を減数分裂に誘導し、さらに *mei4* 変異を用いて第一分裂前期に細胞周期を同調した細胞を用いて ChIP (chromatin immunoprecipitation) 解析を行った。細胞を固定して DNA を断片化した後、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降を行うことにより、Rec8-GFP が局在していた領域の DNA を精製した。これを鋳型として定量的 PCR を行うことにより、染色体上のどの領域の DNA が精製されたかを調べた。プライマーセットとして、セントロメアの中央領域(*cnt*、*imr*)、セントロメアの周縁ヘテロクロマチン領域(*dh*、*dg*)、染色体腕部(*lys1*、*mes1*)をそれぞれ用いた。すると、減数第一分裂前期において、*sgo1Δ*株では野生株とほとんど変わらない量の Rec8-GFP が染色体のいずれの領域においても局在していることが確認された(図 10a)。このことから、*sgo1Δ*株では減数第一分裂前期における Rec8 の局在には異常がないことが分かった。

次に、減数第一分裂後期における Rec8 の局在量について調べた。減数第一分裂後期に細胞を同調して ChIP 解析を行うことは技術的に困難なので、細胞内の Rec8-GFP のシグナルを顕微鏡下で観察することにより調べることにした。分裂の時期を知るため、CFP を融合したチューブリンを発現させることにより同時にスピンドル微小管を可視化した。減数分裂誘導後、これらのシグナルを観察すると、短いスピンドル微小管を持つ第一分裂中期において、Rec8-GFP は染色体全体に局在しており、この時期に野生株と *sgo1Δ*株との間で Rec8-GFP の局在量に差は見られなかった(図 10b)。これは、図 10a における結果と一致している。ところが、スピンドル微小管が伸長して染色体が分離した時期である第一分裂後期の細胞を観察すると、野生株では染色体腕部の Rec8-GFP が分解されて消失し、セントロメアでドット状の局在が見られる(60%)のに対し、*sgo1Δ*株ではほとんどの細胞でこの時期にセントロメアの Rec8-GFP が消失してしまっていた(3%)(図 10b)。このとき野生株と *sgo1Δ*株の両方で核内に拡散した弱いシグナル

が見られるが、これは染色体に結合していない Rec8-GFP によるシグナルであると考えられる。また、それに続いて起こる第二分裂前中期(2 つの短いスピンドル微小管を持つ細胞)における細胞においても、野生株では Rec8-GFP のセントロメアの局在が見られる(65%)のに対し、*sgo1Δ*株ではこれが失われていた(6%)。

これらの結果から、*sgo1Δ*株では、減数第一分裂後期の前までは Rec8 は正常に染色体上に局在しているが、第一分裂後期にセパレーズが活性化したときに、染色体腕部の Rec8 と共にセントロメアの Rec8 も失われてしまったことが強く示唆された。以上により、Sgo1 は減数第一分裂においてセントロメアの Rec8 をセパレーズによる分解から守り姉妹セントロメア間の接着を維持することにより、続く第二分裂で姉妹染色分体が正しく分配されることを保証していることが明らかになった。

Sgo1 は減数第一分裂特異的にセントロメアに局在する

次に、Sgo1 の生理的な発現と細胞内局在を調べるため、抗 Sgo1 抗体を作製した。野生株と *sgo1Δ*株において減数分裂を窒素源飢餓により誘導し、これらの細胞抽出液に対して抗 Sgo1 抗体を用いてウエスタン解析を行ったところ、35kDa のバンド(Sgo1 は 319 アミノ酸、予測分子量 37.1kDa)が野生株の抽出液で特異的に認識された(図 11a)。その他のバンドは抗体のクロスリアクトであると考えられる。

続いて、減数分裂の進行に伴った Sgo1 のタンパク質量の変化を調べた。*pat1-114* 温度感受性株を同調的に減数分裂へ誘導し、1 時間毎に細胞内の核数を数えることにより減数分裂の進行をモニターした。減数第一分裂は 4-5hr で、第二分裂は 5-6hr で起こっていることを確認した。これらのサンプルについて、抗 Sgo1 抗体を用いてウエスタン解析を行った。すると、Sgo1 は体細胞分裂の細胞(0hr)では発現しておらず、減数第一分裂に先立ち(4hr)特異的に発現が認められ、

その後第一分裂の進行に伴って速やかに分解されていくことが分かった(図 11b)。

次に、Sgo1 の細胞内局在を調べるため、細胞を窒素源飢餓により減数分裂へと誘導し、抗 Sgo1 抗体を用いて免疫染色を行った。また、分裂の時期を知るために、同時に抗チューブリン抗体でも染色を行った。すると、減数第一分裂中期において Sgo1 は核内でドット状に局在し、後期に入って核が分裂するとその局在が著しく減少し、核分裂の進行とともに完全に消失した。第二分裂では、Sgo1 は現れることがなかった(図 11c)。sgo1 Δ 株ではこのようなシグナルは観察されなかったため、これは抗体のクロスリアクトに由来するものではないことが確認された(データは示さない)。

さらにこの結果を確認するため、染色体上の sgo1⁺遺伝子を GFP が融合した sgo1⁺-GFP に置き換え、減数分裂を誘導して Sgo1-GFP の局在を生細胞中で観察した。sgo1⁺-GFP 株においては sgo1 Δ 株で見られたような減数分裂における染色体分配の異常は見られなかったため、Sgo1-GFP は機能的である(データは示さない)。Sgo1-GFP は第一分裂中期にドット状に局在し、第一分裂後期に消失していた(図 11d)。この結果は、抗 Sgo1 抗体による免疫染色の結果と一致している。

減数第一分裂における Sgo1 のドット状の局在がセントロメアである可能性を調べるため、セントロメア上に形成される動原体のタンパク質である Mis6 (Saitoh et al., 1997)に CFP (cyan fluorescent protein)を融合させたタンパク質を発現させて、減数第一分裂においてそれらの局在を比較した。すると、Sgo1-GFP は CFP-Mis6 と密接して局在していたため、Sgo1 はセントロメアもしくはその近傍に局在することが分かった(図 12a)。

続いて、Sgo1 が局在するセントロメアの領域を詳細に知るため、ChIP 法を用いて解析を行った。sgo1⁺-GFP の二倍体細胞を用い、窒素源飢餓により減数分裂を誘導した。ここで、Sgo1 がセントロメアに局在する時期である減数第一分裂中期に細胞を同調するために、第一分裂中期から後期への移行に必要な遺伝子

である *slp1*⁺ (*CDC20* 相同遺伝子)のプロモーターを、減数分裂に発現が抑制される *rad21*⁺のプロモーター(*P_{rad21}*)に置き換え、細胞を減数第一分裂中期に停止させた。これにより、~60%が第一分裂中期にある細胞集団を回収することができた。ChIP を行った後、DNA を検出するための PCR に用いたプライマーセットとして、図 10a で用いたものに加え、セントロメア以外のヘテロクロマチン領域(*mat*; mating-type locus、*TAS*; テロメア)をそれぞれ用いた。その結果、セントロメアの周縁ヘテロクロマチン領域の DNA が特異的に Sgo1-GFP と共沈することが分かった(図 12b)。セントロメア周縁ヘテロクロマチン領域は減数第一分裂における姉妹セントロメア間の接着の維持に重要であることが知られており (Kitajima et al., 2003)、Sgo1 が周縁ヘテロクロマチン領域に局在することは、Sgo1 が Rec8 を保護して姉妹セントロメア間の接着を維持するタンパク質であるという考えと一致する。

これらの結果から、Sgo1 は減数第一分裂特異的なセントロメアタンパク質であり、特にセントロメアの周縁ヘテロクロマチン領域に局在することが分かった。Sgo1 は、時間的にも、空間的にも、まさに Rec8 がセパレーズによる分解から保護されるべきところに存在していると言える。

Sgo1 のセントロメア局在には Bub1 が必要である

分裂酵母における研究から、保存された動原体タンパク質である Bub1 キナーゼは体細胞分裂と減数分裂の分裂期において多機能なタンパク質であり、スピンドルチェックポイントや正常な微小管による動原体の捕捉に必要であり (Bernard et al., 1998)、そして減数第一分裂においてはこれらに加え、セントロメア Rec8 の維持に機能していることが示唆されていた (Bernard et al., 2001)。これらの Bub1 の機能のうち、減数第一分裂におけるセントロメア Rec8 を維持する機能は、Sgo1 の機能と一致している。そこで、Bub1 の機能の一つは Sgo1 を制

御することではないかと考えた。

まず、報告された結果を確認するため、*bub1*⁺ 遺伝子破壊株(*bub1Δ*)において、減数第一分裂後期および第二分裂前中期でセントロメア Rec8 が維持されているかを観察した。すると、確かに *bub1Δ* 株では維持されるべきセントロメア Rec8 が失われており、その程度は *sgo1Δ* 株におけるそれとほとんど変わらなかった(図 10b)。このことから、Bub1 が減数第一分裂におけるセントロメア Rec8 の維持に必要であることが確認された。次に、Bub1 が Sgo1 の局在を制御している可能性を検討するため、*bub1Δ* 株において Sgo1-GFP シグナルを観察した。すると、野生株においては Sgo1-GFP はセントロメアに局在してドット状のシグナルを示すのに対し、*bub1Δ* 株では Sgo1-GFP はセントロメアに局在できず、核内に拡散したシグナルを示していた(図 11d)。減数第一分裂中期に同調した細胞でウエスタン解析を行ったところ、野生株と *bub1Δ* 株の間で Sgo1-GFP のタンパク質の量に大きな差はなかったため、*bub1Δ* 株で Sgo1-GFP の局在が失われたのは Sgo1-GFP の発現や安定性に変化があったためではない(図 11e)。これらのことから、Bub1 は Sgo1 のセントロメア局在に必要であることが明らかになった。これにより、Bub1 は Sgo1 の局在を制御することによってセントロメア Rec8 を維持する役割を果たしていると考えられる。

真核生物において広くシュゴシンと相同な配列を持つタンパク質が見出される

シュゴシンがほかの真核生物に保存されたタンパク質であるかどうかを調べるため、Sgo1 のアミノ酸配列を基に BLAST 検索を行ったところ、分裂酵母 SPAC15A10.15 (Sgo2 と命名)、出芽酵母 YOR073W (ScSgo1 と命名)、アカパンカビ B23G1.060 を有意に Sgo1 と相同性のあるタンパク質として検出できたが、菌類以外の真核生物では有意なものを見出すことはできなかった。そこで、Sgo1、Sgo2、ScSgo1、B23G1.060 の間で特に保存された配列を持つ領域を Block Maker

プログラム(Henikoff et al., 1998)により探索した結果、これらのタンパク質はN末端とC末端にそれぞれ保存された領域を持つことが明らかになった。COILSプログラム(Lupas et al., 1991)により、N末端の保存された領域はcoiled-coil構造をとることが予測され、また、C末端の領域は塩基性アミノ酸に富む領域であった。さらに、MASTプログラムによりこれらの保存された二つの領域をそれぞれN末端とC末端に持つタンパク質を検索した。この結果、ショウジョウバエ、線虫、シロイヌナズナ、マウス、そしてヒトといったあらゆる真核生物のそれぞれにおいて、シュゴシンホモログとして一つあるいは二つの候補を得ることができた(図13)。これらのことから、シュゴシンは広く真核生物に保存されたタンパク質である可能性が示唆された。

驚くべきことに、ショウジョウバエにおけるシュゴシンホモログとしては、Mei-S332が候補に挙げられた。Mei-S332は減数分裂においてセントロメアに局在し、姉妹セントロメア間の接着に必要であることが報告されていた(Kerrebrock et al., 1995)が、他の生物にホモログが見出されないことから、ショウジョウバエに特異的なタンパク質であると考えられてきた。実際、Mei-S332を用いてBLAST検索をしても、今回挙げられたシュゴシンホモログの候補は一つもヒットしない。しかし、今回、複数のシュゴシン様タンパク質の間で共通する2つの領域を見出し、Mei-S332もこれらを併せ持つと分かったことで、Mei-S332は機能的にも保存されたシュゴシンホモログとして定義することができると考えられる。

分裂酵母、シロイヌナズナ、マウス、ヒトにおいては、それぞれ2つずつのシュゴシン様タンパク質が見出された。分裂酵母のもう一つのシュゴシンであるSgo2は、体細胞分裂においても発現しており、分裂期にセントロメアに局在するタンパク質であったが、体細胞分裂においても減数分裂においても姉妹セントロメア間の接着の維持には必要なかった(データは示さない)。

考察

本研究により、減数第一分裂においてセントロメア Rec8 を保護する因子の候補として遺伝学的なスクリーニングから新規タンパク質 Sgo1 を同定した。Sgo1 は実際に減数第一分裂特異的に発現してセントロメアに局在し、第一分裂でセントロメア Rec8 を維持するために必要であった。これらのことから、Sgo1 は減数第一分裂においてセントロメアで Rec8 をセパレーズによる切断から保護する因子であると考えられる。第一分裂の後期においてセパレーズは染色体上の Rec8 を切断しようとするが、セントロメアでは Sgo1 によって Rec8 が保護されているため、染色体腕部の Rec8 のみが切断を受ける。これにより染色体腕部でキアズマを支えていた接着が解除されることにより相同染色体が分離し、一方で姉妹染色分体はセントロメアでつなぎとめられたままになる。そのおかげで第二分裂においてスピンドル微小管が正しい姉妹染色分体ペアを認識してこれらを反対方向に引っ張ることができ、後期に再度活性化したセパレーズが今度はセントロメア Rec8 を切断し、姉妹染色分体の分離を起こすと考えられる(図 14)。

Sgo1 は減数第一分裂の後期の中に分解され、続いて起こる第二分裂では現れない。後期に特異的に APC を活性化する因子である *slp1*⁺ の発現を減数分裂において抑制すると Sgo1 の分解が遅れる(データは示さない)ことから、Sgo1 は APC の下流において分解されていると考えられる。Sgo1 のマウスホモログ mSgo1 およびカエルホモログ XSgo1 は、少なくとも *in vitro* で APC によりユビキチン化されて分解されることが示されている(Salic et al., 2004)。APC はタンパク質内の特異的なアミノ酸配列を認識してそれをユビキチン化することが知られている(Peters, 2002)が、Sgo1 およびそのホモログの中で実際に APC の標的となっている配列はいまだ見出されていない。

Sgo1 が第一分裂後期に分解され、第二分裂では現れないことは、第二分裂後期においてセパレーズがセントロメア Rec8 を切断することを可能にするために重要であると考えられる。しかしながら実際には、Sgo1 を第二分裂において強制的に発現させることによりセントロメアに局在させても、第二分裂後期における姉妹染色分体の分離はほとんど正常に起こる(データは示さない)(Rabitsch et al., 2004)。このことは、減数第一分裂には Sgo1 と協調して働く未知の因子が存在し、それは第二分裂においては発現していないことを示唆している。また、体細胞分裂における Sgo1 と Rec8 の共発現はセントロメア Rec8 の保護を引き起こすのに十分であったことから、そのような未知の因子は体細胞分裂には発現しており、Sgo1 依存的にセントロメア Rec8 の保護に機能するものと考えられる。もしくは、体細胞分裂における Sgo1 の強制発現の量は過剰なものであったので、Sgo1 がより接着の保護に直接的な因子であり、Sgo1 単独を過剰に発現させさえすれば未知の因子の助けがなくとも接着の保護を実現できるのかもしれない。

*sgo1Δ*株の減数分裂では、第一分裂における相同染色体の分配は正常に起こる。これは、第一分裂の染色体分配が異常である *rec8Δ*株の表現型とは異なる。減数第一分裂中期においては、スピンドル微小管が姉妹動原体を同一方向から捕らえて引っ張るが、*rec8Δ*株ではこのとき姉妹動原体が反対方向から捕らえられてしまう。このため、第一分裂後期には姉妹染色分体が反対方向に分離してしまうことが分かっている(Watanabe and Nurse, 1999)。これらのことは、Rec8 は姉妹染色分体を接着させる機能の他に、姉妹動原体が微小管によって捕らえられる方向を決定する(一方向性の姉妹動原体を形成する)役割をも担っており、Sgo1 は後者の機能には関わっていないことを示している。Rec8 は染色体上の特にセントロメア中央領域と周縁ヘテロクロマチン領域に局在するが、セントロメア中央領域の Rec8 を取り除くと第一分裂中期における一方向性の姉妹動原体が形成されなくなる(Yokobayashi and Watanabe, 2005)。その一方で、周縁ヘテロクロ

マチン領域の Rec8 を取り除くと一方向性の姉妹動原体の形成は正常なものの、第一分裂後期において姉妹セントロメア間の接着が維持されなくなってしまう (Kitajima et al., 2003)。これらの結果と、Sgo1 が周縁ヘテロクロマチン領域に特異的に局在することと考え合わせると、セントロメアの Rec8 のうち中央領域の Rec8 は一方向性の姉妹動原体の形成を、周縁ヘテロクロマチン領域の Rec8 は姉妹セントロメア間の接着をそれぞれ担っているものと考えられる。減数第二分裂では、姉妹動原体は反対方向から捕らえられる(二方向性の動原体)。セントロメア中央領域には Sgo1 は局在しないので、第一分裂後期において中央領域の Rec8 はセパレーズにより分解されることが予測されるが、このことは第二分裂までに動原体の方向性を一方向性から二方向性に変換することに寄与しているかもしれない。

Sgo1 のセントロメア局在は Bub1 に依存していた。Bub1 のキナーゼ活性中心に変異を導入した株においても Sgo1 のセントロメア局在が失われる(本研究室の川島による)ので、Bub1 はそのキナーゼ活性によって Sgo1 の局在を制御していると考えられる。Bub1 が Sgo1 を直接リン酸化することでその局在を制御する可能性が考えられたが、少なくとも *in vitro* で分裂酵母 Bub1 は Sgo1 をリン酸化しない(川島)ので、Bub1 は他の因子のリン酸化を介してシュゴシンをセントロメアに局在させている可能性が高い。シュゴシンはセントロメア周縁ヘテロクロマチン領域に局在するので、Bub1 はこの領域に局在するタンパク質である Aurora B 複合体などのタンパク質をリン酸化することで、シュゴシンがセントロメアに局在するための足場を作っているのかもしれない。

Sgo1 の配列を基にしたコンピュータ解析から、さまざまな生物がシュゴシン様のタンパク質を持つことが明らかになった。これらのタンパク質は N 末端側の coiled-coil 領域と C 末端側の塩基性領域で保存された配列を持っていたので、これらの領域が特にシュゴシンの機能に重要である可能性が考えられた。実際

に、これらの保存された配列(N29、I50、S294、P293、R296、K298、L299、R300)に変異を導入すると、いずれも Sgo1 の機能が失われた(本研究室の川島による)。また、ショウジョウバエ Mei-S332 においてもこれらの領域がその機能に重要であることが知られている(Tang et al., 1998)。あらに、Mei-S332 はそれ自身と結合することが知られており、N 末端の coiled-coil 領域がその相互作用に重要であることが示唆されている。分裂酵母 Sgo1 どうしも two-hybrid において結合することを示しており(データは示さない)、シュゴシンタンパク質は N 末端 coiled-coil を介して形成された multimer として機能するのかもしれない。

第五章 ヒトシュゴシンは体細胞分裂における姉妹セントロメア間の接着の保護に必要である

分裂酵母 Sgo1 のアミノ酸配列を基にして、さまざまな生物からシュゴシン様の配列をもつタンパク質を見出したものの、その相同性は極めて限られており、分裂酵母 Sgo1 とショウジョウバエ Mei-S332 を除いては、これらのタンパク質が機能的に保存されたタンパク質であると結論できない。そこで、シュゴシンの機能が広く真核生物で保存されていることを示すため、ヒトにおいて見出された 2 つのシュゴシン様タンパク質について機能解析を行うことにした。ヒトにおいては、シュゴシン様のタンパク質が 2 つ見出され、それぞれ Q9BVA8 と Tripin であった。Q9BVA8 はこれまでまったく解析がなされていないタンパク質であり、Tripin は命名されていたものの、機能的な解析は報告されていないタンパク質であった。Q9BVA8 を hSgo1、Tripin を hSgo2 とし、解析を行うことにした。

結果

hSgo1 と hSgo2 は体細胞分裂に発現し、分裂期においてセントロメアに局在する

データベースにおける hSgo1 と hSgo2 の cDNA は、それぞれ乳がんや子宮がんなどの細胞から調製されたものであった。このことは、これらのタンパク質は体細胞分裂においても発現している可能性を示唆している。

hSgo1 の cDNA は ORF の全長を含んでおらず、5'側が欠けたものであったので、ヒト cDNA ライブラリーを用いて全長の ORF 配列を決定し(「方法と材料」を参照)、これにより hSgo1 は 527 アミノ酸からなるタンパク質であることが予測さ

れた。hSgo2 の cDNA は ORF の全長を含んでおり、1265 アミノ酸からなるタンパク質であることが予測された。hSgo1 および hSgo2 タンパク質を検出するため、それぞれに特異的な抗体の作製を行った。それぞれの組み換えタンパク質をウサギに免疫し、得られた血清からアフィニティ精製によって抗 hSgo1 抗体と抗 hSgo2 抗体をそれぞれ精製した。

hSgo1 は体細胞分裂において発現していることが示唆されていたので、ヒトの培養細胞である HeLa 細胞から抽出液を作製して、抗 hSgo1 抗体を用いてウエスタン解析を行った。その結果、75kDa 付近に複数から成るバンド(hSgo1 の予測分子量は 60kDa)を検出した。またこのバンドは hSgo1 の RNAi (後述)を行った細胞では消失した(図 15a)ことから、真に hSgo1 に対応するものであることが分かった。複数のバンドが重なるように検出されたことから、hSgo1 はリン酸化の制御を受けているのかもしれない。90kDa にも hSgo1 RNAi によって消失するバンドが検出されたが、これは何らかの翻訳後修飾を受けた hSgo1 に由来するものかもしれない。その他のバンドは、抗体のクロスリアクトであると考えられる。このことから、hSgo1 は分裂酵母 Sgo1 とは異なり、体細胞分裂においても発現していることが示された。

次に、hSgo1 の細胞内局在について調べるため、HeLa 細胞において抗 Sgo1 抗体を用いて免疫染色を行った。また、細胞周期の時期を知るために同時に抗 チューブリン抗体で微小管を、Hoechst33342 で DNA を染色した。

図 15b に示すように、分裂期の前期の細胞では、間期には緩んでいた染色体が凝縮し始め、微小管は中心体をコアにしてスピンドル極を形成し始める(pro)。前中期になると、染色体は凝縮して棒状の形態をとり、スピンドル微小管が姉妹染色分体間の接着を感知して正しい姉妹動原体ペアを反対方向から捕らえ(prometa)、中期までに染色体をスピンドルの赤道面に整列させる(meta)。後期になると姉妹染色分体が分離してこれらが反対方向に移動し(ana)、終期に細胞質

分裂が起こって分裂期が終了する(telo)。

hSgo1 は、間期の細胞ではシグナルを示さなかったが、分裂期の前期から中期にかけて染色体上に点状のシグナルを示し、それらは後期の間に消失していった(図 15b)。hSgo1 の RNAi を行った細胞ではこれらのシグナルは観察されなくなったので、これらは真に hSgo1 タンパク質を検出したものである(後述、図 31a)。分裂期における点状の hSgo1 の局在が、セントロメアにおけるものである可能性を検討するため、動原体タンパク質 CENP-A を認識する抗体を用いて、hSgo1 と共に免疫染色を行った。すると、分裂前中期において、hSgo1 は CENP-A の近傍に局在していた。また、中期において明らかのように、hSgo1 は 2 つの CENP-A シグナルの間に挟まれるように局在していることが分かった(図 16a)。ヒトの細胞においては、分裂中期に、姉妹動原体ペアがスピンドル微小管によって反対方向に引っ張られることで、これらは 2 点からなるダブルットとして観察される。このことから、hSgo1 が 2 つの CENP-A シグナルに挟まれるように局在していたことは、hSgo1 は姉妹動原体ペアの間、すなわちインナーセントロメアと呼ばれる部位に局在していることを強く示唆している(図 16c)。この可能性について確かめるため、インナーセントロメアに局在するタンパク質である Aurora B と共に hSgo1 を免疫染色した。すると、分裂前中期と中期のいずれにおいても hSgo1 と Aurora B は一致した局在を示した(図 16b)。これらの結果から、hSgo1 は体細胞分裂における分裂前期から中期までインナーセントロメアに局在し、後期に消失していくということが明らかになった。

次に、hSgo2 についても同様に発現と局在について調べた。HeLa 細胞抽出液を用いてウエスタン解析を行ったところ、抗 hSgo2 抗体によって~190kDa のバンド(hSgo2 の予測分子量は 145kDa)が検出され、これは hSgo2 の RNAi(後述)を行った細胞では消失していた(図 17a)。さらに、免疫染色により細胞内局在を観察すると、hSgo2 は、hSgo1 と同様に、間期の細胞ではシグナルを示さず、分裂

期の前期から中期までに染色体上に点状のシグナルを示し、後期の間に消失していた(図 17b)。hSgo2 の RNAi によりこれらのシグナルは観察されなくなったので、これらは真に hSgo2 の局在を示すものである(後述、図 31b)。動原体タンパク質 CENP-A と hSgo2 の局在を比較すると、分裂前中期において、hSgo2 は 2 つの CENP-A シグナルの間に挟まれるように局在しており、hSgo1 と同じくインナーセントロメアに局在していることが分かった(図 18a)。さらに、分裂中期になると、hSgo2 はインナーセントロメアのみならず動原体部位にまでその局在を広げているように見受けられた。この結果を確認するため、インナーセントロメアタンパク質である Aurora B と共に hSgo2 を免疫染色した。すると、分裂前中期には hSgo2 は Aurora B と一致した局在を示したが、分裂中期には、hSgo2 は Aurora B よりも動原体側にその局在を広げていた。(図 18b)。これらのことから、hSgo2 も hSgo1 と同様に体細胞分裂において発現し、分裂前中期にインナーセントロメアに、中期にインナーセントロメアに加えてより動原体に近い部位に局在し、後期に消失するということが分かった。中期において局在部位が広がるのは、hSgo2 はスピンドル微小管によって姉妹動原体が反対方向に引っ張られることを感知し、その局在を移動させているのかもしれない。

分裂中期までセントロメアに局在し、後期で消失するという hSgo1 と hSgo2 の局在は、分裂酵母の減数第一分裂における Sgo1 の局在パターンと類似性が見られる。また、ヒトにおけるインナーセントロメアは、分裂酵母におけるセントロメア周縁ヘテロクロマチン領域に対応し、姉妹セントロメア間の接着に重要である(Bernard et al., 2001; Hauf et al., 2001; Nonaka et al., 2002)と考えられており、この点でも hSgo1 および hSgo2 と分裂酵母 Sgo1 はよく似た特徴を持つと言える。また、ショウジョウバエ Mei-S332 も体細胞分裂においてインナーセントロメアに局在することが知られており(Blower and Karpen, 2001)、これらのことは hSgo1 と hSgo2 が真にシュゴシンのホモログであることを支持している。

hSgo1 および hSgo2 の RNAi によってスピンドルチェックポイント依存的な分裂期の停止が引き起こされる

次に、hSgo1 と hSgo2 の分裂期における機能について解析するため、RNAi を用いて hSgo1 のノックダウンを行うことにした。効率的にノックダウンできる siRNA の標的配列を予測し、その標的配列に対するセンスおよびアンチセンスの 23 ベース RNA をアニールさせて siRNA duplex を形成させた。これらの siRNA を HeLa 細胞に導入して 2 日間培養した後、細胞を回収してウエスタン解析を行ったところ、hSgo1 および hSgo2 の発現がそれぞれ著しく抑制されていることが確認できた(図 15a、図 17a)。hSgo1 RNAi は hSgo2 のセントロメア局在量にほぼ影響せず(後述、図 31b)、また hSgo2 RNAi はウエスタン解析において hSgo1 のタンパク質量にほぼ影響しない(図 17a)ことから、これらの siRNA はそれぞれ特異的に hSgo1 と hSgo2 を認識していると考えられる。

続いて、hSgo1 もしくは hSgo2 を RNAi したことによる細胞への影響を調べた。RNAi を行って 2 日間培養後、DNA を染色することで分裂期にある細胞の割合をカウントした。すると、コントロールの細胞では 3%の細胞が分裂期にあったのに対し、hSgo1 RNAi を行った細胞ではその割合が 17%にまで上昇していた(図 19a)。これらの細胞について免疫染色を行い、スピンドル微小管と DNA を観察したところ、コントロールでは中期までに染色体が赤道面に整列するが、hSgo1 RNAi 後の細胞では、赤道面に整列できない染色体を持つ、前中期の細胞が多く観察された(図 19a&b)。hSgo2 RNAi を行った細胞でも、hSgo1 RNAi の場合よりも割合が小さいものの、同様に分裂期の細胞が蓄積する表現型が見られ(10%)、それらは主に前中期と中期の細胞であった(図 19a&b)。これらのことから、hSgo1 もしくは hSgo2 を失った細胞では、分裂期に異常をきたし細胞周期が停止もしくは遅延することが分かった。

細胞は、分裂期に染色体を赤道面に整列させる過程に異常を感知すると、スピンドルチェックポイントと呼ばれる機構により細胞周期を停止させることが知られている。そこで、hSgo1 RNAi と hSgo2 RNAi によって見られた分裂期の細胞の蓄積が、スピンドルチェックポイントによる細胞周期の停止によるものである可能性を考えた。これについて検討するため、スピンドルチェックポイントの構成因子である Mad2 を RNAi することで、hSgo1 RNAi および hSgo2 RNAi で見られた分裂期の停止が抑圧されるかを調べた。Mad2 の siRNA は、すでに効率的な抑制効果が報告されている配列を使用した(Luo et al., 2004)。hSgo1 もしくは hSgo2 と Mad2 を同時に RNAi すると、hSgo1 もしくは hSgo2 単独の RNAi で見られた分裂期の細胞の蓄積が見られなくなった(図 19a)。このことから、hSgo1 および hSgo2 を RNAi した細胞では、分裂中期までに何らかの異常が生じ、スピンドルチェックポイントを活性化して細胞周期を停止してしまうということが明らかになった。hSgo1 と hSgo2 の RNAi で一部の細胞しか分裂期に停止しなかったのは、RNAi を細胞周期が非同調的な細胞に対して行ったこと、RNAi の効果が一過的かつ部分的であること、もともと翻訳されていたタンパク質が細胞内に残存していたことなどが原因として考えられる。

hSgo1 および hSgo2 は分裂前期から前中期における姉妹セントロメア間の接着の維持に必要である

それでは、hSgo1 と hSgo2 の体細胞分裂における機能とは何だろうか。哺乳動物における体細胞分裂では、分裂期の前にはコヒーシン複合体が姉妹染色分体を全長にわたって接着させているが、分裂前期から前中期の間にコヒーシン複合体は染色体腕部から解離され、腕部の接着の多くが解除されることが知られていた(Losada et al., 1998; Losada et al., 2002; Sumara et al., 2002)。一方で、セントロメアではコヒーシン複合体は解離せずに残存し、姉妹セントロメア間の接着

を維持して姉妹染色分体ペアをつなぎとめる。セントロメアに残った強固な接着のおかげで、スピンドル微小管は正しい姉妹染色分体ペアを認識してこれらを動原体で反対方向へ引っ張り、中期までに赤道面へ整列させることができる。後期になると、セントロメアに残ったコヒーシン複合体の Rad21 サブユニットを、この時期に特異的に活性化したセパレーズが切断して姉妹染色分体を分離させる(図 20)(Hauf et al., 2001)。そこで、分裂酵母 Sgo1 が減数第一分裂後期において Rec8 コヒーシンを保護していたのと同様に、ヒト hSgo1 と hSgo2 は、体細胞分裂の分裂前期から前中期においてセントロメアでコヒーシン複合体を解離から保護し、姉妹セントロメア間の接着を維持しているのではないかと考えた。

この可能性について検討するため、hSgo1 および hSgo2 の RNAi をそれぞれ行った後、分裂前中期における染色体像を観察することにした。RNAi を行って 2 日後に分裂期の細胞を mitotic shake-off によって回収し、スライドガラス上で染色体をスプレッドしてギムザ染色を行った。コントロールでは、ほとんどの分裂前中期の細胞で「X」字型の染色体像が見られた。これは、姉妹染色分体間の接着が染色体腕部では緩んでいるものの、セントロメアでは強固に維持されていることを示している。これに対し、hSgo1 RNAi を行った細胞では、分裂前中期の 70%の細胞で姉妹染色分体が完全に分離してばらばらになっており(sisters separated、赤)、22%の細胞で分離しかけている様子(centromeric cohesion lost, sisters still associated、ピンク)が観察された(図 21)。また、hSgo2 RNAi を行った細胞でも、hSgo1 RNAi の場合よりも頻度は低かったものの、41%の細胞で姉妹染色分体が分離していた(考察を参照)。このことから、hSgo1 と hSgo2 は分裂前中期における姉妹セントロメア間の接着の維持に必要であることが分かった。

次に、hSgo1 についてさらに詳細な解析を行うことにした。hSgo1 RNAi において、姉妹セントロメア間の接着が失われたのは維持されるべきコヒーシン複合体が失われたためである可能性を検討するため、これらの細胞においてコヒ

ーシンサブユニット Rad21 の染色を行うことにした。この目的のため、Rad21 に myc タグが付加された myc-Rad21 を発現誘導可能な HeLa 細胞(Hauf et al., 2001)を用いた。この myc-Rad21 は機能的であることが示されている。発現を誘導した後に hSgo1 の RNAi を行い、2 日後に分裂期の細胞を回収して抗 myc 抗体で染色を行った。また、動原体を ACA 抗体(順天堂大、高崎博士より供与)により同時に染色した。すると、コントロールでは前中期の染色体で myc-Rad21 がセントロメアに残存している様子が観察された(“centromeric enrichment”, 63%)。myc-Rad21 が染色されなかった細胞(“no staining”, 24%)は myc-Rad21 の発現誘導がされなかったものであり、染色体腕部にも染色が見られた細胞(13%、 “arm staining”)は分裂前中期の中でも初期の細胞を反映していると思われる。これに対し、hSgo1 を RNAi した細胞では、セントロメアに残存した myc-Rad21 を持つ細胞がほとんど見られなかった (3%) (図 22)。このことから、hSgo1 は分裂前期と前中期の間にセントロメアのコヒーシン複合体を維持するために必要であることが分かった。

Bub1 は hSgo1 および hSgo2 のセントロメア特異的な局在に必要である

分裂酵母 Sgo1 は、減数第一分裂において Bub1 に依存してセントロメアに局在していた(図 11d)。そこで、ヒト hSgo1 と hSgo2 も同様にヒトにおける Bub1 ホモログによってそれらの局在が制御されている可能性を考えた。ヒト Bub1 はやはり分裂期に動原体に局在し、マウス Bub1 のドミナントネガティブを用いた実験からスピンドルチェックポイントに必要であることが示唆されていた(Taylor and McKeon, 1997)が、ヒト Bub1 の RNAi による解析ではスピンドルチェックポイントへの寄与が見られず、むしろ分裂前中期から中期までに効率的に染色体を赤道面へ整列させるのに必要であるとの報告がなされていた(Johnson et al., 2004)。これらのことから、Bub1 は分裂期の動原体において何らかの機能

を果たしていると考えられたものの、その詳細については不明であった。

Bub1 の mRNA を特異的に認識する siRNA を設計し、RNAi を行った。Bub1 RNAi を行って 2 日後、抗 Bub1 抗体を用いてウエスタン解析を行ったところ、Bub1 の発現が抑制されていることが確認できた(図 19c)。そこでまず、Bub1 RNAi を行うことによって分裂期の停止や遅延が引き起こされるかを調べた。Bub1 RNAi を行って 2 日後に、染色体を Hoechst33342 で染めて観察することにより分裂期にある細胞の割合をカウントした。すると、コントロールでは 3%の細胞が分裂期にあったのに対し、Bub1 RNAi ではその割合が 9%にまで上昇していた(図 19a)。また、これらの分裂期の細胞の中では、特に赤道面に整列できない染色体を持つ前中期の細胞が多く観察された。これらの結果は他のグループから報告された Bub1 RNAi の結果とほぼ一致している(Johnson et al., 2004)。ただし、hSgo1 や hSgo2 RNAi では多くの染色体が整列に失敗した細胞が多かったのに対し、Bub1 RNAi では少数の染色体のみが整列に失敗した細胞が多く見られた(図 19b)。

次に、hSgo1 の局在が Bub1 RNAi によって変化するかを調べるため、Bub1 RNAi 後の細胞を固定し、抗 hSgo1 抗体および抗 Bub1 抗体によって免疫染色した。すると、コントロールでは Bub1 は動原体、hSgo1 はセントロメアを示すドット状のシグナルが観察されたが、Bub1 RNAi を行った細胞では hSgo1 はそのドット状の局在を失い、その代わりに染色体全長にわたって弱く局在していた(図 23a)。このことから、Bub1 は hSgo1 のセントロメアへの局在化に必要であることが明らかになった。続いて、hSgo2 の局在について同様に調べた。コントロールでは、hSgo2 はセントロメアを示すドット状のシグナルが観察されたが、Bub1 RNAi ではそれらのシグナルが消失していた(図 23b)。このとき、hSgo2 は hSgo1 のように染色体全長にわたって弱く局在することはなかった。このことから、Bub1 は hSgo2 の局在に必要であることが分かった。これらとは逆に、Bub1 の動原体局在は hSgo1 もしくは hSgo2 に依存していなかった(データは示さない)。こ

これらの結果は、Bub1 はシュゴシンのセントロメアへの局在を促進する役割を持ち、これは分裂酵母とヒトの間で保存された機能であることを示している。hSgo1 は Bub1 RNAi を行うと染色体全長にわたって弱く局在したことから、hSgo1 はもともと染色体上に局在する能力を持っているのかもしれない。そして、Bub1 は hSgo1 を染色体腕部に局在しないように、またセントロメアに濃縮されるように制御していると考えられる。

Bub1 RNAi を行った細胞ではセントロメア特異的な接着の保護が失われる

Bub1 RNAi を行った細胞では、ヒト hSgo1 および hSgo2 の局在に異常があったことから、分裂前期から前中期における姉妹セントロメア間接着の保護にも異常があることが考えられた。そこで、Bub1 RNAi を行って 2 日後に分裂期の細胞を回収し、分裂前中期における染色体をギムザ染色により観察した。コントロールでは、ほとんどの細胞においてセントロメアで接着が維持され、染色体腕部では緩んだ「X」字型の染色体像が見られた。これに対し、Bub1 RNAi を行った細胞では、39%の細胞で染色体腕部の接着が緩まずに姉妹染色分体がタイトに接着してしまっているもの(tight cohesion all along chromosomes、青)が見られ、また 28%の細胞でセントロメアの接着が緩み、しかし姉妹染色分体のペアは保たれているもの(centromeric cohesion lost, sisters still associated、ピンク)が見られた(図 21)。このことから、Bub1 RNAi を行った細胞では、染色体腕部において接着の解除が起こりにくく、一方でセントロメアにおいては維持されるべき接着が失われやすいということが考えられた。

このことをさらに確かめるため、次の実験を行った。分裂前中期に細胞を停止させると、染色体が過凝縮し、それに伴って染色体腕部における接着の解除がさらに進行することで、「X」字型の染色体像をより明確に観察できるようになる。そこで、分裂期の細胞に微小管の重合阻害剤であるノコダゾールを加え

ることでスピンドルチェックポイントを活性化させ、分裂前中期に細胞を 4 時間停止させた。このとき、Bub1 RNAi を行った細胞はノコダゾールの存在下で分裂前中期に停止し続けた(データは示さない)ので、少なくとも本研究における Bub1 RNAi の条件でスピンドルチェックポイントは正常に機能していると考えられる。4 時間の停止後、細胞を回収して染色体をスプレッドし、ギムザ染色した。コントロールでは 98%の細胞においてセントロメアで接着が維持される一方、腕部では染色体が開いて明確な「X」字型の染色体像をとっていた。しかし、Bub1 RNAi を行った細胞においては、「X」字型の染色体像をとる細胞の割合は 19%にとどまり、64%の細胞では依然として染色体の腕部が開かず、また一方で、セントロメアで維持されるべき接着が緩んでいた(図 24a)。残りの 17%は染色体腕部の接着が緩まずに姉妹染色分体が全長にわたってタイトに接着してしまっているものであった。

さらに、セントロメア間の接着についてより定量的に調べるため、これらの細胞について染色体をスプレッドし、ACA 抗体を用いて動原体を免疫染色した。スプレッドされた染色体上には 2 つの ACA シグナルが対を成したダブレットが観察され、これは姉妹動原体ペアを示している。コントロールでは、姉妹動原体ペアが近接しており、姉妹セントロメア間の接着が維持されていることを示していたが、これに比べ Bub1 RNAi を行った細胞においては、姉妹動原体ペアの距離が長くなっているように見受けられた(図 24b)。そこで、姉妹動原体ペアの距離を各染色体について計測して定量化したところ、コントロールに比べ Bub1 RNAi ではおよそ 0.2 μ m 有意に長くなっていることが分かった(図 24c)。このことから、Bub1 RNAi を行った細胞では姉妹セントロメア間の接着が弱くなっていることが確認された。

次に、Bub1 RNAi の細胞で見られた染色体接着の制御の異常が、コヒーシ複合体の局在の異常によるものである可能性を検討した。そのために、

myc-Rad21 を発現する HeLa 細胞について Bub1 RNAi を行い、抗 myc 抗体と ACA 抗体を用いて免疫染色を行った。すると、Bub1 RNAi を行った細胞ではコントロールに比べ、染色体腕部にも myc-Rad21 の局在が見られる細胞の割合が著しく上昇していた(図 22)。このことから、Bub1 RNAi を行った細胞では分裂前期から前中期にかけて染色体腕部におけるコヒーシン複合体が解離しにくくなり、それゆえ腕部の接着が解除されにくくなると考えられた。

これらの結果から、Bub1 RNAi を行うと、分裂前期から前中期において染色体腕部のコヒーシン複合体が解離しにくくなり、解除されるべき染色体腕部の接着が維持され、また一方で、強固に維持されるべきセントロメアでの接着が弱まるということが明らかになった。

Bub1 RNAi における染色体腕部での接着の維持は hSgo1 RNAi により解消される

Bub1 RNAi を行った細胞では、hSgo1 が染色体全長にわたって弱く局在するようになり、hSgo1 および hSgo2 のセントロメア局在が失われた(図 23a&b)ことから、このことが姉妹セントロメア間の接着の維持が弱くなった原因と考えられた。一方で、染色体腕部においては接着が解除されにくくなるが、これについては、弱く染色体全長にわたって局在した hSgo1 が異所的にコヒーシン複合体を保護してしまったことによる可能性が考えられた。もしその考えが正しければ、Bub1 RNAi における染色体腕部での接着の維持は、さらに hSgo1 RNAi を行うことにより解消されるはずである。

この可能性を検討するため、Bub1 と hSgo1 を同時に RNAi した後、分裂期の細胞について染色体をスプレッドし、ギムザ染色により染色体像を観察した。すると、Bub1 hSgo1 RNAi を行った細胞においては、80%の細胞では姉妹染色分体が完全に分離しており、18%の細胞ではセントロメア間の接着が失われて姉妹

染色分体が離れかけていた(図 21)。Bub1 単独の RNAi で見られた、姉妹染色分体間が全長にわたってタイトに接着しているような細胞は見られなかった。このことから、Bub1 RNAi を行った細胞で染色体腕部の接着が維持されたのは、誤って染色体腕部に局在した hSgo1 が異所的にコヒーシン複合体を保護したためであると考えられた。

考察

hSgo1 と hSgo2 の解析結果から、hSgo1 と hSgo2 は体細胞分裂の分裂前期から前中期において、セントロメアでコヒーシン複合体を維持し、分裂中期まで姉妹セントロメア間を接着させたままにする役割を持つと考えられた(図 25)。hSgo1 と hSgo2 を RNAi した細胞では、前期から前中期にかけて染色体からすべてのコヒーシン複合体が解離してしまうことで、姉妹染色分体が早期に分離してしまい、その結果、スピンドル微小管が正しい姉妹染色分体のペアを認識できなくなるために、Mad2 を介したスピンドルチェックポイントが活性化して細胞周期が停止してしまうことが分かった。一方、Bub1 RNAi を行った細胞で、染色体腕部においてコヒーシン複合体が解離されなくなり、そのため腕部の接着が解除されにくくなっていた。これは、hSgo1 が染色体全長にわたって弱く局在し、異所的にコヒーシン複合体を解離から保護したためであることが示唆された。また、セントロメアでは維持されるべき接着が弱まっており、これは hSgo1 のセントロメアにおける局在量が減少したことと、hSgo2 のセントロメア局在が失われたことが原因であると考えられた(図 25)。

hSgo1 RNAi 後の分裂期の細胞のうち 92%の細胞で姉妹セントロメア間の接着が失われていたことから、hSgo1 RNAi による分裂前中期の停止はほとんどが姉妹セントロメア間の接着が失われたことが原因であると考えられたが、hSgo2

RNAi による分裂期の停止はその半数以上がセントロメア間の接着の欠損を伴っていなかった(図 21)。これには、hSgo2 が姉妹セントロメア間の接着の維持の他にも何らかのセントロメア機能を担っているという可能性と、もしくは、hSgo2 RNAi では分裂前中期に入った時点では姉妹セントロメア間の接着が弱まっているものの完全に失われておらず、しかしながら接着が弱いためにスピンドルチェックポイントを活性化し、それによる分裂期停止の間に徐々に接着が失われていくという可能性が考えられる。後者の可能性は、hSgo2 RNAi で見られる姉妹セントロメア間の接着を失った細胞のほとんどは過凝縮した染色体を持つ (図 21、データは示さない) ことによって支持される。これに対し、hSgo1 RNAi では過凝縮していない染色体でも姉妹染色分体の分離が見られる(図 21)。これらのことから、hSgo2 よりも hSgo1 がより直接的に姉妹セントロメア間の接着の保護に機能しているのかもしれない。

Bub1 RNAi を行うと、hSgo1 は染色体全長にわたって弱く局在するようになり、染色体腕部で異所的な接着の保護を引き起こすと考えられた。このとき、hSgo2 はセントロメアにも染色体腕部にも局在が見られない。このことから、hSgo1 は hSgo2 がなくても、少なくともある程度、接着の保護を実行できるのかもしれない。しかしながら、Bub1 RNAi における異所的な接着の保護に hSgo2 も寄与している可能性を完全には否定できず、これを確かめるためには Bub1 と hSgo2 を同時に RNAi した後の接着の保護について調べる必要がある。

本研究における Bub1 RNAi においては、スピンドルチェックポイントの機能には影響が見られず、これは報告された Bub1 RNAi の表現型と一致していた (Johnson et al., 2004) が、この後、Bub1 はスピンドルチェックポイントの機能と微小管が染色体を赤道面に効率的に整列させるための機能の両方を併せ持つことが示され、RNAi による完全な Bub1 の除去は両方の機能に欠損を引き起こすが、部分的な Bub1 の除去は染色体を整列させる機能のみに異常をきたし、この

ときはむしろスピンドルチェックポイントは活性化されるということが示唆された(Meraldi and Sorger, 2005; Tang et al., 2004)。したがって、Bub1 のスピンドルチェックポイント以外の機能の一つが、hSgo1 および hSgo2 を介した姉妹セントロメア間の接着の維持であり、本研究における Bub1 RNAi ではこれを欠いたために染色体が効率的に整列できず、スピンドルチェックポイントをむしろ活性化し、分裂期の細胞の蓄積を引き起こしたと考えられる。

hSgo1 と hSgo2 は体細胞分裂に発現していたが、これは、減数分裂特異的に発現する分裂酵母 Sgo1 とは異なる点である。哺乳動物の体細胞分裂における、分裂前期と前中期で染色体腕部の接着が解除されセントロメアでは維持されるという現象は、分裂酵母ではほとんど起こらないと考えられている。このため、分裂酵母の体細胞分裂には hSgo1 や hSgo2 のようなコヒーシンを保護する機能が必要ないと考えられる。このことが、分裂酵母 Sgo1 が減数分裂特異的な因子に特化した原因であろう。一方、ショウジョウバエ Mei-S332 は、hSgo1 や hSgo2 のように体細胞分裂にも発現している。ショウジョウバエの体細胞分裂では中期までに染色体が X 字型の像をとるので、姉妹セントロメア間接着の保護の機構が存在すると考えられるが、このとき Mei-S332 は姉妹セントロメア間の接着の維持に必須ではないものの、それを強く保つことに寄与していることが示唆されている(LeBlanc et al., 1999)。ショウジョウバエでは姉妹セントロメア間の接着の保護にはシュゴシン以外の因子も関与し、それらがより必須な機能を果たしているのかもしれない。

本研究においては、癌細胞由来である HeLa 細胞において hSgo1 および hSgo2 タンパク質の解析を行ったが、正常細胞における解析は行っていない。ただし、hSgo1 と hSgo2 が細胞分裂における染色体分配の極めて基本的な機構に必須であることから、正常細胞においても hSgo1 と hSgo2 は発現して機能していると考えられる。hSgo1 は、乳癌抗原 NY-BR-85 として血清学的にも同定されており、

ヒトの乳癌の 90%で 3-11 倍の過剰発現をしていることが報告されている (Scanlan et al., 2001)。癌細胞において過剰に発現した hSgo1 は姉妹セントロメア間の接着に影響を及ぼして異常な染色体分配を引き起こすことで、癌細胞によく見られる特徴である染色体数異常に関与しているかもしれない。

第四章において示したように、分裂酵母 Sgo1 は減数第一分裂においてセパレースを阻害すると考えられるのに対し、ヒト hSgo1 と hSgo2 はセパレースを阻害しないと考えられる。なぜなら、セパレースが活性化する分裂中期から後期への移行において、hSgo1 と hSgo2 はセントロメアに局在しているにもかかわらず、セパレースはセントロメアの Rad21 を切断するからである。この分裂酵母 Sgo1 とヒト hSgo1 および hSgo2 の違いについて考察するためには、シュゴシンによる姉妹セントロメア間接着の保護における分子メカニズムを知る必要がある。第六章では、シュゴシンが機能する分子メカニズムを理解することを目指す。

第六章 ヒトシュゴシンは PP2A と協同して姉妹セントロメア間の接着を保護する

これまでに、分裂酵母 Sgo1 は減数第一分裂後期において Rec8 コヒーシンをセパレーズによる切断から保護することで、また、ヒトホモログ hSgo1 は体細胞分裂前中期において Rad21 コヒーシン複合体を解離から保護することで、姉妹セントロメア間の接着を維持することを示した。しかしながら、シュゴシンがどのような分子メカニズムでコヒーシン複合体を保護しているのかについては、分かっていなかった。

結果

hSgo1 は B56 サブユニットを含む PP2A と複合体を形成する

シュゴシンが機能する分子メカニズムについて解析するため、hSgo1 と物理的に相互作用するタンパク質を探索することにした。この目的のため、hSgo1 の N 末端に FLAG タグを付加した FLAG-hSgo1 を発現できるプラスミドを作製した。産総研・夏目研究室との共同研究により、FLAG-hSgo1 を 293T 細胞に発現させた後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い、共沈したタンパク質を mass spectrometry (MS)解析により決定した。

検出されたタンパク質の一覧を図 26a に示す。これらの検出されたタンパク質のうち、セリン-スレオニンプロテインフォスファターゼ 2A(PP2A)について着目した。PP2A は触媒サブユニット PP2A-C、構造サブユニット PP2A-A、そして基質特異性や局在を制御する可変的な B サブユニット(PP2A-B/B55、-B'/B56、-B''、-B''')のいずれか) の3つのサブユニットから成る複合体である(Janssens and Goris, 2001)。複合体形成には PP2A-C と PP2A-B のそれぞれが構造的土台となる

PP2A-A に直接結合することが知られている(図 27c)。今回の MS 解析により、PP2A-C と PP2A-A に加え、複数ある B サブユニットの中から PP2A-B56 のアイソフォーム(α , β , γ , δ , ϵ)が特異的に検出されたが、PP2A-B56 以外の B サブユニットはいずれも検出されなかった。このことは、PP2A-B56 を含む PP2A 複合体が hSgo1 と特異的な物理的相互作用をしていることを示している。

この結果は、本研究室の石黒によって、HeLa 細胞において内在的な hSgo1 を抗 hSgo1 抗体で免疫沈降すると PP2A-A、PP2A-C、PP2A-B56 α が共沈し、他のタイプの B サブユニットである PP2A-B55 は共沈しないことによって確認された(図 26b)。PP2A-A、-C、-B56 α のうち最も効率的に hSgo1 と共沈したのは PP2A-B56 α であり、このことは hSgo1 が PP2A-B56 α を介して PP2A と相互作用する可能性を示唆している。また、hSgo2 を抗 hSgo2 抗体により免疫沈降すると、PP2A-A、PP2A-C が共沈することが見出されたが、PP2A-B56 α は検出されなかった(図 26c)。hSgo2 は PP2A-B56 以外のサブユニットを介して PP2A と相互作用し、その複合体には PP2A-B56 は含まれないか、もしくは極めて量が少ないと考えられる。これらの実験において、hSgo1 と hSgo2 の共沈は検出されなかった(データは示さない)ので、hSgo1 と hSgo2 はそれぞれ独立な複合体を形成していると考えられる。

さらに、yeast two-hybrid 法を用いて、それぞれのタンパク質の間での相互作用の有無を検討した。その結果、hSgo1 は PP2A-A β と陰性であったが、PP2A-B56 δ と陽性を示した(図 27a)。このことは、PP2A-B56 と hSgo1 が直接的に相互作用をすることを示唆している。また、hSgo1 は PP2A-A β と陰性であったが、同じ細胞に PP2A-B56 δ をさらに発現させることで陽性に転じた(図 27b)。これらのことは、hSgo1 は PP2A-B56 との直接的な相互作用を介して PP2A 複合体と結合する(図 27c)ことを示唆しており、この考えは hSgo1 による免疫沈降における結果とも一致している。また、hSgo2 は、PP2A-B56 δ とは陰性であったが、PP2A-A β

と弱いながらも陽性を示した(図 27a)ことから、hSgo2 は PP2A-A と直接的に相互作用するのかもしれない。

B56 サブユニットを含む PP2A は分裂期においてセントロメアに局在する

PP2A が hSgo1 と複合体を形成するならば、これらのサブユニットは hSgo1 と同じく分裂期のインナーセントロメアに局在するはずである。そこで、HeLa 細胞において抗 PP2A-B56 α 抗体と抗 hSgo1 抗体を用いて免疫染色を行った。すると、PP2A-B56 α は分裂期の前期から中期まで hSgo1 とセントロメアに共局在し、hSgo1 と同様に後期で消失することが分かった(図 28a)。さらに、分裂期の染色体をスプレッドし、PP2A-B56 α を染色すると同時に ACA 抗体により動原体を染色して、PP2A-B56 α の詳細な局在位置を決定した。PP2A-B56 α は、hSgo1 と同様に、姉妹動原体ペアに挟まれるようにインナーセントロメアに局在していた(図 28b)。続いて、PP2A-A と PP2A-C についても免疫染色を試みたが、これらは分裂期の細胞において細胞全体に拡散しており、染色体上の局在を決定するのは困難であった(データは示さない)。そこで、分裂期の細胞を 0.1% Triton X-100-PBS により pre-extract し、その後固定して免疫染色を行った。すると、PP2A-A と PP2A-C はいずれも分裂前中期にセントロメアとスピンドル極(矢頭)に局在し、後期になるとセントロメア局在は消失することが分かった(図 28c&d)。これらの結果から、分裂期において PP2A-B56 サブユニットを含む PP2A 複合体は hSgo1 とセントロメアに共局在することが分かった。細胞全体およびスピンドル極に局在する PP2A-A と PP2A-C は、PP2A-B56 以外の B サブユニットと PP2A 複合体を形成していると考えられる。

PP2A を機能破壊すると姉妹セントロメア間の接着の保護が失われる

次に、hSgo1 および hSgo2 の機能である姉妹セントロメア間の接着の保護に

PP2A が必要であることを調べるため、PP2A の機能を RNAi によりノックダウンすることを試みた。PP2A のサブユニットのうち、hSgo1 に特異的なサブユニットである PP2A-B56 を RNAi することが理想的と思われたが、PP2A-B56 は 5 つの異なるアイソフォームが存在するため、これらをすべて同時に RNAi することは技術的に困難と考えた。そこで、2 つのアイソフォームしか持たない PP2A-A サブユニットを RNAi によりノックダウンすることにした。PP2A-A α および β に対する siRNA を作製し、RNAi を行って 2 日後、抗 PP2A-A 抗体(α と β の両方を認識する)、抗 hSgo1 抗体、抗 hSgo2 抗体、コントロールとして抗チューブリン抗体を用いてウエスタン解析を行ったところ、PP2A-A のタンパク質量の減少が見られ、hSgo1 および hSgo2 のタンパク質量には変化がなかった(図 29a)。続いて、PP2A-A RNAi による分裂期への影響を調べるため、分裂中期まで細胞質内に局在し、後期に分解されて消失するタンパク質であるサイクリン B をマーカーとして用い、また DNA を染色することによって、細胞が分裂期のどの時期にあるかを判別してその数をカウントした。すると、コントロールでは 2%のみの細胞が分裂前中期にあったのに対し、PP2A-A RNAi を行った細胞では 15%の細胞が分裂前中期に留まっていた(図 29b)。さらに分裂期における異常について詳しく調べるため、抗チューブリン抗体を用いてスピンドル微小管を抗体染色したところ、PP2A-A RNAi を行った細胞では、分裂期に染色体を赤道面に整列させることができず、またスピンドル極が過剰に形成されていた(図 29c)。これらの PP2A-A RNAi による表現型は、PP2A の阻害剤であるオカダ酸を加えたときの表現型と一致しており(Van Dolah and Ramsdell, 1992; Vandre and Wills, 1992)、今回見られた RNAi の表現型が確かに PP2A の機能をノックダウンしたことによるものであることを示している。

次に、PP2A-A を RNAi した細胞において、hSgo1 や hSgo2 の RNAi と同様に、分裂前中期に姉妹染色分体の早期分離が見られるかを調べた。RNAi した分裂期

の細胞を回収し、微小管重合(スピンドル形成)阻害剤であるノコダゾールで4時間処理した後、染色体をスプレッドして染色体像を観察した。ノコダゾール処理を行ったのは、細胞を分裂前中期で停止させることで染色体をより凝縮させ、その像を観察しやすいためである。コントロールでは、ほとんどの細胞で「X」字型の染色体像をとっており、姉妹染色分体間の接着が染色体腕部で解除され、一方でセントロメアでは維持されていることを示していた。ところが、PP2A-A RNAiを行った細胞では、セントロメアでの接着が失われて姉妹染色分体が離れかけているもの(cen lost、~15%)や、姉妹染色分体が完全に離れてしまっているもの(separated、~30%)が高頻度で見られた(図 30)。これにより、PP2A は分裂前中期において姉妹セントロメア間の接着の維持に必要であることが分かった。

この結果をさらに確認するため、PP2A の阻害剤であるオカダ酸を加えたときに同様の影響が見られるかを調べた。分裂期の細胞を回収し、ノコダゾールを加えた培地中で細胞を分裂前中期に停止させながら、オカダ酸で8.5時間処理した。オカダ酸を加えなかったほとんどの細胞は姉妹セントロメア間の接着が維持されていたのに対し、オカダ酸処理した89%の細胞ではこれが失われて姉妹染色分体が分離してしまっていた(図 30b)。このことは、PP2A のフォスファターゼ活性が姉妹セントロメアの接着の維持に必須の役割を果たしていることを示唆する。PP2A-A RNAiにおいてオカダ酸処理よりも姉妹染色分体の分離が見られた頻度が低かった(図 30a&b)のは、PP2A-A RNAiによるPP2A-Aの抑制が完全でなかったためかもしれない。

PP2A は hSgo2 に依存してセントロメアに局在する

続いて、PP2A と hSgo1 および hSgo2 の機能に関して相互依存性を調べるため、それぞれを RNAi した細胞で免疫染色を行うことにより、これらの局在が変化するかを調べた。まず、hSgo1 および hSgo2 が PP2A のセントロメア局在に必要なで

ある可能性を検討した。すると、hSgo1 を RNAi した細胞では、分裂前中期において PP2A-B56 α 、PP2A-A、hSgo2 はいずれも正常にセントロメアに局在していた(図 31a&b&c)。これに対し、hSgo2 を RNAi した細胞では、hSgo1 の局在は正常であったものの、PP2A-B56 α と PP2A-A はセントロメアから局在が失われていた(図 31a&b&c)。hSgo2 RNAi 後のウエスタン解析では PP2A-A のタンパク質量に変化はなかった(図 17a)ので、PP2A タンパク質が不安定になったことによるものではない。これらのことから、PP2A がセントロメアにリクルートされるためには hSgo2 が必要であり、hSgo1 は必要ないことが明らかになった。次に、逆に PP2A が hSgo1 および hSgo2 の局在に必要である可能性を検討した。すると、PP2A-A を RNAi した細胞では hSgo1 のセントロメア局在が弱くなり、一方で hSgo2 の局在は正常であった(図 31a&b)。PP2A-A RNAi によって細胞内の hSgo1 の量は変化しない(図 29a)ので、これは hSgo1 タンパク質が不安定になったことによるものではない。それぞれの分裂前中期におけるセントロメアのシグナルの強さを定量化した結果を図 31e に示した。これらの結果から、PP2A は hSgo2 に依存してセントロメアにリクルートされ、また PP2A は hSgo1 が効率的にセントロメアに局在するために必要であると考えられた。ただし、hSgo2 RNAi において PP2A がセントロメアから失われても、hSgo1 は正常にセントロメアに局在できるので、細胞質内に拡散した PP2A の機能が hSgo1 の効率的なセントロメア局在に重要なものかもしれない。

考察

以上の結果から、体細胞分裂の分裂前中期において PP2A は hSgo1、hSgo2 と共に姉妹セントロメア間の接着を保護することに機能していることが分かった(図 32)。hSgo2 は PP2A のセントロメア局在に必須であったことと、また免疫沈

降により PP2A との物理的相互作用が確認されたことから、hSgo2 は PP2A を物理的相互作用を介してセントロメアにリクルートすることが示唆される。セントロメアに局在した hSgo2-PP2A 複合体がコヒーシ複合体の保護に直接的に働くかについては現時点では明らかでなく、PP2A こそがコヒーシ複合体に直接的に働く因子であり、hSgo2 はそのリクルーターとしてのみ機能しているという可能性も考えられる。一方で、hSgo1 は PP2A のセントロメアへのリクルートには必要ではなかった。免疫沈降と two-hybrid の実験結果は、hSgo1 は PP2A と B56 サブユニットを介して複合体を形成することを強く示唆している。これらのことを考え合わせると、PP2A が hSgo1 よりも先にセントロメアに局在し、次に hSgo1 が PP2A との相互作用を介してセントロメアにリクルートされるとも考えられる。しかしながらこの考えは、PP2A がセントロメアに局在できない hSgo2 RNAi において hSgo1 が正常にセントロメアに局在できるという結果と矛盾する。したがって、hSgo1 はセントロメア PP2A を介してリクルートされるのではなく、ある程度それとは独立にセントロメアへ局在できると考えられる。ただし、PP2A-A RNAi において hSgo1 の局在が減少したことから、細胞質内に拡散した PP2A が hSgo1 を間接的に制御することにより hSgo1 のセントロメア局在能を高めているのかもしれない。以上の考察から、hSgo2 がセントロメアに PP2A をリクルートし、それとは独立に(しかし部分的に細胞質内の PP2A に依存して)セントロメアに局在した hSgo1 とセントロメア PP2A が B56 サブユニットを介して複合体を形成するという可能性が考えられる。

この考えが正しいとすれば、hSgo1 と PP2A の複合体はセントロメア上でのみ形成されるはずである。図 26b および c における免疫沈降実験には、非同調的な細胞から低塩濃度のバッファーで調製した細胞抽出液が用いられており、それにはクロマチン上の(それゆえセントロメア上の)タンパク質は含まれていないと考えられる。それにも関わらず hSgo1 と PP2A の相互作用が検出され、細

胞質内でもこれらが複合体を形成していることが示唆された。しかしながら、その共沈効率は極めて低い。分裂期に細胞を同調し、さらにクロマチン上のタンパク質を精製、可溶化した後に免疫沈降を行えば、より効率よく hSgo1 と PP2A が共沈するのかもしれない。

hSgo1、hSgo2、PP2A のうち、いずれがセントロメアのコヒーシン複合体の保護に最も直接的に機能しているのだろうか。hSgo1 RNAi においては、hSgo2 と PP2A がセントロメアに局在できるにも関わらず、ほとんどの分裂期の細胞で姉妹セントロメア間の接着の保護に欠損がある。このことは、PP2A および hSgo2 がセントロメアに局在することはコヒーシン複合体の保護に十分ではないことを示している。また一方で、hSgo2 RNAi においては hSgo1 がセントロメアに局在できるにも関わらず、姉妹セントロメア間の接着の保護に欠損が見られる。これらのことは、三者のいずれも、それぞれがセントロメアに局在するだけではコヒーシン複合体を保護するのに十分ではなく、むしろそれらがセントロメアにおいて機能を分担しあい、協調的に機能することが重要であることを示唆している。

hSgo2 は、その機能として少なくとも PP2A のセントロメアへのリクルートを担っていることが示された。それでは hSgo1 と PP2A の考えられる機能とは何だろうか。最近、分裂前期と前中期における染色体腕部の接着の解除は、主に Polo キナーゼがコヒーシンサブユニット SA をリン酸化してコヒーシン複合体を染色体腕部から解離させることによって起こることが示された(Hauf et al., 2005; Sumara et al., 2002)。このことから、PP2A はセントロメアにおいてそのフォスファターゼ活性を用いて Polo のキナーゼ活性と拮抗し、コヒーシン複合体を脱リン酸化することで解離から保護しているのかもしれない。実際に、本研究室の石黒により、Polo によってリン酸化された SA を、HeLa 細胞から免疫沈降した hSgo1-PP2A 複合体が *in vitro* で脱リン酸化できることが示されている(論文投稿

中)。PP2A がコヒーシン複合体を脱リン酸化するとすれば、hSgo1 の機能は PP2A をセントロメアで活性化したり、基質との親和性を高めたりすることに寄与しているのかもしれない。あるいは逆に、PP2A は hSgo1 や hSgo2 を脱リン酸化することにより活性化し、活性化した hSgo1 や hSgo2 が何らかの機構でコヒーシン複合体を解離から保護するという可能性も考えられる。活性化された hSgo1 や hSgo2 が構造的にコヒーシン複合体をシールドすることでコヒーシン複合体が Polo キナーゼによってリン酸化することを妨げている可能性も考えられる。コヒーシン複合体がリング状の構造をとって姉妹染色分体を囲うように束ねているとすれば、Polo キナーゼによってリン酸化されたコヒーシン複合体が染色体上から解離する際はそのリング状の構造が開かれると考えられるが、hSgo1 はコヒーシン複合体のリング状構造を安定化することに機能し、コヒーシン複合体が Polo キナーゼによってリン酸化を受けてもそのリングが開かないようにしているのかもしれない。

第七章 まとめと展望

本研究により、分裂酵母 Sgo1 が減数第一分裂においてセントロメアで Rec8 コヒーシン複合体をセパレーズによる切断から保護し、姉妹セントロメア間の接着を保護すること(第三、四章)、また、ヒト hSgo1 および hSgo2 が体細胞分裂の分裂前期から前中期においてセントロメアで Rad21 コヒーシン複合体を Polo キナーゼによる解離から保護すること(第五、六章)が明らかになった。これらのことから、シュゴシンは真核生物において機能的に保存された姉妹セントロメア間の接着のプロテクターであると考えられる。

本研究で、アミノ酸配列の相同性から多くの真核生物におけるシュゴシンホモログの候補を挙げたが、その後、現在までに実際にいくつかについて機能的な解析がなされ、既に報告されている。分裂酵母 Sgo2 は、本研究室と他のグループによって解析が行われ、減数分裂特異的な Sgo1 とは異なり体細胞分裂にも発現しており、姉妹セントロメア間の接着の保護には必要なく、その代わりスピンドルチェックポイントに機能していることが分かった(川島、未発表)。出芽酵母では、本研究室と他のグループによる解析から、ScSgo1 が減数第一分裂におけるセントロメア Rec8 の保護に必要であることが示された(Katis et al., 2004; Marston et al., 2004)。ScSgo1 は体細胞分裂にも発現し、体細胞分裂では姉妹セントロメア間の接着の維持にほとんど機能していないが、その代わりスピンドルチェックポイントに機能している(Indjeian et al., 2005)ことから、分裂酵母の Sgo1 と Sgo2 の両方の機能を併せ持ったタンパク質であると考えられる。また、トウモロコシにおける不稔変異体の解析から、今回シュゴシン様タンパク質の候補として挙げたシロイヌナズナ AT5G04320.1 のトウモロコシホモログ ZmSgo1 が同定され、ZmSgo1 は分裂酵母 Sgo1 と同様に減数分裂特異的な発現を示し、やはり減数第一分裂においてセントロメア Rec8 の保護に必要であることが示され

た(Hamant et al., 2005)。しかしながら、哺乳動物の減数分裂におけるシュゴシンの機能解析はいまだ報告されておらず、ヒトまで保存された減数分裂における姉妹セントロメア間の接着の保護機構を完全に理解するためには、この解析を行う必要がある。また、本論文における分裂酵母 Sgo1 の解析の報告後、他のグループによって同様の結果が報告され(Rabitsch et al., 2004)、ヒト hSgo1 の解析についても同時期に他のグループから報告されているので、ここに併記する(McGuinness et al., 2005; Salic et al., 2004; Tang et al., 2004)。

分裂酵母 Sgo1 も、本研究室の作野と川島により、PP2A と共に減数第一分裂における姉妹セントロメア間の接着の保護に機能していることが分かった(論文投稿中)。このことは、真核生物においてシュゴシンによる接着保護の分子メカニズムが保存されていることを示唆している。分裂酵母 PP2A の B56 サブユニットの一つ Par1 は、Sgo1 と直接相互作用し、また Sgo1 に依存して減数分裂特異的にセントロメアに局在していた。これらのことから、分裂酵母 Sgo1 はヒト hSgo1 と hSgo2 の両方の特徴を併せ持つのかもしれない。*par1*⁺ 遺伝子の破壊株では、減数第一分裂における姉妹セントロメア間の接着の保護が *sgo1*Δ 株と同様に失われた。このことは、減数分裂においては Sgo1 と PP2A のどちらも接着の保護に必要であることを示しており、ヒトにおける結果と一致する。ところが、体細胞分裂において Rec8 と Sgo1 を過剰発現したときには、Sgo1 が Rec8 を保護するために PP2A は必要ないことが分かった。このことは、過剰発現の条件では Sgo1 単独で Rec8 を保護することができることを示している。一方で、体細胞分裂において Par1 を過剰にセントロメアに濃縮させると、Sgo1 がなくても Rec8 はセントロメアで保護されるようになる。このことは、過剰な PPP2A も単独で Rec8 を保護できることを示している。これらのことから、Sgo1 と PP2A は互いに異なる機構で Rec8 を保護する能力を持ち、両者が複合体を形成することで協調的に機能している可能性が示唆された。

分裂酵母 Sgo1 は、減数第一分裂において Rec8 コヒーシン複合体をセパレーズによる切断から保護する。これに対し、ヒト hSgo1 は体細胞分裂の分裂前期から前中期にかけて Rad21 コヒーシン複合体を Polo キナーゼによる解離から保護する。続いて起こる分裂中期から後期の移行のときに hSgo1 はセントロメアに局在しているにもかかわらず、セパレーズによる Rad21 コヒーシン複合体の切断を阻害しない。分裂酵母 Sgo1 とヒト hSgo1 は、コヒーシン複合体の保護において同じようなメカニズムを有しながら、なぜ最終的に阻害する相手が異なるのだろうか。

一つの可能性として、Rec8 のセパレーズによる切断が Polo キナーゼに依存しており、一方で Rad21 の切断は Polo キナーゼに依存していないという考えがある。出芽酵母においては、Rec8 は Polo キナーゼに依存してリン酸化され、そのことがセパレーズによる切断に重要である可能性が示唆されている(Clyne et al., 2003; Lee and Amon, 2003)。一方で、Rad21 も Polo キナーゼによってリン酸化されるが、そのリン酸化はセパレーズに切断される効率を高めるものの必ずしも必須ではない(Alexandru et al., 2001; Hauf et al., 2005; Hornig and Uhlmann, 2004)ことが報告されている。これらのことから、分裂酵母 Sgo1 と PP2A は減数第一分裂においてセントロメアで Rec8 をリン酸化されない方向に作用し、その結果、Rec8 のセパレーズによる切断が阻害されるのかもしれない。あるいは、セパレーズまたはその活性化因子を Sgo1 と PP2A がセントロメアで直接抑えているのかもしれない。

シュゴシンは姉妹セントロメア接着のプロテクターとして機能する一方で、分裂酵母 Sgo2 と出芽酵母 ScSgo1 がスピンドルチェックポイントにも機能することは、2つの機能の関連性を考えるうえで非常に興味深い。スピンドルチェックポイントは、分裂期においてスピンドル微小管が姉妹動原体ペアを反対方向から正しく捕らえて引っ張るまで細胞周期を止めておく機構であるが、分裂酵

母 Sgo2 と出芽酵母 ScSgo1 は、姉妹セントロメア間の接着を監視することにより、姉妹動原体がスピンドル微小管によって反対方向に引っ張られたときに生まれる、姉妹セントロメア間の接着部位にかかる物理的な力を感知しているのかもしれない。また、カエル卵抽出液からは、微小管形成を誘導するタンパク質として生化学的にカエル XSgo1 が同定されている(Salic et al., 2004)。シュゴシンが微小管と相互作用しうる性質を備えていることから、シュゴシンは姉妹動原体がスピンドル微小管によって反対方向から捕らえたことを、セントロメアで微小管と相互作用するによって感知するのかもしれない。ヒト hSgo2 は姉妹動原体がスピンドル微小管により反対方向から捕らえられるとインナーセントロメアから動原体近くに移動することが分かっており(図 18a&b)、hSgo2 は姉妹セントロメア間の接着の保護に機能すると共に、微小管と相互作用して動原体の機能に関わっている可能性も考えられる。

それでは、シュゴシンはどのような分子進化を経て、姉妹セントロメア間接着の保護とスピンドルチェックポイントという 2 つの機能を獲得するに至ったのだろうか。真核生物はもともと、体細胞分裂によって遺伝情報のコピーを娘細胞に分配しながら増殖するという単純なサイクルを繰り返すだけだったが、その後、遺伝子をシャッフルすることで遺伝の多様性を生み出すために、減数分裂という特別な機構を獲得したと考えられる。減数分裂を獲得する以前の真核生物におけるシュゴシンは、分裂期に微小管が反対方向から捕らえることを感知するために、その物理的な張力がもっともかかる部位であるセントロメアにおける接着を強固にする役割を果たしていたのかもしれない。哺乳生物では体細胞分裂における姉妹セントロメア間の接着の維持が重要であるため、シュゴシンはそれらを保護するように進化し、一方で出芽酵母や分裂酵母においては、体細胞分裂で姉妹セントロメア間の接着を強固する機能が薄れ、スピンドルチェックポイントに特化して機能するように進化したのではないだろうか。

そして、酵母をはじめとする真核生物においても、減数分裂では姉妹セントロメア間の接着の維持が半数の染色体を配偶子へ確実に分配するために必須であるので、セントロメアで接着を保護する機能が進化したと考えられる。

本研究によって、真核生物における減数分裂および体細胞分裂の染色体分配を考える上で重要な問題であった、姉妹セントロメア間の接着の保護という現象に対し、シュゴシンというその中心的な役割を果たすタンパク質を同定したことにより、分子的な理解への大きな手がかりを得ることができた。今後さらに、シュゴシンの周囲に存在する制御因子を調べていくことで、染色体分配に働く様々な制御メカニズムの分子的な理解を深めることができると考えられる。

参考文献

- Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupart, M. A., and Nasmyth, K. (2001). Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* *105*, 459-472.
- Anderson, D. E., Losada, A., Erickson, H. P., and Hirano, T. (2002). Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol* *156*, 419-424.
- Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* *234*, 179-186.
- Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *14*, 943-951.
- Bernard, P., Hardwick, K., and Javerzat, J. P. (1998). Fission yeast bub1 is a mitotic centromere protein essential for the spindle checkpoint and the preservation of correct ploidy through mitosis. *J Cell Biol* *143*, 1775-1787.
- Bernard, P., Maure, J. F., and Javerzat, J. P. (2001). Fission yeast Bub1 is essential in setting up the meiotic pattern of chromosome segregation. *Nat Cell Biol* *3*, 522-526.
- Bernard, P., Maure, J. F., Partridge, J. F., Genier, S., Javerzat, J. P., and Allshire, R. C. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* *294*, 2539-2542.
- Blower, M. D., and Karpen, G. H. (2001). The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol* *3*, 730-739.
- Buonomo, S. B., Clyne, R. K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., and Nasmyth, K. (2000).

Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* 103, 387-398.

Clyne, R. K., Katis, V. L., Jessop, L., Benjamin, K. R., Herskowitz, I., Lichten, M., and Nasmyth, K. (2003). Polo-like kinase Cdc5 promotes chiasmata formation and cosegregation of sister centromeres at meiosis I. *Nat Cell Biol* 5, 480-485.

Gimenez-Abian, J. F., Clarke, D. J., Mullinger, A. M., Downes, C. S., and Johnson, R. T. (1995). A postprophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes. *J Cell Biol* 131, 7-17.

Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., and Loprieno, N. (1974). *Schizosaccharomyces pombe*. In *Handbook of Genetics* Plenum Publishing Corporation, New York.

Hamant, O., Golubovskaya, I., Meeley, R., Fiume, E., Timofejeva, L., Schleiffer, A., Nasmyth, K., and Cande, W. Z. (2005). A REC8-dependent plant Shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions. *Curr Biol* 15, 948-954.

Hauf, S., Cole, R. W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C. L., and Peters, J. M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 161, 281-294.

Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C. M., Mechtler, K., and Peters, J. M. (2005). Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol* 3, e69.

Hauf, S., Waizenegger, I. C., and Peters, J. M. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* 293, 1320-1323.

Heidmann, D., Horn, S., Heidmann, S., Schleiffer, A., Nasmyth, K., and Lehner, C. F. (2004). The *Drosophila* meiotic kleisin C(2)M functions before the meiotic divisions.

Chromosoma 113, 177-187.

Henikoff, S., Pietrokovski, S., and Henikoff, J. G. (1998). Superior performance in protein homology detection with the Blocks Database servers. *Nucleic Acids Res* 26, 309-312.

Horie, S., Watanabe, Y., Tanaka, K., Nishiwaki, S., Fujioka, H., Abe, H., Yamamoto, M., and Shimoda, C. (1998). The *Schizosaccharomyces pombe* mei4+ gene encodes a meiosis-specific transcription factor containing a forkhead DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 18, 2118-2129.

Hornig, N. C., and Uhlmann, F. (2004). Preferential cleavage of chromatin-bound cohesin after targeted phosphorylation by Polo-like kinase. *Embo J* 23, 3144-3153.

Iino, Y., and Yamamoto, M. (1985). Negative Control for the Initiation of Meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 2447-2451.

Indjeian, V. B., Stern, B. M., and Murray, A. W. (2005). The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science* 307, 130-133.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Izawa, D., Goto, M., Yamashita, A., Yamano, H., and Yamamoto, M. (2005). Fission yeast Mes1p ensures the onset of meiosis II by blocking degradation of cyclin Cdc13p. *Nature* 434, 529-533.

Janssens, V., and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353, 417-439.

Johnson, V. L., Scott, M. I., Holt, S. V., Hussein, D., and Taylor, S. S. (2004). Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J Cell Sci* 117, 1577-1589.

- Katis, V. L., Galova, M., Rabitsch, K. P., Gregan, J., and Nasmyth, K. (2004). Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis I in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Curr Biol* 14, 560-572.
- Katis, V. L., Matos, J., Mori, S., Shirahige, K., Zachariae, W., and Nasmyth, K. (2004). Spo13 facilitates monopolin recruitment to kinetochores and regulates maintenance of centromeric cohesion during yeast meiosis. *Curr Biol* 14, 2183-2196.
- Kerrebrock, A. W., Moore, D. P., Wu, J. S., and Orr-Weaver, T. L. (1995). Mei-S332, a *Drosophila* protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions. *Cell* 83, 247-256.
- Kitajima, T. S., Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Watanabe, Y. (2003). Distinct cohesin complexes organize meiotic chromosome domains. *Science* 300, 1152-1155.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S. B., Michaelis, C., Nairz, K., and Nasmyth, K. (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98, 91-103.
- Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 488-492.
- LeBlanc, H. N., Tang, T. T., Wu, J. S., and Orr-Weaver, T. L. (1999). The mitotic centromeric protein MEI-S332 and its role in sister-chromatid cohesion. *Chromosoma* 108, 401-411.
- Lee, B. H., and Amon, A. (2003). Role of Polo-like kinase CDC5 in programming meiosis I chromosome segregation. *Science* 300, 482-486.
- Lee, B. H., Amon, A., and Prinz, S. (2002). Spo13 regulates cohesin cleavage. *Genes Dev* 16, 1672-1681.
- Lee, B. H., Kiburz, B. M., and Amon, A. (2004). Spo13 maintains centromeric cohesion and kinetochore coorientation during meiosis I. *Curr Biol* 14, 2168-2182.

- Liu, S. T., Hittle, J. C., Jablonski, S. A., Campbell, M. S., Yoda, K., and Yen, T. J. (2003). Human CENP-I specifies localization of CENP-F, MAD1 and MAD2 to kinetochores and is essential for mitosis. *Nat Cell Biol* 5, 341-345.
- Losada, A., Hirano, M., and Hirano, T. (1998). Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev* 12, 1986-1997.
- Losada, A., Hirano, M., and Hirano, T. (2002). Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev* 16, 3004-3016.
- Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J., and Yu, H. (2004). The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat Struct Mol Biol* 11, 338-345.
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.
- Marston, A. L., Tham, W. H., Shah, H., and Amon, A. (2004). A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* 303, 1367-1370.
- Maundrell, K. (1990). *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* 265, 10857-10864.
- McGuinness, B. E., Hirota, T., Kudo, N. R., Peters, J. M., and Nasmyth, K. (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol* 3, e86.
- Meraldi, P., and Sorger, P. K. (2005). A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. *Embo J* 24, 1621-1633.
- Nasmyth, K., and Haering, C. H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* 74, 595-648.
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S. I., and

Watanabe, Y. (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* 4, 89-93.

Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K., and Okayama, H. (1990). High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 18, 6485-6489.

Parisi, S., McKay, M. J., Molnar, M., Thompson, M. A., van der Spek, P. J., van Drunen-Schoenmaker, E., Kanaar, R., Lehmann, E., Hoeijmakers, J. H., and Kohli, J. (1999). Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol Cell Biol* 19, 3515-3528.

Peter, M., Castro, A., Lorca, T., Le Peuch, C., Magnaghi-Jaulin, L., Doree, M., and Labbe, J. C. (2001). The APC is dispensable for first meiotic anaphase in *Xenopus* oocytes. *Nat Cell Biol* 3, 83-87.

Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 9, 931-943.

Rabitsch, K. P., Gregan, J., Schleiffer, A., Javerzat, J. P., Eisenhaber, F., and Nasmyth, K. (2004). Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Curr Biol* 14, 287-301.

Rao, H., Uhlmann, F., Nasmyth, K., and Varshavsky, A. (2001). Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* 410, 955-959.

Saitoh, S., Takahashi, K., and Yanagida, M. (1997). Mis6, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation. *Cell* 90, 131-143.

Salah, S. M., and Nasmyth, K. (2000). Destruction of the securin Pds1p occurs at the onset of anaphase during both meiotic divisions in yeast. *Chromosoma* *109*, 27-34.

Salic, A., Waters, J. C., and Mitchison, T. J. (2004). Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* *118*, 567-578.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.

Scanlan, M. J., Gout, I., Gordon, C. M., Williamson, B., Stockert, E., Gure, A. O., Jager, D., Chen, Y. T., Mackay, A., O'Hare, M. J., and Old, L. J. (2001). Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immunol* *1*, 4.

Shonn, M. A., McCarroll, R., and Murray, A. W. (2002). Spo13 protects meiotic cohesin at centromeres in meiosis I. *Genes Dev* *16*, 1659-1671.

Siomos, M. F., Badrinath, A., Pasierbek, P., Livingstone, D., White, J., Glotzer, M., and Nasmyth, K. (2001). Separase is required for chromosome segregation during meiosis I in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* *11*, 1825-1835.

Sumara, I., Gimenez-Abian, J. F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J. M. (2004). Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr Biol* *14*, 1712-1722.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P. T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. A., and Peters, J. M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* *9*, 515-525.

Tang, T. T., Bickel, S. E., Young, L. M., and Orr-Weaver, T. L. (1998). Maintenance of sister-chromatid cohesion at the centromere by the *Drosophila* MEI-S332 protein. *Genes Dev* *12*, 3843-3856.

Tang, Z., Shu, H., Oncel, D., Chen, S., and Yu, H. (2004). Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell* *16*, 387-397.

Tang, Z., Sun, Y., Harley, S. E., Zou, H., and Yu, H. (2004). Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through Shugoshin during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 18012-18017.

Taylor, S. S., and McKeon, F. (1997). Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* *89*, 727-735.

Terret, M. E., Wassmann, K., Waizenegger, I., Maro, B., Peters, J. M., and Verlhac, M. H. (2003). The meiosis I-to-meiosis II transition in mouse oocytes requires separase activity. *Curr Biol* *13*, 1797-1802.

Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Yuasa, T., Sutani, T., Kearsey, S. E., Uhlmann, F., *et al.* (2000). Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev* *14*, 2757-2770.

Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* *400*, 37-42.

Uhlmann, F., Wernic, D., Poupard, M. A., Koonin, E. V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* *103*, 375-386.

Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., and Saigo, K. (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* *32*, 936-948.

Uzawa, S., Samejima, I., Hirano, T., Tanaka, K., and Yanagida, M. (1990). The fission

yeast *cut1+* gene regulates spindle pole body duplication and has homology to the budding yeast ESP1 gene. *Cell* 62, 913-925.

Van Dolah, F. M., and Ramsdell, J. S. (1992). Okadaic acid inhibits a protein phosphatase activity involved in formation of the mitotic spindle of GH4 rat pituitary cells. *J Cell Physiol* 152, 190-198.

Vandre, D. D., and Wills, V. L. (1992). Inhibition of mitosis by okadaic acid: possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase. *J Cell Sci* 101 (Pt 1), 79-91.

Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J. M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103, 399-410.

Watanabe, Y., and Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* 400, 461-464.

Watanabe, Y., Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Nurse, P. (2001). Pre-meiotic S phase is linked to reductional chromosome segregation and recombination. *Nature* 409, 359-363.

Yanagida, M. (2000). Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes Cells* 5, 1-8.

Yokobayashi, S., and Watanabe, Y. (2005). The novel protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell*, in press.

Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Watanabe, Y. (2003). Cohesins determine the attachment manner of kinetochores to spindle microtubules at meiosis I in fission yeast. *Mol Cell Biol* 23, 3965-3973.

Young, J. A., Schreckhise, R. W., Steiner, W. W., and Smith, G. R. (2002). Meiotic recombination remote from prominent DNA break sites in *S. pombe*. *Mol Cell* 9,

253-263.

本研究の内容に関わる論文

主要論文

Kitajima, T. S., Y. Miyazaki, M. Yamamoto, and Y. Watanabe.

Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast.

EMBO J. 22, 5643-5653 (2003).

Kitajima, T. S., S. A. Kawashima, and Y. Watanabe.

The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis.

Nature 427, 510-517 (2004).

Kitajima T. S., S. Hauf, M. Ohsugi, T. Yamamoto, and Y. Watanabe.

Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization.

Curr Biol. 15, 353-359 (2005).

Kitajima, T. S., T. Sakuno, K. Ishiguro, S. Iemura, T. Natsume, S. A. Kawashima, and Y. Watanabe.

Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin.

投稿中

関連論文

Nonaka, N.*, T. Kitajima*, S. Yokobayashi, G. Xiao, M. Yamamoto, S. Grewal, and Y. Watanabe.

Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast.

Nature Cell Biol. 4, 89-93 (2002). (* equally contributed.)

Kitajima, T. S.*, S. Yokobayashi*, M. Yamamoto, and Y. Watanabe.

Distinct cohesin complexes organize meiotic chromosome domains.

Science 300, 1152-1155 (2003). (* equally contributed.)

謝辞

この研究は、東京大学理学部生物化学科山本研究室(4年間)および東京大学分子細胞生物学研究所染色体動態研究分野渡辺研究室(2年間)において行われたものです。

学部の卒業研究時から6年間の長きにわたって、熱心に指導してくださいました渡辺嘉典先生に心より感謝いたします。また、研究生活を共にした渡辺研究室のメンバーに感謝いたします。

山本正幸先生をはじめとして、研究生活の最初の4年間をお世話になりました山本研究室の皆様から心から感謝いたします。

HeLa細胞を用いた実験を初心者であった私に親切に指導してくださり、また共同研究させていただきました、東京大学医科学研究所の大杉美穂先生と山本雅先生に深くお礼申し上げます。

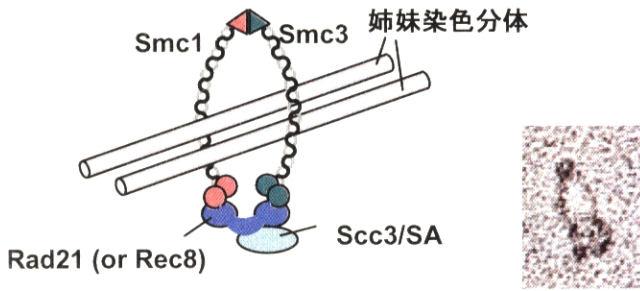
hSgo1複合体のMS解析において共同研究させていただきました、産業技術総合研究所の家村俊一郎先生と夏目徹先生に心からお礼申し上げます。

プラスミド、菌株などの材料を提供してくださいました、Jean-Paul Javerzat 博士、Fred Chang 博士、Jan-Michael Peters 博士、Gerald R. Simith 博士、Paul Nurse 博士、高崎芳成先生、登田隆先生、柳田充弘先生に深く感謝いたします。

最後に、研究者を目指すことを選んだ私を支持し、温かく応援してくれた家族に感謝します。

図1

a コヒーシン複合体



(Anderson et al., 2002)

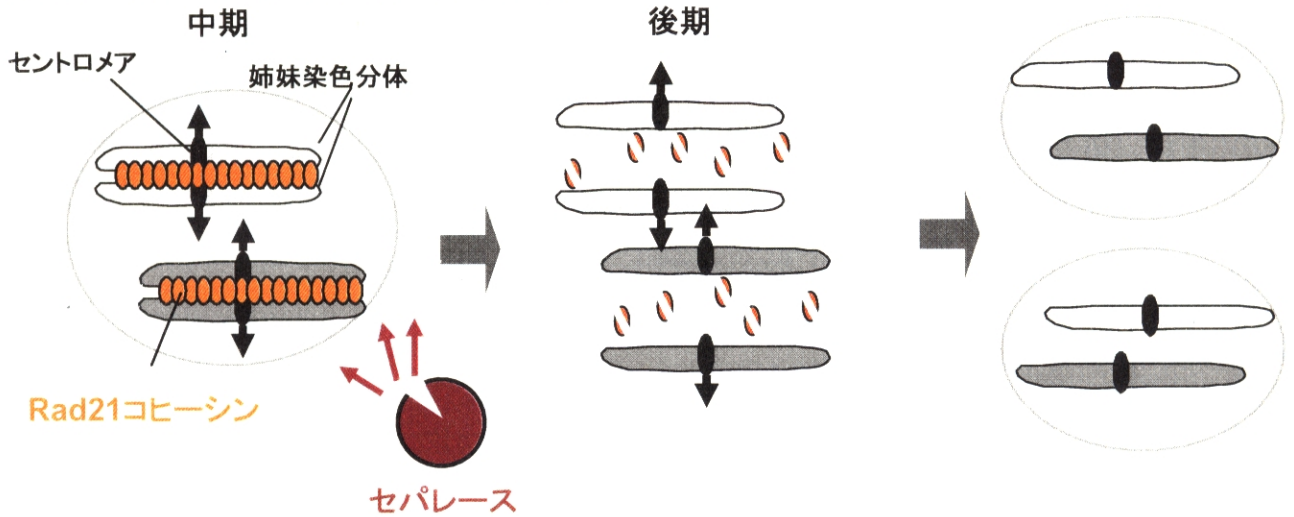
図1: 体細胞分裂と減数分裂における染色体分配

a) コヒーシン複合体の構造を示した。Smc1とSmc3がそれぞれ桿状の構造をとって会合し、Rad21がそれらを橋渡しするように結合することでリング状の構造をとり、姉妹染色分体を囲い込むように接着させると考えられる。右下にコヒーシン複合体の電子顕微鏡像を示す。

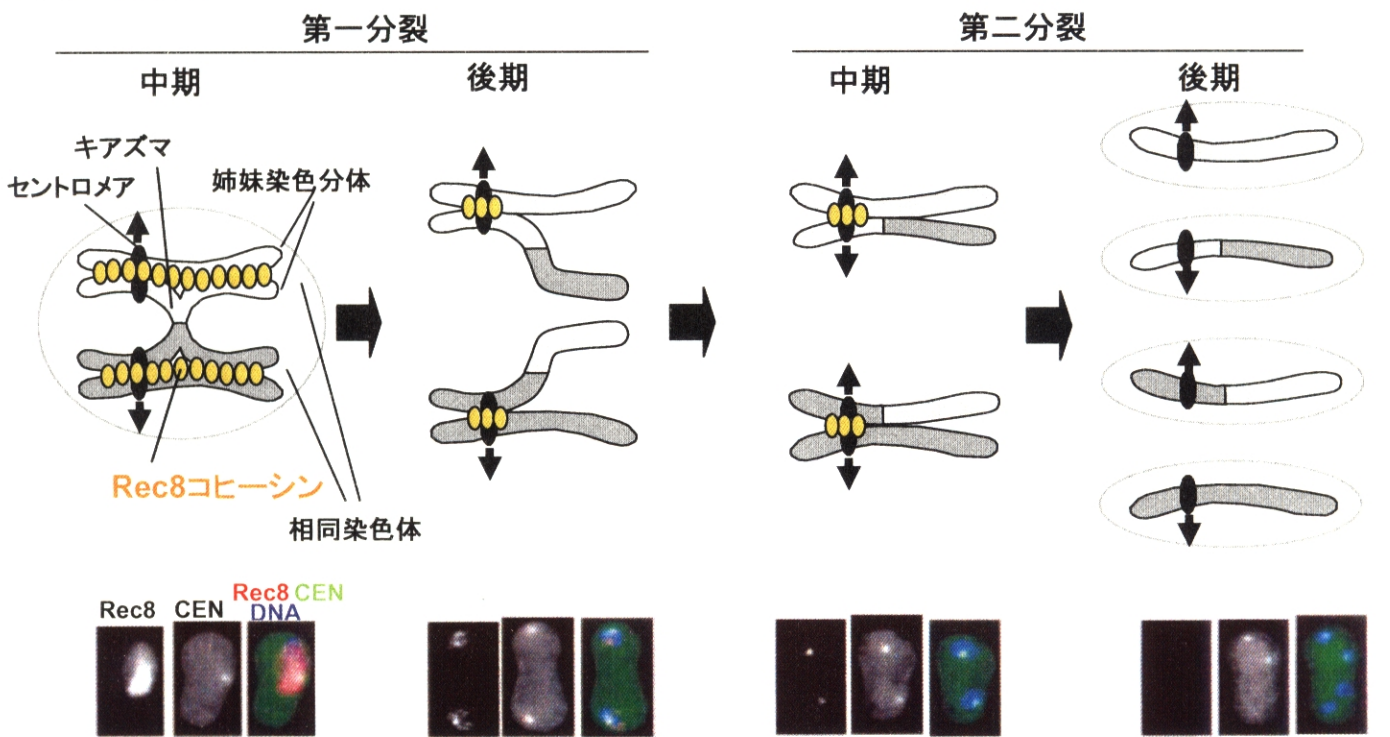
b) 体細胞分裂においては、姉妹染色分体間はRad21を含むコヒーシン複合体によって接着され、後期になるとセパレーズによってRad21が切断されることで姉妹染色分体の接着が解除され、染色体が分離する。

c) 減数分裂においては、Rec8を含むコヒーシン複合体が姉妹染色分体間を接着し、またキアズマにより相同染色体間にもつながりが生まれる。第一分裂においては染色体腕部のRec8コヒーシンが解離して相同染色体が分離する一方、セントロメアではRec8コヒーシンが残存するので姉妹染色分体は分離せず、これらは第二分裂で初めて分離する。下にそれぞれの時期におけるRec8(赤)の局在とセントロメア(CEN、緑)、DNA(青)を示す。

b 体細胞分裂 (分裂酵母の場合)



c 減数分裂



(Watanabe et al., 1999)

図2

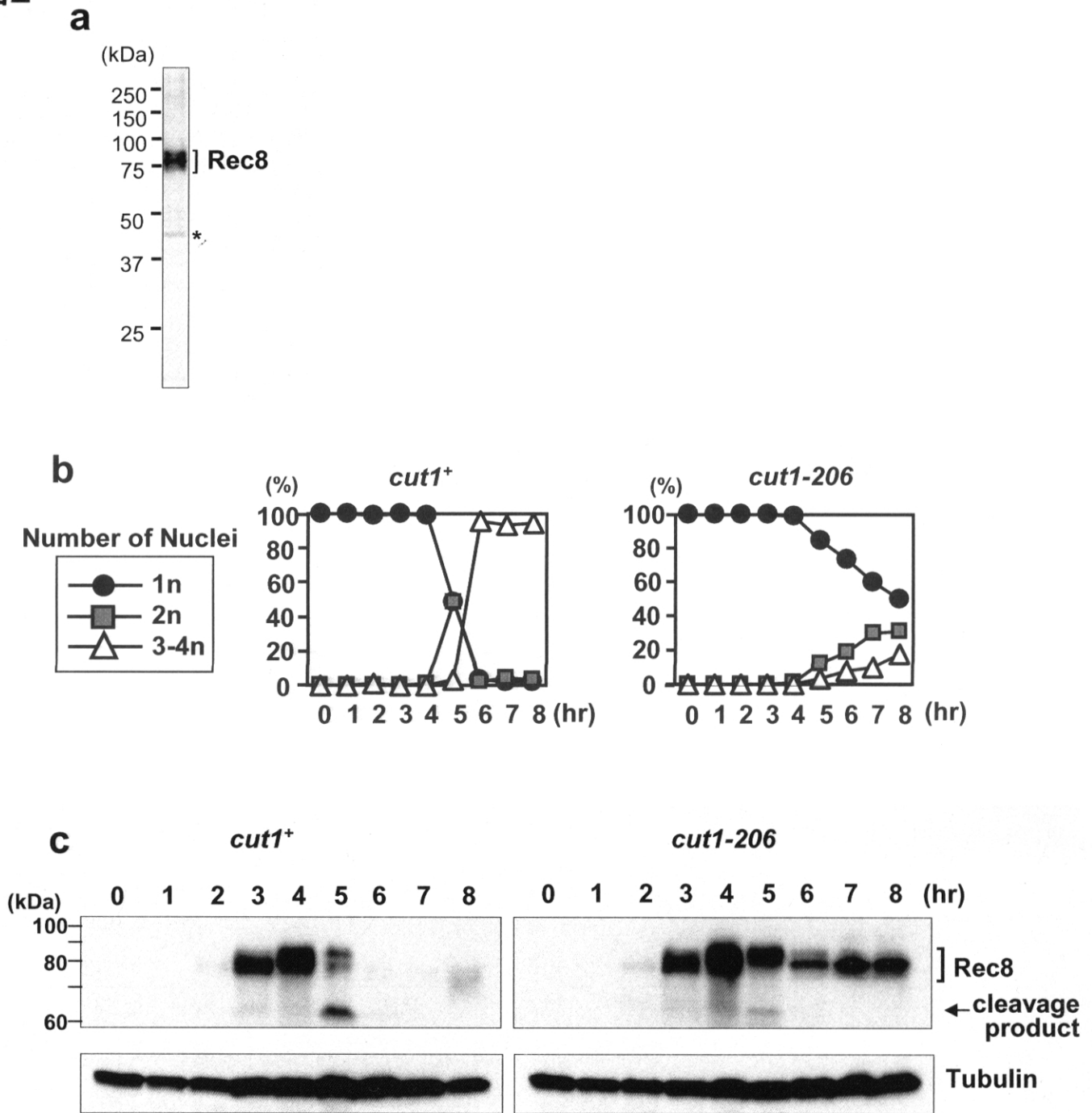


図2: 分裂酵母セパレーズCut1はRec8の分解に必要である

a) *h⁹⁰ mei4Δ* 株(PY452)を窒素源飢餓により減数分裂に誘導し、第一分裂前に停止させた。抗Rec8抗体を用いてウエスタン解析を行った。80kDa付近に複数からなるRec8のバンドを検出した。アスタリスクはクロスリアクトによるものである。

b) 二倍体の*pat1-114/pat1-114 cut1-206/cut1-206*株(PZ91、右)とそのコントロールとして*cut1-206/cut1⁺*株(PZ90、左)をG1期に同調し、34度の制限温度に移すことでPat1とCut1を同時に不活性化して減数分裂を誘導させた。一時間毎に細胞を回収し、メタノール固定後DAPI染色でDNAを観察することによって核分裂の進行をモニターした($n > 100$)。*cut1⁺*株では4-5時間に減数第一分裂、5-6時間に減数第二分裂が起こっている。*cut1-206*株では核分裂が著しく阻害されていた。

c) 一時間毎に回収したサンプルについてウエスタン解析を行った。抗Rec8抗体(上)とコントロールとして抗チューブリン抗体TAT-1(下)を用いた。*cut1⁺*株ではRec8は3hrから蓄積し、5hrから分解されていった。5hrでRec8の切断産物と思われるバンドが検出された。*cut1-206*株ではRec8の分解が著しく阻害されていた。