

紡錘体と動原体の形成を制御する

新規因子 Kis1 の解析

**Analysis of a novel factor, Kis1, which
regulates formation of the spindle and
kinetochores**

2019 年 2 月

平井 隼人

Hayato HIRAI

紡錘体と動原体の形成を制御する

新規因子 Kis1 の解析

**Analysis of a novel factor, Kis1, which
regulates formation of the spindle and
kinetochores**

2019 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

生命医科学専攻

細胞骨格ロジスティクス研究

平井 隼人

Hayato HIRAI

目次

略語表	1
1 章 序論	2
1.1 染色体分配のメカニズム	
1.2 紡錘体の構造	
1.3 微小管を制御する新規因子を探索するためのスクリーニング	
1.4 動原体の構造	
1.5 ヒストン H3 バリエント CENP-A	
2 章 材料と方法	14
2.1 本研究で用いた大腸菌株	
2.2 本研究で用いた分裂酵母株	
2.3 本実験で用いた培地	
2.4 遺伝子クローニング操作	
2.5 分裂酵母ゲノム DNA の単離	
2.6 分裂酵母株の作製	
2.7 SPA スポットによる接合・減数分裂誘導とランダムスポア処理	
2.8 スポットテストによる温度感受性の解析	
2.9 細胞固定と DAPI 染色	
2.10 CDK 活性の阻害	
2.11 タンパク質の抽出と免疫沈降	

2.12 SDS-PAGE とウェスタンブロット

2.13 クロマチン免疫沈降 (ChIP)

2.14 蛍光顕微鏡による観察

2.15 LacO-LacI システムによる染色体の可視化

2.16 蛍光シグナルの測定

2.17 SPB 間およびセントロメア間距離の測定

3 章 結果 31

3.1 Kis1 は正確な染色体分配に必須の因子である

3.2 *kis1* 変異体では紡錘体の伸長および形成に異常が生じる

3.3 Kis1 は動原体と SPB が隣接する位置に局在する

3.4 *kis1* 変異体では CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 が脱局在する

3.5 Kis1 は CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 をセントロメアに局在させることで紡錘体を安定化する

3.6 Kis1 は Mis16-Mis18 複合体と遺伝学的相互作用を示す

3.7 Kis1 は動原体と紡錘体微小管の結合を安定化する

3.8 CENP-ACnp1 はコアセントロメアの構造維持に必要である

4 章 総合討論 61

4.1 Kis1 は CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 のセントロメア局在を促進することで紡錘体を安定化する

4.2 Kis1 は *Schizosaccharomyces* 属でのみ保存性が高い

4.3 *Kis1* は *Mis16* および *Mis18* と複合体を形成することでセントロメアに
局在する

4.4 *kis1* 変異体では部分的に SAC が活性化する

4.5 CENP-*I*^{Mis6} の局在は CENP-A^{Cnp1} および CENP-T^{Cnp20} に依存する

4.6 本研究のまとめ

5 章 引用文献 71

謝辞 80

研究業績 81

略語表

CBZ	Carbendazim
CCAN	Constitutive Centromere-Associated Network
CDK	Cycline-Dependent Kinase
CENP-A	Centromere Protein A
CFP	Cyan Fluorescent Protein
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
GFP	Green Fluorescent Protein
MAPs	Mictorubule-Associated Proteins
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SPB	Spindle Pole Body

1 章 序論

1.1 染色体分配のメカニズム

遺伝情報を担う染色体は複製された後、娘細胞へと均等に分配される。この過程が繰り返されることで同一の遺伝情報を持った細胞が増殖する。このとき染色体が不均等に分配されて一部の遺伝子が欠失するか過多になることは、細胞死あるいは細胞のがん化の原因となる (Dobles et al., 2000; Holland and Cleveland, 2009)。このことから、染色体が均等に娘細胞に分配されるメカニズムと、それに寄与する因子の機能を解明することは重要である。

間期に複製された染色体は、分裂期に形成される紡錘体によって娘細胞に分配される。紡錘体は、両極に位置する 2 つの中心体から細胞骨格の一つである微小管 (紡錘体微小管) が伸長することで形成される。紡錘体微小管は、染色体の狭窄部 (セントロメア領域) に形成される巨大なタンパク質複合体である動原体と接着する。全ての動原体と紡錘体微小管の接着が完了すると、紡錘体微小管は脱重合することで染色体を両極へ引っ張り、染色体分配が完了する (Fig. 1)。このとき、紡錘体あるいは動原体の形成が不完全である場合は、紡錘体微小管と動原体が正確に接着できず、染色体が不均等に分配される頻度が増加する。

本論文では紡錘体および動原体の形成に寄与する因子の解析を行い、染色体が精確に分配されるメカニズムの一端を明らかにした。1.2 ではまず、紡錘体の構造について説明し、1.3 では筆者が所属する研究室の先行研究により行われた、微小管の形成に寄与する新規因子を探索するためのスクリーニングについて説明する。1.4 では動原体構造の概略について説明し、1.5 では動原体の組み立てに必須の因子であるヒストン H3 バリエント CENP-A について説明する。

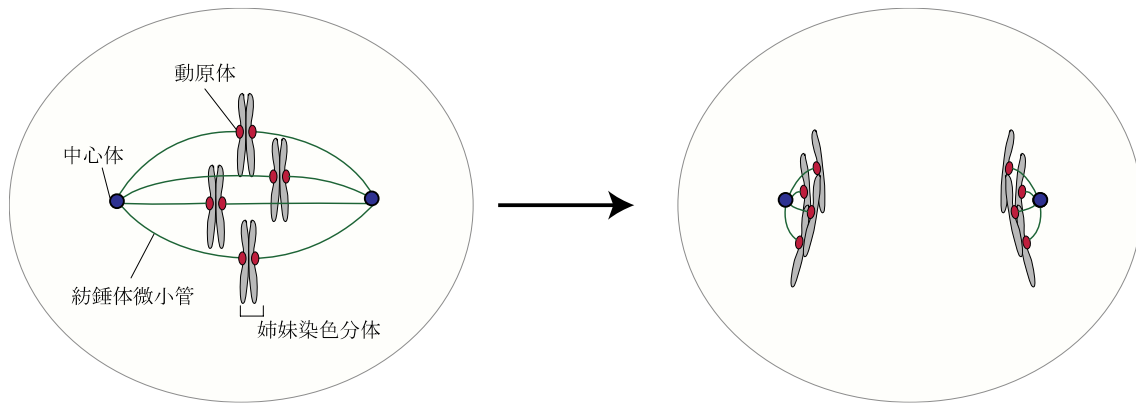


Figure 1 染色体分配のメカニズム

複製された染色体は娘細胞へと均等に分配されなければならない。中心体から伸長する紡錘体微小管が、染色体の狭窄部（セントロメア領域）に形成される動原体と接着する。その後、紡錘体微小管が脱重合することにより、染色体は両極に分配される。

1.2 紡錘体の構造

染色体が娘細胞に均等に分配されるためには紡錘体が正確に形成されなければならない。紡錘体は両極に位置する 2 つの中心体から微小管が伸長することで形成される。微小管は中心体を足場とする γ -チューブリン環複合体 (γ -tubulin ring complex, γ TuRC) に α/β -チューブリン 2 量体が呼び込まれ (Wiese and Zheng, 2006; Flor-Parra et al., 2018; Thawani et al., 2018)、その後、微小管結合タンパク質 (Microtubule-Associated Proteins, MAPs) によって伸長が促進される (Gard and Kirschner, 1987; Brouhard et al., 2008; Al-Bassam et al., 2012), (**Fig. 2A**)。伸長した微小管の一部は動原体と接着することで動原体微小管を形成する。さらに別の微小管は対極から伸長してきた微小管と逆並行に重なり合うことで極間微小管を形成する。また、中心体から放射状に微小管が伸長することで星状微小管が形成される (Wittmann et al., 2001), (**Fig. 2B**)。これまでに、このような微小管の形成や安定化に寄与する MAPs は数多く発見されてきたが、重要であるが未だに発見されていない因子が存在すると考えられる。1.3 では、このような因子を発見するために筆者が所属する研究室で行われたスクリーニングについて説明する。

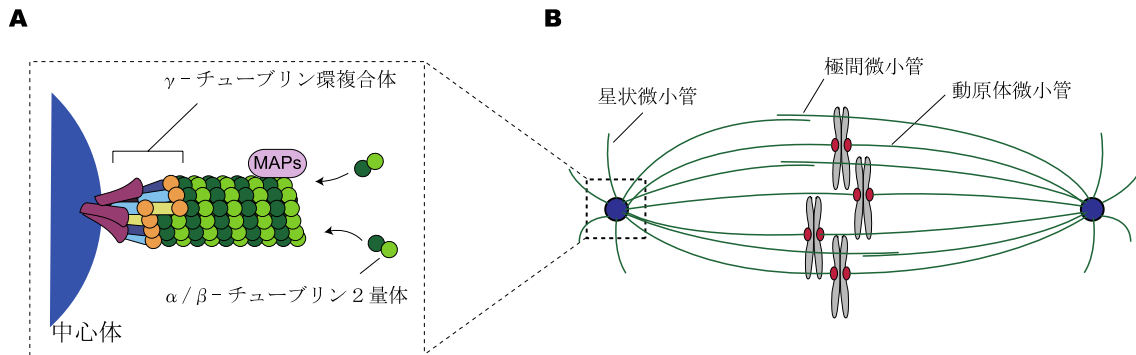


Figure 2 紡錘体の構造

A. 微小管は中心体を足場とする γ -チューブリン環複合体 (γ TuRC) に α/β -チューブリン2量体が呼び込まれ、微小管結合タンパク質 (MAPs) により重合が促進される。

B. 紡錘体は、動原体と接着する動原体微小管、対極から伸長してきた微小管が逆並行に重なり合うことで形成される極間微小管、および中心体から放射状に伸長する星状微小管から形成される。

1.3 微小管を制御する新規因子を探索するためのスクリーニング

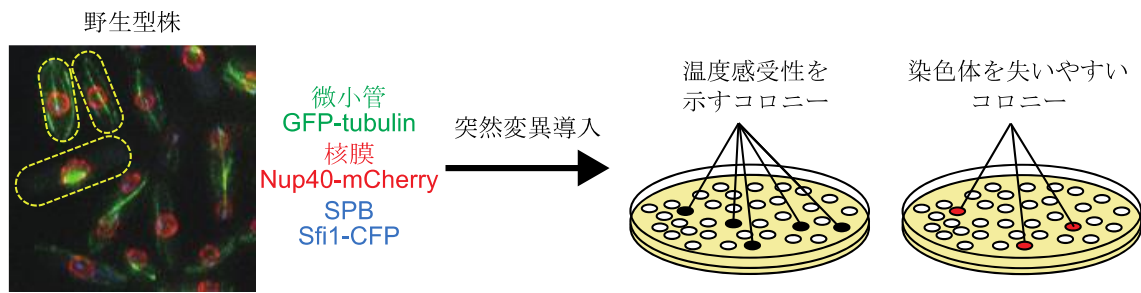
これまでに、いくつかの生物種において紡錘体形成に寄与する因子を探索するためのスクリーニングが行われた。例えばショウジョウバエの S2 細胞を用いて、全ての遺伝子を対象に一つ一つの遺伝子に対して RNA 干渉を行い、紡錘体形成に寄与する因子を探索するスクリーニングが行われた (Goshima et al., 2007)。また、線虫の 98% の遺伝子を対象にそれぞれ RNA 干渉を行った結果、紡錘体形成に寄与するいくつかの新規の因子が同定された (Sönnichsen et al., 2005)。さらにヒトにおいても約 21,000 遺伝子に対してそれぞれ RNA 干渉を行い、紡錘体形成に寄与する未知の因子がいくつか単離された (Neumann et al., 2010)。このように RNA 干渉により、紡錘体形成に寄与する新規の因子がいくつか同定された。しかしながら、RNA 干渉ではデータベースに登録されている遺伝子のみが対象となるため、全ての遺伝子を対象にすることが困難であること、タンパク質の発現量を完全に落とすことが出来ないこと、さらに off-target 効果により複数の遺伝子発現が低下する可能性があることから、全ての因子が完全に調べられた訳ではなく、未だに発見されていない重要な因子が存在すると思われる。このことから、RNA 干渉とは別のアプローチで因子の探索を行う必要があると考えた。

そこで筆者が所属する研究室では分裂酵母を用いて、微小管の形成を制御する未知の因子を単離するためのスクリーニングが行われた。分裂酵母では既に化学変異原により変異を導入するスクリーニング手法が確立されていること、ヒトなどと分裂様式が類似していること、さらに細胞周期が 3 時間程度で分裂期も短く、紡錘体の表現型の観察が容易であることなどから、今回のスクリー

ニングを行うモデル生物として分裂酵母は優れている。

スクリーニングは下記の手順でおこなわれた。まず、微小管を可視化するために α -チューブリンと GFP の融合タンパク質を発現しており、かつ細胞の生育に影響を与えない人工染色体を保持する株を野生型株とみなし、この株に対して化学変異原による突然変異を導入した。その結果、高温では生育できず、かつ人工染色体を維持できなかつた温度感受性変異体を約 2,000 株単離した。これらの変異体を顕微鏡で観察し、微小管の異常に応じて変異体を分類した (Fig. 3)。その中でも、これまでにほとんど報告例がなかつた紡錘体の中央部が脆弱になる変異体のひとつに着目し、原因遺伝子を追究した。具体的には、分裂酵母の DNA 断片が挿入されたプラスミドで構成されるゲノムライブラリを変異体に導入し、温度感受性の相補性を検定した。次に、温度感受性を相補したプラスミドの遺伝子配列をシーケンサーにより同定し、さらに変異体における該当遺伝子の配列を解読することで、変異箇所を特定した。その結果、原因遺伝子は機能が未解明の新規遺伝子であることが判明し、当該遺伝子を変異体の表現型に基づき *kis1* (kinetochore and spindle defect) と名付けた。

kis1 変異体では紡錘体の中央部が脆弱になることの他に、動原体を構成する因子である CENP-I^{Mis6}(分裂酵母オーソログ)および CENP-A^{Cnp1}(分裂酵母オーソログ)タンパク質の局在に異常がみられた (3.4 参照)。そこで、1.4 では動原体構造の概略について説明し、1.5 では動原体を組み立てるために必須の因子である CENP-A について説明する。



微小管に異常を示す変異体のライブラリ

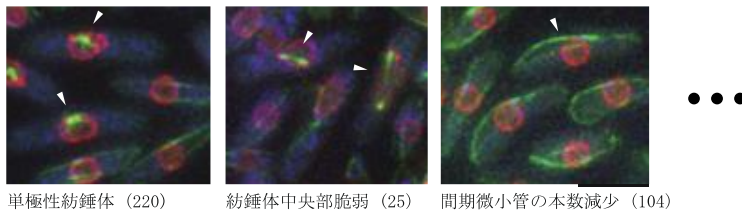


Figure 3 スクリーニングの概要

微小管が GFP- α -チューブリンで可視化され、かつ人工染色体を保持する株を野生型相当株として、これをニトロソグアニジン (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 終濃度 0.3 mg/ml) で処理することで突然変異を導入した。その結果、高温では生育できず、かつ人工染色体を維持できなかったコロニーを約 2,000 株単離した。単離された変異体のそれぞれを顕微鏡観察し、微小管が示す形態異常の種類に基づいて変異体を分類した。白矢頭はそれぞれの表現型を示した細胞を指す。カッコ内の数字は得られた変異体の数を示す。スケールバー; 5 μ m。Hirai et al., 2014 (Figs. 1 and 2)より図を転載し、改変した。

1.4 動原体の構造

動原体は染色体のセントロメア領域にのみ形成される巨大なタンパク質複合体である。セントロメア領域にはヘテロクロマチン化されたペリセントロメア領域と、その領域に挟まれたコアセントロメア領域が存在し、動原体はコアセントロメア領域に形成される (McKinley and Cheeseman, 2016)。電子顕微鏡を用いた観察により、動原体は内側から、インナーセントロメア、インナーキネトコア、アウターキネトコアの 3 層構造であることが報告されている (Jokelainen, 1967)。インナーセントロメアには動原体と紡錘体微小管の誤った結合を不安定化させる AuroraB や INCENP などの染色体パッセンジャー複合体 (Chromosomal Passenger Complex, CPC)、セントロメア配列に特異的に結合する CENP-B、そしてヒストン H3 バリエントである CENP-A が局在する。インナーキネトコアは CENP-A ヌクレオソームを基点として呼び込まれる 16 種類の動原体タンパク質 (Constitutive Centromere-Associated Network, CCAN) によって形成される。アウターキネトコアは紡錘体微小管との接着面であり、CCAN を足場として呼び込まれる KMN (KNL1、Mis12、Ndc80) によって形成される (Perpelescu and Fukagawa, 2011), (Fig. 4)。

これらの動原体タンパク質の中でも CENP-A は動原体形成の基点となることから、CENP-A について理解を深めることは動原体が形成されるメカニズムを解明する上で重要である。*kis1* 変異体では CENP-A^{Cnp1} タンパク質の局在異常が示されたため (3.4 参照)、1.5 では CENP-A について詳しく説明する。

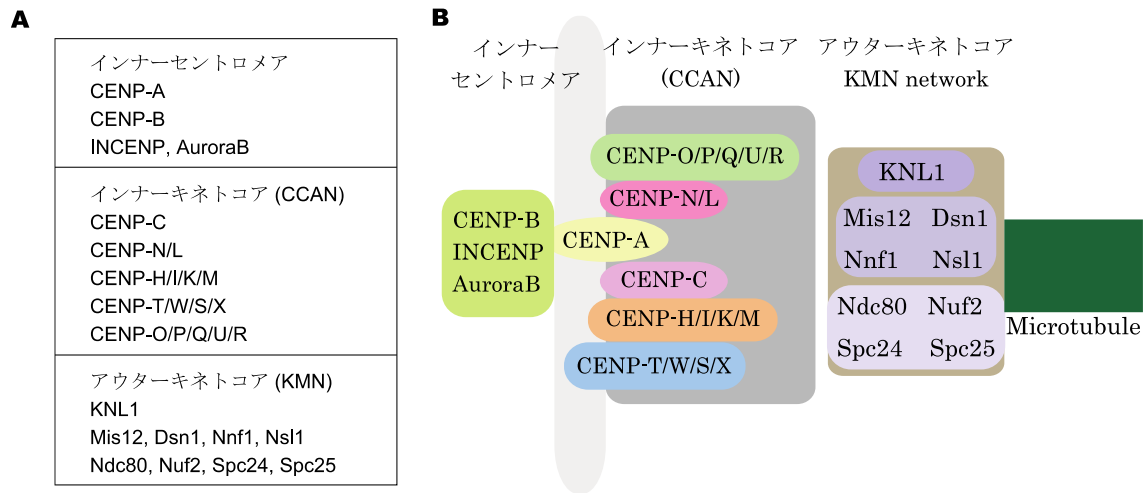


Figure 4 動原体の構造

A. 動原体は内側から、インナーセントロメア、インナーキネトコア、アウターキネトコアの3層構造である。それぞれの層を構成する因子を表で示す。

B. 動原体構造の概略図。

1.5 ヒストン H3 バリエント CENP-A

染色体は、ヒストン 8 量体に DNA が巻き付いて形成されるヌクレオソームが高度に凝集したクロマチン繊維である。ヒストン 8 量体は H2A、H2B、H3 および H4 から構成される。H2A、H2B および H3 には、わずかにアミノ酸配列が異なるバリエントがいくつか存在する (Churikov et al., 2004; Henikoff and Smith, 2015)。その中で、ヒストン H3 バリエントである CENP-A はセントロメア領域にのみ集積し、動原体形成の基点となる。セントロメア領域における CENP-A 量の過不足は染色体分配の異常につながることから、その量は厳密に制御される必要がある (Takahashi et al., 2000; Hayashi et al., 2004; Kitagawa et al., 2014; McKinley and Cheeseman, 2014)。そのため、DNA の複製に応じて CENP-A はセントロメア領域に供給される必要があるが、生物種間によって CENP-A が呼び込まれる時期は大きく異なる。ヒトにおいては、DNA 複製前の G1 期にのみ、ヒストン H3.3 と交換される形で CENP-A は呼び込まれ (Dunleavy et al., 2011)、分裂酵母では主に DNA 複製後の G2 期に呼び込まれる (Lando et al., 2012)。また、ショウジョウバエでは分裂期に CENP-A^{CID} が呼び込まれる (Mellone et al., 2011)。このような CENP-A が呼び込まれる時期の差異は、CENP-A を供給する因子の違いに依存すると推測される。

ヒトおよび分裂酵母では、CENP-A は Mis18 複合体およびヒストンシャペロン HJURP によって呼び込まれる (Hayashi et al., 2004; Fujita et al., 2007; Pidoux et al., 2009; Williams et al., 2009; Foltz et al., 2009; Dunleavy et al., 2009)。ヒトにおいては、核内に散在する (CENP-A/H4)₂ 四量体と結合した

HJURP が、動原体タンパク質 CENP-C と結合した Mis18 複合体 (Mis18BP1、Mis18 α 、Mis18 β) に呼び込まれることで CENP-A はセントロメア領域にのみ供給される (Sekulic et al., 2010; Moree et al., 2011; Barnhart et al., 2011), (Fig. 5A)。また、ヒトにおいては Mis18 複合体は分裂期にサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin-Dependent Kinase, CDK) によってリン酸化されることで、動原体への局在が阻害され、その結果、分裂期には CENP-A の供給が著しく低下する (McKinley and Cheeseman, 2014), (Fig. 5B)。一方で、ショウジョウバエでは、Mis18 および HJURP のオーソログは存在せず、かわりにヒトや分裂酵母にはオーソログが存在しない CAL1 によって CENP-A^{CD} が呼び込まれる (Chen et al., 2014)。

本論文では、スクリーニングにより単離された新規因子 Kis1 の機能解析を行った結果、Kis1 は Mis16 および Mis18 と複合体を形成し、CENP-A^{Cnp1} の呼び込みに寄与することが判明した。また、Kis1 は分裂酵母の近縁種でのみ保存性が高く、その他の生物種で保存されていなかった。このことから、分裂酵母では Kis1 が存在することで、その他の生物種とは異なる時期に CENP-A^{Cnp1} が供給されることが示唆された。それに加えて、*kis1* 変異体でみられる紡錘体形成の異常は、セントロメアから CENP-A^{Cnp1} が消失することにより、セントロメア DNA の立体構造が変形することで生じることが示唆された。このことから、CENP-A^{Cnp1} は動原体形成の基点としての機能のみならず、セントロメア DNA の立体構造を構築・維持することで、染色体分配の正確性に寄与するという新たな知見を得られたので報告する。

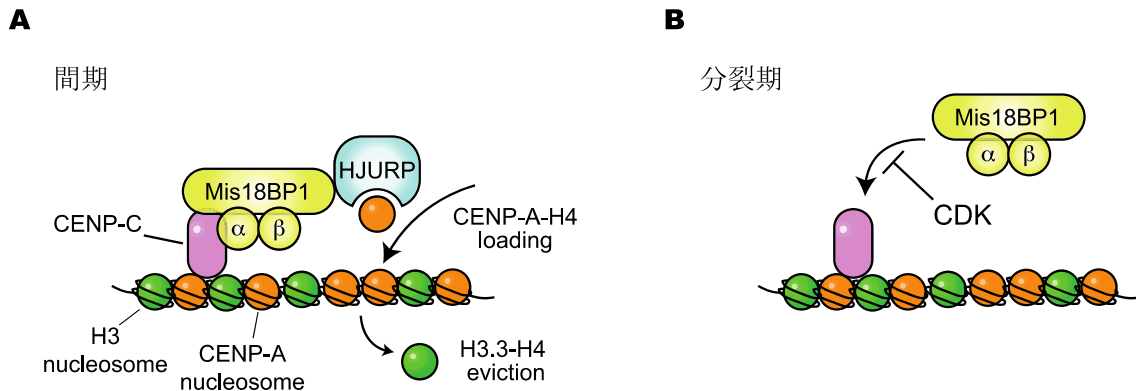


Figure 5 CENP-A は間期にのみ呼び込まれる

A. ヒトにおいて、間期では CENP-A ヌクレオソームに直接結合する CENP-C と Mis18 複合体 (Mis18BP1, Mis18 α , Mis18 β) は結合する。CENP-A のシャペロンである HJURP が Mis18 複合体と結合することで、セントロメア領域にのみ CENP-A は呼び込まれる。

B. ヒトにおいて、分裂期では Mis18 複合体はサイクリン依存性キナーゼ CDK によりリン酸化を受けることで、CENP-C との結合が解消される。そのため HJURP はセントロメアに局在することができず、CENP-A の供給が停止する。

2 章 材料と方法

2.1. 本研究で用いた大腸菌株

XL1-Blue; *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17* (*rk-mk+*), *lac*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*,
F'[*proAB*, *lacIqZ::M15*, *Tn10* (*tetr*)]

2.2. 本研究で用いた分裂酵母株

株番号	遺伝子型	図
HH145	<i>h⁹⁰ cen2<<lac0-kan-ura4+ his7+<<(dis1pro)-GFP-lacI sfi1-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	6A
HH146	<i>h⁻ kis1-1 cen2<<lac0-kan-ura4+ his7+<<(dis1pro)-GFP-lacI sfi1-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M210</i>	6A
HH17	<i>h⁻ leu1 ura4 ade6-M216</i>	6B, 13C
HH722	<i>h⁻ kis1-1 leu1 ura4 ade6-M216</i>	6B
HH231	<i>h⁺ sfi1-GFP-kan leu1 ura4</i>	7B
HH228	<i>h⁻ kis1-1 sfi1-GFP-kan leu1 ura4 ade6-M216</i>	7C
HH22	<i>h⁺ Z2-GFP-atb2-kan cnp3-tdTomato-hph sid4-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	7D, G
HH20	<i>h⁺ kis1-1 Z2-GFP-atb2-kan cnp3-tdTomato-hph sid4-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	7E-G
HH7	<i>h⁺ kis1-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph sid4-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	8A, C 10A
HH379	<i>h⁻ cdc25-22 kis1-GFP-kan</i>	8D
HH328	<i>h⁹⁰ kis1-GFP-kan mis6-2mRFP-hph sfi1-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M210</i>	8E
HH329	<i>h⁹⁰ kis1-GFP-kan mis6-2mRFP-hph sfi1-CFP-nat cdc2-as-M17-bsd leu1 ura4 ade6-M216</i>	8E
HH109	<i>h⁺ kis1-1 cut12-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	9B
HH112	<i>h⁹⁰ cut12-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph leu1 ura4 ade6-M210</i>	9B
HH96	<i>h⁹⁰ kis1-1 pcp1-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph leu1 ura4 ade6-M216</i>	9B

株番号	遺伝子型	図
HH102	<i>h⁺ pcp1-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	9B
HH95	<i>h⁺ kis1-1 sfi1-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph spo15-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M210</i>	9B
HH101	<i>h⁺ sfi1-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph spo15-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M210</i>	9B
HH55	<i>h⁹⁰ ndc80-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>	9C-F, 12B
HH74	<i>h⁺ kis1-1 ndc80-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph sid4-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M210</i>	9C-F, 12B
HH57	<i>h⁺ spc7-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph sid4-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	9C-F
HH77	<i>h⁺ kis1-1 spc7-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph sid4-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	9C-F
HH53	<i>h⁹⁰ mis12-GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>	9C-F
HH73	<i>h⁺ kis1-1 mis12-GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	9C-F
HH56	<i>h⁺ mis6-2GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>	9C-F
HH78	<i>h⁺ kis1-1 mis6-2GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>	9C-F
HH375	<i>h⁻ kis1-1 cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M210 +pREP1-GFP-cnp1</i>	9C-F
HH376	<i>h⁻ cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216 +pREP1-GFP-cnp1</i>	9C-F
HH58	<i>h⁻ mis6-2GFP-kan leu1 ura4</i>	9G
HH60	<i>h⁻ kis1-1 leu1 ura4 ade6-M216</i>	9G
HH80	<i>h⁺ kis1-1 mis6-2GFP-kan his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	9G
HH357	<i>h⁻ kis1-1 leu1 ura4 ade6-M216 + pREP1</i>	9H
HH117	<i>h⁻ leu1 ura4 ade6-M216 +pREP1-GFP-cnp1</i>	9H
HH138	<i>h⁻ kis1-1 leu1 ura4 ade6-M216 +pREP1-GFP-cnp1</i>	9H

株番号	遺伝子型	図
HH147	<i>h⁺ mis6-302 kis1-GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	10A
HH193	<i>h⁻ cnp1-1 kis1-GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat ade6-M216</i>	10A
HH113	<i>h⁻ leu1 ura4 ade6-M216 +pREP1-GFP</i>	10B
HH136	<i>h⁻ kis1-1 leu1 ura4 ade6-M216 +pREP1-GFP</i>	10B
HH316	<i>h⁻ leu1 ura4 ade6-M216 +pREP1-mis6-GFP</i>	10B
HH368	<i>h⁻ kis1-1 leu1 ura4 ade6-M216 +pREP1-mis6-GFP</i>	10B
HH5	<i>h⁻ Z2-GFP-atb2-kan nup40-mCherry-hph sfi1-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>	10F
HH6	<i>h⁺ kis1-1 Z2-GFP-atb2-kan nup40-mCherry-hph sfi1-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M210</i>	10F
HH40	<i>h⁹⁰ mis6-302 Z2-GFP-atb2-kan nup40-mCherry-hph sfi1-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M210</i>	10D-F
HH30	<i>h⁺ kis1-1 his2 leu1 ura4 ade6-M210</i>	11A
HH51	<i>h⁻ mis16-GFP-kan leu1 ura4 ade6-M216</i>	11A
HH32	<i>h⁻ mis18-GFP-kan leu1 ura4 ade6-M216</i>	11A
HH67	<i>h⁺ kis1-1 his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	11A
HH404	<i>h⁻ cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216 +pREP1-mis18-GFP</i>	11B
HH425	<i>h⁻ kis1-1 cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M210 +pREP1-mis18-GFP</i>	11B
HH391	<i>h⁺ kis1-GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	11C
HH407	<i>h⁺ mis18-262 kis1-GFP-kan cnp3-tdTomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>	11C
HH416	<i>h⁻ mis16-53 kis1-GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4</i>	11C
HH54	<i>h⁻ dis1-GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>	12A
HH83	<i>h⁺ kis1-1 dis1-GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat his2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	12A
HH211	<i>h⁹⁰ kis1-1 mad2-GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>	12C
HH222	<i>h⁹⁰ mad2-GFP-kan cnp3-tdtomato-hph sid4-CFP-nat leu1 ura4 ade6-M216</i>	12C

株番号	遺伝子型	図
HH104	<i>h⁻ leu1 ura4</i>	12D
HH239	<i>h⁹⁰ mad2::LEU2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	12D
HH72	<i>h⁹⁰ mis6-302 leu1 ura4 ade6-M216</i>	12D
HH246	<i>h⁹⁰ mis6-302 mad2::LEU2 leu1 ura4 ade6-M216</i>	12D
HH314	<i>h⁻ kis1-1 mad2::LEU2 sfi1-GFP-kan leu1 ura4 ade6-M216</i>	12E
HH583	<i>h⁺ cnt1::kan-lacO-6k his7+-Pdis1-GFP-lacI-NLS sfi1-CFP-hph leu1 (ura4-DS/E) mei4::ura4-DSE ade6-M210 FY534::RS FY527::RS z::nat-Padh31-tetR-tdTomato dh1L-tetO*2-ura4</i>	13B
HH585	<i>h⁹⁰ kis1-1 cnt1::kan-lacO-6k his7+-Pdis1-GFP-lacI-NLS sfi1-CFP-hph leu1 (ura4-DS/E) mei4::ura4-DSE ade6-M210 FY534::RS FY527::RS z::nat-Padh31-tetR-tdTomato dh1L-tetO*2-ura4</i>	13B
HH1262	<i>h⁺ kis1-1-HA-bsd leu1 ura4 ade6-M216</i>	13C

2.3. 本実験で用いた培地

2.3.1 大腸菌培養に用いた培地

大腸菌を通常培養する培地として LB 培地を用いた。必要に応じて LB 培地にアンピシリン (終濃度 40 µg/ml)あるいはカナマイシン (終濃度 10 µg/ml)を加えて使用した。培地の組成 (1 L あたり)を以下に示す。寒天培地を作製する際は、agar を 15 g 添加した。

LB 培地

bacto tryptone	10 g
bacto yeast extract	5 g
NaCl	5 g

2.3.2 分裂酵母培養に用いた培地

分裂酵母を通常培養するための完全培地として YE5S を用いた。培地の組成 (1 L あたり) を以下に示す。寒天培地を作製する際は agar を 20 g 添加した。

YE5S 培地

bacto yeast extract	5 g
D-glucose	30 g
5 supplements* ¹	0.35 g

カナマイシン耐性、ハイグロマイシン耐性、ナタマイシン耐性、ブラストサイジン耐性株の選択には、G418 (終濃度 0.1 mg/ml)、hygromycine B (終濃度 0.1 mg/ml)、clone NAT (終濃度 0.05 mg/ml)、blasticidin S (終濃度 0.03 mg/ml) を YE5S 培地に添加した。また、温度感受性コロニーの判別には、死細胞を染色する phloxine B (終濃度 2 µg/ml) を YE5S 培地に添加した。ウラシル要求性株の選択には 5-fluoroorotic acid (終濃度 1 mg/ml) を YE5S 培地に添加した。

アデニン要求性変異体である *ade6-M210* および *ade6-M216* を区別するために YE-LA 培地を用いた。培地の組成 (1 L あたり) を以下に示す。

YE-LA 培地

bacto yeast extract	5 g
D-glucose	30 g
adenine sulfate 溶液	(終濃度 7.5 µg/ml)
agar	20 g

栄養要求性株および形質転換体の選択をするために SD 培地を用いた。組成 (1 L あたり) を以下に示す。寒天培地を作製する際は agar を 20 g 添加した。

SD 培地

yeast nitrogen base w/o amino acids	6.7 g
D-glucose	20 g

以下のアミノ酸を適宜 SD 培地に添加した。

adenine sulfate	(終濃度 75 µg/ml)
histidine	(終濃度 50 µg/ml)
leucine	(終濃度 100 µg/ml)
lysine	(終濃度 50 µg/ml)
uracil	(終濃度 50 µg/ml)

nmt プロモーター下流の遺伝子がコードするタンパク質を過剰発現させるため EMM 培地を用いた。培地の組成 (1L あたり) を以下に示す。寒天培地を作製する際は agar を 20 g 添加した。過剰発現を抑制するために適宜 thiamine (終濃度 2 µg/ml) を加えた。

EMM 培地

KH phthalate	3 g
Na ₂ HPO ₄	2.2 g
50×MM* ²	20 ml
four vitamins* ³	1 ml
trace elements* ⁴	100 µl
citric acid (1g/100ml)	100 µl
5 supplements* ¹	0.35 g
D-glucose	20 g
25% NH ₄ Cl	20 ml

目的の遺伝子型を持つ分裂酵母株を得るためには、異なる遺伝子型の分裂酵母

株を接合させて孢子形成を誘導する必要がある。SPA 培地は窒素源を含まず、孢子形成させるための培地である。培地の組成 (1 L あたり) を以下に示す。

SPA 培地

KH ₂ PO ₄	1 g
D-glucose	10 g
four vitamins* ³	1 ml
adenine sulfate 溶液	(終濃度 75 µg/ml)
agar	30 g

*¹ 5 supplements の内訳を以下に示す。

adenine	0.1 g,
histidine	0.1 g
leucine	0.05 g
lysine	0.05 g
uracil	0.05 g

*² 50×MM の組成 (1 L あたり) を以下に示す。

MgCl ₂ ·6H ₂ O	53.3 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.735 g
KCl	50 g
Na ₂ SO ₄	2 g

*³ four vitamins の組成 (100 ml あたり) を以下に示す。

calcium pantothenate	0.1 g
nicotinic acid	0.1 g
myo-inositol	1 g

biotin 1 mg

*4 trace elements の組成 (100 ml あたり)を以下に示す。

H ₃ BO ₄	0.5 g
MnSO ₄	0.4 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.2 g
MoO ₄ ·2H ₂ O	0.16 g
KI	0.1 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.04 g

2.4 遺伝子クローニング操作

制限酵素処理、大腸菌の形質転換およびライゲーション反応などの一般的な遺伝子クローニング操作は標準的なプロトコルに従って行った (Sambrook et al., 1989)。

2.5 分裂酵母ゲノム DNA の単離

0.2 ml breaking buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0], 2% triton X-100, 1% SDS)に、YE5S 培地上で培養した細胞を加え、さらに 0.3 g 酸洗浄ビーズ (Sigma)および 0.2 ml phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (Invitrogen)を加えた。細胞破砕機 (FastPrep, MP Biomedicals)で細胞を破砕 (強度 5, 10 秒)し、そこに 0.2 ml TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0])を加えて 10,000 rpm で 5 分間遠心した。分離した上層を 200 μl 回収し、そこに 1 ml 100% ethanol (Wako)

を加えて転倒混和した後、室温で 5 分間静置した。その後、10,000 rpm で 3 分間遠心して上精を廃棄した。次に、0.5 ml 70% ethanol を加え、10,000 rpm で 30 秒間遠心し、上精を廃棄した。乾風後、50 μ l TE に懸濁した溶液を 20~50 倍希釈し、DNA 溶液とした。

2.6 分裂酵母株の作製

遺伝子破壊株および蛍光タンパク質発現株は (Bahler et al., 1998) に従い作製した。

2.6.1 PCR 産物の作製

分裂酵母を形質転換させるための PCR 産物は以下の方法で作製した。破壊株を作製する場合、1st PCR では目的遺伝子の ORF (Open Reading Frame) 直前の 500 base-pair (bp) を P1 および P2 プライマーで増幅した。また、蛍光タンパク質を目的タンパク質の C 端に付加する場合は、目的遺伝子の終始コドンの直前 500 bp を P1 および P2 プライマーで増幅した。さらに、ORF の直後 500 bp を P3 および P4 プライマーで増幅した。このとき P2 および P3 プライマーには特定の 20 bp (JB20) を付加した。次に、1st PCR 産物をプライマーとし、プラスミドを鋳型として 2nd PCR を行った。この際、鋳型に用いたプラスミドには特定の 20 bp (JB20) が含まれるため、プライマーとアニーリングすることができる。作製した 2nd PCR 産物で分裂酵母を以下の方法で形質転換した。

2.6.2 分裂酵母の形質転換

YE5S プレートで培養した宿主株を YE5S 液体培地に適量加えて一晩培養した。0.5~1 $\times 10^7$ cells/ml に達した培養液を 50 ml チューブに移し 2,000 rpm で

3 分間遠心した。上精を廃棄し、1 ml 滅菌水で懸濁した後、1.5 ml チューブに移して 2,000 rpm で 3 分間遠心し、上精を廃棄した。沈殿した細胞に 0.2 ml LiOAc/TE (0.1 M lithium acetate [pH 7.5], 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA [pH 7.5]) を加えて懸濁した。新しい 1.5 ml チューブに 10 μ l PCR 産物、5 μ l carrier DNA (TaKaRa)、100 μ l cell/LiOAc/TE および 240 μ l 40% PEG#4000 (ナカライ) を加えて、25°C あるいは 30°C で約 2 時間保温した。その後、43 μ l DMSO (dimethyl sulfoxide, Wako) を加え、42°C で 10 分間の熱ショックを与えた。5,000 rpm で 10 秒間遠心して上精を取り除き、そこに 50 μ l 滅菌水を加えて細胞を懸濁した。全量を YE5S プレートにまき、25°C あるいは 30°C で 1~2 日インキュベートした後、適切な抗生物質入りプレートにレプリカした。4~6 日後、形成したコロニーが目的の形質転換体かどうかをコロニー PCR によって確認した。コロニー PCR は以下の方法で行った。反応液 (5 μ l Sapphire Amp PCR Master Mix (TaKaRa), 0.1 μ l 100 μ M primer 1, 0.1 μ l 100 μ M primer 2, 4.8 μ l H₂O) を作製後、形成されたシングルコロニーをかき取り、反応液に懸濁して PCR を行った。primer 1 はプラスミド内にある Ttef NtoC あるいは Ura4 CtoN の配列をもとに設計した。primer 2 は 2 段階 PCR で用いた P4 プライマーより C 末端側に設計した。

プラスミドによる形質転換は以下の方法で行った。YE5S プレートで培養した宿主株を YE5S 液体培地で一晩培養し、細胞濃度が $0.5\sim 1.0 \times 10^7$ cells/ml に達した時点で細胞培養液を 50 ml チューブに移し、2,000 rpm で 3 分間遠心した。上精を廃棄し、1 ml LiOAc/TE を加えて懸濁し、懸濁液を 1.5 ml チューブに移して 2,000 rpm で 3 分間遠心した。上精を廃棄し、200 μ l LiOAc/TE を加えて

懸濁した。新しい 1.5 ml チューブに 2 μ l プラスミド DNA、5 μ l carrier DNA、100 μ l cell/LiOAc/TE を加えて 25°C で 1 時間インキュベートした。その後、240 μ l 40% PEG#4000 を加えて 25°C で 2 時間インキュベートした。その後、43 μ l DMSO を加え、42°C で 5 分間の熱ショックを加えて、SD-leucine プレートに懸濁液をまいた。5~7 日後、コロニーが形成されるので、生えてきたコロニーを SD-leucine プレートに塗り広げて株をストックした。

2.7 SPA スポットによる接合・減数分裂誘導とランダムスポア処理

1.5 ml チューブに 5 μ l leucine/uracil 混合液を加え、そこに YE5S プレートで培養した細胞を適量加えた。SPA プレートに細胞懸濁液をスポットして、25°C あるいは 30°C で 1~2 日培養した。栄養培地では細胞は通常の細胞周期を繰り返すが、SPA プレートでは窒素源が枯渇することで減数分裂が誘導される。培養後、SPA プレート上の細胞を 100 μ l 10% グルスラーゼ溶液 (PerkinElmer) に加えて約 30 分間反応させた。この反応により胞子嚢が溶解し、胞子が遊離する。その後、この溶液に 43 μ l 100% ethanol を加え、5 分間静置させた後、2,000 rpm で 1 分間遠心して上精を取り除き、500 μ l YE5S で懸濁した。適当な濃度の胞子懸濁液を YE5S プレートにまき、4~5 日培養した。

2.8 スポットテストによる温度感受性の解析

YE5S あるいは SD-leucine 培地で培養した細胞を滅菌水に懸濁し、細胞濃度を 2×10^5 cells/ μ l になるように調製した。この懸濁液を 2×10^{-1} cells/ μ l まで 10 倍毎に希釈した。YE5S 培地あるいは EMM 培地に 2×10^5 cells/ μ l の濃度から順

に 5 μ l ずつスポットした。

2.9 細胞固定と DAPI 染色

細胞培養液にホルムアルデヒド (終濃度 3.2%)を加えて 20 分間静置した後、2,000 rpm で 1 分間遠心して上精を取り除き、PBS (145 mM NaCl, 1.5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.2 mM Na_2HPO_4)で 1 回洗浄した。1 μ l の細胞懸濁液をスライドガラスに載せ、乾燥させた後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を 1 μ l 載せ、カバーガラスを被せて観察した。

2.10 CDK 活性の阻害

サイクリン依存性キナーゼ (Cycline-Dependent Kinase, CDK)活性を阻害するため、*cdc2-asM17*変異体 (Aoi et al., 2014)に対して DMSO あるいは ATP アナログである 1NM-PP1 (Calbiochem)を終濃度が 2 μ M になるように加えた。

2.11 タンパク質の抽出と免疫沈降

2.11.1 細胞の回収条件

Figure 8D では、*cdc25-22*変異体を 25°C で一晩培養した後、36°C で 4 時間培養し、細胞を G2 期で停止させた。その後、再び 25°C で培養した細胞を 20 分毎に回収した。Figure 9G, H では細胞を 25°C で一晩培養した後、36°C で 6 時間培養した細胞を回収した。

2.11.2 タンパク質抽出

Figures 8D, 9G, 9H で使用した株は lysis buffer によりタンパク質を抽出した。

それぞれの条件で培養した細胞を 2,000 rpm で 3 分間遠心し、上精を廃棄して 1 ml STOP buffer (150 mM NaCl, 10 mM EDTA [pH 8.0], 50 mM NaF, 1 mM NaN_3)を加えて 1.5 ml チューブに移した。2,000 rpm で 3 分間遠心し、上精を取り除き、50 μl lysis+C buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA [pH 8.0], 10% glycerol, 150 mM NaCl, 0.05% NP-40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, complete protease inhibitor cocktail (Roche))を加えた。次に酸洗浄ビーズを加え、細胞破砕機により細胞を破砕した (強度 5.5, 25 秒, 3 回)。そこに 50~150 μl lysis+C buffer を加えて、チューブの底に注射針で穴を開け、新しい 1.5 ml チューブに重ねて 4,000 rpm で 1 分間遠心し、細胞破砕液を回収した。回収した破砕液をさらに 8,000 rpm で 3 分間遠心して上精を回収した。回収した細胞破砕液のうち、20 μl に対して等量の 2 \times SDS buffer (100 mM Tris-HCl, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue, 20% glycerol, 200 mM dithiothreitol)を加えて 100°C で 3 分間加熱した。

2.12 SDS-PAGE とウェスタンブロット

4-12% gradient polyacrylamide gel (Bio-Rad)を用いて SDS-PAGE を行った後、iBlot Dry Blotting system (Invitrogen, Program P3)を用いてニトロセルロース膜にタンパク質を転写した。ニトロセルロース膜は 0.1%スキムミルク (0.1% tween-20 を含む)でブロッキングした後、1 次抗体反応を行った。1 次抗体には抗 GFP 抗体 (Roche, 1:1000)あるいは抗 α -tubulin 抗体 (Sigma, 1:2000)を用いた。1 次抗体反応後、PBST buffer (145 mM NaCl, 1.5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.2 mM Na_2HPO_4 , 0.1% tween-20)でニトロセルロース膜を 3

回洗浄した後、2次抗体反応を行った。2次抗体にはヒツジ抗マウス IgG 抗体 (1:2500, GE Healthcare)を用いた。2次抗体反応後、PBST buffer でニトロセルロース膜を3回洗浄した後、ECL Prime Western Blotting System (Amersham Bioscience)を用いてルミノールを発光させて、Las-1000 plus (Fuji film)によってバンドを検出した。

2.13 クロマチン免疫沈降 (ChIP)

Figure 13C では、細胞を 25°C で一晚培養後、36°C で6時間培養した後、回収した。培養液に 1/10 量のホルムアルデヒド buffer (11% formaldehyde, 0.1 M NaCl, 1m M EDTA, 0.5 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl[pH 7.5])を加えて10分間 36°C で保温した後、氷上で50分間静置した。次に、3,000 rpm で5分間遠心して上精を廃棄し、Buffer I (50 mM HEPES[pH 7.5], 140 mM NaCl, 1 mM EDTA[pH 7.5], 1% triton-X100, 0.1% sodium deoxycholate)で細胞を4回洗浄した。洗浄した細胞と同量の Buffer I* (Buffer I に complete protease inhibitor cocktail, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride を含む)を加えた細胞懸濁液をねじ式チューブに移し、そこに酸洗浄ビーズをチューブの8割ほどまで加えた。細胞破砕機により細胞を破砕 (強度 6, 20 秒, 4 回)し、100 µl Buffer I*を加えた。ねじ式チューブの底に注射器で穴を開け、新しい 1.5 ml チューブに重ねて 7,000 rpm で1分間遠心した。回収した細胞破砕液をまとめて、液量を約 500 µl にして超音波発生機により DNA を断片化した (TAITEC, 10% power, 10 秒 (0.2 秒 on, 0.4 秒 off), 10 回)。次に、5,000 rpm で3分間遠心して上精を回収し、さらに 14,000 rpm で15分間遠心して上精を回収した。回収した溶液に含まれるタ

ンパク質濃度を測定 (Bradford 法)し、全てのサンプルのタンパク質濃度を 5 mg/ml に調製した。調製した溶液の 20 μ l を全細胞抽出液 (whole-cell extract, WCE)とし、200 μ l を免疫沈降に用いる溶液とした。この溶液に対して、抗 *cnp1* 抗体 (齋藤成昭博士により提供, 1:200)、抗 H3K9ac 抗体 (Millipore, 1:200)、抗 H3 抗体 (abcam 1:133)、抗 H3K9me2 抗体 (abcam, 1:200)をそれぞれの溶液に加えて 4°C で 1 時間インキュベートした。その後、protein A-Sepharose beads (GE) を加えて 4°C で 2 時間インキュベートした。インキュベート後、5,000 rpm で 20 秒間遠心して上精を取り除き、Buffer I で beads を 3 回洗浄した。さらに Buffer I (50 mM HEPES[pH 7.5], 500 mM NaCl, 1 mM EDTA[pH 7.5], 1% triton-X100, 0.1% sodium deoxycholate)で 3 回洗浄し、Buffer II (10 mM Tris-HCl[pH 8.0], 250 mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate)で 2 回洗浄し、最後に TE で 2 回洗浄した。洗浄した beads に 100 μ l の TER buffer (TE, 10 μ g/ml RNase A)を加え、20 μ l WCE に 180 μ l の TER を加えて 37°C で 15 分間インキュベートすることで RNA を消化した。次に、これらの溶液に対して 10% SDS および 20 mg/ml proteinase K (Wako)を加えて 37°C で 8 時間インキュベートすることでタンパク質を分解し、さらに 65°C で 6 時間インキュベートすることでホルムアルデヒド架橋を解消した。その後、フェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿により DNA を回収した。続いて、得られた DNA に対して THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)と StepOne Real Time PCR system (Applied Bio systems)を用いて定量 PCR を行った。コアセントロメア (*cnt*)のプライマーセットは (Yokobayashi et al., 2003)で報告されたものを使用した。

2.14 蛍光顕微鏡による観察

Delta-Vision SoftWoRx を用いて顕微鏡観察を行った (Sato et al., 2009)。35 mm glass-bottomed dish (IWAKI) にレクチン溶液 (0.2 mg/ml) を 50 μ l 載せて 3 分間静置した後、レクチン溶液を除去して細胞培養液を載せて 15 分間静置した。その後、EMM 培地を 2 mL 加えて観察を行った。観察時の温度は許容温度である 25°C あるいは制限温度である 36°C で行った。酵母細胞の厚みを考慮して z 軸方向の撮影を 0.4 μ m おきに 10~12 枚行った。撮影した画像は SoftWoRx を用いて、非焦点面から漏れてくる光を除去するデコンボリューションおよび z 軸方向の画像を投影して 1 枚の画像に重ねるプロジェクション処理を行った。

2.15 LacO-LacI システムによる染色体の可視化

染色体の特定の領域に *lacO* リピート配列を挿入し、さらに *lacO* リピート配列に結合する LacI タンパク質に GFP を融合させた GFP-LacI を発現させることで、染色体の特定の領域を可視化することができる (Yamamoto and Hiraoka; 2003)。本研究で用いた *cen2*-GFP 株は第二染色体のセントロメア領域の端に *lacO* リピート配列が挿入されている。さらに、*cnt1*-GFP *dh1L*-tdTomato 株は第一染色体のコアセントロメア領域である *cnt* に *lacO* リピート配列が挿入され、ペリセントロメア領域である *dh* に *tetO* リピート配列が挿入されている (Sakuno et al., 2009)。*tetO* リピート配列には TetR が結合するため、TetR-tdTomato を発現させることで *tetO* 領域を可視化することができる。

2.16 蛍光シグナルの測定

Figure 7G の GFP-Atb2 シグナル強度は、SoftWoRx で画像処理後、画像解析ソフト ImageJ により計測した。具体的な解析手法を以下に示す。分裂中期における紡錘体を範囲選択し、その領域における GFP-Atb2 シグナルの平均輝度値を算出した。また、蛍光バックグラウンドの影響を考慮して、同様の選択範囲で細胞外の平均輝度値を算出して、GFP-Atb2 シグナルの平均輝度値からその値を減算した。

2.17 SPB 間およびセントロメア間距離の測定

距離の測定は SoftWoRx を用いて行った。SPB 間距離は 2 点の Sfi1-GFP シグナルを 1 分毎に測定した。セントロメア間距離は、姉妹染色分体の *cnt1*-GFP 間、*dh1L*-tdTomato 間および同一染色体の *cnt1*-GFP と *dh1L*-tdTomato 間を測定した。シグナル間の距離を可能な限り正確に測定するため、ドット状のシグナル強度を 12 段階に分類し、その中でシグナル強度が最も高く分類されたピクセル間の距離を測定した。

3 章 結果

筆者が所属する研究室では、微小管を制御する未知の因子を単離する目的で、微小管に異常を示す変異体を得るスクリーニングが行われた。その結果、得られた多くの変異体の中から新規因子である **Kis1** が発見された。*kis1* 変異体では、紡錘体の中央部が脆弱になる異常と、動原体の内側に位置する CENP-A^{Cnp1} および CENP-I^{Mis6} の局在が消失する異常が観察された。このことから、**Kis1** は紡錘体および動原体の両方の形成に寄与する因子だと考えられるが、詳細は明らかになっていなかった。

3.1 **Kis1** は正確な染色体分配に必須の因子である

スクリーニングの過程で、人工染色体を用いて染色体不安定性を示す変異体を収集したため、*kis1* 変異体は染色体分配に異常が生じることが示唆されていた。そこで、*kis1* 変異体における染色体分配の様子を調べるため、DNA を DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色し、第 2 染色体を GFP で可視化 (Yamamoto and Hiraoka, 2003) した結果、染色体の不均衡分配が観察された (**Fig. 6A**)。さらに、染色体の不均衡分配が細胞の生育にどの程度影響するのかを調べるため、野生型と *kis1* 変異体で細胞の生育を比較した結果、許容温度下では *kis1* 変異体は生育がわずかに悪化し、制限温度下では顕著に悪化した (**Fig. 6B**)。また、共同実験者により、*kis1* 遺伝子を破壊すると細胞が生育不能になることが示されたことから、*kis1* は必須遺伝子であることが判明した (Hirai et al., 2014)。以上の結果から、**Kis1** は染色体を娘細胞に均等に分配するために必須の因子であるといえる。

また、Kis1 は機能未知の因子であったことから、これまでに生物種間で保存されているかは明らかになっていなかった。そこでまず、*S.pombe* と同じ分裂酵母の近縁種である *S.cryophilus*、*S.octosporus*、*S.japonicus* 内に Kis1 のアミノ酸配列と相同性のある配列が存在するか検索した結果、全ての近縁種内に相同性の高い配列が存在することがわかった。さらに、*Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母)内にも、Kis1 の一部と相同性の高い配列が存在した。しかしながら、線虫、ショウジョウバエおよびヒトでは Kis1 と相同性のある配列は存在しなかった (Fig. 6C)。このことから、Kis1 は進化的に近い種でのみにしか保存されていないと考えられる。

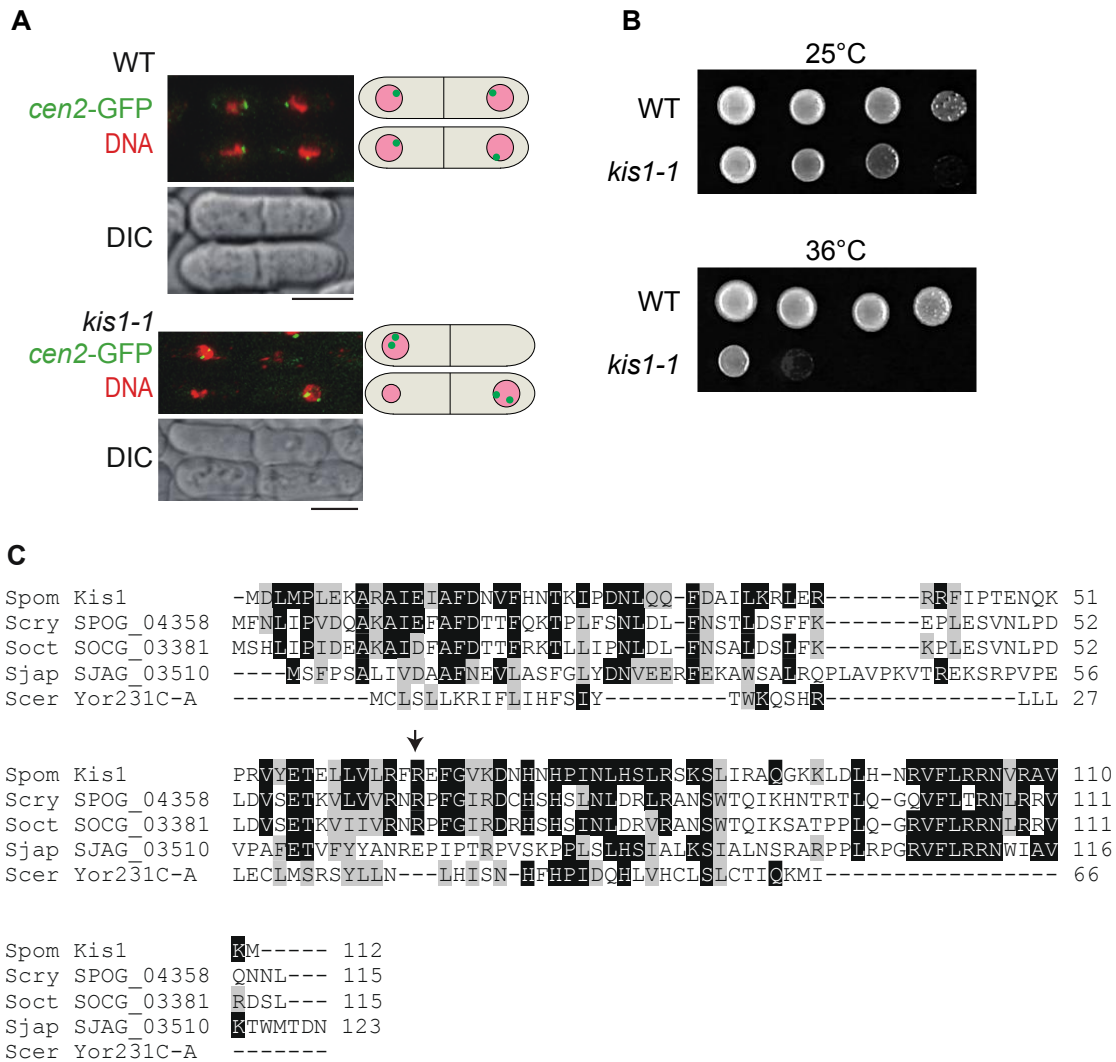


Figure 6 Kis1 は正確な染色体分配に必須の因子である

A. *kis1* 変異体で染色体は不均等に分配された。*cen2-GFP* により可視化した第2染色体を緑、DNA を赤で示し、明視野顕微鏡による観察画像を示す。36°C で6時間培養後、観察を行った。スケールバー; 5 μ m。

B. 10倍毎に希釈した細胞懸濁液を 25°C および 36°C の YE5S 培地にスポットし、温度感受性を調べた結果、36°C で *kis1* 変異体の生育は顕著に悪化した。

C. *S.pombe* 内の *Kis1* とオーソログであると予想される各酵母種のアミノ酸配列。同一アミノ酸を黒、類似アミノ酸を灰色で示す。Spom; *Schizosaccharomyces pombe*、Scry; *Sch. cryophilus*、Soct; *Sch. octosporus*、Sjap; *Sch. japonicus*、Scer; *Saccharomyces cerevisiae* を示す。Kis1、SPOG_04358、SOCG_03381、SJAG_03510、Yor231C-A はタンパク質名を表

す。黒矢印は単離した *kis1* 変異体における変異箇所を示す (R65C)。

図は Hirai et al., 2014 (Fig. 4D, G)より転載して改変した。

3.2 *kis1* 変異体では紡錘体の伸長および形成に異常が生じる

kis1 変異体では、紡錘体の中央部が脆弱になる表現型が観察されていたが、その詳細は明らかになっていなかった。そこで、これを調べるために分裂前期から後期までの紡錘体形成の様子を観察した。

分裂酵母における紡錘体形成は Phase I、Phase II、Phase III の 3 つの段階に区別される (Nabeshima et al., 1998), (**Fig. 7A**)。Phase I は分裂前期に相当し、複製された SPB (Spindle Pole Body, 高等生物の中心体に相当する器官) が両極に分かれ、紡錘体は約 2 μm まで伸長する。Phase II は中期から後期 A に相当し、微小管と動原体の結合が確立して染色体は両極へと分配される。この間、紡錘体は伸長しない。Phase III は後期 B に相当し、SPB 間をつなぐ極間微小管の伸長により紡錘体が伸長する (**Fig. 7A**)。そこで、SPB を構成する因子の一つである Sfi1 を GFP で可視化して紡錘体の段階的な伸長を測定したところ、野生型では約 95% の細胞が Phase I から Phase II を経由して Phase III へと移行するのに対して (**Fig. 7B**)、*kis1* 変異体では約 30% の細胞が Phase II から Phase III へと移行しなかった (**Fig. 7C**)。また、微小管を構成する Atb2 (α -チューブリン) を GFP で標識した (GFP-Atb2) ところ、野生型において紡錘体は SPB 間で一定の太さが保持されていたが (**Fig. 7D**)、*kis1* 変異体では紡錘体中央部の GFP-Atb2 シグナルが両端に比べて微弱な様子が観察された (**Fig. 7E**)。この表現型は Phase III へと移行しなかった細胞においても観察された (**Fig. 7F**)。具体的に、*kis1* 変異体で紡錘体中央部がどの程度脆弱であるか調べるため、分裂中期における紡錘体を 4 区分し、両端 2 区分 (Pole) と中央 2 区分 (Middle) のそれぞれの GFP-Atb2 シグナル量を測定し、Middle/Pole のシグナル比を算出

した。その結果、*kis1* 変異体が生育可能な許容温度 25°C でのシグナル比は、野生型および *kis1* 変異体ともに 0.9 程度で有意差はなかった。一方で、*kis1* 変異体が生育不可能な制限温度 36°C でのシグナル比は、野生型では 0.9 程度であるのに対して、*kis1* 変異体では 0.7 程度まで低下しており、有意差があった (Fig. 7G)。

これらのことから、Kis1 は紡錘体を一定の太さに保持しながら伸長させることで、染色体を均等に分配すると考えられる。

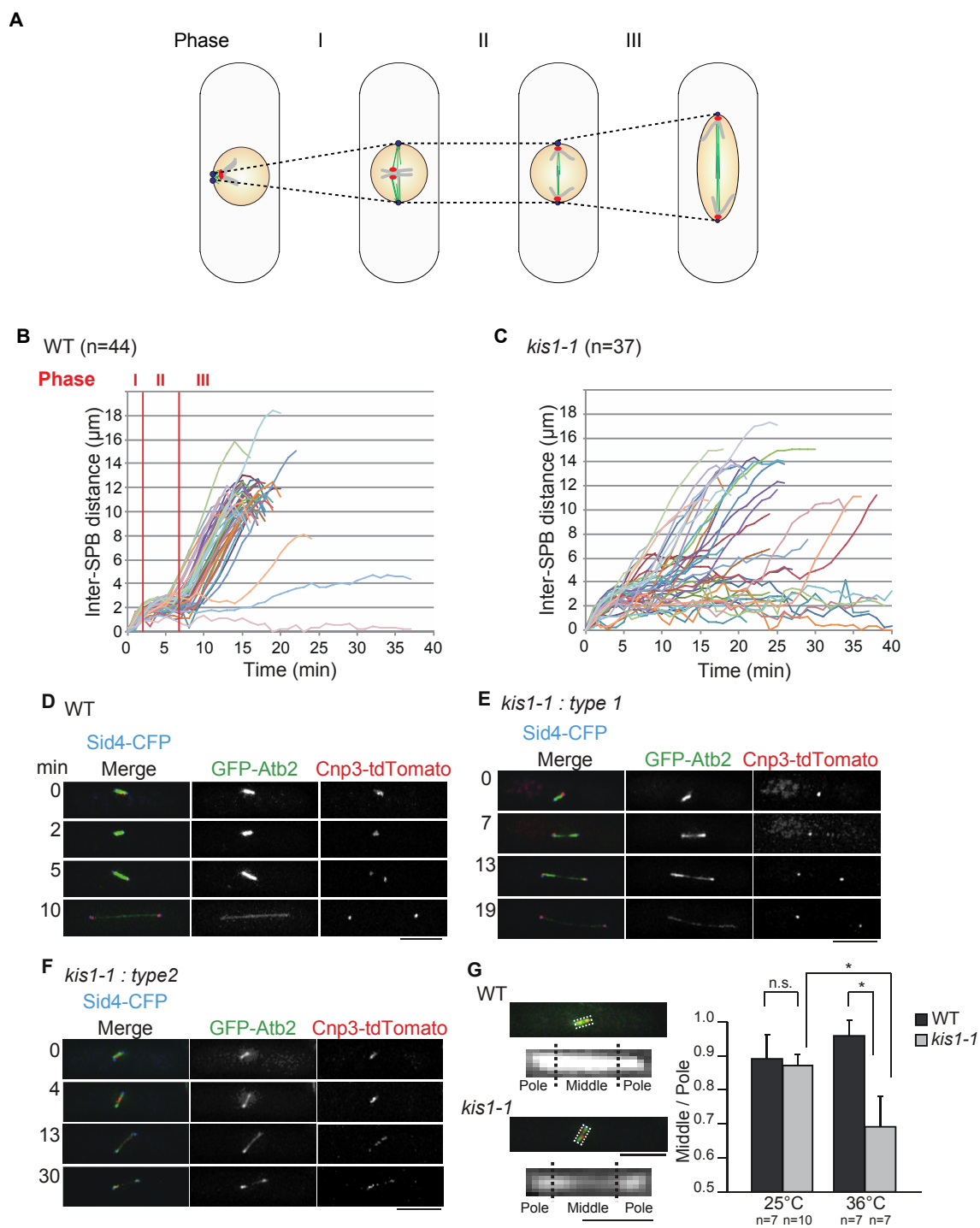


Figure 7 *kis1* 変異体では紡錘体の形成および伸長に異常が生じる

A. Phase I、Phase II、Phase IIIにおける紡錘体の状態を示した模式図。Phase I は分裂前期、Phase IIは中期から後期 A、Phase IIIは後期 B に相当する。

B, C. 野生型および *kis1* 変異体における Phase I から Phase III までの紡錘体伸長の様子。Sfi1-GFP を発現する株を用いて 1 分毎に SPB 間距離を測定した。制

限温度 36°C で 6 時間培養後に観察を行った。n; 測定した細胞数。

D-F. 野生型および *kis1* 変異体での紡錘体形成の様子を観察した。野生型では GFP-Atb2 シグナルが端から端まで一定であるのに対して、*kis1* 変異体では紡錘体中央のシグナルが低下した。SPB を Sid4-CFP (青)、微小管を GFP-Atb2 (緑)、動原体を Cnp3-tdTomato (赤) で示す。*kis1-1.type1* は Phase III まで移行した細胞、*kis1-1.type2* は Phase II で停止した細胞を示す。スケールバー; 5 μ m。

G. 紡錘体中央部と両端の GFP-Atb2 シグナル比を定量し、野生型と *kis1* 変異体で比較した。左図: 定量方法の例。Phase II における紡錘体を 4 区分し、両端 2 区分を Pole、中央 2 区分を Middle とした。Middle/Pole のシグナル比を示したグラフ。シグナル強度は画像解析ソフト ImageJ を用いて計測した。n.s; not significant ($P > 0.05$)、*; $P < 0.05$ 、student の t 検定 (両側検定)。n; 測定した細胞数。エラーバーは標準誤差 (S.E.M.) を示す。

図は Hirai et al., 2014 (Fig. 3) より転載し、改変した。

3.3 Kis1 は動原体と SPB が隣接する位置に局在する

Kis1 は紡錘体の形成に寄与することから、微小管結合タンパク質であることが予想された。それを確かめるため、Kis1 に GFP を融合して発現させた株を観察したところ、Kis1-GFP は細胞質微小管あるいは紡錘体上には局在せず、間期において 1 点のドット状局在が観察された (Fig. 8A)。間期において、SPB には染色体のセントロメア領域がつながり止められており、セントロメアのクラスターを形成している (Funabiki et al., 1993), (Fig. 8B)。このとき、SPB および動原体因子を可視化すると 1 点のドット状に局在することから、Kis1 はこれらの因子と共局在することが予想された。実際に、Kis1-GFP は SPB マーカーである Sid4-CFP および、動原体マーカーである Cnp3-tdTomato と共局在した (Fig. 8A)。しかしながら、分裂期には Kis1-GFP の局在は消失した (Fig. 8A)。そこで、Kis1 の局在が分裂期のどの時点で消失するかを特定するため、分裂期の直前から分裂後期まで Kis1-GFP を経時的に観察した。その結果、SPB が 2 点に分かれる直前まで Kis1-GFP は局在するが、SPB が 2 点に分かれ始める分裂前期の開始とともに消失した。その後、後期 B に入り SPB がさらに分離していく時点で Kis1-GFP は再び局在した (Fig. 8C)。以上のことから、Kis1 は間期において動原体と SPB が隣接する位置に局在するが、分裂期の開始とともに Kis1 の局在は消失し、後期 B に移行した直後に再び動原体と SPB に局在することが判明した。

分裂期における Kis1 局在の消失は Kis1 が分解されたことによる可能性がある。そこで *cdc25* 温度感受性変異体 (Russell and Nurse, 1986) を用いて、制限温度下で細胞を G2 期に同調し、その後許容温度に戻すことで G2 期から分裂期

へと進行させた。その後、20分毎に回収した細胞の抽出液における Kis1-GFP の量をウェスタンブロットで検出したが、分裂期を通じてタンパク質量に差はなかった (**Fig. 8D**)。このことから、Kis1 は分裂期において分解されるのではなく、局在を消失させることがわかった。

Kis1 の局在が消失するのは分裂前~中期に限られていたため、その消失は分裂期の代表的なキナーゼであるサイクリン依存性キナーゼ (Cycline-Dependent Kinase, CDK)により制御される可能性が高い。そこで ATP のアナログ分子を加えることで CDK 活性を強制的に阻害できる *cdc2-as* 変異体 (Dischinger et al., 2008; Aoi et al., 2014)を用いた実験を行い、Kis1 の局在が CDK 活性に依存するか調べた。ATP アナログ分子を加えない分裂前~中期の細胞では Kis1-GFP の局在は消失するのに対して、ATP アナログ分子を加えた同時期の細胞では Kis1-GFP が SPB に局在した (**Fig. 8E**)。このように、Kis1 の局在消失は CDK 活性に依存するため、野生型細胞では CDK が活性化する分裂期の開始とともに Kis1 の局在は消失するが、CDK 活性が低下する分裂後期から間期においては Kis1 は動原体と SPB の隣接部位に局在する。

以上の結果から、Kis1 は分裂期には機能せず、間期に動原体および SPB に局在することで紡錘体形成を促進することが示唆された。

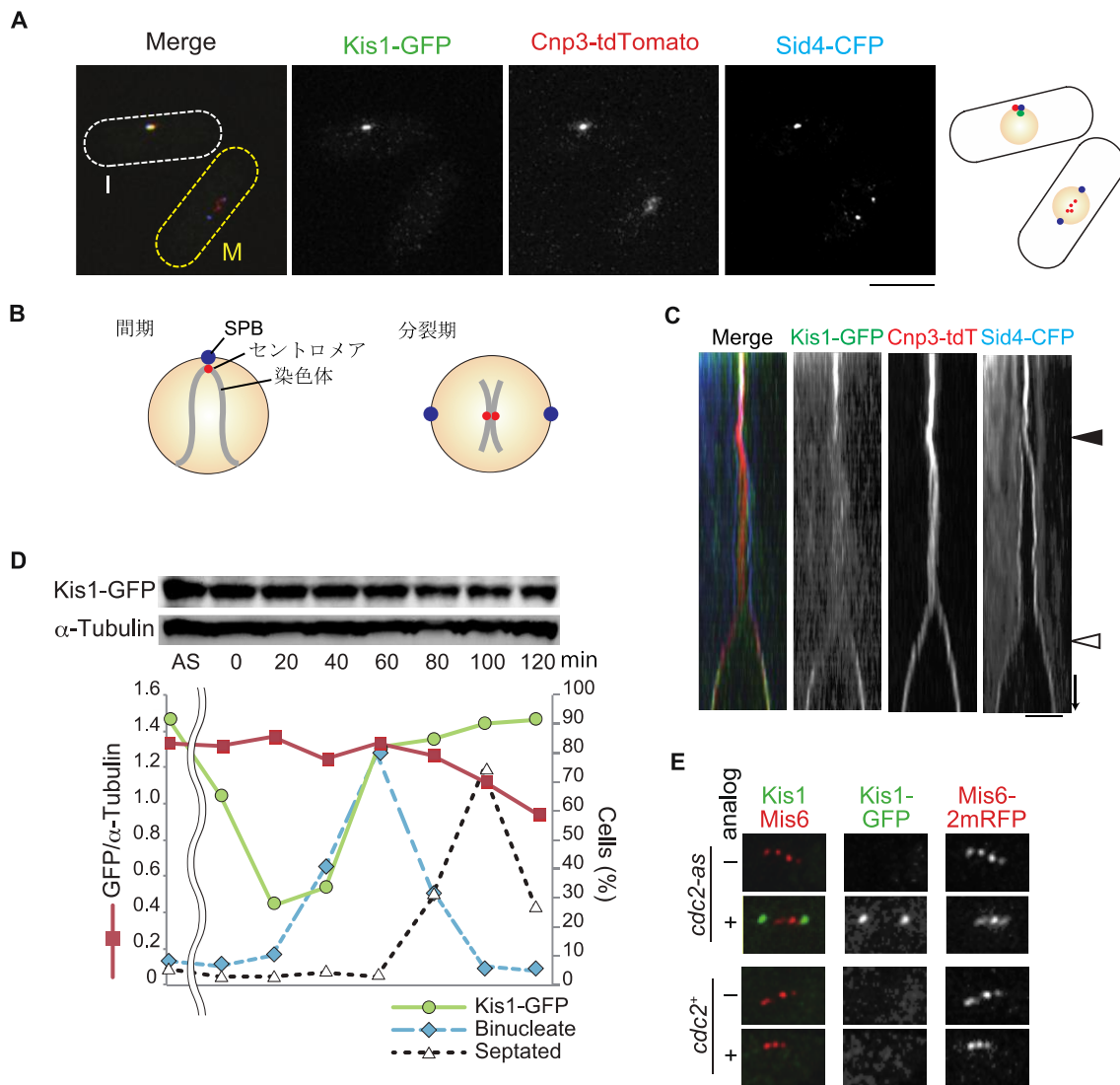


Figure 8 Kis1 は間期に動原体と SPB が隣接する位置に局在する

A. 間期において Kis1 は動原体および SPB と共局在するが、分裂期では Kis1 の局在は消失する。Kis1-GFP を緑、動原体である Cnp3-tdTomato を赤、SPB である Sid4-CFP を青で示す。I は間期、M は分裂期の細胞を示す。スケールバー; 5 μ m。

B. 間期ではセントロメア領域が SPB につなぎ止められているが、分裂期ではそれが解消される。

C. 1 細胞内の分裂前期~後期 B における各シグナルを時間経過とともに示したカイモグラフ。Kis1-GFP を緑、動原体である Cnp3-tdTomato を赤、SPB である Sid4-CFP を青で示す。黒矢頭は Kis1-GFP が消失するタイミング、白矢頭は

Kis1-GFP が再局在するタイミングを示す。下矢印の全長は 2 分に相当する。スケールバー; 5 μm 。

D. *cdc25-22* 温度感受性変異体を用いて、制限温度 36°C で 4 時間細胞を培養して G2 期で同調した後、許容温度 25°C にすることで分裂期へと同調的に進行させた。その後 20 分毎に回収した細胞と、非同調細胞 (AS) からタンパク質を抽出し、Kis1-GFP 量をウェスタンブロットにより検出した。その際、 α -Tubulin の発現量をコントロールとした。Kis1-GFP が局在する細胞の割合 (緑)、DAPI 染色による 2 核の細胞の割合 (青, Binucleate)、隔壁が形成された細胞の割合 (白, Septated) を示した。また、Kis1-GFP の発現量と α -Tubulin の発現量の比 (赤, GFP/ α -Tubulin) を示した。GFP/ α -Tubulin 比は ImageJ によりバンド強度を測定し、算出した。

E. *cdc2-as* 変異体に対して、分裂前~中期に ATP アナログ分子である 1NM-PP1 を加えると、Kis1-GFP は SPB に局在した。DMSO (-) または 1NM-PP1 (+) を、*cdc2-as* 変異体あるいは野生型の培養液に加えて 5 分以内に観察を行った。スケールバー; 5 μm 。

図は Hirai et al., 2014 (Fig. 5) より転載し、改変した。

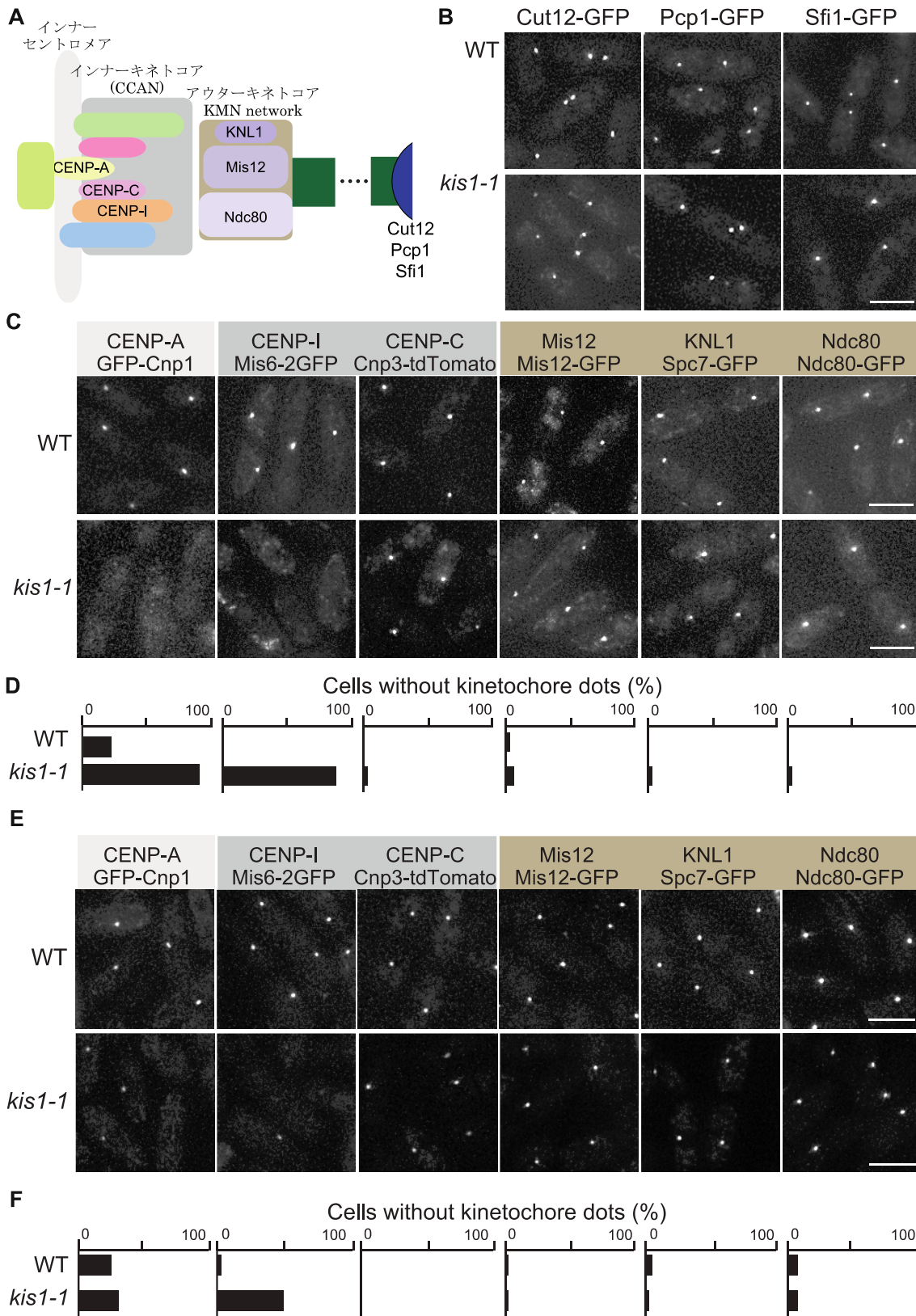
3.4 *kis1* 変異体では CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} が脱局在する

動原体あるいは SPB を構成する一部の因子の変異体では紡錘体形成に異常がみられることが報告されている (Fong et al., 2009; Hsu and Toda, 2011)。Kis1 は動原体と SPB が隣接する位置に局在することから、Kis1 は間期に動原体あるいは SPB の形成を促進することが予想された。そこでまず、SPB を構成する代表的な因子である Cut12 (Bridge et al., 1998)、Pcp1 (Flory et al., 2002)、Sfi1 (Kilmartin, 2003) の局在を *kis1* 変異体において制限温度下で観察した結果、野生型と同様の局在を示した (Fig. 9B)。

次に、Kis1 が動原体の形成を促進すると予想し、動原体を構成する主要な因子である CENP-A^{Cnp1} (Takahashi et al., 2000)、CENP-I^{Mis6} (Saitoh et al., 1997)、CENP-C^{Cnp3} (Tanaka et al., 2009)、Mis12 (Goshima et al., 1999)、KNL1^{Spc7} (Kerres et al., 2004)、Ndc80 (Wigge and Kilmartin, 2001), (Fig. 9A) の *kis1* 変異体における局在を制限温度下で観察した。その結果、CENP-A^{Cnp1} および CENP-I^{Mis6} の局在がほとんどの細胞で動原体から消失した (Fig. 9C, D)。また、許容温度下で同様の実験を行った結果、CENP-A^{Cnp1} は野生型と同様の局在を示したが、CENP-I^{Mis6} が局在する細胞の割合は約 50%まで低下した (Fig. 9E, F)。

kis1 変異体における CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} の局在率の低下はタンパク質が分解されたことが原因である可能性が考えられる。そこで、CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} のタンパク質量をウェスタンブロットにより調べた結果、制限温度下における野生型と *kis1* 変異体ではいずれのタンパク質量も差を示さなかった (Fig. 9G, H)。以上の結果から、Kis1 は間期に動原体の内側を構成す

る CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 を正常に局在させるために必要な因子であることがわかった。



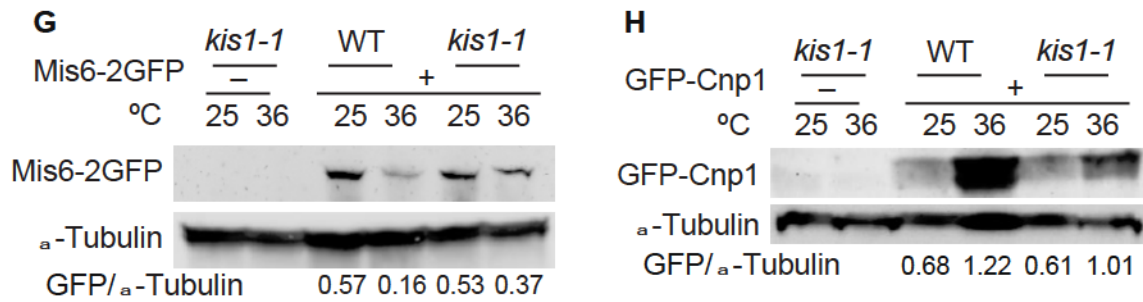


Figure 9 *kis1* 変異体では CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} が脱局在する

A. 本実験で観察を行った SPB および動原体タンパク質のおおまかな位置関係を示す。

B-D. 制限温度 36°C で 6 時間培養後の野生型および *kis1* 変異体における各タンパク質の局在。B. SPB 構成因子である Cut12、Pcp1 および Sfi1 の局在は正常であった。C. 動原体構成因子である CENP-A^{Cnp1}、CENP-I^{Mis6}、CENP-C^{Cnp3}、Mis12、KNL1^{Spc7} および Ndc80 の局在。*kis1* 変異体では CENP-A^{Cnp1} および CENP-I^{Mis6} が脱局在した。スケールバー; 5 μ m。D. 各動原体タンパク質が脱局在した細胞の割合。n>50。

E, F. 許容温度 25°C での野生型および *kis1* 変異体における各タンパク質の局在。

E. 動原体構成因子 CENP-A^{Cnp1}、CENP-I^{Mis6}、CENP-C^{Cnp3}、Mis12、KNL1^{Spc7} および Ndc80 の局在。スケールバー; 5 μ m。F. 各動原体タンパク質が脱局在した細胞の割合。n>50。

G, H. 野生型および *kis1* 変異体における Mis6-2GFP および GFP-Cnp1 タンパク質の量。目的タンパク質を発現する株 (+)と発現しない株 (-)を 25°C および 36°C で 6 時間培養後に回収し、ウェスタンブロットによりタンパク質量を検出した。GFP/ α -Tubulin 比は ImageJ によりバンド強度を測定し、算出した。

図は Hirai et al., 2014 (Figs. 6, S7 and S8)より転載し、改変した。

3.5 Kis1 は CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 をセントロメアに局在させることで紡錘体を安定化する

kis1 変異体では、CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 の局在が低下することがわかった。そこで以下では、Kis1 と CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 の遺伝学的相互作用を調べた。*mis6* 変異体 (Takahashi et al., 1994) および *cnp1* 変異体 (Takahashi et al., 2000) における Kis1-GFP の局在を観察したところ、野生型と同様の局在を示した (Fig. 10A)。これらの結果をまとめると、CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 は遺伝学的に Kis1 の下流に位置する因子であるといえる。さらにこれを確認するために、CENP-IMis6 を過剰発現するプラスミドを *kis1* 変異体に導入したところ、半制限温度において部分的に生育異常が抑圧された (Fig. 10B)。以上の結果は、Kis1 によって CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 の局在が制御されることを示唆する (Fig. 10C)。

kis1 変異体では CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 の局在異常と紡錘体形成異常の 2 つの症状を示す。そこで、これら 2 つの異常が独立して生じるのか、互いに関連して生じるのか追究するため、*mis6* 変異体における紡錘体形成の様子を観察した。その結果、約 20% の細胞で紡錘体伸長が早い段階で停止してひとつの塊のように見える表現型 (blob spindle), (Fig. 10D, F) や、約 40% の細胞で紡錘体中央部が脆弱になる表現型 (dim midzone)、さらに紡錘体伸長の際に紡錘体が折れる表現型が観察された (collapse), (Fig. 10E, F)。このように *mis6* 変異体では *kis1* 変異体と同様の表現型を示した (Fig. 10F)。同様に、*cnp1* 変異体においても dim midzone となる表現型が観察された (data not shown)。以上の結果から、Kis1 は紡錘体形成に直接寄与するのではなく、CENP-IMis6 および

CENP-A^{Cnp1} をセントロメアに局在させることで紡錘体の安定化に寄与すると考えられる。

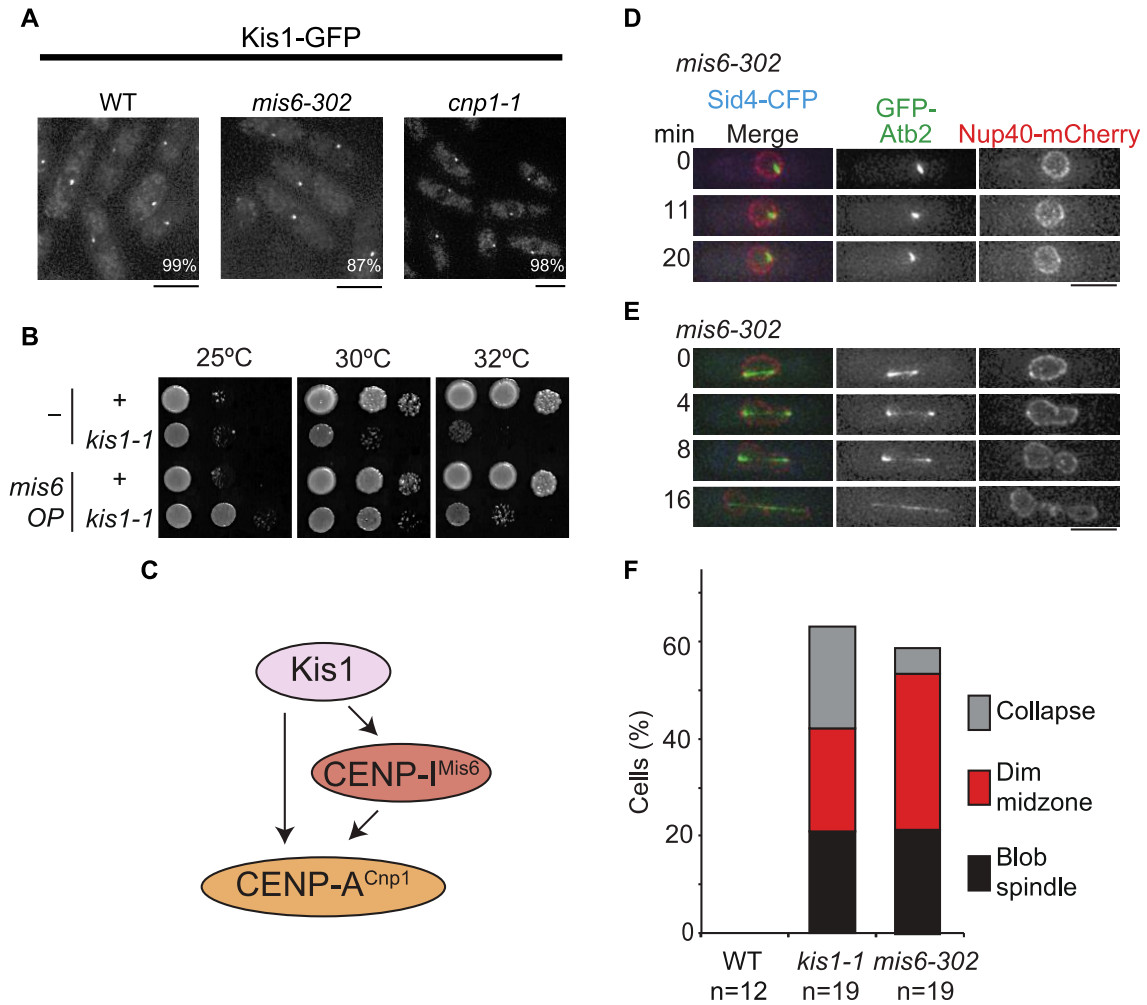


Figure 10 Kis1 は CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} をセントロメアに局在させることで紡錘体を安定化する

A. *mis6* 変異体および *cnp1* 変異体における Kis1-GFP の局在は野生型と同様であった。画像内右下の%は Kis1-GFP が局在する細胞の割合を示す。制限温度 36°C で 6 時間培養した。スケールバー; 5 μm。

B. 10 倍毎に希釈した細胞懸濁液を 25°C、30°C および 32°C の EMM-leucine 培地にスポットした。*nmt1* プロモーターを保持するプラスミドを用いて CNEP-I^{Mis6} を過剰発現させた。

C. *Kis1*、*CENP-I^{Mis6}* および *CENP-A^{Cnp1}* の関係を示す模式図。

D, E. *mis6* 変異体においても *kis1* 変異体と同様に紡錘体形成の異常が観察された。SPB を *Sid4-CFP* (青)、微小管を *GFP-Atb2* (緑)、核膜を *Nup40-mCherry* (赤) で示した。制限温度 36°C で 6 時間培養した後、観察を行った。

F. 紡錘体形成異常の割合を野生型、*kis1* 変異体および *mis6* 変異体について示した。n; 観察した分裂期細胞の数。

図は Hirai et al., 2014 (Fig. 7)より転載し、改変した。

3.6 Kis1 は Mis16-Mis18 複合体と遺伝学的相互作用を示す

Kis1 は CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} の局在を制御することがわかった。先行研究においては、CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} が局在するためには動原体構成因子である Mis16-Mis18 複合体が必要であること、および Mis16-Mis18 複合体は Kis1 と同様に間期には動原体に局在するが、分裂期には局在を消失させることが知られている (Hayashi et al., 2004)。これらの事実から、Kis1 は Mis16-Mis18 複合体と遺伝学的相互作用および物理的相互作用があるのではないかと考えられた。

それらの可能性を追究するため、Mis16 あるいは Mis18 に GFP が融合した *kis1* 変異体株の作製を試みたが、*kis1-1* 遺伝子と *mis16-GFP* 遺伝子の両方を保持する細胞、および *kis1-1* 遺伝子と *mis18-GFP* 遺伝子の両方を保持する細胞はいずれも生育不能であった (Fig. 11A)。すなわち *kis1-1* と *mis16-GFP* あるいは *mis18-GFP* は、複数の遺伝子が欠損すると致死性を示す、合成致死であった。そこで、プラスミドにより Mis18-GFP を発現させて局在を観察したところ、野生型に比べて *kis1* 変異体ではほとんどの細胞で Mis18-GFP の局在が見られなかった (Fig. 11B)。

次に、*mis16* 変異体および *mis18* 変異体における Kis1-GFP の局在を観察した。制限温度 36°C において、野生型ではほぼ全ての細胞で Kis1-GFP が局在するのに対して、変異体では全ての細胞で Kis1-GFP の局在が見られなかった (Fig. 11C)。これらの結果から、Kis1 と Mis16-Mis18 複合体は相互依存関係にあるといえる。さらに、共同実験者が行った共免疫沈降実験によって Kis1 と Mis16-Mis18 複合体が結合することも示された (Hirai et al., 2014)。また、同

時期に他の 2 つのグループによって、Mis18 複合体と結合する新規因子として Kis1 が単離され、それぞれ Mis19 あるいは Eic1 と名付けられている。彼らの解析によっても Kis1/Mis19/Eic1 が Mis16-Mis18 複合体と遺伝学的相互作用および物理的相互作用があることが報告されている (Hayashi et al., 2014; Subramanian et al., 2014)。

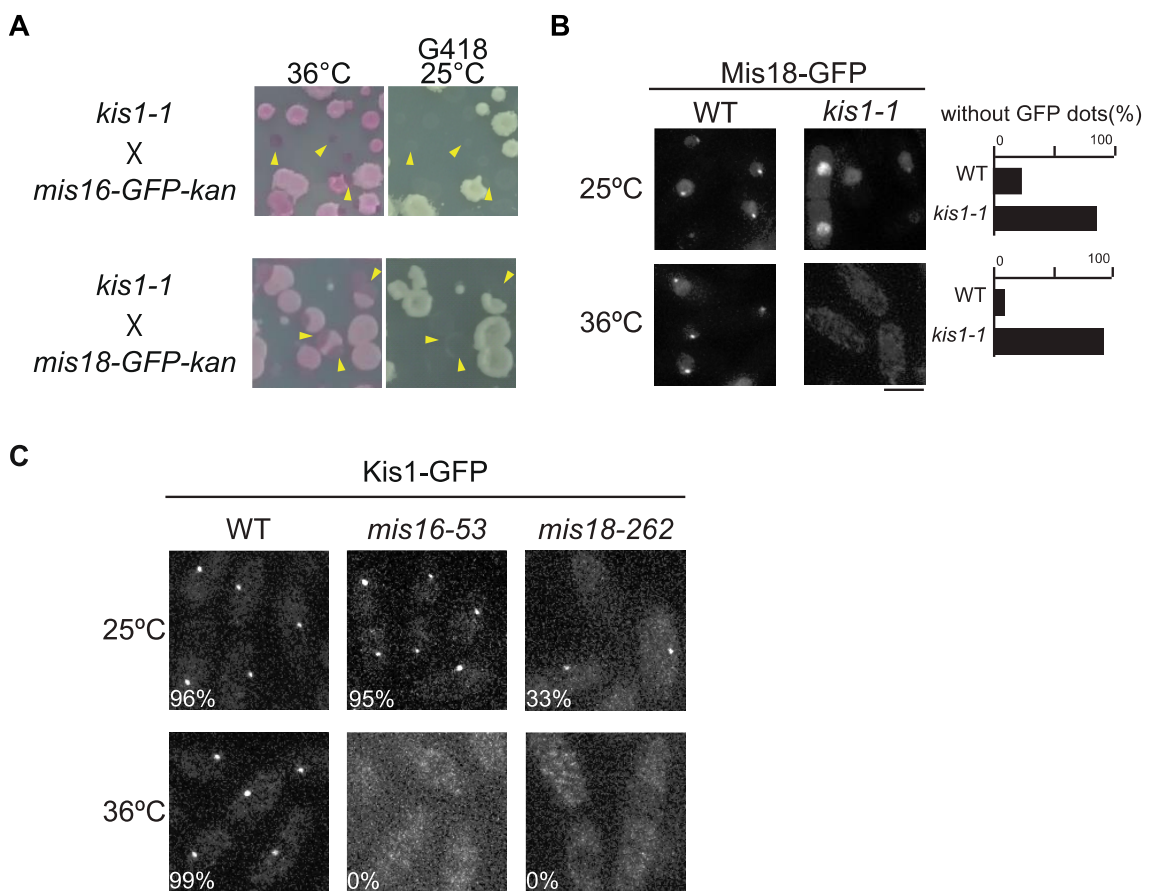


Figure 11 Kis1 は Mis16-Mis18 複合体と遺伝学的相互作用を示す

A. *kis1-1* 変異体と *mis16-GFP-kan* あるいは *mis18-GFP-kan* 遺伝子を持つ株を掛け合わせた次世代の細胞の中に、温度感受性 (*kis1-1*)を示し、かつ G418 耐性 (*mis16-GFP-kan* あるいは *mis18-GFP-kan*)を示すものはなかった。黄矢頭はそれぞれの培養条件下で生育できなかったコロニー (*kis1-1* 遺伝子を保持)を示す。

B. 野生型と比較して *kis1* 変異体では Mis18-GFP が局在する細胞の割合が減少

した。野生型および *kis1* 変異体に *mis18-GFP* 遺伝子が組み込まれたプラスミドを導入し、Mis18-GFP を発現させた。SD-leucine 培地で 25°C あるいは 36°C で 6 時間培養した。グラフは Mis18-GFP の局在が消失した細胞の割合を示す。n>100。スケールバー; 5 μ m。

C. *mis16* 変異体および *mis18* 変異体では Kis1-GFP が局在する細胞の割合が著しく減少した。画像左下の%は Kis1-GFP が局在する細胞の割合を示す。25°C あるいは 36°C で 6 時間培養した。n>100。スケールバー; 5 μ m。

図は Hirai et al., 2014 (Fig. 8)より転載し、改変した。

3.7 Kis1 は動原体と紡錘体微小管の結合を安定化する

Kis1 は内側動原体タンパク質である CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} の局在制御を介して紡錘体を安定化することが示された。そこで次に、内側動原体タンパク質がどのように紡錘体を安定化するのか追究した。一つの可能性として、動原体と紡錘体微小管の結合に異常が生じて、紡錘体が不安定になったことが考えられる。そこで、動原体と紡錘体微小管の結合の安定化に寄与する Dis1 に着目した。Dis1 は微小管結合タンパク質であり、間期においては細胞質微小管に局在する。分裂期には最初に紡錘体微小管に局在し (Nabeshima et al., 1995; Nakaseko et al., 1996; Aoki et al., 2006)、その後、紡錘体微小管と動原体が結合することで動原体にも局在する (Kakui et al., 2013)。そこで、紡錘体微小管と動原体が結合しているかを判断するために Dis1-GFP の局在を観察した。その結果、*kis1* 変異体では野生型に比べて、全ての動原体に Dis1 が局在する細胞の割合が低下した (Fig. 12A)。一方、Dis1 の足場タンパク質である Ndc80 は野生型と *kis1* 変異体で同様の局在を示した (Fig. 12B)。以上のことから、*kis1* 変異体では紡錘体微小管と動原体の結合が不安定であることが示唆された。

さらに、*kis1* 変異体における紡錘体微小管と動原体の結合の有無を調べるため、紡錘体形成チェックポイント (Spindle Assembly Checkpoint, SAC) の因子である Mad2 に着目した。Mad2 は紡錘体微小管が未結合な動原体に局在し、SAC を活性化させることで染色体の不均衡分配を防ぐ機構が存在する (Foley and Kapoor, 2013)。そこで Mad2 の局在を観察することで、動原体と紡錘体微小管が結合しているか調査した。その結果、野生型では Mad2 が動原体に局在しないのに対して、*kis1* 変異体では約 60% の細胞で動原体に Mad2 が局在し

た (**Fig. 12C**)。この結果からも、*kis1* 変異体では紡錘体微小管と動原体の結合が不安定になることが示唆された。

kis1 変異体では動原体に Mad2 が局在することから、SAC が活性化することが予想された。そこで、*kis1* 変異体における SAC の活性化が細胞の生育に必要なかを調べるため、*kis1* 単独変異体と *kis1 mad2Δ* 二重変異体の生育を比較した。その結果、半制限温度 32°C において *kis1 mad2Δ* 二重変異体は、*kis1* 単独変異体よりも細胞の生育が悪化した (**Fig. 12D**)。また、*kis1* 変異体における分裂中期 (Phase II) での停止が SAC の活性化によるものかを調べるため、*kis1 mad2Δ* 二重変異体における紡錘体の伸長の様子を観察したところ、中期 (phase II) から後期 (Phase III) へと移行できない細胞の割合が *kis1* 単独変異体よりも低下した (**Fig. 7C, 12E**)。すなわち *kis1* 変異体では、紡錘体微小管と動原体の結合が不安定になった結果、動原体に Mad2 が局在して SAC が活性化し、中期 (Phase II) で停止する細胞の割合が野生型に比べて増加したと考えられる。

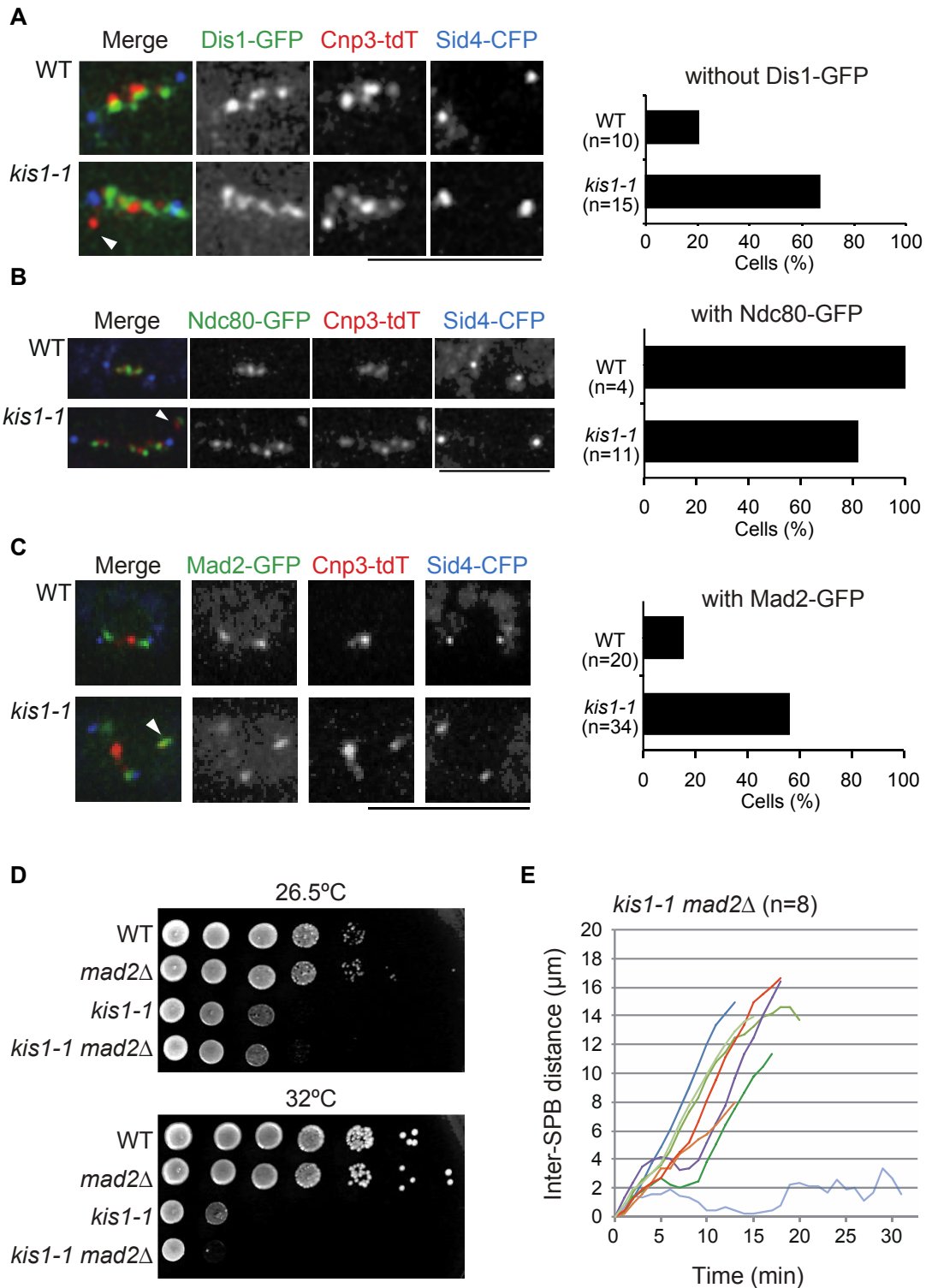


Figure 12 Kis1 は動原体と紡錘体微小管の結合を安定化する

A. *kis1* 変異体において Dis1 の動原体局在が減少した。Dis1-GFP (緑)、動原体マーカーとして Cnp3-tdTomato (赤)、SPB マーカーとして Sid4-CFP (青) で示す。

白矢頭は Dis1-GFP と共局在しない Cnp3-tdTomato シグナルを示す。右図は Dis1-GFP が局在しない動原体を有する細胞の割合。動原体の位置は Cnp3-tdTomato により判定した。n; 計測に用いた細胞数。スケールバー; 5 μ m。制限温度 36°で 6 時間培養した。

B. Ndc80 の局在は野生型と *kis1* 変異体で差異はなかった。Ndc80-GFP (緑)、動原体マーカーとして Cnp3-tdTomato (赤)、SPB マーカーとして Sid4-CFP (青) で示す。白矢頭は Ndc80-GFP と共局在する Cnp3-tdTomato を示す。右図は Ndc80-GFP と Cnp3-tdTomato が共局在する細胞の割合を示すグラフ。n; 計測に用いた細胞数。スケールバー; 5 μ m。制限温度 36°C で 6 時間培養後に観察を行った。

C. *kis1* 変異体において Mad2 の動原体局在が増加した。Mad2-GFP (緑)、動原体マーカーとして Cnp3-tdTomato (赤)、SPB マーカーとして Sid4-CFP (青) で示す。白矢頭は Mad2-GFP と共局在する Cnp3-tdTomato を示す。右図は Mad2-GFP と Cnp3-tdTomato が共局在する細胞の割合を示したグラフ。n; 計測に用いた細胞数。スケールバー; 5 μ m。制限温度 36°C で 6 時間培養した。

D. 10 倍毎に希釈した細胞懸濁液を 26.5°C および 32°C の YE5S 培地にスポットした。*kis1-1 mad2 Δ* 二重変異体では、*kis1-1* 単独変異体よりも生育が悪化した。

E. *kis1-1 mad2 Δ* 二重変異体では *kis1-1* 単独変異体に比べて後期 (Phase III)へと移行する細胞の割合が増加した。分裂前期から後期まで SPB 間距離を 1 分毎に測定した。n; 計測に用いた細胞数。制限温度 36°C で 6 時間培養した。

図は Hirai et al., 2014 (Figs. 9 and S9)から転載し、改変した。

3.8 CENP-A^{Cnp1} はコアセントロメアの構造維持に必要である

kis1 変異体では動原体形成の基点となる CENP-A^{Cnp1} が脱局在した。CENP-A^{Cnp1} がセントロメアから消失すると動原体は新規に形成されないが、*kis1* 変異体では Ndc80 など、アウターキネトコア因子の局在は正常であった。このことから、*kis1* 変異体では一度形成された動原体から CENP-A^{Cnp1} のみが消失したと考えられる。このとき、紡錘体微小管と動原体の結合が不安定であることから、CENP-A^{Cnp1} は動原体形成の基点としての機能の他に、紡錘体微小管と動原体の結合を安定化させる機能があると予想し、後者の機能の解明を目指した。

一つの可能性として、CENP-A^{Cnp1} はセントロメア領域のヌクレオソームを構成することから、*kis1* 変異体で CENP-A^{Cnp1} が消失したことにより、セントロメア DNA の立体構造が野生型とは異なる構造になったと考えられた。そこで、この仮説を調べるため、コアセントロメアを GFP、ペリセントロメアを tdTomato により蛍光標識することで細胞内におけるこれらの部位を可視化した株 (Sakuno et al., 2009) を用いて、分裂期細胞における姉妹染色分体のセントロメア間の距離、および同一染色体のセントロメア間の距離を測定した (Fig. 13A)。その際、微小管が動原体へ結合することで張力が生じると姉妹動原体が物理的に引っ張られてセントロメアの構造に影響をもたらすため、一定条件下での観察が不可能になる。これを防ぐために微小管重合阻害剤である CBZ (Carbendazim) を添加し、微小管を消失させた状態で観察を行った。その結果、野生型と比較して、*kis1* 変異体では姉妹染色分体のペリセントロメア間の距離に変化はなかったが、コアセントロメア間の距離が減少した。また、同一染色

体でのセントロメア間の距離が *kis1* 変異体で増加した (**Fig. 13B**)。

このようなセントロメア DNA の立体構造の変化は、ヌクレオソームを構成するヒストンの種類あるいはヒストンへの化学修飾が変化したためだと考えられる。そこで、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) によりコアセントロメアにおけるヒストンの状態を調べたところ、*kis1* 変異体では CENP-A^{Cnp1} 量が減少し、代わりにアセチル化された H3 量が増加した (**Fig. 13C**)。ヒストンはアセチル化されるとクロマチン構造が弛緩することが顕微鏡観察を用いた実験により示唆されている (Görisch et al., 2005; Llères et al., 2009)。これが原因で、*kis1* 変異体ではセントロメア DNA の立体構造に異常が生じたと考えられる (**Fig. 13D**)。このことから、CENP-A^{Cnp1} によってセントロメア DNA の立体構造が維持されることが紡錘体微小管と動原体の結合の確立に必要であることが示唆された。

以上の結果をまとめると、スクリーニングにより紡錘体の形成に寄与する新規因子として単離された Kis1 は、Mis16 および Mis18 と複合体を形成して CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} のセントロメアへの局在を促進する。さらに、CENP-A^{Cnp1} が動原体の機能に果たす役割として、従来から知られる他の動原体因子の足場としての役割に加えて、セントロメア DNA の立体構造を維持することで、動原体と紡錘体微小管の正確な結合に寄与するという新たな役割について知見が得られた (**Fig. 13E**)。

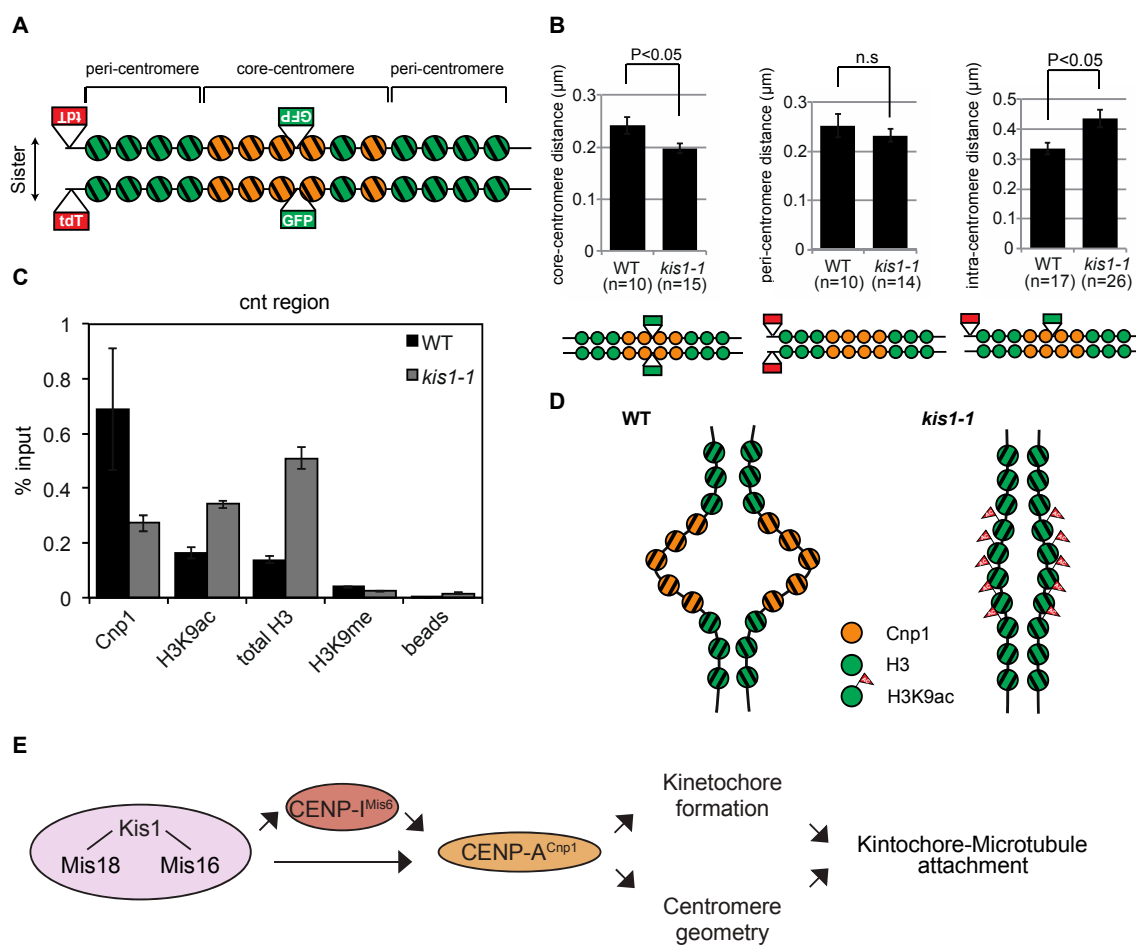


Figure 13 CENP-A^{Cnp1} はコアセントロメアの構造維持に重要である

A. コアセントロメア領域を GFP で可視化し、ペリセントロメア領域を tdTomato で可視化した模式図。

B. 姉妹染色分体のコアセントロメア間、ペリセントロメア間の距離、および同一染色体のセントロメア間の距離を測定した。36°C で 6 時間培養後に観察を行った。また、観察を行う 30 分前に微小管重合阻害剤である CBZ を加えた。30 秒間隔で 5 分間観察を行い、セントロメア間の距離を測定し、その平均をそれぞれの細胞で算出した。n.s; not significant ($P>0.05$), student の t 検定 (両側検定)。エラーバーは標準誤差 (S.E.M.)を示す。n; 測定した細胞数。

C. 野生型および *kis1* 変異体におけるクロマチン免疫沈降 (ChIP)。コアセントロメア領域 (cnt)の CENP-A^{Cnp1}、アセチル化 H3 (H3K9ac)、H3、メチル化 H3 (H3K9me)量を測定した。抗体を加えなかったサンプルをネガティブコントロールとして beads と示した。36°C で 6 時間培養後に細胞を回収した。エラーバー

は標準偏差 (S.D.)を示す (n=3 回の PCR 増幅結果)。

D. 野生型と *kis1* 変異体におけるセントロメア DNA の立体構造の予想図。 *kis1* 変異体ではコアセントロメアにアセチル化 H3 が蓄積し、コアセントロメア間の距離が野生型に比べて減少する。

E. Kis1 複合体が動原体と紡錘体微小管の正確な結合を促進するまでの模式図。

4 章 総合討論

4.1 Kis1 は CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 のセントロメア局在を促進することで紡錘体を安定化させる

kis1 変異体では、紡錘体の中央部が脆弱になる表現型および CENP-IMis6 と CENP-ACnp1 の局在異常を示す表現型がみられた (Figs. 7 and 9)。また、*mis6* および *cnp1* 変異体では Kis1 は正常に局在するにも関わらず、紡錘体形成の異常がみられた (Fig. 10)。これらのことから、*kis1* 変異体でみられた紡錘体の異常は CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 の局在異常を介して引き起こされたと考えられる。

kis1 変異体では、紡錘体微小管との結合に重要なアウターキネトコア因子の局在は正常であったが、紡錘体微小管と動原体の結合を安定化する Dis1 の動原体への局在が減少し、さらに紡錘体微小管と未結合な動原体に集積する Mad2 の局在が増加した (Figs. 9 and 12)。このことから、CENP-IMis6 および CENP-ACnp1 の局在が消失することによって動原体と微小管の結合が不安定になることが示唆された。

Kis1 と複合体を形成する Mis16 および Mis18 の変異体では、セントロメアから CENP-ACnp1 が脱局在し、代わりにアセチル化された H3 が蓄積することが報告されていた (Hayashi et al., 2004; Hirai et al., 2014; Hayashi et al., 2014; Subramanian et al., 2014)。実際に *kis1* 変異体でも同様の結果が得られ、さらにセントロメアを可視化したところ、姉妹染色分体のコアセントロメア間の距離が野生型に比べて減少し、同一染色体でのセントロメア間の距離が増加した (Fig. 13)。このことから、CENP-ACnp1 がセントロメアに局在して正確な

セントロメア DNA の立体構造を形成することが紡錘体微小管と動原体の結合の安定化に重要であることが示唆された。では、セントロメア DNA の立体構造は紡錘体微小管と動原体の結合にどのように寄与するのだろうか。

紡錘体微小管と動原体の結合が不正確である場合、インナーセントロメアに局在する AuroraB が、動原体を構成する Ndc80、KNL1、Dam1 などの因子をリン酸化することで紡錘体微小管と動原体の結合を解消する (Kelly and Funabiki, 2009)。結合が正確である場合は、紡錘体微小管により動原体が引っ張られることで Ndc80 などの因子は AuroraB からのリン酸化を逃れることができ、紡錘体微小管と動原体の結合が安定化する (Kelly and Funabiki, 2009)。このことから、*kis1* 変異体ではコアセントロメア間の距離が野生型に比べ減少しているため、正確に紡錘体微小管と動原体が結合した場合でも AuroraB によって Ndc80 などの因子はリン酸化され、結合が解消されるのかもしれない。

ヒトにおいては、オーキシソグロン法を用いて CENP-A を急速に分解させてセントロメアから CENP-A を消失させた場合、その直後の染色体分配には異常がみられない (Hoffmann et al., 2016)。このことから CENP-A は、動原体因子の足場となることは細胞の生育に必須であるものの、セントロメア DNA の立体構造の維持には寄与しないことが示唆されている (Hoffmann et al., 2016)。一方で、ニワトリの DT40 細胞では、CENP-A に依存せずとも異所的な領域に動原体を形成させることができるが、このような人為的に形成させた動原体を用いた染色体分配には異常がみられることから、CENP-A によるセントロメア DNA の立体構造の形成が染色体分配に重要であることが示唆されている (Gascoigne et al., 2011)。

分裂酵母および高等生物におけるセントロメアは、複数の反復配列から形成されるリージョナルセントロメアという点で進化的に類似しているが、セントロメアに含まれる CENP-A 量などの違いによって、セントロメア構造を形成する際の CENP-A への依存度が生物種で異なるのかもしれない。分裂酵母のコアセントロメアは約 80 ヌクレオソームから形成されるが、そのうち約 10%が CENP-A^{Cnp1} ヌクレオソームである (Lando et al., 2012)。また、ニワトリのコアセントロメアは約 200 ヌクレオソームから形成され、そのうち約 15%が CENP-A ヌクレオソームである (Fukagawa and Earnshaw, 2014)。これに対して、ヒトのコアセントロメアは約 5000 ヌクレオソームのうち約 4%のみが CENP-A ヌクレオソームである (Bodor et al., 2014)。このことからヒトではセントロメア領域に含まれる CENP-A 量の比率が小さく、セントロメア DNA の立体構造の形成に対する CENP-A の寄与は少ないと予想される。それに対して、分裂酵母およびニワトリではセントロメアに含まれる CENP-A 量の比率が大きく、CENP-A はセントロメア DNA の立体構造の維持に大きく寄与すると考えられる。

4.2 Kis1 は *Schizosaccharomyces* 属でのみ保存性が高い

分裂酵母 *S. pombe* の Kis1 と配列類似性が高いタンパク質は、同属である *S. japonicus*、*S. cryophilus*、*S. octosporus* 内に見つかり、また、出芽酵母内でも部分的に配列相同性が高いタンパク質が見つかった。一方で、線虫、ショウジョウバエおよびヒトでは Kis1 と相同性のあるアミノ酸配列は見つからなかった (Fig. 6C)。分裂酵母 *pombe* では Kis1 は Mis16 および Mis18 と複合体を形

成し (Hirai et al., 2014; Hayashi et al., 2014; Subramanian et al., 2014)、
CENP-A^{Cnp1} のシャペロンである HJURP の足場となる (Foltz et al., 2009;
Dunleavy et al., 2009), (Fig. 14A)。一方で出芽酵母では HJURP のオーソログ
は存在するが、Mis16 および Mis18 のオーソログは発見されていない。また、
出芽酵母では分裂酵母やヒトには存在しない CBF3 複合体が CENP-A^{Cse4} の呼
び込みに寄与している (Camahort et al., 2007), (Fig. 14B)。このような
CENP-A を供給する因子の違いは、セントロメアに呼び込まれる CENP-A 量や
範囲を制御するのかもしれない。分裂酵母ではコアセントロメア領域のサイズ
が 10~15kbp であることから広範囲に渡って CENP-A^{Cnp1} が供給される必要が
ある。それに対して出芽酵母ではセントロメアサイズが 125bp であり、
CENP-A^{Cse4} は一箇所のみ供給される。このようなセントロメア構造は出芽酵
母以外には存在しないことから、出芽酵母内で CENP-A^{Cse4} を供給する因子が独
立に進化したのではないかと考えられる。

ショウジョウバエでは、Mis16 のオーソログである RbAp48 は存在するが、
HJURP および Mis18 のオーソログは発見されていない。しかしながら、類似
した機能をもつ CAL1 が存在する (Furuyama et al., 2006)。CAL1 は分裂前~
中期に局在し、CENP-A^{CID} を分裂期にリクルートする。CAL1 は CENP-A^{CID}
と CENP-C の両方に結合することから、HJURP と Mis18 の両方の機能を担っ
ていると考えられる (Mellone et al., 2011), (Fig14. C)。多くの真核生物では
CENP-A は間期に呼び込まれることから、ショウジョウバエでは分裂期に
CENP-A^{CID} を呼び込むシステムを確立するために、CAL1 が独立に進化したの
かもしれない。

ヒトにおいては Mis16、Mis18 および HJURP のオーソログが存在するが、Kis1 のオーソログは発見されなかった (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009; Hayashi et al., 2004), (Fig. 14D)。ヒトにおいて Mis18 は Mis18BP1、Mis18 α および Mis18 β の 3 因子から形成される (Fujita et al., 2007)。この Mis18 複合体は RbAp46/48 (Mis16 オーソログ) と結合するが、その結合は不安定であるという知見がある (Fujita et al., 2007)。このことから、Kis1 は Mis16 と Mis18 の結合の安定性に寄与することが推測される。分裂酵母では G1 期から G2 期にかけて CENP-A^{Cnp1} が供給され続けることから (Dunleavy et al., 2007; Lando et al, 2012)、Mis16-Mis18 は Kis1 を介して安定的に結合する必要があるのに対して、ヒトでは G1 前期にのみ CENP-A が供給されることから (Jansen et al., 2007)、Kis1 を介さずに Mis16-Mis18 が不安定に結合することが重要なかもしれない。

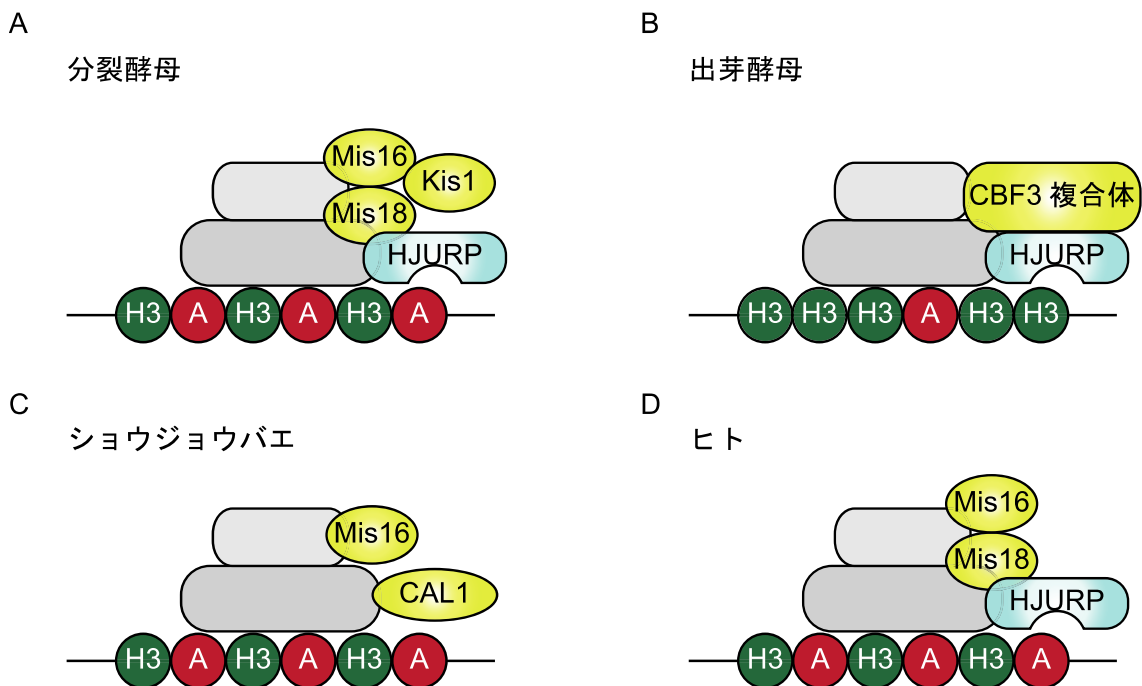


Figure 14 Kis1 は *Schizosaccharomyces* 属でのみ保存性が高い

- A. 分裂酵母 *pombe* では Kis1 は Mis16 および Mis18 と複合体を形成して HJURP の足場となる。
- B. 出芽酵母では HJURP のオーソログは存在するが、Mis18 複合体のオーソログは存在せず、CBF3 複合体によって CENP-A^{Cse4} が呼び込まれる。
- C. ショウジョウバエでは Mis16 のオーソログは存在するが、Mis18 および HJURP のオーソログは存在しない。代わりに CAL1 がそれらの機能を担い、CENP-A^{CID} をセントロメアに供給する。
- D. ヒトでは Mis16、Mis18 および HJURP のオーソログは存在するが、Kis1 のオーソログは存在しなかった。ヒトにおいては、Kis1 が局在しないことで Mis16-Mis18 結合が不安定になることが推測される。

4.3 Kis1 は Mis16 および Mis18 と複合体を形成することでセントロメアに局在する

Kis1 は同時期に異なる 2 つのグループによって Mis19 および Eic1 として同定され、Mis16 および Mis18 と複合体を形成することが報告されている (Hirai et al., 2014; Hayashi et al., 2014; Subramanian et al., 2014)。*kis1/mis19/eic1* 変異体では Mis16 および Mis18 はセントロメアから脱局在することから、3 者が複合体を形成することがセントロメアに局在するための必須な条件なのかもしれない。近年の研究により Kis1/Mis19/Eic1 の C 端領域に存在するアルギニン (R100, R105, R108) が Mis16 との結合に必要であることが報告されている (An et al., 2018)。筆者が所属する研究室で得られた *kis1* 変異体では、65 番目のアルギニンがシステインに置換されていたことから、Kis1-1 タンパク質は高温では Mis16 との結合能が低下するのかもしれない。

4.4 *kis1* 変異体では部分的に SAC が活性化する

SAC の構成因子である Mad2 は紡錘体微小管と未結合な動原体に局在してチェックポイントを活性化させる。*kis1* 変異体では Mad2 が動原体に局在し、SAC が活性化した (Fig. 12C-E)。先行研究において、*mis6* 変異体では Mad2 が動原体に局在できなくなることが報告されている (Saitoh et al., 2005)。さらに、高等生物においても Mis6 ホモログである CENP-I をノックダウンすると Mad2 が動原体に局在できなくなる (Liu et al., 2003)。このことから、Mad2 は CENP-I^{Mis6} を足場として動原体に局在すると考えられる。しかしながら、*kis1* 変異体では CENP-I^{Mis6} がセントロメアから消失するにも関わらず、Mad2 が動

原体に局在した。そこで追試のため、*mis6* 変異体で Mad2 の局在を観察したところ、一部の動原体に Mad2 が局在した (data not shown)。このことから CENP-I^{Mis6} 以外にも Mad2 の足場となる因子が存在すると考えられる。しかしながら、*kis1* 変異体では Mad2 が局在するにも関わらず、約 7 割の細胞が分裂後期へと進行したことから、SAC が完全に活性化するためには Mad2 が Mis6 を足場として局在することが必要であると推測される。

4.5 CENP-I^{Mis6} の局在は CENP-A^{Cnp1} および CENP-T^{Cnp20} に依存する

kis1 変異体において CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} の局在が消失した (Fig. 11)。このとき CENP-I^{Mis6} の局在は Kis1 に直接的に制御されるのか、それとも別の因子によって制御されるのだろうか。これを調べるため、始めに *cnp1* 変異体における CENP-I^{Mis6} 局在を 36°C で 6 時間培養後に観察したところ、約 50% の細胞で CENP-I^{Mis6} 局在が消失した (data not shown)。このことから、CENP-I^{Mis6} は CENP-A^{Cnp1} を足場として局在すると考えられるが、その他の因子も足場となることが示唆された。

高等生物では CENP-I の局在が CENP-N/L あるいは CENP-T のノックダウンにより低下することが報告されている (Izuta et al., 2006)。このことから、これらの因子が CENP-I^{Mis6} の足場となる可能性が考えられた。この可能性を検証するため、CENP-T のホモログである *cnp20* に変異を導入して温度感受性変異体を作製し、CENP-I^{Mis6} の局在を 36°C で 6 時間培養後に観察したところ、約 40% の細胞で CENP-I^{Mis6} 局在が消失した (data not shown)。このことから、CENP-T^{Cnp20} も CENP-I^{Mis6} の足場となる可能性が示唆された。そこで次に、

CENP-A^{Cnp1} および CENP-T^{Cnp20} の両方の足場が消失することで CENP-I^{Mis6} の局在が失われるかを調べる目的で、*cnp1-1* 変異体内の *cnp20* に対して変異を導入して二重変異体を作製した。この変異体において CENP-I^{Mis6} 局在を 36°C で 4 時間培養後に観察した結果、約 90% の細胞で CENP-I^{Mis6} 局在が消失したことから、CENP-I^{Mis6} は CENP-A^{Cnp1} および CENP-T^{Cnp20} の両方に依存して局在することが示唆された (data not shown)。

4.6 本研究のまとめ

先行研究において、紡錘体形成に寄与する新規因子を探索する目的で行われたスクリーニングにより新規因子 **Kis1** が単離されていた。本研究は **Kis1** の機能解析を行い、以下のことを明らかにした。

単離された *kis1* 変異体における紡錘体形成の表現型を調べたところ、*kis1* 変異体では紡錘体伸長に異常がみられると同時に、紡錘体の中央部が脆弱になることが判明した。このことから、**Kis1** は紡錘体を一定の太さに維持しながら、伸長させるのに必要な因子であることがわかった。そのため、**Kis1** は分裂期に紡錘体上に局在し、紡錘体の形成を制御することが予想されたが、意外なことに **Kis1** は分裂期には局在せず、間期に動原体と SPB が隣接する位置に局在した。このことから、**Kis1** が間期に動原体あるいは SPB を構成する因子の局在化を促進すると予想し、*kis1* 変異体において動原体および SPB を構成する主要なタンパク質の局在を観察した。その結果、*kis1* 変異体では動原体因子である CENP-A^{Cnp1} および CENP-I^{Mis6} の局在が消失した。さらに、紡錘体形成の異常が *mis6* 変異体においても *kis1* 変異体と同様に観察されたことから、**Kis1** は

CENP-I^{Mis6} および CENP-A^{Cnp1} のセントロメア局在を制御することで、紡錘体の正確な形成に寄与することが判明した。

また、*kis1* 変異体では紡錘体微小管との結合に重要なアウターキネトコア因子が正常に局在するにも関わらず、染色体が不均等に分配される頻度が増加した。このことから、*kis1* 変異体で局在を消失させた CENP-A^{Cnp1} には、動原体形成の足場としての機能に加えて、さらに別の機能を発揮することで染色体分配の正確性に寄与することが予想された。そこで、CENP-A^{Cnp1} がセントロメアのヌクレオソームを構成する因子であることから、CENP-A^{Cnp1} の消失によってセントロメア DNA の立体構造が変化すると想定し、セントロメア領域を GFP あるいは RFP で可視化して構造の変化を測定した。その結果、野生型に比べて *kis1* 変異体ではセントロメア DNA の立体構造に歪みが生じることが判明した。このことから、CENP-A^{Cnp1} によるセントロメア DNA の立体構造の維持が染色体分配の正確性に寄与するという新たな知見を得ることができた。

さらに、*kis1* 変異体では CENP-A^{Cnp1} 局在が消失することから、CENP-A^{cnp1} をセントロメアに供給する因子であることが予想された。そこで、CENP-A^{cnp1} を呼び込むことが報告されている既存の因子との関連性を調べた結果、Mis16-Mis18 と複合体を形成することが判明した。Kis1 は近縁種以外の生物種では保存されていなかったことから、Kis1 を介した Mis18 複合体の形成は生物学的になんらかの意義をもつと想定される。例えば、ヒトと分裂酵母では CENP-A が呼び込まれる時期が異なるが、分裂酵母では特定の時期に CENP-A を呼び込むために Kis1 が存在するのかもしれない。このように、呼び込み時期が生物種間で異なる意義についても明らかにすることが今後の課題である。

5 章 引用文献

Al-Bassam, J., Kim, H., Flor-Parra, I., Lal, N., Velji, H., and Chang, F. (2012). Fission yeast Alp14 is a dose-dependent plus end-tracking microtubule polymerase. *Mol. Biol. Cell* *23*, 2878–2890.

An, S., Koldewey, P., Chik, J., Subramanian, L., and Cho, U.-S. (2018). Mis16 Switches Function from a Histone H4 Chaperone to a CENP-ACnp1-Specific Assembly Factor through Eic1 Interaction. *Structure* *26*, 960–971.e964.

Aoi, Y., Kawashima, S.A., Simanis, V., Yamamoto, M., and Sato, M. (2014). Optimization of the analogue-sensitive Cdc2/Cdk1 mutant by in vivo selection eliminates physiological limitations to its use in cell cycle analysis. *Open Biol.* *4*, 140063–140063.

Aoki, K., Nakaseko, Y., Kinoshita, K., Goshima, G., and Yanagida, M. (2006). CDC2 phosphorylation of the fission yeast *dis1* ensures accurate chromosome segregation. *Curr. Biol.* *16*, 1627–1635.

Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 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.

Barnhart, M.C., Kuich, P.H.J.L., Stellfox, M.E., Ward, J.A., Bassett, E.A., Black, B.E., and Foltz, D.R. (2011). HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. *J. Cell Biol.* *194*, 229–243.

Bodor, D.L., Mata, J.F., Sergeev, M., David, A.F., Salimian, K.J., Panchenko, T., Cleveland, D.W., Black, B.E., Shah, J.V., and Jansen, L.E. (2014). The quantitative architecture of centromeric chromatin. *Elife* *3*, e02137.

Bridge, A.J., Morpew, M., Bartlett, R., and Hagan, I.M. (1998). The fission yeast SPB component Cut12 links bipolar spindle formation to mitotic control. *Genes Dev.* *12*, 927–942.

Brouhard, G.J., Stear, J.H., Noetzel, T.L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S.C., Howard, J., and Hyman, A.A. (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* *132*, 79–88.

Camahort, R., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and Gerton, J.L. (2007). Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore. *Mol. Cell* *26*, 853–865.

Chen, C.-C., Dechassa, M.L., Bettini, E., Ledoux, M.B., Belisario, C., Heun, P., Luger, K., and Mellone, B.G. (2014). CAL1 is the *Drosophila* CENP-A assembly factor. *J. Cell Biol.* *204*, 313–329.

Churikov, D., Siino, J., Svetlova, M., Zhang, K., Gineitis, A., Morton Bradbury, E., and Zalensky, A. (2004). Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* *84*, 745–756.

Dischinger, S., Krapp, A., Xie, L., Paulson, J.R., and Simanis, V. (2008). Chemical genetic analysis of the regulatory role of Cdc2p in the *S. pombe* septation initiation network. *J. Cell Sci.* *121*, 843–853.

Dobles, M., Liberal, V., Scott, M.L., Benezra, R., and Sorger, P.K. (2000). Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* *101*, 635–645.

Dunleavy, E.M., Almouzni, G., and Karpen, G.H. (2011). H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G₁ phase. *Nucleus* *2*, 146–157.

Dunleavy, E.M., Pidoux, A.L., Monet, M., Bonilla, C., Richardson, W., Hamilton, G.L., Ekwall, K., McLaughlin, P.J., and Allshire, R.C. (2007). A

NASP (N1/N2)-related protein, Sim3, binds CENP-A and is required for its deposition at fission yeast centromeres. *Mol. Cell* *28*, 1029–1044.

Dunleavy, E.M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y., and Almouzni-Pettinotti, G. (2009). HJURP Is a Cell-Cycle-Dependent Maintenance and Deposition Factor of CENP-A at Centromeres. *Cell* *137*, 485–497.

Flor-Parra, I., Iglesias-Romero, A.B., and Chang, F. (2018). The XMAP215 Ortholog Alp14 Promotes Microtubule Nucleation in Fission Yeast. *Curr. Biol.* *28*, 1681–1691.e1684.

Flory, M.R., Morphew, M., Joseph, J.D., Means, A.R., and Davis, T.N. (2002). Pcp1p, an Spc110p-related calmodulin target at the centrosome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Growth Differ.* *13*, 47–58.

Foley, E.A., and Kapoor, T.M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 25–37.

Foltz, D.R., Jansen, L.E.T., Bailey, A.O., Yates, J.R., Bassett, E.A., Wood, S., Black, B.E., and Cleveland, D.W. (2009). Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* *137*, 472–484.

Fong, C.S., Sato, M., and Toda, T. (2009). Fission yeast Pcp1 links polo kinase-mediated mitotic entry to γ -tubulin-dependent spindle formation. *Embo J.* *29*, 120–130.

Fujita, Y., Hayashi, T., Kiyomitsu, T., Toyoda, Y., Kokubu, A., Obuse, C., and Yanagida, M. (2007). Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1. *Dev. Cell* *12*, 17–30.

Fukagawa, T., and Earnshaw, W.C. (2014). The centromere: chromatin foundation for the kinetochore machinery. *Dev. Cell* *30*, 496–508.

Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S., and Yanagida, M. (1993). *Cell*

- cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J. Cell Biol.* *121*, 961–976.
- Furuyama, T., Dalal, Y., and Henikoff, S. (2006). Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro. *Pnas* *103*, 6172–6177.
- Gard, D.L., and Kirschner, M.W. (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J. Cell Biol.* *105*, 2203–2215.
- Gascoigne, K.E., Takeuchi, K., Suzuki, A., Hori, T., Fukagawa, T., and Cheeseman, I.M. (2011). Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes. *Cell* *145*, 410–422.
- Görisch, S.M., Wachsmuth, M., Tóth, K.F., Lichter, P., and Rippe, K. (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J. Cell Sci.* *118*, 5825–5834.
- Goshima, G., Saitoh, S., and Yanagida, M. (1999). Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation. *Genes Dev.* *13*, 1664–1677.
- Goshima, G., Wollman, R., Goodwin, S.S., Zhang, N., Scholey, J.M., Vale, R.D., and Stuurman, N. (2007). Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science* *316*, 417–421.
- Hayashi, T., Ebe, M., Nagao, K., Kokubu, A., Sajiki, K., and Yanagida, M. (2014). *Schizosaccharomyces pombe* centromere protein Mis19 links Mis16 and Mis18 to recruit CENP-A through interacting with NMD factors and the SWI/SNF complex. *Genes Cells* *19*, 541–554.
- Hayashi, T., Fujita, Y., Iwasaki, O., Adachi, Y., Takahashi, K., and Yanagida, M. (2004). Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell* *118*, 715–729.
- Henikoff, S., and Smith, M.M. (2015). Histone variants and epigenetics. *Cold*

Spring Harb. Perspect. Biol. 7, a019364.

Hirai, H., Arai, K., Kariyazono, R., Yamamoto, M., and Sato, M. (2014). The kinetochore protein Kis1/Eic1/Mis19 ensures the integrity of mitotic spindles through maintenance of kinetochore factors Mis6/CENP-I and CENP-A. *PLoS ONE* 9, e111905.

Hoffmann, S., Dumont, M., Barra, V., Ly, P., Nechemia-Arbely, Y., McMahon, M.A., Hervé, S., Cleveland, D.W., and Fachinetti, D. (2016). CENP-A Is Dispensable for Mitotic Centromere Function after Initial Centromere/Kinetochore Assembly. *Cell Rep.* 17, 2394–2404.

Holland, A.J., and Cleveland, D.W. (2009). Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 478–487.

Hsu, K.-S., and Toda, T. (2011). Ndc80 internal loop interacts with Dis1/TOG to ensure proper kinetochore-spindle attachment in fission yeast. *Curr. Biol.* 21, 214–220.

Izuta, H., Ikeno, M., Suzuki, N., Tomonaga, T., Nozaki, N., Obuse, C., Kisu, Y., Goshima, N., Nomura, F., Nomura, N., et al. (2006). Comprehensive analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells. *Genes Cells* 11, 673–684.

Jansen, L.E.T., Black, B.E., Foltz, D.R., and Cleveland, D.W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell Biol.* 176, 795–805.

Jokelainen, P.T. (1967). The ultrastructure and spatial organization of the metaphase kinetochore in mitotic rat cells. *Journal of Ultrastructure Research* 19, 19–44.

Kakui, Y., Sato, M., Okada, N., Toda, T., and Yamamoto, M. (2013). Microtubules and Alp7-Alp14 (TACC-TOG) reposition chromosomes before meiotic segregation. *Nat. Cell Biol.* 15, 786–796.

Kelly, A.E., and Funabiki, H. (2009). Correcting aberrant kinetochore microtubule attachments: an Aurora B-centric view. *Current Opinion in Cell Biology* *21*, 51–58.

Kerres, A., Vietmeier-Decker, C., Ortiz, J., Karig, I., Beuter, C., Hegemann, J., Lechner, J., and Fleig, U. (2004). The fission yeast kinetochore component Spc7 associates with the EB1 family member Mal3 and is required for kinetochore-spindle association. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5255–5267.

Kilmartin, J.V. (2003). Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* *162*, 1211–1221.

Kitagawa, T., Ishii, K., Takeda, K., and Matsumoto, T. (2014). The 19S proteasome subunit Rpt3 regulates distribution of CENP-A by associating with centromeric chromatin. *Nat. Commun.* *5*, 3597.

Lando, D., Endesfelder, U., Berger, H., Subramanian, L., Dunne, P.D., McColl, J., Klenerman, D., Carr, A.M., Sauer, M., Allshire, R.C., et al. (2012). Quantitative single-molecule microscopy reveals that CENP-A(Cnp1) deposition occurs during G2 in fission yeast. *Open Biol.* *2*, 120078.

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.

Llères, D., James, J., Swift, S., Norman, D.G., and Lamond, A.I. (2009). Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. *J. Cell Biol.* *187*, 481–496.

McKinley, K.L., and Cheeseman, I.M. (2014). Polo-like Kinase 1 Licenses CENP-A Deposition at Centromeres. *Cell* *158*, 397–411.

McKinley, K.L., and Cheeseman, I.M. (2016). The molecular basis for centromere identity and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 16–29.

- Mellone, B.G., Grive, K.J., Shteyn, V., Bowers, S.R., Oderberg, I., and Karpen, G.H. (2011). Assembly of *Drosophila* centromeric chromatin proteins during mitosis. *PLoS Genet.* *7*, e1002068.
- Moree, B., Meyer, C.B., Fuller, C.J., and Straight, A.F. (2011). CENP-C recruits M18BP1 to centromeres to promote CENP-A chromatin assembly. *J. Cell Biol.* *194*, 855–871.
- Nabeshima, K., Kurooka, H., Takeuchi, M., Kinoshita, K., Nakaseko, Y., and Yanagida, M. (1995). p93dis1, which is required for sister chromatid separation, is a novel microtubule and spindle pole body-associating protein phosphorylated at the Cdc2 target sites. *Genes Dev.* *9*, 1572–1585.
- Nabeshima, K., Nakagawa, T., Straight, A.F., Murray, A., Chikashige, Y., Yamashita, Y.M., Hiraoka, Y., and Yanagida, M. (1998). Dynamics of centromeres during metaphase-anaphase transition in fission yeast: Dis1 is implicated in force balance in metaphase bipolar spindle. *Mol. Biol. Cell* *9*, 3211–3225.
- Nakaseko, Y., Nabeshima, K., Kinoshita, K., and Yanagida, M. (1996). Dissection of fission yeast microtubule associating protein p93Dis1: regions implicated in regulated localization and microtubule interaction. *Genes Cells* *1*, 633–644.
- Neumann, B., Walter, T., Hériché, J.-K., Bulkescher, J., Erfle, H., Conrad, C., Rogers, P., Poser, I., Held, M., Liebel, U., et al. (2010). Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature* *464*, 721–727.
- Perpelescu, M., and Fukagawa, T. (2011). The ABCs of CENPs. *Chromosoma* *120*, 425–446.
- Pidoux, A.L., Choi, E.S., Abbott, J.K.R., Liu, X., Kagansky, A., Castillo, A.G., Hamilton, G.L., Richardson, W., Rappsilber, J., He, X., et al. (2009). Fission yeast Scm3: A CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore

chromatin. *Mol. Cell* *33*, 299–311.

Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* *45*, 145–153.

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.

Saitoh, S., Ishii, K., Kobayashi, Y., and Takahashi, K. (2005). Spindle checkpoint signaling requires the mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with mad2 and mitotic spindles. *Mol. Biol. Cell* *16*, 3666–3677.

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

Sato, M., Toya, M., and Toda, T. (2009). Visualization of fluorescence-tagged proteins in fission yeast: the analysis of mitotic spindle dynamics using GFP-tubulin under the native promoter. *Methods Mol. Biol.* *545*, 185–203.

Sekulic, N., Bassett, E.A., Rogers, D.J., and Black, B.E. (2010). The structure of (CENP-A-H4)₂ reveals physical features that mark centromeres. *Nature* *467*, 347–351.

Sönnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.-M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., et al. (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *434*, 462–469.

Subramanian, L., Toda, N.R.T., Rappsilber, J., and Allshire, R.C. (2014). Eic1 links Mis18 with the CCAN/Mis6/Ctf19 complex to promote CENP-A assembly. *Open Biol.* *4*, 140043.

Takahashi, K., Chen, E.S., and Yanagida, M. (2000). Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science* *288*, 2215–2219.

- Takahashi, K., Yamada, H., and Yanagida, M. (1994). Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality. *Mol. Biol. Cell* *5*, 1145–1158.
- 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.
- Thawani, A., Kadzik, R.S., and Petry, S. (2018). XMAP215 is a microtubule nucleation factor that functions synergistically with the γ -tubulin ring complex. *Nat. Cell Biol.* *20*, 575–585.
- Wiese, C., and Zheng, Y. (2006). Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J. Cell Sci.* *119*, 4143–4153.
- Wigge, P.A., and Kilmartin, J.V. (2001). The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *J. Cell Biol.* *152*, 349–360.
- Williams, J.S., Hayashi, T., Yanagida, M., and Russell, P. (2009). Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin. *Mol. Cell* *33*, 287–298.
- Wittmann, T., Hyman, A., and Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* *3*, E28–E34.
- Yamamoto, A., and Hiraoka, Y. (2003). Monopolar spindle attachment of sister chromatids is ensured by two distinct mechanisms at the first meiotic division in fission yeast. *Embo J.* *22*, 2284–2296.
- Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Watanabe, Y. (2003). Cohesins determine the attachment manner of kinetochores to spindle microtubules at meiosis I in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology* *23*, 3965–3973.

謝辞

本研究は、新井邦生博士がスクリーニング系の開発と変異体の単離を行い、仮屋園遼氏が *kis1* の同定を行ったことで遂行することが出来ました。この場を借りて感謝致します。

本研究を行うにあたり一部の株を Paul Nurse 博士、柳田充弘博士、登田隆博士、平岡泰博士、渡邊嘉典博士、山本歩博士、作野剛士博士、Miguel Angel Garcia 博士、National BioResource に提供して頂きました。また、抗 *cnp1* 抗体を齋藤成昭博士に提供して頂きました。深く感謝致します。

本研究は日本学術振興会より研究遂行奨励費による支援を頂きました。心より感謝致します。

早稲田大学 先進理工学学部 生命医科学科 佐藤政充研究室のメンバーの皆様には、研究に対する多くの助言を頂き、議論をさせて頂きました。深く御礼申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり、佐藤政充教授には実験の指導をして頂き、研究を遂行する上で多くの貴重な助言を頂きました。また、研究生活の 6 年間の中で、研究者として科学に対する考え方や姿勢を学ばせて頂きました。この場を借りて深く感謝致します。

そして、研究生活を常に支えて下さった父と母に感謝致します。

