

図3

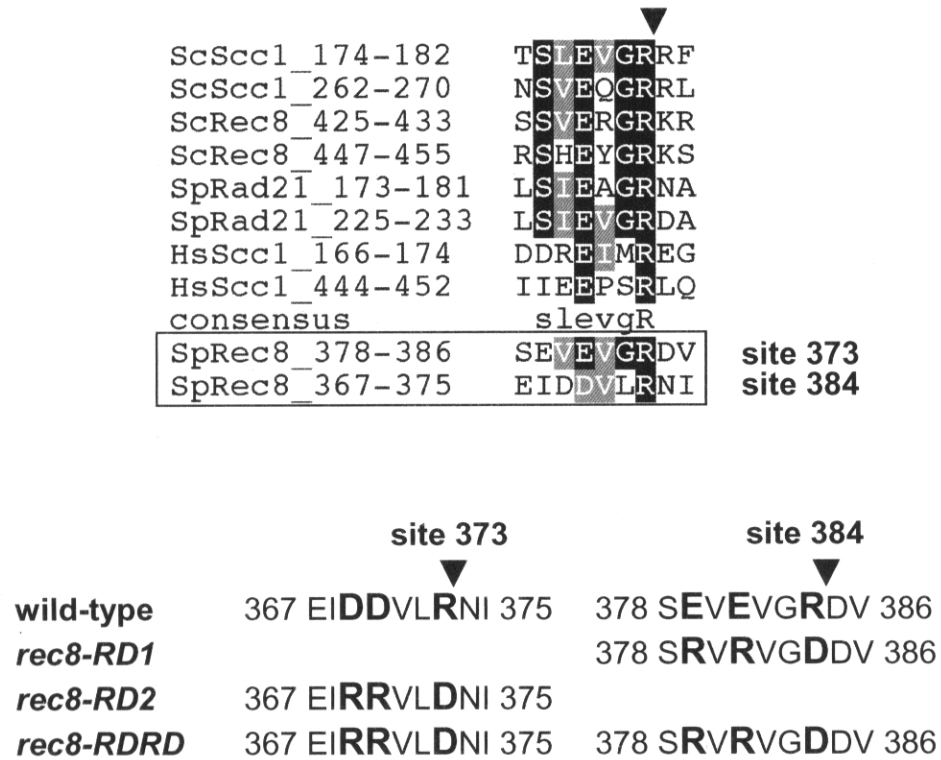
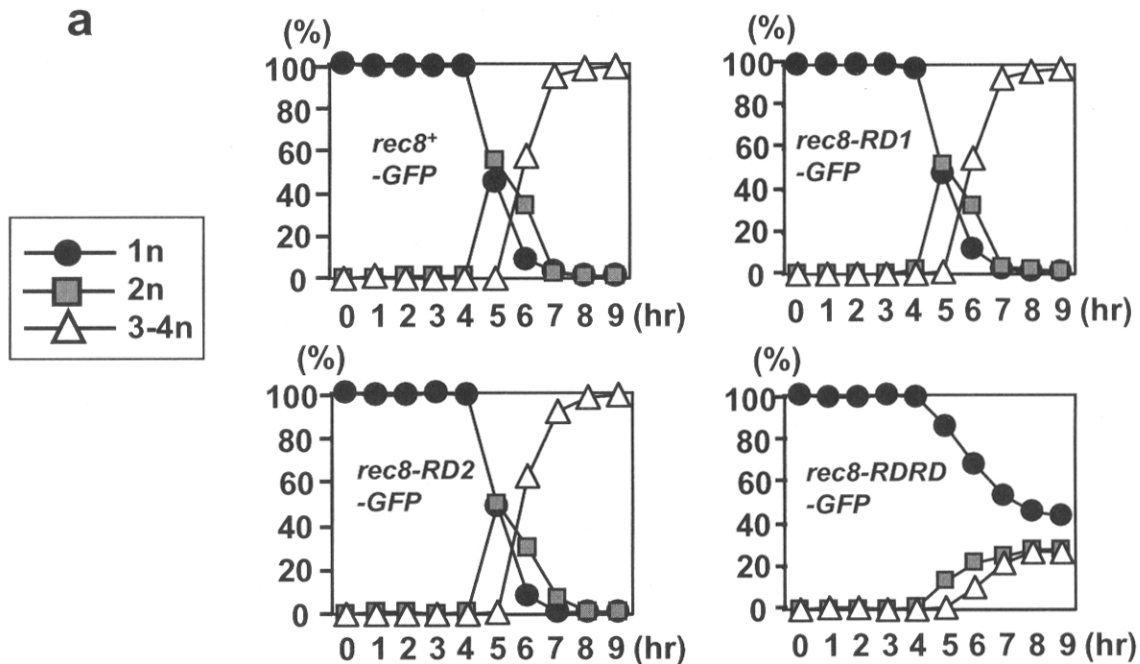


図3: 分裂酵母Rec8におけるセパレーズの標的配列

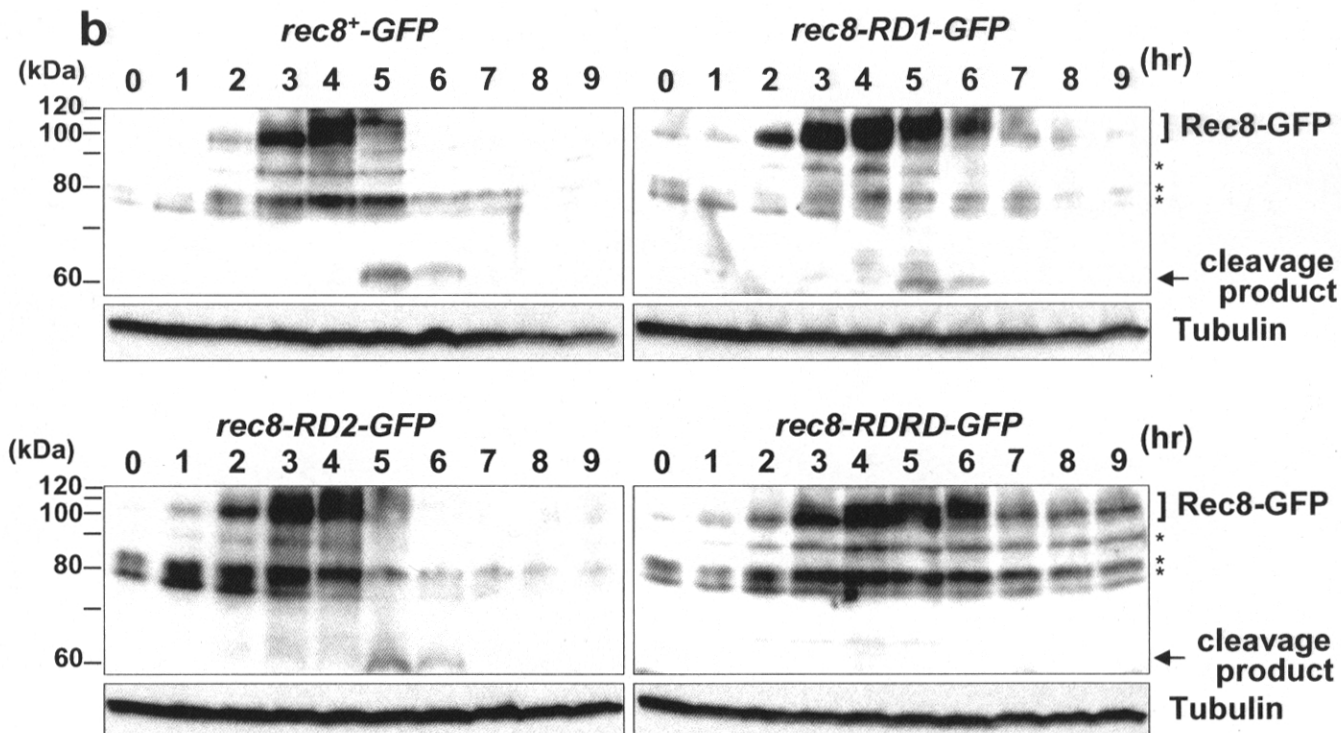
これまでにセパレーズの標的となると知られていたタンパク質の中の標的配列を並べた。矢頭は切断される位置を示している。Sc=出芽酵母、Sp=分裂酵母、Hs=ヒト。今回の解析により、分裂酵母Rec8には予想された部位(site 373)に加えて、相同性の比較的弱いsite384もセパレーズの標的になっていることが分かった。site373に変異を導入したものを*rec8-RD1*、site384に導入したものを*rec8-RD2*、両方に導入したものを*rec8-RDRD*とそれぞれ呼ぶ。

a

Nuclear division



b



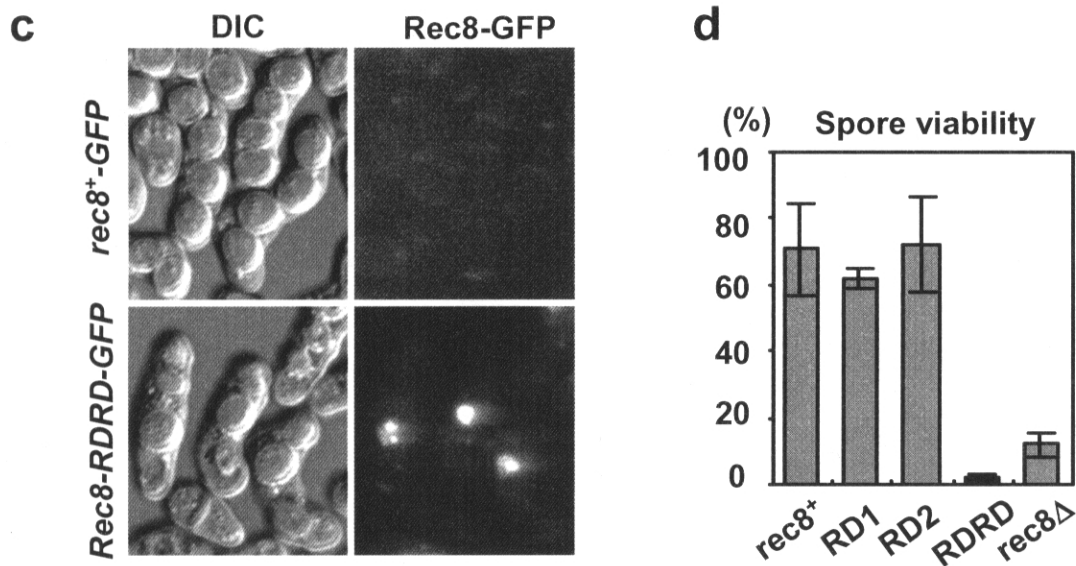


図4: Rec8のセパレーズによる切断は減数分裂における核分裂に必要である

- a) 二倍体の *rec8⁺-GFP* (PZ44、左上)、*rec8-RD1-GFP* (PZ45、右上)、*rec8-RD2-GFP* (PZ50、左下)、*rec8-RDRD-GFP* (PZ47、右下)株において、*pat1-114*変異を用いてそれぞれ同調的な減数分裂を誘導した。一時間毎に細胞を回収し、メタノール固定後DAPI染色をすることで核分裂の進行を観察した($n > 100$)。コントロールでは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。*rec8-RDRD-GFP*株では核分裂が著しく阻害されていた。
- b) 一時間毎のサンプルについてウェ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。*rec8⁺-GFP*株では5hrでRec8の切断産物と思われるバンドが検出され、*rec8-RD1*株では切断産物の泳動度が速くなっていた。*rec8-RDRD-GFP*株ではRec8の分解が著しく阻害されていた。アスタリスク(*)によって示したバンドは、GFPを付加したことによりRec8が不安定化したために生じたものであると考えられる。
- c) h^{90} *rec8⁺-GFP* (PY929、上)と*rec8-RDRD-GFP* (PY990、下)株を窒素源飢餓により減数分裂に誘導し、減数分裂終了後に孢子形成している細胞についてGFPシグナルと孢子の形を観察した。*rec8⁺-GFP*株では大きさが均等な4つの孢子ができているのに対し、*rec8-RDRD-GFP*株の孢子は大きさが不均等で数も少なかった。また、*rec8-RDRD-GFP*株では減数分裂が終了しているにもかかわらずRec8-GFPが残存していた。
- d) h^{90} *rec8⁺-GFP* (PY929)、*rec8-RD1-GFP* (PY964)、*rec8-RD2-GFP* (PZ52)、*rec8-RDRD-GFP* (PY990)、*rec8Δ* (PY344)株において、減数分裂の後に形成された孢子についてランダムスポアを行い、生存率を調べた。*rec8-RDRD-GFP*株における孢子はほとんど生育できなかった。4回の独立な実験の平均値を示す。

図5

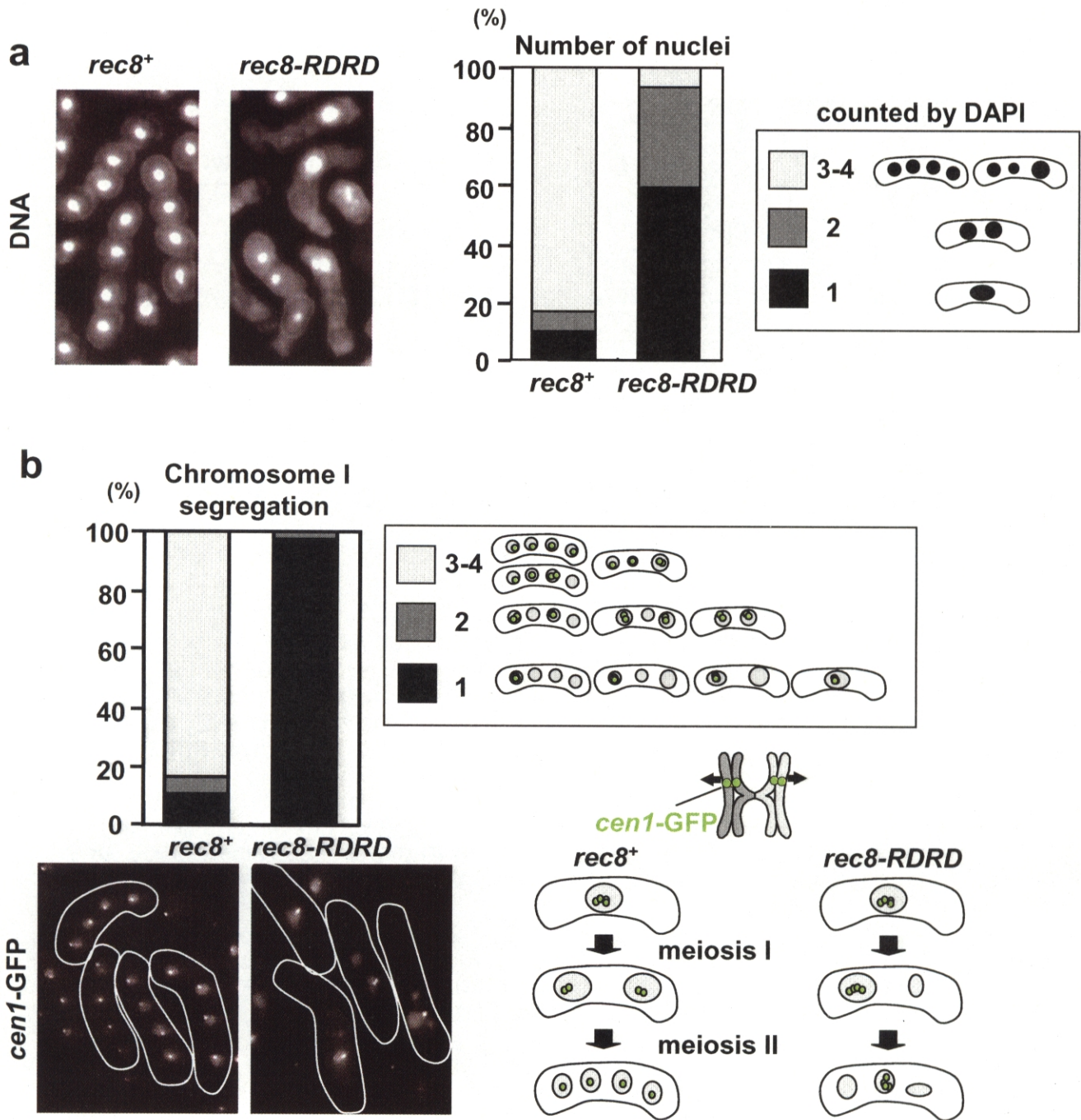


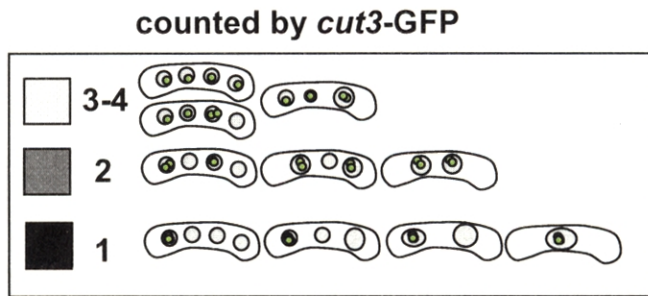
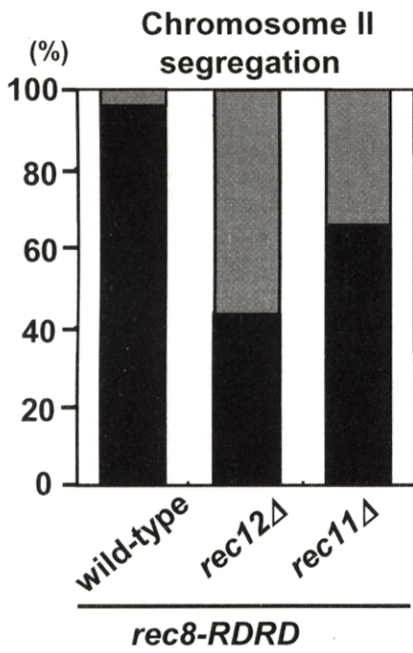
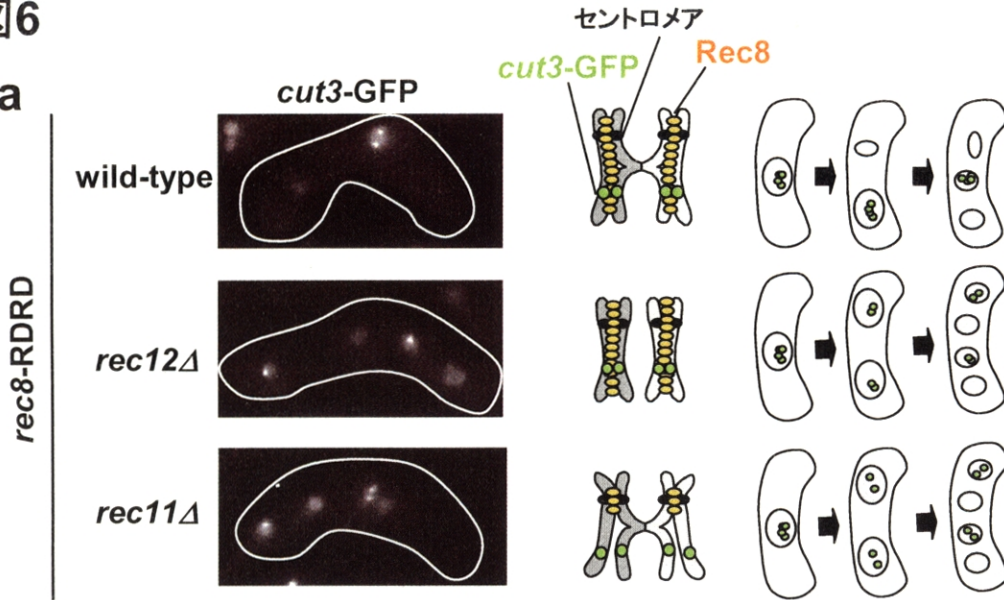
図5: *rec8-RDRD*株における減数分裂では染色体分離が起こらない

a) h^{90} *cen1-GFP rec8⁺* (PZ94, 左)と*rec8-RDRD* (PZ97, 右)株を窒素源飢餓により減数分裂に誘導し、1日後に細胞を回収してメタノール固定後、DAPIによりDNAを染色し、核の数を数えた。*rec8-RDRD*株では核分裂が著しく阻害されていたが、依然~40%の細胞で分裂した核が見られた。(n>100)

b) 減数分裂によって*cen1-GFP*が分配されたパターンを観察して数えた。強いドットが*cen1*座を示し、弱い球状のシグナルはGFP-NLS-LacIが核内に拡散したものである。*rec8⁺*株では*cen1-GFP*が均等に分配されているのに対し、*rec8-RDRD*株では*cen1-GFP*が分配されずに一つの核内に留まった。(n>100)

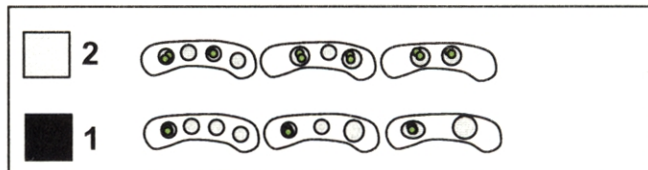
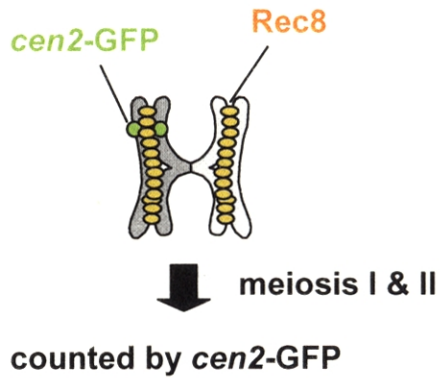
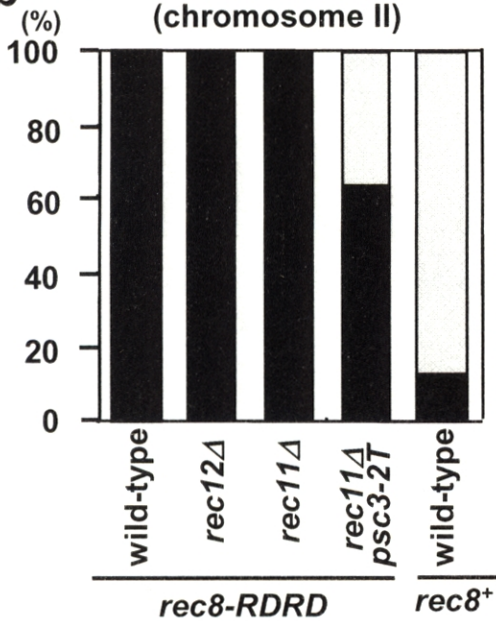
図6

a



b

Sister chromatid segregation (chromosome II)



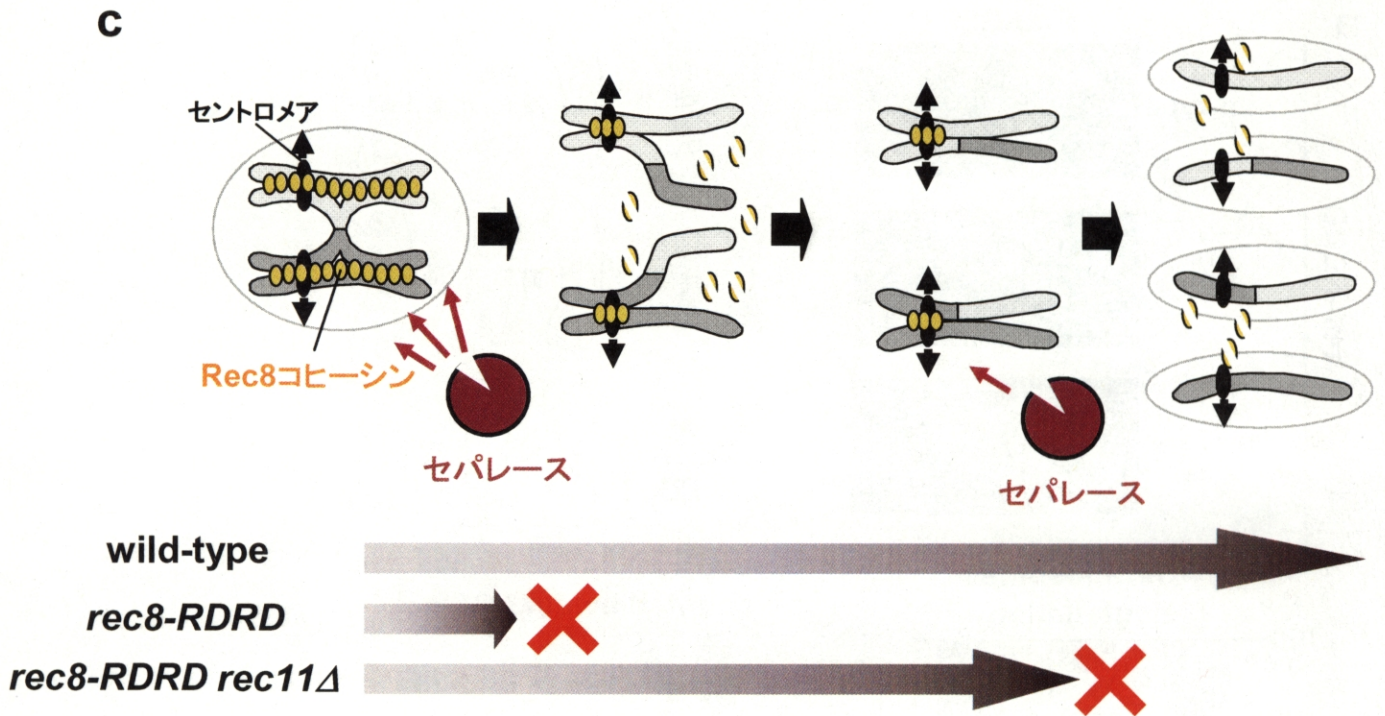


図6: 染色体腕部のコヒーシン複合体を取り除くことによりrec8-RDRD株における相同染色体の不分離が解消される

a) h^{90} cut3-GFP rec8-RDRD (PZ134, wild-type)とそのrec12D株(PZ146)、rec11D株(PZ140)を窒素源飢餓により減数分裂に誘導し、1日後にcut3-GFPが分配されたパターンを観察して数えた。rec8-RDRD株ではcut3-GFPが一つの核内に留まっていたが、rec12Δおよびrec11Δ変異を導入することによって2つの核に分配されるようになった。(n>100)

b) 以下のそれぞれの変異を持つ h^+ cen2-GFP rec8Δ株と h^- rec8-RDRD株を掛け合わせて減数分裂を誘導し、1日後にcen2-GFPが分配されたパターンを観察して数えた。wild-type (PZ167×PZ170)、rec12Δ (PZ168×PZ171)、rec11Δ (PZ169×PZ172)、rec11Δ psc3-2T (PZ992×PZ962)。コントロールとして、 h^- rec8⁺ (PZ166)と h^+ rec8Δ cen2-GFP (PZ170)の掛け合わせにおいて同様に観察した。rec12D株とrec11Δ株のいずれにおいても姉妹染色分体の分配は起こっていなかったが、rec11Δ psc3-2T株においては姉妹染色分体の分配が部分的に起こっていた。(n>100)

c) Rec8は減数分裂においてセパレーズによる切断を受け、それは減数第一分裂における相同染色体の分離に必須である。非切断型のRec8を発現するrec8-RDRD株では減数第一分裂における相同染色体の分離が起きないが、rec11Δ変異によって染色体腕部のコヒーシン複合体を取り除くと、第一分裂の相同染色体の不分離が解消されるものの、第二分裂において姉妹染色分体の分離が阻害される。このことは、第二分裂において姉妹染色分体を分離するためには再度セパレーズが活性化してセントロメアのRec8を切断することが必要であることを強く示唆する。

図7

減数第一分裂

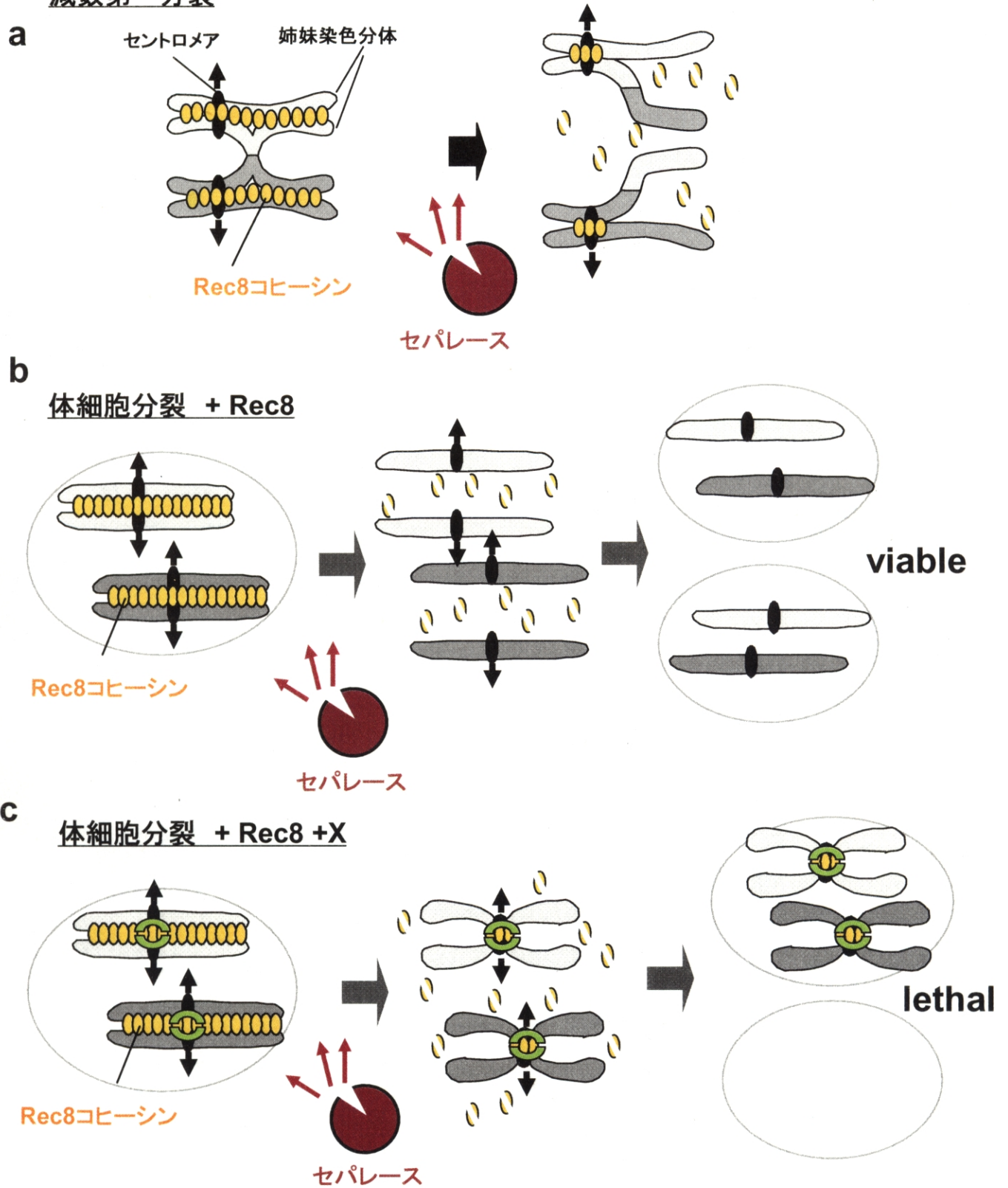


図7: セントロメアRec8の保護因子を同定するためのスクリーニングの戦略

a) 減数第一分裂後期に、セパレーズが染色体腕部のRec8を切断することにより、相同染色体が分離する。その一方で、セントロメアのRec8は切断されずに残存し、姉妹セントロメア間の接着が維持される。
 b) 体細胞分裂においてRec8コヒーシンを強制的に発現させ機能させると、分裂後期にRec8は染色体全長にわたってセパレーズに切断され、姉妹染色分体は分離して娘細胞に均等に分配される。
 c) もし、体細胞分裂においてRec8コヒーシンを機能させ、さらにRec8のセントロメアにおける保護因子(X)を同時に発現させると、分裂後期にセントロメアのRec8が切断されずに残存し、セントロメアで姉妹染色分体が接着したままになって娘細胞に不均等に染色体が分配されると考えられる。このような娘細胞はほとんどが死に至るはずである。

図8 a

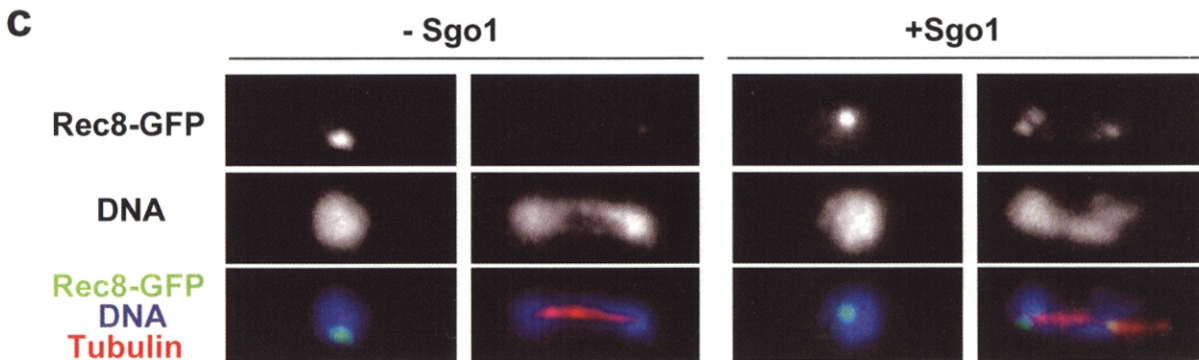
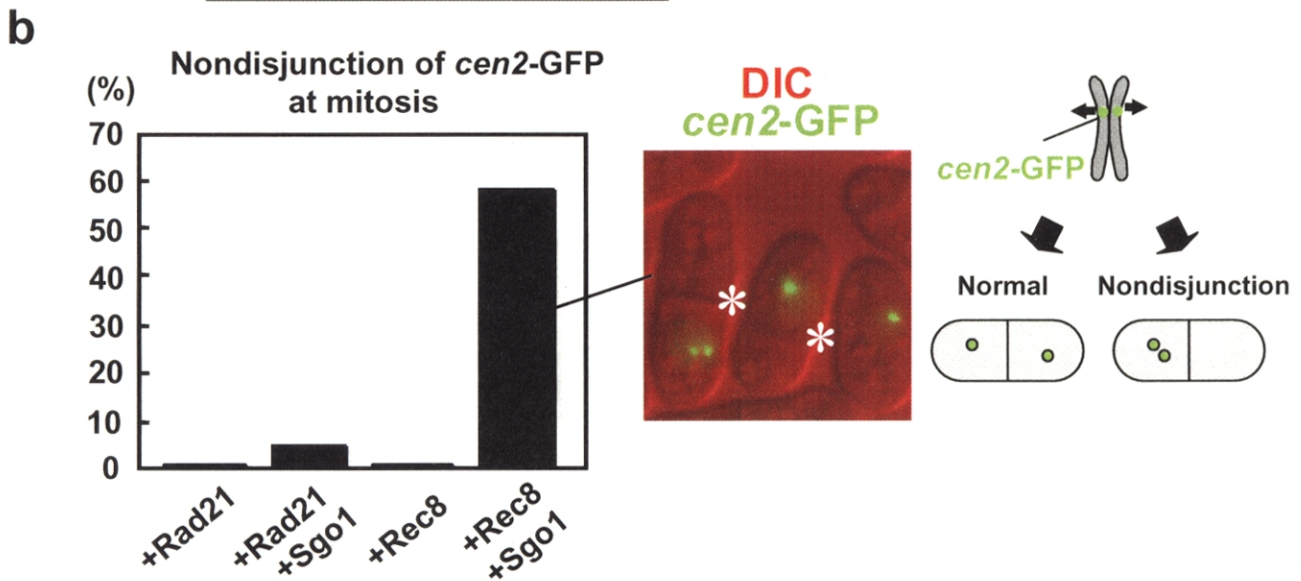
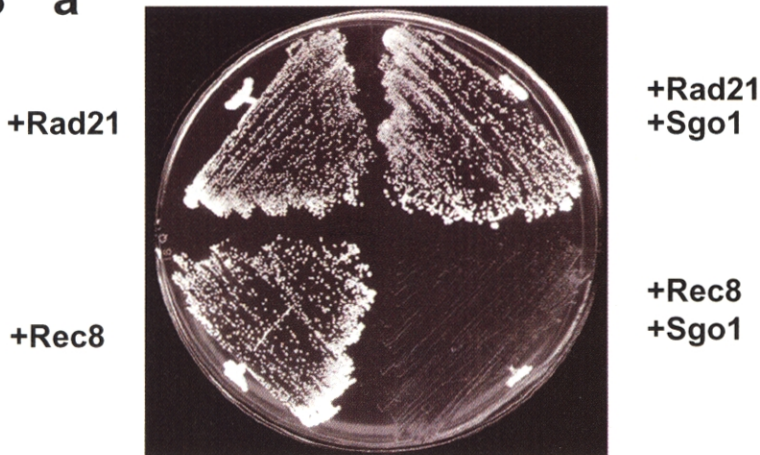


図8: 体細胞分裂において強制発現させたSgo1はRec8を分解から保護する

a) *cen2*-GFP *P_{adh1}-rad21*⁺ (PZ688, 左上), *P_{adh1}-rad21*⁺ *P_{nmt1}-sgo1*⁺ (PZ687, 右上), *P_{adh1}-rec8*⁺ (PZ690, 左下), *P_{adh1}-rec8*⁺ *P_{nmt1}-rec8*⁺ (PZ689, 右下) 株をチアミンを含まない発現誘導培地で培養した。Rec8とSgo1を同時に発現させると、細胞は生育できなかった。*P_{adh1}*は恒常的に活性のあるプロモーターであり、*P_{nmt1}*はチアミン除去により活性が誘導されるプロモーターである。

b) これらの株について、液体培地でチアミンを除くことにより発現誘導して15時間後、*cen2*-GFPシグナルを観察し、分裂後の細胞に分配された*cen2*-GFPのパターンを調べた。Rec8とSgo1を同時に発現させた細胞では*cen2*-GFPのnondisjunctionが高頻度で見られた(n>100)。DIC(赤)、*cen2*-GFP(緑)。

c) *P_{adh1}-rec8*⁺-GFP *rad21*Δ (PZ694, 左), *P_{adh1}-rec8*⁺-GFP *rad21*Δ *P_{nmt1}-sgo1*⁺ (PZ695, 右) 株を発現誘導して15時間後、ホルムアルデヒドで固定して抗GFP抗体(緑)、抗チューブリン抗体(赤)、DAPI(青)を用いて染色した。間期(左)と分裂後期(右)の細胞を示す。コントロールでは後期にRec8-GFPはほとんど残存していなかった(9%, n=129)のに対し、Sgo1を発現した細胞では高頻度に残存が見られた(84%, n=129)。