

図9

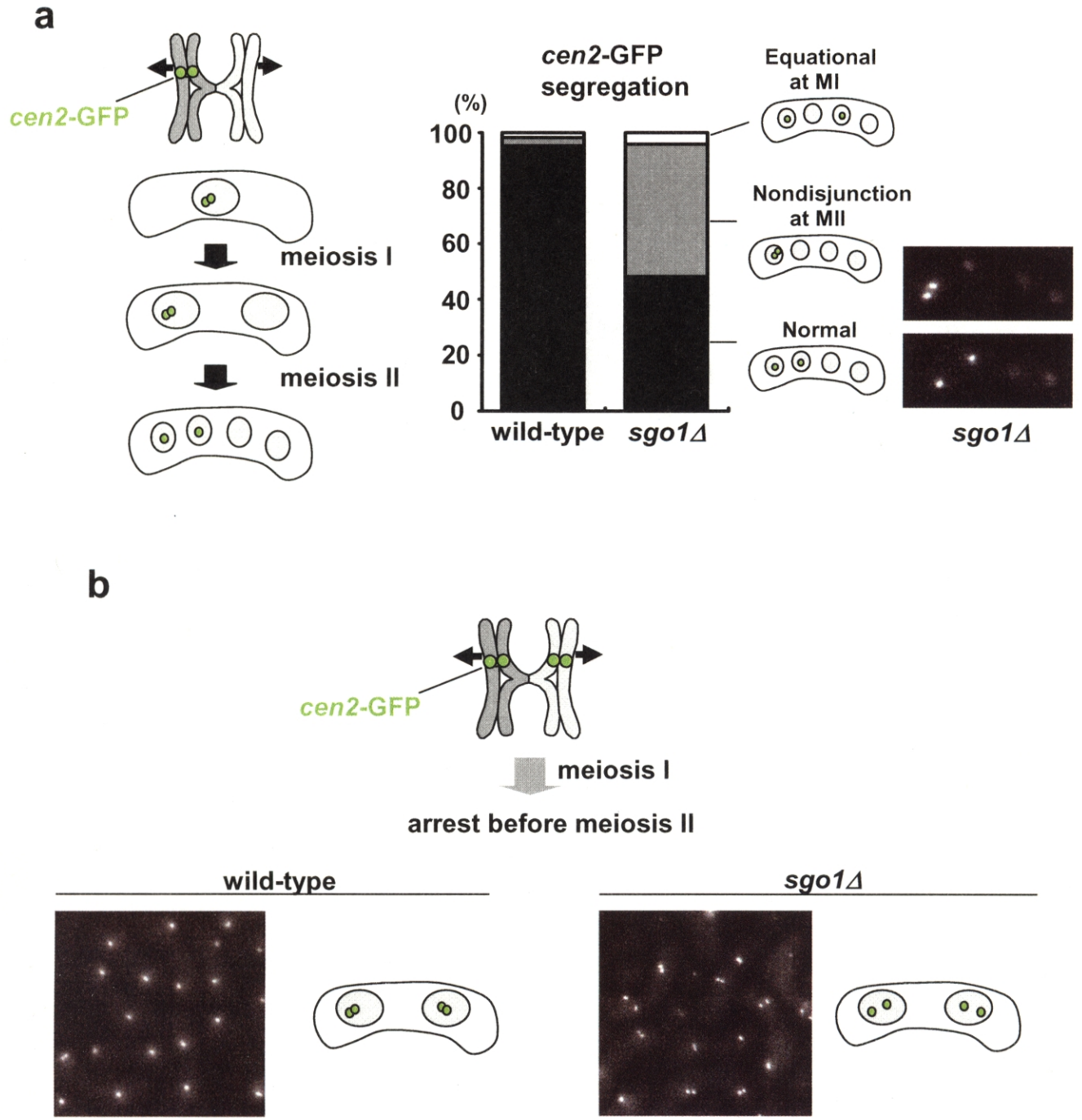


図9: Sgo1は減数第一分裂後における姉妹セントロメア間の接着の維持に必要である

a) wild-type: [JY334(*h⁺*) × PZ809 (*h⁻ cen2-GFP*)]および*sgo1Δ*: [PZ856 (*h⁺ sgo1Δ*) × PZ855 (*h⁻ sgo1Δ cen2-GFP*)] のかけ合わせにおいて、それぞれ減数分裂終了後の*cen2-GFP*の分配パターンを観察した。wild-typeでは、*cen2-GFP*が4つの核に均等に分配されるので(1,1,1,1)のパターンになる。*sgo1Δ*では、ほぼ50%の確立で(2,0,0,0)あるいは(0, 2, 0, 0)のパターンになっており、減数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ていることを示していた($n > 100$)。*sgo1Δ*の代表的な例を右に示す。

b) wild-type株: *h⁹⁰ cen2-GFP mes1-B44* (PZ164、左)、*sgo1Δ*株: *cen2-GFP mes1-B44 sgo1Δ* (PZ858、右)株を窒素源飢餓により減数分裂に誘導し、減数第一分裂後に細胞周期を停止させ、それぞれ*cen2-GFP*シグナルを観察した。wild-type株では、姉妹セントロメア間が接着しているため、姉妹染色分体上の2つの*cen2-GFP*が重なってほぼ一点に見えるが、*sgo1Δ*株ではセントロメア間の接着が失われてこれらが2点に離れて観察された。

図10

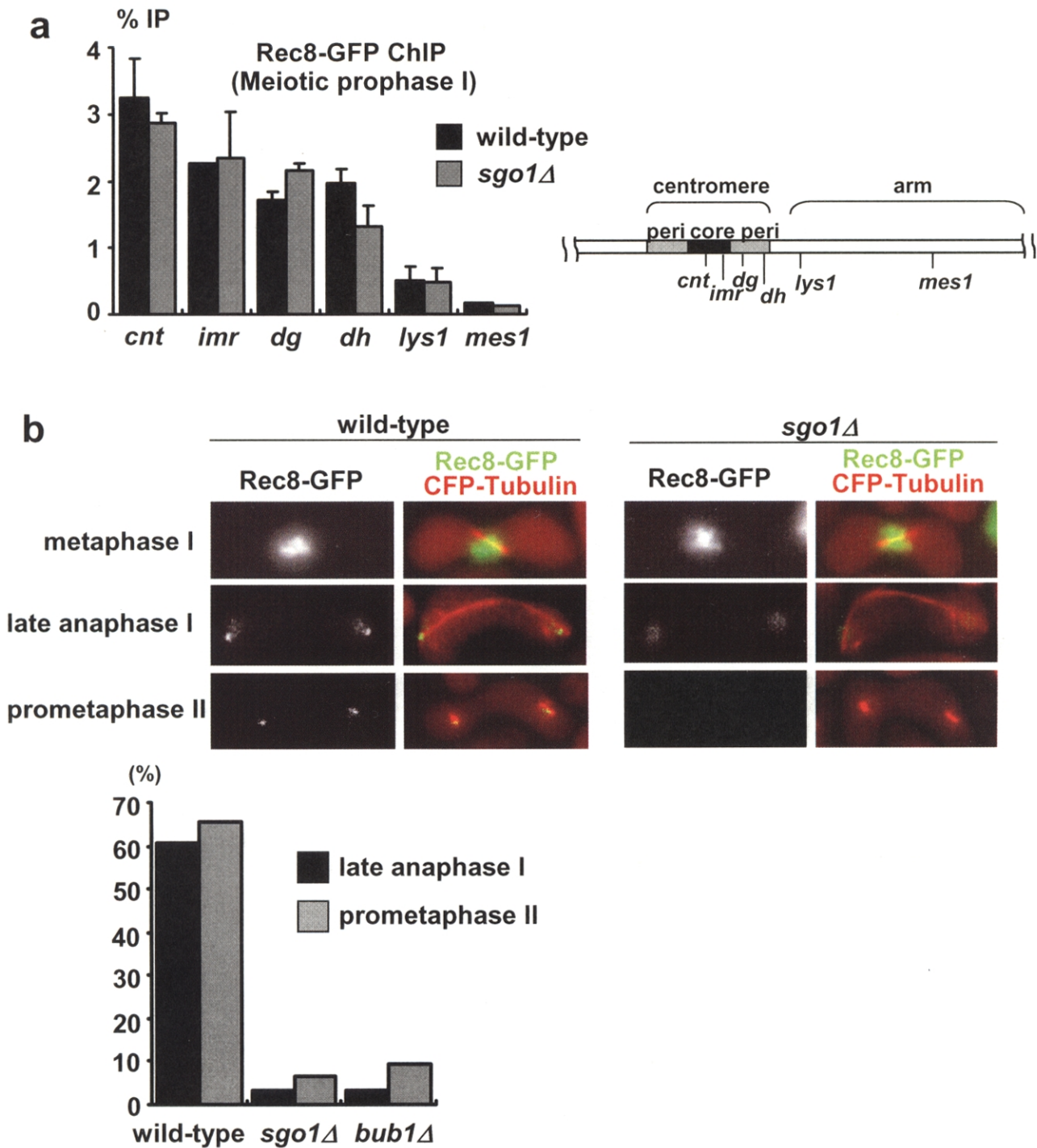


図10: Sgo1は減数第一分裂におけるセントロメアRec8の維持に必要である

a) wild-type株: PY577 ($h^+/h^- rec8^+-GFP/rec8^+-GFP mei4\Delta/mei4\Delta$)および*sgo1*Δ株: PZ887 ($h^+/h^- sgo1\Delta/sgo1\Delta rec8^+-GFP/rec8^+-GFP mei4\Delta/mei4\Delta$)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停止させ、抗GFP抗体を用いてChIP解析を行った。*cnt*、*imr* (セントロメア中央領域)、*dg*、*dh* (セントロメア周縁ヘテロクロマチン領域)、*lys1*、*mes1* (染色体腕部)をPCRのプライマーとしてそれぞれ用いた。減数第一分裂前期において*sgo1*Δ株のRec8の局在はwild-type株とほとんど変わらなかった。

b) wild-type株: PZ985 ($h^{90} rec8^+-GFP pREP81(CFP-atb2^+)$)および*sgo1*Δ株: PZ986 ($h^{90} sgo1\Delta rec8^+-GFP pREP81(CFP-atb2^+)$)を窒素源飢餓により減数分裂へ誘導し、減数第一分裂中期(上)、第一分裂後期(中)、第二分裂前中期(下)の細胞についてRec8-GFP(緑)とCFP-Tubulin(赤)シグナルを観察した。第一分裂後期と第二分裂前中期で、wild-type株では維持されているセントロメアのRec8が*sgo1*Δ株では消失していた。それぞれの時期においてセントロメアRec8-GFPが観察された細胞の割合をグラフに示した。同時にPZ987($h^{90} bub1\Delta rec8^+-GFP pREP81(CFP-atb2^+)$)についても同様に調べた。(第一分裂後期(n>30)、第二分裂前中期(n>100))。

図11

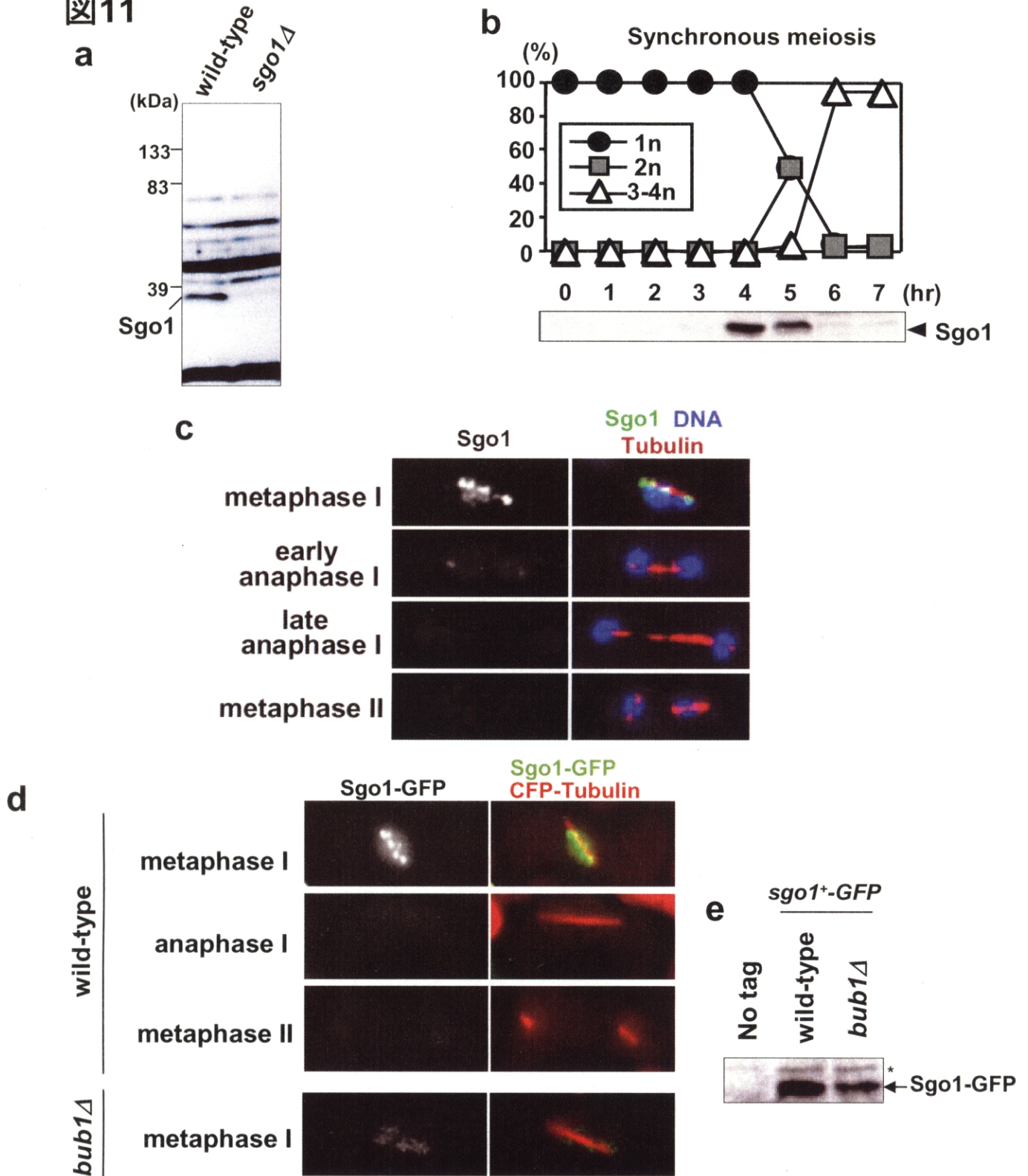


図11: Sgo1は減数第一分裂中期にドット状に局在し、後期に消失する

a) JY450 (h^{90} , wild-type)とPZ845 (h^{90} *sgo1Δ*)株を窒素源飢餓により減数分裂に誘導し、その後抗Sgo1抗体を用いてウエスタン解析を行った。35kDaにSgo1を示すバンドが検出された。

b) PZ90 (h^+/h^- *pat1-114/pat1-114*)株をG1期に同調後、制限温度にシフトして同調的な減数分裂を誘導した。1時間毎に細胞をメタノール固定してDAPI染色し、細胞内の核数を数えた($n > 100$)。4-5時間で減数第一分裂が、5-6時間で第二分裂が起こっている(上)。抗Sgo1抗体によりウエスタン解析を行った。Sgo1は減数第一分裂の前後4-5時間に蓄積し、その後分解されていた。

c) JY362 (h^+/h^-)株を窒素源飢餓により減数分裂に誘導し、パラホルムアルデヒドで固定後、抗Sgo1抗体(緑)、抗チューブリン抗体(赤)、DAPI(青)によって染色した。Sgo1は減数第一分裂中期にドット状に局在し、第一分裂後期の間に消失していた。

d) PZ988 (h^{90} *sgo1^+-GFP pREP81(CFP-atb2^+)*)とPZ990 (h^{90} *sgo1^+-GFP pREP81(CFP-atb2^+)*)株を窒素源飢餓により減数分裂に誘導し、生細胞内のシグナルを観察した。Sgo1-GFP(緑)、CFP-Tubulin(赤)。

e) d)の株について抗GFP抗体を用いてウエスタン解析を行った。アスタリスクはクロスリアクトによるものである。

図12

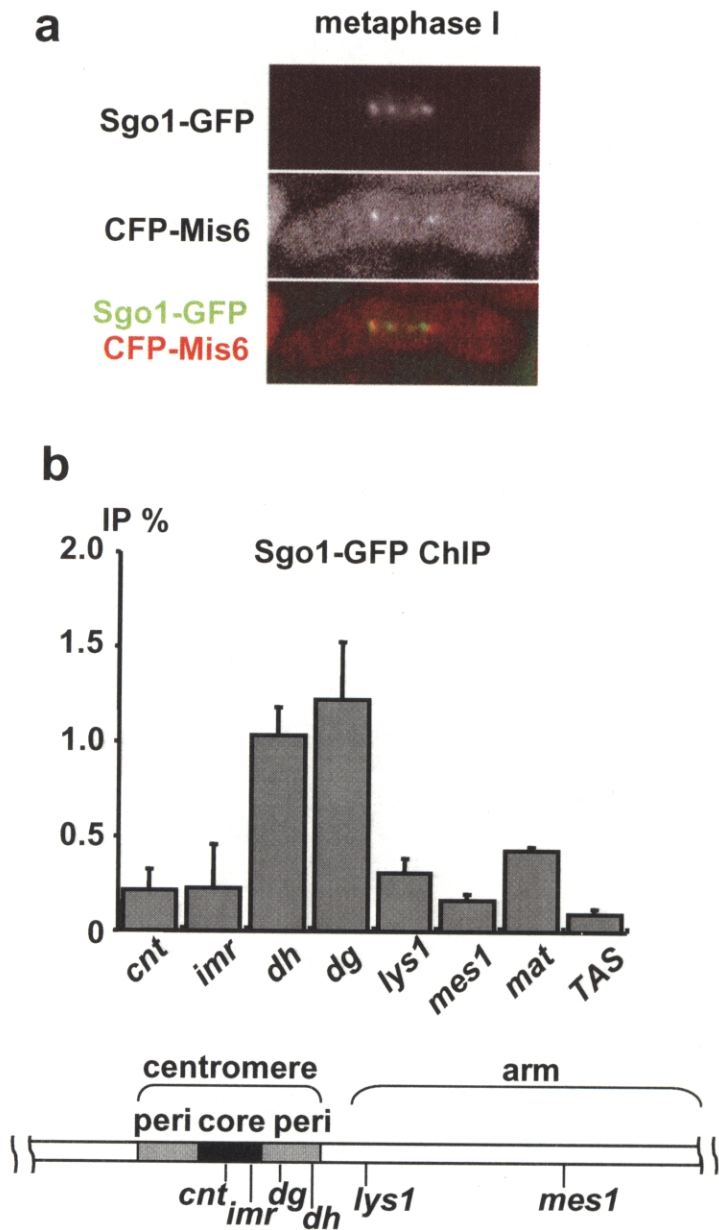


図12: Sgo1はセントロメア周縁ヘテロクロマチンに局在する

a) PZ924 (h^{90} $sgo1^+$ -GFP $pREP81(mis6^+$ -CFP))株の減数第一分裂中期においてSgo1-GFP(緑)、CFP-Mis6(赤)のシグナルを観察した。Sgo1-GFPは動原体マーカークFP-Mis6と密接して局在していた。

b) PZ955 (h^+/h^- $sgo1^+$ -GFP/ $sgo1^+$ -GFP P_{rad21} - $slp1^+$ / P_{rad21} - $slp1^+$)株を窒素源飢餓により減数分裂に誘導し、減数第一分裂中期に停止させ、抗GFP抗体を用いてChIP解析を行った。*cnt*、*imr* (セントロメア中央領域)、*dg*、*dh* (セントロメア周縁ヘテロクロマチン領域)、*lys1*、*mes1* (染色体腕部)、*mat* (mating-type locus)、TAS(テロメア)をPCRのプライマーとして用いた。Sgo1はセントロメア周縁ヘテロクロマチン領域に特異的に局在していた。

図14

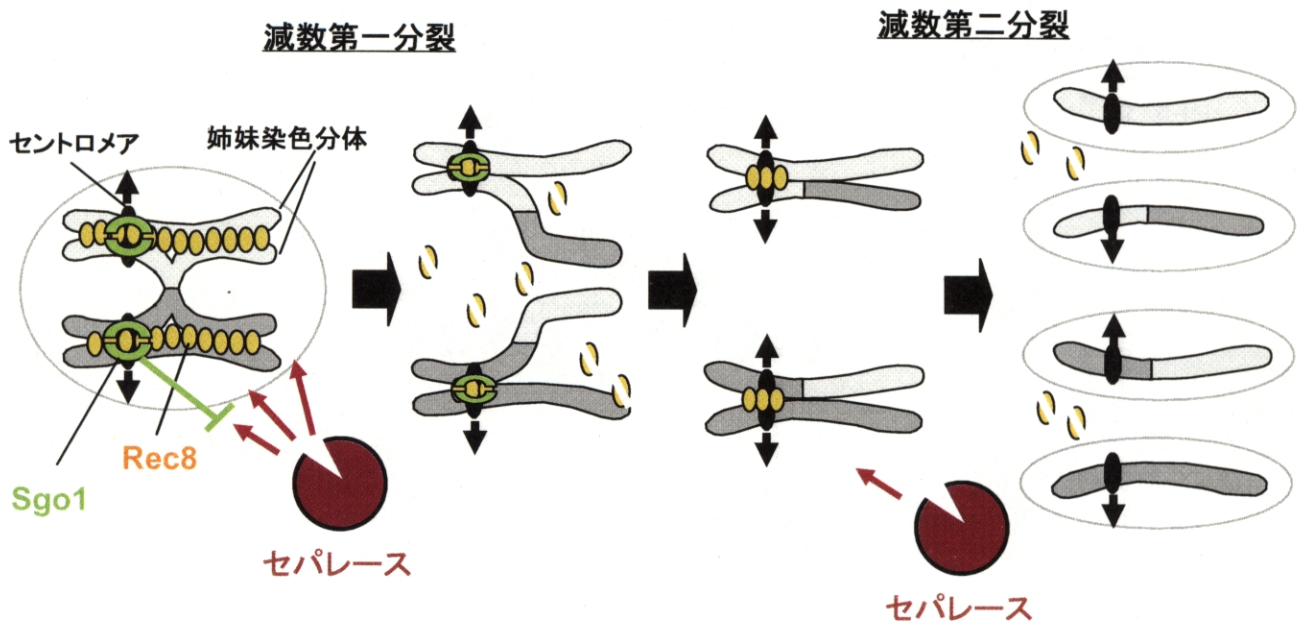


図14: Sgo1は減数第一分裂においてセントロメアのRec8をセパレーズによる切断から保護する
減数第一分裂において、染色体腕部のRec8がセパレーズに切断されることにより相同染色体が分離するが、一方でセントロメアではSgo1がRec8をセパレーズによる切断から保護するので、姉妹セントロメア間の接着は維持されて姉妹染色分体は分離しない。セパレーズは減数第二分裂後期には再度活性化されたセパレーズがセントロメアのRec8を切断して姉妹染色分体を分離させると考えられる。

図15

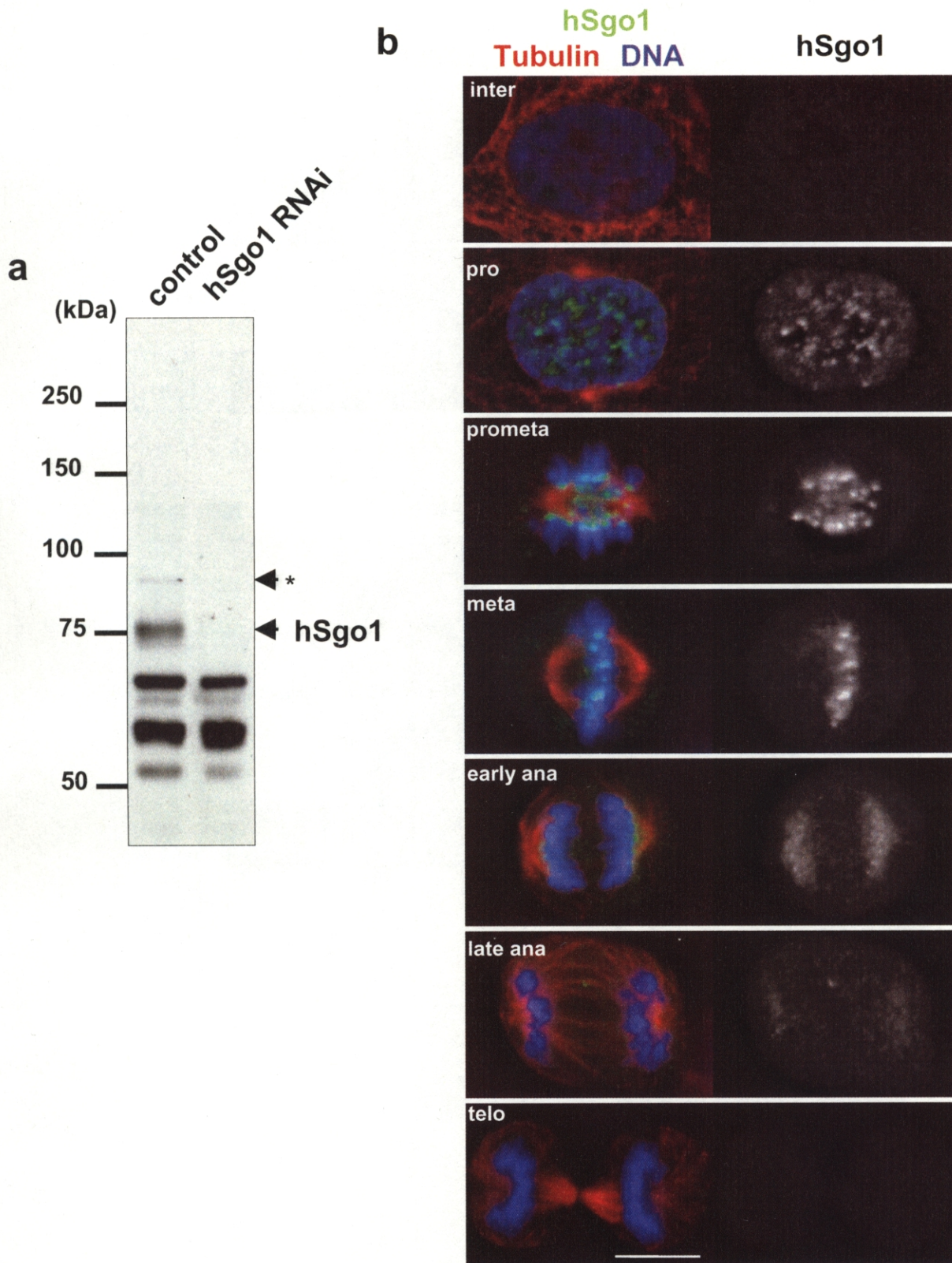


図15: hSgo1は体細胞分裂の分裂期においてドット状に局在する

a) HeLa細胞に対しhSgo1のRNAiを行い、2日後に分裂期の細胞を回収し、抗Sgo1抗体を用いてウエスタン解析を行った。75kDaにhSgo1に対応するバンドを検出し、これはhSgo1 RNAiにより消失した。アスタリスクで示したバンドもhSgo1 RNAiで消失したことから、このバンドは何らかの翻訳後修飾を受けたhSgo1に対応するのかもしれない。

b) HeLa細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、抗hSgo1抗体(緑)、抗チューブリン抗体(赤)、Hoechst33342 (青)で染色した。hSgo1は分裂期の前期から中期までドット状のシグナルを示し、後期の間に消失していた。scale bar = 10 μ m

図16

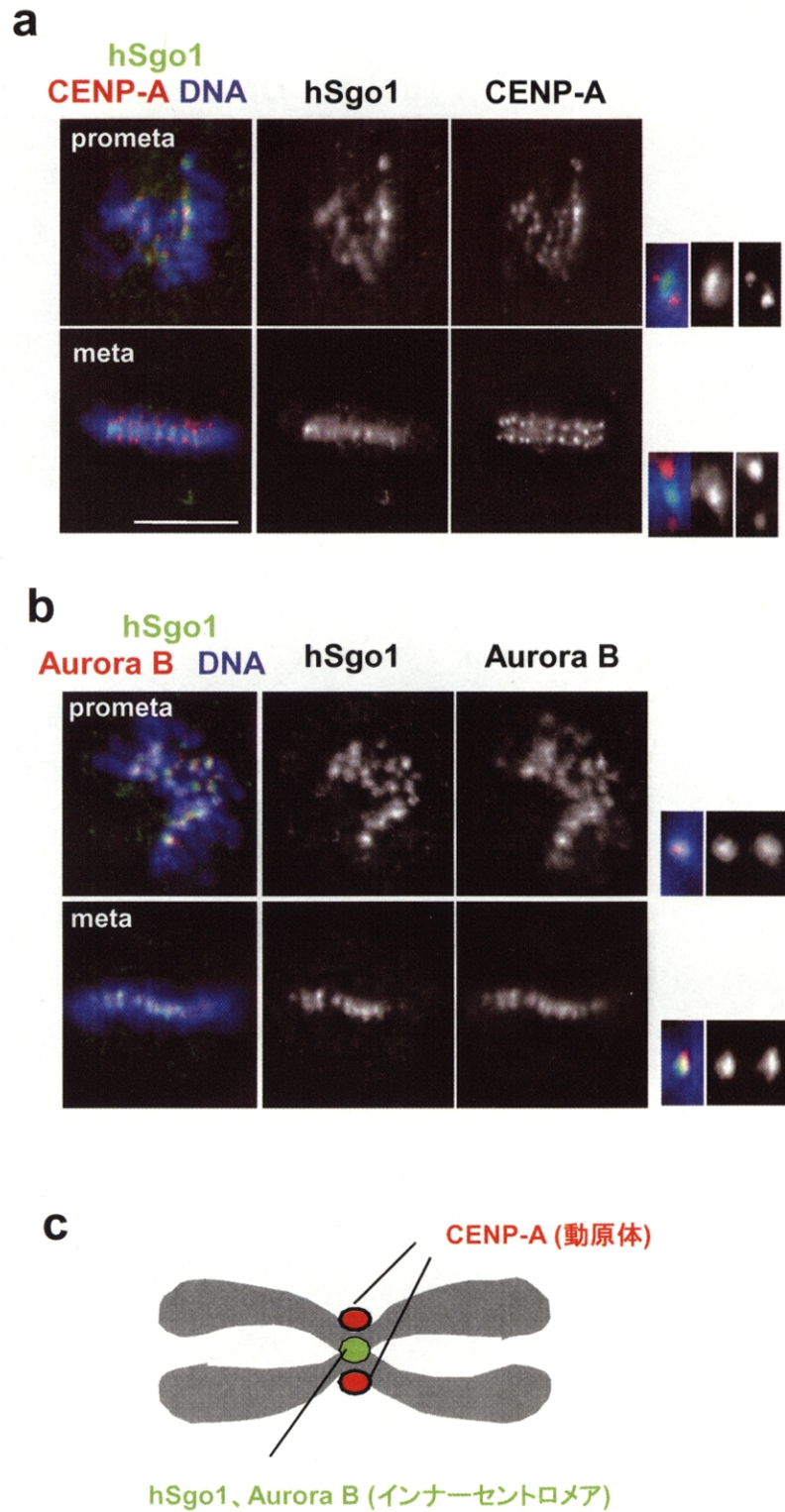


図16: hSgo1は体細胞分裂の分裂期においてセントロメアに局在する

a) HeLa細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、hSgo1(緑)と動原体タンパク質CENP-A(赤)を免疫染色し、分裂前中期および中期の細胞についてそれらの局在を比較した。hSgo1は2つのCENP-Aシグナルに挟まれるように局在していた。

b) hSgo1(緑)とインナーセントロメアタンパク質Aurora B(赤)を免疫染色し、分裂前中期および中期の細胞についてそれらの局在を比較した。hSgo1とAurora Bの局在は一致していた。

c) hSgo1とAurora Bはインナーセントロメアに局在し、CENP-Aはその外側の動原体に局在する。scale bar = 10 μ m