

学位論文

Moa1-Plo1 によるセントロメアの接着保護機構の研究

( Study of centromeric cohesion protection mediated by Moa1-Plo1 )

平成 28 年 12 月博士 (理学) 申請

東京大学大学院理学系研究科  
生物化学専攻

宮崎聖良

## 要旨

“減数分裂”は次の世代へと遺伝情報を引き継ぐために非常に重要な過程である。減数分裂期では DNA 複製に伴って姉妹染色分体が接着した後、二回の連続した分裂が起きる。第一分裂では姉妹染色分体は同一極へと分配され、続く第二分裂では両極へと分配される。第二分裂を正確に行うためには、第一分裂期でセントロメア領域の接着が保護される必要がある。このセントロメアの接着保護は、Bub1 キナーゼに依存してセントロメアへ集積する Sgo1 によって担われている。また減数第一分裂期特異的な動原体因子 Moa1 も、セントロメアの接着を保護する機能があることが知られていたが、その詳細な分子メカニズムはこれまで明らかになっていなかった。

本研究では、Moa1 依存的なセントロメア接着の保護には、Moa1 によって動原体に局在化される Plo1 キナーゼの活性によって担われていることを明らかにした。さらに、減数第一分裂期においては、Mph1 と Moa1-Plo1 の二つのキナーゼが協調して動原体因子 Spc7 をリン酸化し、Bub1 の動原体局在化を制御するとともに、Bub1 の下流である Sgo1 のセントロメア局在化を促進することが分かった。*mph1Δ moa1Δ* 二重変異体で観察されたセントロメア接着保護の欠損は、Bub1 を強制的に動原体へ局在化させることで抑圧されたことから、Moa1-Plo1 は Bub1 の動原体局在化を介してセントロメアの接着保護を促進することが明らかとなった。さらに、Moa1-Plo1 は、Sgo1 のセントロメア局在化以外の経路でも、セントロメア接着保護を促進する機能があることが示唆された。

## Abstract

Meiosis is an essential process to inherit their genome to next generation. During meiosis, one round of DNA replication is followed by two consecutive nuclear divisions, resulting in the production of four haploid nuclei or gametes. In meiosis I, sister chromatids are captured by spindle microtubules emanating from the same pole (mono-orientation), whereas in following meiosis II, sister chromatids are captured from opposite poles (bi-orientation). For faithful segregation in meiosis II, centromeric cohesion must be protected throughout meiosis I. This protection is mediated by Sgo1, which accumulates at centromeres depending on kinetochore kinase Bub1. Furthermore meiosis specific kinetochore protein Moa1 also play a role in protecting centromeric cohesion, although underlying molecular mechanisms have been unidentified.

Here I showed that Moa1-dependent cohesion protection at centromeres is largely mediated by Plo1 kinase, which is recruited to kinetochores by Moa1. I showed that during meiosis I, Moa1-Plo1 together with Mph1 phosphorylates the kinetochore protein Spc7, which thereby recruits Bub1 to kinetochores, and thereby Sgo1 to centromeres. Protection defects in *moa1Δ mph1Δ* cells was suppressed by ectopically localizing Bub1 to kinetochores, suggesting that Moa1-Plo1 has a function for cohesion protection by promoting Bub1 localization. Furthermore, it was suggested that Moa1-Plo1 plays another function for cohesion protection in addition to the regulation of Sgo1 localization.

## 目次

序	2
材料と方法	9
結果と考察	26
1. <i>Moa1-Plo1</i> はセントロメアの接着保護に必要である	26
2. 減数第一分裂期において <i>Moa1-Plo1</i> と <i>Mph1</i> は <i>Bub1</i> のセントロメア局在を促進する	28
3. <i>Plo1</i> と <i>Mph1</i> は協調的に SAC を活性化する	30
4. <i>Plo1</i> 依存的な <i>Spc7</i> のリン酸化が <i>Bub1/Bub3</i> 複合体との相互作用を促進する	31
5. <i>Sgo1</i> のセントロメア局在は <i>Mph1</i> と <i>Plo1</i> によって協調的に制御される	33
6. セントロメアの接着の保護は <i>Mph1</i> と <i>Plo1</i> によって協調的に制御される	34
7. セントロメア接着保護は <i>Bub1</i> の動原体局在化と <i>Swi6</i> により制御される	35
8. <i>Moa1-Plo1</i> は <i>Sgo1</i> のセントロメア局在化以外の経路でセントロメア接着保護を促進する	36
まとめと展望	37
引用文献	41
謝辞	47
図	

## 序

遺伝情報を担う染色体を正しく分配することは、全ての生物の存続にとって重要である。遺伝情報が母細胞から娘細胞へと正確に受け継がれるためには、染色体分配を正しく行う必要があり、緻密なメカニズムにより制御されている。真核生物は自らのコピーを作り増殖する際に行う体細胞分裂と、染色体数を半減させて配偶子を形成する際に行う減数分裂の、二つの細胞分裂様式を有している。体細胞分裂期に染色体分配の異常が生じると、多くの場合細胞死が誘発されるが、一部の生存した細胞が癌化したり、癌の悪性を促進すると考えられている(Jallepalli and Lengauer, 2001)。また減数分裂期における染色体分配の異常は、早期流産や不妊、またダウン症やクラインフェルター症といった先天性の遺伝性疾患の原因となると考えられている。

S 期 (DNA 合成期) に複製された姉妹染色分体は、コヒーシン複合体によって接着される (図 1A)。コヒーシン複合体は、SMC (structural maintenance of chromosome) サブユニットである Smc1, Smc3 (分裂酵母では Psm1, Psm3) と、kleisin サブユニット、アクセサリサブユニット Scc3 (分裂酵母では Psc3) からなるリング状の構造をとり (Nasmyth, 2001)、コヒーシン複合体が姉妹染色分体を取り囲むようにして接着するというモデルが提唱されている (Nasmyth and Haering, 2005)。体細胞分裂期と減数分裂期では kleisin サブユニットが異なり、分裂酵母ではそれぞれ Rad21、Rec8 が担っている。コヒーシンの染色体上へのローディングは分裂終期から G1 期にかけて Scc2-Scc4 依存的に起こり (Ciosk et al., 2000)、姉妹染色分体間の接着は S 期に DNA 複製と協調して起きると考えられている (Lengronne et al., 2006) (図 1B)。この姉妹染色分体間の接着は、分裂期において染色体を二つの娘細胞に均等に分配するために必要である。分裂期に

入ると両極から伸長してきたスピンドル微小管によって動原体が捉えられる。このとき、スピンドル微小管と動原体が正しく結合した場合にのみ、スピンドル微小管による引力と姉妹染色分体間の接着力が拮抗して張力が発生して結合が安定化し、細胞は分裂後期へと進行する。

分裂後期で染色体を分配するためには、姉妹染色分体間の接着を解除する必要がある、プロテアーゼであるセパレーズの活性に依存している。セパレーズは、コヒーシン複合体のうち *kleisin* サブユニット (*Rad21/Rec8*) を切断分解することで、コヒーシンのリング構造が開環し、コヒーシン依存的に接着していた姉妹染色分体は解離し、二つの娘細胞へ分配される (Nasmyth and Haering, 2009; Onn et al., 2008; Peters et al., 2008; Uhlmann et al., 1999)。

このようにセパレーズの活性化が姉妹染色分体の解離を伴う分裂後期への進行を引き起こすのだが、細胞は分裂中期までセパレーズの活性を抑制する機構として *spindle assembly checkpoint : SAC* を備えている (Musacchio and Hardwick, 2002)。分裂期では両極から伸長してきたスピンドル微小管によって姉妹染色分体の動原体が捉えられ、二方向性結合が確立し、染色体が赤道面に整列する。*SAC* はすべての動原体とスピンドルとの結合が正しく行われるまで、分裂後期への移行を阻害する機構であり、正しい染色体分配を保証している。スピンドルに捉えられていない動原体が存在すると、*SAC* 因子が動原体へと集積して *SAC* シグナルを活性化する。活性化された *SAC* シグナルは分裂後期への進行に必要な E3 ユビキチンリガーゼである *APC/C* (*anaphase promoting complex/cyclosome*) に結合して活性を阻害し、分裂後期への進行を防いでいる。すべての動原体がスピンドル微小管によって捕らえられると、*SAC* は解除されて *APC/C* が活性化する (London and Biggins, 2014)。活性化した *APC/C* は、セパ

レースの阻害因子であるセキュリンをユビキチン化することで分解へと導く (図 1B)。セパレースを活性化することによって、姉妹染色分体間のコヒーシ  
ンが切断されて、染色体はスピンドル微小管により両極へと分配される(Wirth et al., 2006)。

体細胞分裂期では姉妹染色分体が二つの娘細胞へ均等に分配されるのに対し  
て、減数分裂期では一回の DNA 複製の後、二回の連続した染色体分配が起き、  
4 つの配偶子を形成する (図 2A)。減数分裂期では、DNA 複製の後、相同染色  
体がキアズマを介して物理的に結合し (二価染色体)、第一分裂では相同染色体  
の均等分配、すなわち姉妹染色分体が同一極へと分配される還元分配が行われ  
る。このとき姉妹動原体は横並びに融合したような構造をとることで同一極か  
ら伸長してきたスピンドル微小管に捉えられやすく (一方向性結合)、キアズマ  
を介して相同染色体間に張力が発生することで SAC が解除される。セパレース  
は姉妹染色分体腕部のコヒーシンを切断することでキアズマを解消し、相同染  
色体が切り離される。このときセントロメア付近のコヒーシンは、減数分裂期  
特異的な因子である Sgo1 依存的に保護され、セパレースによる切断から免れる  
(Kitajima et al., 2004, 2006; Marston et al., 2004; Rabitsch et al., 2004)。第二分裂では、  
Sgo1 依存的に保護されたセントロメアの接着により、両極から伸長してきたス  
ピンドル微小管によって動原体が捕らえられる二方向性結合が確立して、SAC  
が解除される。その後、再び活性化されたセパレースがセントロメアに残存し  
ているコヒーシンを切断することで、染色体が両極へと分配される (均等分配)。  
*sgo1Δ* 変異体では第一分裂でセントロメアの接着が完全に失われるため、第二  
分裂では染色体がランダムに分配される (図 3)。

減数第一分裂期で見られる還元分配と、体細胞分裂期や減数第二分裂で見ら

れる均等分配の、二つの染色体分配様式の違いは、分裂酵母においてよく解析されており、セントロメア領域のコヒーシンのによる接着の違いに起因することが知られている(Sakuno et al., 2009; Watanabe, 2012) (図 2B)。セントロメアの接着の違いはコヒーシンスブユニットの一つである kleisin に依存しており、体細胞分裂期では Rad21 が、減数分裂期では Rec8 が担っている(Watanabe and Nurse, 1999)。分裂酵母のセントロメアはリピート配列上にヘテロクロマチンが構成される外側領域と、動原体が形成される中央領域の二つの領域からなり、高等真核生物と類似した構造をとる(Cleveland et al., 2003; Hauf and Watanabe, 2004; Takahashi et al., 1992)。体細胞分裂期では Rad21 コヒーシスがセントロメア外側領域のみを接着し、中央領域は開いたような構造をとる。その結果両極から伸長してきたスピンドル微小管によって動原体が捕らえられる二方向性結合が確立する。一方、減数第一分裂期では、Rec8 コヒーシスがセントロメア外側領域に加えて中央領域も接着することで、姉妹動原体は横並びに融合したような構造をとり、同一方向を向きやすくなる(Sakuno et al., 2009)。そのため、姉妹動原体が同一極から伸長してきたスピンドル微小管によって捕らえられる一方向性結合が確立しやすくなる。さらに相同染色体間の結合（キアズマ）を介して、相同染色体間に張力が発生することでこの一方向性結合が安定化し、第一分裂では還元分配が起きる(Sakuno et al., 2011; Watanabe, 2012)。Rec8 コヒーシン依存的なセントロメア中央領域の接着には、減数分裂期特異的な動原体因子である Moa1 が重要な働きをすることが知られている(Yokobayashi and Watanabe, 2005)。分裂酵母で発見された Moa1 は、アミノ酸配列レベルでの相同性は示さないものの、マウスにおいて機能的なホモログである MEIKIN の存在が報告されており、進化的に保存された重要な機能を持つタンパク質であることが示唆される(Kim



et al., 2015)。 *moa1Δ* 変異体では、Rec8 コヒーシンがセントロメア中央領域に局在するものの、接着が成り立たない。その結果、減数第一分裂期においても二方向性結合が確立しやすくなる。しかし、相同染色体間の結合（キアズマ）があるときは、キアズマ依存的に相同染色体間に張力が発生するため、一方向性結合が安定化されやすく、その結果、多くの染色体は減数第一分裂期において還元分配の様式を示す。このとき、続く第二分裂では染色体の不分離が観察されることから、Sgo1 と同様に Moa1 にもセントロメア領域の接着を保護する機能が示唆されていた（図 3）。しかし、その詳細な分子メカニズムはこれまで明らかにされていなかった。また、Rec8 コヒーシンによるセントロメア中央領域の接着には、Moa1 によって呼び込まれる Plo1 のキナーゼ活性が必須であることが分かっているが(Kim et al., 2015)、Plo1 の基質やその詳細な分子メカニズムは未だ明らかとなっていない。

このように Moa1 と Sgo1 は減数分裂期の染色体分配を規定する非常に重要な減数分裂期特異的な因子であり、Moa1 と Sgo1 が機能するためにはセントロメア領域へ集積する必要がある。Moa1 は動原体因子 Cnp3 と直接結合して動原体へと集積する(Tanaka et al., 2009)。一方、Sgo1 のセントロメア集積には SAC 因子である Bub1 キナーゼと、ヘテロクロマチン因子である Swi6 が重要な働きをすることが知られている(Kawashima et al., 2010; Yamagishi et al., 2008)（図 4）。すなわち、Bub1 は動原体近傍でヒストン H2A のスレオニン残基をリン酸化して、Sgo1 とリン酸化ヌクレオソームとの相互作用を促進する(Kawashima et al., 2010)。また、セントロメア外側領域に集積する Swi6 と Sgo1 の直接的な結合によって、セントロメアの Sgo1 の局在が安定化されることも知られている(Yamagishi et al., 2008)。Bub1 のキナーゼ活性を持たない変異体や、Swi6 と結合できない Sgo1 の

変異体では、Sgo1 のセントロメア局在が減少するため、減数第一分裂でコヒーシンが保護されず、第二分裂がランダムな分配を呈することが知られている。

Bub1 は分裂期に動原体へ局在して、SAC の活性化と Shugoshin (Sgo1, Sgo2) のセントロメア局在を促進する二つの重要な機能を持っている。Bub1 が機能するためには分裂期に動原体へ集積することが必要であり、その局在化機構は体細胞分裂期においてよく知られている (図 4)。すなわち、SAC の最上流因子である Mph1 が、動原体因子 Spc7 の保存された MELT 配列をリン酸化し、Bub1-Bub3 複合体とリン酸化 Spc7 の相互作用を促進させることで、Bub1 が動原体へと局在する (Shepperd et al., 2012; Yamagishi et al., 2012)。体細胞分裂期において Bub1 の動原体局在は、*mph1Δ* 変異体や *spc7* の非リン酸化型変異体で完全に消失することが知られていたが、減数分裂期における Bub1 の動原体局在化機構については解析されていなかった。

本研究では Moa1-Plo1 による減数分裂期の染色体分配制御機構、特にこれまで詳細な分子機構が明らかにされていなかった、セントロメア接着の保護機構について、理解を深めることを目的として解析を進めた。

初めに *moa1Δ* 変異体において、減数第一分裂後にセントロメア領域の接着が失われることを確認した。この Moa1 依存的なセントロメア接着の保護には、Plo1 のキナーゼ活性が必要であることが分かった。減数分裂期において、Sgo1 のセントロメア集積に必要な Bub1 の動原体局在化は、Mph1 と Moa1-Plo1 の二つのキナーゼによって協調的に制御されることが分かった。また、Plo1 による Bub1 の動原体局在化には、Mph1 と同様に Spc7 の MELT 配列のリン酸化を介していることが明らかとなった。*moa1Δ* 変異体と比較して、*moa1Δ mph1Δ* 二重変異体では、Sgo1 のセントロメア局在が失われるために、セントロメア接着保護

の欠損が亢進した。*moa1Δmph1Δ*二重変異体で見られたセントロメア接着保護の欠損は、*spc7-12E* 変異によって Bub1 を強制的に動原体へ局在化させることで、部分的に抑圧された。Bub1 の動原体局在化が失われる *spc7-12A* 変異体は、*mph1Δ moa1Δ*二重変異体と同程度に Sgo1 のセントロメア集積が失われるものの、セントロメア接着保護の欠損は観察されなかった。このとき、*swi6* 遺伝子の破壊や、Swi6 と結合できない Sgo1 の変異 (*sgo1-VE*) を組み合わせると、セントロメア接着保護の欠損が亢進した。これより Mph1 と Moa1-Plo1 による Spc7 のリン酸化を介した Bub1 の動原体集積は、Swi6 と協調して Sgo1 のセントロメア集積を促進し、セントロメア接着保護を制御することが示唆された。さらに、*spc7-12A moa1Δ* 二重変異体や *sgo1-VE moa1Δ*二重変異体において、*moa1Δ*変異体で観察されたセントロメア接着保護の欠損が亢進したことから、Moa1 は Sgo1 のセントロメア集積に加えて、他の経路でセントロメア接着保護を促進する可能性が示唆された。以上の結果から Moa1-Plo1 は Spc7 のリン酸化を介して Bub1 の動原体局在化を促進することで、Sgo1 のセントロメア局在化を制御するとともに、Sgo1 のセントロメア局在化とは異なる経路で、セントロメア接着保護を促進することが明らかとなった。

## 材料と方法

### 1. 大腸菌株

表 1 に本研究で用いた大腸菌株を示した。プラスミドの構築、分裂酵母からのプラスミド DNA の回収、一般的な遺伝子操作には DH5 $\alpha$  を用い、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]) または Terrific brouth 培地 (1.2% Bacto Trypton, 2.4% Yeast extract, 0.6% glycerol, 17mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 72mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) で培養した。培地には、必要に応じて終濃度 40  $\mu$ g/ml ampicilin または 35  $\mu$ g/ml kanamycin を添加して用いた。寒天培地として使用する際は、1 リットル当たり 20 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

DH5 $\alpha$	<i>deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(rk-mk+), recA1, relA1, supE44, thi-1, <math>\Delta</math> (lac ZYA-argF)U169, <math>\phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math> M15, F-, <math>\lambda</math>-</i>
BL21(DE3)	<i>F- ompT hsdSb (rB-mB-) gal (<math>\lambda</math>cl857 ind1 Sam7 nin5 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、アガロースゲル電気泳動、大腸菌の形質転換等の操作は、標準的なプロトコルにしたがって行った(Sambrook et al., 1989)。プラスミドベクターとして pUC119、pCR2.1-TOPO、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. 大腸菌からの組換えタンパク質の精製

*spc7<sup>+</sup>*、*plo1<sup>+</sup>*の cDNA を pGEX4T-1 (Pharmacia) に、*mph1<sup>+</sup>*の cDNA を pGEX4T-2 (Pharmacia) にそれぞれクローニングし、大腸菌 BL21 に導入して GST (glutathione-S transferase) 融合組換えタンパク質を発現させた。大腸菌を LB 培地、37°C で OD<sub>600</sub>=0.2 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 4-6 時間培養後、細胞を遠心回収し、可溶化 buffer (40mM Tris-HCl (pH7.5), 0.5mM EDTA, 0.5% Triton X-100 , 150mM NaCl, PMSF) に懸濁し、ソニケーションを 30 秒、4 回行った。遠心して沈殿物を取り除き、上清を Glutahione セファロース (GE) と 4°C で 2 時間混和し、その後ビーズを可溶化 buffer で洗浄した。その後 kination buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100, 150mM NaCl, 20mM Glutahione) を用いて溶出した。

### 4. 分裂酵母株

本研究で用いた分裂酵母の株とその遺伝子型を表 2 に示す。

表 2

図 5A, B	PL	67	h+	<i>leu1 mes1 imr1-ura4-GFP</i>
	PB	127	h-	<i>leu1 mes1 ade6-M216 Z::natr-Padh13-mCherry-atb2</i>
	PD	753	h+	<i>leu1 mes1 imr1-ura4-GFP Δsgo1::kanr ade6-M21?</i>
	PB	128	h-	<i>leu1 Δsgo1::kanr mes1 (ade6-M216?) imr1-ura4-lacO</i>

				<i>Z::natr-Padh13-mCherry-atb2</i>
	PF	558	h+	<i>leu1 mes1 imr1-ura4-GFP Δmoa1::natr</i>
	PF	582	h-	<i>Δmoa1::kanr Δmph1::HB Z::natr-Padh13-mCherry-atb2 mes1-B44 leu1</i> <i>Ade+</i>
	PL	952	h+	<i>ade6 leu1 mes1 bub1(K762R,D900N) imr1L&lt;&lt;ura4+-lacO</i> <i>his7+&lt;&lt;Pdis1-GFP-lacI</i>
	PL	947	h-	<i>ade6 leu1 mes1 bub1(K762R,D900N)</i>
☒ 5C	PL	67	h+	<i>leu1 mes1 imr1-ura4-GFP</i>
	PE	918	h+	<i>leu1, mes1-B44, imr1&lt;&lt;lacO&lt;&lt;ura4+, his7+&lt;&lt;Pdis1-lacI-GFP, plo1-tev</i>
	PE	927	h-	<i>plo1(341,405tev), leu1, mes1-B44, rec12-15::LEU2, Δ</i> <i>lys1::Prec8-Cnp3C-CFP&lt;&lt;Hyg.B</i>
	PE	928	h-	<i>plo1(341,405tev), leu1, mes1-B44, rec12-15::LEU2, Δ</i> <i>lys1::Prec8-Cnp3C-CFP-TEVp&lt;&lt;Hyg.B</i>
☒ 5D	PH	634	h+	<i>leu1, imr1L-GFP, mes1-B44</i>
	JZ	874	h-	<i>mes1 leu1 ade6-M216</i>
	PH	650	h+	<i>leu1, imr1L-GFP, mes1-B44, moa1::NATr</i>
	PZ	269	h-	<i>mes1-B44 moa1::kanr leu1 ade6</i>
	PD	774	h+	<i>leu1, mes1-B44, imr1&lt;&lt;lacO&lt;&lt;ura4+, his7+&lt;&lt;Pdis1-lacI-GFP,</i> <i>3PK-moa1-T101A</i>
	PD	773	h-	<i>ade6-M216, leu1, mes1-B44, 3PK-moa1-T101A</i>
☒ 5E	PH	650	h+	<i>leu1, imr1L-GFP, mes1-B44, moa1::NATr</i>
	PZ	269	h-	<i>mes1-B44 moa1::kanr leu1 ade6</i>
	PH	656	h-	<i>leu1, ade6, mes1-B44, moa1::kanr, lys1</i> <i>Δ::Prec8-cnp3C-CFP-plo1N&lt;&lt;hygr</i>
	PH	657	h-	<i>leu1, ade6, mes1-B44, moa1::kanr, lys1</i> <i>Δ::Prec8-cnp3C-CFP-plo1NKR&lt;&lt;hygr</i>
☒ 6A	PJ	414	h90	<i>bub1-GFP&lt;&lt;kanr leu1 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
	PC	793	h90	<i>bub1-GFP&lt;&lt;kanr leu1 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr mph1::hygr</i>
☒ 6B	PC	896	h90	<i>mph1-GFP-hygr ade6-M216 leu1 z::Padh13-mCherry-atb2&lt;&lt;natr</i>

	PF	389	h90	<i>plo1-GFP-kanr leu1 pNATZA13-mCherry-atb2</i>
	PF	390	h90	<i>plo1-GFP-kanr moa1::ura4 leu1 pNATZA13-mCherry-atb2</i>
☒ 6C	PJ	414	h90	<i>bub1-GFP&lt;&lt;kanr leu1 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
	PC	793	h90	<i>bub1-GFP&lt;&lt;kanr leu1 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr mph1::hygr</i>
	PJ	415	h90	<i>bub1-GFP&lt;&lt;kanr moa1::kanr leu1 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
	PC	794	h90	<i>bub1-GFP&lt;&lt;kanr moa1::kanr leu1 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr mph1::hygr</i>
	PC	805	h90	<i>bub1-GFP&lt;&lt;kanr leu1? z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4</i>
☒ 7A, B	YX	108	h90	<i>Δlys1::Prec8-Cnp3C-CFP-TEVp&lt;&lt;Hyg.B bub1-GFP&lt;&lt;kanr z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr leu1</i>
	YX	109	h90	<i>Δlys1::Prec8-Cnp3C-CFP-TEVp&lt;&lt;Hyg.B bub1-GFP&lt;&lt;kanr z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr leu1 mph1::hygr</i>
	YX	110	h90	<i>3HA-plo1(341,405tev) Δlys1::Prec8-Cnp3C-CFP-TEVp&lt;&lt;Hyg.B bub1-GFP&lt;&lt;kanr z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr leu1</i>
	YX	111	h90	<i>3HA-plo1(341,405tev) Δlys1::Prec8-Cnp3C-CFP-TEVp&lt;&lt;Hyg.B bub1-GFP&lt;&lt;kanr z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr leu1 mph1::hygr</i>
☒ 8	PC	896	h90	<i>mph1-GFP-hygr ade6-M216 leu1 z::Padh13-mCherry-atb2&lt;&lt;natr</i>
	PF	389	h90	<i>plo1-GFP-kanr leu1 pNATZA13-mCherry-atb2</i>
	PF	390	h90	<i>plo1-GFP-kanr moa1::ura4 leu1 pNATZA13-mCherry-atb2</i>
☒ 9	PX	994	h90	<i>leu1 ade6-M216 cut2-GFP&lt;&lt;kanR sad1-GFP&lt;&lt;kanR</i>
	PR	660	h90	<i>ade6-M216 leu1 cut2-GFP&lt;&lt;kanR sad1-GFP&lt;&lt;kanR moa1::ura4+ (ura4)</i>
	PC	800	h90	<i>mph1::hygr leu1 ade6-M216 cut2-GFP&lt;&lt;kanR sad1-GFP&lt;&lt;kanR</i>
	PC	801	h90	<i>mph1::hygr ade6-M216 leu1 cut2-GFP&lt;&lt;kanR sad1-GFP&lt;&lt;kanR moa1::ura4+ (ura4)</i>
	PW	360	h90	<i>leu1 ura4-D18 mad2::ura4+ cut2-GFP&lt;&lt;kanR sad1-GFP&lt;&lt;kanR</i>
☒ 10D	YX	57	h+	<i>C::5'-3Flag-HA-Spc7(WT)-3'-hygr pat1-114 Prad21-slp1&lt;&lt;kanr Prad21-cut23&lt;&lt;kanr bub1-GFP-kanr spc7::ura4</i>

	YX	58	h+	<i>C::5'-3Flag-HA-Spc7(12A)-3'-hygr pat1-114 Prad21-slp1&lt;&lt;kanr Prad21-cut23&lt;&lt;kanr bub1-GFP-kanr spc7::ura4</i>
	YX	59	h+	<i>moa1::bsdr C::5'-3Flag-HA-Spc7(WT)-3'-hygr pat1-114 Prad21-slp1&lt;&lt;kanr Prad21-cut23&lt;&lt;kanr bub1-GFP-kanr spc7::ura4</i>
	YX	60	h+	<i>mph1::natr C::5'-3Flag-HA-Spc7(WT)-3'-hygr pat1-114 Prad21-slp1&lt;&lt;kanr Prad21-cut23&lt;&lt;kanr bub1-GFP-kanr spc7::ura4</i>
	YX	67	h+	<i>mph1::natr moa1::bsdr C::5'-3Flag-HA-Spc7(WT)-3'-hygr pat1-114 Prad21-slp1&lt;&lt;kanr Prad21-cut23&lt;&lt;kanr bub1-GFP-kanr spc7::ura4</i>
☒ 10E	PC	872	h+	<i>bub1-GFP&lt;&lt;kanr bub3-S(GGGGS)3-GFP&lt;&lt;kanr</i>
☒ 11	YX	70	h90	<i><math>\Delta</math>lys1::Padh13-Cnp3C-CFP-bsdr bub1-GFP&lt;&lt;kanr leu1 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
	PC	877	h90	<i><math>\Delta</math>lys1::Padh13-cnp3C-CFP-plo1<math>\Delta</math>C-bsdr bub1-GFP&lt;&lt;kanr leu1 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
	PC	878	h90	<i><math>\Delta</math>lys1::Padh13-cnp3C-CFP-plo1<math>\Delta</math>C-bsdr mph1::hygr bub1-GFP&lt;&lt;kanr leu1 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
	PC	875	h-	<i><math>\Delta</math>lys1::Padh13-cnp3C-CFP-plo1<math>\Delta</math>C-bsdr ura4-D18 leu1 bub1-GFP&lt;&lt;kanr z::Padh15-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4</i>
	PC	882	h90	<i><math>\Delta</math>lys1::Padh13-cnp3C-CFP-plo1(KR)<math>\Delta</math>C-bsdr bub1-GFP&lt;&lt;kanr leu1 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
☒ 12A	PJ	412	h90	<i>sgo1-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
	PJ	413	h90	<i>moa1::kanr sgo1-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
	PC	798	h90	<i>mph1::hygr sgo1-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
	PC	799	h90	<i>mph1::hygr moa1::kanr sgo1-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>
	YX	27	h90	<i>p35-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4</i>
☒ 13A	PL	67	h+	<i>leu1 mes1 imr1-ura4-GFP</i>



	PB	127	h-	<i>leu1 mes1 ade6-M216 Z::natr-Padh13-mCherry-atb2</i>
	PD	753	h+	<i>leu1 mes1 imr1-ura4-GFP Δsgo1::kanr ade6-M21?</i>
	PB	128	h-	<i>leu1 Δsgo1::kanr mes1 (ade6-M216?) imr1-ura4-lacO</i> <i>Z::natr-Padh13-mCherry-atb2</i>
	PF	558	h+	<i>leu1 mes1 imr1-ura4-GFP Δmoa1::natr</i>
	PF	582	h-	<i>Δmoa1::kanr Δmph1::HB Z::natr-Padh13-mCherry-atb2 mes1-B44 leu1</i> <i>Ade+</i>
	PF	583	h+	<i>leu1 mes1 imr1-ura4-GFP Δmph1::kanr Δmoa1::natr</i>
	PF	582	h-	<i>Δmoa1::kanr Δmph1::HB Z::natr-Padh13-mCherry-atb2 mes1-B44 leu1</i> <i>Ade+</i>
	YW	467	h+	<i>mes1 imr&lt;&lt;lacO-ura4+ his7&lt;&lt;Pdis1-GFP-lacI-NLS</i> <i>c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4 leu1</i>
☒ 13B	YW	464	h-	<i>mes1 c::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4 ura4-D18?</i>
	YW	465	h+	<i>mes1 imr1-ura4-GFP c::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4</i> <i>moa1::natr ura4-D18?</i>
	PF	558	h+	<i>leu1 mes1 imr1-ura4-GFP Δmoa1::natr</i>
	PF	582	h-	<i>Δmoa1::kanr Δmph1::HB Z::natr-Padh13-mCherry-atb2 mes1-B44 leu1</i> <i>Ade+</i>
	PF	583	h+	<i>leu1 mes1 imr1-ura4-GFP Δmph1::kanr Δmoa1::natr</i>
	YW	466	h-	<i>mes1 c::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4 moa1::natr</i> <i>ura4-D18?</i>
	YW	499	h+	<i>mph1::bsdr mes1 imr1-ura4-GFP c::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7&lt;&lt;hygr</i> <i>spc7::ura4 moa1::natr ura4-D18?</i>
	YW	500	h-	<i>mph1::bsdr mes1 c::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4</i> <i>moa1::natr ura4-D18?</i>
☒ 13C	PH	634	h+	<i>leu1 imr1L-GFP mes1-B44</i>
	JZ	874	h-	<i>mes1 leu1 ade6-M216</i>
	YW	467	h+	<i>mes1 imr&lt;&lt;lacO-ura4+ his7&lt;&lt;Pdis1-GFP-lacI-NLS</i> <i>c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4 leu1</i>
	YW	468	h-	<i>mes1 c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4 leu1</i>
	YW	538	h+	<i>swi6::kanr leu1 mes1 imr1-ura4-GFP</i>

YW 539 h- *swi6::kanr leu1 mes1 ade6-M216 Z::natr-Padh13-mCherry-atb2*  
 YW 536 h+ *swi6::kanr mes1 imr<<lacO-ura4+ his7<<Pdis1-GFP-lacI-NLS*  
*c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7<<hygr spc7::ura4 leu1*  
 YW 537 h- *swi6::natr mes1 c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7<<hygr spc7::ura4 leu1*  
*moa1::kanr*  
 YW 556 h+ *imr1L<<ura4+-lacO his7+<<Pdis1-GFP-lacI mes1 sgo1(V242E) leu1*  
 YW 557 h- *mes1 sgo1(V242E) leu1*  
 YW 560 h+ *mes1 imr<<lacO-ura4+ his7<<Pdis1-GFP-lacI-NLS*  
*c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7<<hygr spc7::ura4 sgo1(V242E) leu1*  
 YW 561 h- *mes1 c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7<<hygr spc7::ura4 sgo1(V242E) leu1*  
 ☒ 13D PH 634 h+ *leu1 imr1L-GFP mes1-B44*  
 JZ 874 h- *mes1 leu1 ade6-M216*  
 PF 558 h+ *leu1 mes1 imr1-ura4-GFP Δmoa1::natr*  
 PZ 269 h- *mes1-B44 moa1::kanr leu1 ade6*  
 YW 467 h+ *mes1 imr<<lacO-ura4+ his7<<Pdis1-GFP-lacI-NLS*  
*c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7<<hygr spc7::ura4 leu1*  
 YW 468 h- *mes1 c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7<<hygr spc7::ura4 leu1*  
 YW 533 h+ *moa1::kanr mes1 imr<<lacO-ura4+ his7<<Pdis1-GFP-lacI-NLS*  
*c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7<<hygr spc7::ura4 leu1*  
 YW 468 h- *mes1 c::Pspc7-spc7(12A)-Tspc7<<hygr spc7::ura4 leu1 moa1::kanr*  
 YW 556 h+ *imr1L<<ura4+-lacO his7+<<Pdis1-GFP-lacI mes1 sgo1(V242E) leu1*  
 YW 557 h- *mes1 sgo1(V242E) leu1*  
 YW 562 h+ *imr1L<<ura4+-lacO his7+<<Pdis1-GFP-lacI mes1 sgo1(V242E) leu1*  
*moa1::kanr*  
 YW 563 h- *mes1 sgo1(V242E) leu1 moa1::kanr*  
 PD 753 h+ *leu1 mes1 imr1-ura4-GFP Δsgo1::kanr ade6-M21?*  
 PL 80 h- *ade6 leu1 mes1 sgo1::natr*  
 YW 571 h+ *leu1 mes1 imr1-ura4-GFP Δmoa1::natr sgo1::bsdr*  
 YW 572 h- *mes1-B44 moa1::kanr leu1 ade6 sgo1::bsdr*  
 ☒ 14A PC 865 h90 *bub1-GFP-kanr Z::Padh13-mCherry-atb2<<natr*  
*C::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7<<hygr spc7::ura4 leu1 ura4?*

	PC	866	h90	<i>bub1-GFP-kanr moa1::kanr Z::Padh13-mCherry-atb2&lt;&lt;natr C::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4 leu1 ura4?</i>
	YW	530	h90	<i>bub1-GFP-kanr moa1::kanr mph1::bsdr Z::Padh13-mCherry-atb2&lt;&lt;natr C::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4 leu1 ura4?</i>
図 14B	YX	61	h90	<i>sgo1-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr C::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4 ura4?</i>
	YX	62	h90	<i>sgo1-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr C::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4 ura4? moa1::kanr</i>
	YX	134	h90	<i>mph1::bsdr sgo1-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr C::Pspc7-spc7(12E)-Tspc7&lt;&lt;hygr spc7::ura4 ura4? moa1::kanr</i>
	PC	799	h90	<i>mph1::hygr moa1::kanr sgo1-FLAG-GFP leu1 ade6-M210 z&lt;&lt;padh13-mCherry-atb2+&lt;&lt;natr</i>

## 5. 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 YES を、最少合成培地として MM を用いた。分裂酵母の胞子形成を誘導する際には SPA 寒天培地を用いた。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。

YES : 完全培地

kan<sup>r</sup> 遺伝子挿入株の選択時には、G418（Geneticin）を終濃度 0.1 mg/ml になるように添加して用いた。hyg<sup>r</sup> 遺伝子挿入株の選択時には、Hygromycin-B（Wako）を終濃度 0.3 mg/ml になるように添加して用いた。nat<sup>r</sup> 遺伝子挿入株の選択時に

は、ClonNat（重松貿易）を終濃度 0.1 mg/ml になるように添加して用いた。bsd<sup>r</sup> 遺伝子挿入株の選択時には、Blastcidin S, hydrochloride（フナコシ）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 0.5 mg/ml 加えた。

Yeast extract	5 g
グルコース	30g
アデニン	75mg
ウラシル	75mg
リジン塩酸塩	75mg
L-ロイシン	75mg

・ MM（MM+N）：最少選択培地

(Gutz et al., 1974)フタル酸水素カリウム	3 g	14.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.2 g	15.5 mM
NH <sub>4</sub> Cl	5 g	93.5 mM
グルコース	10 g	1 % (w/v)
50×Salt stock (*1)	20 ml	
10,000×Mineral stock (*2)	0.1 ml	
1,000×Vitamin stock (*3)	1 ml	

• SPA : 合成孢子形成培地

グルコース	10 g	1 % (w/v)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g	
1000×Vitamine stock (*3)	1ml	

\*1 50×Salt stock :

(1L 当たり)

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

\*2 10,000×Mineral stock :

(100 ml 当たり)

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

クエン酸	1000 mg	47.6 mM
------	---------	---------

\*3 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

6. 分裂酵母の一般的な取扱いと遺伝学的解析

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

分裂酵母の形質転換は岡崎らにより改良された酢酸リチウム法(Okazaki et al., 1990)を改変しておこなった。YES 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、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA) に懸濁した。懸濁液に DNA (0.1-1 μg)、サケ精子 DNA (キャリア DNA) および 280μl 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。その後上清を遠心除去し、細胞を YES に懸濁して選択培地に広げた。

ランダムスポア処理は、SPA プレート上で孢子を形成している細胞を掻き取り、5%グルスラーゼ溶液に懸濁し、室温で3から5時間インキュベートして胞

子嚢を溶解させた。その後エタノール終濃度 30%となるように加えて 5 分間インキュベートし、遠心後上清を捨て、胞子を 0.5ml の YES に懸濁し、適当な培地に胞子をまいた。

## 7. 分裂酵母のベクタープラスミド

分裂酵母の形質転換には下記のシャトルベクターを用いた。

### pNATZA13, pHBCPspc7, pHBKPrec8

(pNATZA13) : *adh13* プロモーター (強力かつ恒常的に発現が誘導される、*adh* プロモーターの TATA ボックスに変異を導入し発現量を抑えたプロモーター) の下流にマルチクローニングサイトが存在し、*clonNAT* 耐性遺伝子をマーカーとして持つ pUC119 由来のベクターである。プラスミド中に分裂酵母 *zfs1* 遺伝子近傍のゲノム配列が挿入されており、*Apa I* で切断した後に分裂酵母に形質転換することで *zfs1* 遺伝子近傍にプラスミドを挿入できる。

(pHBCPspc7) : hygromycin 耐性遺伝子をマーカーとしてもつ pUC119 由来のベクターのマルチクローニングサイトに、*spc7* プロモーターを挿入したベクターである。プラスミド中に分裂酵母 *SPAC26F1.12c* 遺伝子近傍のゲノム配列が挿入されており、*Apa I* で切断後に分裂酵母に形質転換することで *SPAC26F1.12c* 遺伝子近傍にプラスミドを挿入することができる。

(pHBKPrec8) : hygromycin 耐性遺伝子をマーカーとしてもつ pUC119 由来のベクターのマルチクローニングサイトに、*rec8* プロモーターを挿入したベクターである。プラスミド中に分裂酵母 *lys1* 遺伝子のゲノム配列が挿入されており、*Apa I* で切断後に分裂酵母に形質転換することで *lys1* 遺伝子領域にプラスミド

を挿入することができる。プラスミドが挿入された細胞は *lys1* 要求性となる。

## 8. 分裂酵母からの DNA の調製

分裂酵母のゲノム DNA の回収は、以下の方法を用いた。YES プレート上で生育した細胞を回収し、0.2 ml の breaking buffer ( 1% SDS, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA)、0.3 g のガラスビーズ ( $\phi=0.5$  mm)、および 0.2 ml のフェノール/クロロホルムを加え、2 分間激しく攪拌して細胞を破砕した。その後、室温で 7 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、風乾させた。その後、滅菌水に溶解して DNA 溶液とした。

## 9. 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 度にて培養した。 $h^+$ 株と  $h$ 株を掛け合わせて観察する場合は、懸濁液を等量ずつ混合して SPA プレート上にスポットした。

細胞を同調的に減数分裂に誘導するためには、*pat1-114* 温度感受性変異体 (Iino and Yamamoto, 1985) を用いた。細胞を MM+N 培地で  $1 \times 10^7$  cells/ml まで培養したのち、MM-N 培地で 2 回洗浄した。その後 MM-N 培地に移し、25°C で 16 時間培養して G1 期に同調した。制限温度である 34°C で培養するとともに  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を終濃度 0.5mg/ml となるように加えて、減数分裂期へ誘導した。

## 10. 分裂酵母株の作製



ゲノム上の *moa1*<sup>+</sup>, *mph1*<sup>+</sup>, *sgo1*<sup>+</sup>, *spc7*<sup>+</sup>の変異体もしくは GFP によるタグ付加は、PCR-based gene targeting 法(Bahler et al., 1998)に従って作製した。

3xflag-HA-Spc7 の発現のため、*spc7* 遺伝子の開始コドンのすぐ上流に 3xflag-HA タグを挿入したプラスミド、*pHBCP<sub>spc7</sub>-3xflag-HA-spc7-T<sub>spc7</sub>* を作成し、分裂酵母にトランスフォームすることで *SPAC26F1.12c* 遺伝子近傍にプラスミドを挿入した。

## 11. 細胞の停止法

細胞を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。

細胞を減数第一分裂中期に停止させる場合は、*cut23* 遺伝子と *slp1* 遺伝子のプロモーター領域を減数分裂期で発現が抑制される *rad21* 遺伝子のプロモーターに置換した変異体を用いた。

## 12. ウェスタン解析

分裂酵母細胞を遠心回収後、HB buffer (25mM MOPS, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 15mM EGTA, 60mM β-glycerophosphate, 0.1mM Na-orthovanadate, 0.1mM NaF, 15mM p-nitrophenylphosphate, 1% triton x-100, 1mM DTT, 1mM PMSF) を添加して、5 分間煮沸した。その後約 1ml のガラスビーズを加え、Multi bead shocker (Yasui Kikai) によって細胞を破碎した。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。

サンプルを SDS-PAGE で展開した後、PVDF Immobilon (MILLIPORE)メンブレンに転写した。メンブレンを 30 分間、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 または Can Get Signal Solution A (TOYOBO)に一次抗体を適量加えて 4°C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、Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad)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 Sgo1 抗体 1:1000、マウス抗 FLAG M2 抗体 (sigma) 1:2000、ウサギ抗 Spc7 pT77 抗体 (Yamagishi et al., 2012) 1:1000、ウサギ抗 Spc7 pT257 抗体 (Yamagishi et al., 2012) 1:1000、ヤギ抗 GFP 抗体 1:5000。

### 13. 蛍光タンパク質のセントロメアシグナルの定量化

Sgo1-flag-GFP, Bub1-GFP のイメージを Delta Vision P system (GE) を用いて time-lapse 撮影し、核内のシグナルの最大値から、バックグラウンドである細胞質周辺の最大値シグナルを差し引いた値を、各タンパク質のセントロメアにおけるシグナルとして定量化した。

Bub1-GFP のイメージを Axioplan2 (Zeiss) を用いて撮影し、スピンドル上にある Bub1-GFP シグナルの平均値から、バックグラウンドである細胞質周辺の平均値シグナルを引いた値を、セントロメアのシグナルとして定量化した。

### 14. 免疫沈降法

*pat1* 変異により減数分裂期へ誘導した分裂酵母細胞の培地に PMSF を終濃度

1mM になるように加え、細胞を回収した。回収した細胞を NP-40 buffer (6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% NONIDET P-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF )で wash した後、NP-40 Buffer に complete protease inhibitors (Roche)と phos-STOP (Roche) を加えた buffer に懸濁し、細胞懸濁液を boil することでホスファターゼとプロテアーゼの活性を阻害した。その後 Multi bead shocker (Yasui Kikai) によって細胞を破碎し、遠心分離して上清を細胞抽出液とした。得られた細胞抽出液に anti-FLAG M2 affinity gel (sigma)を加え 4°Cで 2 時間反応させた後、NP-40 Buffer と HEPES buffer (50mM HEPES, 10mM NaCl) で wash した。Anti-FLAG M2 affinity gel の一部を 30°Cで 30 分間 lambda-phosphatase (NEB) で処理をし、5 μM phostag (NARD Institute) を含むアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロットティング法により免疫沈降物を解析した。

#### 15. *in vitro* キナーゼアッセイ

大腸菌に発現させて精製した組換えタンパク質、GST-Spc7-N を GST-Plo1 あるいは GST-Mph1ΔN と kinase buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100, 150mM NaCl, 5mM Dithiothreitol, 10mM ATP) 中で混合し、30°Cにおいて 30 分処理した。混合液を SDS-PAGE で分離後、Spc7 pT77, pT257 リン酸化特異的抗体を用いてウェスタン解析を行った。

#### 16. 酵母細胞抽出液を用いた *in vitro* pull-down アッセイ

大腸菌に発現させた野生型もしくは変異型の GST-Spc7 を glutathione beads

で精製し、glutathione beads に結合させた状態で、GST-Plo1 あるいは GST-Mph1ΔN と kinase buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100, 150mM NaCl, 5mM dithiothreitol, with or without 10mM ATP) 中で混合し、30 分間 30 度で攪拌しながらインキュベートした。Bub1-GFP, Bub3-GFP が発現している分裂酵母株を Buffer H/0.6 (25 mM HEPES (pH 8.0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5 mM EGTA (pH8.0), 0.1% NONIDET P-40, 600 mM KCl, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma)) with phosphatase inhibitors 1 μM okadaic acid (Wako), 1 μM microcystin (Wako), PhosSTOP (Roche) and Complete protease inhibitor (Roche)) に懸濁し、液体窒素下で凍結させ、freezer mill (SPEX) によって細胞を破砕した。破砕した凍結細胞に Buffer H/0.6 を加えて溶解させ、遠心分離後、上清を細胞抽出液とした。得られた細胞抽出液に前述の glutathione beads 結合 GST-Spc7 を加えて、4°C で 1.5 時間インキュベートした。Buffer H/0.4 (25 mM HEPES (pH 8.0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5 mM EGTA (pH8.0), 0.1% NONIDET P-40, 400 mM KCl, 1mM PMSF) と pre-elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.3), 1 mM EGTA, 75 mM KCl) を用いて洗浄したのち、GST-Spc7 に結合したタンパク質を elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.3), 1 mM EDTA, 0.1%SDS) 中で攪拌混合して溶出した。溶出産物を anti-GFP 抗体を用いてウエスタンブロット解析した。

## 結果と考察

### 1. Moa1-Plo1 はセントロメアの接着保護に必要である

分裂酵母 Moa1 は減数第一分裂期において一方向性結合を制御する因子として単離されたが、同時にセントロメア接着を促進する機能があることも報告されていた。しかしながらその分子メカニズムは明らかになっていなかった。そこで私は Moa1 がセントロメアの接着保護を促進する機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

分裂酵母の染色体分配の様式は、特定の染色体のセントロメア領域に *lacO* リピートを挿入した細胞株に対して、GFP-LacI 融合タンパク質を発現させることでセントロメア領域を可視化し、蛍光顕微鏡下で観察することによってその動態が判別できる (図 3)。1 番染色体のセントロメア領域に *lacO* リピートを挿入し、GFP-LacI 融合タンパク質を発現させた細胞株 (*imr1-GFP*) (Sakuno et al., 2009) と、セントロメアを標識していない細胞株を掛け合わせ、相同染色体のうち一方の動態を追った。減数第一分裂終了後の姉妹染色分体間の接着の有無を観察するために、*mes1* 変異体を用いて細胞を減数第一分裂期終了時に停止させた (図 3) (Izawa et al., 2005)。*imr1-GFP* の動態を観察したところ、野生株ではほとんどの細胞で *imr1-GFP* のシグナルは片側に一点のシグナルとして観察された。一方 *sgo1Δ* 変異体では *imr1-GFP* のシグナルが片側に観察されたが、約 50% の細胞で 2 点のシグナルとして観察された。これは減数第一分裂期における還元分配後に、セントロメア領域の接着が失われたことを示す。先行研究より、*sgo1Δ* 変異体は第二分裂で姉妹染色分体がランダムに分配されることから、

第一分裂後にセントロメアの接着が完全に失われていると考えられる(Kitajima et al., 2004)。従ってこの解析方法では、約 50%の細胞で *imr1-GFP* のシグナルが 2 点に観察された場合、セントロメアの接着がほぼ完全に失われたと判断できる。先行研究と一致して、*moa1Δ* 変異体においては、約 10%の細胞で両側に *imr1-GFP* のシグナルが観察された (均等分裂が起きた) ことから、*Moa1* には減数第一分裂期において動原体の一方向性を促進する機能があることが分かる (図 5A) (Yokobayashi and Watanabe, 2005)。興味深いことに、第一分裂で還元分配を示した *moa1Δ*変異体のうち、約 25%の細胞で *imr1-GFP* が 2 点のシグナルとして観察された。この割合はコヒーシンの保護が完全に失われる *sgo1Δ* 変異体と比較して低いことから、*Moa1* には部分的にコヒーシンを保護する機能があることが示唆される。*Sgo1* のセントロメア局在は *Bub1* のキナーゼ活性に依存していることが知られており、*Bub1* のキナーゼ活性が失われる *bub1-KD* 変異体においても、*sgo1Δ* 変異体ほどではないが *imr1-GFP* のシグナルが 2 点として観察される。このことから、*Sgo1* のセントロメア局在がコヒーシンの保護に重要であることが確認された (図 5A, B) (Bernard et al., 2001; Kawashima et al., 2010)。次に *Moa1* は *Plo1* キナーゼをセントロメアヘリクルートすることが知られているので、*Moa1* 依存的なコヒーシンの保護に *Plo1* キナーゼが関与する可能性を検証した。*Plo1* は生育に必須な因子で、またスピンドル形成に必要なため、細胞全体で *Plo1* を不活性化するような変異体は減数第一分裂が進行せず、解析が困難である。そこでセントロメア領域特異的に *Plo1* を破壊できる *plo1-tev* 変異体を用いた (Kim et al., 2015)。*plo1-tev* 変異体に対してキネトコア因子 *Cnp3* のキネトコア局在ドメイン (*cnp3C*) を TEV プロテアーゼと融合させることで、

TEV プロテアーゼを強制的にセントロメアへ局在化させ、セントロメア領域特異的に Plo1 を不活性化することができる。*plo1-tev* 変異体に対して *cnp3C-TEV* プロテアーゼを発現させた場合にのみ *imr1-GFP* のシグナルが 2 点に観察される細胞の割合が増加した (図 5C)。また、Plo1 と結合できない Moa1 の変異体である *moa1-T101A* でも同様の結果が得られた (図 5D)。さらに *moa1Δ* 変異体に対して、キネトコア因子 Cnp3 のキネトコア局在ドメインと Plo1 のキナーゼドメインの融合タンパク質 (*cnp3C-Plo1N*) を発現させたところ、Plo1 のキナーゼ活性依存的に *moa1* 破壊によるセントロメア接着の欠損が部分的に抑圧された (図 5E)。以上のことから Moa1 タンパク質自体ではなく、Moa1 によってリクルートされた Plo1 キナーゼがコヒーシン保護の機能を担うことが示唆された。

## 2. 減数第一分裂期において Moa1-Plo1 と Mph1 は Bub1 のセントロメア局在を促進する

Mph1 のヒトホモログである MPS1 と、Plo1 のヒトホモログである PLK1 は基質特異性が類似しており、ヒト培養細胞と線虫において、PLK1 が Spc7 のヒトホモログである KNL1 をリン酸化することが知られていた (Dou et al., 2011; Espeut et al., 2015; von Schubert et al., 2015)。セントロメアのコヒーシン保護には Bub1 の機能が必須であることから (Kawashima et al., 2010)、Moa1 によってセントロメアに集積する Plo1 が、Bub1 を介してコヒーシンの保護を促進する可能性を考えた。そこで初めに内在性の Bub1 の C 末端側に GFP タグを融合させ、外因性の  $\alpha$  チューブリンの N 末端側に mCherry タグを付加したタンパク質を恒常的に発現している細胞を用いて、Bub1 の動態をタイムラプス観察した。

体細胞分裂期においてBub1は分裂前期に一過的にキネトコアへ集積し、分裂中期では核内にシグナルが拡散した (図6A)。この局在パターンはBub1の動原体局在を制御する因子であるMph1の動態に類似している (図6B)。実際、体細胞分裂期においてBub1の動原体局在化は、Mph1キナーゼによる動原体因子Spc7のリン酸化に依存しており、*mph1Δ* 変異体ではBub1の動原体局在は失われる (図6A) (Yamagishi et al., 2012)。

興味深いことに減数第一分裂期においては、Bub1は分裂後期まで動原体に集積した状態が保たれることが分かった (図6C)。さらに体細胞分裂期とは異なり、*mph1Δ* 変異体においてもBub1の動原体局在は残存していた。一方*moa1Δ* 変異体においては、Bub1の動原体への集積は分裂中期の後半から分裂後期にかけて減少し、*mph1Δ moa1Δ* 二重変異体ではBub1の動原体集積はほとんど失われた (図6C, D)。これらの結果は、減数第一分裂期において、Moa1-Plo1とMph1は協調的にBub1の動原体局在化を制御し、特にMph1が動原体から消失する分裂中期から分裂後期にかけては、主にMoa1-Plo1がBub1の動原体局在化を制御することが示唆された。

次に、Moa1の下流でPlo1がBub1の動原体局在を制御する可能性を検討することにした。初めに、*plo1-tev*変異体を用いて、セントロメア領域特異的にPlo1を不活性化した場合の、Bub1のセントロメア集積を検証した。その結果、*cnp3C-TEV*プロテアーゼを発現した場合に減数分裂中期におけるBub1のセントロメア局在が減少し、*plo1-tev mph1Δ* 二重変異体では更なる減少が観察された (図7A, B)。これより、Moa1によって動原体に集積されたPlo1がBub1の動原体局在を制御していることが明確になった。



Mph1とMoa1-Plo1による、Bub1の動原体局在制御におけるタイミングの違いは、それぞれの因子の動原体局在時期が異なることに起因する可能性が考えられた。そこで、Mph1とPlo1の減数第一分裂期における動態を観察した(図8)。内在性のMph1とPlo1のC末端側にGFPを融合させたタンパク質を発現する細胞を減数分裂期に誘導し、減数第一分裂期における動態をタイムラプス観察した。その結果、Mph1は減数第一分裂初期に一過的に動原体へ集積してすぐに消失するのに対し、減数分裂期特異的にMoa1に依存して動原体へ集積するPlo1は、分裂前期から後期開始まで動原体に維持されることが分かった。

### 3. Plo1 と Mph1 は協調的に SAC を活性化する

Bub1-GFP シグナルのタイムラプス観察から、減数第一分裂にかかる時間が、*mph1Δ moa1Δ* 二重変異体で野生株と比較して非常に短いことが分かった。これより、Mph1 と同様に Moa1-Plo1 も SAC の機能を持つ可能性が示唆された。この可能性を検証するために、減数第一分裂前期から第一分裂後期までの時間を、分裂酵母の中心体類似物である SPB の分離(スピンドル微小管の形成開始)からセキュリンの分解(分裂後期開始)のタイミングを指標として計測した(図9)。野生株と比較して、*mph1Δ* 変異体は分裂期の時間が顕著に短縮したが、*moa1Δ* 変異体では分裂期の時間が伸長した。これは、*moa1Δ* 変異体では姉妹動原体の一方向性が失われるためにスピンドル微小管と動原体の接着異常が起き、SAC が活性化され分裂後期への進行が遅れたためであると考えられる。興味深いことに *mph1Δ moa1Δ* 二重変異体では、*mph1Δ* 変異体と比較して、さらに分裂期の時間が短縮し、SAC が全く機能しない *mad2Δ* 変異体と同程度に

なった。以上の結果から減数第一分裂期においては、主に Mph1 が SAC の機能を担っているが、Bub1 の動原体局在化制御と同様に、Moa1-Plo1 も Mph1 と協調的に SAC を制御していることが示唆された。

#### 4. Plo1 依存的な Spc7 のリン酸化が Bub1/Bub3 複合体との相互作用を促進する

ヒト培養細胞と線虫での研究から、PLK1 が KNL1 (分裂酵母では Spc7) の MELT 配列をリン酸化することが示唆されていた (Espeut et al., 2015; von Schubert et al., 2015)。そこで Plo1 が Spc7 のリン酸化を介して Bub1 の動原体局在を制御する可能性を考えた。初めに *in vitro* で Plo1 が Spc7 をリン酸化する可能性を検証した (図 10A, B)。Mph1 と同様に Plo1 は、Bub1/Bub3 との相互作用に必要な、保存された MELT 配列を含む Spc7 の N 末断片 (Spc7-N) を強くリン酸化した。次に、Plo1 が MELT 配列をリン酸化する可能性を検証するために、12 箇所ある MELT 配列のうち、2 箇所に対するリン酸化特異的抗体を用いて、ウエスタンブロット解析を行った (図 10C)。その結果、Mph1 と同様に Plo1 も Spc7 の MELT 配列を *in vitro* でリン酸化することが分かった。

次に *in vivo* で Mph1 と Plo1 が協調的に Spc7 をリン酸化する可能性を検証するために、*pat1* 変異を用いて細胞を同調的に減数分裂期へと誘導し、Cdc20 と APC/C サブユニットの減数分裂期特異的シャットオフ株 (*Prad21-slp1*, *Prad21-cut23*) を用いて第一分裂中期に停止した細胞を回収した。Spc7 のリン酸化を維持するために回収した細胞を煮沸したのち、Spc7 を免疫沈降により濃縮し、フォスタグ SDS-PAGE を用いて、リン酸化依存的なバンドシフト (泳動

度の低下) をウエスタンブロット解析により検証した (図 10D)。その結果、野生株での **Spc7** タンパク質においては、ホスファターゼ処理により消失する顕著なバンドシフトが見られた。これより **Spc7** は減数第一分裂中期においてリン酸化されることが分かった。このリン酸化依存的な **Spc7** のバンドシフトは *mph1Δ* 変異体や *moa1Δ* 変異体で低下し、*mph1Δ moa1Δ* 二重変異体では更なる低下が見られた。また MELT 配列のスレオニン残基をアラニン残基に変換したことで **Spc7** がリン酸化修飾を受けない *spc7-12A* 変異体においては、ほとんどバンドシフトが見られなかった。これより *in vivo* において、**Plo1** と **Mph1** が協調的に **Spc7** をリン酸化することが示唆された。

**Mph1** 依存的な **Spc7** のリン酸化は、**Bub1/Bub3** 複合体との相互作用を促進して、**Bub1/Bub3** を動原体へ局在化させることが知られていた (Primorac et al., 2013)。そこで **Mph1** と同様に、**Plo1** による **Spc7** のリン酸化も **Bub1/Bub3** 複合体との相互作用を促進する可能性を考えた。そこで、大腸菌から精製した **Spc7** を **Plo1** または **Mph1** でリン酸化した後、分裂酵母の細胞抽出液と混合し、**Spc7** の pull-down を行った (図 10E)。その結果 **Mph1** と同様に、**Plo1** で **Spc7** をリン酸化した場合にのみ、**Spc7** と **Bub1/Bub3** との相互作用が見られた。さらに *spc7-12A* 変異タンパク質に対して **Plo1** または **Mph1** で同様のリン酸化反応を行った場合には、**Bub1/Bub3** との相互作用は見られなかったことから、**Plo1** は **Spc7** の MELT 配列のリン酸化を介して **Bub1/Bub3** との相互作用を促進することが示唆された。

次に分裂酵母の細胞内において、**Plo1** 単独で (**Mph1** なしで) **Bub1** を動原体へ集積できるかを検証した (図 11)。体細胞分裂期の間期において、**Plo1** は

細胞質に分散しており、動原体局在は見られない。このとき *cnp3C*-Plo1 融合タンパク質を発現させることで、強制的に Plo1 を動原体へ局在化させ、Bub1-GFP の動態を観察した。その結果 Plo1 のキナーゼ活性依存的に Bub1 の動原体局在が観察され、この Bub1 の動原体局在は *mph1* 遺伝子の破壊により影響を受けなかった。さらに、*spc7-12A* 変異体に対して Plo1 を動原体へ局在させても Bub1 の動原体集積が見られなかったことから、Plo1 は *in vivo* においても Spc7 の MELT 配列のリン酸化を介して Bub1 の動原体局在を促進することが示唆された。

## 5. Sgo1 のセントロメア局在は Mph1 と Plo1 によって協調的に制御される

減数第一分裂期において、Sgo1 のセントロメア局在は Bub1 に依存することが知られていたため、Mph1 と Moa1-Plo1 が Bub1 を介して Sgo1 のセントロメア局在を制御する可能性を考えた。そこで、内在性の Sgo1 の C 末端側に GFP タグを融合し、外因性の  $\alpha$  チューブリンの N 末端側に mCherry タグを付加したタンパク質を恒常的に発現している細胞を用いて、Sgo1 の動態をタイムラプス観察した (図 12A, B)。

野生株において Sgo1 のセントロメアシグナルは減数第一分裂前中期に最も強く観察され、中期から後期開始にかけて次第に弱まった。この局在パターンは分裂後期まで動原体に維持される Bub1 の動態とは異なる。この Sgo1 の動態は、Bub1 とは違い、分裂後期に APC/C 依存的な分解制御を受けるためであると考えられる (Kitajima et al., 2004)。*moa1 $\Delta$*  変異体では、減数第一分裂中期か

ら後期にかけて **Bub1** の動原体局在は減少したものの (図 6C)、**Sgo1** のセントロメア局在にはほとんど影響を与えなかった (図 14B)。この理由として、**Bub1** の動原体局在が失われても、**Sgo1** のセントロメア局在に必要な **H2A** のリン酸化は、すぐには消失せずに維持されている可能性が考えられる。一方、減数第一分裂期の初めから **Bub1** が動原体から消失する *mph1Δ moa1Δ* 二重変異体と *spc7-12A* 変異体では、**Sgo1** のセントロメアシグナルが顕著に減少した。これより、**Mph1** と **Moa1-Plo1** 依存的な **Bub1** の動原体集積は、**Sgo1** のセントロメア局在に必要であることが示唆された。

## 6. セントロメアの接着の保護は **Mph1** と **Plo1** によって協調的に制御される

**Sgo1** のセントロメア局在は減数第一分裂期におけるセントロメアの接着保護に必要であることが知られている (Kawashima et al., 2010; Yamagishi et al., 2008)。*mph1Δ* 変異体ではセントロメア接着保護の欠損は見られないが、*mph1Δ moa1Δ* 二重変異体は *moa1Δ* 変異体と比較して顕著にセントロメア接着保護の欠損が観察された (図 13A)。これより、**Mph1** と **Moa1** はセントロメアの接着保護に対して協調的に機能することが考えられ、その機能として **Bub1** の動原体局在化制御が挙げられる。そこで *mph1Δ moa1Δ* 二重変異体に対して、**Spc7** の MELT 配列の疑似リン酸化変異体である *spc7-12E* 変異体を用いて、**Bub1** を強制的に動原体へ局在化させた (Yamagishi et al., 2012)。実際に *spc7-12E* 変異は *mph1Δ moa1Δ* 二重変異体においても、**Bub1** の動原体局在と **Sgo1** のセントロメア局在が明瞭に観察された (図 14A, B and C)。さらに

*spc7-12E* 変異は、*mph1Δ moa1Δ* 二重変異体で観察されたセントロメア接着保護の欠損を部分的に抑圧した (図 13B)。一方、*spc7-12E* 変異は *moa1Δ* 変異体で見られたセントロメア接着保護の欠損は抑圧しなかったことから、*Moa1* には *Bub1* の動原体局在化制御のほかにも、セントロメア接着保護を促進する機能があることが示唆される。以上のことから、*Mph1* と *Moa1-Plo1* 依存的な *Bub1* の動原体局在化制御はセントロメアの接着保護に重要であることが示唆された。

## 7. セントロメア接着保護は *Bub1* の動原体局在化と *Swi6* により制御される

*Bub1* の動原体局在化は、*Sgo1* のセントロメア局在化を介して、セントロメアの接着保護に重要であることが示唆された。しかしながら、興味深いことに *Bub1* と *Sgo1* のセントロメア集積が低下する *spc7-12A* 変異体において、セントロメアの接着保護の欠損が観察されなかった (図 13C)。過去の研究から動原体に局在できない *Bub1* の変異体を発現させた場合に、*Sgo1* はヘテロクロマチンタンパク質 *Swi6* 依存的にセントロメアへ集積することが知られていた (Yamagishi et al., 2008)。ゆえに、*spc7-12A* 変異体では *Swi6* 依存的に少量の *Sgo1* がセントロメアへ集積し、機能している可能性が考えられた。実際に、*spc7-12A* 変異は *swi6Δ* 変異体で観察されたセントロメア接着保護の欠損を促進した (図 13C)。*Swi6* には、*Sgo1* のセントロメア局在制御以外にも、コヒーシンのセントロメア局在制御やヘテロクロマチンの形成制御の機能があることが知られていた (Grewal and Jia, 2007; Nonaka et al., 2002)。そこで *Swi6* のこれらの機能と *Sgo1* のセントロメア局在化制御の機能を切り離すために、

*sgo1-VE* 変異体を用いた。*sgo1-VE* 変異体は Swi6 との直接的な相互作用が失われる Sgo1 の変異体であり、ヘテロクロマチン形成に影響しないことが分かっている(Yamagishi et al., 2008)。*siw6Δ* 変異体と同様に、*sgo1-VE* 変異体ではセントロメアの接着保護の欠損が観察され、*spc7-12A* 変異によってさらにその欠損が亢進した(図 13C)。これらの結果から、Mph1 と Moa1-Plo1 による Bub1 の動原体への集積は、Swi6 の働きと協調して、Sgo1 のセントロメア局在および接着保護の機能を促進することが示唆された。

## 8. Moa1-Plo1 は Sgo1 のセントロメア局在化以外の経路でセントロメア接着保護を促進する

*spc7-12A* 変異体と比較して、*moa1Δ* 変異体は、Sgo1 のセントロメア集積量が多いにも関わらず(図 12B)、セントロメア接着保護の欠損が観察された(図 13A, C)。また、*moa1Δ* 変異体におけるセントロメア接着保護の欠損は、*spc7-12E* 変異で抑圧されなかったことから(図 13B)、Moa1 には Bub1 の動原体局在化制御以外の経路でも、セントロメア接着保護を促進している可能性が考えられた。実際に *moa1Δ* 変異体と比較して *moa1Δ spc7-12A* 二重変異体や、*moa1Δ sgo1-VE* 二重変異体ではセントロメアの接着保護の欠損が亢進した(図 13D)。一方、*sgo1Δ* 変異体と *moa1Δ sgo1Δ* 二重変異体では、セントロメアの接着保護の欠損が同程度観察された。以上の結果から、Moa1 は Bub1 依存的な Sgo1 のセントロメアの局在化に加えて、他の経路で Sgo1 に作用して、セントロメアの接着保護を促進する可能性が示唆された。

## まとめと展望

減数第一分裂における一方向性結合の確立と、セントロメアの接着保護は、減数分裂期の染色体分配制御の大きな特徴であり、この制御機構は酵母から哺乳動物まで広く保存されている。一方向性結合を制御する因子として、分裂酵母で同定された Moa1 は、配列レベルでの相同性は見られないものの、*polo-like kinase* (分裂酵母では Plo1、マウスでは PLK1) との相互作用を介して働くことから、マウス MEIKIN, 出芽酵母 Spo13 がその機能ホモログと考えられている (Kim et al., 2015)。セントロメアの接着保護は主に shugoshin (分裂酵母および出芽酵母では Sgo1, マウスでは SGO2) によって制御されている。分裂酵母 Moa1、出芽酵母 Spo13 およびマウス MEIKIN でも、セントロメア接着保護の機能を持つことが示唆されていた (Katis et al., 2004; Kim et al., 2015; Yokobayashi and Watanabe, 2005)。しかしながらその詳細な分子メカニズムは明らかになっていなかった。

本研究において、私は、分裂酵母 Moa1 と、Moa1 によって減数分裂期特異的にセントロメアへ集積する Plo1 が、セントロメアの接着保護を制御する分子メカニズムの一端を明らかにした。減数第一分裂期において Moa1-Plo1 は Mph1 と協調して動原体因子 Spc7 の保存された MELT 配列をリン酸化することで、Spc7 と Bub1/Bub3 複合体との相互作用を促進し、Bub1 を動原体に局在化させることを見出した。動原体に集積した Bub1 は、ヒストン H2A のリン酸化を介して Sgo1 をセントロメア領域に集積させ、さらにヘテロクロマチンタンパク質である Swi6 と Sgo1 が直接的に結合することで、Sgo1 が安定的にセントロメ



アへと局在し、セントロメアの接着保護を促進することが示唆された。

これまでの研究から、ヒト培養細胞の体細胞分裂期において、MPS1 と PLK1 は分裂前期に動原体へ集積し、KNL1 をリン酸化することで Bub1 の動原体局在を制御し、SAC の活性化に必要なことが示されていた(von Schubert et al., 2015)。また、MPS1 に相当する因子を持たない線虫において、PLK1 が高等生物で報告されている MPS1 の機能を代替することが報告されていた(Espeut et al., 2015)。したがって PLK1 による KNL1 のリン酸化は、Bub1 の動原体局在化と SAC の活性化に必要な、保存された機構であると考えることが出来る。一方、分裂酵母の体細胞分裂期では、Plo1 は動原体に集積せず、Mph1 単独で Bub1 の動原体局在を制御する。減数第一分裂期では、減数分裂期特異的な動原体因子である Moa1 によって、Plo1 は動原体へと集積し、Mph1 と Plo1 が協調的に Spc7 をリン酸化して、Bub1 の動原体局在を制御する。Mph1 が減数第一分裂前中期に一過的に動原体へ集積するのに対して、Plo1 は減数第一分裂期を通して動原体に維持される (図 8)。そのため、特に分裂中期から後期にかけて、Moa1・Plo1 が Bub1 の動原体局在化に対してより重要な働きをしていると考えられる (図 6C)。また、ヒト培養細胞において、PLK1 依存的な KNL1 のリン酸化は、MPS1 による SAC の活性化をサポートすることが知られているが(von Schubert et al., 2015)、分裂酵母の減数第一分裂期でも同様の制御が観察されただけでなく (図 9)、分裂酵母 Moa1・Plo1 は Sgo1 のセントロメア局在化を介して、積極的にセントロメアの接着保護を促進することが明らかとなった (図 13B)。

また当研究室の金博士の解析から、マウス MEIKIN も、分裂酵母 Moa1 と同

様に、減数第一分裂期において PLK1 を動原体に呼び込み、MPS1 と協調して BUB1 の動原体局在を促進することが示された（未発表データ）。したがって、本研究で明らかとなった、減数分裂期における Moa1-Plo1 による Bub1 の動原体局在化制御は、高等生物においても保存されていることが明らかとなった。今後の課題としては、*Meikin*-ノマウスで観察されるセントロメアの接着保護の欠損が、BUB1 の動原体局在化制御に依存しているのか、あるいは分裂酵母 Moa1 と同様に他の経路によっても制御されているのか、さらなる解析が期待される。また、分裂酵母において報告されている、ヘテロクロマチンタンパク質 Swi6 による Sgo1 のセントロメア局在化制御は、高等生物では解析されていない。したがって、マウス SGO2 のセントロメア局在と機能について、ヘテロクロマチンタンパク質による関与を含む、詳細な解析が期待される。

本研究において、Moa1-Plo1 は、Sgo1 のセントロメア局在化制御以外の経路でも、セントロメアの接着保護を促進することが示唆された。当研究室に所属していた石黒博士による解析から、Plo1 キナーゼがコヒーシンサブユニット Rec8 の特異的な部位をリン酸化し、このリン酸化が接着保護に重要な働きをしていることが示された（未発表データ）。したがって Moa1-Plo1 は、Spc7 のリン酸化を介した Bub1 の動原体局在化に加え、Rec8 のリン酸化を介して、セントロメアの接着保護を制御する可能性が示唆される。今後の課題として、Moa1-Plo1 によるセントロメアの接着保護における、両者の関係性を解析していきたい。これまでの研究から、セパレーズによる Rec8 コヒーシンの切断には、カゼインキナーゼ (CK1) 依存的な Rec8 のリン酸化が必要であることが報告されている (Ishiguro et al., 2010) (図 16)。また、Sgo1 はセントロメアにおいてホスファ

ターゲットである PP2A を集積させ、CK1 によるリン酸化に拮抗することで、セントロメアの接着を保護することが知られている(Ishiguro et al., 2010; Kitajima et al., 2006; Riedel et al., 2006)。ゆえに、Moa1-Plo1 依存的な Rec8 のリン酸化は、CK1 キナーゼ依存的な Rec8 のリン酸化を抑制する、あるいは PP2A 依存的により脱リン酸化されやすくする制御である可能性が考えられ、さらなる解析が期待される。

## 引用文献

- 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*, 522–6.
- Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., and Nasmyth, K. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol Cell* *5*, 243–254.
- Cleveland, D.W., Mao, Y., and Sullivan, K.F. (2003). Centromeres and kinetochores. From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* *112*, 407–21.
- Dou, Z., von Schubert, C., Körner, R., Santamaria, A., Elowe, S., and Nigg, E.A. (2011). Quantitative mass spectrometry analysis reveals similar substrate consensus motif for human Mps1 kinase and Plk1. *PLoS One* *6*.
- Espeut, J., Lara-Gonzalez, P., Sassine, M., Shiau, A.K.K., Desai, A., and Abrieu, A. (2015). Natural Loss of Mps1 Kinase in Nematodes Uncovers a Role for Polo-like Kinase 1 in Spindle Checkpoint Initiation. *Cell Rep.* *12*, 58–65.
- Grewal, S.I., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 35–46.
- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., and Loprieno, N. (1974). *Schizosaccharomyces pombe*, in: Handbook of Genetics, vol 1, pp. 395-446. Ed. R. C. King. Plenum Press, New York. 395–446.

Hauf, S., and Watanabe, Y. (2004). Kinetochore orientation in mitosis and meiosis. *Cell* *119*, 317–327.

Ishiguro, T., Tanaka, K., Sakuno, T., and Watanabe, Y. (2010). Shugoshin-PP2A counteracts casein-kinase-1-dependent cleavage of Rec8 by separase. *Nat Cell Biol* *12*, 500–506.

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.

Jallepalli, P. V, and Lengauer, C. (2001). Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* *1*, 109–117.

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.

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

Kim, J., Ishiguro, K.-I., Nambu, A., Akiyoshi, B., Yokobayashi, S., Kagami, A., Ishiguro, T., Pendas, A.M., Takeda, N., Sakakibara, Y., et al. (2015). Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature* *517*, 466–471.

Kitajima, T.S., Kawashima, S. a, and Watanabe, Y. (2004). The conserved

kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis.

*Nature* *427*, 510–517.

Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T.,

Kawashima, S. a, and Watanabe, Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* *441*, 46–52.

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

London, N., and Biggins, S. (2014). Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 736–748.

Marston, A.L., Tham, W.H., Shah, H., and Amon, A. (2004). A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* (80-. ). *303*, 1367–1370.

Musacchio, A., and Hardwick, K.G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 731–741.

Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* *35*, 673–745.

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 595–648.

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms.

*Annu Rev Genet* 43, 525–558.

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.

Onn, I., Heidinger-Pauli, J.M., Guacci, V., Unal, E., and Koshland, D.E. (2008). Sister chromatid cohesion: a simple concept with a complex reality. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 105–129.

Peters, J.M., Tedeschi, A., and Schmitz, J. (2008). The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev* 22, 3089–3114.

Primorac, I., Weir, J.R., Chirolì, E., Gross, F., Hoffmann, I., van Gerwen, S., Ciliberto, A., and Musacchio, A. (2013). Bub3 reads phosphorylated MELT repeats to promote spindle assembly checkpoint signaling. *Elife* 2013.

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.

Riedel, C.G., Katis, V.L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Galova, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B., et al. (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441, 53–61.

Sakuno, T., Tada, K., and Watanabe, Y. (2009). Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* 458, 852–858.

Sakuno, T., Tanaka, K., Hauf, S., and Watanabe, Y. (2011). Repositioning of Aurora B promoted by chiasmata ensures sister chromatid mono-orientation in meiosis I. *Dev Cell* *21*, 534–545.

von Schubert, C., Cubizolles, F., Bracher, J.M., Sliedrecht, T., Kops, G.J.P.L., and Nigg, E.A. (2015). Plk1 and Mps1 Cooperatively Regulate the Spindle Assembly Checkpoint in Human Cells. *Cell Rep.* *12*, 66–78.

Shepperd, L.A., Meadows, J.C., Sochaj, A.M., Lancaster, T.C., Zou, J., Buttrick, G.J., Rappsilber, J., Hardwick, K.G., and Millar, J.B.A. (2012). Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr. Biol.* *22*, 891–899.

Takahashi, K., Murakami, S., Chikashige, Y., Funabiki, H., Niwa, O., and Yanagida, M. (1992). A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere. *Mol Biol Cell* *3*, 819–835.

Tanaka, K., Chang, H.L., Kagami, A., and Watanabe, Y. (2009). CENP-C functions as a scaffold for effectors with essential kinetochore functions in mitosis and meiosis. *Dev Cell* *17*, 334–343.

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.

Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 370–382.



Watanabe, Y., and Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* *400*, 461–4.

Wirth, K.G., Wutz, G., Kudo, N.R., Desdouets, C., Zetterberg, A., Taghybeeglu, S., Seznec, J., Ducos, G.M., Ricci, R., Firnberg, N., et al. (2006). Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J. Cell Biol.* *172*, 847–860.

Yamagishi, Y., Sakuno, T., Shimura, M., and Watanabe, Y. (2008). Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* *455*, 251–255.

Yamagishi, Y., Yang, C.-H., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2012). MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat. Cell Biol.* *14*, 746–752.

Yokobayashi, S., and Watanabe, Y. (2005). The kinetochore protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* *123*, 803–817.

## 謝辞

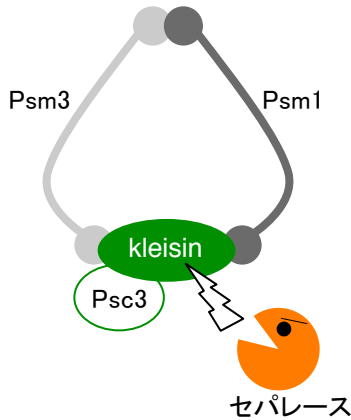
本研究は東京大学分子細胞生物学研究所渡邊研究室において、大学院修士課程と博士課程の6年間に渡って行われたものです。

大学院修士課程入学時から6年間の長きにわたり、根気強く、かつ情熱を持って指導して下さいました渡邊嘉典教授に心から感謝いたします。また、酵母の実験の基礎を教えて下さった作野剛士博士、多田健二博士、実験のことをよく相談した後藤祐平氏をはじめ、日々議論をし、切磋琢磨して共に研究を進めていった現在および過去の渡邊研究室の皆様に感謝いたします。

最後に、見返りを求めない愛情をもって私を育ててくれた両親、研究室の外側からいつも応援してくれた家族に心から感謝いたします。

**A**

分裂酵母コヒーシン複合体

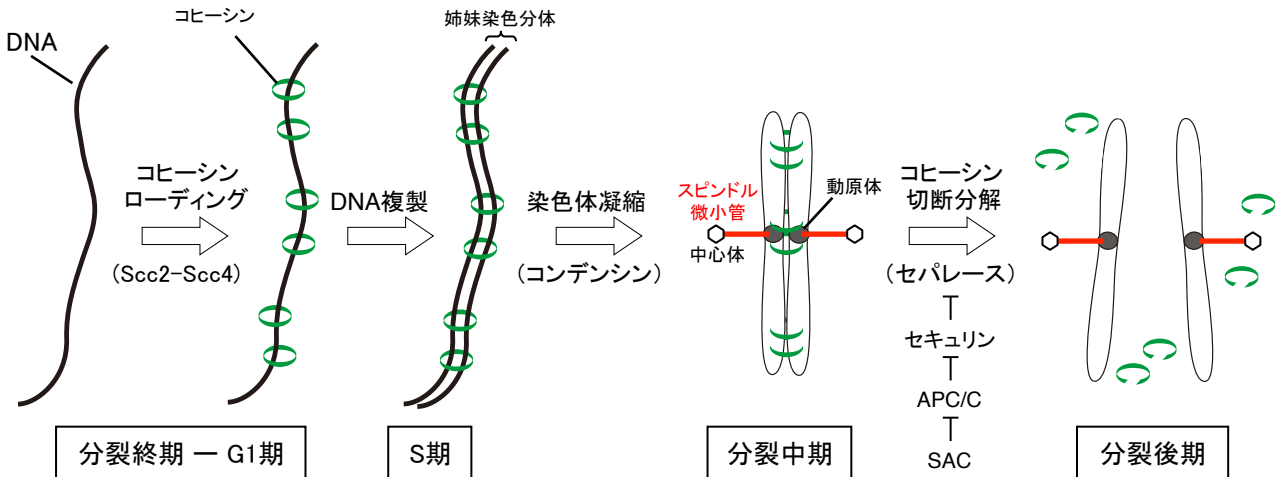


kleisinサブユニット

Rad21(体細胞分裂期)

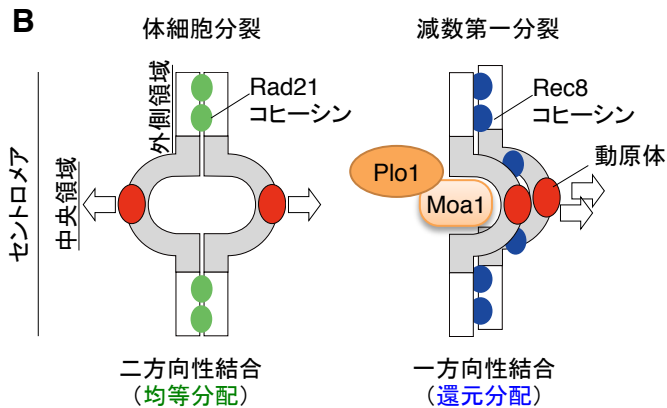
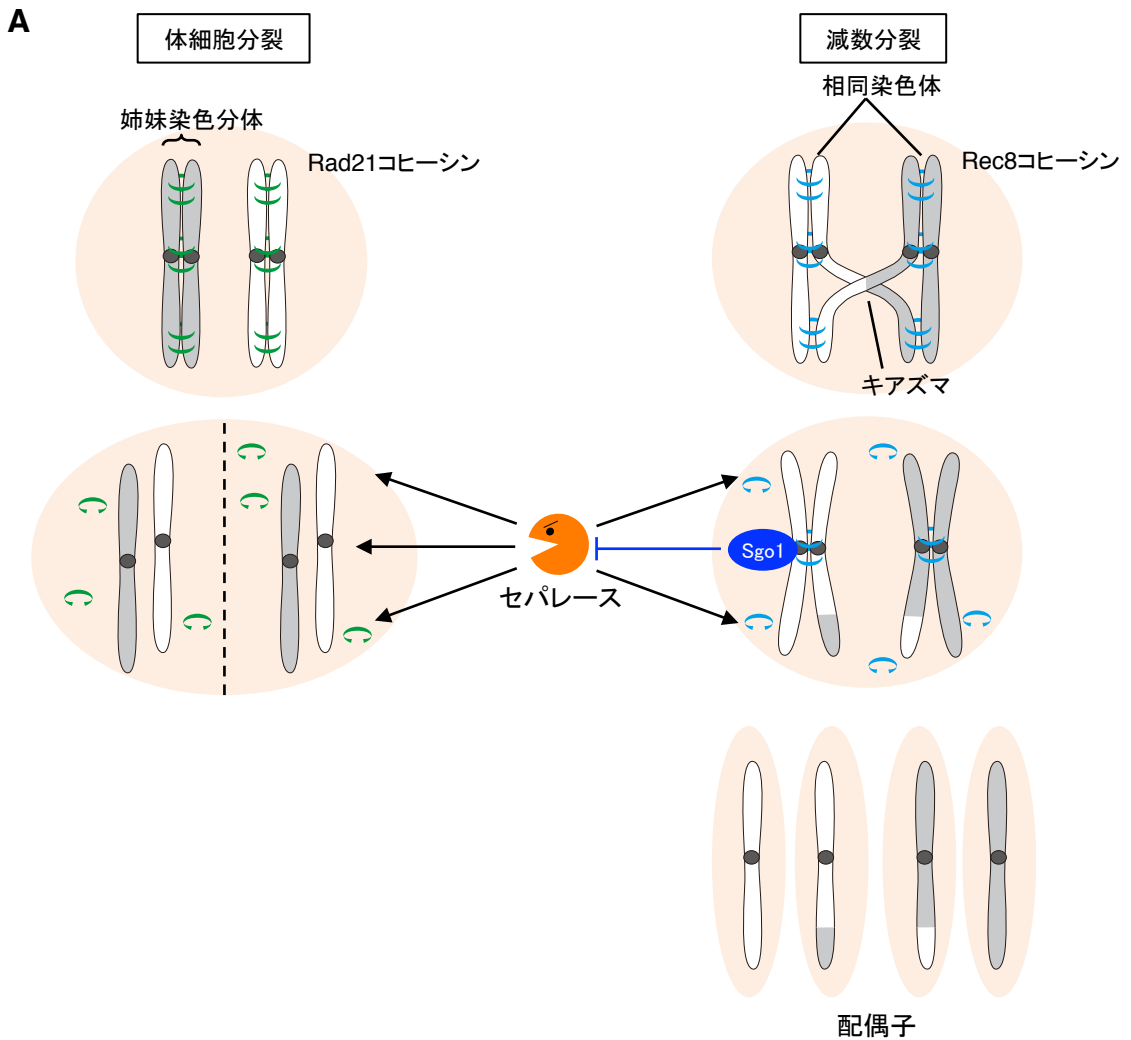
Rec8(減数分裂期)

セパレーズ

**B****図1. コヒーシン複合体**

A. コヒーシン複合体の模式図。分裂酵母コヒーシン複合体はPsm3, Psm1, Psc3, kleisinから構成されている。kleisinサブユニットは体細胞分裂期と減数分裂期でそれぞれRad21、Rec8が機能する。分裂後期ではkleisinサブユニットがセパレーズ依存的な切断分解を受け、姉妹染色分体間の接着が失われる。

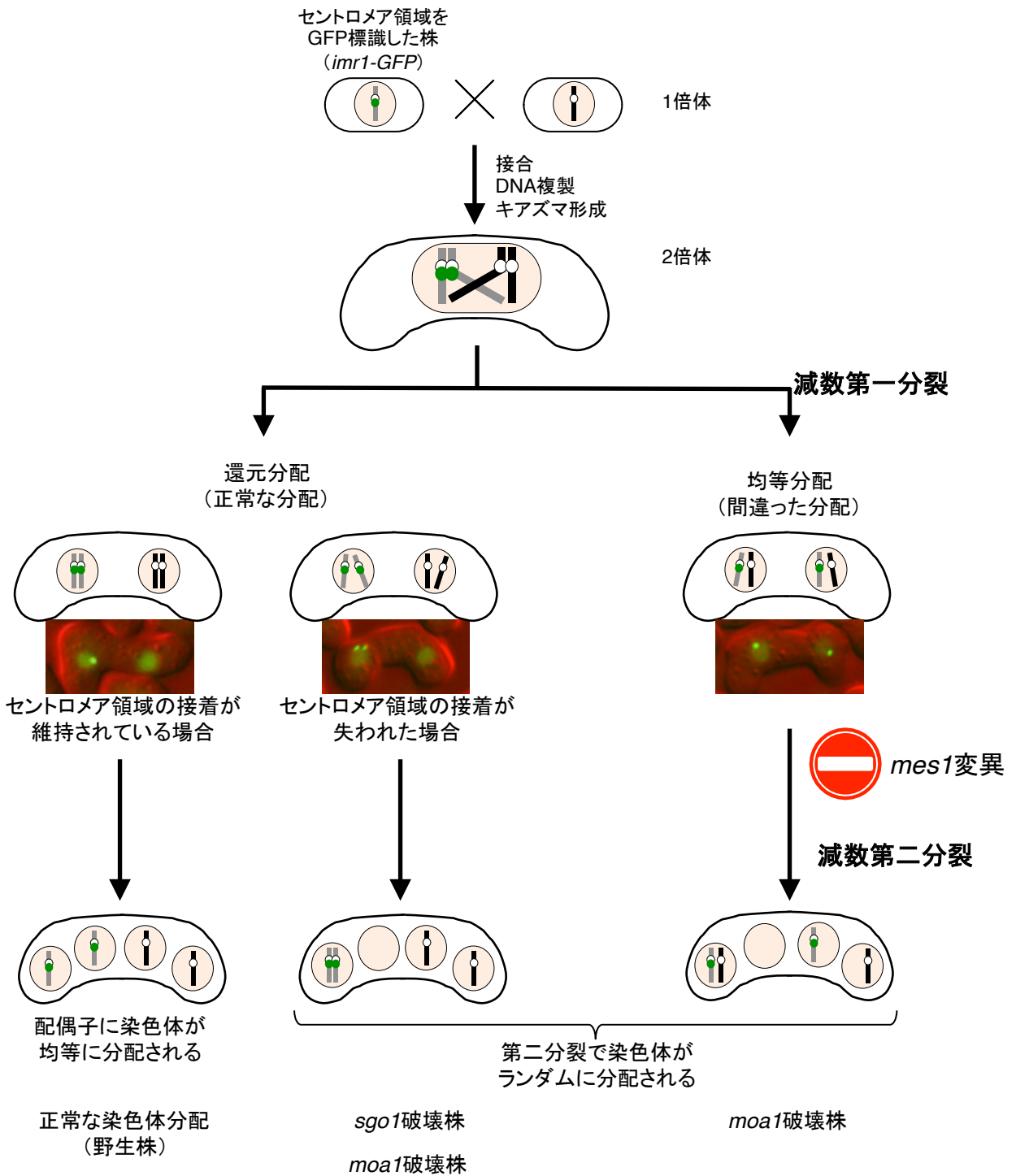
B. 細胞周期でのコヒーシンの動態。コヒーシン複合体は分裂終期からG1期にかけてローディングされ、S期でDNA複製と共に姉妹染色分体を接着する。両極の中心体から伸長してきたスピンドル微小管によって動原体が捕らえられると(二方向性結合の確立)、セパレーズが活性化しコヒーシンリングを切断することで姉妹染色分体の接着は解除される。



**図2. 体細胞分裂期と減数分裂期の染色体分配の違い**

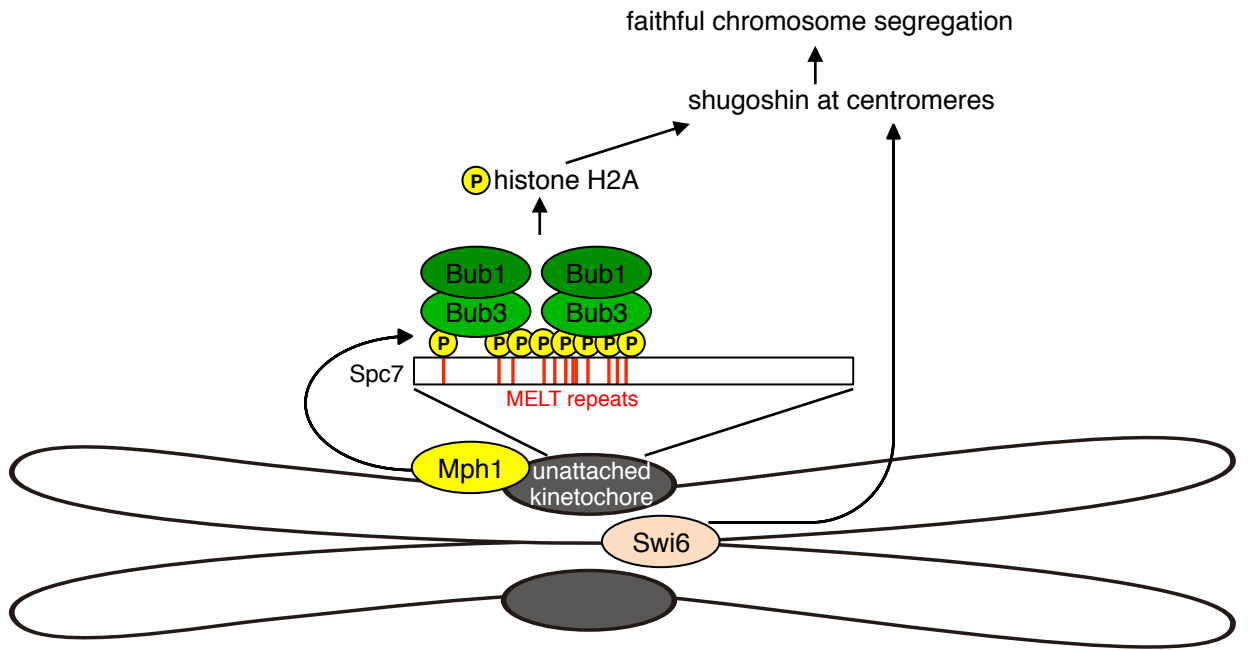
A. 体細胞分裂期と減数分裂期における染色体動態の模式図。体細胞分裂期ではDNA複製後、姉妹染色分体の均等分配が一度起きるのに対して、減数分裂期では二回の連続した分配が起きる。

B. 体細胞分裂期と減数第一分裂期のセントロメアの構造の模式図。体細胞分裂期ではRad21コヒーシンがセントロメアの外側領域を接着し、動原体は開いたような構造をとる。その結果二方向性結合が確立しやすくなる。一方減数第一分裂期では、Rec8コヒーシンによってセントロメア外側領域に加えて、中央領域も接着される。Rec8コヒーシンによる中央領域の接着には、減数分裂期特異的な動原体因子であるMoa1と、Moa1依存的に動原体へ呼び込まれるPlo1キナーゼの活性が必要である。動原体が横並びに融合したような構造をとることで、一方向性結合が確立されやすくなる。



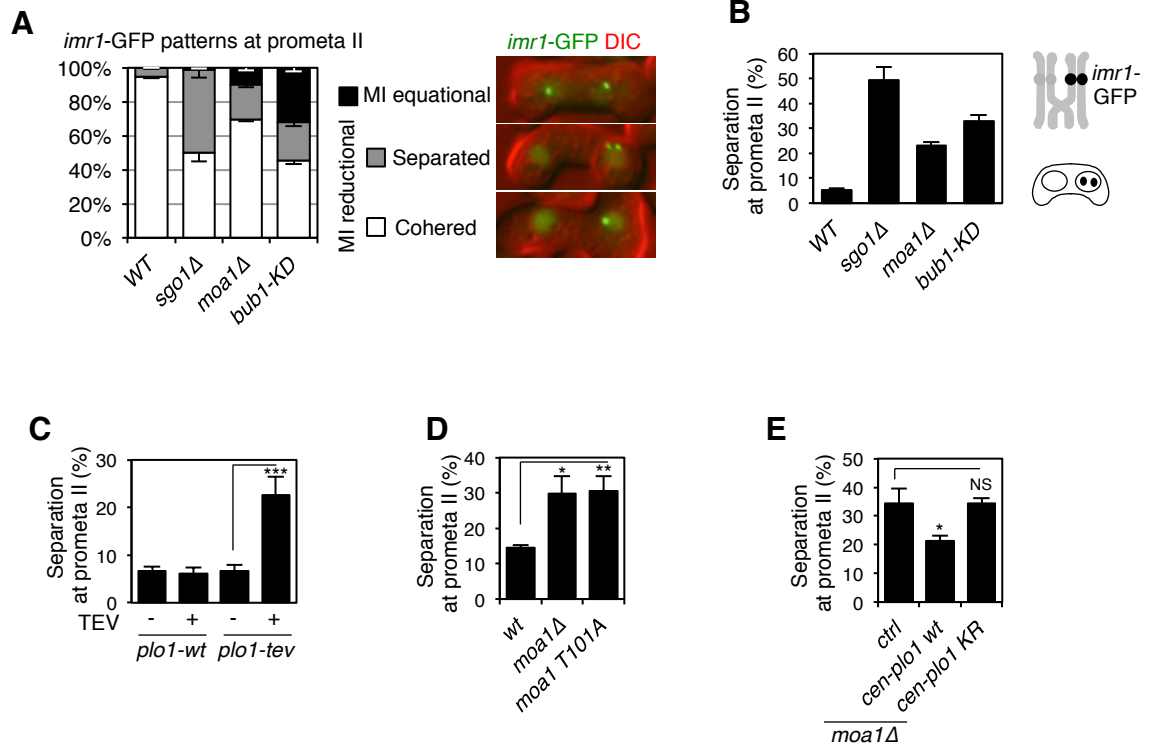
### 図3. 分裂酵母における染色体分配様式の可視化

セントロメアをGFPで標識した株(*imr1-GFP*)と標識していない株を掛け合わせて減数分裂期に誘導する。このとき *mes1*変異株を用いると、細胞は減数第二分裂期へ進行出来ず、第一分裂終了後に減数分裂期が停止する。減数第一分裂期の染色体分配が正常に行われると*imr1-GFP*のシグナルは細胞の片側にのみ観察され(左上)、間違った分配が起きると両側に観察される(右)。減数第一分裂期においてSgo1依存的なセントロメア接着保護に異常があると、正常な染色体分配を行うものの、早期に姉妹染色体分配が分離し、*imr1-GFP*のシグナルが2点観察される(中央)。



#### 図4. Sgo1のセントロメア局在化制御機構

SAC因子であるMph1は分裂期において、スピンドル微小管と結合していない動原体へ集積し、動原体因子Spc7のMELT配列をリン酸化する。リン酸化されたSpc7はBub1/Bub3複合体と直接的に結合し、セントロメア近傍でヒストンH2Aをリン酸化する。リン酸化されたヒストンH2Aを含むムクレオソームはSgo1と相互作用し、Sgo1をセントロメアへ局在化させる。セントロメア外側領域に集積しているヘテロクロマチンタンパク質Swi6はSgo1と結合し、Sgo1のセントロメア局在を安定化させる。

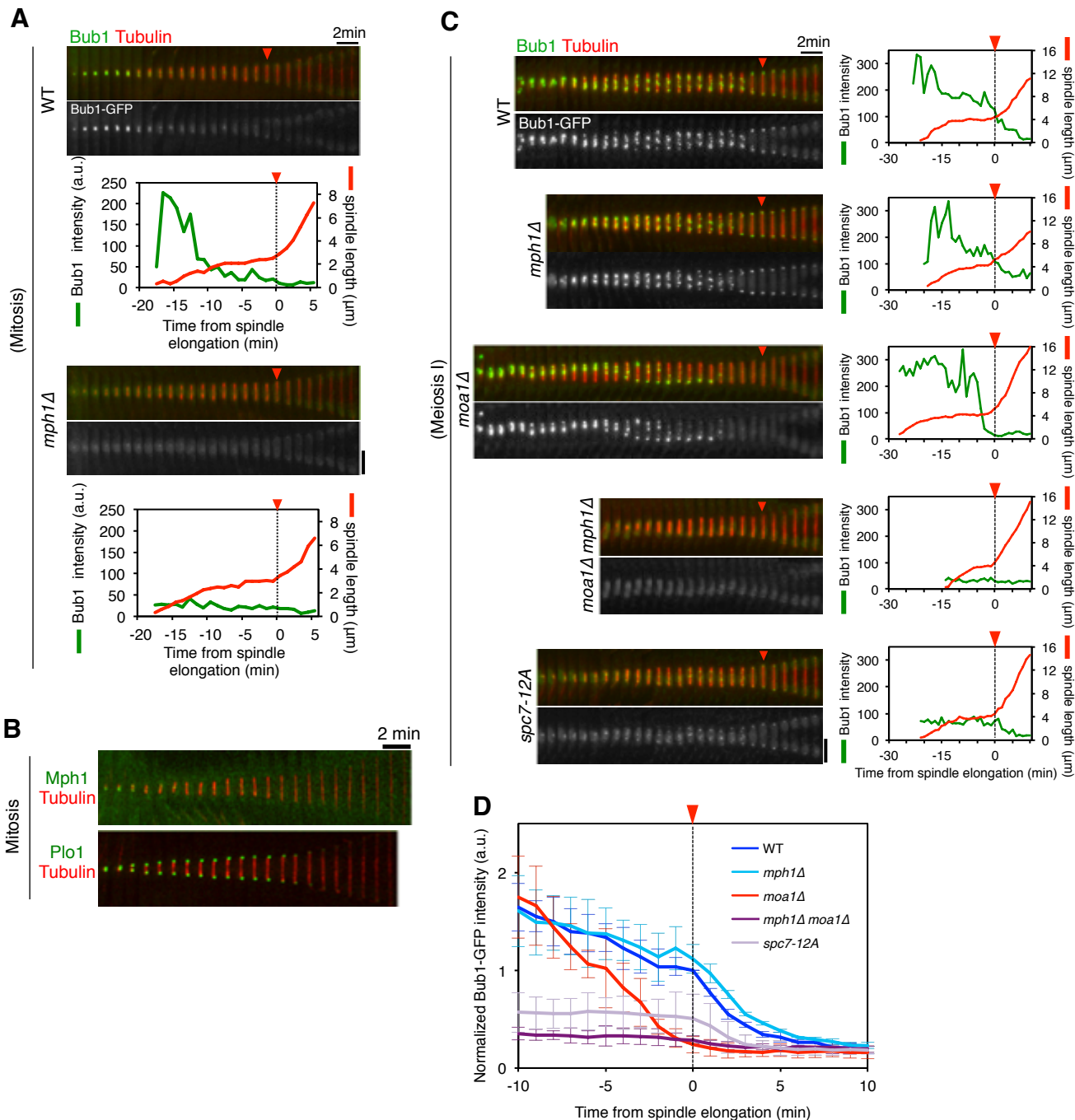


### 図5. *Moa1*-*Plo1*は減数第一分裂においてセントロメアの接着保護に必要である

A. 1番染色体のセントロメア領域をGFPで標識した*imr1-GFP*株と無標識の株を掛け合わせて減数分裂期へ誘導し、*mes1*変異によって減数第一分裂後に停止させ、各種細胞株における*imr1-GFP*のパターンを解析した。グラフの右に*imr1-GFP*の分配パターンの例を示す。(n > 150細胞で、3回の独立した実験を行った)

B. 図AのMI reductionalのうち、separatedの細胞の割合を示す。(n > 130細胞で、3回の独立した実験を行った) (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, NS; not significant, ANOVA (Bonferroni) with multiple comparison test.)

C, D and E. 減数第一分裂が正常に行われた細胞のうち、減数第一分裂後にセントロメアが2点に離れて見える細胞の割合を解析した。エラーバーは標準偏差を示す。(C; n > 110, D; n > 200, E; n > 200細胞で、3回の独立した実験を行った) (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, NS; not significant, ANOVA (Bonferroni) with multiple comparison test.)



**図6. Moa1-Plo1とMph1は減数第一分裂期のBub1の動原体集積に必要である**

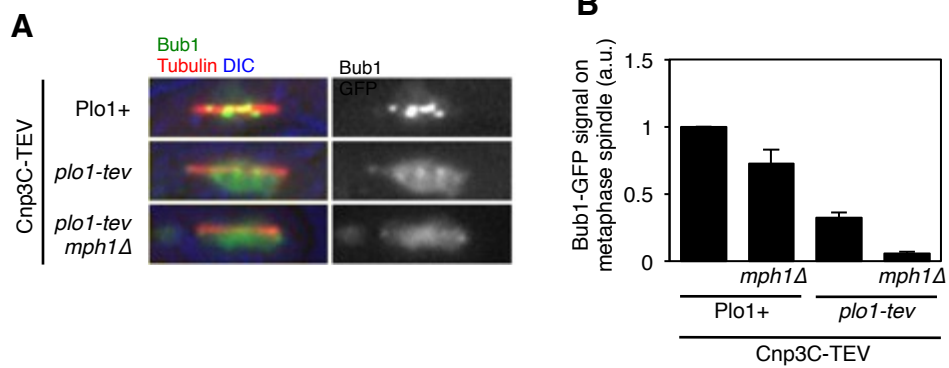
A. 各種細胞株でBub1-GFPとチューブリン(mCherry-atb2)のシグナルを体細胞分裂期において、1分間のインターバルでタイムラプス観察した。赤矢頭は分裂後期開始時期を示す。図の下側に、各タイムポイントにおけるBub1-GFPシグナルの最大値とスピンドル微小管の長さの定量値を示した。

B. 体細胞分裂期においてMph1-GFPまたはPlo1-GFPの動態をチューブリンのシグナルとともに、1分間のインターバルでタイムラプス観察した。

C. 各種細胞株でBub1-GFPとチューブリン(mCherry-atb2)のシグナルを減数分裂期において、1分間のインターバルでタイムラプス観察した。赤矢頭は分裂後期B開始時期を示す。図の右側に、各タイムポイントにおけるBub1-GFPシグナルの最大値とスピンドル微小管の長さの定量値を示した。分裂後期開始をtime = 0とする。

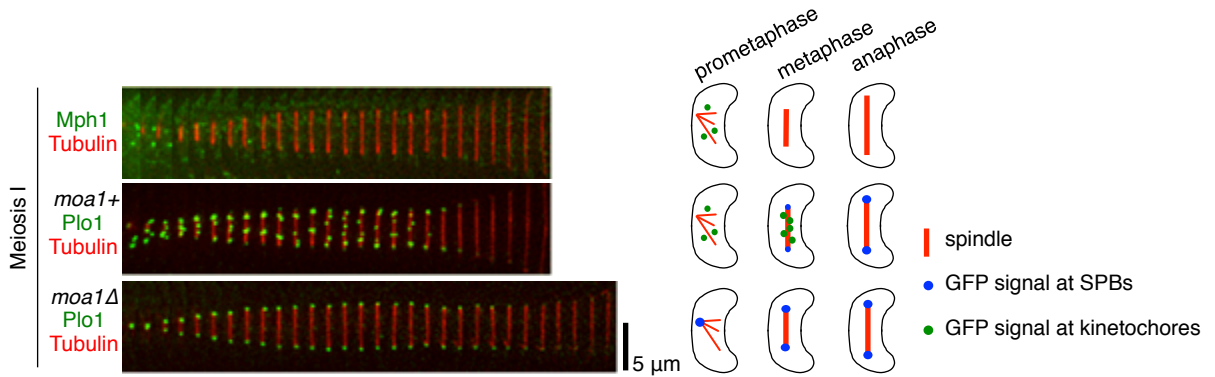
D. Bで観察した細胞株について、WT(野生株)の0minを1とした場合の、減数第一分裂期でのBub1-GFPシグナルの最大値の平均値を定量した。エラーバーは標準偏差を示す。(3回の独立した実験を行った。解析した細胞数、WT; n = 37, *mph1Δ*; n = 47, *moa1Δ*; n = 40, *mph1Δ moa1Δ*; n = 37, *spc7-12A*; n = 26 細胞)





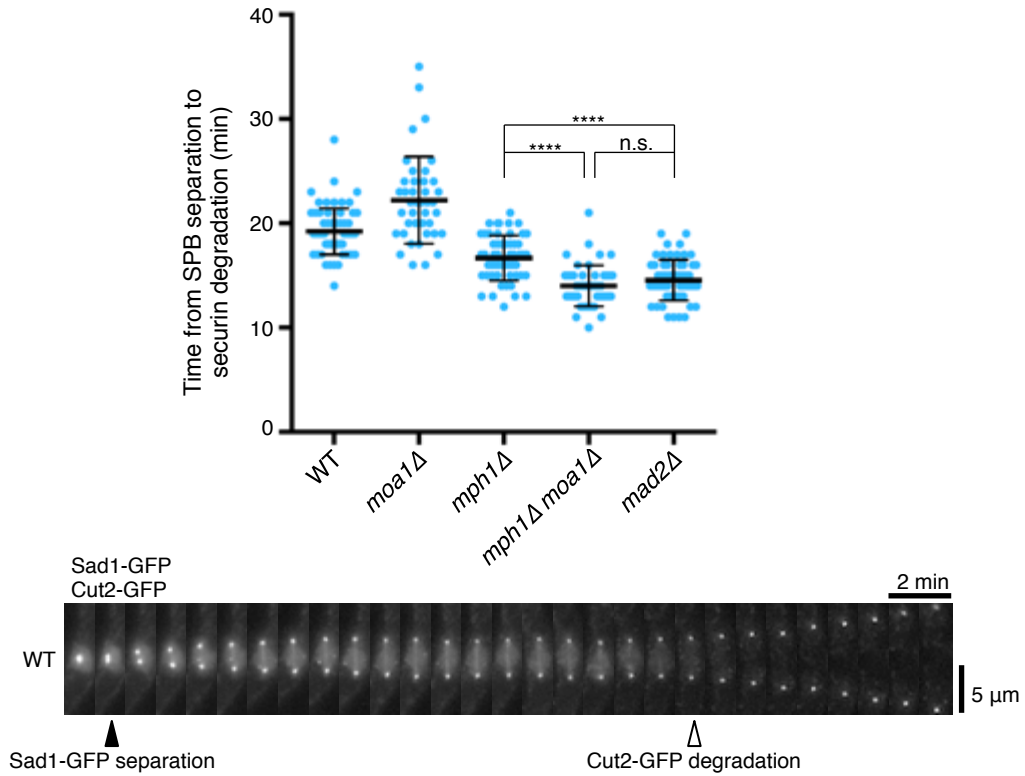
### 図7. Plo1はBub1の動原体局在化を促進する

A. 減数第一分裂中期におけるBub1-GFPのシグナルをmCherry-Tubulinと共に、各種細胞株において観察した。  
 B. Aの実験でTubulin上のBub1-GFPシグナルの平均値の定量化を行った。Plo1+ Cnp3C-TEV 発現細胞でノーマライズした。バーは標準偏差を示す。(n=20細胞)



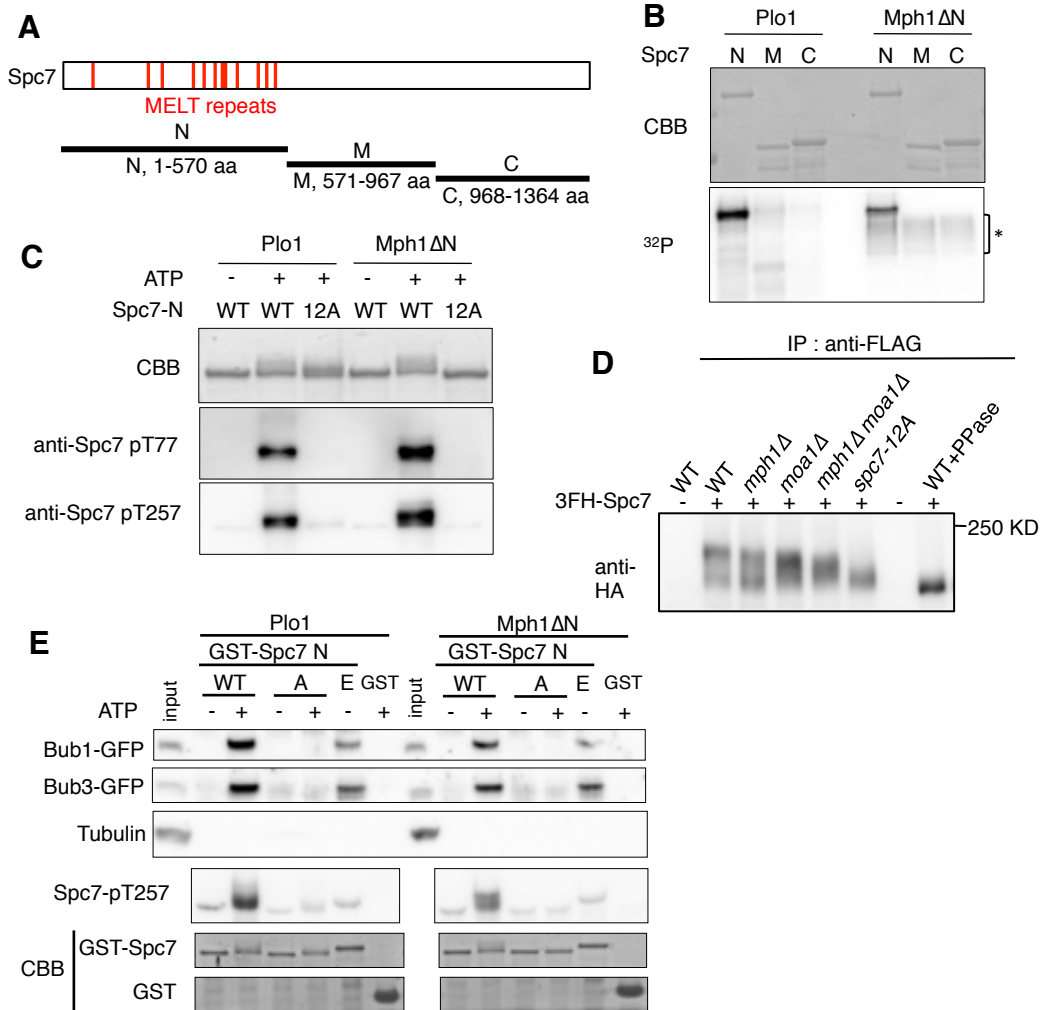
**図8. Plo1は減数第一分裂期においてMoa1依存的に動原体へ集積する**

減数分裂期においてMph1-GFPまたはPlo1-GFPの動態をチューブリンのシグナルとともに、1分間のインターバルでタイムラプス観察した。右側にそれぞれのGFPシグナルの局在パターンを模式的に示した。



**図9. Mph1とMoa1-Plo1は減数第一分裂期において協調的にSACを制御する**

Cut2-GFPとSad1-GFPを発現している細胞株において1分間隔でタイムラプス観察を行った。Sad1-GFPのシグナルが2点になってからCut2-GFPのシグナルが消失するまでの時間を定量した(n>40細胞)。(Error bars, SD. n.s., not significant; \*\*\*\*P < 0.001, ANOVA with Bonferoni's multiple comparisons test.)



**図10. Plo1とMph1によるSpc7のリン酸化はBub1/Bub3複合体との相互作用を促進する**

A. 分裂酵母Spc7のMELT配列の位置と*in vitro*リン酸化解析に用いた断片の長さを示す。

B. 大腸菌から精製したGST-Spc7の断片を[γ-<sup>32</sup>P]ATP存在下で、GST-Plo1あるいはGST-Mph1ΔN (251-678a.a.)と混合し、放射標識されたリン酸基の取り込みをオートラジオグラフィーで解析した。

C. 大腸菌から精製したGST-Spc7(N)をGST-Plo1あるいはGST-Mph1ΔNで*in vitro*キナーゼ反応を行い、Spc7-pT77, pT257特異的抗体を用いてウエスタンブロットングをすることで、Spc7のMELT配列のリン酸化の有無を調べた。(\*)はMph1ΔNの自己リン酸化を示す。

D. Spc7のN末端側に3xFlag-HA (3FH) タグをした株としていない株を、*pat1-114*変異により減数分裂期へ同調的に進行させるとともに、*slp1*及び*cut23*の発現を減数分裂期特異的に抑制することで細胞を減数第一分裂中期に停止させた。細胞抽出液を調整し、Flag M2 beadsを用いて3FH-Spc7の免疫沈降を行い、phostag SDS-PAGEで展開し、anti-HA抗体でウエスタンブロットング解析を行った。

E. 大腸菌からグルタチオンビーズで精製したGST-Spc7N断片をPlo1あるいはMph1でリン酸化し、Bub1-GFPとBub3-GFPを発現している細胞抽出液と混合し、エクストラクトプルダウンを行った。沈降物をSDS-PAGEし、各抗体でウエスタンブロットング解析を行った。

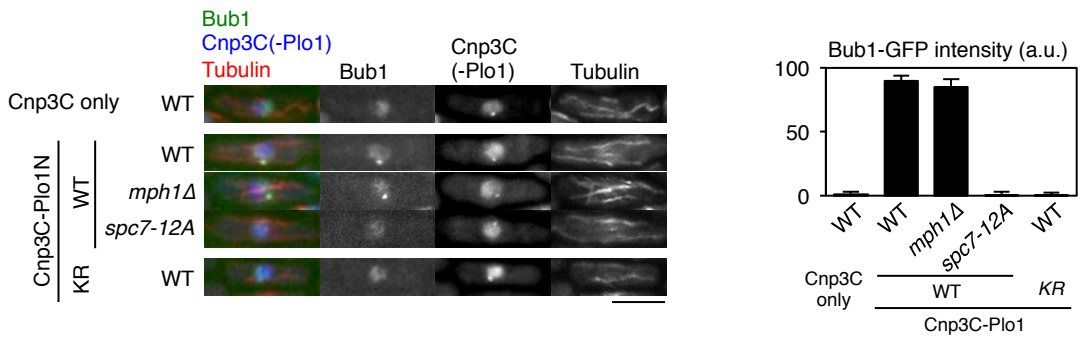
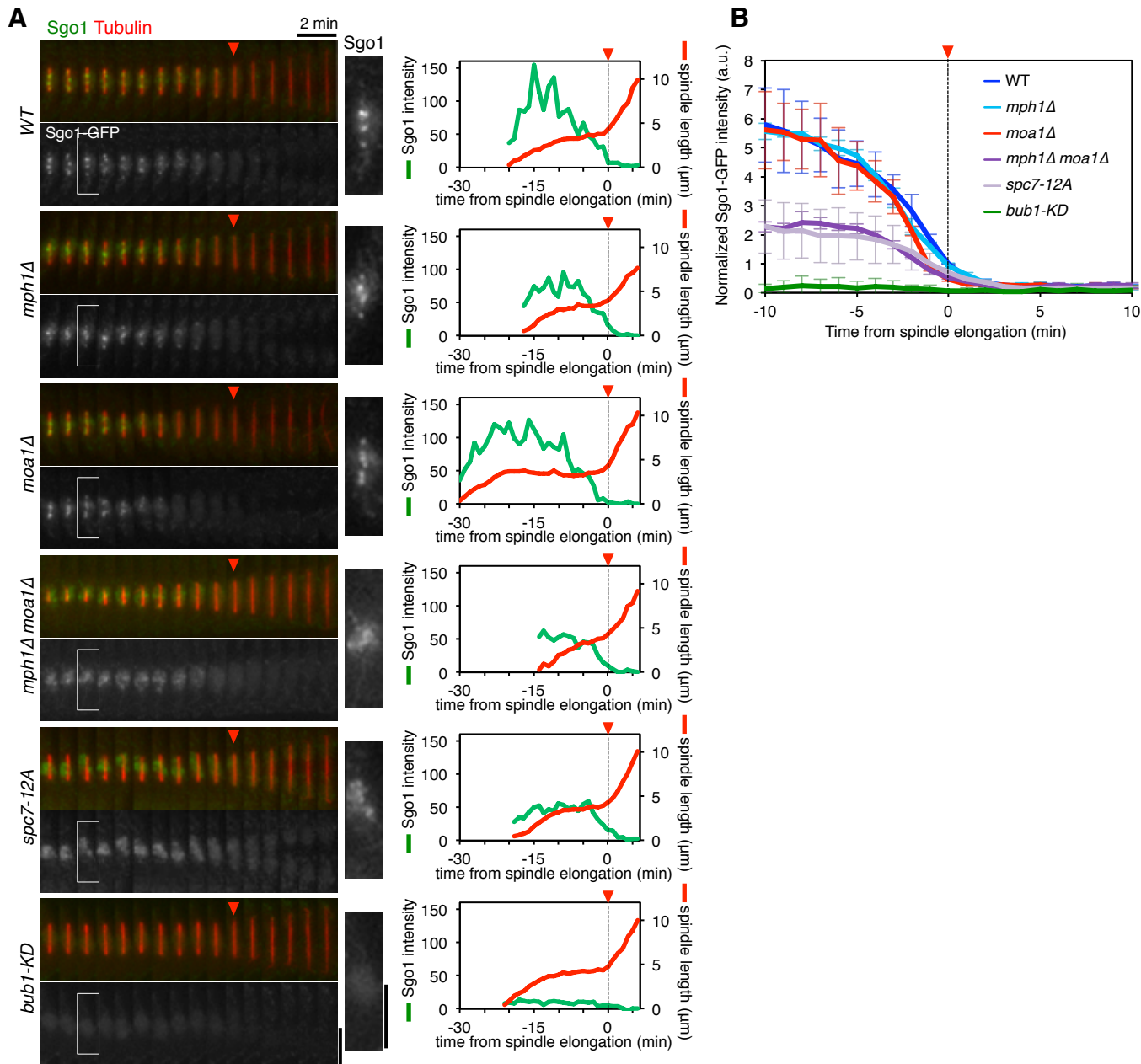


図11. Plo1はSpc7のリン酸化を介してBub1の動原体集積を促進する

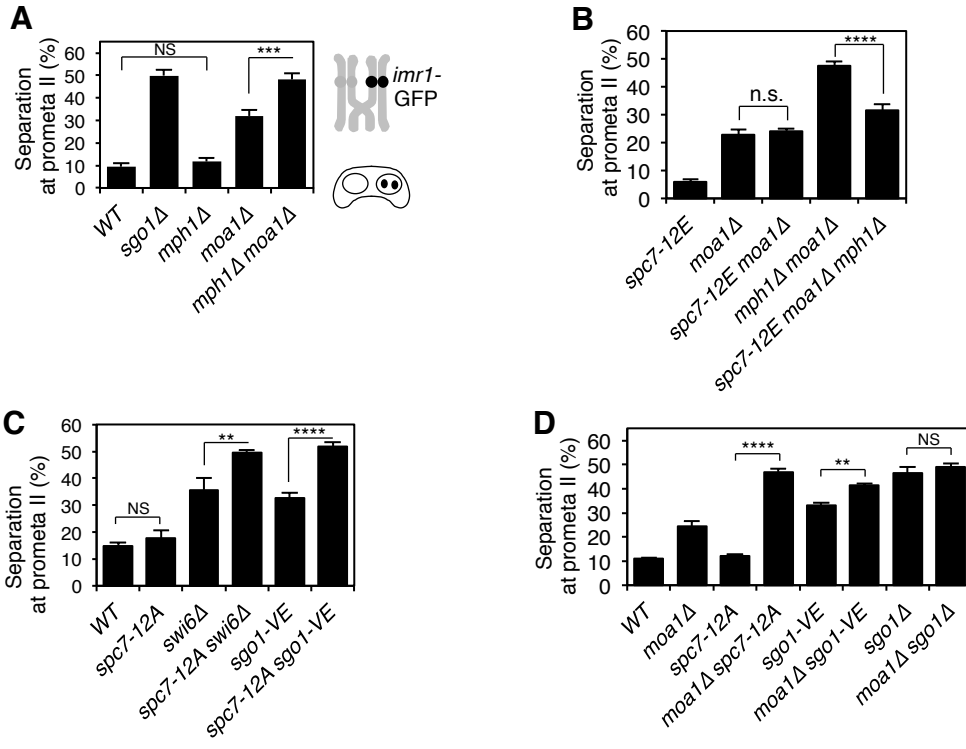
Plo1のキナーゼドメイン (Plo1N) をCnp3Cと融合させることで強制的に動原体へ集積したとき、体細胞分裂期の間期におけるBub1-GFPのシグナルを各種細胞株で観察した。(KR;kinase dead)



**図12. Moa1-Plc1とMph1はSgo1のセントロメア集積に必要である**

A. 各種細胞株でSgo1-GFPとチューブリン(mCherry-Atb2)のシグナルを減数分裂期において、1分間のインターバルでタイムラプス観察した。赤矢頭は分裂後期開始時期を示す。図の右側に、各タイムポイントにおけるSgo1-GFPシグナルの最大値とチューブリンの長さの定量値を示した。

B. 各種細胞株において、WT(野生株)の0minを1とした場合の、減数第一分裂期でのSgo1-GFPシグナルの最大値の平均値を定量した。分裂後期開始を time = 0 とする。エラーバーは標準偏差を示す。(3回(*mph1Δ*, *moa1Δ*, *mph1Δ moa1Δ* and *spc7-12A*)または4回(WT, *bub1-KD*)の独立した実験を行った。WT; n = 64, *mph1Δ*; n = 60, *moa1Δ*; n = 47, *mph1Δ moa1Δ*; n = 37, *spc7-12A*; n = 33, *bub1-KD*; n = 26 細胞。)



**図13. Moa1-Plo1はBub1の動原体局在化と、他の経路を介してセントロメアの接着保護を促進する**

A, B, C and D. 1番染色体のセントロメア領域をGFPで標識した*imr1-GFP*株と無標識の株を掛け合わせて減数分裂期へ誘導し、*mes1*変異によって減数第一分裂後に停止させた。各種細胞株において減数第一分裂が正常に行われた細胞のうち、分裂後にセントロメアのシグナルが2点に離れて見える細胞の割合を解析した。エラーバーは標準偏差を示す。(A;n>140, B;n>110, C;n>180, D;n>140細胞)) (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  NS; not significant, ANOVA (Tukey) with multiple comparison test.)

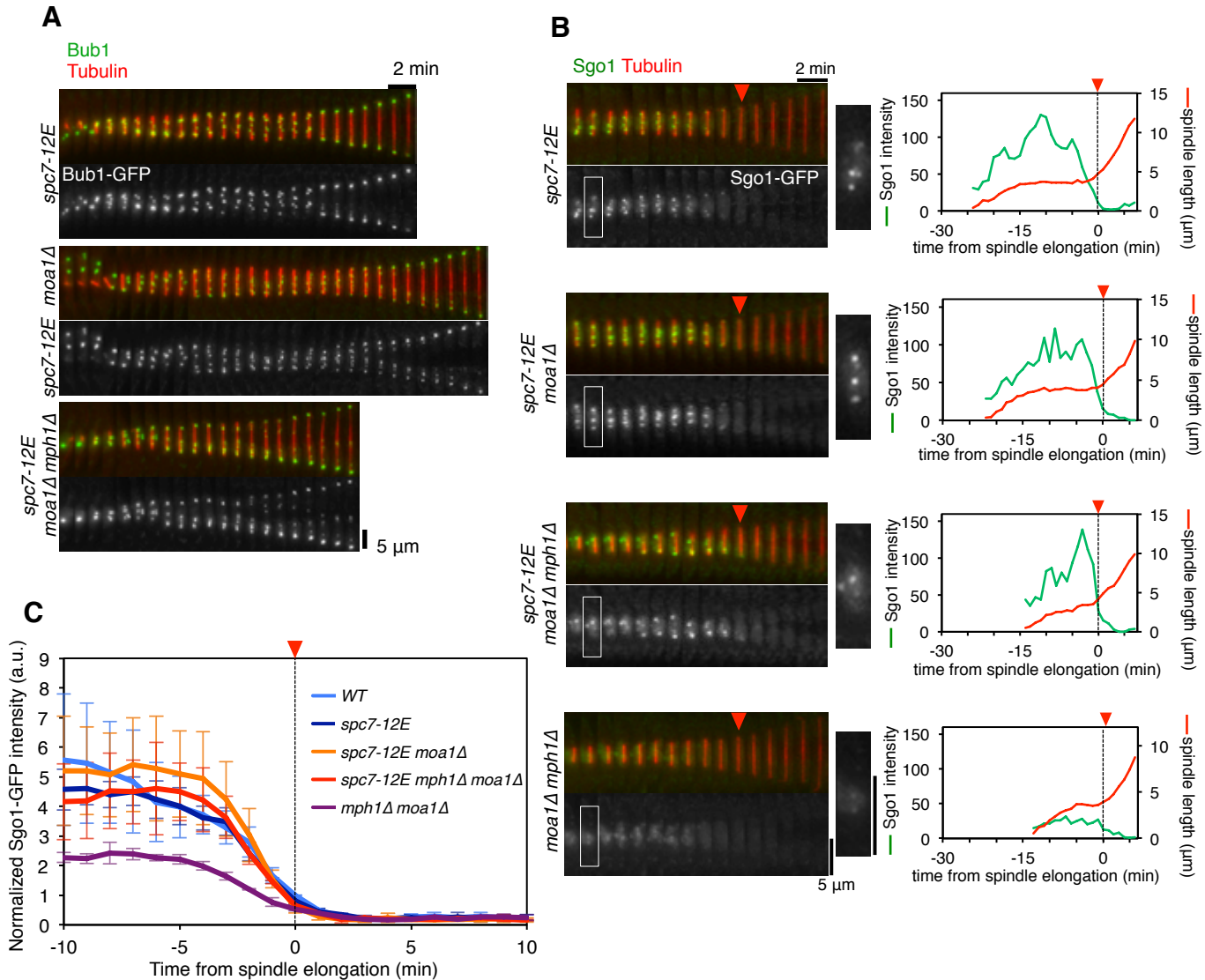


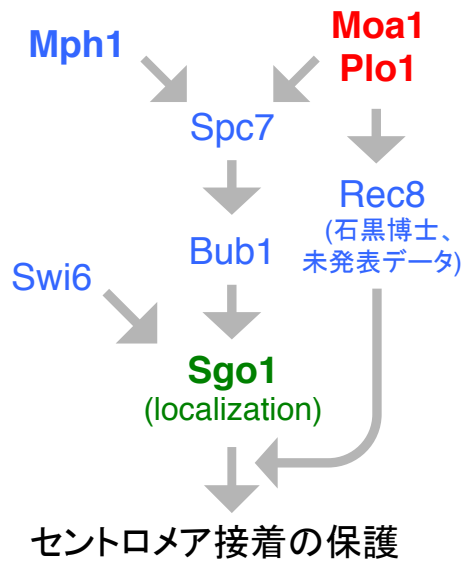
図14. *spc7-12E*変異は*mph1 moa1*二重変異株におけるBub1とSgo1の局在異常を抑圧した

A. 各種細胞株でBub1-GFPとチューブリン(mCherry-atb2)のシグナルを、減数分裂期において1分間のインターバルでタイムラプス観察した。

B. 各種細胞株でSgo1-GFPとチューブリン(mCherry-Atb2)のシグナルを減数分裂期において、1分間のインターバルでタイムラプス観察した。赤矢頭は分裂後期開始時期を示す。図の右側に、各タイムポイントにおけるSgo1-GFPシグナルの最大値とチューブリンの長さの定量値を示した。分裂後期開始をtime=0とする。

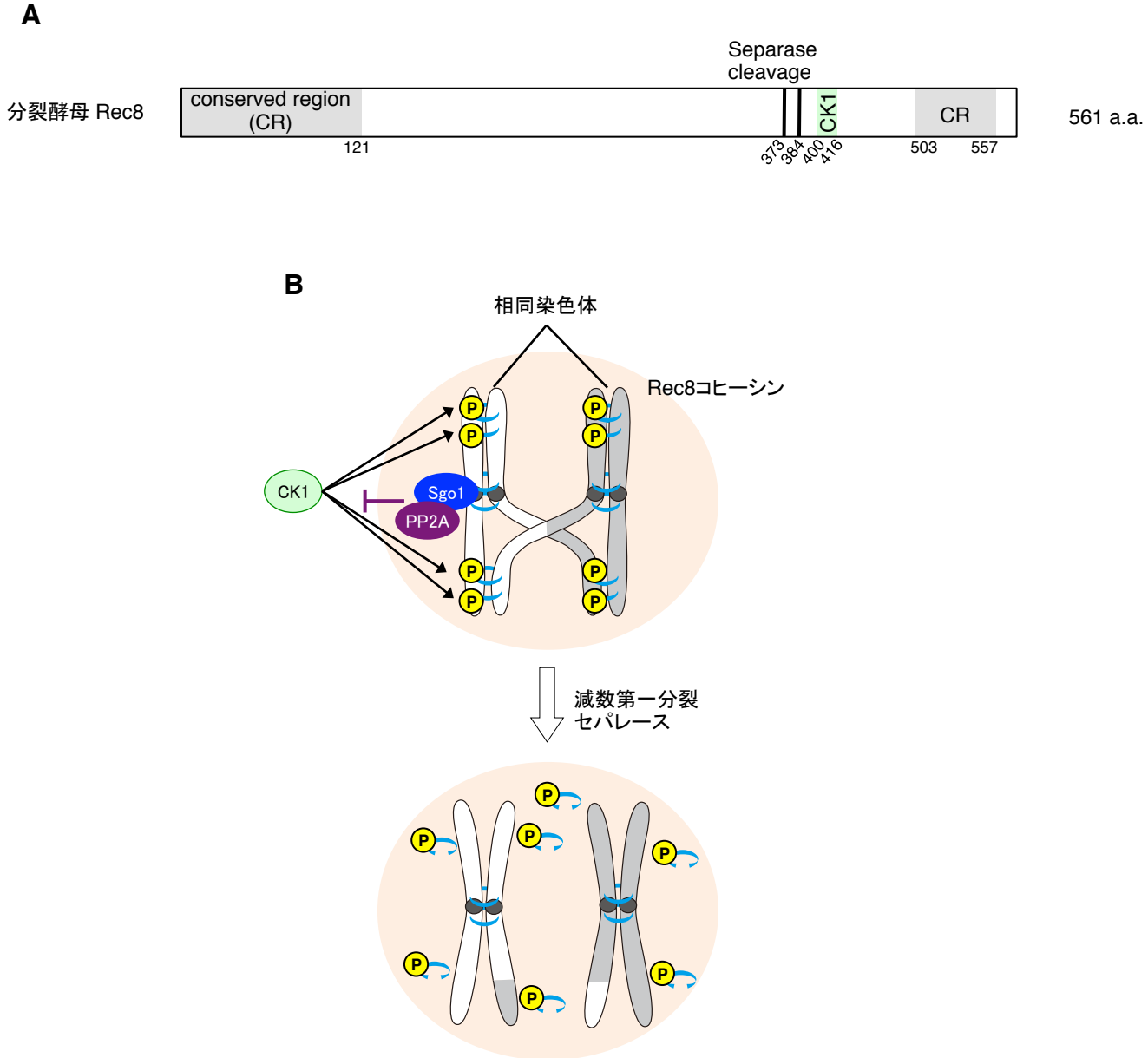
C. Bで観察した細胞株について、WT(野生株)の0minを1とした場合の、減数第一分裂期でのSgo1-GFPシグナルの最大値の平均値を定量した。エラーバーは標準偏差を示す。(3回の独立した実験を行った。解析に用いた細胞数、WT: n = 38, *spc7-12E*; n = 38, *spc7-12E moa1Δ*; n = 34, *spc7-12E mph1Δ moa1Δ*; n = 29, *mph1Δ moa1Δ*; n = 37細胞(図12Bと同じ))





### 図15. モデル図

Moa1-Plo1はMph1と協調的にSpc7の保存されたMELT配列をリン酸化し、Bub1の動原体局在化を促進する。動原体に集積したBub1は、Swi6と共にSgo1のセントロメア局在化を促進し、減数第一分裂期においてセントロメアの接着を保護する。また、Moa1-Plo1はSpc7のリン酸化を介したBub1の動原体局在化制御に加えて、Rec8をリン酸化することで、セントロメア接着の保護を促進する。(石黒博士未発表データ、詳細はまとめと展望を参照)



**図16. CK1キナーゼ依存的なRec8のリン酸化は、セパレーズによるRec8コヒーシンの切断促進する**

A. 分裂酵母Rec8の模式図。CR; keisinで保存された配列、Separase cleavage; 分裂後期でセパレーズによって切断される残基、CK1; CK1依存的にリン酸化されるセリンまたはスレオニン残基のクラスター領域。

B. 減数第一分裂期におけるセントロメアの接着保護機構のモデル図。CK1(casein kinase) 依存的なRec8のリン酸化はセパレーズによる切断を促進する。セントロメア領域はSgo1と、Sgo1依存的にセントロメアに集積するPP2Aホスファターゼによって、CK1依存的なリン酸化を抑制し、セパレーズによる切断から保護される。