

学位申請論文

染色体分配あるいは核分裂の  
均等性を保障する機構に関する研究

齋藤成昭

## 要旨

真核生物の染色体DNAはS期に複製され、M期（有糸分裂期）に娘細胞へと分配される。遺伝情報が損なわれることなく子孫に伝達されるためには、複製された染色体が有糸分裂過程で均等に分配されなければならない。本研究では、核分裂・染色体分配の均等性を保障する機構を解明することを目的とし、分裂酵母*mis6*、*mis12*および*lsd1*変異体の解析を進めた。

*mis6*、*mis12*変異体は、分裂酵母動原体配列を含む人工ミニ染色体を安定に保持できず、かつ温度感受性を示す変異体として単離された。制限温度で培養すると、両変異体では染色体が不均等に分配され、姉妹核の大きさに差異が生じた。この「不均等染色体分配」表現型を*mis6*変異体が示すには、制限温度でG1/S期を通過することが必要があった。Mis6タンパク質はG1/S期に機能するのかもしれない。GFP融合タンパクを作製して局在を決定したところ、Mis6は動原体領域に特異的に局在することが明らかとなった。分裂酵母動原体DNAは配列上の特徴から*cnt*、*imr*、*otr*と呼ばれる3つの領域に区別できる。免疫沈降を応用した解析の結果、Mis6は動原体の中央に位置する*cnt*、*imr*に結合し、*otr*には結合しないことが明らかとなった。同様の解析で、Mis12もやはり動原体中央（*cnt*、*imr*）に特異的に結合することが明らかとなった。この動原体中央領域のクロマチン構造は特殊であることが知られている。両変異体を制限温度で培養すると、その動原体特異的クロマチン構造が消失した。両タンパクは動原体クロマチンの形成に必須の役割を果たしているものと思われる。免疫沈降でMis6、Mis12と結合するタンパクを精製したところ、リボソームタンパクL7b、L13がMis6と結合することが明らかとなった。この驚くべき結果についてはまだ議論の余地があるが、分裂酵母ではリボソームタンパクやtRNAといった一見無関係な分子が動原体クロマチンの構築に流用されているのかもしれない。また、正体は不明であるがMis12も複数のタンパクと結合して複合体を形成しているようであった。Mis6とMis12は免疫共沈することはなく、*mis12*変異体中でもMis6は動原体に結合していた。Mis6とMis12は、それぞれ別の分子複合体に含まれており、独立に機能して動原体クロマチンの構築に関与するのであろう。*mis6*変異株あるいは野生株をM期中期で停止させて、FISH法により動原体の核内配置を比較したところ、野生株では動原体は紡錘体中央に集結していたのに対し、変異株では核内に散らばっていた。変異体では時期尚早に姉妹動原体が分裂しているような像も観察された。Mis6、Mis12が構築する動原体クロマチンは、M期中期まで姉妹動原体を連結して紡錘体との両方向的結合（Bi-orientation）を保障する「コネクター」として機能するのかもしれない。

一方、*lsd1*変異体はDAPIを用いた核染色によるスクリーニングで、*mis6*、*mis12*変異体と類似の不均等核分裂を示す温度感受性変異体として単離された。FISH法で染色体分配の様子を調べたところ、*lsd1*変異体では染色体は均等に分配されており、姉妹核の大きさの違いは染色体の凝縮状態の差異に起因することが明らかとなった。電子顕微鏡による詳細な表現型解析の結果、*lsd1*変異体では、異方的な核の伸長や異常な隔壁形成、核内構造の不均等分配などが観察された。*lsd1*変異体では染色体以外の何らかの核内構造（例えば核膜孔や核骨格）が不均等に分配され、その結果、姉妹核間で染色体の凝縮状態の違いが生じるらしい。*lsd1*<sup>+</sup>遺伝子を単離したところ、驚いたことにそれは脂肪酸合成酵素の $\alpha$ サブユニットをコードしていた。脂肪酸を培地に添加することで*lsd1*変異は相補され、また抗生物質セルレニンによって脂肪酸合成を阻害すると野生株でも不均等核分裂が誘導された。細胞内の脂肪酸濃度が低下することで不均等核分裂が引き起こされるのだろう。同調培養の結果、脂肪酸合成の阻害はM期特異的に致死的影响を及ぼすことが明らかとなった。脂肪酸は、生体膜の原料やエネルギー貯蔵分子であるばかりでなく、核分裂の均等性を保障する上で重要な役割を担っていると思われる。

# 目次

序論	1-16
本研究の背景と目的	1
有糸分裂のダイナミクスとその制御	3
染色体の基本構造としてのクロマチンとその修飾	10
動原体領域のクロマチン構造	10
動原体DNA配列と結合タンパク質	11
分裂酵母の動原体	15
はじめに	17
第一部 結果	18-72
mis6-302変異体では制限温度で染色体の不均等分配が起こる	18
染色体不均等分配は制限温度に移してから2回目のM期に起こる	21
mis6変異体で染色体の不均等分配が起こるためには	
制限温度でG1/S期を通過することが必要である	21
mis6 <sup>+</sup> 遺伝子の単離	22
Mis6タンパク質は動原体領域に結合する	26
C末154アミノ酸を欠失してもMis6は機能する	30
分裂酵母Mis6と哺乳類LRPR1の相同性についての検討	34
Mis6は動原体DNA中央領域に結合している	41
生細胞中でのMis6タンパクの挙動	44
Mis6-302変異型タンパク質は動原体に結合できない	44
mis6変異体では動原体中央部のクロマチン構造に異常がある	47
mis6変異は中期停止細胞中での動原体の配置に異常を引き起こす	50
Mis6タンパク質は細胞内で沈降係数10-15Sの複合体を形成している	52
Mis6と結合するタンパク質の探索	54
分裂酵母mis12変異は染色体不均等分配を引き起こす	59
Mis12タンパク質は動原体中央領域に局在する	63
mis12変異体では動原体特異的クロマチン構造に異常がある	63
Mis12は細胞周期を通じて5-10Sの複合体を形成している	67
Mis6、Mis12は免疫共沈しない	67
mis12変異体中でもMis6タンパク質は動原体に結合している	71
第一部 考察	73-81
Mis6、Mis12は独立に機能して動原体クロマチンを形成する	73
Mis6、Mis12は動原体領域に結合して特異的クロマチン構造を形成する	74
動原体クロマチンは姉妹動原体をつなぐコネクターなのかもしれない	75
Mis6はG1/S期に機能して動原体クロマチンを形成する	77
Mis6はリボソームタンパクと結合するかもしれない	79
Mis6-GFPはリアルタイムな動原体の挙動を視覚化する	80
まとめ	81
第二部 結果	82-102
lsd1変異株の単離	82
lsd1変異株の表現型	82
電子顕微鏡による表現型の観察	85
lsd1変異株では染色体は均等に分配されている	89
lsd1 <sup>+</sup> 遺伝子は脂肪酸合成酵素の $\alpha$ サブユニットをコードする	89

lsd1 <sup>+</sup> 遺伝子は生育に必須である	91
lsd1変異はパルミチン酸の添加により相補される	96
抗生物質セルレニンによってlsd表現型が誘導される	96
脂肪酸合成の阻害は核分裂期に致命的影響をおよぼす	96
第二部 考察	103-105
均等な核分裂を行うためには脂肪酸合成が必須である	103
M期に脂肪酸濃度が低下すると致命的な不均等核分裂がおこる	103
lsd1変異体では染色体以外の核構造が不均等分配されるらしい	104
まとめ	105
おわりに	106
材料と方法	107-117
参考文献	118-127

## 図表目次

図1.	真核生物の細胞周期は4つのステージからなる	2
図2.	真核生物の有糸分裂の模式図	4
図3.	ヒト培養細胞の有糸分裂像	5
図4.	分裂酵母の核分裂像	6
図5.	分裂酵母野生株の微小管染色像	7
図6.	ヒト、出芽酵母、分裂酵母の動原体	13
図7.	制限温度における <i>mis6</i> 変異体の細胞増殖、生存率および表現型出現率の変化	19
図8.	<i>mis6</i> 変異体では染色体の不均等分配が起こっている	20
図9.	G2期に同調した <i>mis6</i> 変異株を制限温度に移すと、2度目のM期に致死となる	23
図10.	G1期に同調した <i>mis6</i> 変異株を制限温度に移すと、1度目のM期に致死となる	24
図11.	S期停止した <i>mis6</i> 変異体を制限温度で培養しても、1回目のM期は正常である	25
図12.	<i>mis6+</i> 遺伝子のクローニング	27
図13.	Mis6はほ乳類LRPR1タンパク質と相同性を示す	28
図14.	ウエスタンブロット法によるMis6-HAタンパク質の検出	29
図15.	Mis6-GFPタンパク質の細胞内局在	31
図16.	M期におけるMis6の局在	32
図17.	M期中期変異株中でのMis6の局在	33
図18.	C末154アミノ酸を欠失したMis6タンパク質は動原体に局在する	35
図19.	ほ乳類LRPR1は分裂酵母 <i>mis6</i> 変異体の成育を阻害する	37
図20.	分裂酵母中ではLRPR1タンパク質は核クロマチン領域に局在する	38
図21.	LRPR1はHela細胞では細胞質に局在する-1	39
図22.	LRPR1はHela細胞では細胞質に局在する-2	40
図23.	CHIP (Chromatin immunoprecipitation) 実験の概略	23
図24.	Mis6は動原体中央領域に結合する	43
図25.	Mis6は細胞周期を通じて動原体領域に局在する	45
図26.	FISH法より推定される動原体の挙動	46
図27.	変異型Mis6-302タンパク質のウエスタンブロット	48
図28.	変異型Mis6タンパク質は制限温度で動原体に結合できなくなる	49
図29.	<i>mis6</i> 変異株では動原体特異的クロマチン構造が崩壊している	51
図30.	<i>mis6</i> 変異はM期中期の動原体配置に異常を引き起こす	53
図31.	Mis6は細胞周期を通じて10-15Sの複合体を形成している	55
図32.	Mis6はホモポリマーは形成していない	56
図33.	Mis6はp32、p29タンパク質と複合体を形成している	57
図34.	p32、p29は60Sリボソーム構成タンパク質である	58
図35.	<i>mis12-537</i> 変異は制限温度で不均等核分裂を引き起こす	60
図36.	<i>mis12</i> 変異体の微小管染色像	61
図37.	<i>mis12</i> 変異体では染色体の不均等分配が起こっている	62
図38.	Mis12は動原体中央領域に結合する	64
図39.	M期中期停止変異株中でもMis12は動原体に結合している	65
図40.	<i>mis12</i> 変異体では動原体特異的クロマチン構造が崩壊している	66
図41.	Mis12は細胞周期を通じて5-10Sの複合体を形成している	68
図42.	Mis12と結合するタンパク質の同定	69
図43.	Mis6、Mis12は複合体を形成しない	70

図44.	<i>mis12</i> 変異体中でもMis6は動原体に結合している	72
図45.	紡錘体と動原体の結合様式	76
図46.	<i>mis6</i> 、 <i>mis12</i> 変異体で予想される染色体不均等分配モデル	78
図47.	不均等核分裂表現型を示す変異株	83
図48.	<i>lsd1</i> 変異体では制限温度で不均等核分裂がおこる	84
図49.	<i>lsd1</i> 変異体の電子顕微鏡観察像	86
図50.	<i>lsd1</i> 変異体の電子顕微鏡観察像 (cut表現型を示す細胞)	87
図51.	<i>lsd1</i> 変異体の電子顕微鏡観察像 (lsd表現型を示す細胞)	88
図52.	<i>lsd1</i> 変異体では染色体は均等に分配されている	90
図53.	<i>lsd1</i> 変異を相補するゲノム断片の単離	92
図54.	<i>lsd1</i> <sup>+</sup> 遺伝子の塩基配列の決定	93
図55.	<i>lsd1</i> <sup>+</sup> 遺伝子は脂肪酸合成酵素 $\alpha$ サブユニットをコードする	94
図56.	<i>lsd1</i> <sup>+</sup> 遺伝子は成育に必須である	95
図57.	<i>lsd1</i> 変異体の温度感受性はパルミチン酸で相補される	97
図58.	脂肪酸合成を阻害するとlsd表現型が誘導される	98
図59.	脂肪酸合成を阻害するとM期に致死となる	100
図60.	G2期停止している細胞では脂肪酸合成が阻害されても致死とならない	101
図61.	脂肪酸合成阻害は核分裂過程に致命的影響を及ぼす	102

# 序論

## 本研究の背景と目的

原核生物の遺伝情報は1分子の環状DNA上におさめられているが、真核生物の遺伝情報は何本かの直線状DNAに分割され、たたみ込まれ、核内に収納されている。例えば、ヒトの場合は23本（半数体あたり）のDNAに分割されており、出芽酵母の場合は16本、分裂酵母の場合は3本のDNAに分割されている。これらのDNAは染色体DNAと呼ばれる。真核生物の細胞周期はG1、S、G2、Mの4つのステージから成り立っているが、染色体DNAはS期に複製されて倍加し、M期に娘細胞へと分配される（図1）。

遺伝情報が子孫の細胞へと正確に伝達されるためには、複製された染色体は均等に分配されなければならない。つまり、姉妹細胞がともに親と同じ一組の染色体を受け継がなければならないのである。さもなければ、大規模な遺伝情報の欠失や重複が起こる。これはある種の病気（ダウン症候群、ターナー症候群など）や、発ガンの原因となる（Lengauer et al. 1997、Li et al. 1997、Cahill et al. 1998、Duesberg et al. 1998など）。真核細胞は、そのような「悲劇」を避けるために、有糸分裂における核分裂・染色体分配の均等性を保障する機構を備えているらしい。そこで本研究では、分裂酵母を研究対象として、そのような機構に関与する因子を同定し、その分子機能を解明することを目指した。

染色体分配を正確に行うためには、有糸分裂過程が正常に進行すること、および染色体分離・分配に必要な構造が正しく構築されることが必須である。本序論の前半では、有糸分裂で起こる事象とその制御について、後半では染色体分離・分配に必要な構造体、とりわけ動原体について現在までに得られている知見を概説する。

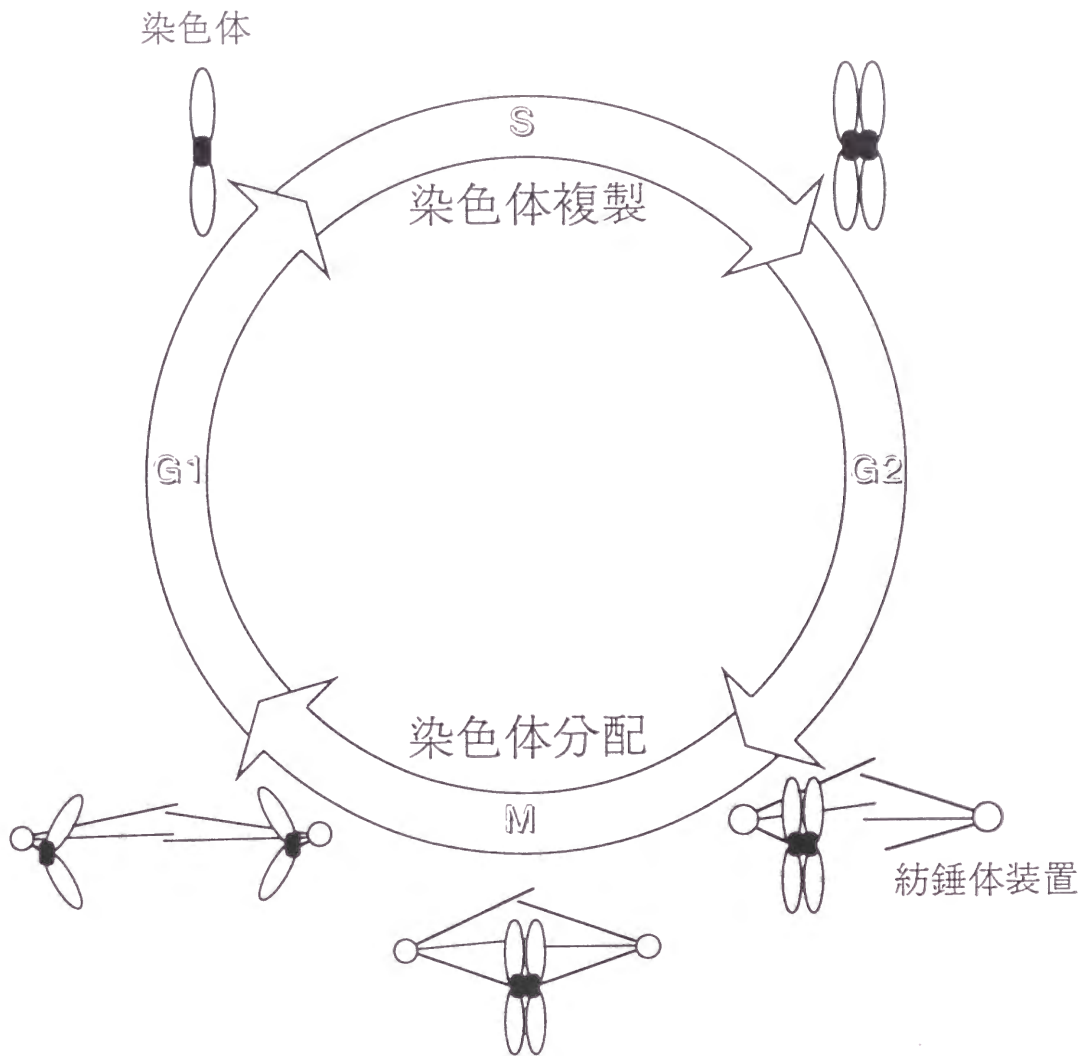


図1. 真核生物の細胞周期は4つのステージからなる

染色体DNAはS期に複製され、倍加した染色体はM期に紡錘体装置によって娘細胞へと分配される。各時期の長さは生物によって異なるが、分裂酵母の場合、S期は10-15分程度、M期は20-30分程度である。一周期は2-3時間でその大半はG2期である。通常の培養条件ではG1期は極めて短い。



## 有糸分裂のダイナミクスとその進行制御

真核生物の有糸分裂期、すなわちM期には細胞内で劇的な一連の構造変化が起こる。一般的にその構造変化は次に示すような順序で整然と進行する（図2、例えばGorbsky 1992、Zhang and Nicklas 1995、Haraguchi et al. 1997等）。

1. 染色体DNAの凝縮、核膜の崩壊が始まる。細胞質に張り巡らされていた微小管ネットワークは崩壊し、染色体分配装置である紡錘体に再編成される（M期前期）。
2. 凝縮した染色体DNAは、それぞれが独立した棒状の構造体になる。核膜は完全に消失し、紡錘体と染色体が結合する（M期前中期）。
3. 凝縮染色体が紡錘体の中央に整列する（M期中期）。
4. それまで対合していた姉妹染色体が分離し、紡錘体の両極に向かって分配される（M期後期）。
5. 紡錘体が消失し、核膜が再生する。細胞質分裂が起こり、細胞質微小管が再生する（M期終期）。

図3にはヒト培養細胞（Hela）でM期に観察される微小管構築、染色体DNAの変化を示した。また図4には生きた分裂酵母細胞での核分裂像を、図5には免疫染色法による微小管の染色像を示した。分裂酵母の核は、間期には球型をしているが、M期になると染色体凝縮にともない変形し、やがて紡錘体伸長によって均等な大きさの2つの娘核へ分割される（McCully and Robinow 1971、Toda et al. 1981、Tanaka and Kanbe 1986、Hagan and Hyams 1988）。分裂酵母の紡錘体は何本もの微小管が一本の束になったような形態をしている（図5）。細胞長軸方向にのびたカゴ状の間期微小管ネットワークはM期が開始すると崩壊し、紡錘体へと再構築される。近年の生細胞観察の結果によれば、分裂酵母のM期紡錘体伸長は3段階に分けられるらしい（Nabeshima et al. 1998）。すなわち、一定速度で約 $2.5\mu\text{m}$ まで伸長する第I期（phase I）、 $2.5\mu\text{m}$ で伸長が数分間停止する第II期（phase II）、その後再び一定速度で $14\mu\text{m}$ まで伸長する第3期（phase III）に分割される。それぞれ第I期は前中期、第II期は中期～後期A、第III期は後期Bに相当すると思われる。以前の固定細胞でのFISH（蛍光in situ ハイブリダイゼーション）や電子顕微鏡観察の結果をあわせて考えると、分裂酵母では核膜消失は起こらないものの、それ以外は高等真核生物と同様のステップを経て核分裂が進行すると考えられる（Funabiki et al. 1993、Ding et al. 1993、Saka et al. 1994）。有糸分裂の諸過程は酵母から高等真核生物まで進化的に広く保存されているようである。

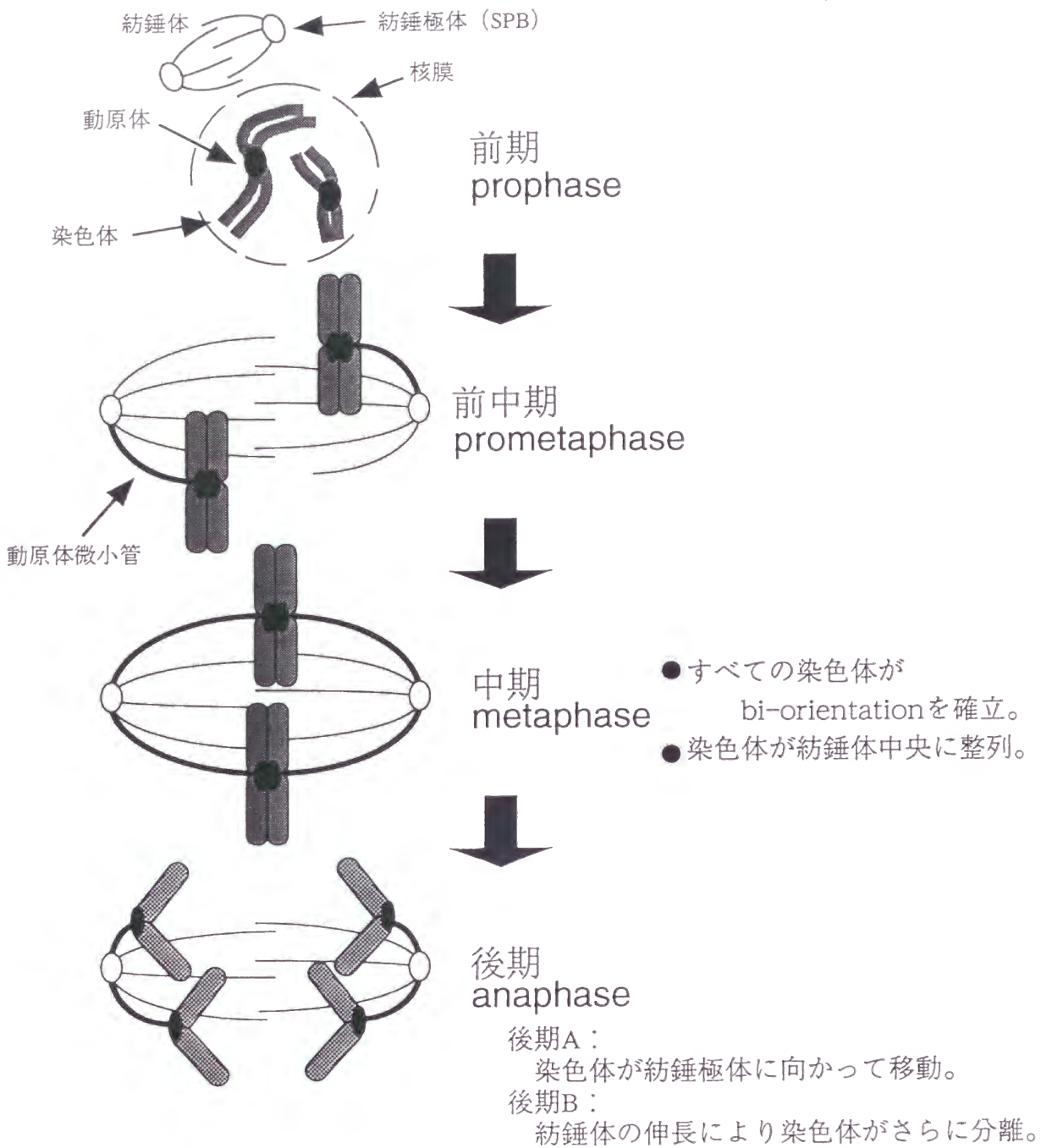


図2. 真核生物の有糸分裂の模式図

Cdc2キナーゼ・サイクリン複合体が活性化すると有糸分裂が開始する。前期には細胞質で紡錘体が形成され、染色体凝縮、核膜崩壊が始まる。前中期になると紡錘体が核領域に進入し、動原体微小管が動原体と結合する。両方向的に紡錘体と結合 (bi-orientation) した染色体は紡錘体中央 (中期板) に整列する。全ての染色体が中期板に集結した状態が中期であり、サイクリン分解、姉妹染色体対合の解除と共に後期が開始し、姉妹染色体が分配される。後期は、染色体が極に向かって移動する後期Aと、紡錘体自身が伸長することで姉妹染色体間の距離がさらに増加する後期Bの2つのステップに分類される。終期 (telophase) になると紡錘体は崩壊し、核膜、細胞質微小管が再生され、細胞質分裂がおこる。

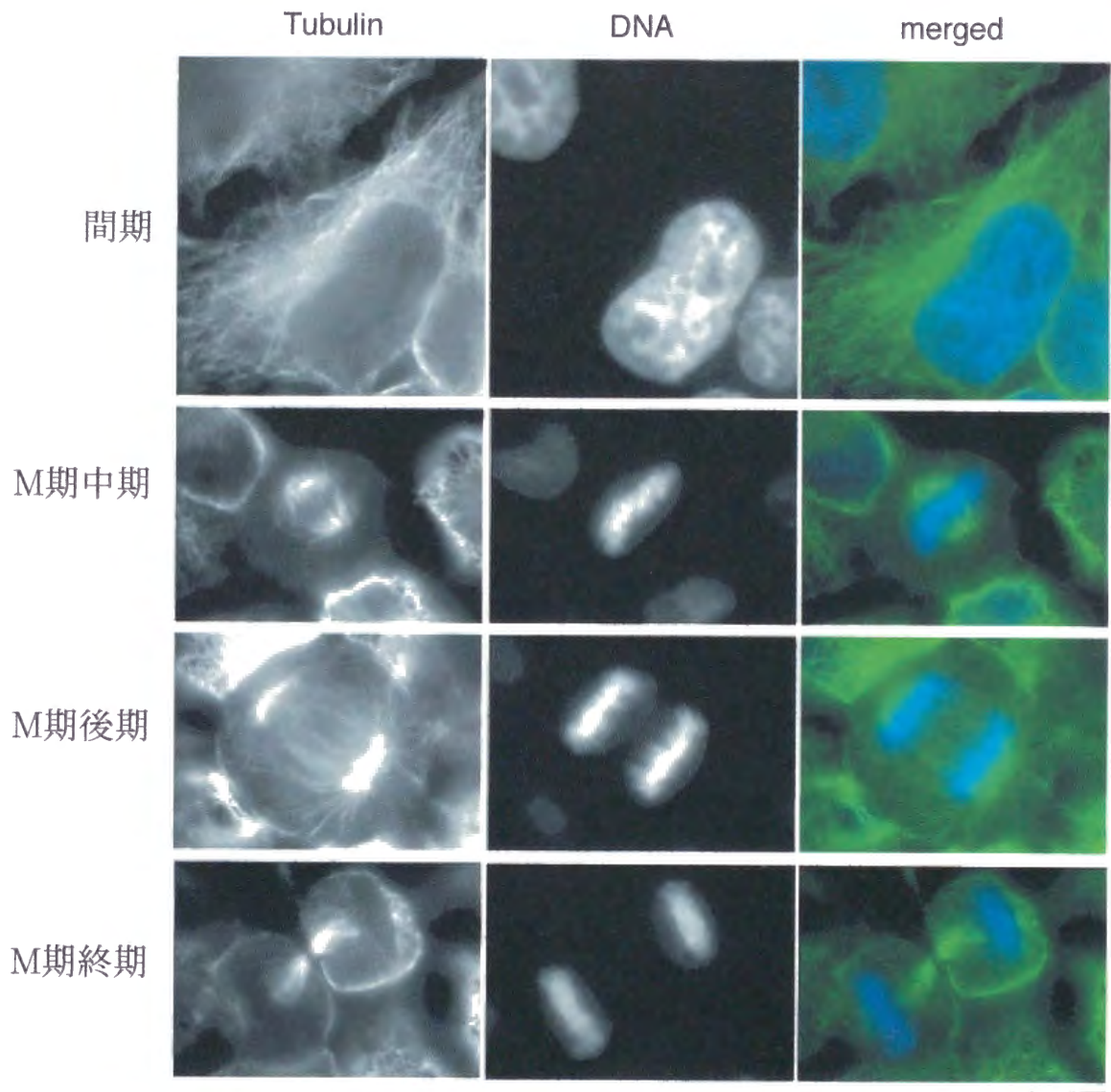


図3. ヒト培養細胞の有糸分裂像

培養したHela細胞をホルムアルデヒドで固定し、免疫染色法により微小管を染色した。DNAはHoechst33342で染色した。冷却CCDカメラを搭載した蛍光顕微鏡で撮影後、デジタル処理により、コントラスト補正、疑似着色をおこなった。



図4. 分裂酵母の核分裂像

YPD+21%ゼラチン培地に包埋した分裂酵母細胞を位相差顕微鏡で観察し、CCDカメラを接続した間欠記録ビデオレコーダー（time lapse video recoder）で経時的に記録した。21%ゼラチン中では屈折率の違いにより核領域が明るく浮き上がる。図中の数字は観察開始よりの経過時間（単位は時間:分）。写真右下の細胞では、55分あたりからM期が開始すると思われる。1時間5分目より後期が開始し、染色体が娘核へ分配される。1時間40分目には隔壁形成が始まり（細胞中央の暗い線）、2時間11分後には細胞質分裂が完了する。写真左側の細胞では1時間40分後よりM期が開始する。

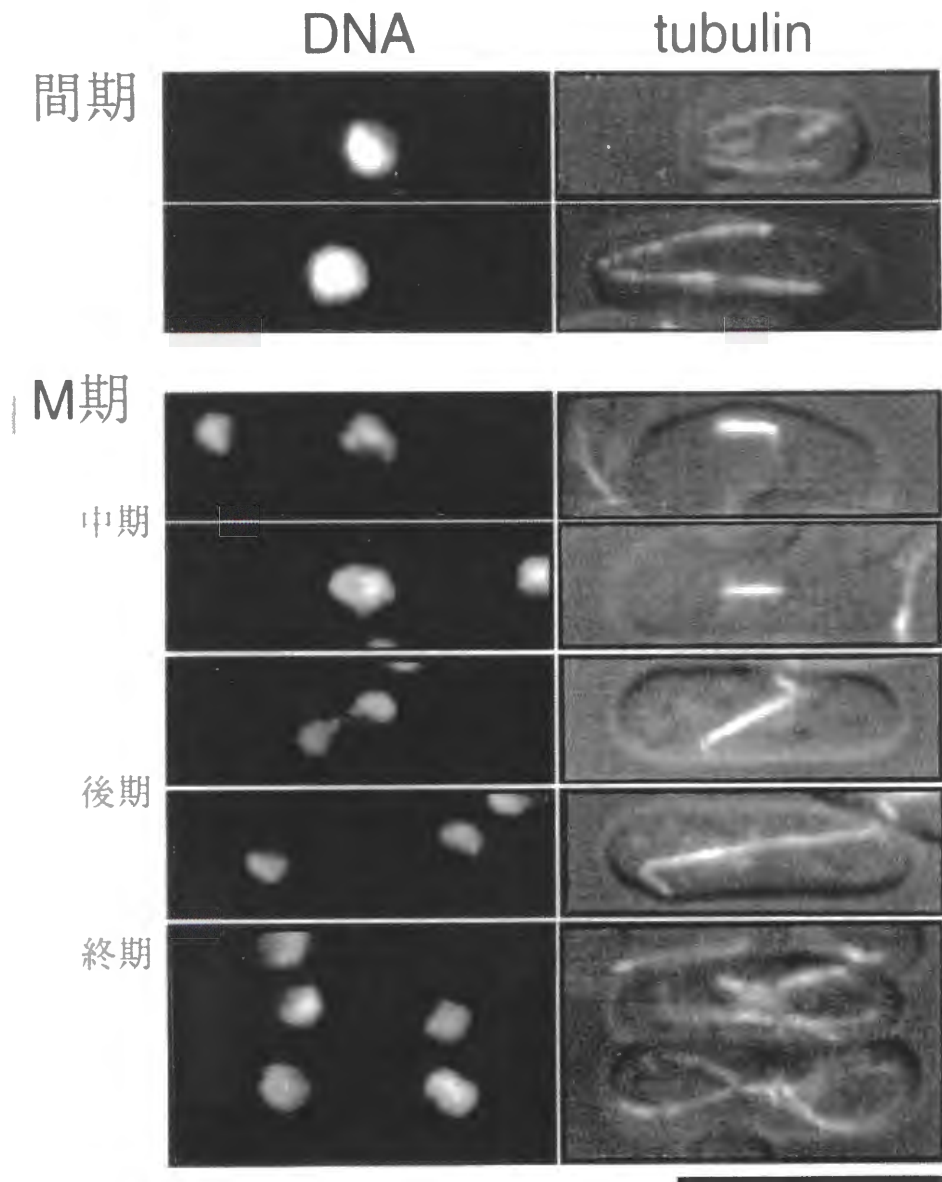


図5. 分裂酵母野生株の微小管染色像

対数増殖期の細胞をアルデヒドで固定し、免疫染色法により微小管を染色した。DNA染色にはDAPIを用いた。分裂酵母の核は間期には球型で、半球はクロマチンDNAが占め、残りの半球は核小体が占める。間期には細胞の長軸方向に伸びる数本の微小管が観察できる。焦点を動かして観察すると、この微小管はカゴ状に細胞質内に張り巡らされていることがわかる。M期になると、染色体凝縮に伴って核形態が変形する。紡錘体は直線状の微小管束として観察される。中期の紡錘体長は間期核の直径と同程度で、 $2-2.5\mu\text{m}$ 。後期になると、紡錘体の伸長と共に核が分裂し、細胞の両端へと移動する。核分裂が完了して終期になると、核クロマチンは再び半球状の形態に戻り、細胞質にはX型に配置した微小管ネットワークがあらわれる。バーは $10\mu\text{m}$ 。

有糸分裂過程の進行には、Cdc2カイネース (Cdc2 kinase) -サイクリン複合体の周期的な活性化・不活性化が必要となる (Hunt 1989, Doree 1990, Coleman and Dunphy 1994など)。すなわちCdc2カイネースが、1) M期開始時に活性化され、2) 中期から後期への遷移時に不活性化される。Cdc2カイネースの活性は15残基目のチロシンのリン酸化状態を変化させることによって制御される。リン酸化はWee1・Mik1カイネース (Wee1・Mik1 kinase) によって、脱リン酸化はCdc25フォスファターズ (Cdc25 phosphatase) によって担われており、脱リン酸化状態でCdc2は活性化する。Cdc2の活性化のタイミングは“複製・修復チェックポイント”と呼ばれる監視機構によって制御されている (Weinert and Hartwell 1989, Elledge 1996, Russell 1998, Weinert 1998など)。このチェックポイントは、染色体複製の完了あるいはDNA損傷の修復の完了を監視しており、これらの完了以前にCdc2が活性化することを防いでいる。このチェックポイントが欠損すると、損傷を含む染色体や複製の終わっていない染色体が無理に分配されることとなり、子孫へ正確な遺伝情報を伝達することが不可能となる。このチェックポイントにはCds1、Chk1という2種類のカイネースが関与している (Walworth et al. 1993, Murakami and Okayama 1995)。これらがWee1・Mik1を活性化し、またCdc25を不活性化することにより、時期尚早なCdc2の活性化を防いでいるらしい (O'Connell et al. 1997, Boddy et al. 1998, Zeng et al. 1998)。

一方、Cdc2カイネース複合体の不活性化はサイクリンサブユニットを分解することによって引き起こされる (Cohen-Fix and Koshland 1997, Townsley and Ruderman 1998など)。このタンパク分解はユビキチン依存的である。すなわち、重合したユビキチンタンパク質がサイクリンに共有結合され、次いでそれを目印としてプロテオソームと呼ばれるタンパク分解酵素複合体がサイクリンを分解する。サイクリンサブユニットのユビキチン化はAPC (Anaphase promoting complex 後期促進複合体) /サイクロソームと呼ばれるタンパク複合体によって担われている (Hershko et al. 1994, King et al. 1995)。このAPCは中期から後期の移行へ重要な役割を果たす。分裂酵母ではCut4、Cut9、Nuc2タンパク質がAPC複合体の構成要素であることが明らかとなったが、これらの遺伝子の欠損変異体はいずれもM期中期で細胞周期進行が停止する (Yamashita et al. 1996, Yamada et al. 1997)。時期尚早なM期後期の開始は染色体分配異常を引き起すので、中期から後期への遷移のタイミングは厳密に制御されなければならない。“紡錘体チェックポイント”は、そのような制御機構の一つである (Rudner and Murray 1996)。このMurrayらによって提唱されたチェックポイントは、紡錘体形成が不完全になったときに機能する制御機構で、紡錘体が正常に形成されるまで後期の開始を抑制する。遺伝学的解析により、このチェックポイントに関与する遺伝子、MAD1~3、BUB1~3が出芽酵母で同定された (Hoyt et al. 1991, Li and Murray 1991)。これらの相同遺伝子が分裂酵母やアフリカツメガエル、ヒトからも見つけだされており、紡錘体チェックポイントは進化的に保存された制御機構であるらしい (Chen et al. 1996, Li and Benezra 1996, He et al. 1997)。近年、Mad2タンパク質がAPC

複合体に結合し、その活性を抑制することが報告された (Gorbsky 1997、Li et al. 1997、Fang et al. 1998)。中期から後期の遷移はAPCの活性調節によって制御されていると思われる。

M期前中期になると、紡錘体を構成する微小管のうち、一群の特別な微小管 (動原体微小管と呼ばれる) が染色体に結合する。動原体微小管と結合する染色体領域は動原体と呼ばれ、通常それぞれの染色体に一ヶ所ずつ存在する。姉妹染色体はM期中期までは対合しており、姉妹染色体の動原体はペアになっている。姉妹染色体が均等に娘細胞へと分配されるためには、一方の紡錘極体から伸びてきた動原体微小管が姉妹動原体の一方に結合し、他方の紡錘極体から伸びてきた微小管がもう一方の動原体に結合するという状態が確立されなければならない (図2、図45)。そのような結合状態は両極性あるいは両方向性結合 (bi-polar/bi-oriented attachment あるいは bi-orientation) と呼ばれている (Ault and Nicklas 1989 など)。M期後期に姉妹染色体が均等に分配されるには、M期中期に染色体が紡錘体と両方向的に結合しなければならない。“中期チェックポイント”と名付けられたチェックポイントは、すべての染色体が両方向性の結合を獲得するまで、中期から後期への遷移を抑制する制御機構である。このチェックポイントは厳密な意味ではその存在は証明されていないが、その存在を示唆する状況証拠はいくつか得られている。例えば、Riederらの観察によれば、脊椎動物の培養細胞では一部の染色体が紡錘体と両方向的に結合できなかった場合には、中期から後期への遷移が遅延する (Rieder et al. 1994、1995)。(Hartwellらが提唱した概念に厳密に従うならば、染色体と紡錘体の結合を特異的に阻害したときに後期への進行が抑制され、さらに変異などによってその抑制がバイパスされ得る事を示さないとチェックポイントとは呼べない。Hartwell and Weinert 1989) 先に述べたMad1~3、Bub1~3タンパクはそのような制御機構に関与するのかもしれない (Straight 1997)。出芽酵母の動原体構成タンパク質の変異体ctf13変異体では細胞周期の進行がM期で停止するが、この停止はMad1~3およびBub1、3に依存的である (Pangilinan and Spencer 1996)。またアフリカツメガエルやヒトなどの培養細胞な場合、Mad2タンパク質は、M期に紡錘体と結合できていない動原体へ選択的に局在することが知られている (Chen et al. 1996、Li and Benezra 1996、Waters et al. 1998)。またBub1相同タンパク質もやはり M期に動原体に局在することが示された (Taylor and McKeon 1997、Taylor et al. 1998)。Mad、Bubタンパクは動原体と紡錘体の両方向性の結合を監視し、中期-後期遷移を制御しているのかもしれない。また3F3/2と呼ばれる抗体をもちいてヒト培養細胞を免疫染色すると、紡錘体と結合していない動原体が特異的に染色される。この抗体の抗原は決定されていないが、何らかのリン酸化タンパク質を認識しているようである (Gorbsky and Ricketts 1993)。3F3/2抗原もいわゆる“中期チェックポイント”に関与していると考えられている。

## 染色体の基本構造としてのクロマチンとその修飾

真核生物の染色体DNAは、ヒストン等のタンパク質と相互作用して高度に折り畳まれ、核内に収められている。この折り畳まれたDNA-タンパク複合体はクロマチンと呼ばれる。クロマチンの最も基本となる構造はヌクレオソームである。これは、直径11nm、高さ6nmの円筒形をしたヒストン8量体に約200塩基対のDNAが巻き付いた構造体である。このヌクレオソームが数珠つなぎにつながり、高次の折りたたみやその他の染色体機能に必要なタンパク群が付加してクロマチン繊維となる。例えば、分裂酵母の染色体DNAの総塩基数は14メガ塩基対であり、染色体DNA1分子あたりの長さは約1.6mmである。これがクロマチン繊維としてたたみ込まれ、直径わずか2 $\mu$ mの核に詰め込まれている。クロマチンはその機能を発現させるために様々な修飾を受ける。代表的な修飾としてはDNAのメチル化やヒストンのアセチル化がある。ヒストンアセチル化は遺伝子の発現制御に重要な働きをしていることが知られている（例えばKuo and Allis 1998）。また、ヌクレオソームの位置やヌクレオソーム間の間隔も発現制御や染色体機能に関与していると思われる。Chromatin remodeling factorなどと呼ばれる一連の因子群はヌクレオソームの位置や間隔に作用して遺伝子発現を制御しているらしい（Steger and Workman 1996、Tsukiyama and Wu 1997、Cairns 1998など）。

クロマチンは有糸分裂期に入るとさらに折りたたまれ、1本ずつの染色体DNAが独立した棒状の塊となる。形態学的にはこの棒状の構造体を染色体と呼ぶ。この過程は染色体凝縮といわれており、II型トポイソメラーズやSMCファミリーというグループに属する一群のタンパク質が関与している（Strunnikov et al. 1993、Hirano and Mitchison 1994、Saka et al. 1994）。姉妹染色体はM期後期になるまではつなぎ止められているが、これに必要な因子は"glue"あるいは"cohesion分子"と名付けられている（Holloway et al. 1993、Guacci et al. 1997、Michaelis et al. 1997）。出芽酵母ではScc1タンパク質およびSMCファミリーに属する別のタンパク質がcohesinとよばれる複合体を形成し、姉妹染色体の対合に関与していることが示されている（Losada et al. 1998）。分裂酵母ではMis4タンパク質（adherinと名付けられた）がやはり姉妹染色体の対合に必要であることが示された（Furuya et al. 1998）。

## 動原体領域のクロマチン構造



DNA分子が染色体として振る舞うためには、動原体（セントロメア）、テロメアそして自律複製配列（ARS）の3つの要素を含むことが必要である。出芽酵母の場合では、この3要素を含むDNA断片が人工染色体として機能することが知られている（Murray and Szostak 1983）。ARS配列はDNA複製の開始に必要であり、テロメアは染色体末端の複製および保護に必要である。一方、動原体は、遺伝学的には減数分裂時に組み換えが起こらず必ず還元分離する遺伝子座として定義される。これは、細胞学的に見るとM期に動原体微小管が結合する部位であり、染色体分配に必須である。

紡錘体との相互作用に必要な動原体は、高等真核生物の場合は、凝縮染色体の一次狭窄部位として観察される。ほとんどの真核生物の場合、動原体は一つの染色体につき一カ所だけに限定されており、通常、染色体上の決まった領域に形成される。後に述べるように動原体DNAは特殊な配列をしている。特殊な一次配列が動原体部位を決定しているのかもしれない。実際、出芽酵母の場合は120塩基対の動原体配列を含むDNA断片をプラスミドにつないで細胞内に導入すると、その断片は動原体として機能する（Clarke and Carbon 1980、Murray and Szostak 1983）。しかしながらヒトやショウジョウバエなどでは、本来は動原体とされないはずの染色体領域が動原体化するネオセントロメアという現象も観察されている（Depinet et al. 1997、du Sart et al. 1997、Willard 1998）。新たに動原体化した領域には本来の動原体DNA配列は含まれないので、この場合はDNA配列以外の要因が動原体部位決定に関与していると考えざるを得ない。マウスの場合にはDNAのメチル化状態が動原体の位置決定に重要な役割を果たしているということが報告されている（Mitchell et al. 1996）。分裂酵母ではヒストンのアセチル化状態が動原体機能に関与しているらしい（Ekwall et al. 1997）。また分裂酵母の動原体領域はヌクレオソームの配置が特殊であることも知られている（Polizzi and Clarke 1991、Takahashi et al. 1992、および本論文）。出芽酵母でもやはり動原体領域のクロマチン構造は特殊であると報告されている（Bloom and Carbon 1982）。DNAの一次配列だけでなく、ヌクレオソームの位置や間隔を変化させたり化学的に修飾したりして動原体特異的クロマチンを形成することが、動原体DNA-タンパク複合体を構築するために必須であると思われる（Wiens and Sorger 1998）。

## 動原体DNA配列と結合タンパク質

霊長類の動原体DNAには $\alpha$ サテライトと呼ばれる約170塩基対の配列が数メガ塩基対にわたって反復している。近年の報告によると、 $\alpha$ サテライト配列の反復を含むDNA断片を培養細胞中に導入すると組み換えが起こり、 $\alpha$ サテライトが数メガ塩基対にわたって連続するDNA断片が形成され、それが人工染色体として機能するらしい（Harrington et al. 1997、Ikeno et al. 1998、Murphy and Karpen 1998）。ショウジョウバ

エの動原体も約1メガ塩基対と巨大で、5-10塩基対くらいの単純な反復配列やトランスポゾン配列を多く含む (Murphy and Karpen 1995, Sun et al. 1997)。一般に高等真核生物の動原体は、種を越えると配列自体は大きく異なるものの、巨大で反復配列を多く含むという特徴がある。

出芽酵母 *S.cerevisiae* の動原体は、上記の例とは異なり、約120塩基対の短いDNA配列が動原体機能を有する。この短い動原体DNAは配列上の特徴からCDE I~IIIの3つのドメインに分けられる。CDE Iはパリンドローム配列を含む8塩基対の配列であり、CDE IIは約80塩基対のA/Tに富む配列、CDE IIIは対称な配列を含む26塩基対の配列である (Carbon and Clarke 1984, Fitzgerald-Hayes 1987など) (図6B)。このような特徴は、別種の出芽酵母である *Kluyveromyces lactis* でもやはり保存されている (Heus et al. 1993)。

動原体DNAには様々なタンパク質が結合し、巨大なDNA-タンパク質複合体が形成されている。Scleroderma (進行性全身性硬化症) という自己免疫疾患の患者うち30%の者は動原体タンパク質に対する自己抗体を持っていた。そのような患者は、calcinosis、Raynaud's phenomenon、esophageal dysmotility、sclerodactyly、telangiectasia という症状を特徴的に示したので、彼らから得られた血清はCREST血清と呼ばれる。このCREST血清を用いて、複数のヒト動原体結合タンパク (centromere protein) CENPsが同定された (Earnshaw and Rothfield 1985)。CENPsのいくつかについては、以下に述べるような機能が示唆されており、また出芽酵母や分裂酵母にも相同性を示すタンパクが見いだされている。CREST血清は他の哺乳類生物や高等植物の動原体タンパク質とも交叉反応する。動原体配列は種によって異なっているが、結合しているタンパクは真核生物を通じて保存されているのかもしれない。

CENP-Aは17kDのタンパク質でC末側3分の2がヒストンH3と強い相同性を有している (Palmer et al. 1987)。CENP-AはヒストンH4やほかのヒストンと結合していることが知られており、おそらく動原体領域特異的なヌクレオソームを形成しているのではないかとと思われる (Warburton et al. 1997)。出芽酵母 Cse4タンパク質はヒストンH3と相同性を有しており、この遺伝子に変異が起こると、人工ミニ染色体が不安定となる (Stoler et al. 1995)。局在などのデータからこのタンパク質がCENP-Aの出芽酵母における相同タンパク質ではないかと考えられている (Meluh et al. 1998)。

CENP-Bは80kDのタンパクでホモ2量体を形成している。C末 (カルボキシル末端) 領域がこの2量体化に必要で、一方N末 (アミノ末端) 領域はDNA結合能を有する (Masumoto et al. 1989)。このDNA結合能は配列特異的で、その17塩基対の認識配列 (CENP-B boxと呼ばれる) は先に述べた  $\alpha$  サテライト配列中に含まれる。N末で  $\alpha$  サテライトDNAに結合し、一方C末で2量体化することにより、動原体DNAを束ねるような働きをしているのではないかとされている (Sugimoto et al. 1994)。CENP-Bタンパク質は哺乳類から分裂酵母まで種を越えて広く保存されている。最近CENP-B遺伝子を破壊したノックアウトマウスが作成



された。体重が野生株に比べ軽いなどのいくつかの欠損が見いだされたが、基本的に生育可能で繁殖も可能であった (Hudson et al. 1998)。分裂酵母のCENP-B相同タンパク質は当初、ARS配列に結合するタンパクとして同定された (Murakami et al. 1996、Lee et al. 1997)。遺伝子破壊株は低温感受性を示すものの、常温では生育には必要ではなかった。大量発現すると人工染色体が不安定化するなどの現象が知られているが (Halverson et al. 1997)、動原体機能との関わりについては明らかでない。

CENP-Cは140kDのタンパク質である。ヒトの動原体は電子顕微鏡で観察すると3層の層状構造をしていることが知られているが (Comings and Okada 1971、Witt et al. 1980、Rieder and Salmon 1998) (図6A)、このタンパク質はその最も内側の層に局在している。中和抗体をマイクロインジェクションすると動原体形成が阻害されるので、CENP-Cは動原体タンパク複合体の構築に必須な役割をしているのではないかと思われる (Tomkiel et al. 1994)。出芽酵母のMif2は染色体の安定性に関与するタンパク質であるが (Meeks-Wagner et al. 1986)、CENP-Cと相同性を示すといわれている (Meluh and Koshland 1995)。Mif2はA/Tに富むDNAに結合するモチーフ (AT-フック) を有しているのでCDEII領域に結合すると考えられていたが、ホルムアルデヒドを用いた架橋実験からは、Mif2はCDEIIIと相互作用することが示唆されている (Meluh and Koshland 1997)。

そのほかにも哺乳類細胞では、動原体タンパク質としてCENP-E、Fなどが知られている (Yenet al. 1991、Liao et al. 1995)。CENP-Fは時期特異的に局在が変化する。すなわち、M期初期になると動原体に局在し、後期になると動原体からはなれて紡錘体中央帯 (midzone) へ集まるようになる。時期特異的に動原体へ局在するタンパクとしては他にINCENPなどが知られている (Cooke et al. 1987)。またCENP-Eはキネシンモーター様のタンパク質でM期初期に動原体へ局在し、後期になると離れていく。動原体に局在するキネシンモーターとしては他にMCAKが知られている (Wordeman and Mitchison 1995)。これらの微小管モータータンパク質は、紡錘体上での動原体の運動あるいは染色体分離・分配において重要な働きをしていると考えられている。

出芽酵母のCDEIII領域には多くのタンパク質が結合し、DNA-タンパク質複合体が形成されていることが生化学的に示されているが (Lechner and Carbon 1991)、この分子量240kDのタンパク複合体はCBF3複合体と呼ばれている。その構成因子はCBF3A~Dと名付けられており、それぞれ110kD、64kD、58kD、23kDのタンパク質である。110kDサブユニットはCBF3AはCBF2 (=NDC10、CTF14) 遺伝子によってコードされている (Goh and Kilmartin 1993、Doheny et al. 1993)。NDC10、CTF14は染色体不分離を引き起こす変異、あるいは人工染色体の動原体機能を損なう変異の原因遺伝子として単離されたのであるが、110kDサブユニットをコードする遺伝子 (CBF2) と同一であることが明らかとなった (Jiang et al. 1993)。CBF3B (64kD)、

CBF3C (58kd) はそれぞれ *CEP3*、*CTF13* 遺伝子によってコードされているが、これらは人工染色体の動原体機能欠損の原因遺伝子として単離された (Doheny et al. 1993、Strunnikov et al. 1995)。また Skp1 タンパク質も CBF3D として CDE III 領域に結合することが示されたが (Connelly et al. 1996)、この Skp1 は G1/S あるいは G2/M の進行に必要なタンパク質で SCF と呼ばれる複合体を形成し、CDK インヒビターのユビキチン依存的分解に関与していることが知られている (Bai et al. 1996)。

## 分裂酵母の動原体

分裂酵母の動原体 DNA は *otr* や *imr* と名付けられた反復配列が *cnt* 配列を中心として対称に配置した構造をしている (Clarke et al. 1986、Nakaseko et al. 1987、Fishel et al. 1988、Chikashige et al. 1989、Clarke and Baum 1990、Hahnenberger et al. 1991、Murakami et al. 1991、Takahashi et al. 1992) (図6C、図24A)。第1、第3染色体の *cnt* 配列には *tm* と名付けられた共通の配列モチーフが含まれるが、その点を除けば各染色体の *cnt* 配列間で類似性は見られない。*imr* 領域についても、ひとつの動原体についてみれば左右の *imr* 配列は 100% 一致するが、染色体間では配列上の類似性はない。一方、*otr* 配列には *dg*、*dh* と名付けられた 4~5 キロ塩基対の配列モチーフが含まれており、これらは全ての染色体で共通である。動原体全体は 40 キロ塩基対から 120 キロ塩基対と大きく、出芽酵母のそれに比べれば約 500~1000 倍の大きさである。巨大かつ反復配列に富むという特徴が高等真核生物の動原体と類似しているので、分裂酵母の動原体は良いモデル系になると期待できる。

分裂酵母の直線状人工ミニ染色体は第3染色体の腕部をガンマ線で切断するという方法で作成されたが (Niwa et al. 1986)、そのように作成された最短の人工染色体 Ch10 は完全な動原体配列のみから成り立っていた (Niwa et al. 1989)。動原体配列中には ARS 配列が含まれていることが明らかとなり (Takahashi et al. 1992)、また人工染色体の両端には新たにテロメア配列が付加されていた (Matsumoto et al. 1987)。環状の人工染色体は組み換え修復を利用したギャップフィリング法で作成された (Matsumoto et al. 1990)。これらの人工染色体を利用し、動原体の部分欠失変異体を作成して機能に必要な領域を調べたところ、有糸分裂の染色体分配には *cnt* 配列と *imr* 配列が特に重要であることが分かった (Matsumoto et al. 1990、Hahnenberger et al. 1991、Takahashi et al. 1992)。環状ミニ染色体 CM2104 は *otr* 配列を一部分しか含まないが、それでも有糸分裂で安定に保持される。近年、*dh* 配列と類似の DNA 配列が接合型 (*mat*) 遺伝子座に存在することが明らかとなった (Grewal and Klar 1997)、接合型遺伝子座はヘテロクロマチンを形成しており、*mat2-P* (*h*) と *mat3-M* (*h*) 遺伝子の発現は抑制されている (どちらか一方の遺伝子が *mat1* 遺伝子座にコ

ピーされて発現し、接合型を決定する)。otr配列はヘテロクロマチンの形成に関与しているのかもしれない。実際、動原体領域もやはりヘテロクロマチン化しており、遺伝子の発現が抑制されている (Allshire et al. 1994)。

しかしながら、上述のように分裂酵母動原体の塩基配列については情報が蓄積されているが、動原体に結合するタンパク質についてはあまり知見は得られていない。分裂酵母Swi6タンパク質が動原体領域に局在することが報告されたが (Ekwall et al. 1995) 動原体特異的というわけではなく、テロメアや接合型遺伝子座領域にも局在していた。このタンパク質はクロモドメインというモチーフを含むタンパクで、ヘテロクロマチン形成、遺伝子サイレンシングに関わると考えられている (Lorentz et al. 1994, Allshire et al. 1995)。

本研究の過程で、分裂酵母Mis6、Mis12タンパク質は動原体機能に深く関与することが明らかとなった。分裂酵母*mis*変異体 (mini chromosome instability) は、人工ミニ染色体を安定に保持できず、かつ温度感受性をしめす一群の変異体として単離された (Takahashi et al. 1994)。12相補群の*mis*変異が単離されたが、その中には染色体複製に欠損があると思われる変異 (*mis1*、*mis5*、*mis10*) (Takahashi et al. 1994、近藤 祥司 未発表、建部 恒 未発表) や、複製された姉妹染色体の対合に欠損のある変異 (*mis4*) (Furuya et al. 1998)、スプライシングなどRNA代謝の欠損と思われる変異 (*mis2*、*mis11*) (Takahashi et al. 1994、近藤 祥司 未発表)、およびタンパク合成制御に欠損があると思われる変異 (*mis3*) (近藤 祥司 未発表) が含まれていた。本研究では*mis6*と*mis12*変異体を解析したが、これらは制限温度で核が不均等な大きさの姉妹核に分裂するという興味深い表現型を示した。他の*mis*変異体はいずれもそのような表現型は示さない。遺伝子を単離してその局在を解析したところ、Mis6、Mis12タンパク質は動原体中央領域に結合していることが分かった。変異体表現型の解析によると、これらのタンパクは動原体のクロマチン構造の形成に関与しているらしい。これらのタンパク、あるいは動原体特異的なクロマチン構造がどのような分子的機能を担っているのか考察したい。

本研究の過程で新たに同定した分裂酵母*Isd1*変異体は、*mis6*変異体等と同様に制限温度で不均等な核分裂を引き起こした。解析の結果、この不均等は染色体分配の異常によるものではなく、染色体の凝縮状態の相違によるものであることが明らかとなった。驚くべきことに、*Isd1*遺伝子は脂肪酸合成酵素をコードしていた。脂肪酸の前駆体合成に関与するアセチルCoAカルボキシレースの変異である*cut6*変異体もやはり同様の表現型を示していた。近年、脂肪酸が、生体膜の原料やエネルギー源としてだけでなく、RNA輸送などのさまざまな生体プロセスで重要な機能を果たしていることが示唆されている (Schneider and Kohlwein 1997)。脂肪酸が核分裂においてどのような機能を果たしているのか可能性を検討したい。

## はじめに

本研究において核分裂の均等性を保障する機構を解明する目的で解析した分裂酵母 *mis6*、*mis12*、*lsd1* 変異株では、制限温度で培養すると不均等な核分裂が生じる。DAPI染色像が類似しているため、当初、これらの遺伝子産物はいずれも同様の生体機能に関与しているだろうと予想した。しかしながら研究過程で、Mis6、Mis12とLsd1タンパクは性質が大きく異なることが明らかとなった。すなわち、前者は染色体均等分配に関与しているのに対し、後者は染色体以外の核内構造の分配に関与しているとおもわれる。Mis6、Mis12は動原体結合タンパク質で、一方Lsd1は予想外にも脂肪酸合成酵素であった。そこで本論文は二部構成とし、第一部でMis6、Mis12の機能解析、第二部ではLsd1の解析について述べる。

## 第一部 結果

### *mis6-302*変異体では制限温度で染色体の不均等分配がおこる

(この実験は高橋博士によって行われた)

完全な動原体DNA配列を含む人工ミニ染色体Ch10は、分裂酵母野生株では極めて安定に保持される。*mis6-302*変異株は、そのCh10を安定に保持できず、かつ温度感受性を示す変異株として単離された (Takahashi et al., 1994)。*mis6*変異体を制限温度で培養すると4時間後より生存率が低下するが (図7パネルB)、このときDAPIで核を染色して観察すると、不均等な核分裂が起こっていた (図9パネルD参照、データは示さない)。すなわち、核分裂自体は一見正常に進行しているのだが、生じた姉妹核の大きさが著しく異なっていた。不均等核分裂を示す細胞の頻度は、培養時間を経るにつれ増加し、8時間後には2核の細胞 (すなわち核分裂直後の細胞) のうち9割で不均等核分裂が起こっていた (図7パネルC)。*mis6*変異体では姉妹染色体が不均等に分配され、そのため姉妹核の大きさに差異が生じるのかもしれないと考え、rDNAをプローブとした蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) による解析を行った。リボソームRNAをコードするrDNAは第3染色体の両末端に反復して存在しており、これをプローブとすることで第3染色体の分配の様子を観察することができる。結果は図8に示した。許容温度では*mis6*変異体中でも第3染色体は娘核に均等に分配されていた (図8パネルA 26℃)。ところが制限温度で培養すると (図8パネルA 36℃)、第3染色体が娘核の一方にしか分配されていない細胞 (a) や、第3染色体は均等に分配されているが姉妹核の大きさが著しく異なる細胞 (b) が多数観察された。おそらく (b) の細胞では、第1あるいは第2染色体の不均等分配が起こっているのだろう。(a) に示したような第3染色体の不均等分配の頻度は制限温度での培養時間を経るとともに増加した (図8パネルB)。図8パネルA (c) には間期の細胞を示したが、第3染色体を含む細胞と含まない細胞が観察された。

以上の結果より、制限温度で培養すると*mis6*変異体では姉妹染色体の不均等分配が起こり、それが原因で娘核の大きさに差異が生じるものと結論した。分裂酵母では第3染色体が二染色体的 (disomic) な半数体以外、異数体は致死的であるので (Niwa and Yanagida, 1985)、染色体不均等分配による高頻度な異数体の生成が生存率の低下を引き起こしているのだろう。



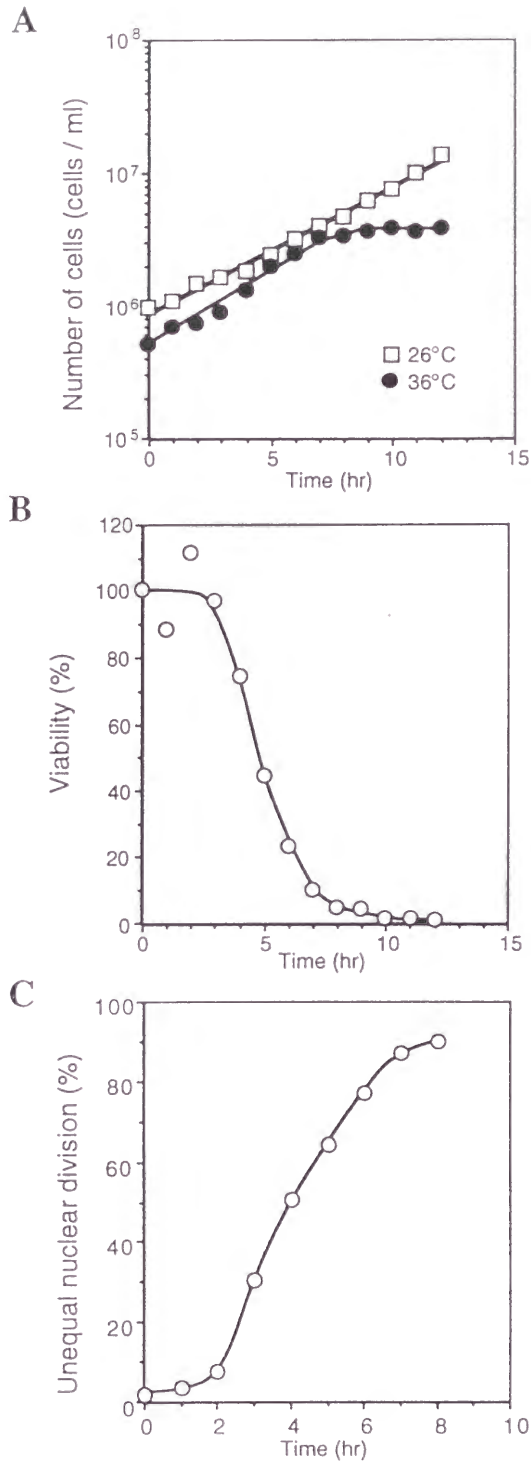


図7. 制限温度における *mis6* 変異体の細胞増殖、生存率および表現型出現率の変化

YPD培地で対数増殖期まで培養した *mis6-302* 変異体を制限温度に移し、経時的に細胞濃度 (A)、生存率 (B) および不均等核分裂を引き起こした細胞の頻度 (C) を測定した。(B) の生存率は適当数の細胞をプレート培地に広げ、許容温度で培養後コロニーを形成した細胞の頻度を測定した。(C) では、細胞を固定後DAPIで核を染色し、核分裂で2核になった細胞 (M期終期に相当する細胞) のうち明らかに姉妹核の大きさに違いがあるものの頻度を求めた。

細胞数は7時間目まで指数関数的に増加して約8倍になった。生存率は4時間目より下がり始め、7時間目には約10%、12時間目には1%まで低下した。不均等核分裂を示す細胞の頻度は3時間目より上昇し始め、8時間目には9割近くの細胞で不均等核分裂が起っていた。

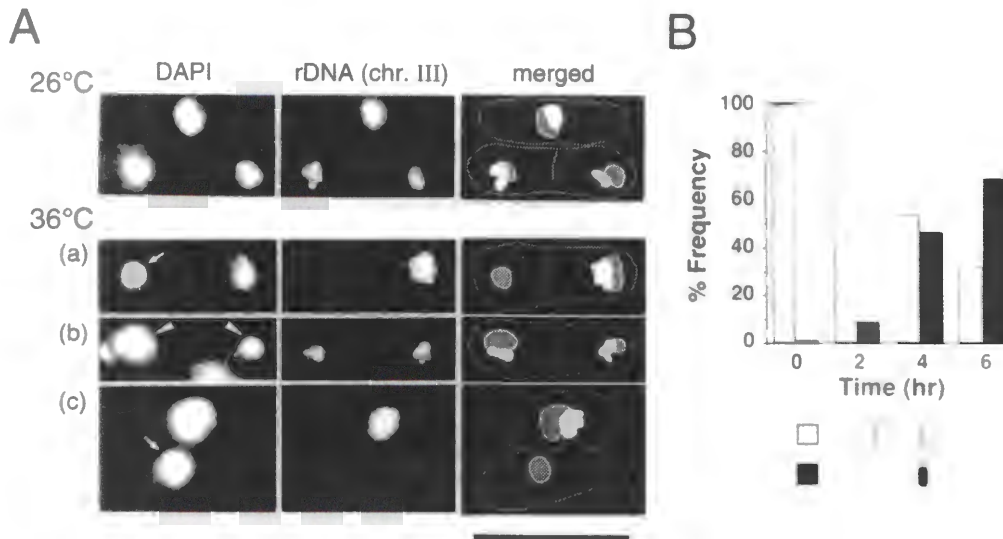


図8. *mis6*変異体 は染色体の不均等分配が起こっている

許容温度 (26度) あるいは制限温度 (36度) で培養 (YPD培地) した*mis6*変異体を固定し、rDNAをプローブとしたFISH法で第3染色体の分配の様子を解析した。rDNAは第3染色体両末端に反復して巨大なクラスターを形成している。

(A) 許容温度、あるいは制限温度で6時間培養後のFISH像。許容温度では、第3染色体は姉妹核に均等に分配されている。制限温度では(a)核分裂は起こっているにもかかわらず、一方の娘核しか第3染色体を含まない細胞、(b)第3染色体は両方の核に含まれるが、姉妹核の大きさに明らかな違いのある細胞が観察される。(c)は間期の細胞であるが第3染色体を含むものと、含まないものが見られる。バーは10 $\mu$ m。

(B) パネル (A) -(a)のように第3染色体の不均等分配が起こっている細胞の頻度を経時的に測定し、グラフ化した。4時間後より不均等分配の頻度が増加し、6時間後には約6割の細胞で不均等分配が起こっていた。

## 染色体不均等分配は制限温度に移してから2回目のM期におこる

次に *mis6* 変異体が細胞周期のどの時点に欠損があるのかを決定するため、以下のような実験を行った。まずエルトリエーションで *mis6* 変異株を G2 初期に同調した後、制限温度で培養を開始した。20 分間隔で経時的に細胞濃度、生存率、不均等核分裂の頻度を測定した結果を図9に示す。制限温度に移して約100-120分後に細胞数の倍加が始まり、隔壁をもつ細胞の頻度がピークに達した。この時点が、制限温度に移してから1度目のM期であるが、このとき生存率は低下しておらず（図9パネルA）、核分裂も正常であった（図9パネルC）。それに対し、220-240分後の2度目のM期には、生存率は急激に低下し、不均等核分裂を引き起こした細胞の頻度も増加した。この結果は、*mis6* 変異体では制限温度に移してから2回目のM期に異常が生じ、不均等な染色体分配が起こることを示唆している。パネルDには2度目のM期のDAPI染色像を示した。なお、この時点で娘核の大きさに著しい差異は見いだされたが、既知のM期異常変異体で観察されるような「過凝縮染色体」や「引き延ばされた染色体」といった表現型（例えばYanagida 1998）は観察されなかった。*mis6* 変異体では、染色体凝縮や紡錘体形成、中期-後期遷移といった事象は一見正常に起こるようである。

## *mis6* 変異体で染色体の不均等分配が起こるためには制限温度でG1/S期を通過することが必要である

先に述べたように、G2期に同調した *mis6* 変異体を制限温度に移しても最初のM期は正常で、2回目のM期以降に表現型が現れる。この結果は、変異体が表現型を示すためには制限温度でG1/S期を通過する必要があるという可能性を示唆している。その可能性を検討するために以下のような実験を行った。

分裂酵母は培地から窒素源を枯渇させるとG1期で停止する（Nurse and Bissett 1981）。そこで、まず窒素源を抜いた培地で *mis6* 変異株を培養してG1期に同調し、次いで窒素源を含む培地に戻して生育を再開させると同時に制限温度に移した。経時的に生存率、表現型の頻度およびDNA含量を測定した結果を図10に示した。DNA含量の推移から判断すると、窒素源を含む培地に戻してから3時間後にS期が進行し（図10パネルB）、4-5時間後に最初のM期が起こり細胞数が増え始める。表現型を観察すると、G2期から制限温度に移した先の結果とは異なり、最初のM期でも高頻度で染色体の不均等分配が起こっていた（図10パネルA）。この結果は、変異体がM期に不均等染色体分配を引き起こすには、直前のG1/S期を制限温度で通過

することが必要であるという仮説を強く支持する。しかしながら、変異型Mis6が失活するまでには時間がかかり、そのためエルトリエーションでの同調培養実験では初めのM期は正常であったのかもしれない。この可能性を検討するためにヒドロキシウレア (hydroxyurea;HU) を利用して次のような実験を行った。HUはヌクレオチドリダクテースの阻害剤であり、HUで細胞を処理するとヌクレオチド量が減少し、細胞周期はS期開始直後で停止する。

そこでまず*mis6*変異体をHU存在下、許容温度で3.5時間培養して、S期初期に同調した。次いでHUを加えたまま36度に移し、さらに3時間培養した。この間、細胞濃度は一定であったので細胞はS期で停止したままであったと考えられる。その後、制限温度を維持したまま培地を交換してHUを除去し、生育を再開させた。このときの生存率の変化、表現型の頻度を測定した結果が図11パネルAである。HU除去後1時間で1度目のM期が起こり (1stM)、3時間後に2度目のM期が起こった (2ndM)。この実験の場合は、制限温度で合計4時間培養したにも関わらず、1度目のM期には正常な核分裂が起こり、生存率も制限温度に移行する前と大差はなかった。すなわち、変異株を制限温度に長時間さらせば表現型が誘導されるというわけではなかった。2度目のM期になると不均等核分裂の頻度が増大し、生存率も低下した。

以上の結果を総合すると、*mis6*変異体で染色体不均等分配が起こるためには、制限温度でG1/S期を通過することが必要であると結論できる。これは野生株のMis6タンパクがG1/S期に何らかの機能を果たしている可能性を示唆している。上述のように変異株をHUで同調した場合は一度目のM期は正常であったので、Mis6はS期の開始点かそれ以前に機能していると思われる (図11パネルB参照)。

## *mis6*<sup>+</sup>遺伝子の単離

温度感受性の相補能を利用して*mis6*遺伝子が単離され、その塩基配列が決定された (高橋 博士論文)。*mis6*遺伝子は生育に必須な672アミノ酸の新規のタンパク質をコードしていた (図12)。*mis6*遺伝子破壊株は、制限温度での温度感受性変異株と同様に、染色体不均等分配を引き起こして致死となった (高橋 博士論文)。*mis6-302*変異体ゲノムより変異*mis6*遺伝子を単離し塩基配列を決定したところ、135番目のアミノ酸がグリシンからグルタミン酸へと変化していた。遺伝子組み換えを利用して野生株ゲノムの*mis6*遺伝子の135番グリシンをグルタミン酸に置換すると、温度感受性を示し不均等核分裂を起こすようになったので、この変異が温度感受性の原因であると考えられる。タンパクデータベースに対しホモロジー検索を行ったところ、Mis6のN末端350アミノ酸と相同性を有するタンパクが哺乳類 (Norway ratおよびhuman) に見つかった (図13)。Norway rat LRPR1遺伝子は、濾胞刺激ホルモンによって転写が誘導される遺伝子

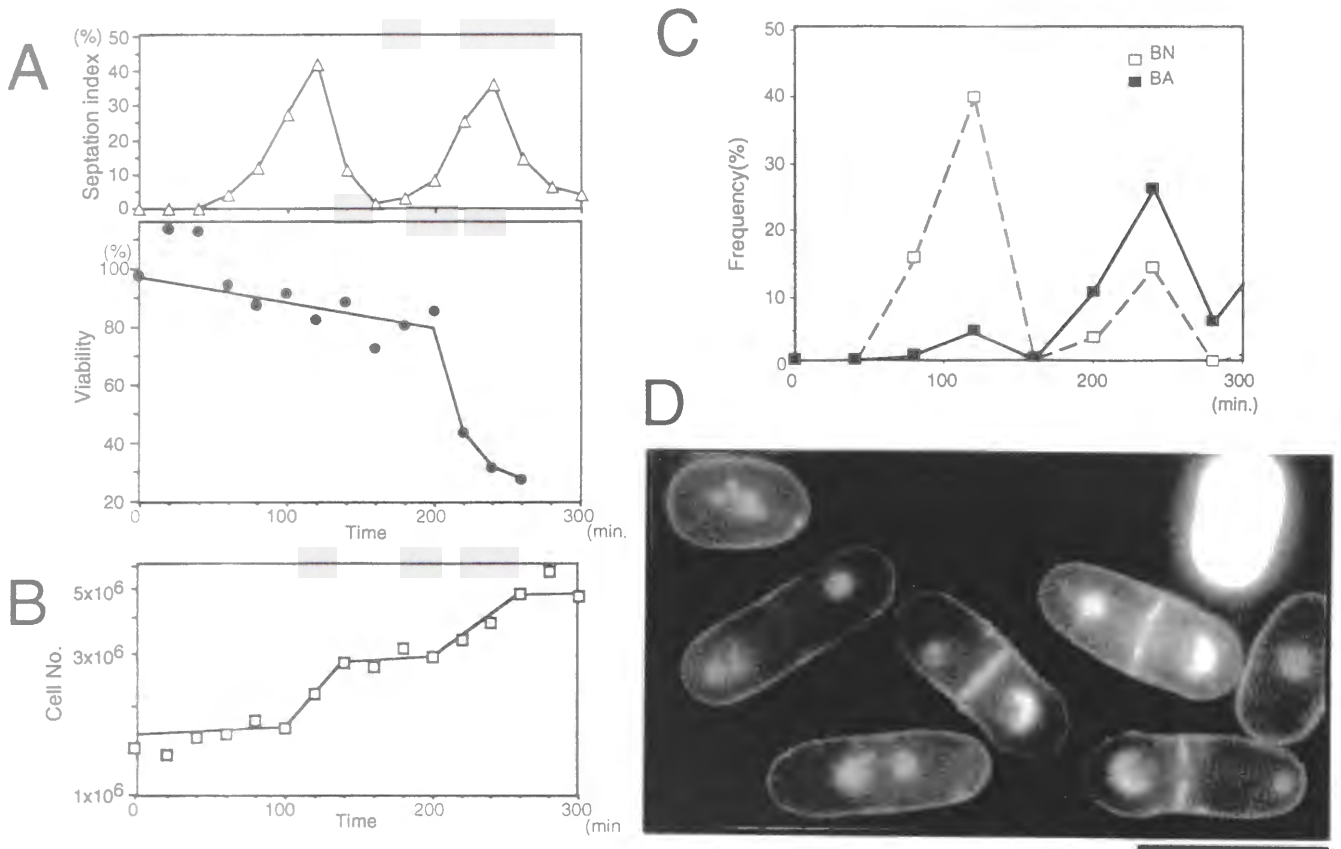


図9. G2期に同調した *mis6* 変異株を制限温度に移すと、2度目のM期に致死となる

エルトリエーション法によってG2期に同調した *mis6* 変異体を制限温度に移し、経時的に (A) septation指数と生存率、(B) 細胞濃度、および (C) 不均等核分裂の頻度を測定し、グラフ化した。(D) には240分後のDAPI染色像を示した。septation指数は細胞隔壁を有する細胞 (すなわち細胞質分裂期の細胞) の頻度で、同調率の指標となる。そのピークはおおよそM期後期からG1期に相当する。

(A) 生存率は1度目のM期には高いままで、2度目のM期に急速に低下する。(C) 姉妹核の大きさが正常な2核の細胞 (Binuclear, Normal size; BN) と、娘核の大きさが異常な2核の細胞 (Binuclear, Abnormal size; BA) の頻度を測定した。核分裂後の姉妹染色体の大きさに違いが生じる細胞は1度目のM期にはほとんど現れず、2度目のM期になると出現する。

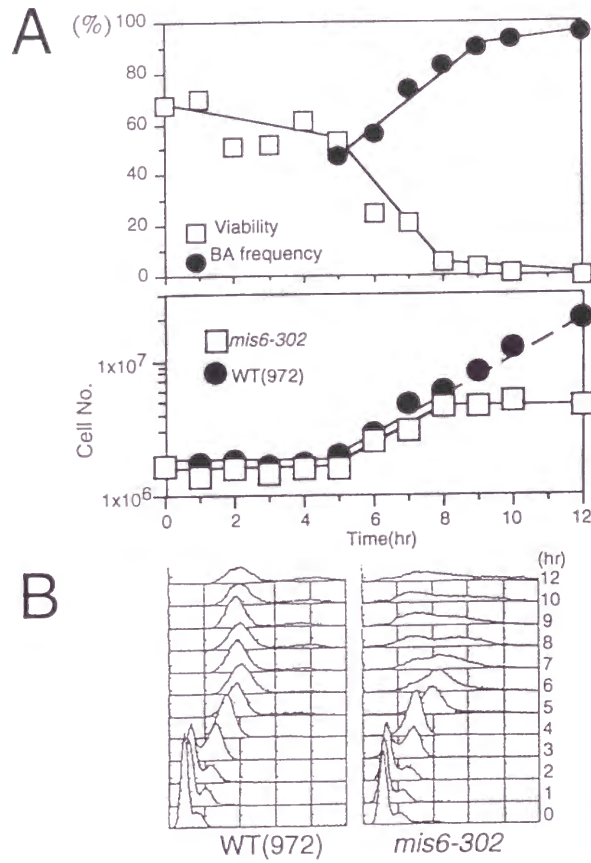
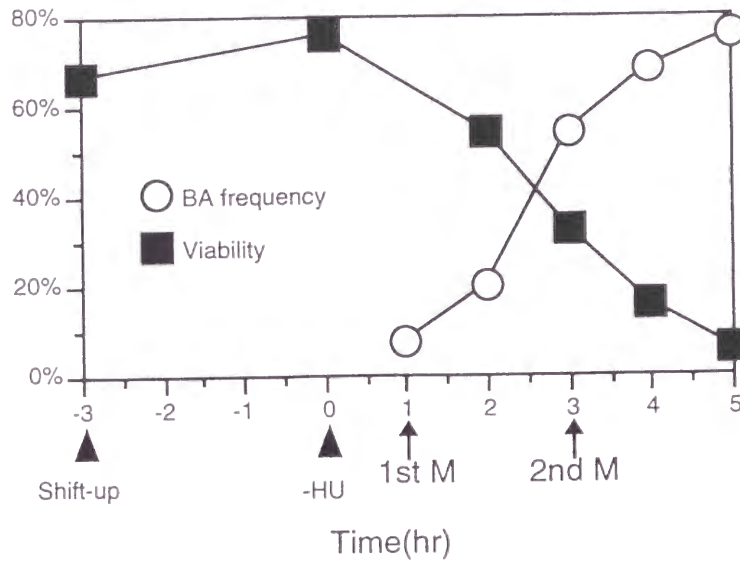


図10. G1期に同調した*mis6*変異株を制限温度に移すと、1度目のM期に致死となる

窒素源を除いたEMM2培地で培養した*mis6*変異株を窒素源を含む培地に移すと同時に制限温度で培養した。経時的に生存率、不均等核分裂の頻度、細胞濃度を測定した (パネルA)。(B)にはFACSscanによるDNA含量測定の結果を示した。野生株および変異株ともに、培養開始3時間後よりDNA合成が開始した。

細胞数の増加は5時間後より開始した。したがってこの点が1回目のM期に相当すると考えられる。この点より生存率の低下が始まり、不均等核分裂の頻度も増加した。

A



B

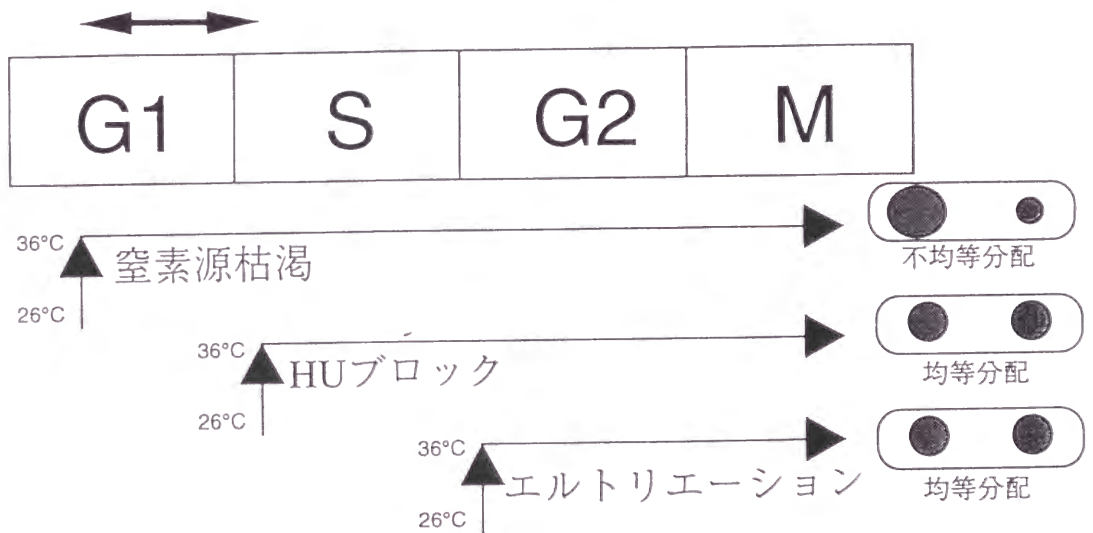


図11. S期停止した*mis6*変異体を制限温度で培養しても、1回目のM期は正常である

(A) 許容温度で対数増殖期初期まで培養した*mis6*変異体の培養液にDNA合成の阻害剤HU (ヒドロキシウレア)を加えて3時間30分培養を続け、S期初期に停止させた。HUを加えたまま制限温度に移し(-3時間)、さらに3時間培養を続けた。その後、制限温度(36度)を維持したまま培地を交換してHUを除去し成育を再開させた(この点を0時間とする)。細胞周期は半ば同調的に進行し、1回目のM期は1時間目(1st Mと表記)、2回目のM期は3時間目(2nd M)に訪れた。■は生存率を示し、○は不均等核分裂の頻度を示す。

1度目のM期には生存率はそれほど低下せず、不均等核分裂を示す細胞の頻度も低かった。ところが2回目のM期になると生存率の低下が始まり、不均等核分裂を引き起こした細胞の頻度も増加した。

(B) 図9-11の結果のまとめ。窒素源枯渇でG1に同調した変異株を制限温度で培養すると不均等核分裂が起こるが、HUブロックでS期、エルトリエーションでG2期に同調した変異株を制限温度で培養しても最初のM期は正常である。変異株で染色体不均等分配が起こるためには、G1/S期(両向き矢印で示した部分)を制限温度で通過することが必須である。

として単離されたが (Slegtenhorst-Eegdeman et al. 1994)、そのタンパク質の分子機能は明らかではない。このLRPR1とMis6が機能的に相同なタンパクであるかどうかについては後ほど検討する。*mis6* 遺伝子産物を同定するために次のような実験を行った。

*mis6* のC末にHA (インフルエンザ ヘマグルチニン) エピトープ (Field et al. 1988) を3コピー付加した遺伝子 (*mis6*-HA遺伝子) を作成した。ゲノム上の野生型*mis6* 遺伝子を *mis6*-HA遺伝子で置換した株 (*mis6*-HA組み込み体、図14パネルA)、あるいは多コピーベクターにつないだ*mis6*-HA遺伝子を持たせた細胞株からタンパク抽出液を調製してSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、抗HAモノクローナル抗体 (12CA5) によるウエスタンブロッティングを行った。その結果、約66kdのバンドが特異的に検出された (図14パネルB)。多コピーで導入した場合はそのタンパク量が増量していたので、このバンドがMis6-HAタンパクに由来するものと結論した。Mis6-HAの推定分子量は約80kdであるので、見かけの分子量を減少させるような何らかの修飾あるいは部分切断を受けているのかもしれない。

HAエピトープを付加した*cut2* 遺伝子 (*cut2*-HA遺伝子) をゲノム上に組み込んだ細胞 (*cut2*-HA組み込み体) と *mis6*-HA組み込み体からそれぞれ細胞抽出液を調製して抗HA抗体によるウエスタンブロットを行い、細胞内のCut2とMis6のタンパク量を比較したところ、Mis6のタンパク量はCut2のおよそ4分の1であった (データは示さない)。Cut2は1細胞あたりおよそ8000分子含まれているので (Funabiki et al. 1996)、Mis6は1細胞あたり約2000分子存在すると見積もられる。

## Mis6タンパク質は動原体領域に局在する

タンパクの細胞内局在についての情報は、その分子機能を考える上でしばしば重要な示唆を与える。そこでMis6タンパク質の細胞局在を決定するために、C末端にGFP (green fluorescent protein、Chalfie et al. 1994) を付加した*mis6* 遺伝子 (*mis6*-GFP遺伝子) を作成した。GFPはクラゲ (*Aequorea victoria*) から単離された蛍光タンパク質で、青色の光を吸収し緑色の蛍光を発する。*mis6*-GFP遺伝子は*mis6* 変異体の温度感受性を相補したので、GFPを付加してもMis6タンパク質は機能を失わないと結論した (図18)。そこで多コピーの*mis6*-GFP 遺伝子を野生株細胞に導入して、蛍光顕微鏡観察によりMis6の細胞内局在を観察した。結果を図15パネルAに示した。間期 (G2期) の細胞ではMis6は核の辺縁部の一点に集まっていた (図15パネルA 1段目)。核分裂期初期と思われる細胞では直線上に並んだいくつかの点として観察され (図15パネルA 2段目)、分裂後期と思われる細胞では分裂中の染色体の両末端に集まっていた (図15パネルA 3段目)。パネルBには制限温度で4時間培養した*cdc25*、*cdc10* 変異体でのMis6の局在を示した、両変異





```

Mis6      12: IEEGIQWIKKNSENLSSSKTILAR-IQQFHKLCSEVGLNQHSISSGLDVLISKRTHTFDKNHVQLLIKCLYPNELISQTI
LRPR1     63: LQTAVEYFQKGPKKASLSKDSVICEKHKTVENVAWNNGLAPEAIDILNVALSCK--FGNALSTRILKCMIPETHGSEDS
huLRPR1   66: LQMAVGYPEKGIKASQNKDKTICEKHKTVENVAWKNGLASEEIDILNIALSGN--FGNAVNTRILKCMIPATVISEDS

```

```

IAIRIISLDPHCILRCASYAIQAKLLNWLIVHYEPLDGNLLCRYGVLPHFLDFLTLRPTISNLLVLLTKHYEVASFRIH
SVVKAVSWLCV-C-KCSGNTKVLFYRWLVAMFDEIDHKKQINSLYGFVVSILQDDTLCPYVCHLLMLTKKENVKPFRAR
SVVKAVSWLCV-C-KCSGSTKVLFYRWLVAMFDEIDRKEQINLLYGFVVSILQDDALCPYVCHLLMLTKKENVKPFRVR

```

↑

```

QLLALYQKPCNTADSYLLALILTYKQHPEDVIVGSIYTRKHGQSVRLDSE-WIAATKAILNRQS---EDVPLE---TWS
KGLDILQAKMG--MOPHLQALLSLYKFFAPTLISVSLPVRKKIFFNNSKNLWTPALLAVKLRNQGIFPEPLKIQLGPTSGR
KGLDILQAKMG--MOPHLQALLSLYKFFABALISVSLPVRKKIYLQNSENLWKTALLAVKQRNRGSPPEPLKIMLGPANVR

```

```

SEKRR-RQSSLTPDITM-KNTSSSY-----SLEELTSVQMGIVYEKIVFPSRIAIV---LAKSLFLIF---LPT
SLARKWNYHSVIPAVNSAKK-----ECREKMSLFDYLSNDRSLPVEQLQSPFQLLNIHCLELPSQMSVNLNSSGLL
PLKRWNSLSVIPVLN-----SSSYTKECGKKEMSLSDCLNRSGSPFLEQLQSPFQLLQNIHCLELPSQMGSVLNNSGLL

```

KNKNVYYSRLDEWLHITQNYGLALRSGSNNOEPEVLHLLYKY : 345

HYVNCVK---DESILLRLSYWL---SQTLOEECVWYNMNDY : 402

HYINCVR---DEPVLLRFHWL---SQTLOEECIWYKVNNY : 408

図13. Mis6はほ乳類LRPR1タンパク質と相同性を示す

データベース検索によりMis6と相同性を示すタンパクを検索したところ、ほ乳類（Norway ratおよびヒト）で単離されているLRPR1タンパクと弱いながらも相同性を示すことが明らかとなった。N末側約350アミノ酸で27%が同一であった。LRPR1（Leucine rich primary response gene 1）は、濾胞刺激ホルモンによって転写が誘導される遺伝子で、タンパクは比較的低イソチン残基に富む。分子機能については明らかではない。

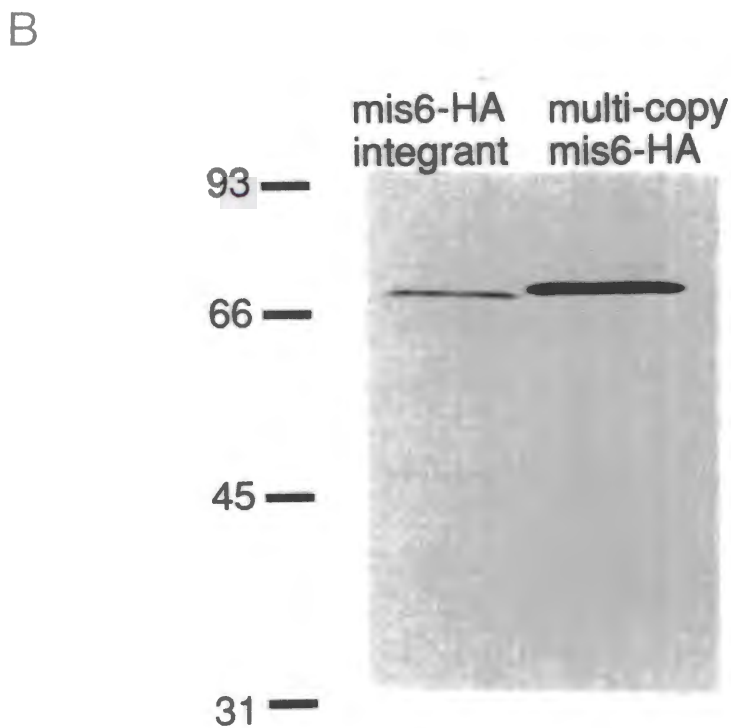
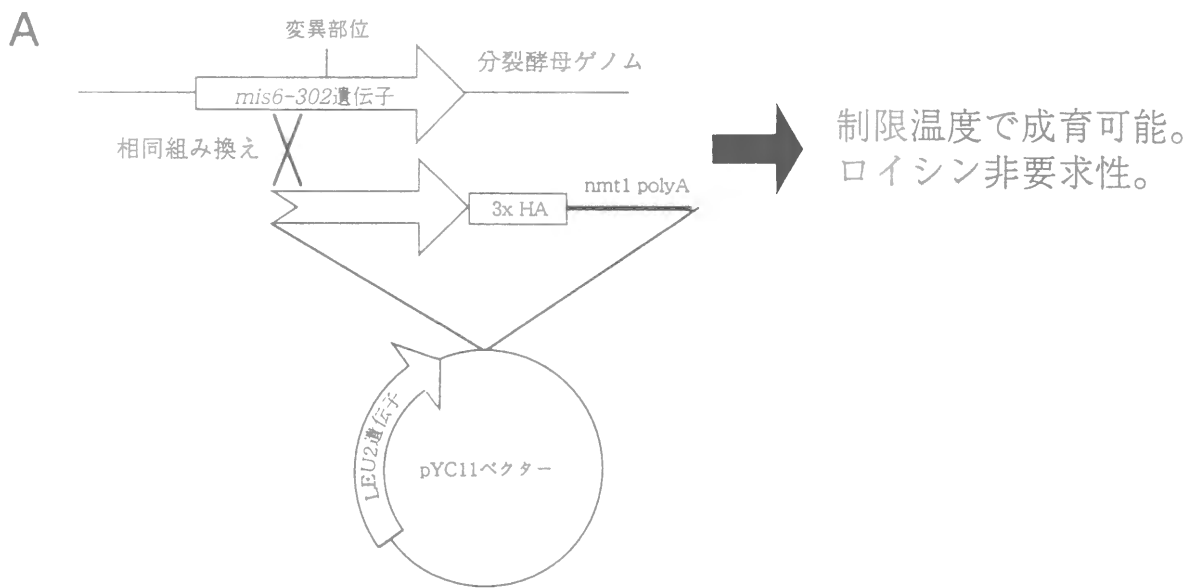


図14. ウェスタンブロット法によるMis6-HAタンパク質の検出

(A) *mis6<sup>+</sup>*-HA遺伝子組み込み株作製の戦略。5'末端を欠いた*mis6*遺伝子のC末にHA（インフルエンザヘマグロニンエピトープ）を付加した遺伝子断片を作製し、組み込みベクターpYC11につなぎ、*mis6*変異株に形質転換した。相同組み込みによりプラスミドがゲノム中に組み込まれた株は温度感受性が相補され、ロイシン非要求性となる。

(B) *mis6<sup>+</sup>*-HA遺伝子組み込み株（*mis6*-HA integrantと表記、左レーン）、および多コピープラスミドにつないで多コピーの*mis6*-HA遺伝子を導入した株（multi-copy *mis6*-HA、右レーン）からタンパク抽出液を調製し、10%SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、抗HAモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法により、Mis6-HAタンパクを検出した。66kDの分子量マーカー付近にバンドが検出された。多コピー導入した株ではバンドの強度が増加していた。このタンパク質の見かけの分子量はゲルの調製により多少変動するものの、約66kdと見積られる、野生型株ではこのようなバンドは検出されなかった（データは示さない）。

体は36度で培養すると細胞周期がそれぞれG2、G1期で停止する（Nurse et al. 1976、Russell and Nurse 1986、Simanis and Nurse 1989）。いずれの場合も、Mis6は細胞中央の一点に集まっていた。

次にM期のMis6の挙動を詳細に解析するために、免疫染色法による微小管染色と組み合わせて、Mis6-GFPの局在を観察した（図16）。免疫染色の影響でバックグラウンドノイズが高まっていたが、その局在は明らかに決定できた。分裂酵母ではM期には直線状の紡錘体が形成される。M期初期の短い紡錘体を持つ細胞では、Mis6は2-3の点にわかれ、紡錘体上に散在していた（細胞2）。紡錘体がもう少し伸びた分裂中期と思われる細胞では、Mis6は紡錘体中央に集まっており（細胞3）、後期Aに相当すると思われる細胞では、Mis6は紡錘体の両極に移動しつつあるように見え（細胞4、5）、後期Bの細胞では紡錘体の両端の2点に集まっていた（細胞6）。以上のMis6の局在の変化は、以前にFISH法で示された動原体の挙動と酷似している（Funabiki et al. 1993、図26）。そこで、さらにM期停止変異株中でのMis6の局在を決定した（図17）。この場合はゲノム中の*mis6*遺伝子を*mis6*<sup>+</sup>-GFP遺伝子で置換した株（*mis6*<sup>+</sup>-GFP組み込み体）を用いた（作製法は図14パネルAと同様）。ここで使用した*nda3*変異はβチューブリンの低温感受性変異で、制限温度では紡錘体が形成できずM期中期で停止する（Hiraoka et al. 1984）。染色体DNAは凝縮した3本の棒状構造として観察される。このときMis6はそれぞれの染色体の上に1点ずつ分かれて存在していた。以上のような一連の結果から、Mis6はそれぞれの染色体の動原体領域へ特異的に局在しているものと結論した。分裂酵母で特異的に動原体へ局在するタンパクとしてはこれが最初の例である。

## C末154アミノ酸を欠失してもMis6は機能する

Mis6の動原体局在および機能に必要な領域を限定するために、図18に示したような一連のMis6欠失変異を作製してGFPを融合し野生株に導入してその局在を決定した。

全長672アミノ酸にGFPを融合したもの（プラスミド2）は先に述べたように動原体に局在した。プラスミド3はMis6-302変異型タンパク質にGFPを融合したものである。変異型Mis6-GFPは、許容温度26度ではわずかに動原体に局在していたが、33度、36度ではほとんど局在していなかった。許容温度でも野生型Mis6-GFPに比べれば、蛍光強度は減少していた（データは示さない）。今回の実験条件ではゲノム上の野生型*mis6*遺伝子が発現しているはずなので、変異型Mis6は野生型Mis6によって動原体領域から排除されたのかもしれない。プラスミド4は、C末154アミノ酸を欠失したMis6（1-518）にGFPを融合したものである。この欠失Mis6タンパクは、全長タンパク質と同様に動原体に局在していた、さらにC末領域を削ったプラスミド5、6あるいはN末を欠失したMis6タンパク質は動原体には局在できず、細胞全体に拡散してい

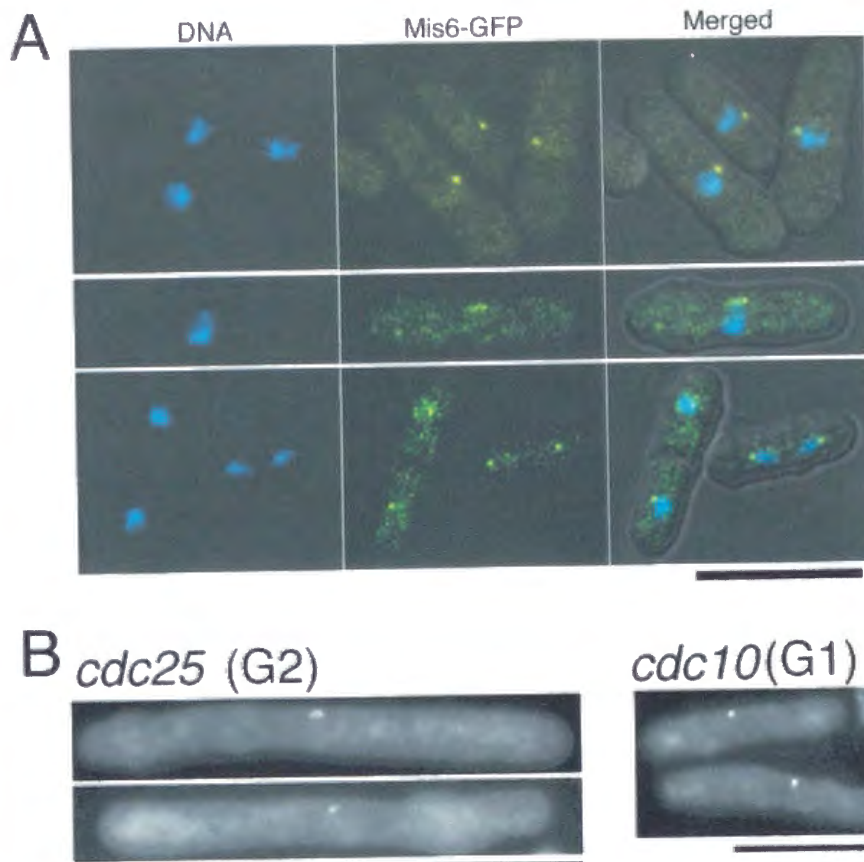


図15. Mis6-GFPタンパク質の細胞内局在

Mis6タンパク質のC末端にGFPを付加した*mis6-GFP*遺伝子を作製し、多コピーベクターにつないで、野生株（パネルA）、および*cdc*変異株（パネルB）に導入した。メタノール固定後、蛍光顕微鏡によって観察した。

(A) *mis6-GFP*遺伝子を導入した細胞を固定後、DNAを染色し、局在を観察した。Mis6-GFPの発する蛍光は微弱であったため（肉眼でかろうじてとらえられる程度）、デジタル処理によりコントラストを補正後、疑似着色した。パネル上段は間期の細胞。Mis6は半球状の核の辺縁部の一点に集まっている。中段はM期初期～中期と思われる細胞。Mis6はいくつかの点に分割し、直線上に並んでいる。下段はM期後期の細胞。Mis6は分裂中の染色体の両末端（紡錘極体があると思われる位置）に集まっている。

(B) 細胞周期停止変異株 (*cdc*) にMis6-GFPを導入し、制限温度で4時間培養後、固定し、局在を観察した。G2期で止まる*cdc25*変異株、G1期で止まる*cdc10*変異株いずれも細胞中央の核の辺縁部と思われる位置に集まっていた。

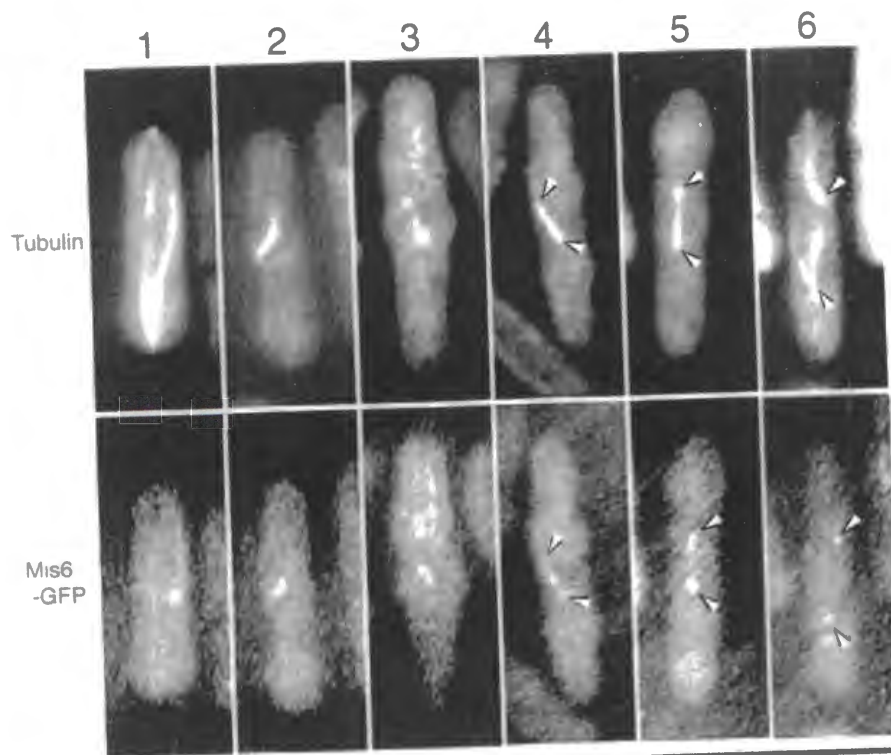
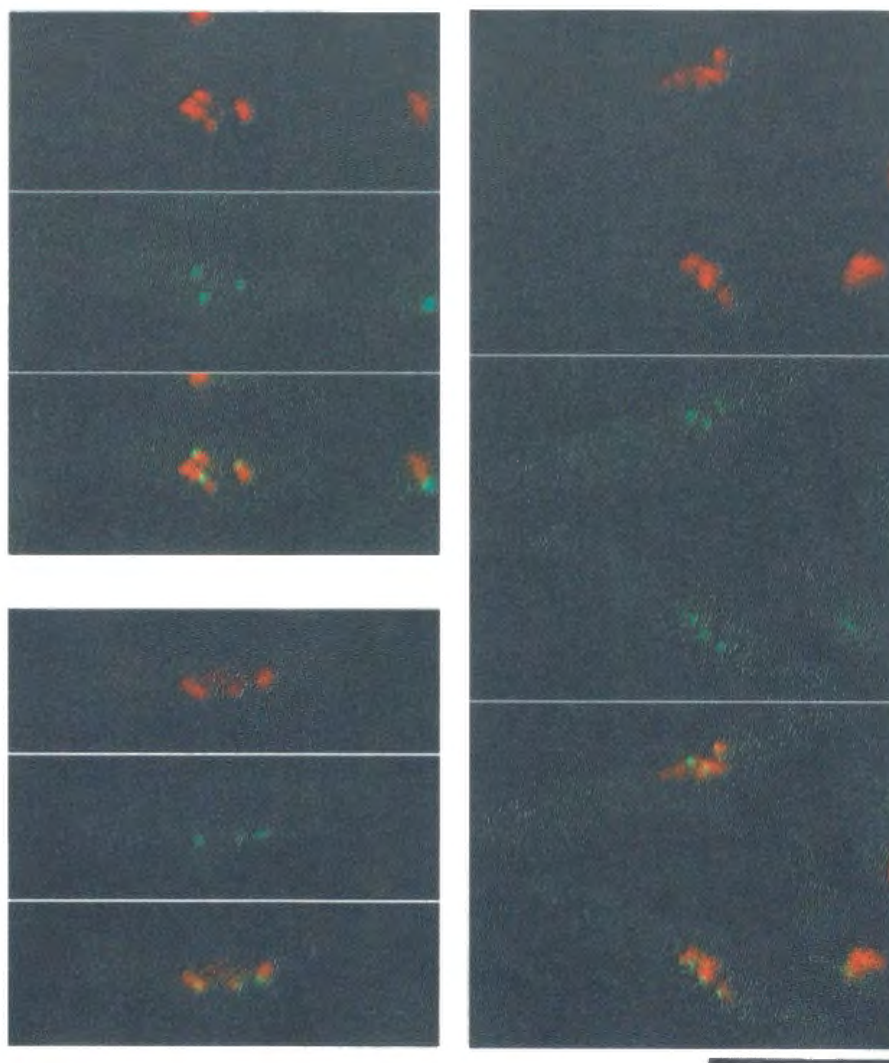


図16. M期におけるMis6の局在

多コピーのMis6-GFPを導入した野生株をメタノール固定し、免疫染色法で微小管を染色した。細胞1は間期の細胞。細胞中央の一点に集まっている。2はM期初期の細胞。Mis6は2~3点に分裂し、紡錘体上に並んでいる。3は中期と思われる細胞。Mis6は紡錘体中央に集結している。4、5は後期Aの細胞。紡錘体両端のSPBと思われる位置を矢頭で示した。Mis6は4~6点に分裂し、SPBに向かって紡錘体上を移動しているように見える。6は後期Bの細胞。Mis6は紡錘体の両端に集まっている。バーは10 $\mu$ m。

*nda3 mis6<sup>+</sup>-GFP* 20°C 8hr



Red: DNA  
Green: Mis6-GFP

図17. M期中期変異株中でのMis6の局在

*nda3*は $\beta$ チューブリンの低温感受性変異体で、制限温度では紡錘体が形成できずM期中期で細胞周期が停止する。ゲノム中の*mis6*遺伝子を*mis6-GFP*遺伝子と置き換えた株を作製し、かけあわせにより*nda3*変異を導入した。制限温度で8時間培養後（YPD培地）、固定しRNaseで処理した後、ヨウ化プロピジウムでDNAを染色した。蛍光撮影後、デジタル処理により疑似着色した。赤はDNA、緑がMis6-GFPを表す。

*nda3*変異株では、制限温度で8時間培養すると、3本の凝縮染色体が核内に散らばっているような細胞が観察される。この時Mis6は3つの点に分かれており、それぞれの染色体に一点ずつ存在していた。バーは10  $\mu$ m。

るようであった。

次にこれらのプラスミドを *mis6* 変異株に導入して36度で培養し、コロニー形成能を回復させるかどうかを検定した。全長Mis6を導入した場合以外に、動原体に局在できるMis6 (1-518) が変異株の温度感受性を相補した。変異型タンパク質も多コピーで導入すると、やや弱いながらも温度感受性を相補した。後述するが、変異型Mis6タンパクは不安定なので、増量することで不安定性を補うことができるのかもしれない。プラスミド5は変異株へ安定に導入できなかった。Mis6 (1-392) 欠失タンパクは変異株特異的に毒性を示すらしい。N末を欠くタンパク質は大量発現すると、わずかにコロニー形成を阻害した(プラスミド7、8)。なお野生型全長Mis6は大量発現しても、コロニー形成を阻害することはなかった(データは示さない)。

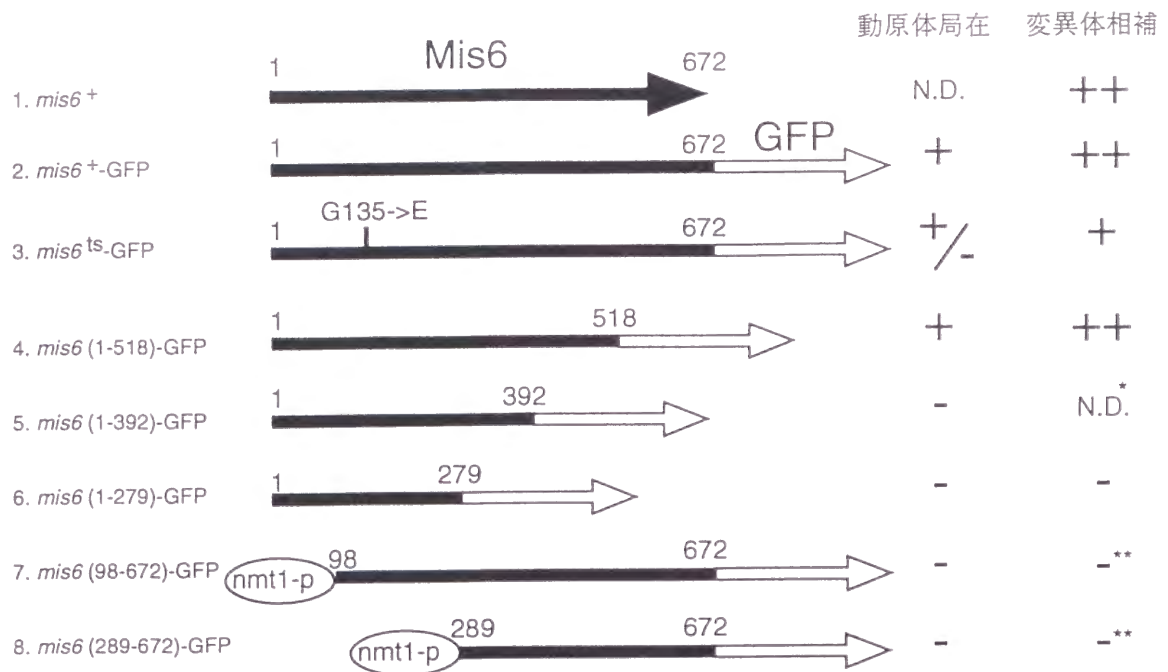
以上の結果より、Mis6の動原体局在および温度感受性変異株の相補にはC末154アミノ酸は不要であることが明らかとなった。また動原体に局在できない欠失タンパクが変異株を相補することはなかった。これは、Mis6が機能を発揮するためには動原体領域に結合することが必須であることを示唆している。

## 分裂酵母Mis6と哺乳類LRPR1の相同性についての検討

Mis6と哺乳類LRPR1 (leucine-rich primary response gene 1) は弱いながらも有意な相同性を示した(N末側約350アミノ酸で27%が同一)。LRPR1遺伝子は、Norway ratのセルトリ細胞(Sertoli cell)で濾胞刺激ホルモン(Follicle stimulating hormone;FSH)に特異的に応答して発現誘導されるmRNAとして同定された(Slegtenhorst-Eegdeeman et al. 1995)。LRPR1タンパクの分子機能については分かっておらず、また細胞内での局在も決定されていない。LRPR1も分裂酵母Mis6と同じく動原体に局在し、同様の機能を果たしているのだろうか?そこで、Mis6とLRPR1の機能的関連性を調べるため、酵母およびヒト培養細胞中で強制発現したLRPR1の局在および細胞成長に対する影響を調べた。

分裂酵母の *nmt1* 遺伝子のプロモーターは培地中のチアミンの有無で転写活性化レベルが制御される(Maundrell 1993)。すなわちチアミン存在下では転写量は低く抑えられているが、チアミンを除去するとその転写活性は数百倍に増加する。この *nmt1* プロモーターにNorway rat LRPR1 cDNAをつなぎ(*nmt1p*-LRPR1遺伝子)、それを多コピーベクターにのせたプラスミド(*pREP1*-LRPR1)を作成して野生株あるいは *mis6* 変異株に導入した。制限温度(36、33度)では、*nmt1*-LRPR1はチアミン存在・非存在どちらの条件でも *mis6* 変異株の温度感受性を相補できなかった(データは示さない)。チアミン存在下では野生株、*mis6* 変異株ともに生育に影響を与えなかった(図19パネルA)。ところが、チアミン非存在





\*: 変異株中で毒性があるらしく、安定な形質転換体が得られなかった。  
 \*\*: 大量発現するとコロニー形成を弱く阻害した。

図18. C末154アミノ酸を欠失したMis6タンパク質は動原体に局在する

上記のようなGFP融合Mis6欠失変異遺伝子を作製し、多コピーベクターにつないだ。プラスミド1~6は遺伝子本来のプロモーターが付加されており、7、8には*nmt1*遺伝子プロモーターが付加されている。*nmt1*プロモーターによる転写活性はチアミン存在下では低く抑えられているが、チアミンを除去すると数百倍に増加する (Maundrell 1993)。

これらのプラスミドを野生株に導入し、その局在を観察したところ、野生型全長Mis6およびC末154アミノ酸を欠失したMis6 (1-518) が動原体に局在した。3は変異型Mis6にGFPを付加したものであるが、許容温度ではわずかに動原体に局在していたが、制限温度ではほとんど局在していなかった。5~8は動原体には局在せず、細胞全体に拡散していた。

*mis6*変異体に導入して、温度感受性の相補を調べたところ、全長Mis6以外にMis6 (1-518) が相補した。変異型タンパク質も多コピーで導入すると、変異株の温度感受性をやや弱いが相補した。

条件でLRPR1タンパクを過剰発現させるとコロニー形成が阻害された。野生株に導入した場合には、コロニーの大きさがベクターを導入したコントロールよりも明らかに小さくなった。*mis6*変異株では阻害効果が著しく、26℃で4日間培養してもコロニーが全く形成されなかった。そこで野生株細胞に*nmt1p*-LRPR1を導入し、チアミン除去後33度で16時間培養してLRPR1タンパクを過剰発現させ、DAPI染色により核形態を観察した(図19パネルB)。核が長く引き伸ばされたようなものや、核形態が変形したような細胞が観察された。しかしながら、不均等核分裂は生じていないようであった。

次にGFPをLRPR1のC末端に付加して*nmt1*プロモーターに接続した遺伝子を作成し、酵母細胞に導入して局在を観察した。チアミン除去後26度で16時間培養し、その局在を調べた。この培養条件では、*nmt1*プロモーターによるタンパク発現量は中程度に抑えられていると思われる。このとき、図20に示したように核クロマチン領域が強く染色された。動原体が特異的に染色されることはなかった。細胞質もGFPで染色されており、いくつかの細胞では顆粒状の染色パターンが見られた。20時間培養後には(このときタンパクの発現量は最大に達していると思われる)、LRPR1はクロマチン領域よりも細胞質に多く存在しているようであった。細胞質のLRPR1は巨大な塊を形成していた。

次いで培養細胞中でのLRPR1タンパク質の局在を免疫染色法で観察した。Norway rat LRPR1遺伝子のN末端にmycエピトープを付加し、CMV (cytomegalovirus) プロモーターに接続した遺伝子(CMV-LRPR1)を作成し、トランスフェクション法によりHela細胞(ヒト培養細胞)に導入した。トランスフェクトしたCMV-LRPR1遺伝子がHela細胞の成育を阻害することはなかった。トランスフェクションして1日後にホルムアルデヒドで固定し、抗mycモノクローナル抗体(9E10)を用いた免疫染色法によりLRPR1タンパク質の細胞内局在を決定した。

図21に示すとおり、細胞質領域が細かい粒子状に強く染色された。核領域は染色されなかった。有糸分裂期の細胞では、染色体領域以外の部分が染色された。図22には共焦点レーザー顕微鏡による観察像を示した。この場合はC末端にHAエピトープを付加したLRPR1遺伝子を用いた。パネルAは1 μm間隔の光学切片像である。やはり核や染色体領域をのぞいた細胞質が強く染色された。パネルBは両眼立体視による立体再構築像であるが、核内には染色は観察されない。以上の結果より、ヒト培養細胞(Hela細胞)で発現させたLRPR1タンパクは核や染色体あるいは動原体上には全く局在せず、細胞質中に広く存在していることが明らかとなった。

以上のようにLRPR1タンパク質は*mis6*変異の温度感受性を相補することはなかった。またHela細胞中で強制発現した場合は、LRPR1は細胞周期を通じて細胞質に存在しており、むしろ核クロマチン領域から排除されているように見えた。これらの結果を踏まえるとLRPR1は本来は細胞質に存在すべきタンパク質で、動原体局在のMis6とは異なる生体機能を担っているのかもしれない。しかしながら、LRPR1の発現は組織

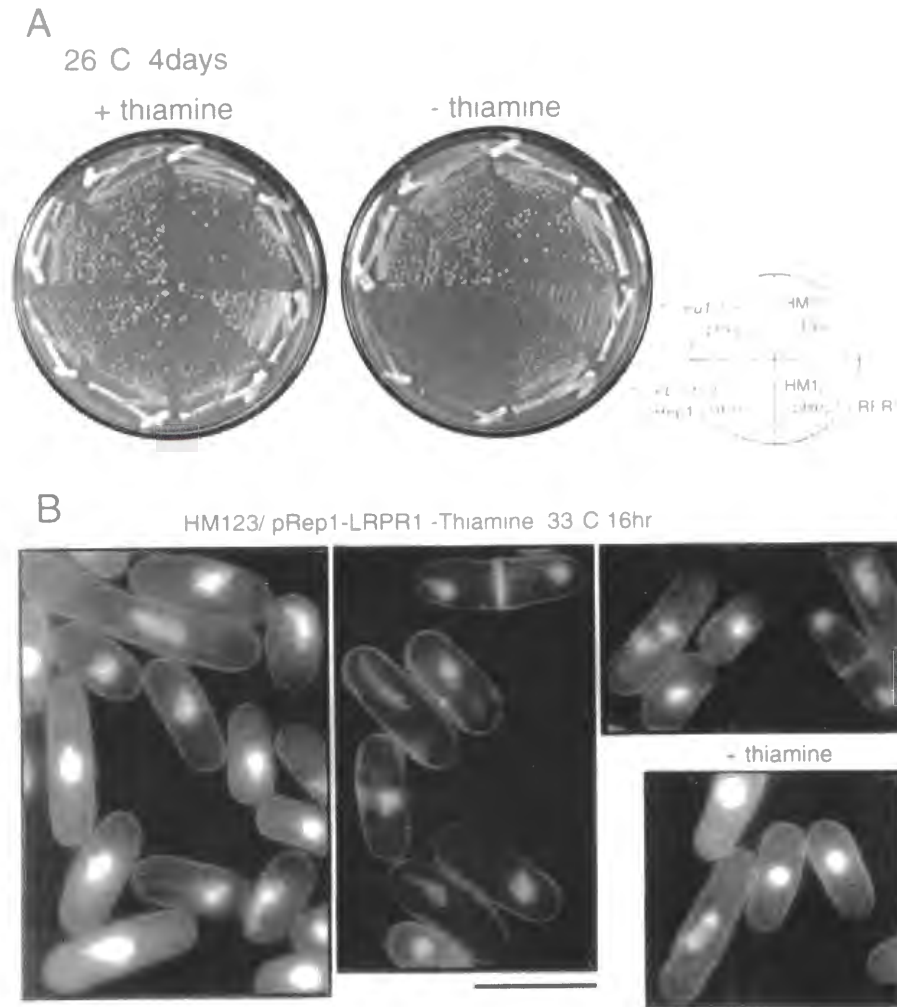


図19. ほ乳類LRPR1は分裂酵母*mis6*変異体の成育を阻害する

チアミンによって発現を抑制できる*nmt1*プロモーターにLRPR1遺伝子をつなぎ、多コピーベクターのせて分裂酵母細胞に導入した。pREP1は*nmt1*プロモーターを含むベクターである。

(A) 野生株 (HM123) および*mis6*変異株に*nmt1*-LRPR1あるいはベクターのみを導入し、チアミンを含むEMM2培地、あるいは含まない培地で培養した(26度4日)。なおLRPR1は*mis6*変異の温度感受性を相補できなかつた(データは示さない)。チアミンを含まない培地中では、LRPR1は野生株、*mis6*変異株の成育を阻害した。阻害効果は*mis6*変異株で顕著であった。

(B) 野生株でLRPR1タンパク質を過剰発現したときのDAPI染色像。チアミンを含まないEMM2液体培地で16時間培養後(33度)、固定してDNAを染色し、核形態を観察した。核の一部が引き延ばされたような細胞が多く観察された。チアミンを加えてLRPR1の発現を抑圧したコントロール(パネル右下)ではそのような像は観察できなかつた。

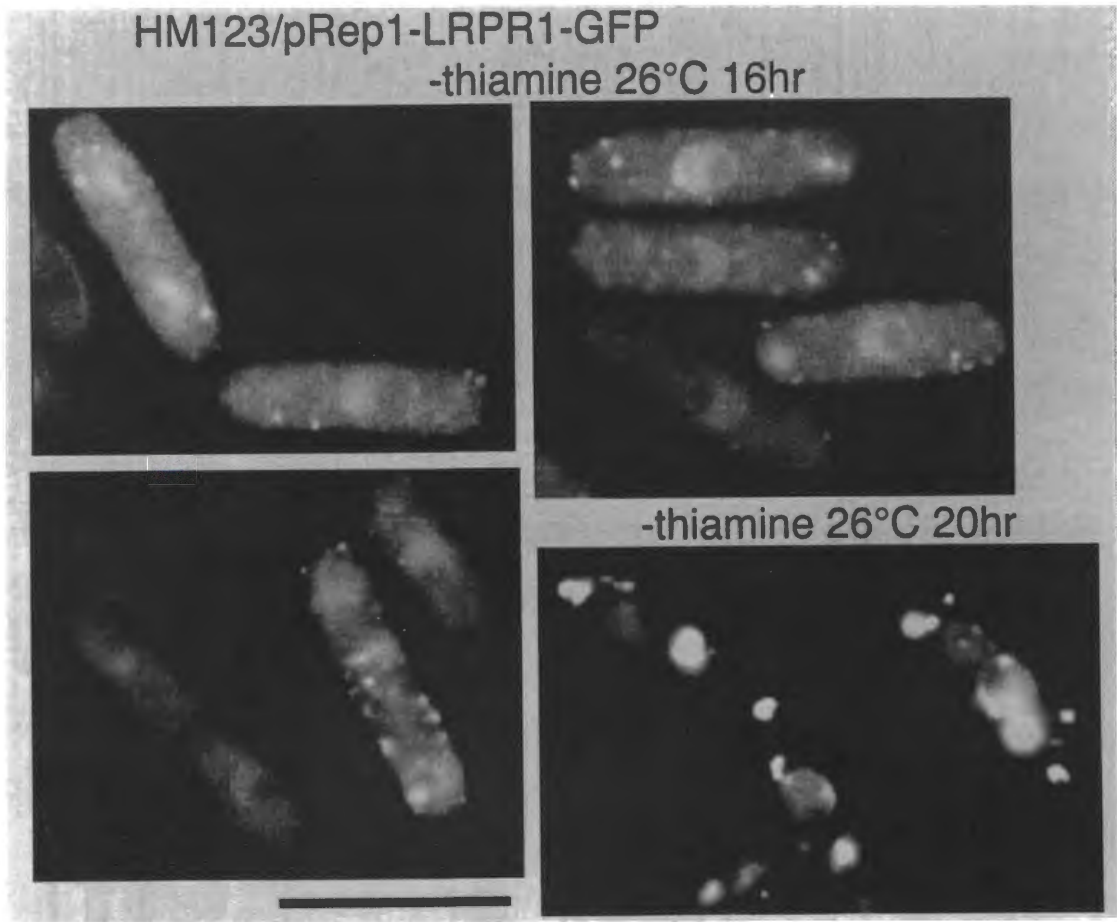


図20. 分裂酵母中ではLRPR1タンパク質は核クロマチン領域に局在する

LRPR1のC末にGFPを付加し、*nmt1*プロモーターにつないだプラスミドpPEP1-LRPR1-GFPを作製し、分裂酵母野生株HM123に導入して、LRPR1の局在を観察した。チアミンを除いた培地で26度、16時間あるいは20時間培養した。26度で16時間培養した場合には発現量は中程度に抑えられていると思われるが、核形態の変形はほとんど観察できなかった。LRPR1は細胞質および核に局在していた。とりわけ核クロマチン領域に多く集まっていた。20時間培養した場合には、クロマチン領域の局在も観察できるが、蛍光強度から判断するとLRPR1の多くは細胞質で大きな塊を形成しているようであった。バーは10  $\mu$ m。

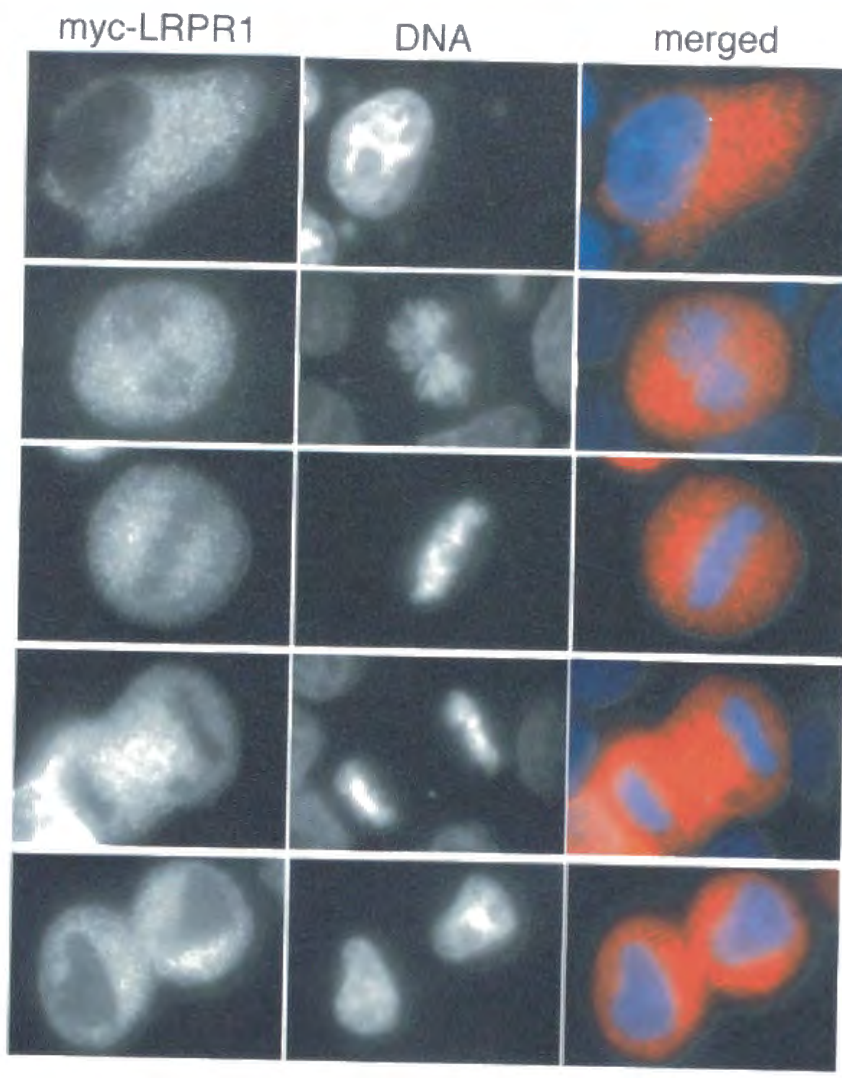
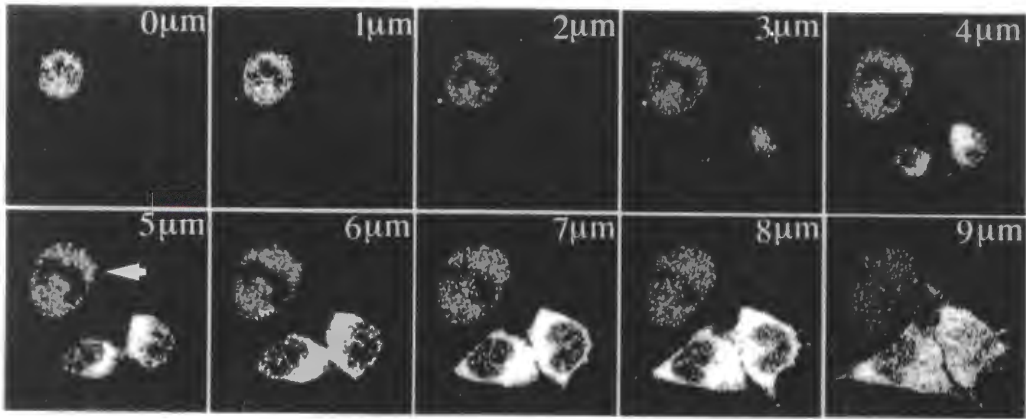


図21. LRPR1はHela細胞では細胞質に局在する-1

mycエピトープを付加したLRPR1遺伝子をCMV (cytomegalovirus) プロモーターにつないだプラスミドを作製し、DMEM培地中30%コンフルエントまで培養したHela細胞にトランスフェクトした。24時間後ホルムアルデヒドで固定し、抗mycモノクローナル抗体による免疫染色法でLRPR1タンパクの局在を調べた。バーは10 $\mu$ m。

DNA染色像および細胞形態から判断して、上から順に間期、M期前中期、中期、後期、終期の細胞である。間期の細胞では核を除いた細胞質領域にLRPR1は局在していた。M期においても染色体領域は染まらず、LRPR1は常に細胞質に局在しているようであった。

A



B



図22. LRPR1はHela細胞では細胞質に局在する-2

HAエピトープをC末に付加したLRPR1遺伝子をCMV (cytomegalovirus) プロモーターにつないだプラスミドを作製し、Hela細胞にトランスフェクトした。24時間後ホルムアルデヒドで固定し、抗HAモノクローナル抗体による免疫染色法LRPR1を染色し、レーザー共焦点顕微鏡をもちいて観察した。

(A) 共焦点効果による光学的切片像。励起波長の問題でDNA染色像は撮影できなかったが、通常の蛍光顕微鏡を用いた観察によると、矢印で示した細胞はM期、その下の2つの細胞は間期の細胞であった。核領域、あるいは染色体領域を除く細胞質が染色されていた。

(B) 光学的切片を積み重ねることにより作製した立体再構築像。両眼視（右の写真を右目で見、左の写真を左で見る）により立体像が得られる。共に間期の細胞であるが、核領域には全く染色は観察されない。

特異的で、精巣、卵巣、膵臓、肺、脳でのみ発現しており、肝臓や腎臓、筋肉や皮膚組織では発現していないと報告されている (Slegtenhorst-Eegdeman et al. 1994)。Hela細胞でも通常発現していないと思われる。そのゆえ、例えば本来は共発現して相互作用するはずのタンパク質が存在しないために、CMVプロモーターで強制発現したLRPR1タンパク質は正しく核内へ輸送できなかったという可能性もある。LRPR1タンパクを分裂酵母細胞で強制発現した場合には、核クロマチン領域に蓄積した。LRPR1のアミノ酸配列中には核移行シグナルと思われる配列は見いだされない (Slegtenhorst-Eegdeman et al. 1995)、この場合には何らかの酵母タンパク質と結合して協同的に核へ輸送されるのかもしれない。強制発現したLRPR1は、*mis6*変異の遺伝的背景で強い細胞毒性を示した。これは本来Mis6タンパク質が相互作用するはずの因子をLRPR1が奪ってしまったためとも考えられる。Mis6とLRPR1が相同性を示す領域は比較的疎水性である。Mis6とLRPR1が相同性を示す領域は、タンパク-タンパク間相互作用、あるいはタンパク-DNA間相互作用に必要なのかもしれない。

## Mis6は動原体DNA中央領域に結合している

先に述べたようにMis6が動原体に局在することが明らかとなった。分裂酵母の動原体DNAは、図24パネルAに示すような対称的に反復配列が配置したような構造をしている (序論参照)。中央にcntと呼ばれる配列があり、その両脇にimrと呼ぶ配列が左右対称に配置している。その外側にはdg、dhと名付けられた配列要素が反復するotrという領域が存在している。そこでMis6が動原体DNAのどの領域に結合するかを決定するため、以下のような実験を行った。

*mis6*<sup>+</sup>-HA組み込み株をホルマリンで固定し (この操作でMis6-HAタンパクとDNAを架橋する)、洗浄後ガラスビーズで細胞を破碎して細胞抽出液を得た。抽出液を超音波で処理してゲノムDNAを1kb以下に切断した後、免疫沈降によりMis6-HAタンパク質を回収した。その後、熱処理によりホルマリン固定を解き、プロテアーゼ処理、フェノール処理を経て、Mis6-HAと免疫共沈したDNAを回収した (この実験手法はChromatin immunoprecipitation; CHIP法と呼ばれる。図23、材料と方法)。回収したDNA中にどのような配列が含まれるのかをPCR法で解析した。その結果を図24パネルBに示す。

cnt1配列あるいはimr1配列を増幅するプライマーを用いてPCRを行った場合にはDNAの増幅が観察された (レーン1)。ところがotr2配列を増幅するプライマー (dh配列の一部はそれぞれの染色体で異なっており、この性質を利用して第2染色体のotrのみを増幅するプライマーを設計した)、あるいは第一染色体の動原体から約30キロ塩基分離したところにある*lys1*遺伝子を増幅するようなプライマーを用いた場合に

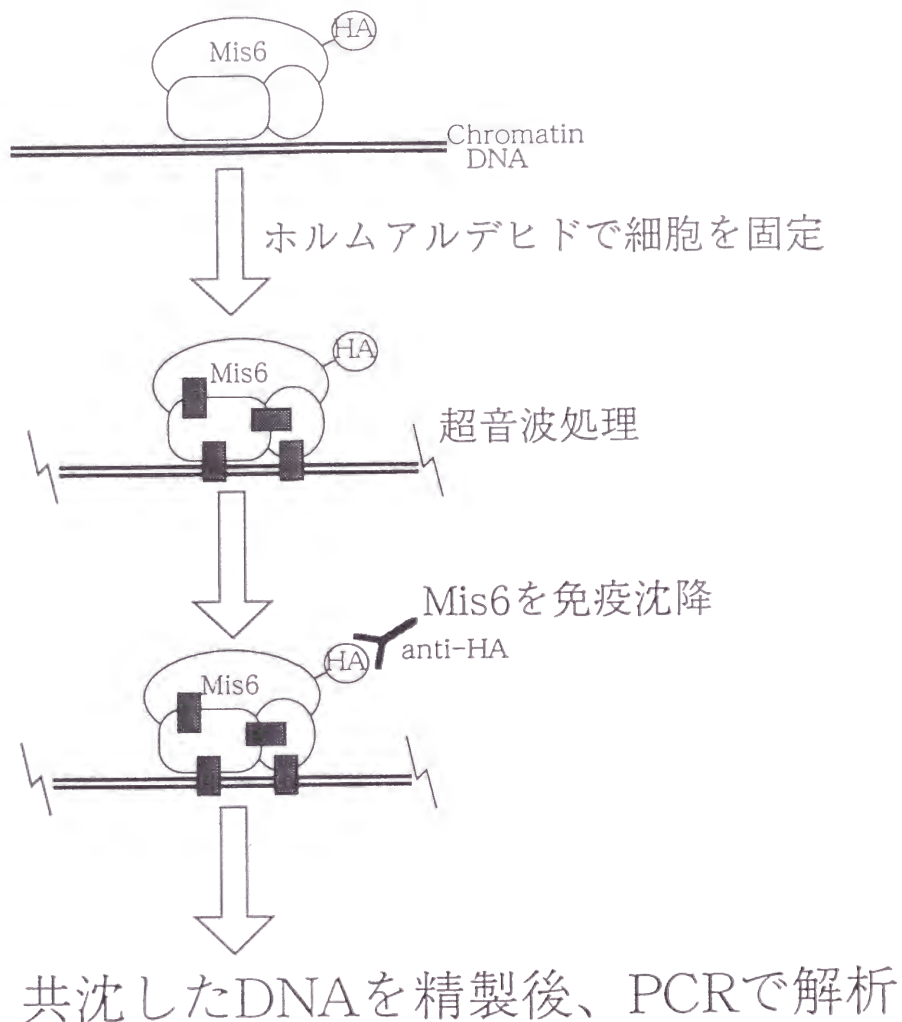


図23. CHIP (Chromatin immunoprecipitation)実験の概略

酵母培養液に1%ホルマリンを加えて1時間固定した後、ガラスビーズで細胞を破碎しタンパク抽出液を得る。次いで超音波処理によって抽出液中のDNAを1キロ塩基対以下の長さまで切断する。その後、プロテインAセファロースビーズを用いた免疫沈降法によりMis6タンパク質を回収する。ビーズをproteinase Kで処理し、65度で5時間保温する。この熱処理によりホルマリン固定の逆反応が起こり、タンパク、DNAが脱架橋される。フェノール抽出、エタノール沈殿によりDNAを精製した後、これをテンプレートとしてPCR反応をおこなう。



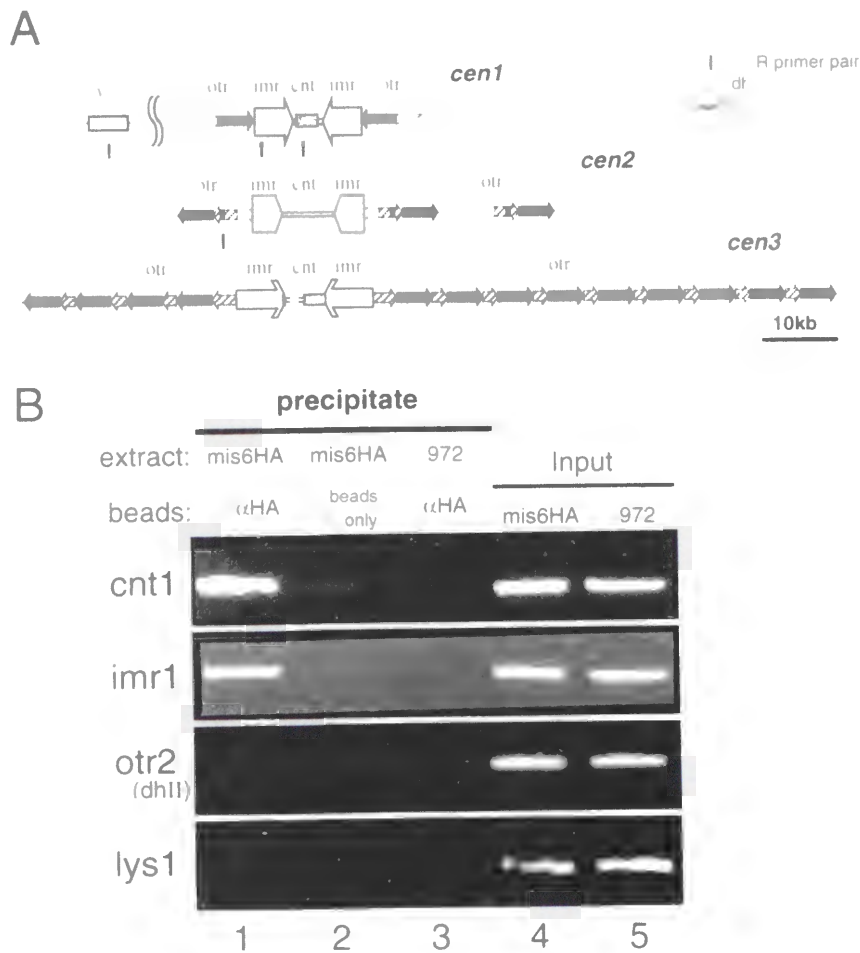


図24. Mis6は動原体中央領域に結合する

(A) 分裂酵母動原体DNAの模式図。序論および本文参照。第1~3染色体全ての動原体は、cnt領域を中心と、imr、otr領域が対称に配置するという共通構造を有する。

(B) CHIP法によってMis6の結合している動原体領域を決定した。PCRをおこなった後、反応産物をアクリルアミドゲルで電気泳動し、臭化エチジウムによりDNAを染色した。PCRに用いたプライマーの位置は、パネル(A)に短い縦線で示した。

レーン1, *mis6*-HA遺伝子組み込み株から得た抽出液から抗HA抗体を用いて免疫沈降をおこなった。cnt1およびimr1プライマーを用いた場合にのみPCR増幅産物が得られた。

レーン2-3; 免疫沈降のネガティブコントロール。2では、抗体を用いずプロテインAセファロースビーズのみで免疫沈降を行い、3では*mis6*-HA遺伝子を含まない野生株(972株)からの抽出液を用いて免疫沈降を行った。いずれの場合もバックグラウンドレベルの増幅産物しか得られなかった。

レーン4、5; PCR反応のポジティブコントロール。*mis6*-HA遺伝子組み込み株(レーン4)、あるいは972株(レーン5)からえた抽出液をテンプレートとしてPCRを行った。

は、DNAの増幅は観察できなかった。免疫沈降のネガティブコントロールであるレーン2、3ではいずれのプライマーを用いた場合もバックグラウンドレベル以上のDNAの増幅は観察できなかった。この結果はMis6タンパク質が動原体中央領域のimr、cnt配列に特異的に結合していることを示している。なお、テロメア、接合型遺伝子領域は動原体と同様にヘテロクロマチンを形成しているといわれているが、これらのDNAはMis6-HAと共沈したDNAの中には含まれていなかった（データは示さない）。Mis6がヘテロクロマチンに結合することはないと思われる。

## 生細胞中でのMis6タンパクの挙動

GFPタンパク質は生きた細胞中でも蛍光を発する。この性質を利用して、生細胞中でのMis6タンパク質の挙動を観察した。*mis6*-GFP組み込み株を蛍光顕微鏡下で培養し、30秒間隔でGFPの蛍光を観察した（材料と方法）。生きた単一細胞内でのMis6の経時的変化を図25パネルAに示した。最初、Mis6は紡錘極体（SPB）があると思われる細胞中央の一点に集まっている（0-2分）。その後2、3点に分裂し、短い直線上を往復運動する。この直線は紡錘体であると思われるが、この運動は有糸分裂前中期～中期の動原体の運動を反映しているものと考えられる（3分-17分）。いったんMis6は動原体中央に集まり（17.5分）、その後急速に両紡錘体極に向かって分裂していく（18-20.5分）。この動きは後期Aにおける動原体の運動と一致する。その後、細胞の両端に向かってさらに移動していくが（21分以降）、これは、後期Bの動原体の動きを反映しているのだろう。

以上のMis6の運動は、FISH法によって明らかにされた動原体DNAの振る舞いと完全に一致する（図25パネルBおよび図26、Funabiki et al 1993）。この結果は、Mis6が細胞周期を通じて常に動原体に結合していることを示している。またMis6-GFPは、各種変異株における動原体の運動を解析するための有用な道具となるかもしれない。

## Mis6-302変異型タンパク質は動原体に結合できない

温度感受性変異型Mis6タンパクは、制限温度にさらされるとどのような機能欠損を示すのだろうか？そこで変異型Mis6タンパクの性質を調べるため、*mis6-302*変異遺伝子にHAエピトープを付加した遺伝子

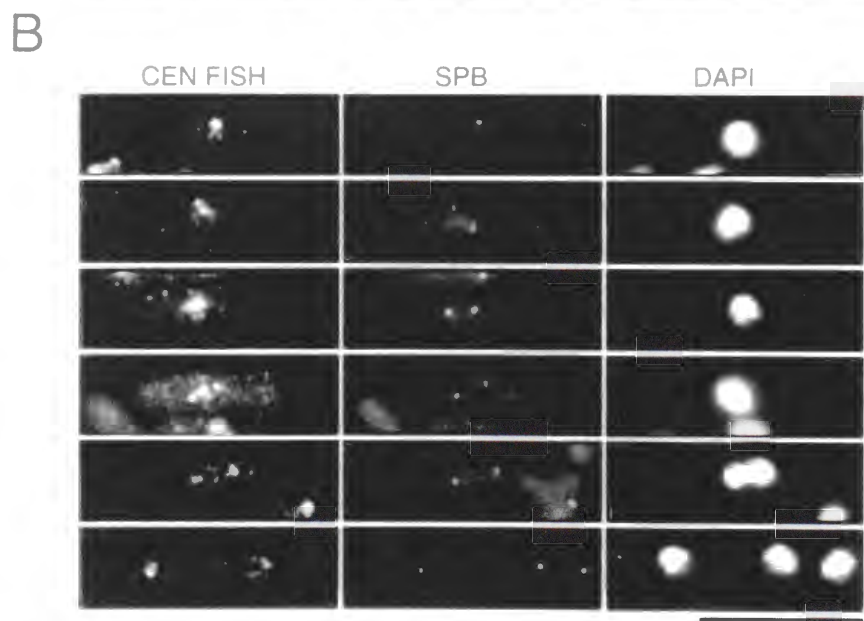
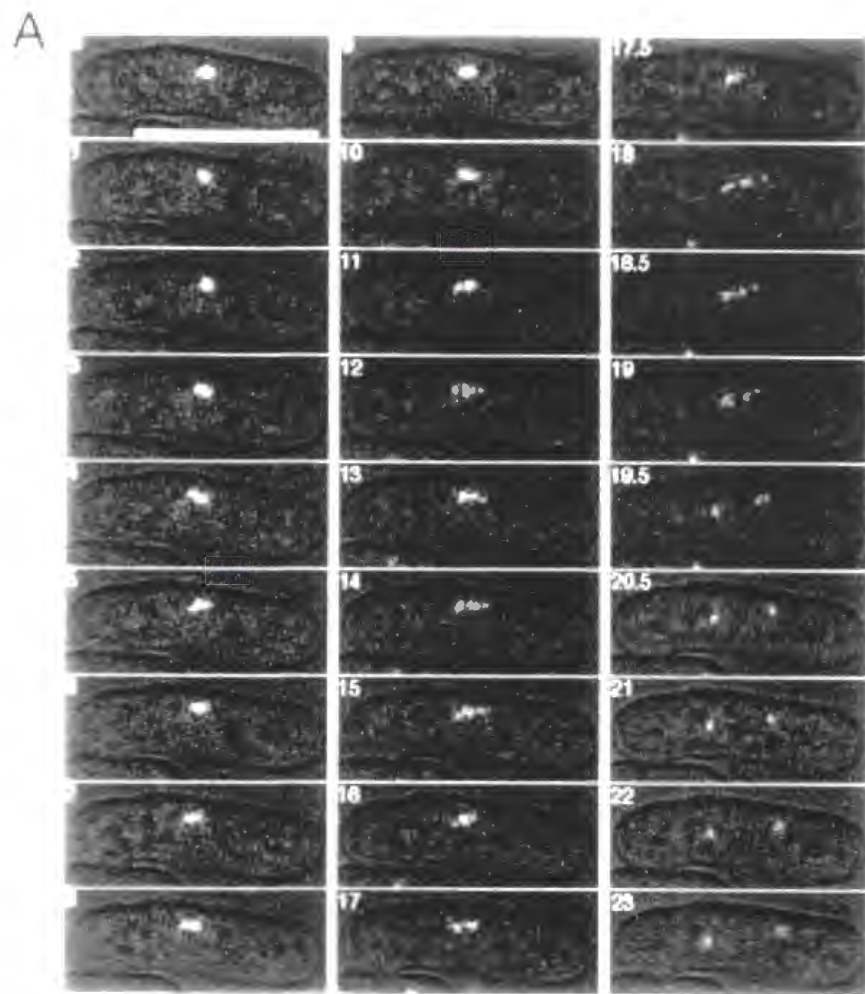


図25. Mis6は細胞周期を通じて動原体領域に局在する

(A) *mis6*-GFP組み込み株を0.5%低融点アガロースを含むEMM2培地に懸濁し、スライドガラス上で培養した。レーザー共焦点顕微鏡MRC-1024 (BioRad) の経時観察モードを利用して、30秒間隔でGFP蛍光を観察した。細胞外形は微分干渉像を取り込み、デジタル処理により重ね合わせた。写真左上の数字は観察開始よりの経過時間 (単位は分)。はじめ1点に集まっていたMis6は2-3点に分かれ、短い直線上を往復運動する (3-17分)。細胞中央に緩やかなクラスターを形成した後 (17.5分)、両極に向かって急速に分裂する (18-20.5分)。白いバーは10 $\mu$ m。

(B) FISHによる動原体挙動の解析。FISHのプローブにはotr配列を用いたので全ての動原体が同時に染色される (左列)。中列は紡錘極体 (SPB) 構成タンパクSad1の免疫染色像。右列はDAPIによる核染色像 (右列)。バーは10 $\mu$ m (図26を参照)

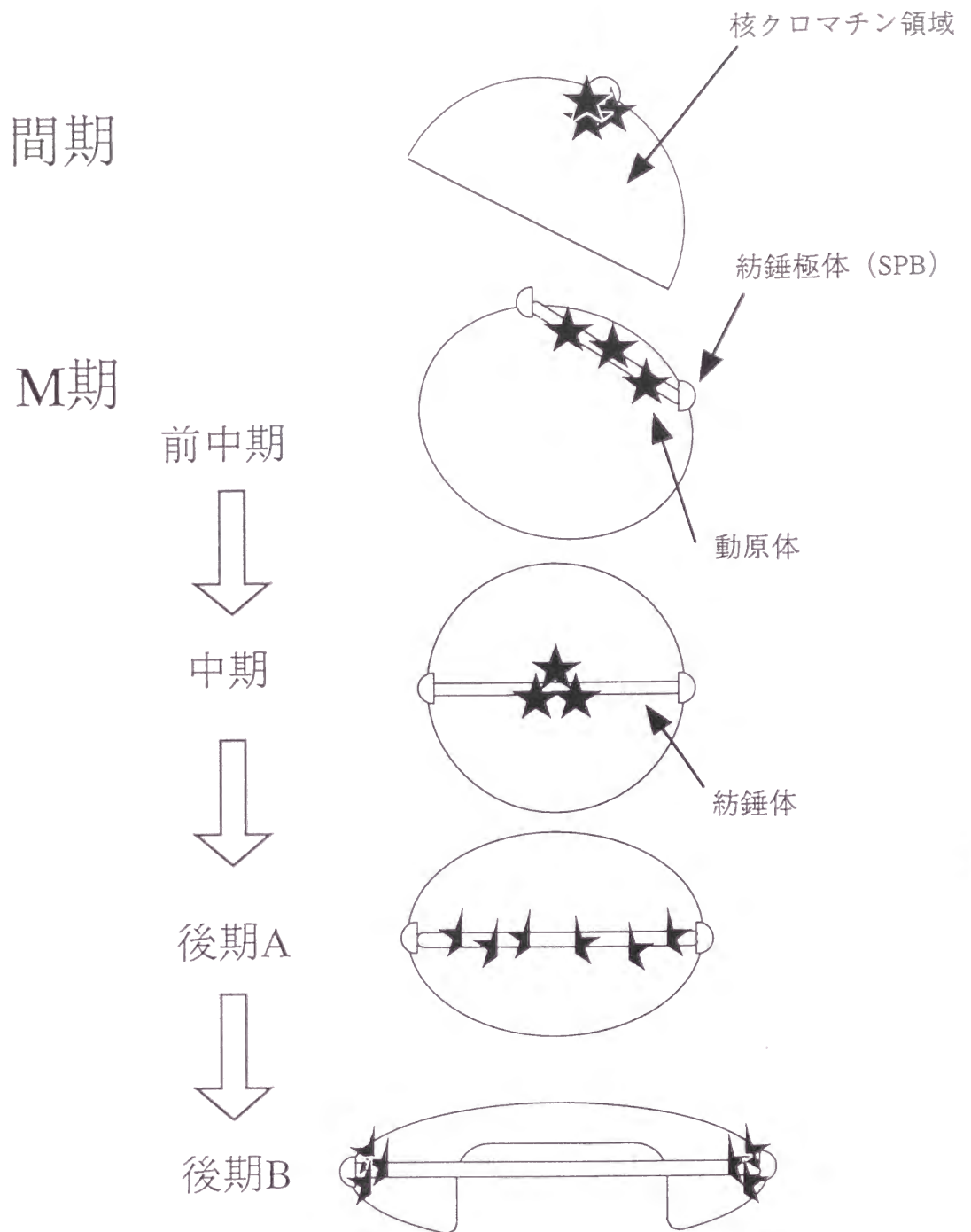


図26. FISH法より推定される動原体の挙動

動原体otr配列をプローブとしたFISH法の結果より推定される分裂酵母動原体の挙動模式図。図24パネルBおよびFunabiki et al. 1993を参考にして作成した。間期には動原体はSPBの近傍にクラスターを作っている。M期になるとクラスターは崩れ、紡錘体上を移動する。中期には動原体は紡錘体中央に集まり、後期Aが始まると姉妹動原体は分離し、両SPBに向かって移動する。後期Bには動原体はSPB近傍にクラスターを再び形成する。紡錘体伸長にとまない、姉妹動原体間の距離はさらに離れていく。

(*mis6-302*-HA遺伝子)で、野生株ゲノム中の*mis6*遺伝子を置換した株を作製した(*mis6-302*-HA組み込み体)。この*mis6-302*-HA組み込み体は温度感受性を示し、制限温度では染色体の不均等分配が起こっていた。*mis6-302*-HA組み込み株を許容温度あるいは制限温度で培養し、ウェスタンブロットおよびCHIP法を行った。図27にはウェスタンブロットの結果を示した。Mis6-302変異型タンパク質は不安定であるらしく、許容温度においても変異型タンパクの量は野生型(WT-Mis6)に比べて減少していた。制限温度で3時間、6時間培養した場合には、変異型Mis6全長タンパクの量は許容温度の場合と大差はないものの(太い矢頭で示す)、部分分解産物と思われるバンドが検出された(細い矢印で示す)。CHIPの結果は図28に示す。おおよそ等間隔に*cnt1*配列中に4カ所、*imr1*配列中に3カ所PCRプライマーを設計し、結合能を詳細に解析した。許容温度では動原体DNAは変異型Mis6タンパクと免疫共沈するものの、沈降量は野生型の場合に比べ減少していた。特に*imr*領域のDNAの共沈量が低下していた。制限温度で6時間培養すると、*cnt*領域DNAの共沈量も野生型の20-30%にまで減少した。これは野生株に多コピーで導入した変異型Mis6-GFPが動原体へ局在できないという結果と一致する。以上の結果は、変異型Mis6タンパク質は不安定で、しかも制限温度では動原体に結合できなくなることを示している。なお先に述べたように、変異型Mis6を多コピーベクターにつないで導入した場合、細胞毒性などの効果は観察されず、むしろ*mis6*変異株の温度感受性が相補された(ただし野生型Mis6に比べ相補能は弱い。図18)。多コピー導入で増量すれば、一部の変異型Mis6は制限温度でも動原体に結合し、機能を回復するのだろう。

## *mis6*変異体では動原体中央部のクロマチン構造に異常がある

Mis6は動原体に結合してどのような機能を果たしているのだろうか?先に示したとおりMis6は動原体の中央部(*cnt*、*imr*配列)に特異的に結合している。この領域はクロマチン構造が特殊であると報告されている。すなわち、核クロマチンDNAをマイクロコッカルヌクレースで部分消化後に電気泳動してサザンハイブリダイゼーションを行うと、通常の染色体領域あるいは*otr*領域をプローブにした場合には、はしご状のパターンが得られる。このパターンはヌクレオソームが規則的な間隔で並んでいることを示している。ところが*cnt*、*imr*配列をプローブにした場合には、スメアー状のパターンが得られる(Polizzi and Clarke 1991, Takahashi et al. 1992、および図29参照)。スメアー状のパターンを詳しく観察すると、モノヌクレオソームおよびヌクレオソーム2量体を反映すると思われるバンドは観察できるので、この領域ではヌクレオソームは形成されるものの、その間隔が不規則になっていると考えられる。このような特殊クロマチン構造の形成にMis6が関与しているかもしれないと考え、*mis6*変異体中の*cnt*、*imr*領域のクロマチン構造

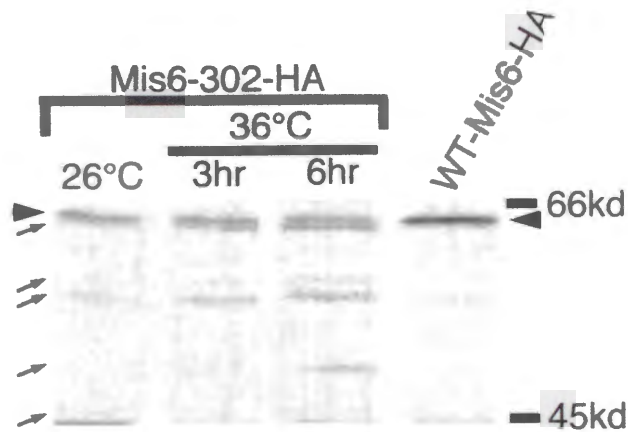


図27. 変異型Mis6-302タンパク質のウエスタンブロット

変異型Mis6のC末にHAエピトープを付加した遺伝子 (*mis6-302-HA*) でゲノム上の *mis6* 遺伝子を置き換えた株 (Mis6-302-HA組み込み株)、および野生型Mis6-HAを組み込んだ株 (WT-Mis6-HA) からタンパク抽出液を調製し、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、抗HA抗体を用いてウエスタンブロットを行った。左から順に、許容温度で培養したMis6-302-HA組み込み株、制限温度で3時間、制限温度で6時間培養したMis6-302-HA組み込み株、一番右は33度で培養したWT-Mis6-HA株から得た抽出液を泳動した結果である。4レーンとも、全タンパク量をそろえて泳動した。

太い矢頭で示したのが、Mis6全長のバンドで、細い矢印で示したのがMis6の分解産物に由来すると思われるバンドである。許容温度においても変異型Mis6の量は野生株に比べ減少していた。制限温度で培養した場合、全長Mis6の量は許容温度の場合と大差はなかったが、分解産物の量が増加した。

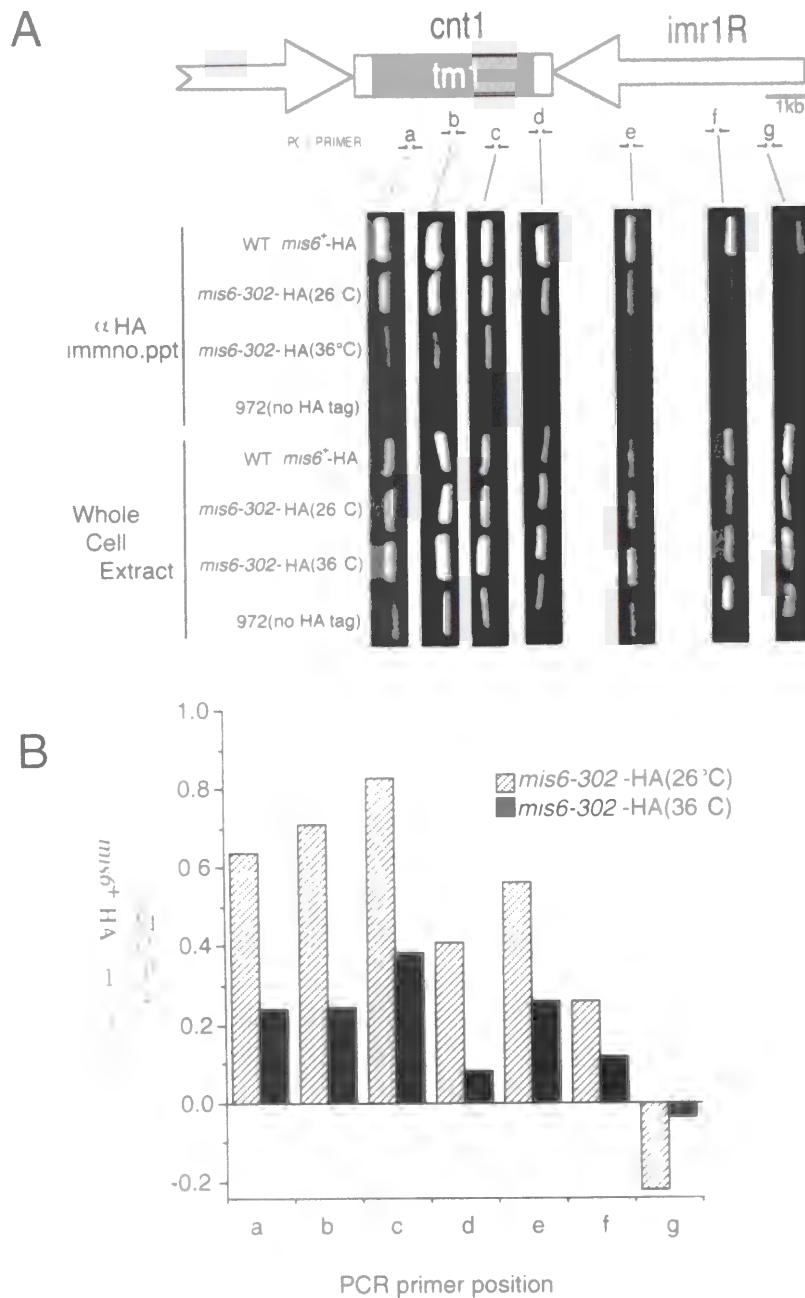


図28. 変異型Mis6タンパクは制限温度で動原体に結合できなくなる

(A) 野生型*mis6*-HAをゲノム上に組み込んだ株、変異型*mis6*-302-HAを組み込んだ株（許容温度、あるいは制限温度で6時間培養）およびHAエピトープを含まない野生株（972株）を用いてCHIP解析を行った。PCRプローブは上図に示したとおり、おおよそ1~2キロ塩基対間隔で7箇所設計した。上4レーンは抗HA抗体による免疫沈降物をテンプレートにしてPCR反応を行った結果で（ $\alpha$  HA immno.pptと表記）、下4レーンは細胞抽出液をテンプレートとしてPCRを行ったポジティブコントロール。

(B) 臭化エチジウム染色後、アクリルアミドゲルをCCDカメラで撮影し、それぞれのPCR産物のバンド強度をデンストメーターで測定した。WT *mis6*-HA株からの免疫沈降物を用いた場合のバンド強度を1とし、972株を用いた場合を0としてバンド強度を相対化した。

変異型Mis6は許容温度においても動原体結合能が低下しているようである（棒グラフ斜線）。とくに*imr*部のプライマー（f, g）を用いた場合の現象が顕著であった。制限温度では、*cnt*部DNAの結合量も著しく低下し、c領域のDNAも野生型の4割以下しか結合していなかった。

を解析した。

図29はサザンハイブリダイゼーションの結果である。*mis6-302*変異株および変異株の*mis6*遺伝子を野生型遺伝子で置換した株 (*mis6<sup>+</sup>* integrantと表記、この株は*mis6*遺伝子以外は変異株と全く同じ遺伝的背景を持つ) を36度で6時間培養したのち、クロマチンDNAをマイクロコッカルヌクレースで部分消化した(図29パネルA)。野生型遺伝子で置換した株では、以前に野生株で報告されたように、*cnt*、*imr*配列をプローブにした場合はスメアー状のパターンが得られた。それに対し変異株ではスメアー状のパターンは消失して、代わりに、はしご状のパターンが現れた。この結果は、*mis6*変異体中では動原体特異的なクロマチン構造が崩壊し、通常の染色体領域と同じクロマチン構造になっていることを示している。図29パネルBには*mis6*変異体を許容温度、あるいは制限温度で3時間、6時間培養したときの動原体クロマチン構造の変化を示した。許容温度においても、変異体の*cnt1*領域の消化パターンは野生株のそれとはやや異なっており、スメアー状とはしご状のパターンが混ざっているようであった。*mis6*変異体は許容温度でも人工ミニ染色体を安定に維持できないが(Takahashi et al,1994)、この許容温度におけるクロマチン構造の異常がミニ染色体の不安定性の原因であると思われる。制限温度で6時間培養するとスメアー状のパターンは完全に消失し、はしご状のパターンが現れた。*otr*領域の消化パターンは許容温度、制限温度でも変化はなく、野生型と同じはしご状のままであった。以上の結果より、Mis6タンパク質は動原体特異的なクロマチン構造の形成あるいは維持に必要である結論した。

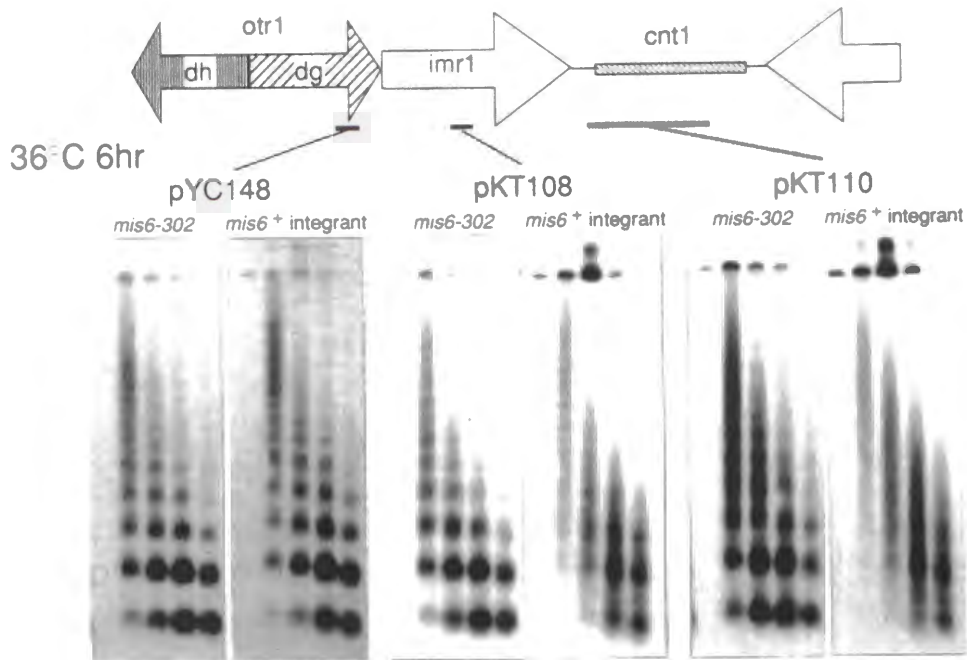
分裂酵母の動原体領域はヘテロクロマチン化しており、動原体領域に挿入された遺伝子の発現は抑制される(サイレンシング効果と呼ばれる、Allshire et al. 1994)。スメアー状の消化パターンが、ヘテロクロマチン化と関係があるのか否かを検討するために、*mis6*変異体の動原体*otr*、*imr*、*cnt*領域に*ura4<sup>+</sup>*を挿入し、その発現を調べた。26度あるいは30度で培養して実験を行ったが、野生株でも*mis6*変異体でも*ura4<sup>+</sup>*遺伝子の発現は抑制されていた。むしろ*mis6*変異体の方が抑制効果が強いようであった(データは示さない)。*imr*、*cnt*領域のスメアー状の消化パターンはヘテロクロマチンとは関連がないと思われる。

## *mis6*変異は中期停止細胞中での動原体の配置に異常を引き起こす

分裂酵母*cut9*変異株はAPC (Anaphase promoting complex) /サイクロソームの構成因子の変異体で制限温度ではサイクリンのユビキチン化が起こらず、M期中期で停止する(Yamada et al. 1997)。姉妹染色体が均等に分配されるためにはM期中期に動原体が紡錘体と正常に結合し、正しく配置することが重要であると考えられる。*mis6*変異体では分裂中期における動原体の配置に異常が生じているのかもしれない。この



A



B

pKT110 (cnt1)

pYC148 (otr1)

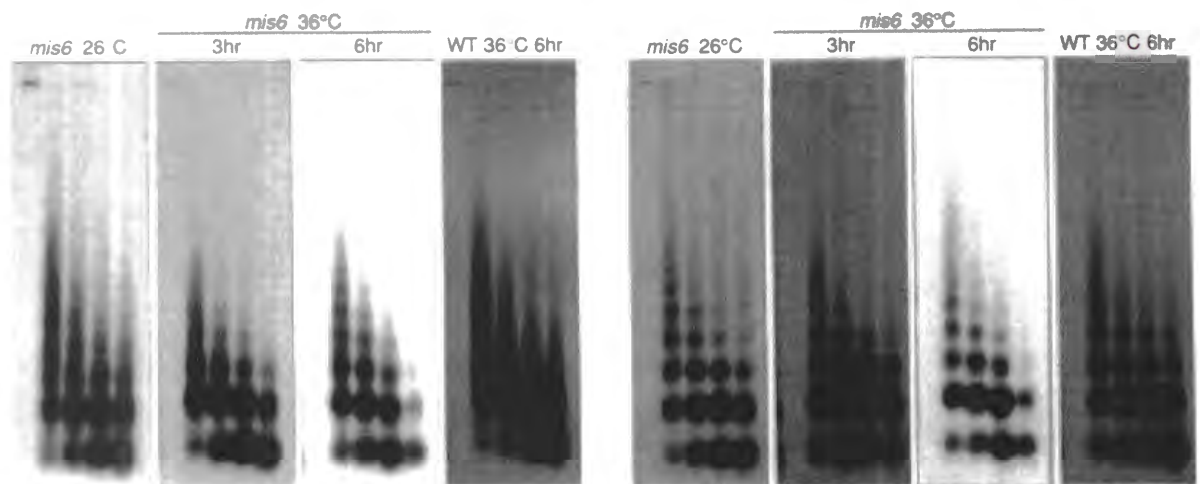


図29. *mis6*変異株では動原体特異的のクロマチン構造が崩壊している

(A) 36度で6時間培養した*mis6*変異株、あるいは変異株の*mis6*遺伝子を野生型遺伝子に置換した株

(*mis6*<sup>+</sup> integrantと表記、*mis6*遺伝子以外は変異株と遺伝的背景が同一なコントロール株) のクロマチンDNAをマイクロコッカルヌクレースで部分消化し、アガロース電気泳動後、図中で示したプローブでサザンハイブリダイゼーションを行った。電気泳動は5レーンが1セットになっており、ヌクレースの処理時間が左から0、1、2、4、8分となっている。

*otr*領域 (pYC148) をプローブに用いた場合は、変異株、コントロール共にはしご状のパターンが得られた。これは臭化エチジウム染色による全クロマチンDNAのパターンと同一であった (データは示さない) - *imr* (pKT108)、*cnt* (pKT110) をプローブにした場合は、コントロールでは野生株で報告されていると同様のスマーカー状のパターン (パネルB WT参照あるいは図39参照) が得られたが、変異株では、はしご状のパターンが観察された。

(B) *mis6*変異株を26度あるいは制限温度36度で3時間、6時間培養後、パネルAと同様の実験を行い、動原体クロマチン構造を調べた。コントロールには野生株972を36度で6時間培養したものを用いた。変異株の*cnt*領域のパターンは許容温度でも若干異常で、はしご状パターンとスマーカー状パターンが混ざったようであった。36度で6時間培養後は完全にはしご状パターンになっていた。

可能性を検討するため、*cut9*変異株および*cut9mis6*二重変異株における動原体の配置をFISH法で比較した。

先に示したとおり *mis6*変異の表現型を最初のM期に出現させるためには、細胞をG1期に同調してから制限温度に移行させる必要がある。そこでまず両変異株を窒素源枯渇によりG1期に同調し、そのあと富栄養培地に戻すと同時に制限温度に移した。8時間培養後、固定してFISH法で動原体DNAを視覚化した。プローブにはotr配列を用いた。これによりすべての動原体が染色される。図30に示すように、*cut9*変異株ではすべての動原体は紡錘体中央に集まり、大きな一つの塊のように見えた。分裂中期に停止している細胞の9割で同様の像が観察された。この配置は、別の中期停止変異株*nuc2*を用いた場合と同様であるが (Funabiki et al,1993)、高等真核細胞における中期板 (metaphase plate) 形成に相当するものと考えられる。ところが、*cut9mis6*二重変異株では動原体の配置に劇的な異常が見いだされた。中期停止している細胞の9割以上で、動原体が一点に集まらず核内に散らばっているような像が観察された (図30)。DAPI染色を比較しても、*cut9*変異株では3本の凝縮染色体が一カ所に集まっていたのに対し、*cut9mis6*二重変異株では染色体が散らばっているように見えた。この結果は、*mis6*変異がM期中期の動原体配置に異常を引き起こすことを示唆している。また*cut9mis6*二重変異株の場合、動原体配置に異常のあった細胞のうち約半数で4つ以上のFISHシグナルが観察された。分裂酵母一倍体は3本しか染色体を持たないので、これは、*cut9mis6*二重変異株ではM期後期が開始しないにもかかわらず時期尚早に姉妹動原体が分離しているという可能性を示している。

## Mis6タンパク質は細胞内で沈降係数10-15Sの複合体を形成している

高等真核細胞あるいは出芽酵母の動原体には多くのタンパク質が結合し、巨大なタンパクDNA複合体が形成されている。分裂酵母の動原体も同様に巨大な複合体が形成されていることが予想される。そこで、しよ糖密度勾配遠心法を用いて、Mis6が細胞内でどれほどの大きさの複合体を形成しているのかを調べた (図31 WT)。15-40%のしよ糖密度勾配に *mis6*-HA組み込み体から得た細胞抽出液を重層し、40Krpm (150kG) で12時間遠心した後、密度の軽い方から順に20の分画に分けた。抗HA抗体によるウエスタンブロット法でMis6タンパク質を検出したところ、大部分は2から13フラクションに分布していた。分布のピークは6-7フラクションであった。マーカーに用いたサイログロブリン (沈降係数16-19.5S) は8-9フラクションまで沈降していたので、Mis6は細胞内で10-15S程度の沈降係数を持つ複合体を形成していると予想される。複合体が球形をしていると仮定して計算すると、Mis6は分子量500kD以上の巨大な複合体を形成していると思われる。

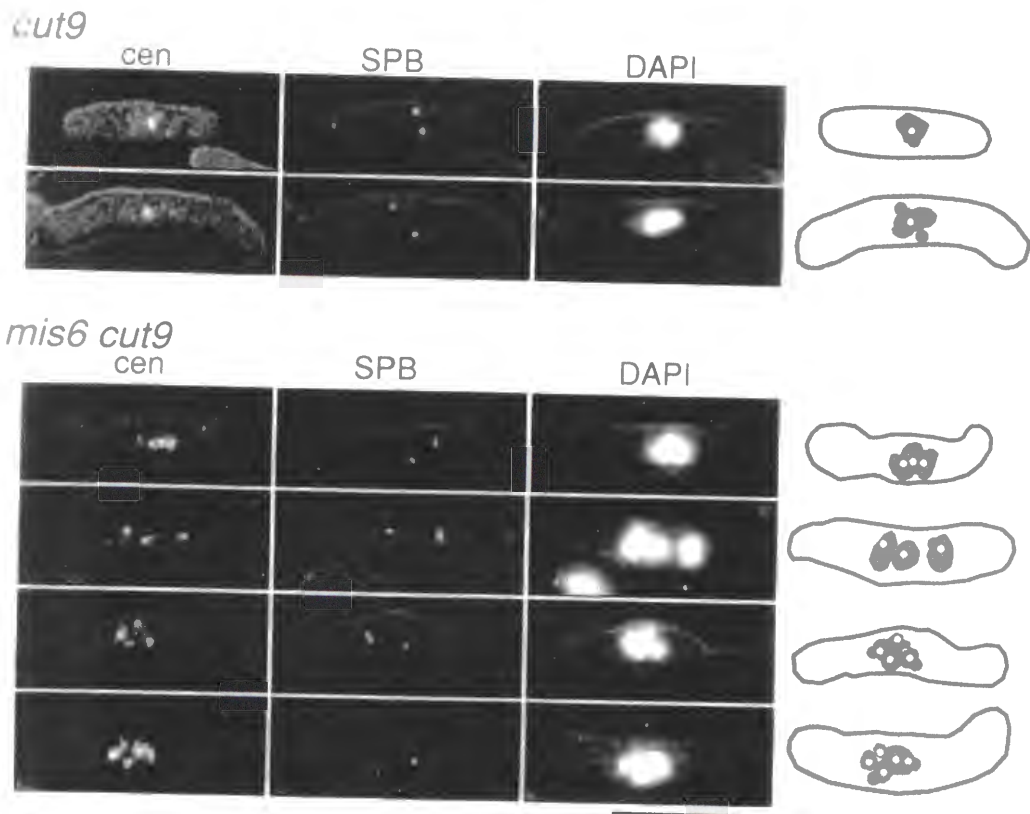


図30. *mis6*変異はM期中期の動原体配置に異常を引き起こす

*cut9*はAPCの構成タンパクの温度感受性変異で制限温度で培養するとM期中期で停止する。*cut9*あるいは*cut9mis6*変異株を窒素源枯渇によりG1期に同調後、富栄養培地（YPD）に移し、制限温度で8時間培養した。固定後、全動原体で共通のotr配列をプローブにしたFISHを行った（*cen*と表記）。紡錘極体（SPB）構成タンパクSad1の免疫染色によりSPBを染色し、DAPIにより染色体DNAを染色した。最右列にはそれらの像を重ね合わせたイラストを示した。動原体を白丸、SPBを黒丸で示してある。

*cut9*変異株では動原体は紡錘体中央にクラスターを形成していた。ところが*cut9mis6*変異株では動原体はクラスターを形成せず、散らばっていた。また4つ以上の動原体FISHシグナルが観察される細胞もあった。SPB間の距離も*cut9*変異株に比べ若干長いようであった。

次に細胞周期を通じて、Mis6の沈降係数に変化があるかどうかを調べた。非同調の野生株は大半がG2期の細胞である。従って上述の結果より、G2期のMis6の沈降係数は10-15Sと考えられる。*cut4*、*cut9*変異株はそれぞれAPCの変異株で制限温度に移すとM期中期で停止する（Yamashita et al. 1996、Yamada et al. 1997）。*cdc10*はS期開始に関わる転写因子の変異で、その変異体は制限温度ではG1期に停止する（Simanis and Nurse 1989）。これらの変異体を用いてM期、G1期でのMis6の沈降係数を調べた。図31に示すとおり、どの変異体の細胞抽出液においてもMis6の分布は野生型のそれと変化はなかった。これは、Mis6複合体は細胞周期を通じて10-15Sの複合体を形成しており、その大きさは変化しないだろうということを示唆している。ただし沈降係数に変化を与えないような修飾やサブユニットの交換が起こっている可能性は否定できない。

Mis6が形成する複合体としては、それ自身が互いに結合しあってホモポリマーになっている可能性が考えられる。この可能性を次のような方法で検討した。まずMis6のC末端にmycエピトープを付加した遺伝子を作成し、ゲノム上の*mis6*遺伝子をそれで置き換えた*mis6-myc*組み込み体を作成した。つぎに*mis6*-HA組み込み体と*mis6-myc*組み込み体をかけ合わせてヘテロ2倍体を作成した。このヘテロ2倍体は*mis6*-HA遺伝子と*mis6-myc*遺伝子を1コピーずつ含んでいる。この2倍体から細胞抽出液を得、抗HA抗体あるいは抗myc抗体を用いた免疫沈降法によりMis6タンパクを回収した。沈降物にMis6-HAタンパク、Mis6-mycタンパクが含まれるか否かをウエスタンブロット法により検定した。結果は図32に示した。HA抗体で免疫沈降した沈降物中にはMis6-HAのみ検出され、myc抗体による沈降物中にはMis6-mycのみが検出された。この結果から考えると、Mis6タンパク質はホモポリマーを形成していないらしい。しかしながら、免疫沈降の効率はお互いの抗体を用いた場合も20%程度で、多くのMis6は免疫沈降せず上清に残っていた。立体構造の影響でホモポリマーを形成したものは免疫沈降できなかったのかもしれない。

## Mis6と結合するタンパク質の探索

先のショ糖密度勾配遠心の結果から考えると、Mis6は他のタンパク質とヘテロ多量体を形成していると予想される。Mis6と物理的に相互作用するタンパク質を同定することは、Mis6の分子機能を理解する上で有用な情報を与えるだろう。そこでMis6と結合するタンパク質を見いだす目的で、以下のような実験を行った。*mis6*-HA組み込み体、あるいは野生型株から細胞抽出液を得、抗HA抗体でMis6-HAタンパクを免疫沈降した。沈降物をSDSアクリルアミドゲルで電気泳動し、銀染色法によりタンパク質を染色した（図33）。野生株抽出液から免疫沈降したコントロールと比較したところ、Mis6-HAと特異的に免疫共沈したと思わ

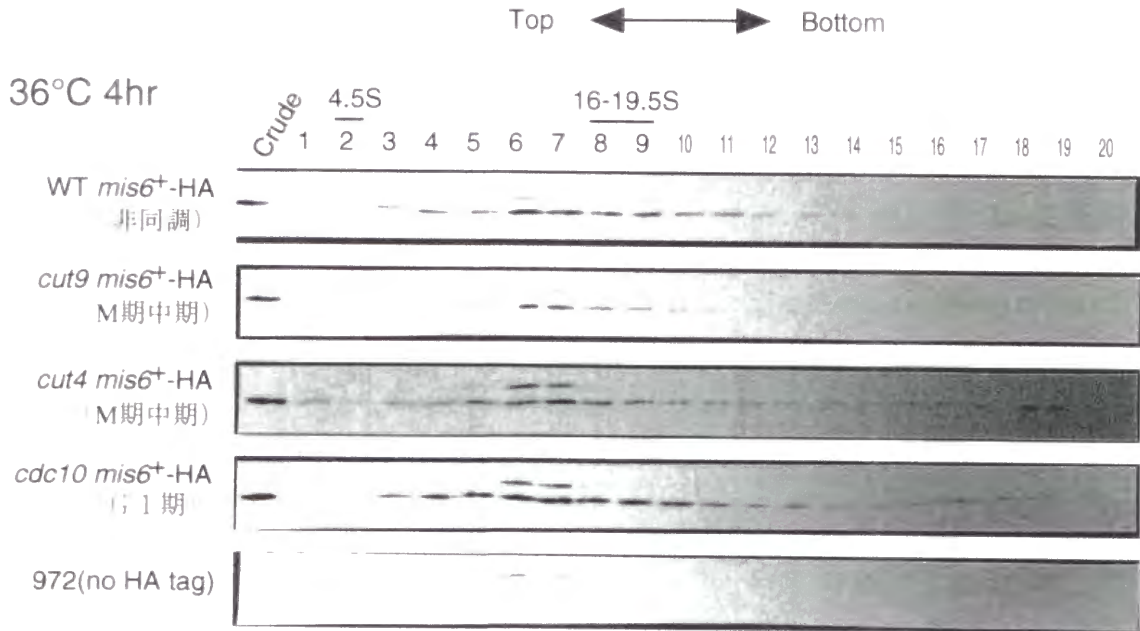


図31. Mis6は細胞周期を通じて10-15Sの複合体を形成している

野生株 (WT)、*cut9*、*cut4*、*cdc10*に*mis6*-HA遺伝子を組み込んだ株、あるいはHAエピトープを含まない972株を36度で4時間培養してからタンパク抽出液を調製し、ショ糖密度勾配遠心後に20に分画してSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、抗HA抗体によるウエスタンブロットによりMis6-HAタンパク質を検出した。非同調野生株の大半はG2の細胞で、*cut9*、*cut4*はM期中期、*cdc10*はG1期の細胞が大半を占める。

どの変異株を用いた場合もMis6は6、7レーンにピークをもつ緩やかな分布パターンを示した。なお、6、7レーンでMis6の直上にバンドが検出されたが、これはHAエピトープを含まないはずの972株でも検出されており、抗HA抗体の交叉反応によるコンタミネーションであると考えられる。

密度勾配遠心の沈降係数マーカーとして、BSA (4.5S)、サイログロブリン (16-19.5S) を用いた。マーカーの位置は図中に示した。

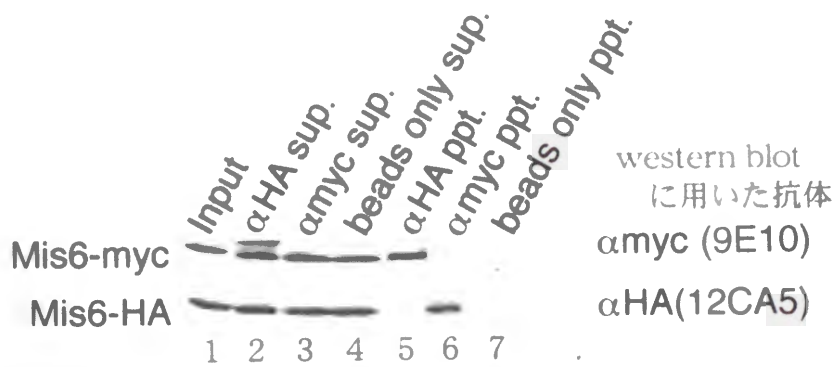


図32. Mis6はホモポリマーは形成していない

*mis6-HA/mis6-myc* ヘテロ2倍体からタンパク抽出液を得、抗HA抗体（レーン2、5）あるいは抗myc抗体（レーン3、6）を用いて免疫沈降を行った。レーン4、7はプロテインAセファロースビーズのみで免疫沈降を行ったネガティブコントロールである。レーン1にはタンパク抽出液、レーン2、3、4には免疫沈降後の上清、レーン5、6、7には免疫沈降物を電気泳動して抗myc、抗HA抗体でウエスタンブロットを行った。免疫沈降の効率はあまり良くなく、ほとんどのMis6は上清に残っていた。それゆえレーン5~7にはレーン1~4の10倍に相当する量をロードした。

抗HA抗体による沈降物の中にはMis6-mycは含まれておらず（レーン5）、逆に抗myc抗体による沈降物の中にもMis6-HAは含まれていなかった。

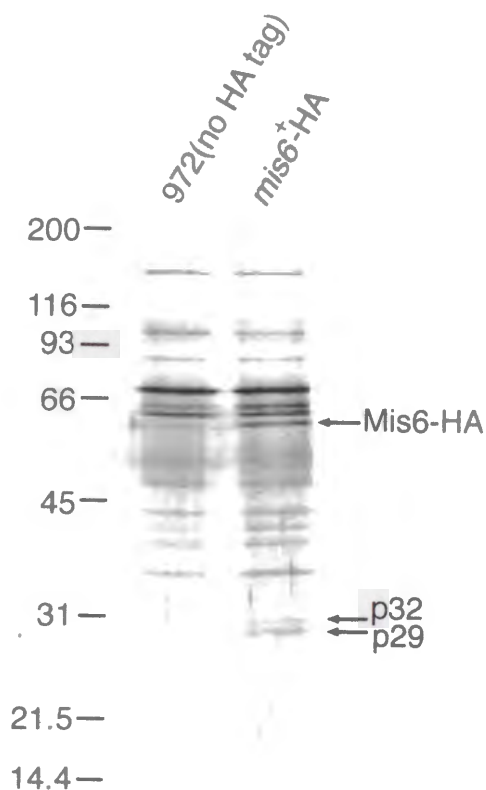


図33. Mis6 とp32、p29タンパク質と複合体を形成している

Mis6-HA組み込み体（右レーン）あるいはHAエピトープを含まない972株（左レーン）から細胞抽出液を調製し、抗HA抗体で免疫沈降を行った。沈降物を10-15%濃度勾配SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、銀染色によりタンパク質を検出した。なお抽出バッファーは25mM HEPES-KOH(pH7.5)、200mM NaCl、10%glycerol、1%NP-40を用いた。予備実験によると、このバッファーを用いたほうがHBバッファーよりも沈降効率がやや良く、30%程度のMis6タンパクが回収できた。左側に示した数字は分子量マーカーである。

Mis6-HA組み込み体からの抽出液を用いたときのみ検出されるタンパク質が3本見いだされた（図中矢印）。66kDのマーカー付近のタンパクはMis6-HA自身であると思われる。一方32kD、29kDのタンパクはMis6結合タンパクだと思われる。p32、p29と名付けた。

p32

分裂酵母 60Sリボソームタンパク L13

MAIHVKGQLP NAHFHKDWQR YVKIWFNQPG RKLRRRQARQ TKAAKIAPRP VEAIRPAVKP  
PTIRYNMKVR AGRGFTLEEL KAAGVSRRAVA STIGIPVDHR RRNRSEESLQ RNVERIKVYL  
AHLIVFPRKA GQPKKGDATD VSGAEQTDVA AVLPTIQEAV EEAKPITEEA KNFNAFSTLS  
NERAYARYAG ARAAFQKKRA EEAEAKKK (208 a.a.)

p29

分裂酵母 60Sリボソームタンパク L7b

MAVASSIVPS KEQIFAPESL LKKKKTQEQS REQFVAAAAE KKAQQKKRE LIAKRAESYD  
AEYRKAEREQ IELGRKARAE GNYVVPDEIK LVFVIRIRGI NNIPPKARKI MQLLRLIQIN  
NGVVFKNKA TKEMLQWVEP YVTYGIPNLK TVRELLYKRG FGKVNKQRIA LSDNAITEEA  
LGKYSILSIE DLIHEIYTVG PNFKQANFI WPFQLSSPLG GWRDRKFKHF IEGGDAGKRD  
EHINSLVRKM L (251 a.a.)

図34. p32、p29は60Sリボソーム構成タンパク質である

p32、p29を免疫沈降で回収し、部分ペプチド配列を決定した（理化学研究所の龍尾博士との共同研究による）。データベース検索を行ったところ、p32、p29の部分配列はそれぞれ分裂酵母60SリボソームL13、L7bサブユニットの配列と一致した。配列決定した部分を下線で示した。共に塩基性でリジン、アルギニン残基に富むタンパク質である。



れるタンパク質のバンドが検出された。66kd付近のバンドはMis6-HAに由来するもので、一方、31kd近傍の2つのバンドがMis6と結合しているタンパクに由来すると考えられる（上からp32、p29と命名）。これらのタンパクの正体をつきとめるために、大量スケールで免疫沈降を行い、理化学研究所の瀧尾博士の協力を得て、p32、p29の部分ペプチド配列を決定した。残念ながら満足なサンプルが調製できなかったために不確定な要素が残るものの、驚いたことにp32の部分配列は分裂酵母60Sリボソームタンパク質L13と一致し、一方p29の配列は60Sリボソームタンパク質L7bと一致した（図34）。リボソームタンパクL13、L7bはそれぞれ208アミノ酸、251アミノ酸のタンパク質で、ともにリジンとアルギニンに富み、等電点は塩基性である。真核生物のリボソームは60Sサブユニットと30Sサブユニットから成り立っているが、L7、L13はどちらも60Sサブユニットの構成タンパク質である。リボソームの構成タンパク質が動原体タンパク質Mis6と免疫共沈するという結果はどういう意味があるのだろうか？一つにはこの結果がアーティファクトであるという可能性も考えられる。Mis6も塩基性タンパク質であり、L7、L13も塩基性タンパク質である。免疫沈降の際に、DNAやRNAなど酸性のポリマー分子を介して凝集塊を形成したのかもしれない。あるいは、リボソームタンパク質は細胞内の量が多いので、サンプル調製の不具合でコンタミネーションが起こったのかもしれない。

しかしながら、近年リボソームタンパク質がタンパク合成以外にも様々な生体機能を担っていることを示す報告がいくつも得られている（Wool 1996）。Mis6と共沈したL7は核酸結合能を持っており、細胞周期進行やある種のタンパク発現調節に関与していることも示唆されている。リボソームタンパクL7、L13は、分裂酵母ではMis6と結合して動原体機能に関与しているのかもしれない（考察参照）。

## 分裂酵母*mis12*変異は染色体不均等分配を引き起こす

高橋によって単離された12の*mis*変異体のうち*mis12-537*変異体もやはり、*mis6*変異体と同じく、制限温度で不均等核分裂の表現型を示す（Takahashi et al, 1994、図35）。そこで並行して*mis12*変異体の解析も行った。この変異体を許容温度から制限温度に移すと、4時間後より生存率が下がり始め、10時間後には3%にまで低下した（図35パネルC）。細胞濃度は8時間後まで指数関数的にふえ、約1.3倍にまで増加した（図35パネルA）。DAPI染色すると、4時間後には2核の細胞のうち4割の細胞で娘核の大きさが不均等になっており、6時間後には8割以上の細胞が不均等核分裂を引き起こしていた（図35パネルB、D）。図36は*mis12*変異体中での微小管染色像である。制限温度で6時間培養後、固定して免疫染色法により微小管を染色した。分裂中期の紡錘体長が野生株に比べ若干長いような印象があるものの（図36パネルB 野生

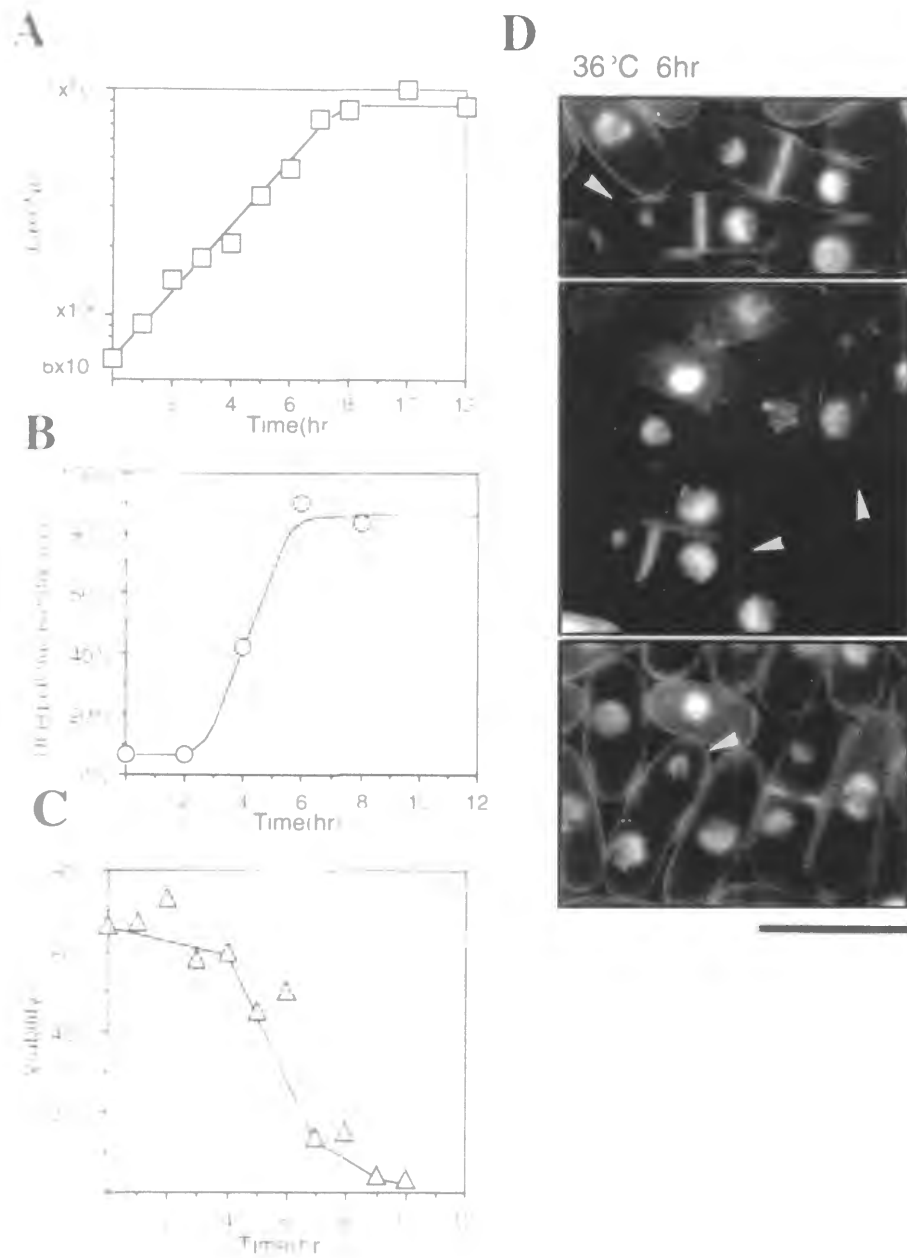


図35. *mis12-537*変異は制限温度で不均等核分裂を引き起こす

YPD培地で培養した*mis12-537*変異体を制限温度36度に移し、経時的に細胞濃度 (A)、表現型 (B、D)、生存率 (C) を測定した。パネルDには制限温度で培養6時間後のDAPI染色像を示した。バーは10 $\mu$ m。白矢頭で示したように、姉妹核の大きさに違いの生じる不均等核分裂を引き起こした細胞が観察された。(B) には2核の細胞のうち、姉妹核の大きさに違いがある細胞の頻度をグラフ化した。4時間後より不均等核分裂の頻度が増加し、最終的に8割以上に達する。生存率は4時間後より減少しはじめ、10時間後には3%となった。

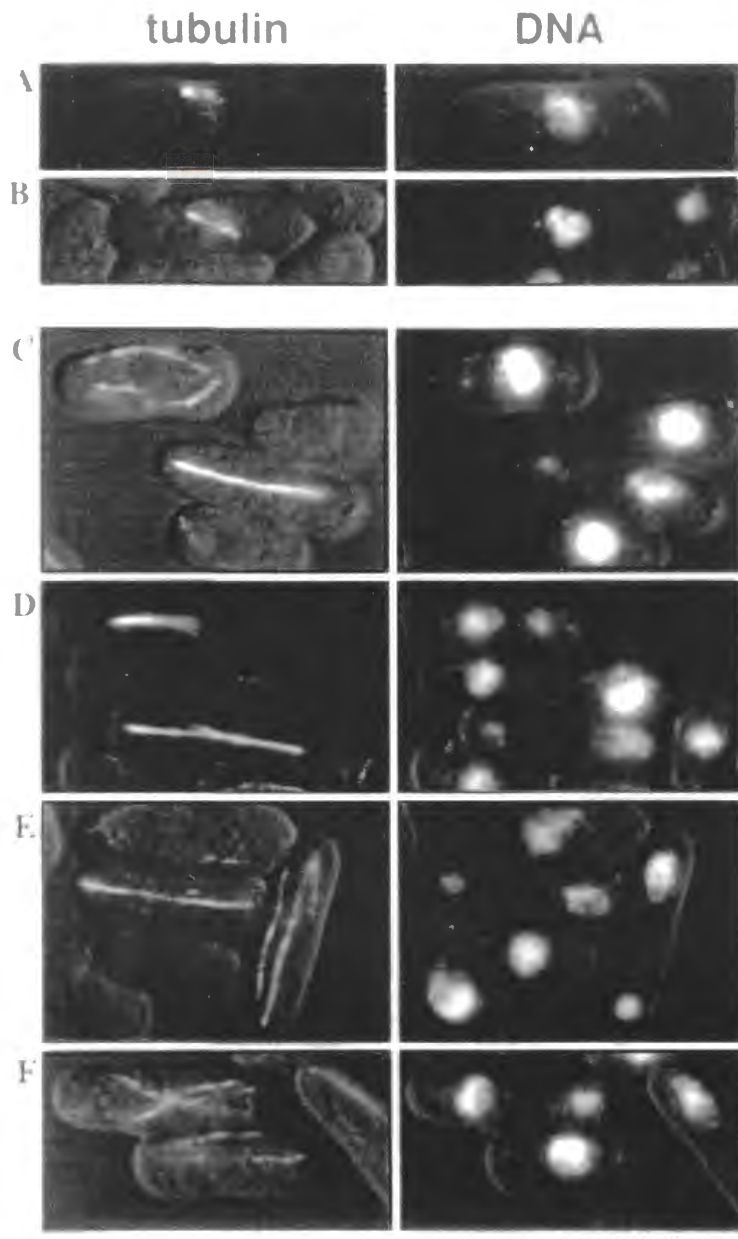


図36. *mis12*変異体の微小管染色像

*mis12*変異体を制限温度で6時間培養後（YPD培地）、アルデヒド固定して免疫染色法で微小管を染色した。AはM期前中期、BはM期中期の細胞と思われる。Bでは野生株に比べ若干、紡錘体長が長いように思われる。C-EにはM期後期、FにはM期終期の細胞を示した。野生株にくらべ、微小管構造に大きな異常は観察されなかった。

*h<sup>+</sup> mis12-537* 36°C 6hr

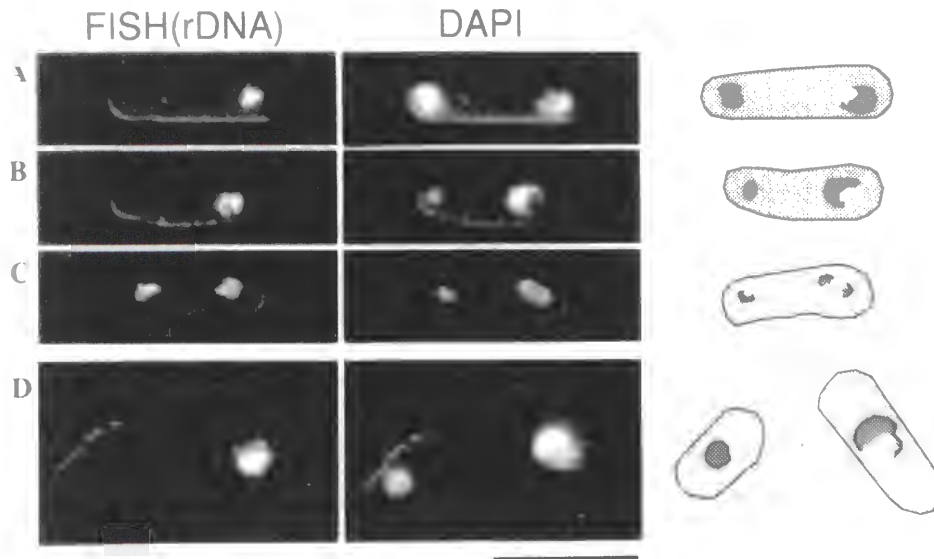


図37. *mis12*変異体では染色体の不均等分配が起こっている

制限温度で6時間培養 (YPD培地) した*mis12*変異体を固定後、rDNAをプローブとしたFISH法で第3染色体の様子を解析した。rDNAはリボソームRNAをコードする遺伝子で第3染色体の両端にクラスターを形成している。

A、Bのように第3染色体が娘核の一方にしか分配されていない細胞や、Cのように第3染色体は均等に分配されているものの姉妹核の大きさに明らかな違いのあるような細胞が観察された。またDに示すように一核の間期細胞でも第3染色体を含むものと含まないものがあらわれた。バーは10 $\mu$ m。

制限温度で4時間培養した場合には2核の細胞のうち18%で、6時間培養した場合には37%で第3染色体の不均等分配が起こっていた。

株では $2.3\ \mu\text{m}$ 程度であるのに対し、この細胞では $3.2\ \mu\text{m}$ ）、その点を除いて紡錘体および細胞質微小管に大きな異常はなかった。

*mis12*変異の不均等核分裂が染色体の不均等分配に起因するの否かを検討するために、rDNAをプローブとしたFISHを行い、第3染色体の分配の様子を観察した。図37に示すとおり、*mis12*変異体でも第3染色体の不均等分配が起こっていた。制限温度で培養後6時間目には、2核の細胞のうち約4割で第3染色体が不均等に分配されていた。この結果は、*mis6*変異体と同様に、制限温度で*mis12*変異体でも染色体の不均等分配が起こり、それが原因となって姉妹核の大きさに差異が生じるということを示している。

## Mis12タンパク質は動原体中央領域に局在する

五島が*mis12*<sup>+</sup>遺伝子座を同定し、染色体歩行法で*mis12*<sup>+</sup>遺伝子を単離した。*mis12*<sup>+</sup>遺伝子は259アミノ酸のタンパク質をコードしており、データベース検索を行ったところ、出芽酵母、糸状菌などに相同遺伝子が見つかった。GFP融合タンパク質を作成し、その局在を決定したところ、Mis6と同様に細胞周期を通じて動原体領域に局在していた（五島、修士論文、準備中）。先に述べたように、分裂酵母の動原体は対称に配置したotr、imr、cntの3つの配列要素から成り立っている（図24パネルA）。Mis12タンパク質がその3つの要素のうちどれに結合しているかを決定するため、CHIP法による解析を行った（図38パネルB）。ゲノム中の*mis12*遺伝子をHAエピトープを付加した*mis12*<sup>+</sup>-HA遺伝子に置換した株を作成し（図38パネルA、五島、修士論文、準備中）、これを解析に用いた。

PCRによる解析の結果、cnt1およびimr1配列はMis12タンパク質とともに免疫共沈するが、otr配列および*lys1*<sup>+</sup>遺伝子配列は共沈しないことが明らかとなった。この結果は、Mis12タンパク質もMis6と同様、動原体の中央領域へ特異的に結合していることを示している。なお、M期中期で停止する*cut9*変異を用いた場合でも同様の結果が得られたので、Mis12はM期においても動原体に結合しているものと思われる（図39）。これはGFPを用いた生細胞中でのMis12の観察と矛盾しない。

## *mis12*変異体では動原体特異的クロマチン構造に異常がある

先に述べたように、動原体の中央領域（imr、cnt）は特殊なクロマチン構造をしており、*mis6*変異体で

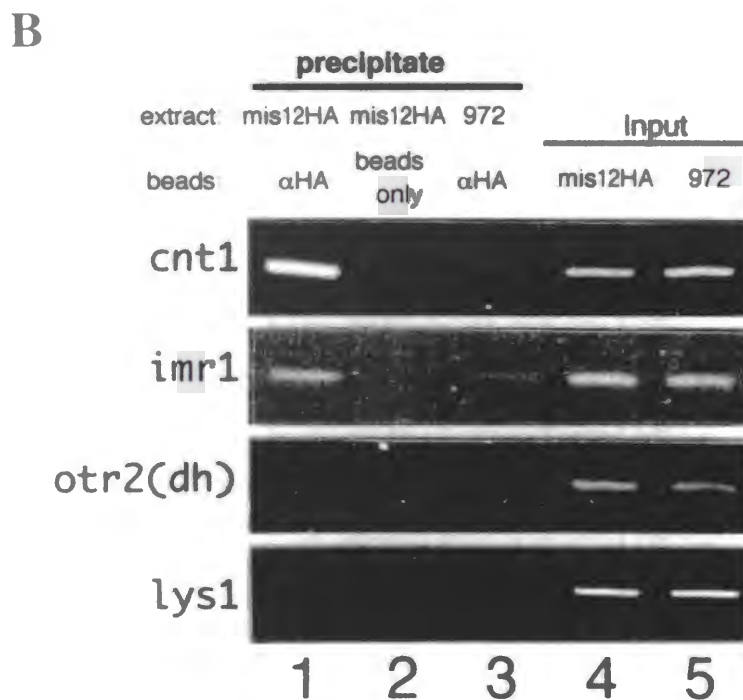
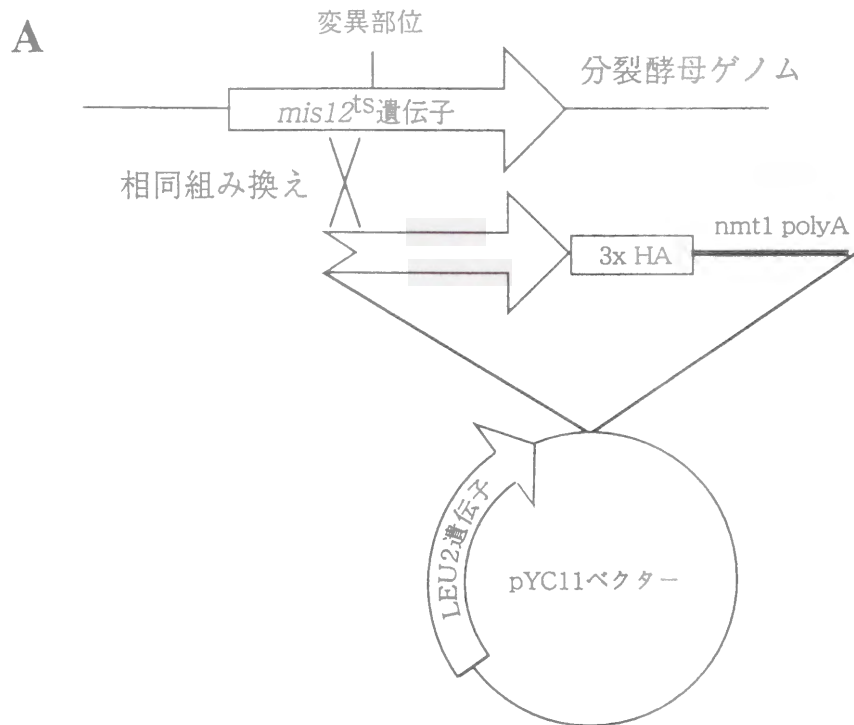


図38. Mis12は動原体中央領域に結合する

(A) *mis12*-HA組み込み体の作製。5'側を欠失した野生型*mis12*遺伝子にHAエピトープおよび*nmt1*遺伝子polyAシグナルを付加した遺伝子断片を作製し、組み込みベクターpYC11につないだ。*mis12*変異株に形質転換し、温度感受性を相補し、かつロイシン非要求性になったコロニーを選択した。プラスミドが正しい位置に組み込まれていることは四分子解析で確認した。なおこの株は五島によって作製された。

(B) *mis12*-HA組み込み体を用いてCHIP解析を行った。図23を参照。

レーン1; *mis12*-HA遺伝子組み込み株から得た抽出液から抗HA抗体を用いて免疫沈降をおこなった。*cnt1*および*imr1*プライマーを用いた場合にのみPCR増幅産物が得られた。

レーン2、3; 免疫沈降のネガティブコントロール。2では、抗体を用いずプロテインAセファロースビーズのみで免疫沈降を行い、3では*mis12*-HA遺伝子を含まない野生株(972株)からの抽出液を用いて免疫沈降を行った。いずれの場合もバックグラウンドレベルの増幅産物しか得られなかった。

レーン4、5; PCR反応のポジティブコントロール。*mis12*-HA遺伝子組み込み株(レーン4)、あるいは972株(レーン5)からえた抽出液をテンプレートとしてPCRを行った。

*cut9 mis12<sup>+</sup>-HA*

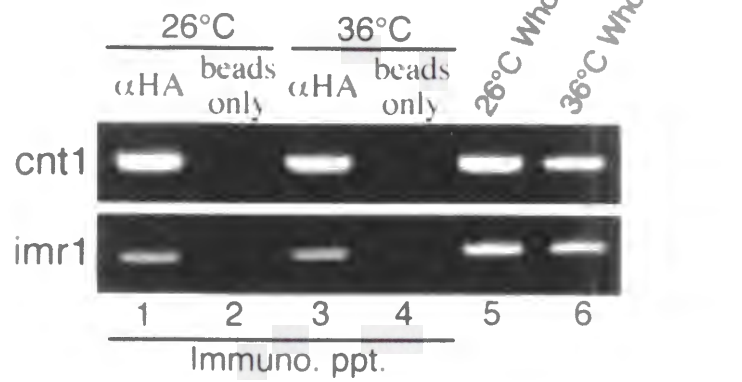


図39. M期中期停止変異株中でもMis12は動原体に結合している

かけあわせこより、*cut9*変異株に*mis12<sup>+</sup>-HA*遺伝子を組み込んだ株を作製し、許容温度（26度、レーン1、2、5）あるいは制限温度（36度、レーン3、4、6）で4時間培養後CHIP法による解析を行った。レーン1~4は免疫沈降物をテンプレートとしてPCRを行った結果で、レーン2、4は抗体を加えずに免疫沈降を行ったネガティブコントロール。レーン5、6は細胞抽出液をテンプレートとしたポジティブコントロールである。レーン3に見られるように*cut9*変異株を制限温度で培養してM期中期中で停止させてもMis12は動原体DNAと共沈してきた。

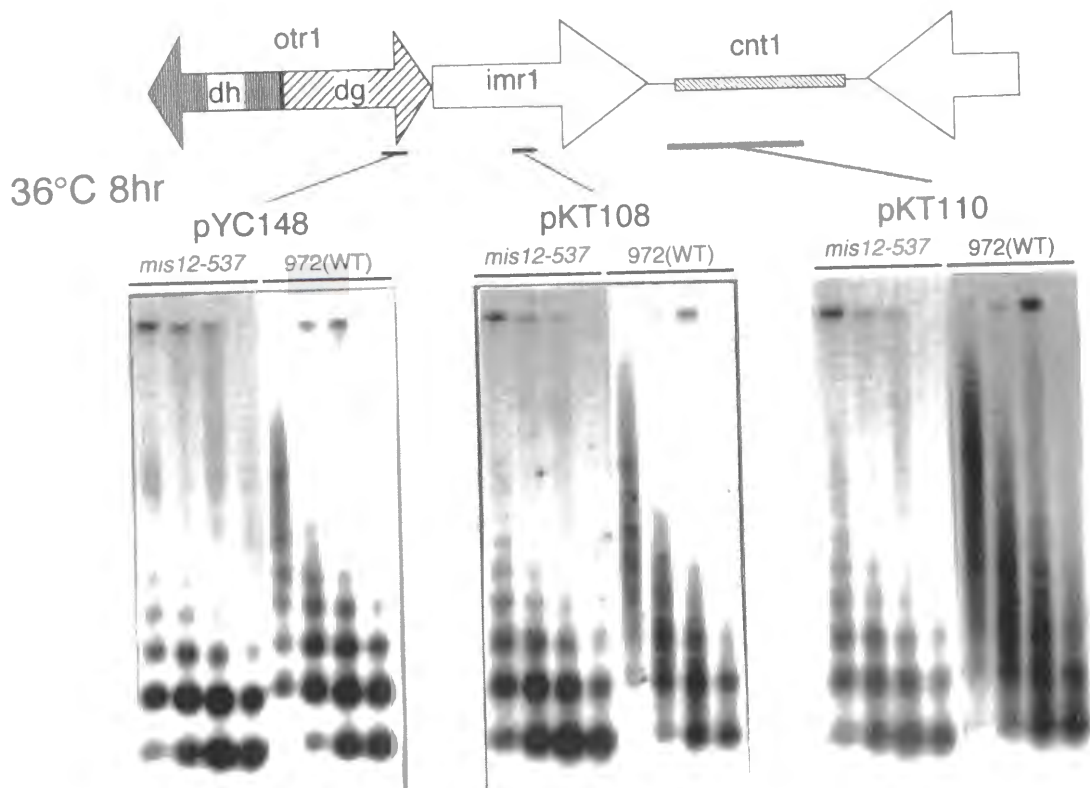


図40. *mis12*変異体では動原体特異的クロマチン構造が崩壊している

*mis12*変異体あるいは野生株(972株)をYPD培地、36度で8時間培養後、図28に示したのと同様の実験を行い、動原体中央領域のクロマチン構造を変異株と野生株と比較した。電気泳動は4レーンが1セットでヌクレースによる消化時間が左から順に1、2、4、8分となっている。

*otr*領域(pYC148)をプローブに用いた場合は、変異株、野生株ともにはしご状のパターンが得られた。これは臭化エチジウム染色による全クロマチンDNAのパターンと同一であった(データは示さない)。*imr*(pKT108)、*cnt*(pKT110)をプローブにした場合は、野生株ではスメアー状のパターンが得られたが、変異株では、はしご状のパターンが観察された。



はその構造が異常になっていた（図29）。*mis12*変異体は*mis6*変異体と類似の表現型を示し、かつMis12タンパク質はMis6と同様の動原体DNA領域に結合していた。そこで*mis12*変異体中에서도動原体特異的クロマチン構造に欠損が生じるのではないかと考え、マイクロコッカルヌクレースによる部分消化実験を行った。図40に示したように制限温度で8時間培養すると、*mis12*変異株ではimr、cnt領域でスメア状のパターンが消失し、ヌクレオソームが規則的に整列していることを示すはしご状のパターンが現れた。otr領域の消化パターンは野生株と比べて変化はなかった。この結果は、*mis12*変異体中에서도*mis6*変異体と同様に動原体特異的クロマチン構造に異常が生じることを示している。

## Mis12は細胞周期を通じて5-10Sの複合体を形成している

野生株、*cut9*、*cut4*、*cdc10*変異株の細胞抽出液をしょ糖密度勾配遠心で分画し、Mis12タンパク質の沈降係数を調べた（図41）。非同調の野生株細胞の大半はG2期の細胞であり、制限温度で培養した*cut9*、*cut4*変異体はM期中期、*cdc10*はG1期の細胞である。抗Mis12ポリクローナル抗体によるウエスタンブロットでMis12タンパク質を検出した。どの細胞抽出液中でもMis12は2-4レーン目にピークを持つような緩やかな分布パターンを示した。マーカーに用いたBSA（4.5S）は2レーン目に存在していたので、Mis12は細胞周期を通じて5-10S程度の複合体を形成しているものと考えられる。球形の複合体と仮定すると、これは分子量100-200kdの複合体である。*mis12*-HA組み込み体より免疫沈降法でMis12-HA複合体を精製し、複合体に含まれるタンパク質の同定を試みた。沈降物をSDSポリアクリルアミドゲルで分離し、銀染色によりタンパク質を染色した。図42に示すとおり、38kdのMis12-HAタンパク質以外に、90kd、66kd、50kd、45kd、32kd、30kdのタンパク質が、Mis12-HA免疫沈降物の中に特異的に含まれていた。これらのタンパク質が何であるかはまだ不明であるが、Mis12の分子機能を知る上で重要な手がかりとなると思われる。

## Mis6、Mis12は免疫共沈しない

*mis6*、*mis12*変異体の表現型はともによく似ている。またMis6、Mis12タンパク質はともに動原体中央部のcnt、imr領域に結合している。これらの結果を踏まえると、Mis6、Mis12タンパク質は物理的に結合しているのかもしれない。しかしながら、しょ糖密度勾配遠心では、両者の分布パターンは、オーバーラップ

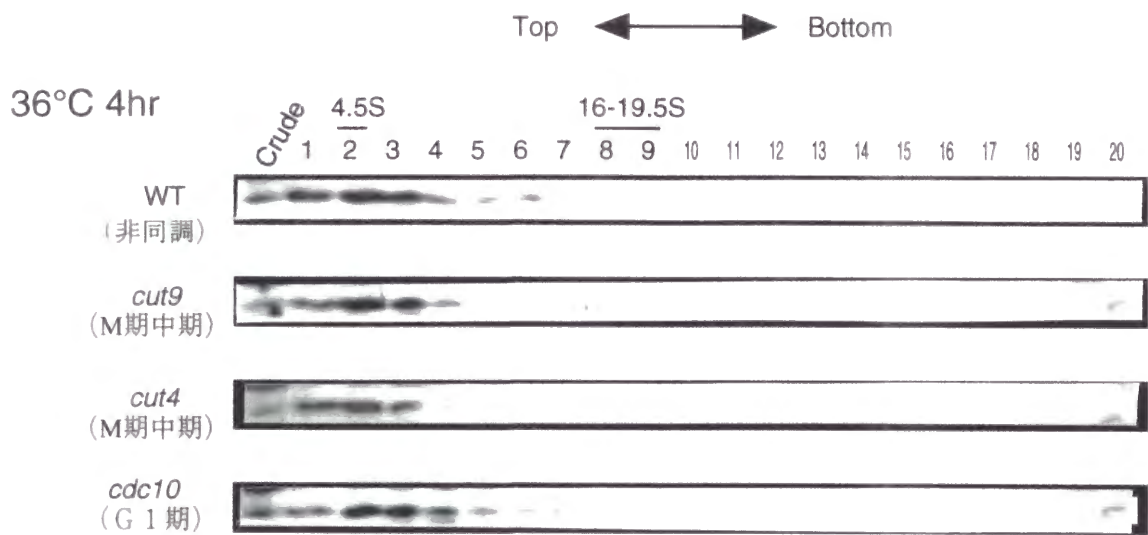


図41. Mis12は細胞周期を通じて5-10Sの複合体を形成している

野生株 (WT)、*cut9*、*cut4*、*cdc10*を36度で4時間培養してからタンパク抽出液を調製し、ショ糖密度勾配遠心後、20に分画し、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、抗Mis12ポリクローナル抗体によるウエスタンブロットでMis12タンパク質を検出した。非同調野生株の大半はG2の細胞で、*cut9*、*cut4*はM期中期、*cdc10*はG1期の細胞が大半を占める。

どの変異株を用いた場合もMis12は2、3レーンにピークをもつような分布パターンを示した。密度勾配遠心の沈降係数マーカーとして、BSA (4.5S)、サイログロブリン (16-19.5S)を用いた。マーカーの位置は図中に示した。

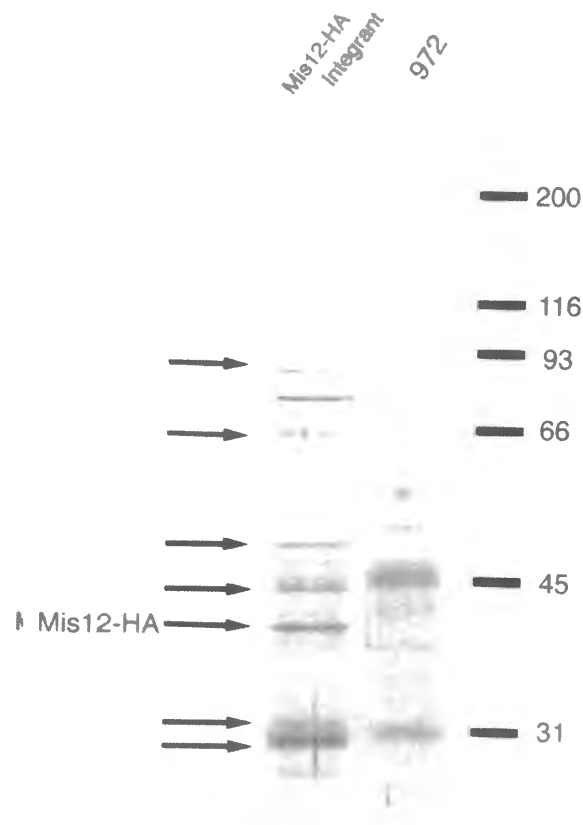


図42. Mis12と結合するタンパク質の同定

Mis12-HA組み込み株（左レーン）あるいは野生株（右レーン）から細胞抽出液を調製し、抗HAモノクローナル抗体（16B12）で免疫沈降を行い、沈降物を10%ポリアクリルアミドゲルで泳動後、銀染色でタンパク質を検出した。抽出バッファーとして25mMHEPES-KOH（pH7.5）,150mM NaCl,10%glycerol,0.2%NP-40を用いた。

Mis12-HA組み込み株からの抽出液を用いたときにのみ検出されるバンドが7本検出された（矢印で示す）。推定分子量は上から順に90kd、66kd、50kd、45kd、38kd、32kd、30kdで、38kdのバンドはMis12-HA自身だと思われる。残りの6本のバンドはMis12と結合しているタンパクに由来するものと予想される。

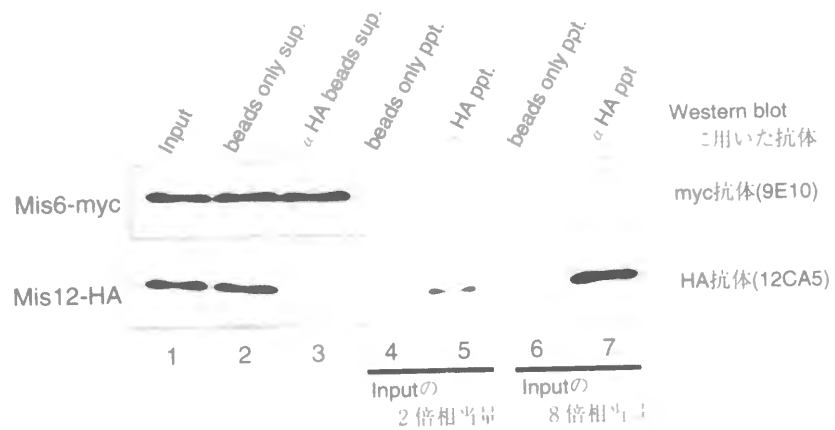


図43. Mis6、Mis12は複合体を形成しない

かけあわせによりMis6-myc Mis12-HA 二重組み込み体を作製し、細胞抽出液を調製して抗HA抗体でMis12-HAタンパク質を免疫沈降した。レーン1には抽出液、2、3は免疫沈降後の上清、4~7は沈降物を電気泳動し、ウエスタンブロットでMis6-myc、Mis12-HAを検出した。レーン2、4、6は抗体を加えずにプロテインAセファロースビーズのみで免疫沈降を行ったネガティブコントロールである。レーン4、5にはレーン1~3の2倍、レーン6、7には8倍に相当する量のサンプルをロードした。

レーン1と3のMis12の量を比較すると約6割のMis12が免疫沈降物として回収されたと思われる。しかしながらMis6-mycはほとんど上清に残っており(レーン3)、沈降物の中には全く検出できなかった(レーン5、7)。

なおレーン5、7で沈降効率とサンプル量から計算してMis12のタンパク量が減少しているようだが、これは免疫沈降後のビーズの洗浄で一部のMis12タンパクが遊離したためと考えられる。

はあるものの異なっており、また *mis6*、*mis12* 両遺伝子間で遺伝的相互作用は観察されなかった。そこで、Mis6、Mis12タンパク質が物理的に相互作用するの否かを検討するために次の実験を行った。

ゲノム上の *mis6*、*mis12* 遺伝子をそれぞれ *mis6*<sup>+</sup>-myc、*mis12*<sup>+</sup>-HA 遺伝子に置換した株 (*mis6*-myc *mis12*-HA 二重組み込み体) を作成し、Mis12タンパク質を抗HA抗体による免疫沈降法で回収した。沈降物をSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、抗myc、抗HA抗体を用いたウエスタンブロット法により Mis6、Mis12タンパク質を検出した。図43にその結果を示した。免疫沈降前の抽出液 (Input) と沈降後の上清 (Sup) に含まれる Mis12タンパクの量を比較したところ、約 6 割程度の Mis12が沈降物として回収できた。しかしながら、このとき Mis6は上清に残っており、沈降物中には検出されなかった。これは、少なくとも実験に用いた条件では、Mis6、Mis12の間に物理的相互作用は検出できないことを示している。両者を細胞内で過剰発現させて増量し、免疫沈降を行ってもやはり相互作用は観察できなかった (データは示さない)。

## *mis12*変異体中でも Mis6タンパク質は動原体に結合している

Mis6と Mis12の物理的相互作用は検出できなかったため、次に Mis6タンパク質の動原体局在が Mis12のタンパク機能に依存するの否かをCHIP法によって検討した。*mis6*<sup>+</sup>-HA 遺伝子を組み込んだ *mis12* 変異体を用いて、CHIP解析を行った。PCRプライマーはおおよそ等間隔に *cnt1* 配列中に4カ所、*imr1* 配列中に3カ所設計した。図44に示すとおり、*mis12* 変異体を制限温度で6時間培養しても、Mis6の動原体への結合能は野生株の場合と大差はなかった。野生型 Mis6-GFPタンパク質を *mis12* 変異体中で観察したところ、やはり細胞周期を通じて動原体領域に局在していた (データは示さない)。これらの結果は Mis12が不活性な状態でも Mis6は動原体領域に結合し得ることを示している。予備的な観察によると変異型 Mis12-537-GFPタンパク質は制限温度では動原体に局在しなくなる。Mis6タンパク質は Mis12とは独立して動原体に結合しているのであろう。また先に述べたように *mis12* 変異体では動原体特異的クロマチン構造が崩壊しているので、Mis6の動原体への結合はクロマチン構造には依存しないと考えられる。

予備的な結果ではあるが、上述の実験とは反対に *mis6*-302変異体中で野生型 Mis12の動原体結合をCHIP法で解析したところ、共沈量は若干低下したように見えるものの、制限温度でも Mis12タンパク質と動原体DNAは免疫共沈した (データは示さない)。Mis12の動原体結合も Mis6の分子機能には依存しないらしい。

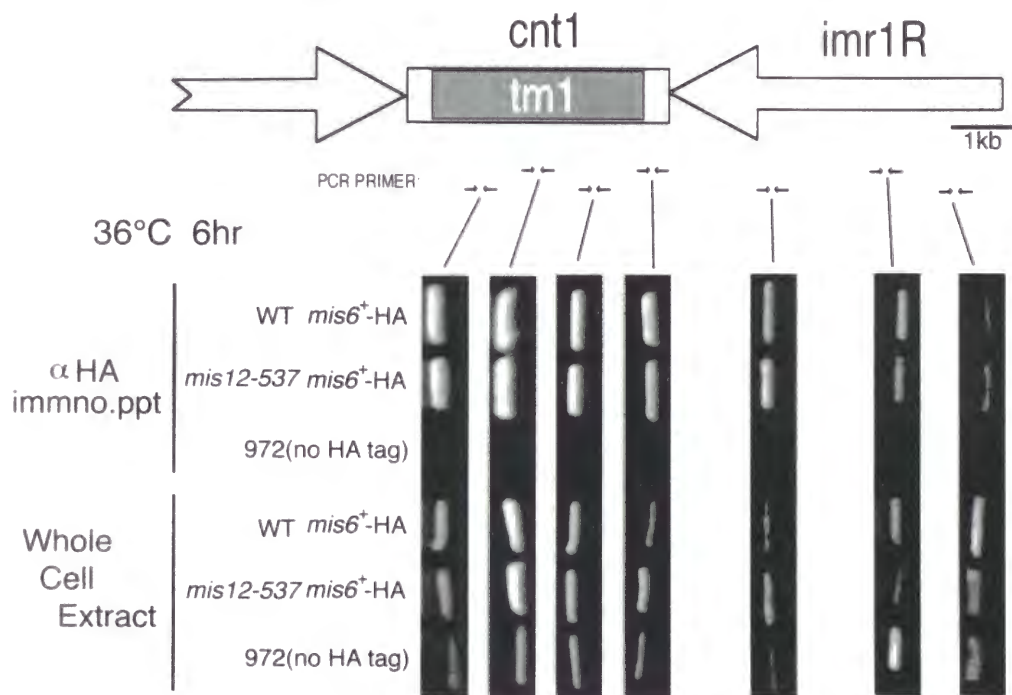


図44. *mis12*変異体中でもMis6は動原体に結合している

野生株に *mis6*<sup>+</sup>-HA 遺伝子を組み込んだ株 (WT *mis6*<sup>+</sup>-HA と表記)、*mis12* 変異株に *mis6*<sup>+</sup>-HA 遺伝子を組み込んだ株 (*mis12-537 mis6*<sup>+</sup>-HA と表記) および HA エピトープを含まない 972 野生株をもちいて、36 度で 6 時間培養後、CHIP 解析を行った。上 3 レーンが免疫沈降物をテンプレートとして PCR を行った結果であり、下 3 レーンは細胞抽出液をテンプレートとした PCR のポジティブコントロールである。PCR のプライマーは図に示したとおり、1-2 キロ塩基対間隔で 7 箇所設計した。

WT *mis6*<sup>+</sup>-HA 株と *mis12-537 mis6*<sup>+</sup>-HA 株を比較すると、調べた限り動原体 DNA はどの領域も同程度 Mis6-HA と共沈した。

## 第一部 考察

### Mis6、Mis12は独立に機能して動原体クロマチンを形成する

本研究により、分裂酵母Mis6、Mis12タンパク質が染色体分配の正確性を保障する上で決定的な役割を果たしていることが明らかとなった。*mis6*および*mis12*遺伝子は生育に必須で、遺伝子破壊株は染色体均等分配に欠損を示し致死となった。直接的もしくは間接的に両タンパク質は動原体中央領域 (*imr*、*cnt*) に結合し、この領域のクロマチン構築に影響を与えているらしい。*mis6-302*および*mis12-537*変異体は制限温度で互いによく似た表現型を示した。この類似性は両タンパク質が同じような分子機能を果たしている可能性を示唆している。しかしながら、これらの分子が直接的に結合して複合体を形成している可能性は低い。細胞内での両者の沈降係数は異なっており、細胞周期を通じて一致することはなかった。免疫沈降法によっても両者が共沈することはなかった。また*mis12*変異体中でもMis6は動原体領域に結合しており、一方、予備的な結果ではあるが*mis6*変異体中でもMis12は動原体に結合しているようである。これらの結果から考えれば、Mis6とMis12はそれぞれ違った分子複合体に含まれており、互いに独立に動原体中央部へ結合するものと思われる。どちらか一方に変異が生じて異常が生じるので、動原体クロマチンの形成にはその両者の分子複合体の機能が必要となるのだろう。Mis6、Mis12はともに*imr*、*cnt*領域全体に結合するものの、より精密に結合部位を特定すれば、両者は違った部分に結合しているのかもしれない。CHIP法を用いて得られた予備的な結果によると、Mis6は比較的均等に*imr*、*cnt*領域全域に結合しているのに対し、Mis12は*cnt*の中央部により多く結合している傾向があった（データは示さない）。本研究で用いたCHIP法の解像度は1キロ塩基対程度であるが、ヌクレオソームに結合するDNAの長さが200塩基対以下であることを考えると、両者の結合部位の違いを見分けるにはもっと解像度の高い方法を用いることが必要なのであろう。あるいは、全く同じ部位に結合していても、Mis6、Mis12は機能するタイミングが異なっているのかもしれない。本研究で示したように、Mis6はG1/S期に働くと思われるが、Mis12はG1期以前に機能しているらしい（五島、修士論文 準備中）。窒素源枯渇によるG1期から制限温度に移した場合、*mis6*変異体では初めのM期で染色体不均等分配が起こったが、*mis12*変異体の場合は1回目は正常で次のM期で不均等分配が起こる。

## Mis6、Mis12は動原体領域に結合して特異的クロマチン構造を形成する

imr、cnt配列のクロマチン構造は、これらの配列が機能的な動原体に含まれるときに限って特殊化する。すなわち、cnt配列を中央としてimr配列が対称的に位置し、さらにその外側にotr配列が配置する場合に限って動原体DNAは機能的となり、cnt、imr領域のクロマチン構造が特殊化する。これらの配列（の一部）を単独でベクターにつないで分裂酵母に導入しても、それは動原体として機能せず、その配列上にはヌクレオソームが規則正しく並んだ通常のクロマチン構造が形成される（Takahashi et al. 1992）。cnt1配列の一部を多コピーベクターにつないで導入しても、Mis6の局在に変化はなかった（データは示さない）。Mis6、Mis12は機能的な動原体配列にのみ結合するのだろう。各動原体のcnt、imr領域の塩基配列はAまたはTに富むという性質は似ているが、基本的に相同性はない。コンピューター検索を用いてotr配列とcnt、imr配列を比較してみたが、後者の配列にのみ頻出するような短いモチーフ配列は見つけられなかった（データは示さない）。おそらくMis6、Mis12は塩基配列そのものを識別して動原体領域に結合しているのではないだろう。両タンパクは大域的なDNAの高次構造のようなものを識別しているのではないだろうか。Takahashi et al. 1992によれば、対称に配置した左右のimr配列では100%の相同性が維持されている。例えば、動原体領域では左右のimr配列がよりあわさって4本鎖DNAが形成され、cnt配列がループとなった"ステムループ"構造が形成されるのかもしれない。両タンパクはそのような構造を識別するのかもしれない。

Mis6、Mis12と動原体DNAとの結合が直接的なのか、あるいは間接的なのかは明らかではない。両タンパク質と動原体DNAとの結合を試験管内で観察できれば、明確な解答が得られるだろう。しかしながら動原体DNAは数十キロ塩基対と巨大なので、現在のところそのような解析は困難である。

Mis6、Mis12は動原体特異的クロマチン構造を識別して結合しているのでもないだろう。動原体クロマチン構造が崩壊しているmis12変異体中でもMis6は動原体に結合していた。むしろ両タンパク質がcnt、imr配列に結合することによって、動原体クロマチン構造への変換が誘導されると思われる。マイクロコッカルヌクレースの部分消化のパターンを詳細に観察するとcnt、imr領域にもヌクレオソーム単量体、二量体に相当すると思われるバンドが観察できる。つまり、cnt、imr領域にもヌクレオソームは形成されているのだろう。ただ、それが規則的に並ばず、間隔が不規則に変化しているためスメア状のパターンが現れると考えられる。Mis6は細胞あたり2000分子存在しており、また予備的な実験によれば、Mis12タンパク質は細胞あたり2000-3000分子存在していた（データは示さない）。すべてが動原体に結合しているとする、約200塩基対につき約4分子結合していることになる。モノヌクレオソームに巻き付いているDNAは約200塩基対なので、Mis6あるいはMis12が物理的にヌクレオソームに作用していると考えても矛盾は無い。また分裂酵母の機能的動原体のヒストンは脱アセチル化されていることが知られているが（Ekwall et al.



1997)、あるいはMis6、Mis12はアセチル化やリン酸化もしくはユビキチン化といったヌクレオソームの化学修飾に関係しているのかもしれない。

変異型Mis6、Mis12タンパク質は制限温度では動原体に結合できなくなるようである。また動原体に局在できない欠失変異Mis6タンパクが温度感受性変異を相補することもなかった。両タンパク質が*imr*、*cnt*配列へ結合することが、動原体クロマチンの形成には必須であるらしい。

## 動原体クロマチンは姉妹動原体をつなぐコネクターなのかもしれない

では、動原体中央領域に形成された動原体特異的クロマチンは、姉妹染色体の均等分配を保障する上でどのような働きをしているのだろうか？一つの可能性は、特殊化したクロマチン構造が動原体複合体形成の“基礎”になっているということである。すなわち*mis6*、*mis12*変異体では正常な動原体複合体が形成されないのかも知れない。分裂酵母*swi6*遺伝子破壊株では動原体ヘテロクロマチン形成に異常が生じ、正常な動原体複合体が形成できなくなると考えられている。*swi6*遺伝子破壊株ではM期に紡錘体とうまく結合できず、紡錘体中央に取り残された染色体 (lagging chromosomeと呼ばれる) が高頻度で観察される (Ekwall et al. 1995)。しかしながら、*mis6*、*mis12*変異体では制限温度でもlagging chromosomeは観察されなかった。それゆえ、両変異株でも動原体は紡錘体に結合し、その上を移動する能力を保持していると思われる。変異株中では姉妹染色体を均等に分配する機能のみが欠落しているのである。この点から考えると、*mis6*、*mis12*変異体では動原体は紡錘体との両方向的結合が確立できないのかもしれない。*cut9mis6*二重変異株細胞中で動原体が紡錘体中央に集まらなかったという観察結果はこの推測を支持している。ほ乳類細胞での観察によれば、両方向的に紡錘体と結合した動原体は、速やかに紡錘体中央へ移動すると考えられている (Rieder and Salmon 1994、図45)。

両方向性結合を確立するための分子的機構についてはあまり分かっていないが、高等真核細胞の場合、M期中期に染色体が両方向性の結合を確立することは、姉妹染色体を均等に分配するうえで極めて重要である (Rieder and Salmon 1998)。*mis6*、*mis12*変異体では微小管と結合したり移動したりするための動原体複合体は正常に形成されているものの、両方向的結合が確立できなくなっているらしい。また、M期停止させた*cut9mis6*二重変異株細胞では、姉妹染色体が時期尚早に分離していると思われる像がしばしば観察された。この結果から推察すると、動原体クロマチンは両方向的結合が確立できるように、M期後期が開始するまで姉妹動原体を連結しておく「コネクター」として働いているのではないだろうか。Mis6の機能

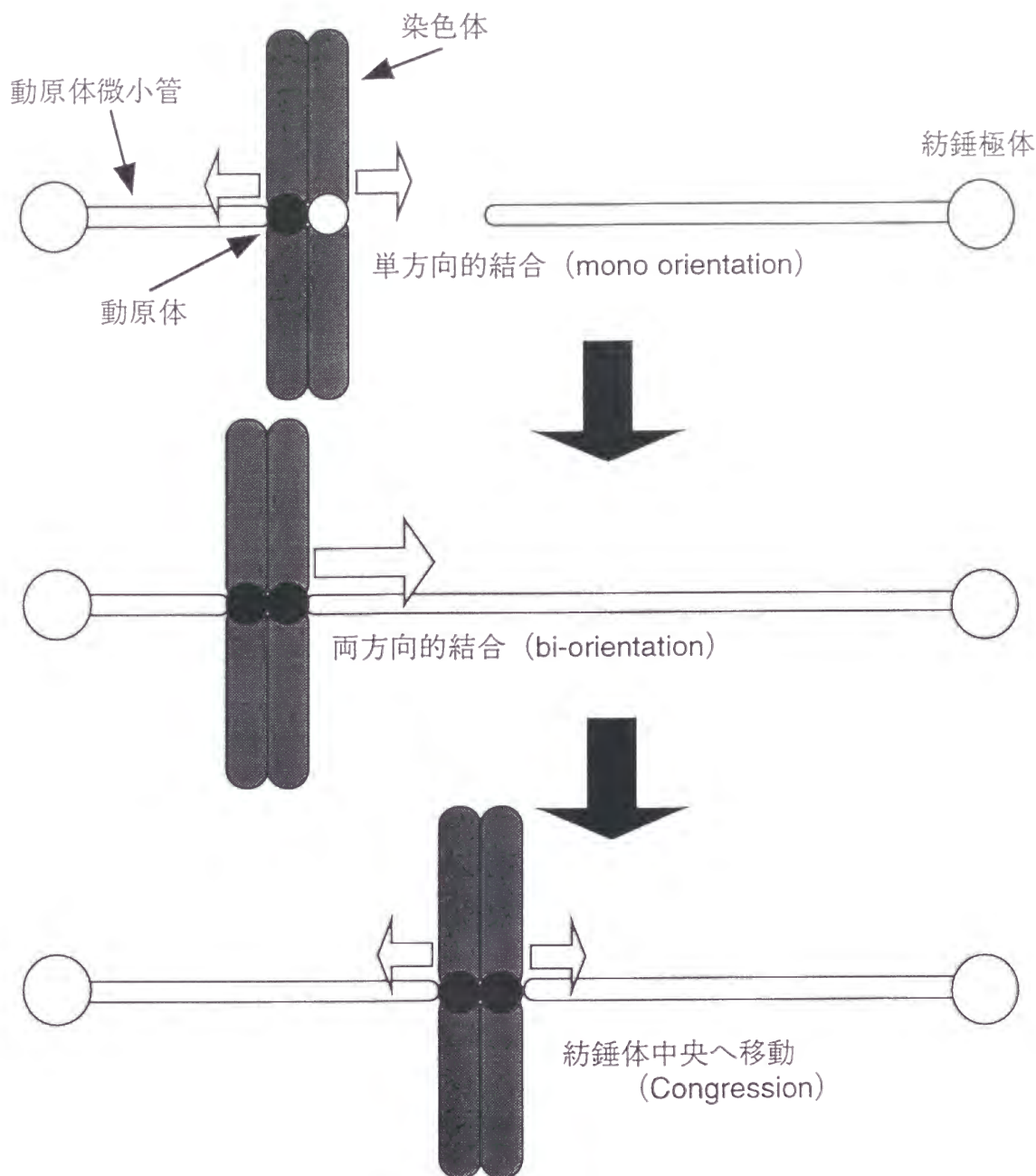


図45. 紡錘体と動原体の結合様式

M期になり紡錘体が形成されると、姉妹動原体のうちまず一方が動原体微小管と結合する。この状態は単方向的結合 (mono orientation) と呼ばれる。単方向的に結合した染色体は動原体モーターの移動方向が切り替わることによって、紡錘極体に近づいたりあるいは離れたりを繰り返す往復運動をする。やがて、もう一方の動原体が逆方向から伸びてきた微小管と結合すると両方向的結合状態 (bi-orientation) になる。両方向的に結合した染色体は紡錘体中央 (spindle equator) へ移動する。この移動はCongressionと呼ばれる。中央に移動した染色体は、後期が開始するまでの間、中央付近で往復運動をする。

以上のような動原体と紡錘体の相互作用に関する知見は、生きたほ乳類細胞のM期染色体運動を観察することで得られた (Rieder and Salmon 1994, Rieder and Salmon 1998)。動原体運動は、微小管の張力よりはむしろ動原体自身が有する微小管モーターが主たる駆動力となっていると思われる。モーターの移動方向はリン酸化、脱リン酸化によって制御されている可能性がある (Hyman and Mitchison 1991)。

が欠落すると、姉妹動原体間の連結がM期中期にはずれてしまうのだろう。それが原因で、紡錘体と動原体の結合がでたらめになるのかもしれない。同じ紡錘極体から伸びてきた動原体微小管が両方の姉妹動原体に結合してしまうこともあり得るだろう。このような異常な動原体と紡錘体の結合 (mal-orientation と呼ばれる) が生じれば、高頻度で染色体の不均等分配が起こると予想される (図46)。姉妹動原体間の連結は、動原体と紡錘体の結合が正常であるか異常であるかを識別するのに必須であるのかもしれない。野生株には、動原体と微小管の異常な結合が感知された場合にそれを解消する機構が備わっていると思われる。*mis6*、*mis12*変異体では異常が感知できず、mal-orientationが解消されないのかもしれない。あるいは、動原体間の連結は構造的な剛性を得るために必要で、一方の動原体が微小管と結合すると他方は必ず反対を向くように保障されるのかもしれない。

興味深いことに *mis6*、*mis12*変異体では、染色体分配は不均等になるものの、中期から後期への移行は起こるようである。すべての染色体が紡錘体と両方向的に結合するまで後期の開始を抑制しておく制御機構 (いわゆる中期チェックポイント) が、高等真核細胞には存在するらしい (序論参照)。そのような制御機構が分裂酵母にもあるとすれば、両変異体では動原体に結合した微小管の方向が検知できなくなっているのかもしれない。しかしながら両変異体でも染色体が紡錘体中央に取り残されることはないので、方向はどちらでも良いから微小管がすべての動原体と結合するまでは後期の開始は抑制されるのだろう。

## Mis6はG1/S期に機能して動原体クロマチンを形成する

それでは、*mis6*変異体が表現型を示すのに、なぜ制限温度でG1/S期を通過することが必要となるのだろうか。Mis6が動原体クロマチンを構築するためにはG1/S期に合成されるタンパクと相互作用する必要があるのかもしれない。あるいは、Mis6は動原体DNAの複製が開始するときに働くのかもしれない。しょ糖密度勾配遠心および免疫沈降の結果から考えるとMis6はリボソームL7、L13等を含むヘテロ多量体タンパク複合体を形成しているらしい。この複合体形成がG1/S期に起こり、いったん形成された複合体は次のG1/Sまでは安定に存在できるのかもしれない。ヒストンタンパクは染色体複製に先立って合成され、複製されたDNAは直ちにヌクレオソームを構成するものと思われる (Matsumoto et al. 1987)。Mis6は新規に合成されたヒストンに作用して動原体クロマチンを形成するのかもしれない。あるいは、動原体領域に通常のヒストンが取り込まれるのを阻止し、動原体特異的ヒストン (例えば哺乳細胞のCENP-Aに相当するもの) の取り込みを促進するのかもしれない。同調培養実験で明らかにしたように、変異体が表現型を示すためにはG1/S期を通過することが必要であるが、生存率が低下するのはその後のM期以降である。この結果は、

# 野生株

# *mis6*、*mis12*変異体

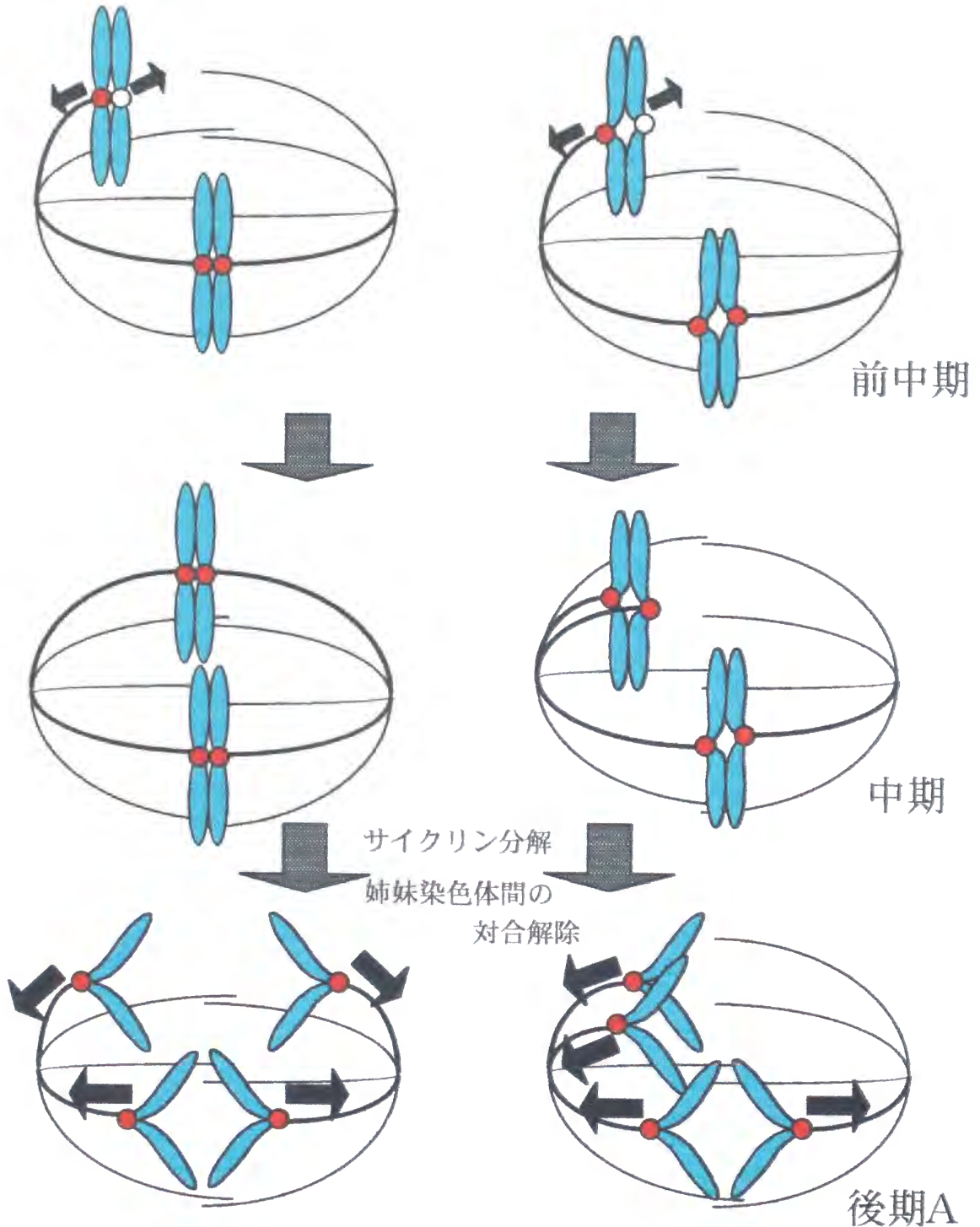


図46. *mis6*、*mis12*変異体で予想される染色体不均等分配モデル

野生株では、染色体は両方向的に紡錘体と結合して紡錘体中央へ集結する。後期が開始すると姉妹染色体間の対合が解除され、染色体は両極へと分離する。

それに対し、*mis6*、*mis12*変異体では染色体腕部の対合は正常であるにも関わらず、動原体部の連結にのみ異常が生じている。そのため紡錘体と動原体の結合がでたらめになり、ある染色体については、同じ極から伸びてきた微小管が姉妹動原体両方に結合してしまうという事態が起こるのかもしれない。全ての動原体が微小管と結合すると後期が開始し、染色体腕部の対合も解かれ、染色体が極に向かって移動する。その際同じ極からの微小管が両動原体に結合していた染色体は、姉妹染色体の両方が同じ極へと分配されることになる。

Mis6はG1/S期に機能できなくなってもM期までに許容温度に戻ればその機能を発揮し、動原体クロマチンを構築し得るということを示している。マイクロコッカルヌクレース消化で観察できるレベルでは、細胞周期を通じて動原体特異的クロマチン構造に変化はないようであるが (Polizzi and Clarke 1991)、同調培養の結果から考えると、そのクロマチン構造が生存に必要となるのはM期に入ってからのものである。動原体クロマチンは、G1/S期にMis6が働いて形成され、姉妹動原体を連結しておくコネクターとしてM期中期に必要なのであろう。出芽酵母の動原体結合タンパク質Skp1はG1/S期の進行制御に関わっている (Bai et al. 1996)。skp1変異の一つskp1-3はG1期停止を引き起こすことが知られている。mis6変異は細胞周期停止を引き起こさないで、skp1変異とは表現型が異なっている。おそらく直接的にはMis6タンパクは細胞周期制御に関与しないのだろう。しかし細胞周期制御因子の制御を受けている可能性は考えられる。出芽酵母Skp1はユビキチン依存的タンパク分解経路を介してG1/S期進行を制御しているが、いままでのところMis6がユビキチン化経路と何らかの関係があるのかどうか分かっていない。

Mis12タンパク質もやはり動原体クロマチンの形成に必須であった。先に述べたようにMis6とMis12の動原体局在は互いの分子活性には依存しないと考えられる。動原体特異的クロマチンの形成には独立に起こる複数の事象が必要となるのであろう。例えば、動原体特異的ヒストンが取り込まれ、その修飾状態が調整されて初めて機能的な動原体クロマチンが形成されるのかもしれない。五島の結果によれば、Mis12はG1期以前 (おそらくM期後期) に機能し、次のM期の染色体均等分配を保障しているようである。動原体領域のヌクレオソームの修飾状態が細胞周期で変化するのであれば、Mis12はM期型の修飾状態からG1期型に変換する役割を果たしているのかもしれない。高等真核生物のヒストンH2A、Bの一部はユビキチン化されているが、ユビキチン化ヒストンはM期中期に消失し、M期後期になると再び現れる (Mueller et al. 1985)。ヒストンのユビキチン化が動原体機能と関連があるか否かについては分かっていないが、Mis12は脱ユビキチン化された動原体クロマチンをM期後期に再びユビキチン化するのもかもしれない。cnt、imr領域の動原体特異的クロマチンの正体を解明するためには、この領域に含まれるヌクレオソームヒストンの修飾状態を決定することが重要であろう。これはCHIP法と修飾ヒストンに対する抗体をうまく組み合わせれば可能となるのではないだろうか (Ekwall et al. 1997)。

## Mis6はリボソームタンパクと結合するのもかもしれない

免疫沈降の結果によれば、Mis6はリボソームタンパク質L7b、L13と結合していた。これらのリボソームタンパクは塩基性で、細胞内に多量に存在すると思われる。この驚くべき結果はどう解釈できるのだろうか

か？細胞抽出液中のMis6の沈降係数（10-15S）はリボソームのそれ（30S、60S）と大きく異なるので、Mis6がリボソーム全体と結合することはないだろう。Mis6はL7b、L13サブユニットと特異的に結合しているようである。注意すべき一つの可能性としては今回検出したMis6とL13、L7の結合が実験上のアーティファクトであることが考えられる。本来、細胞質にあるはずのリボソームタンパク質と核にあるはずのMis6を抽出液中で混合したため、両者の非生理的な結合が生じたのかもしれない。あるいはサンプル調製の際のコンタミネーションかもしれない。細胞内で実際にMis6とこれらのリボソームタンパク質が複合体を形成しているのかどうかについては、例えばMis6・L7・L13複合体の沈降係数が細胞粗抽出液中のMis6の沈降係数と同じなのか、分画操作を行って精製度を上げてL7・L13は免疫共沈するのかといったことを検討する必要があるだろう。もしも変異型Mis6-302タンパクとL7・L13の結合が温度感受性であるようなら、これらリボソームタンパクとMis6の結合の生理的意義が示唆できるかもしれない。

近年リボソームを構成するタンパク質がタンパク合成以外にも様々な生体機能を担っていることを示す報告がいくつも得られている（Wool 1996）。Mis6と免疫共沈したL7タンパク質はそのN末端にbZIPと呼ばれる核酸結合モチーフを持っており、実際ヒトL7タンパク質が二重鎖DNAおよびRNAに結合することが報告されている（Hemmerich et al. 1997）。このL7タンパクはZn-フィンガーモチーフを持つ転写因子様タンパクZNF7とも結合する（Witte and Krawinkel 1997）。またJurkat-Tリンパ球細胞でL7を強制発現すると細胞周期がG1期で停止しアポトーシスが誘導されることが知られている（Neumann and Krawinkel 1997）。このような例から考えると、L7はリボソームの構成因子としての機能だけでなく、Mis6と複合体を形成して何らかの動原体機能を担っているという可能性もあり得る。分裂酵母の動原体領域には36コピーのtRNA遺伝子が存在している（Takahashi et al. 1991）。分裂酵母のゲノム中には約300のtRNA遺伝子が存在すると見積もられているが（Gamulin et al. 1983）、ゲノム全長の1.8%に相当する動原体領域へ全tRNA遺伝子の12%が集中している。これらの動原体中のtRNA遺伝子座はDNaseI消化に対して感受性を示す（Takahashi et al. 1992）。tRNA合成あるいはタンパク合成系で機能しているタンパク質やRNAが、分裂酵母では、動原体クロマチンの構築や染色体分配にも転用されているのかもしれない。

## Mis6-GFPはリアルタイムな動原体の挙動を視覚化する

今回、Mis6-GFPの視覚化に成功したことにより、生細胞中での動原体の挙動を解析することが可能となった。今後、これは細胞学的な解析を行う上で非常に有効な道具として利用できるだろう。これまでもFISH法を用いて固定した細胞中での染色体挙動を解析することはできたが、Mis6-GFPを用いれば生きた

生細胞中での動原体の挙動をリアルタイムで観察することが可能となる。以前FISH法により、分裂酵母のM期には、高等真核生物と同じく、前期、中期、後期A、Bという段階が存在することが示唆されていた。今回の観察によって、それらの存在が確認された。さらに、後期Aにおける染色体分離は極めて急速な過程であることが明らかとなった。これまでに分裂酵母ではM期異常を示す変異体が数多く単離、研究されてきたが、リアルタイムでの動原体の運動が解析できれば、それらの表現型をよりくわしく理解できることと思う。

## まとめ

本研究において、分裂酵母Mis6、Mis12タンパク質が動原体中央部に結合し、動原体特異的クロマチン構造の形成、維持に関与していることが示された。Mis6はG1/S期に機能し、Mis12は（前の周期の）M期後期に機能すると思われるが、動原体クロマチンが本当に必要となるのはM期になってからである。動原体クロマチンは、姉妹動原体を接着する「コネクター」として機能し、M期における動原体と紡錘体の両方向的結合を保障しているのではないだろうか。Mis6はリボソームタンパクL7、L13等と複合体を形成しているようであり、Mis12もやはり、いくつものタンパクを含む複合体を形成していると思われる。姉妹染色体の均等分配のためには、動原体タンパク質を含め、多くの因子が関与していると推察される。その一方で、*mis6*、*mis12*のような「染色体不均等分配」という表現型を示す変異体は、まだ他には発見されていない。分裂酵母ではゲノム計画も進行しており、これが完了すれば分子遺伝学的研究もさらに容易になると考えられる。「染色体不均等分配」表現型を示す変異体をさらに同定することも可能であろう。Mis6、Mis12の生化学的解析とあわせて、遺伝学的追求を進めることで動原体の分子構築およびその制御機構について理解が深まることだろう。その過程で得られた知識は分裂酵母のみならず広く高等真核生物まで応用できるものと期待される。

## 第二部 結果

### *lsd1*変異株の単離

分裂酵母の野生株では、核分裂過程において染色体および核構造が均等に娘細胞へと分配され、大きさの等しい2つの娘核が生じる。均等な核分裂を保障する機構を解明する目的で、温度感受性を示しかつ制限温度で娘核の大きさに差異の生じる変異体を単離した。高橋、山下らがDAPI染色による核の観察を行い、約1200株の温度感受性変異体の中から、そのような不均等核分裂の表現型を示す変異体を新たに14株単離した(図47)。14の変異株を遺伝的に解析した結果、そのうち9変異株が同一の遺伝子に欠損を持つことが明らかとなった。そこで、この遺伝子を*lsd1* (large and small daughter nuclei 1) と名付け、遺伝子の単離および変異株の解析を行った。9つの*lsd1*変異株はいずれも同様の表現型を示したので、以下の解析では主に*lsd1*-H518変異株を用いた。

### *lsd1*変異株の表現型

*lsd1*-H518変異株は許容温度(26℃)では生育可能であるが、制限温度(36℃)ではプレート上でコロニーを形成できない。制限温度に移してから生存率の推移、及び表現型を詳細に調べるために、YPD液体培地中で対数増殖期まで培養した*lsd1*変異株を制限温度に移し、1時間おきに細胞濃度、生存率およびDNA含量を測定した。また培養液の一部を採取して、DAPI染色によって核形態を観察した(図48)。パネルAは制限温度に移して6時間後のDAPI染色像である。一番上の写真に示したように、核分裂後の娘核の大きさに差異のある細胞が多数観察された。この表現型を*lsd*表現型と名付け、その出現頻度の推移をパネルBに示した。*lsd*表現型を示す細胞の頻度は4時間後より急速に増加し、6時間後には2核の細胞(すなわち核分裂後の細胞)のうち約8割が*lsd*表現型を示していた。またパネルAに示したように、娘核が隔壁近傍に集まっている細胞や、細胞隔壁で核が破断された細胞(*cut*表現型)、隔壁形成は起こっているが一方の娘細胞しか核を含まない細胞なども観察された(合計で約10%)。変異株の生存率は、制限温度に移行後3時間目より低下しはじめ、6時間後には約30%、10時間後には1%以下にまで減少した(パネルC)。細胞濃度は5時間後まで指数関数的に増加し、元の濃度の約4倍に至った(図48パネルB)。



遺伝子座	株番号
<i>lsd1</i>	48,197,220,247,275,450,H201*,H265*,H518*
( <i>mis6/lsd2</i> )	<u>302</u>
<i>lsd3</i>	303
<i>lsd4</i>	368
<i>lsd5</i>	389
<i>lsd6</i>	397
<i>lsd7</i>	510
( <i>mis12/lsd8</i> )	<u>537</u>
( <i>cut6/lsd9</i> )	H621*

下線を引いた302,537株はミニ染色体を安定に維持できない。

\*印をつけたH201,H265,H518,H621株についてはミニ染色体の安定性を調べていない。

上記以外の変異株はミニ染色体を安定に維持できる。

#### 図47. 不均等核分裂表現型を示す変異株

DAPI染色による核形態の観察から制限温度で不均等核分裂を起こす変異体を、*mis6*、*mis12*、*cut6*以外に新たに14株単離した。相補群検定の結果、9株で*lsd1*遺伝子座に変異が起こっていることが分かった。*cut6*は隔壁形成によって核が破断される"cut"表現型を示す変異として単離されていたが、詳細な解析の結果、不均等核分裂表現型を示すことが明らかとなった。

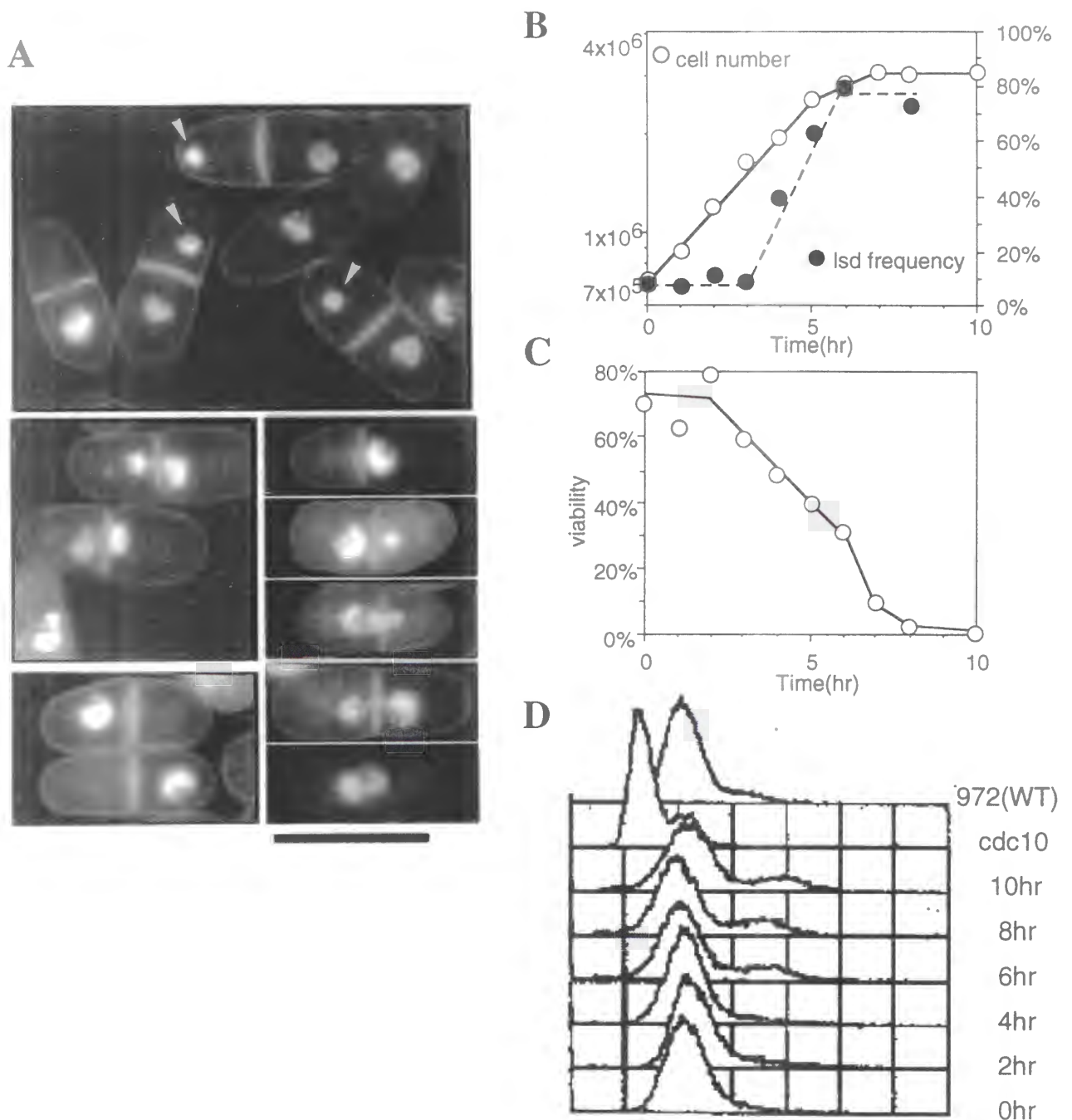


図48. *lsd1*変異体では制限温度で不均等核分裂がおこる

YPD培地で対数増殖期初期まで培養した*lsd1-H518*変異体を制限温度（36度）に移行し、経時的に細胞濃度、表現型、生存率を観察した。

(A) 制限温度培養6時間後のDAPI染色像。パネル上段に示したように姉妹核の大きさに違いが生じている。小さい方の娘核（矢頭で示す）は核が凝縮しているようにも見える。パネル下段に示したような、核の一部が隔壁ではさまれているような細胞や、核が一方の娘細胞にのみ分配されているような細胞も観察できた。バーは10 $\mu$ m。

(B) 細胞濃度および表現型の出現頻度の推移。細胞濃度は7時間後まで増加し続け、約4倍になる。不均等核分裂を示す細胞の頻度は4時間後より増大し、6時間後には2核の細胞のうち約8割が表現型を示していた。

(C) 生存率は時間後より減少し始め、6時間後には約30%、10時間後には1%にまで低下した。

(D) FACSscanによるDNA含量の測定。972はG2期、*cdc10*はG1期DNA含量を示すコントロール。DNA含量は制限温度に移行しても大きな変化はみられなかった。6時間以降、4C DNA含量を有する細胞の頻度が上昇してきた。

パネルDには、FACScan測定によるDNA含量の推移を示した。制限温度移行後も、DNA含量に大きな変化は観察されなかった。6時間後以降、4CDNA（G1期のDNA含量の4倍）を含む細胞の頻度が、若干増加してきた。

## 電子顕微鏡による表現型の観察（この観察は東京大学 平田博士の指導による）

*lsd1*変異株の示す表現型をより深く理解するために、電子顕微鏡による観察を行った。制限温度で5時間培養した変異株を凍結置換法で処理し、連続切片を作って観察した（図49-51）。変異株では下記に示すような様々な核分裂異常が観察された。観察された異常は主に次の5つに分類できた。

1) 核分裂が終了していないにも関わらず、隔壁形成が開始している、あるいは完了している（図49パネルA 細胞1-4）。これらの細胞はこの後、cut表現型、あるいはlsd表現型を示すものと思われる。通常、野生株では、核分裂が完了した後に隔壁形成が始まる（McCully and Robinow 1971、Tanaka and Kanbe 1986、図4）。

2) 紡錘体微小管の伸長によって核の一部が突出している（図49パネルA 細胞3、パネルB）。核の突出部位には紡錘体微小管の束が観察できる（パネルB右下）。このような紡錘体による核の異常な突出を示す細胞では、このあと非対称的な核分裂が起こるものと考えられる。ふつう野生株の核分裂は対称的で、紡錘体の両端には均等な大きさの娘核が形成されている。

3) 分裂した娘核が隔壁近傍に位置している（図50）。このときの核分裂は完全ではなく、隔壁を貫く細い管によって娘核がつながっている（パネルC-E）。

4) 核の大きさあるいは核内構造が不均等である（図50、51）。娘核の大きさに違いがあることは、連続切片を観察して確認した。黒矢印で示した核にある電子密度の高い構造は、核小体に相当する構造だと考えられるが（図51、Tanaka and Kanbe 1986）、ここに示した細胞では、この構造が一方の娘核にしか含まれていなかった。野生株の場合は、この構造は両方の核に均等に分配される。核小体を含まない娘核には、代わりに、電子密度の高い粒子状の構造が観察された。このような構造は野生株では観察できない。

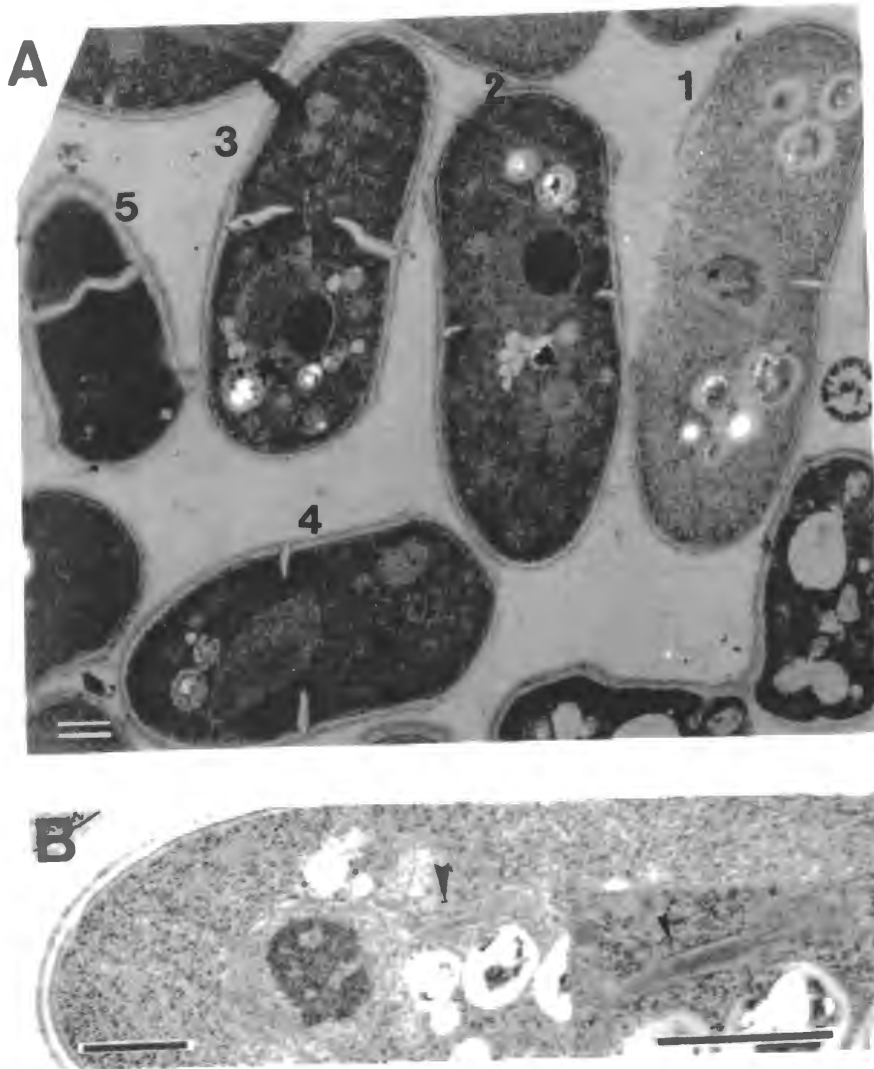


図49. *Isd1*変異体の電子顕微鏡観察像

制限温度 5時間培養した*Isd1-H518*変異体を急速凍結置換法によって処理し、電子顕微鏡観察用の連続切片を作製した。

A) 1-4の細胞では核分裂が完了していないにもかかわらず隔壁形成が開始している。3の細胞では核の一部が異常に突出している。また3、5の細胞では隔壁が変形しゆがんでい。バーは1  $\mu$ m。

(B) 3の細胞の一部が突出している細胞の拡大図。矢頭で示したような異常な突出が観察される。突出部には紡錘体微小管と思われる構造が観察される。パネル右下には突出部の拡大図を示した。バーは1  $\mu$ m。

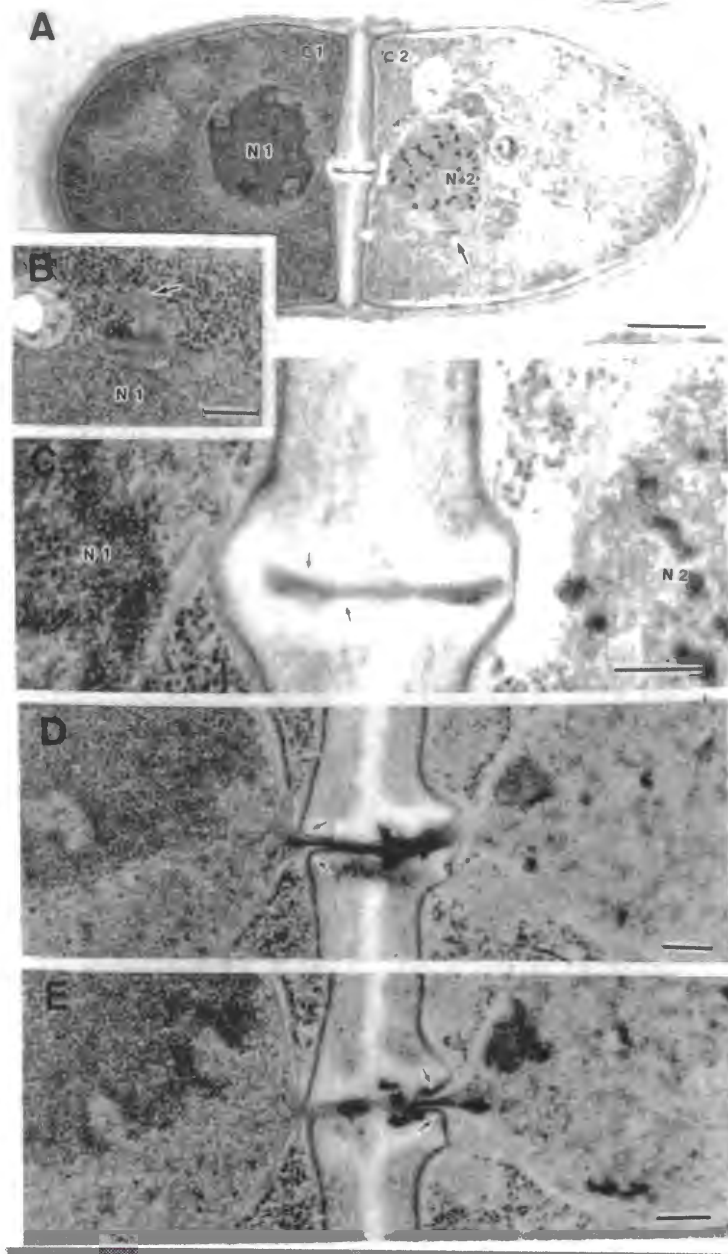


図50 *Isd1*変異体の電子顕微鏡観察像 (cut表現型を示す細胞)

A) 細胞の全体像。娘核 (N1とN2) の分離が完了する前に隔壁形成が起ったらしく、2つの核が隔壁を貫く細い管によって連結されている。N2核では野生株にはない未知の粒状構造が観察される。娘細胞間細胞質 (C1とC2) の染色濃度が大きく異なっていた。N1核とN2核の大きさは異なっていた。N1核は30枚の連続切片にわたって観察されたが、N2は20枚の切片にわたって観察された。バーは1  $\mu\text{m}$ 。

B) N1核の紡錘極体 (SPB) とそれに付随する細胞質微小管。どちらも野生株と比べ異常は見いだせなかった。バーは0.2  $\mu\text{m}$ 。

C) - D) 娘核 (N1とN2) の連結部分の拡大像。これらは同一領域の連続切片である。細い管が細胞隔壁のこの部分は他に比べ厚くなっている。N1からN2につながっているのがわかる。バーは0.2  $\mu\text{m}$ 。

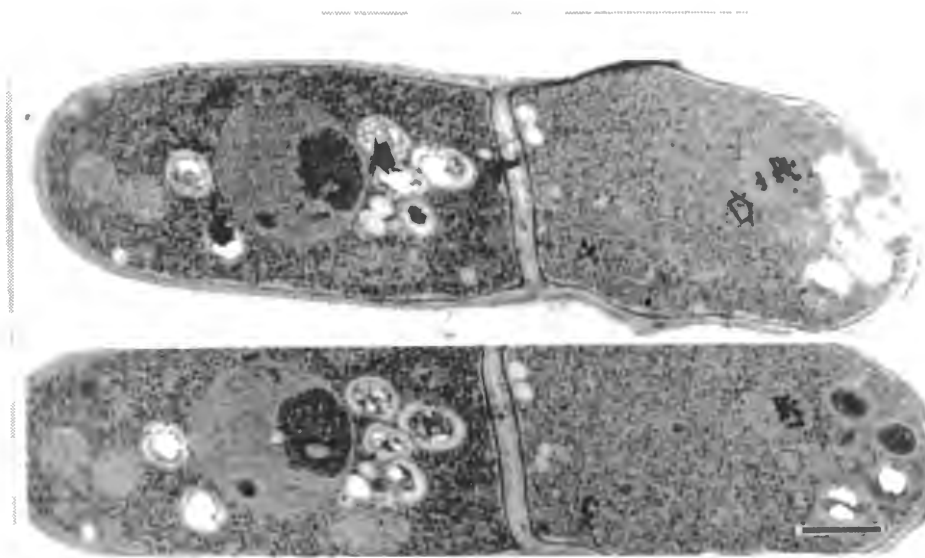


図51. *lsd* 変異体の電子顕微鏡観察像 (*lsd*表現型を示す細胞)

娘核の大きさが左右で異なっている (黒矢印と中抜き矢印)。細胞質の染色濃度も左右の娘細胞で異なっていた。右側の娘核では、通常はみられない粒子状の構造物が観察された。パネル上下は同一細胞の異なる切片。バーは $1\mu\text{m}$ 。

5) 隔壁の位置、方向、形態が異常である (図49パネルA、細胞3、5)。また図50の細胞では、隔壁が通常より厚くなっている。特に核の一部を挟んだ中央部で顕著である。

## *lsd1*変異株では染色体は均等に分配されている

*lsd1*変異体で起こる不均等な核分裂は、*mis6*、*12*変異体と同じく染色体DNAの不均等分配に起因するのかもしれない。この可能性を検証するために、蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) により、変異株での染色体分配の様子を観察した。制限温度で6時間培養した細胞を固定し、rDNAをプローブとしてFISHを行った。rDNAは分裂酵母の第3染色体に存在しているので、この解析によって第3染色体の分配の様子を観察することができる。

図52にその結果を示した。2核の細胞中9割以上で両方の核にFISHのシグナルが認められた。*lsd*表現型を示す細胞では、小さい方の娘核のFISHのシグナルは明るい小さな点のように見えた。それに対し、大きい方の核ではrDNAは、野生型の場合 (図52wt) と同様、少しはやけた大きな塊として観察された (図52左側写真の矢頭で示した細胞、あるいは図52右側)。隔壁近傍に核が集まっている細胞ではrDNAは分離せず、隔壁によって挟まれていた (矢印で示す)。

この結果は、予想に反し、*lsd1*変異株では染色体DNAは均等に娘細胞へ分配されていることを示している。FISHのシグナルの強度や形態から判断すると、小さい方の核では染色体DNAが高度に凝縮しているようである。これは核分裂期の染色体凝縮とは様子が異なる。微小管染色を行っても、小さい方の核で紡錘体形成が起こっていることはなかった (データは示さない)。

以上の結果をまとめると、*lsd1*変異株では染色体DNAは均等に娘細胞へと分配されるものの、染色体の凝縮状態が姉妹核で異なり、そのため核の大きさに著しい差異が生じていると考えられる。

## *lsd1*<sup>+</sup>遺伝子は脂肪酸合成酵素の $\alpha$ サブユニットをコードする

*lsd1*変異株の温度感受性を相補するゲノム断片を分裂酵母ゲノムライブラリーより単離した。ゲノムライブラリーを導入した90000の形質転換体から、温度感受性が相補されたものが2株得られた。それらの形質転換体から、プラスミドを回収したところ、2種類のプラスミドが得られた (pSA100とpSA110)。

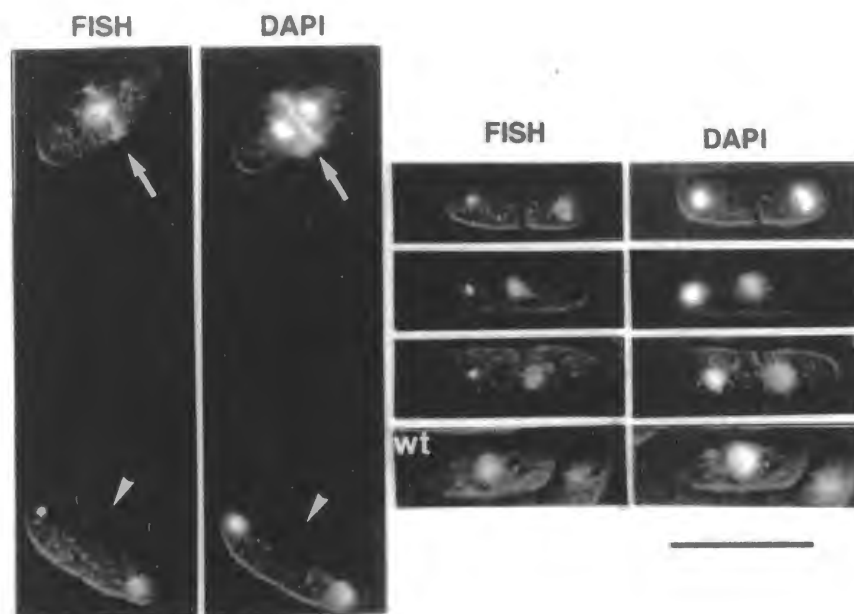


図52. *Isd1*変異体では染色体は均等に分配されている

*Isd1*変異株を制限温度で6時間培養後（YPD培地）、固定し、rDNAをプローブとしたFISH法により第3染色体の分配の様子を調べた。rDNAはリボソームRNAの遺伝子で第3染色体の両端に反復して存在している。バーは10 $\mu$ m。

左側のパネルにはcut表現型を示している細胞（上、矢印で示す）とIsd表現型を示している細胞（下、矢頭で示す）を示した。矢印で示した細胞ではrDNAのシグナルが分離せず、細胞隔壁にはさまれている。なお、この細胞では隔壁がDAPI、FISHで染色されているが、これはアーティファクトによるものである。矢頭で示した細胞では、核の大きさに違いはあるがFISHのシグナルは姉妹核の両方に観察される。

右側のパネルにはIsd表現型を示す細胞を示した。最下段は間期の野生株細胞である。Isd表現型をしめした細胞の9割以上で、第3染色体は両方の核に分配されていた。小さい方の核のFISHのシグナルは野生株の場合に比べ小さく、高度に収縮しているように見えた。



制限酵素地図の比較から、両者は同じゲノム領域を含んでいるものと考えられる（図53）。これらが*lsd1*変異を相補することは再度形質転換を行って確認した。

pSA100の 4kb断片をプローブにして、整列コスミドライブラリー（Mizukami et al. 1993）に対してザンハイブリダイゼーションを行ったところ、このプラスミドが第一染色体上の*sds22<sup>+</sup>*、*ppal<sup>+</sup>*遺伝子近傍のゲノム領域を含んでいることが明らかとなった。四分子解析を行ったところ、*lsd1*変異遺伝子は*ppal*遺伝子と強く連鎖していた（PD:NPD:TT=27:0:0）ので、pSA100、pSA110は*lsd1<sup>+</sup>*遺伝子本体を含んでいるものと結論した。

サブクローニングの結果、6.5kbのspeI断片を含むpFAS2-100プラスミドが*lsd1*変異を相補した。pFAS2-100の塩基配列を決定したところ、1842アミノ酸のタンパクをコードすると思われるオープンリーディングフレームが1つ見いだされた（図54、pFAS2-100の塩基配列決定は鍋島博士によって行われた）。タンパク質データベースに対しホモロジー検索を行ったところ、*lsd1<sup>+</sup>*遺伝子は出芽酵母*S.cerevisiae*のFAS2遺伝子と高い相同性を示した（図55、約60%のアミノ酸が同一）。真核生物の脂肪酸合成酵素は $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットがそれぞれ6分子ずつあつまったヘテロ12量体を形成しているが、出芽酵母FAS2遺伝子はその $\alpha$ サブユニットをコードしていることが分かっている（Schweizer et al. 1984）。その相同性より、*lsd1<sup>+</sup>*遺伝子は分裂酵母の脂肪酸合成酵素 $\alpha$ サブユニットの遺伝子であると結論した。

## *lsd1<sup>+</sup>*遺伝子は生育に必須である

定法に従い、*lsd1<sup>+</sup>*の遺伝子破壊を行った（材料と方法、図56パネルA）。一方の相同染色体上の*lsd1<sup>+</sup>*遺伝子を*ura4<sup>+</sup>*遺伝子に置換したヘテロ二倍体を作成し、胞子を形成させ、四分子解析を行った。26度、33度いずれの温度においても4胞子のうち、コロニーを形成をしたのは2胞子のみで、すべてウラシル要求性であった。この結果は*lsd1<sup>+</sup>*遺伝子が破壊された一倍体細胞は生育出来ないことを意味している。胞子発芽法（材料と方法）によって遺伝子破壊体のみを発芽させたところ、細胞数は約8倍まで増加した。その表現型をDAPI染色で観察したところ、温度感受性変異体の場合と同じく、*lsd*表現型を示した（図56パネルB-D）。以上の結果より、*lsd1<sup>+</sup>*遺伝子は生育に不可欠で、均等な核分裂を行うために必須であると考えられる。

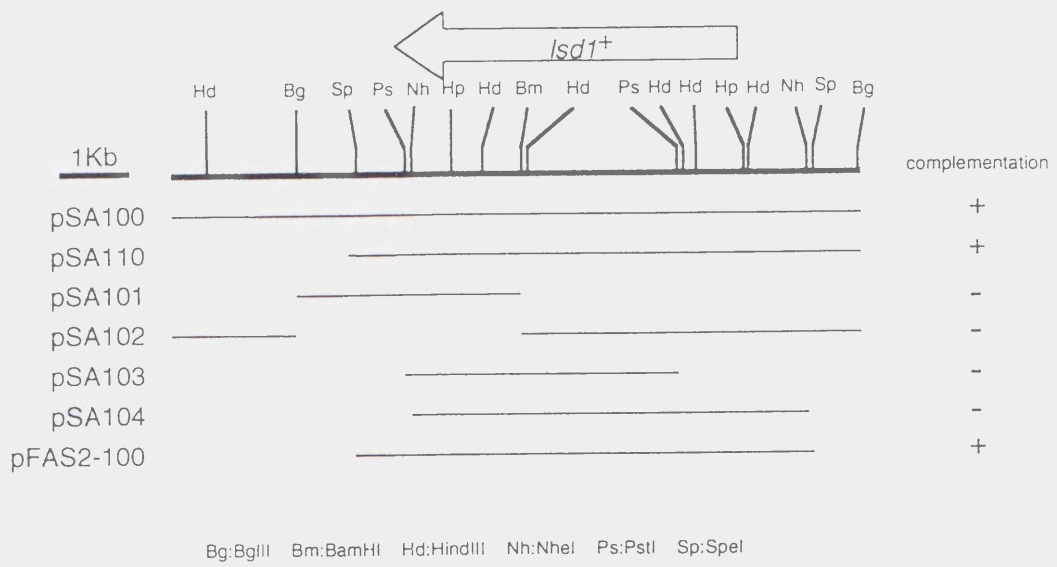


図53. *lsd1*変異を相補するゲノム断片の単離

分裂酵母野生株ゲノムライブラリーを *lsd1-H201* 変異体に形質転換し、その温度感受性を相補したゲノム断片を2種類えた (pSA100とpSA110)。制限酵素地図を作製し、比較したところ両者は同一のゲノム領域を含むものと考えられた。

サブクローニングを行った結果、pFAS2-100が温度感受性を相補する必要最小限の領域を含んでいた。





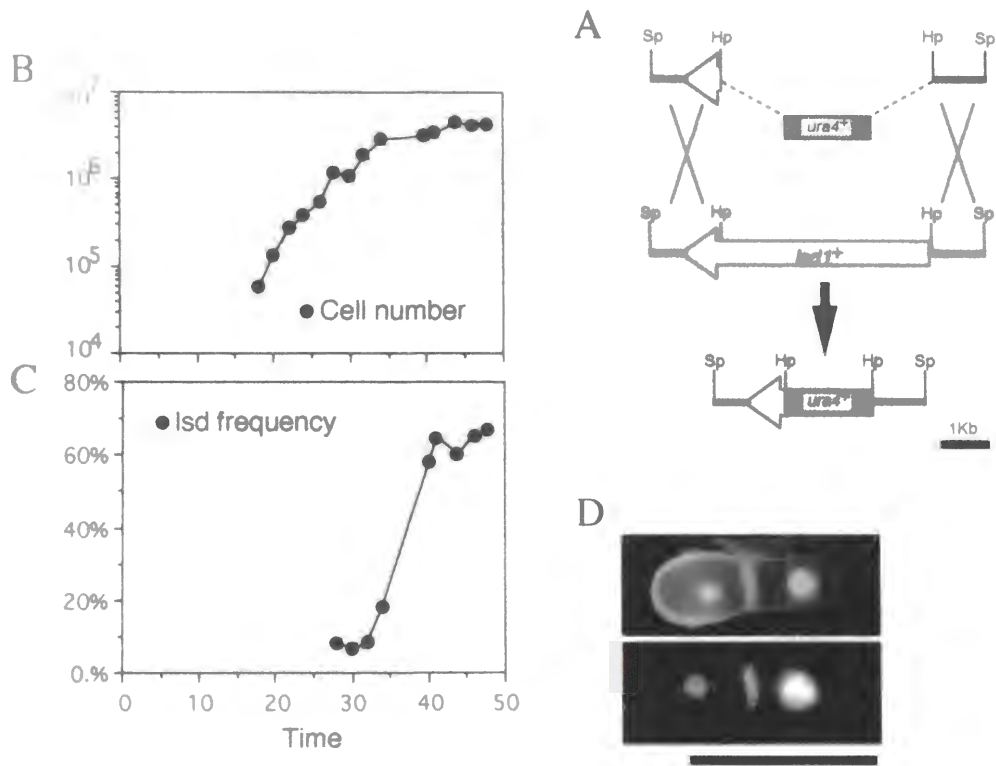


図56. *Isd1*<sup>+</sup>遺伝子は成育に必須である

(A) 定法に従い*Isd1*<sup>+</sup>遺伝子を破壊した。*Isd1*<sup>+</sup>遺伝子の大半を*ura4*<sup>+</sup>遺伝子で置き換えたDNA断片を作成し、*ura4*の2倍体に形質転換した。相同組み換えにより、*Isd1*<sup>+</sup>遺伝子の一方が破壊された2倍体をウラシル非要求性、サザンプロテティングで選択した。この2倍体を孢子形成させたところ、4孢子のうち生育可能なものは2つだけで、それらはいずれもウラシル要求性であった。

(B) - (D) *Isd1*遺伝子破壊2倍体を孢子形成させ、ウラシルを含まない合成培地中で、*Isd1*遺伝子破壊半数体を強制的に発芽させた。(B)には細胞濃度、(C)には*Isd*表現型の頻度、

(D)にはDAPI染色像を示した。孢子は培養開始18時間後より発芽し始め4-5回の細胞分裂の後、成育を停止した(34時間後)。このとき細胞は(D)に示すように*Isd*表現型を呈していた。*Isd*表現型を示す細胞の頻度は時間経過と共に増加し、48時間後には2核の細胞のうち90%が表現型を呈していた。バーは10 $\mu$ m。

## *lsd1*変異はパルミチン酸の添加により相補される

*lsd1*遺伝子が脂肪酸合成酵素をコードすることが明らかとなったので、脂肪酸を培地に添加することによりその表現型が相補されるかどうか検証した。図57に示すように、脂肪酸の一種であるパルミチン酸0.03%をYPDプレート培地に加えると、検証した3つの*lsd1*変異 (*lsd1*-H201、-H265、-H518) すべてについて温度感受性が相補された。またこのとき、DAPI染色で調べたところ、制限温度においても核分裂は正常に起こっていた。これは、*lsd1*変異体では脂肪酸の供給量が低下し、その結果として不均等核分裂が起こっていることを示唆している。なお、加えるパルミチン酸の量を希釈して、相補に必要なパルミチン酸濃度を決定したところ、*lsd1*-H518株は0.0075%、*lsd1*-H265株は0.0038%、*lsd1*-H201株は0.015%が最小限度であった（データは示さない）。

*cut6*変異体は脂肪酸合成の前駆体（マロニルCoA）を合成するアセチルCoAカルボキシラーゼの温度感受性変異体で、やはり制限温度で*lsd*表現型を示し致死となるのであるが（山下、修士論文）、その温度感受性はパルミチン酸の添加によっては相補されなかった。

## 抗生物質セルレニンによって*lsd*表現型が誘導される

真菌 *Cepharosporium cacrulens* が産生する抗生物質セルレニンは脂肪酸合成酵素の活性を阻害することが知られている（Awaya et al. 1975）。野生株培養液に10  $\mu$ g/mlのセルレニンを培地に加えると、生育が阻害された。細胞濃度の増加は3時間後に1.8倍になったところで停止した。（図58パネルA上）。このとき細胞をDAPI染色して観察したところ、*lsd1*変異体と同様の*lsd*表現型が観察された（図58パネルA下、B）。セルレニン添加3時間後には、2核の細胞のうち8割が*lsd*表現型を示していた。プレート培地上でもセルレニンは野生株酵母の生育を阻害したが、この阻害効果はパルミチン酸を添加することで打ち消された（データは示さない）。分裂酵母では、セルレニンはかなり特異的に脂肪酸合成酵素を阻害するようである。なお、許容温度において*lsd1*変異株 (*lsd1*-H201、-H265、-H518) はセルレニンに対し野生株よりも強い感受性を示した。調べた3株のうちでは*lsd1*-H265株が最も強い感受性を示した（データは示さない）。

脂肪酸合成の阻害は核分裂期に致死的影響をおよぼす

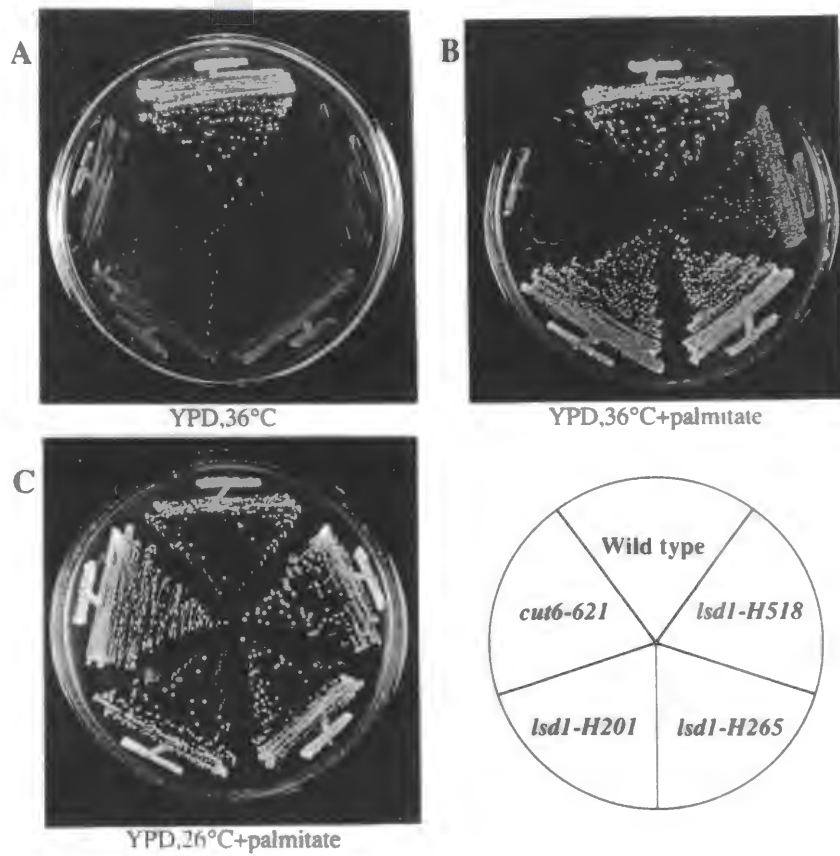


図57. *lsd1*変異体の温度感受性はパルミチン酸で相補される

野生株 (HM123)、*lsd1-H201*、*-H265*、*-H518* および *cut6-621* 変異株をYPDプレート (A) あるいはYPD+0.03%パルミチン酸プレート培地に塗布し (B、C)、26度 (C) または36度 (A、B) で培養した (B、C) にはパルミチン酸を可溶化するため1%tween20を添加した。

(A) 制限温度で培養した場合、野生株以外の変異株はコロニーを形成できなかった。

(B) 培地中にパルミチン酸を添加すると、*lsd1*変異株は制限温度でも野生株と同程度のコロニーを形成できた。しかし*cut6*変異株はパルミチン酸存在下でもコロニーを形成しなかった。

(C) パルミチン添加は許容温度での生育に影響を与えることはなかった。

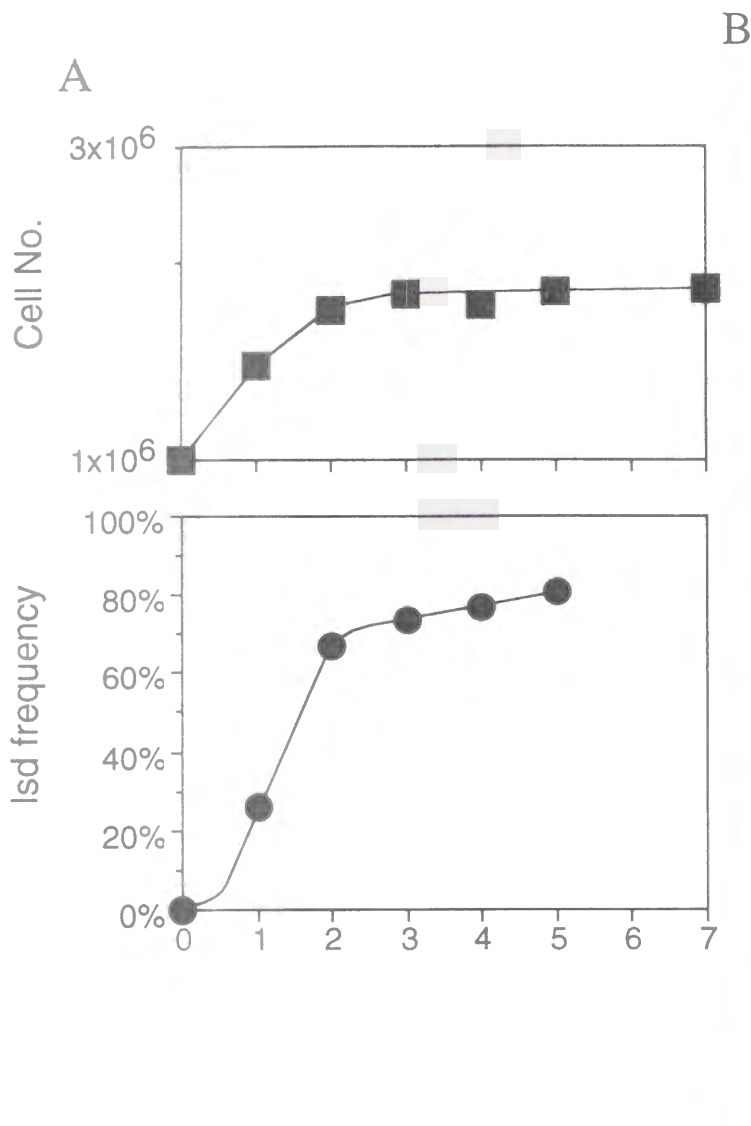


図58. 脂肪酸合成を阻害するとlsd表現型が誘導される

野生株培養液（YPD培地、33度）にセルレニン（ $10 \mu\text{g/ml}$ ）を添加し、経時的に細胞濃度と表現型を観察した。セルレニンは菌類が合成する抗生物質で脂肪酸合成酵素を阻害することが知られている。

(A) 細胞濃度は添加3時間後に1.8倍まで増加した。その後、生育は停止した。このとき細胞はlsd表現型を示していた。3時間後には2核の細胞のうち8割が表現型を示していた。

(B) セルレニン添加2時間後のDAPI染色像。矢印で示すようにlsd表現型を示す細胞が多数観察される。バーは $10 \mu\text{m}$ 。



脂肪酸合成の阻害が、細胞周期のどの点で致死的影响を及ぼすのか決定するために、エルトリエーション法でG2期初期に同調した細胞を（材料と方法）セルレニンを含む液体培地で培養し、生存率の変化を調べた（図59）。生存率は100分目より低下し始めた。この時期は、紡錘体を有する細胞の頻度がピークに達して細胞数が増加し始める時期であり、核分裂後期～隔壁形成期に相当すると考えられる。この結果は、脂肪酸合成の阻害が核分裂期に致死的影响を及ぼすという可能性を示唆している。この可能性をさらに検証するために次のような実験を行った。

分裂酵母*cdc25*変異体では、制限温度36度で培養するとM期進行の駆動力であるCdc2カインエースの活性化が起きず、細胞周期はG2期後期で停止する。G2後期に停止した*cdc25*変異体を許容温度に戻して培養すると同調的に有糸分裂が進行し、細胞の生育が再開する（Moreno et al. 1989）。制限温度で1時間培養した*cdc25*変異体の培養液中にセルレニンを添加し、制限温度で培養し続けてその生存率の変化を測定した。図60に示すようにセルレニン添加後3時間経過しても生存率に変化はみられなかった。これは、G2期で停止している限り脂肪酸合成が阻害されても細胞は死なないということを示している。この培養液を許容温度に戻して核分裂を進行させると生存率は急速に低下した。先のエルトリエーションによる同調培養の結果と併せて考えると、脂肪酸合成阻害はM期特異的に致死的效果を及ぼすようである。

図59の実験では隔壁を持つ細胞の割合が20%にまで高まった後、減少せずそのまま維持された。細胞数の増加速度も、セルレニンを加えなかったコントロールに比べ低下している。脂肪酸合成の阻害によって細胞質分裂の進行も遅延しているのかもしれない。

M期に起こる事象としては、核分裂と細胞質分裂の2つが考えられる。セルレニンで脂肪酸合成が阻害された場合、どちらの事象が細胞を死に至らしめるのかを検討するために以下のような実験を行った。分裂酵母*cdc11*変異体は隔壁形成に欠損を持つ変異体で、制限温度で培養すると隔壁形成・細胞質分裂が起こらないまま細胞周期が進行し、1つの細胞質に複数の核を持つ細胞が現れる（Nurse et al. 1976、図61パネルA右）。この変異体をセルレニン存在下、制限温度で培養して生存率の変化とDAPI染色像を観察した（図61）。この変異体を用いた場合、理由は明らかではないが、セルレニンによって核分裂が阻害された。培養5時間後、セルレニンを加えなかったコントロールでは全細胞中の約75%が4つ、25%が8つの核を含む細胞であったのに対し、セルレニンを加えた場合は、70%が1核のままで、核分裂が起こって2核になった細胞は30%であった。パネルA左に示すように、2核になった細胞では娘核の大きさに不均等が生じていた。セルレニン存在下でもやはり隔壁形成は全く起こらなかった。セルレニン添加前80%であった生存率は、5時間後には約50%にまで低下していた（パネルB）。この結果は、隔壁形成が起こらなくても不均等な核分裂自体が生存率の低下を引き起こすということを示唆している。

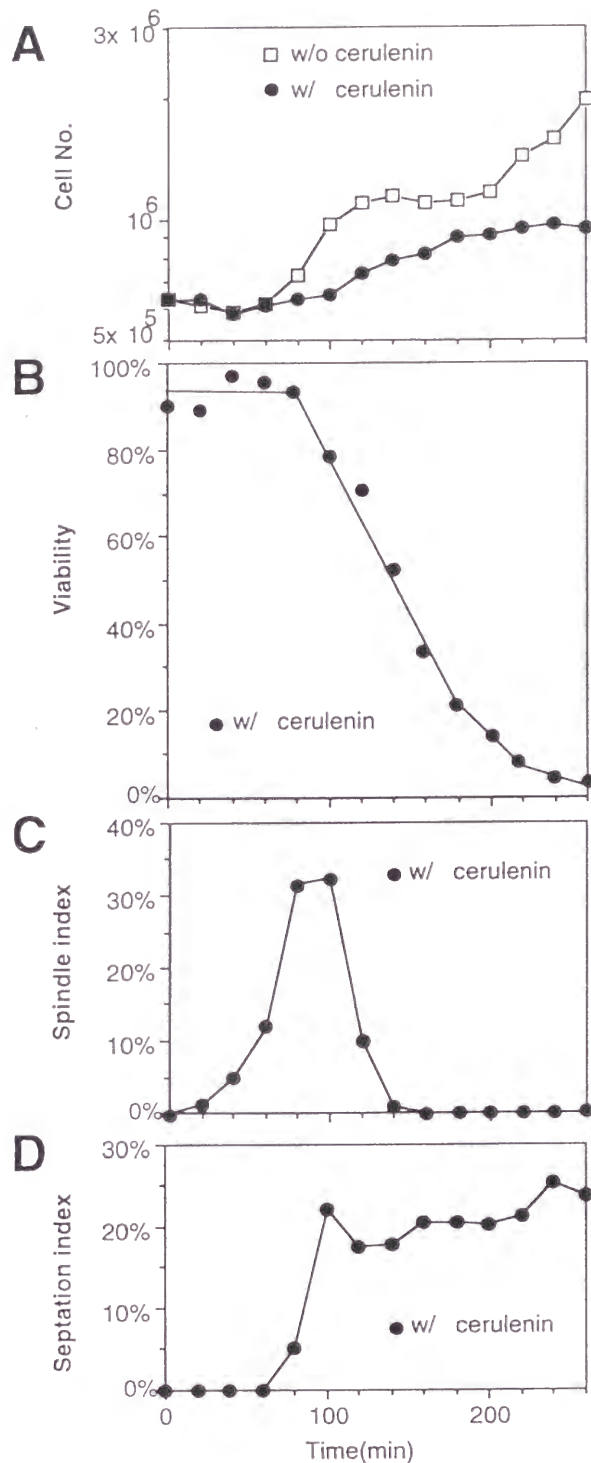


図59. 脂肪酸合成を阻害するとM期に致死となる

野生株 (972株) をエルトリエーションによってG2初期に同調し、 $10 \mu\text{g/ml}$ のセルレニンを含むYPD培地で培養した (33度)。20分間隔で経時的にサンプルを採取し、細胞濃度 (A)、生存率 (B)、紡錘体指数 (C、紡錘体を有する細胞の頻度、M期の指標となる)、隔壁形成指数 (D、細胞隔壁を有する細胞の頻度) を測定した。セルレニンを加えなかったコントロールの増殖曲線は (A) に□で示した。

紡錘体指数より判断すると60分後ごろよりM期が開始し、100-120分頃にM期終期になると思われる。生存率はG2期の間は高いままであるが、M期後期-終期に相当すると思われる100分後より急速に低下した。隔壁形成指数は100分後にピークに達し、そのまま20%を維持した。通常、隔壁形成が起こると速やかに細胞質分裂が進行して隔壁形成指数は低下するはずなので、脂肪酸合成を阻害すると隔壁形成、細胞質分裂にも遅延が生じると思われる。

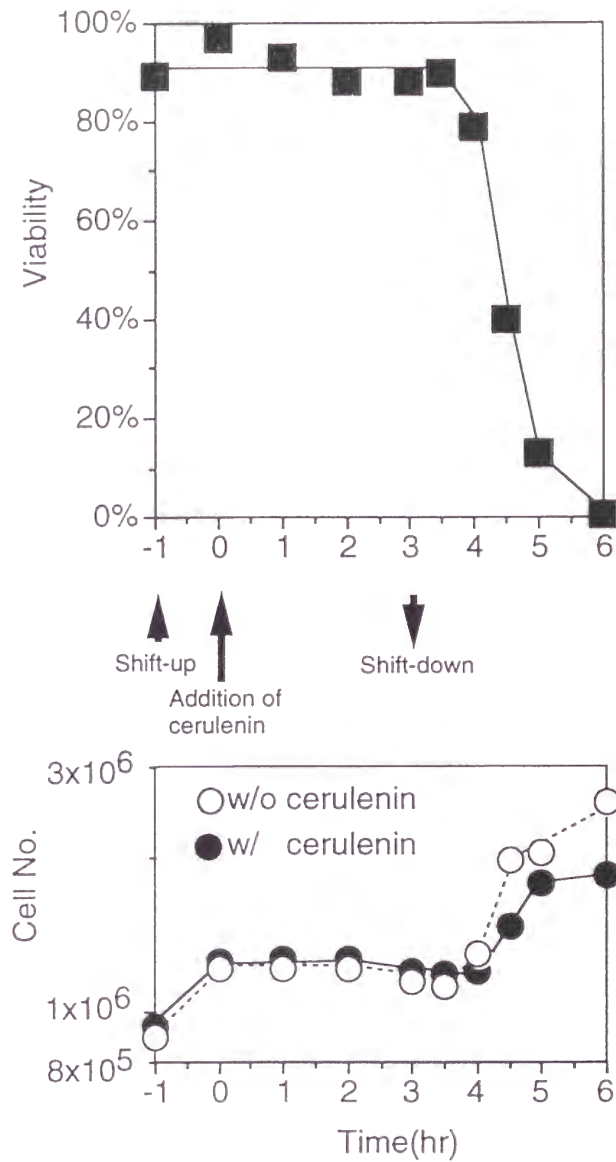


図60. G2期停止している細胞では脂肪酸合成が阻害されても致死とならない

許容温度で対数増殖初期まで培養したcdc25変異体を制限温度に移し(-1時間目)、1時間培養した。その時点(0時間目)でセルレニン(10 $\mu$ g/ml)を添加し、そのまま制限温度で3時間培養を続けた。その間、1時間毎に生存率を測定したが(パネル上段)、生存率は低下しなかった。その後、許容温度に戻し、M期を再開させると、生存率は急速に低下した。パネル下段には、その時の細胞濃度の変化、およびセルレニンを加えなかったコントロールの細胞濃度変化を示した。

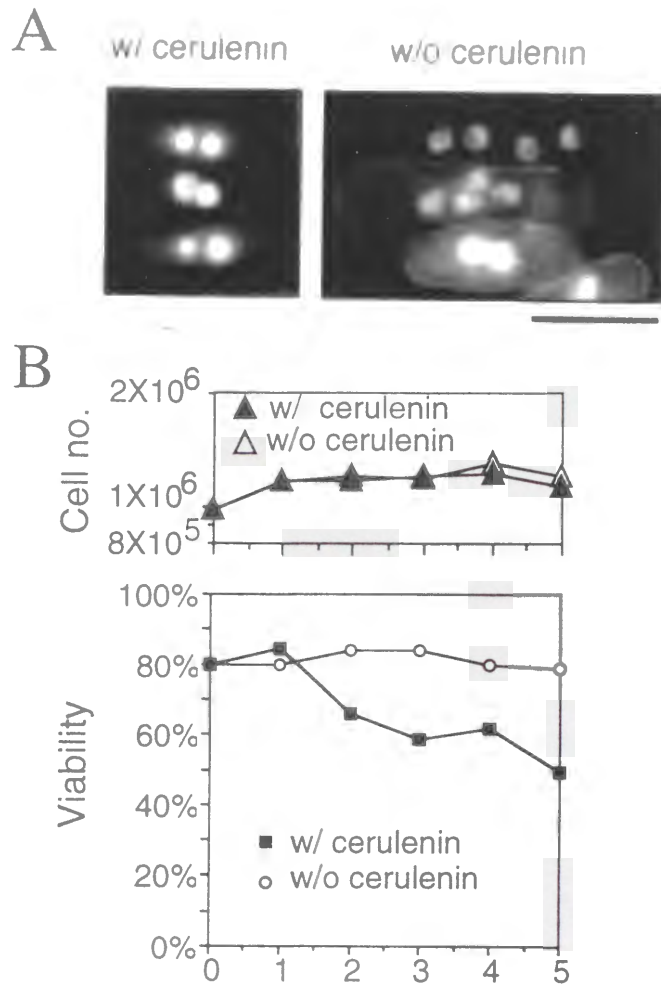


図61. 脂肪酸合成阻害は核分裂過程に致命的影響を及ぼす

*cdc11*変異株の培養液 (YPD培地) にセルレニン (10  $\mu$ g/ml) を添加し、あるいは添加せずに制限温度で培養し、表現型、細胞濃度および生存率を測定した。*cdc11*は隔壁形成に欠損を持つ変異体で制限温度では核分裂は起こるものの、隔壁は形成されない。

(A) 制限温度に移行後4時間のDAPI染色像。セルレニンを加えなかった場合、多くの細胞が多核であったが (パネル右)、セルレニンを加えると3割の細胞が2核になっているに過ぎなかった (本文参照)。2核の細胞では、姉妹核の大きさに違いが生じていた。バーは10  $\mu$ m。

(B) セルレニンを添加した場合 (▲) も、しなかった場合 (△) も細胞濃度の増加は、制限温度に移してすぐに停止した (パネル上段)。生存率は、セルレニンを加えなかった場合 (○) は変化が無かったのに対し、セルレニンを添加すると (■)、隔壁形成が起こらないにもかかわらず、1時間後より減少し、5時間後には約50%まで低下した。

## 第二部 考察

### 均等な核分裂を行うためには脂肪酸合成が必須である

本研究で示したとおり、*lsd1*は生育に必須な遺伝子で、脂肪酸合成酵素 $\alpha$ サブユニットをコードしていた。*lsd1*変異体は核分裂に欠損があり、娘核の大きさに差異が生じるlsd表現型を示す。*cut6*遺伝子はアセチルCoAカルボキシレースをコードしているが、この酵素は脂肪酸合成の前駆体であるマロニルCoAを合成する。*cut6*変異体もやはり*lsd1*と同様の核分裂欠損の表現型を示した(データは示さない、山下、修士論文)。*lsd1*遺伝子も*cut6*遺伝子とともに脂肪酸合成に必須であり、両遺伝子の変異は互いによく似た表現型を示した。脂肪酸は、生体膜の構成要素でありエネルギー源でもある脂質の原材料として必須であるが、オルガネラやRNA輸送過程などにおいても重要な働きをしているようである(Schneider and Kohlwein 1997)。たとえば出芽酵母の*mtr7*はアセチルCoAカルボキシレースの変異体であるが、この変異体ではmRNAの核外輸送に欠損が生じ、mRNAが核内に蓄積する(Schneider et al. 1996)。また出芽酵母*mdm2*変異体では娘細胞へのミトコンドリアの分配が異常になるが、*MDM2*遺伝子は脂肪酸不飽和化酵素をコードしている(Stewart and Yaffe 1991)。本研究により、脂肪酸合成が核分裂を正常に進行させるためにも必要であることが明らかとなった。

### M期に脂肪酸濃度が低下すると致死的な不均等核分裂が起こる

*lsd1*変異は劣性であった。*lsd1*変異遺伝子によってコードされる変異型脂肪酸合成酵素は、制限温度では活性が低下するのだろう。そのために*lsd1*変異体では細胞内の脂肪酸量が低下し、それが引き金となって核分裂が不均等となると考えられる。この推測は、1) *lsd1*変異がパルミチン酸の添加によって相補される、2) 脂肪酸合成阻害剤セルレニンを野生型酵母の培養液に添加すると*lsd1*変異体と同様の核分裂異常が誘導される、という2つの事実によっても支持される。制限温度で培養してG2期で生育停止させた*cdc25*変異株の生存率はセルレニン存在下でも低下しない。ところが許容温度に戻してM期を再開させるとセルレニン存在下で急速に生存率が低下した。これはM期特異的に脂肪酸合成が必須となるということを示しているが、その解釈としては次のような可能性が考えられる。1) 細胞が核分裂期を正常に通過するためには

細胞内脂肪酸濃度が上昇する必要があるのかもしれない、2) 脂肪酸濃度は細胞周期を通じて一定に保たれるが、M期になると核膜や輸送小胞などの生体膜の新規合成のために脂肪酸消費量が増加し、それを補うために合成酵素が活性化しなければならないのかもしれない。あるいは、3) 脂肪酸の合成量も消費量も通常は細胞周期を通じて一定であるが、G2期で停止している限りは脂肪酸が枯渇しても死には至らないという可能性も考えられる。これらの可能性を検証するためには、細胞周期を通じての脂肪酸量や代謝産物量の変動を測定する必要があるだろう。アセチルCoAカルボキシレースはAMP依存的カイネースによって不活性化されることが知られている（例えばWoods et al. 1994）。AMPはATPの代謝産物であり、その量は細胞内のエネルギー状態の良い指標となると思われる。出芽酵母のAMP依存的カイネースSnf1は培地中のグルコース量が低下すると活性が上昇し、また試験管内では2A型脱リン酸化酵素によって不活性化される。脂肪酸合成系は細胞周期やエネルギー状態によって活性調節を受けているのかもしれない。

OA-519 (oncogenic antigen-519) は乳ガンや子宮ガン、前立腺ガン等の患者のガン細胞で増量している分子で、ガンの悪性度が進行するにつれ発現量が増量する。この分子はガンの早期発見のためのマーカーとして利用されている (Shurbaji et al. 1992、Shurbaji et al. 1996など)。このOA-519を精製したところ、脂肪酸合成酵素であることが明らかとなった (Kuhajda et al. 1994)。OA-519が増量しているガン細胞では脂肪酸合成の活性も上昇していた。これは、脂肪酸合成の制御が乱れると細胞周期進行に異常が生じるという可能性を示唆している。

## *lsd1*変異体では染色体以外の核構造が不均等分配されるらしい

*lsd1*表現型は新しいタイプの核分裂欠損である。*mis6*、*mis12*変異体の表現型との類似性から、当初*lsd1*変異体で生じる姉妹核の大きさの差異は染色体の不均等分配によるものと予想していた。しかしながらFISH法による解析で明らかにしたように、*lsd1*変異体では染色体は正しく均等に分配されていた。この結果から考えると、この変異体では動原体や紡錘体の機能には欠損はないらしい。予想に反して、姉妹核の大きさの違いは染色体凝縮の程度の違いが原因であった。FISHでのrDNAのシグナルの大きさや強度から判断すると、小さい方の娘核では染色体が過凝縮しているようである。しかしながら、何が原因となって姉妹核の凝縮状態に差が生じるのかは明らかではない。脂肪酸合成が阻害されると染色体以外の何らかの核内構造の不均等分配が起こり、それが原因で染色体の凝縮状態に差が生じるのかもしれない。例えば核膜孔が不均等に分配されると、核内輸送が一方の娘核でのみ欠損し、その結果として異常な染色体凝縮が起こるのかもしれない。

分裂酵母 *dcd1* (defective in chromosome decondensation) 変異株はM期終期になっても娘核が脱凝縮できず、両方の核が小さく過凝縮してしまう (Sazer and Nurse 1994)。娘核が過凝縮しているという点に注目すれば、*lsd1* と *dcd1* の表現型は似ていると言えるだろう。*dcd1* 遺伝子は先に単離されていた *pim1*<sup>+</sup> 遺伝子 (Matsumoto and Beach 1991) と同一であり、哺乳類RCC1遺伝子と相同である。RCC1はRan依存的核輸送に関与しており、*pim1/dcd1* 変異では核輸送および染色体脱凝縮が異常になると思われる。また *pim1* 変異株では核膜の断片化が起こっているらしい (Demeter et al. 1995)。電子顕微鏡観察によれば、*lsd1* 変異体では核膜は正常であるように見えたが、検出できない程度の微細な欠損が起こっている可能性はある。脂肪酸合成を阻害すると核分裂後、核輸送あるいは核膜形成に異常が生じ、その結果、一方の娘核で有糸分裂完了後の染色体脱凝縮が起こらなくなっているのかもしれない。

電子顕微鏡で *lsd1* 変異株を観察したところ、伸長した紡錘体のよって核膜の一部が飛び出しているような異常な核分裂像が観察された。この異常な核分裂は、脂肪酸濃度の低下によって核膜の化学的性質が変化したために起こるのかもしれない。あるいは、様々なGタンパクや核膜ラミン、チロシンカイネースなどが脂質修飾を受けているといわれているが (Fukada et al. 1990、Kokame et al. 1992、Casey 1994、Georgatos et al. 1994、Koegl et al. 1994)、そのような修飾が起こらなくなった影響で核分裂が異常になるのかもしれない。いずれにせよ、核分裂過程の異常によって核の構成要素が姉妹核へ不均等に分配されると思われる。実際、変異体では電子密度の濃い核小体領域 (核小体マトリクス) は大きい方の娘核に残っており、小さい方の核は核小体マトリクスを失い、代わりに電子密度の高い顆粒状の構造を含んでいた。小さい方の核へは何らかの核構造が分配されず、そのせいで染色体が脱凝縮した核構造を再構築できなくなっているのかもしれない。あるいは、何らかの脂肪酸の誘導体がそれ自身で核骨格の材料になっている可能性も考えられる。

## まとめ

本研究では、核内構造の均等分配を保障するための新規な制御機構が存在することを示した。そして有糸分裂期における脂肪酸量の低下は、そのような均等分配の過程に致命的な影響を与えた。脂肪酸やその代謝物のレベル変動、あるいは核タンパク質の脂質修飾の状態の変化を調べることで、核内構造分配における脂肪酸分子の役割がより明らかになると思われる。

## おわりに

本研究では、核分裂の均等性を保障する2種類の因子について解析を進めた。

分裂酵母Mis6、Mis12は動原体結合タンパクであった。Mis6はG1期、Mis12はそれ以前に機能して、動原体特異的クロマチン構造の形成に関与しているらしい。これらは姉妹染色体を娘細胞へ均等分配するために必須であった。mis6変異体では、M期中期に動原体が紡錘体中央へ集合できず、また時期尚早な姉妹動原体分離も観察された。動原体クロマチンは姉妹動原体を連結する「コネクター」として働き、動原体と紡錘体の両方向的結合 (bi-orientation) を保障していると思われる。

一方、脂肪酸合成酵素Lsd1の変異でも不均等な核分裂が引き起こされた。細胞内の脂肪酸濃度を低下させるとM期特異的に致死的な異常が生じ、不均等核分裂が起こる。この不均等核分裂は、染色体分配の異常によるものではなく、それ以外の核構造の不均等分配によるものらしい。何らかの構造が不均等に分配されたため、姉妹核間で染色体の凝縮状態に差が生じたと思われる。この分配過程に脂肪酸が関与するということは、たいへん興味深い発見であると思う。

従来、核分裂について考える場合には染色体分配過程に重点が置かれていたが、それ以外の核構造の分配もやはり生命の維持に重要なのだろう。「遺伝情報」が子孫に伝達されるためには、遺伝子本体を含む染色体が分配され、さらにその機能発現に必要な核膜や核骨格などが分配されることが必須であるらしい。



# 材料と方法

## 菌株

(分裂酵母)

本研究で用いた分裂酵母 *S. pombe* 株はすべて972あるいは975株に由来する。

### 野生株

972:*h*

975:*h*<sup>+</sup>

HM123:*h leu1*

### 遺伝子破壊二倍体作成用

5A:*h leu1 ura4 ade6-210*

1D:*h<sup>+</sup> leu1 his2 ura4 ade6-216*

*mis6*、*mis12*、*lsd1*、*cut6*変異株は、温度感受性変異株ライブラリーより単離されたものを3度以上戻し交配した後を用いた。必要に応じて各種細胞周期変異 (*cdc10*、*cdc11*、*cdc25*、*cut4*、*cut9*、*nda3*) あるいは栄養要求性変異 (*leu1*、*his2*、*ura4*) を交配によって導入した。

(大腸菌)

形質転換用の宿主としてMM294株あるいはJM109株を用いた。

## プラスミドベクター

大腸菌用のベクターとしてはpBluescriptKS+ (Stratagene社) を用いた。

分裂酵母用の多コピーベクターとしては、pSK248あるいはpDB248を用いた。pSK248はpBluescriptに出芽酵母 *LEU2* 遺伝子断片と2 $\mu$  DNA 自律複製配列をつないだプラスミドであり、pDB248は大腸菌ベクター pBR322に *LEU2* 遺伝子断片と2 $\mu$  DNA 自律複製配列をつないだプラスミドである。出芽酵母 *LEU2* 遺伝子は分裂酵母 *leu1* 変異のロイシン要求性を相補することができる。分裂酵母のゲノム組み込みベクターとしてはpYC11を用いた。これはpBluescriptに *LEU2* 遺伝子断片をつなげたもので、自律複製配列を含まない。

## 基本的操作

大腸菌およびプラスミドDNAの基本的取り扱いにはManiatis et al. 1982に従った。TEバッファー、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）等、基本的試薬の調製もManiatis et al. 1982に従った。

PCRにはAmpli Taqポリメラーゼ（Palkin elmer社）を用いた。反応条件は次の通り。変性は94度30秒、伸長反応は72度1分。アニーリングは用いるプライマーに応じて最適条件を検討した。

塩基配列の決定にはABI社の蛍光自動DNAシーケンサーを利用し、Dye-terminator法を用いた。

分裂酵母の基本的取り扱いは、Alfa et al. 1993に従った。富栄養培地としてはYPD（1%イーストエキストラクト、2%ポリペプトン、2%グルコース）あるいはYE（0.5%イーストエキストラクト、3%グルコース）を用いた。合成培地としてはEMM2（Mitchison 1970）を用いた。接合用培地としてはSPAを用いた。必要に応じてロイシン、ヒスチジン（200  $\mu$ g/ml）、アデニン、ウラシル（75  $\mu$ g/ml）を添加した。プレート固形培地には2%寒天末を加えた。

パルミチン酸添加実験では、YPDに0.03%のパルミチン酸と1%Tween-20を加えてからオートクレーブして用いた。セルレニン添加実験では、オートクレーブ滅菌した液体培地を常温に戻した後、フィルター濾過したセルレニン水溶液を添加した。ヒドロキシウレアによるS期同調実験では、実験直前に準備したヒドロキシウレア水溶液をフィルター濾過し15mMになるよう培地に添加した。

分裂酵母へのプラスミド導入は酢酸リチウム法を用いた。生存率の測定は、約1000個の細胞をプレート培地に広げて許容条件で培養後、コロニーを計数した（生存率=コロニー数/プレートに広げた細胞数）。

## *lsd1* 遺伝子の単離

pDB248ベクターを基本とした分裂酵母ゲノムライブラリーを*lsd1-H201*変異株に形質転換し、プレートを26度で1.5日培養後、36度にうつしてさらに培養した。36度で形成されたコロニーを拾い、酵母からプラスミドを回収した。回収したプラスミドを制限酵素切断のパターンにより分類したところ、2種類のプラスミドpSA100とpSA110が得られたことが明らかとなった。これらを再度*lsd1*変異株に形質転換して、温度感受性相補を確認した。コスミドマップの結果、これらのプラスミドが*ppa1*遺伝子近傍のゲノム領域を含むことが明らかとなり、四分子解析の結果*lsd1*遺伝子と*ppa1*遺伝子が強く連鎖していることが明らかとなっ

たので、これらプラスミドが*Isd1*<sup>+</sup>遺伝子を含むと結論した。

## エルトリエーションによるG2期同調

Moreno et al. 1989およびKinoshita et al. 1990に従った。Beckman社のElutoriator roterを備えた遠心機 (JE-5.0システム) を用い、遠心力とローターに備わった水流ポンプの圧力を調節して (ポンプ圧8.0、2400rpm)、小さな細胞を選択的に採取した。分裂酵母は細胞の大きさと細胞周期に相関関係があるので、これによってG2初期の細胞を集めることができる。

## 窒素源枯渇

Nurse and Bissett 1981およびSaka and Yanagida 1993に従った。EMM2液体培地で対数増殖後期まで培養した細胞を塩化アンモニウムを除いたEMM2培地に懸濁し、26度で12時間以上培養した。その後、適当な濃度になるようEMM2培地あるいはYPD培地に懸濁して、G1期から生育を再開させた。なお、栄養要求性マーカー入った株を用いると、この実験は成功しなかった。

## FACScanによるDNA含量の測定

基本的にCostello et al. 1986に従った。10<sup>7</sup>細胞を集菌し、蒸留水で洗浄後、70%エタノールに懸濁し、4度で半日以上固定した。遠心してエタノールを除去し、細胞を50mMクエン酸ナトリウム (pH7) で2度洗浄後、1mg/mlのRNaseAを含むクエン酸ナトリウム溶液に懸濁し、37度3時間保温してRNAを分解した。懸濁液の一部をシース液 (Becton Dickinson社) で希釈し、軽く超音波処理を施した後、12.5 μg/mlのヨウ化プロピジウムでDNAを染色した。測定装置にはFACScan (Becton Dickinson社) を用いた。

## DAPI染色、免疫染色、FISH、蛍光顕微鏡観察

DAPI染色はAdachi and Yanagida 1989に従った。酵母培養液に、1/10容量の25%グルタルアルデヒドを添加し、氷上で20分以上固定した。PBSで3度洗浄後、少量のPBSに懸濁して冷蔵保存した。スライドガラス上で25 μg/mlのDAPIを添加し、蛍光顕微鏡で観察した。

免疫染色はHagan and Hyams 1988に従った。培養液に3%ホルムアルデヒドと0.25%グルタルアルデヒドを添加して1時間固定後、0.5mg/ml Zymolyase100Tで細胞壁を消化し、一次抗体、次いで蛍光標識二次抗体を結合させた。核はDAPIによって染色した。微小管染色には抗 $\alpha$ チューブリン抗体TAT1 (Woods et al. 1989) を一次抗体として用いた。

FISHはUzawa and Yanagida 1992およびFunabiki et al 1993に従った。細胞をアルデヒドで20-60分固定してから0.1mg/ml Novozym234と0.5mg/ml Zymolyase100Tで細胞壁を消化し、染色体DNAをアルカリ変性後、ディゴキシゲニン (DIG) 標識したプローブDNAをハイブリダイズさせた。蛍光標識抗DIG抗体 (Boehringer社) でプローブDNAを蛍光染色した。DIG標識にはOligonucleotide tailing labelingキット (Boehringer社) を使用した。SPBの免疫染色には抗Sad1抗体 (Hagan and Yanagida 1995) を用いた。rDNAプローブとしてはpYI10.4 (Toda et al. 1989)、otrプローブとしてはpYC140 (Chikashige et al. 1989) を用いた。

蛍光顕微鏡観察には100W水銀ランプを備えたAxiophot蛍光顕微鏡 (Zeiss社) か、共焦点レーザー走査顕微鏡MRC-1024 (BioRad社) を用いた。写真撮影にはKodak T-Max400白黒フィルムを用いた。高感度撮影にはSIT (Silicon intensifier target) カメラC1000か冷却CCDカメラC5985 (ともに浜松フォトニクス社) を使用した。得られた高感度画像は付属のコンピューターあるいはビデオ取り込みによってデジタル化した。Adobe photoshopあるいはNIH Imageソフトウェアを用いて、情報の線形性を失わないように注意しながらコントラスト補正、疑似着色を行った。

## 位相差顕微鏡を用いた生細胞核分裂の観察

Robinow 1975を参考とした。21%ゼラチンを含むYPD液体培地を100度でゾル化した後、37度まで冷却し、あらかじめ暖めておいたスライドガラス上に20 $\mu$ l滴下した。プレート培地上で1日程度培養した新鮮な細胞を掻き取り、スライドガラス上でYPD+ゼラチン培地に懸濁した。泡が入らないように22mm四方のカバーグラスをかけ、22度で30分程度保温して、ゼラチンをゲル化した。21%ゼラチンを含むことで培地と細胞質の屈折率がおおよそ同じになり、核領域の位相差を視覚化できるようになる。

観察には、100Wハロゲンランプと位相差照明装置、および100倍位相差対物レンズ (開口数1.4プランアポクロマート) を備えたAxiophot顕微鏡 (Zeiss社) を用いた。撮影には間欠記録ビデオレコーダ

BR-S925（ビクター社）に接続した明視野用カメラC2400（浜松フォトニクス社）を使用した。

## GFP観察

細胞を固定して観察する場合にはメタノール固定法を用いた。

GFPを発現している細胞を対数増殖初期まで培養したのち、吸引濾過装置を用いてグラスファイバー製フィルター上に集めた。-80度に冷却した100%メタノールに細胞の張り付いたフィルターを浸け、-80度のディープフリーザー中で30分以上静置した。その後、室温のPBSを段階的に加え、メタノール濃度を75、50、30%と順次希釈した。遠心によって細胞を集め、PBSで3回洗浄後、少量のPBSに懸濁して冷蔵保存した。観察は保存後2日以内に行った。

DAPI染色する場合は、スライドガラス上で細胞懸濁液と等量の0.2  $\mu$ g/ml DAPI水溶液を混合した。ヨウ化プロピジウムで核を染色する場合には、細胞を100  $\mu$ g/mlのRNaseAを含むPBSに懸濁して37度で30分以上保温してRNAを分解した後、細胞懸濁液と等量の5  $\mu$ g/mlヨウ化プロピジウム水溶液をスライドガラス上で混合した。なお、理由は明らかではないが、ヨウ化プロピジウム染色を行った場合、バックグラウンドが高くなることがあった。これはヨウ化プロピジウムの濃度を1/5～1/10に減少することで改善された。蛍光観察の際に退色が問題となる場合には、1mg/mlの

-フェニレンジアミンを添加することで改善された。微小管の免疫染色と組み合わせる場合にはHagan and Hyams 1988に従った。PBSの代わりにPEMバッファー（100mM PIPES、1mMEGTA、1mMMgCl<sub>2</sub>）を用いて上述のようにメタノール固定した細胞を、0.1mg/ml Zymolyase100Tで37度10分間処理して細胞壁を消化し、TAT1抗体を用いて微小管を染色した。

生細胞で経時的に観察する場合には、次のようにした。EMM2培地で、対数増殖初期まで培養した細胞を遠心で集菌し、約 $5 \times 10^6$ 細胞/mlになるようEMM2+0.5%低融点アガロース培地（EMM2-LMPagarose）に懸濁した。EMM2-LMPagaroseは予め100度で溶解させ、37度に保温しゾル化しておいた。20  $\mu$ lの細胞懸濁液をスライドガラス上に滴下し、泡が入らないよう注意して22mm四方のカバーガラスをかけた（計算上これで約3  $\mu$ m厚の薄膜が形成されることになる）。サンプルを湿ったティッシュペーパーと共にシャーレに入れて乾燥しないように注意しながら、26度で30分保温してEMM2-LMPagaroseをゲル化させた。共焦点レーザー走査顕微鏡MRC-1024（BioRad社）の間欠記録モードを用いてGFP蛍光を30秒間隔で経時的に撮影した。電気的雑音を除去するため1回の撮影につき3度走査しカルマン平均を取った。得られた画像情報は、Adobe photoshopソフトウェアを用いて、情報の線形性を失わないように注意しながらコントラスト補正を行った。

## Hela細胞の培養、免疫染色

Hela細胞の培養には1%のウシ血清を加えたダルベッコ変法イーグル培地（Gibco BRL社）を用いた。トランスフェクションにはQIAGEN社のSuperFectキットを用いた（無血清培地100 $\mu$ l、SuperFect溶液20 $\mu$ lに対しDNAを4 $\mu$ g加えたときに最大効率が得られた）。トランスフェクション用DNAの精製にはQIAGEN社 Endofree Plasmid maxiキットを利用した。これによりエンドトキシンを含まない高純度なプラスミドが得られる。

免疫染色は次のように行った。滅菌したカバーグラス上でHela細胞を約30%コンフルエントになるまで培養し、トランスフェクションを行った。さらに24時間培養後、培地を除去し、3%パラフォルムアルデヒド-2%ショ糖溶液を加え、室温で10分間固定した。PBSで3度洗浄後、0.5%Triton X-100を含むPBSを加えて5分間静置し、透過処理を行った。PBSで3度洗浄した後、1%BSAを含むPBSを加えて10分間静置し、ブロッキング処理を行った。PBSで3度洗浄後、PBSで希釈した一次抗体溶液100 $\mu$ lを細胞の張り付いたカバーグラス上に滴下し、乾燥しないよう注意しながら室温で1時間以上静置した。PBSで3度洗浄後、Hoechst33342（5 $\mu$ g/ml）とCY3標識抗マウスIgG抗体（CHEMICON社 1:500希釈）を含むPBSを100 $\mu$ lを滴下し、1時間静置した。PBSで3度洗浄後、1mg/ml *p*-フェニレンジアミンを含む100mMTris（pH8.8）+90%グリセロールでマウントし、ネイルポリッシュで封印した。一次抗体の希釈率は次の通り。抗myc抗体（9E10 Biochem社）1:200、抗HA抗体（12CA5 Boehringer社）1:2000、抗 $\alpha$ チューブリン抗体（DM1A）1:500。

## 遺伝子破壊、胞子発芽法

遺伝子破壊はRothstein 1993に従った。遺伝子の大半を*ura4*遺伝子で置換したDNA断片を作製し、制限酵素で切断して直線化した後、5A/1D二倍体に形質転換した。相同組み換えにより目的遺伝子が*ura4*遺伝子に置換されてウラシル非要求性になった二倍体を選択し、ゲノムサザンプロット法により遺伝子破壊が起こっていることを確認した。26度と33度で4分子解析を行い、ウラシル非要求性の胞子がコロニーを形成できるか否かを検定した。

胞子発芽法による表現型の観察は次のように行った。遺伝子破壊二倍体を低窒素源培地（EMM2培地の

塩化アンモニウムを0.1%グルタミン酸ナトリウムに置き換えたもの)で24時間培養し、窒素源を枯渇させて減数分裂・胞子形成を誘導した。遠心によって胞子を回収し、0.5%  $\beta$ グルクロニダーゼ (SIGMA社) 水溶液に懸濁し、室温で12時間以上攪拌した。この処理によって残存する二倍体細胞を溶菌させた。蒸留水による洗浄後、胞子は蒸留水に懸濁して冷蔵保存した。遺伝子破壊一倍体を発芽させる場合には、ウラシルを含まないEMM2培地に適量の胞子を植え、33度で振とう培養した。培地にウラシルが含まれないため、目的遺伝子が*ura4*遺伝子に置換された胞子のみ発芽可能となる。経時的にサンプルを採取し、血算盤上で目視により胞子濃度、発芽した細胞濃度を測定した。

## HA、mycあるいはGFP融合*mis6*遺伝子の作成

PCRを用いた突然変異導入によって*mis6*遺伝子の終止コドン除去し、かわりにNotI制限酵素部位を導入した。このNotI部位に3回連続したHAエピトープと*nmt1*遺伝子のpolyA付加シグナル配列を含むDNA断片をDNAライゲーションにより導入した。作成したプラスミドをpMH601と名付けた。pMH601はpSK248ベクターを基本として、遺伝子本来のプロモーターによって発現される*mis6*<sup>+</sup>-HA融合遺伝子を含む。ゲノムへの*mis6*<sup>+</sup>-HA遺伝子組み込みには、プロモーターおよび開始コドンを含まない*mis6*<sup>+</sup>-HA融合遺伝子断片 (pMH601 HindIII-SacI断片) をpYC11につないだプラスミド (pYC11-*mis6*-HA) を用いた。

上述の手法と同様に*mis6*遺伝子にGFPを融合したプラスミドはそれぞれ、pMG601 (多コピープラスミド)、pYC11-*mis6*-GFP (組み込み用プラスミド) と名付けた。pYC11-*mis6*-GFPには改変型GFP (S65T) を用いた。65番セリンをスレオニンに置換することでGFPの蛍光強度が6倍増加すると言われている (Heim et al. 1995)。

mycエピトープは合成オリゴヌクレオチドを用いて作成した。制限酵素切断とライゲーション反応を繰り返してmycエピトープが8回繰り返した遺伝子断片を作成し、*nmt1*遺伝子のpolyA付加シグナル配列を融合してpYC11ベクターに結合した。得られたプラスミドをpMYC8と名付けた。*mis6*<sup>+</sup>-myc融合遺伝子をゲノムへ組み込みのためのプラスミド、pYC11-*mis6*-myc8、の作成にはpMYC8を利用した。

## 細胞抽出液の調製

酵母細胞をTEバッファーで洗浄後、抽出バッファーに $1\sim 3 \times 10^6$ 細胞/ $\mu$ lとなるよう懸濁し、グラスビーズ (直径0.5mm) を加え、ボルテックスミキサーで激しく混合することにより細胞を破碎した。断続的に

混合と氷上静置を繰り返すことで、温度上昇を防いだ。破碎後、弱い遠心（微量遠心機で5000rpm、5分）によりガラスビーズと細胞壁を除去した。免疫沈降に用いる場合には20kGで30分間、シヨ糖密度勾配遠心の場合には20kGで10分間、この抽出液を遠心してその上清を用いた。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は（Laemmli 1970）に従った。抽出液に1/4量の4xSDSサンプルバッファー（0.25M Tris-Cl[pH6.8]、4%SDS、40%glycerol、0.2%プロモフェノールブルー、10%βメルカプトエタノール）を添加して100度で5分間加温した後、ウェルに重層し、電気泳動した。

抽出バッファーには、特に述べない限り、HBバッファー（25mM Tris-Cl[pH7.5]、15mM EGTA、15mM MgCl<sub>2</sub>、60mM β glycerophosphate、15mM *p*-nitrophenylphosphate、0.5mM NaVO<sub>4</sub>、1mM DTT、1%NP-40）に100mM NaClを加えたものを用いた。タンパク分解酵素阻害剤としては1mM PMSFと1%トラジロール（Bayer社）を加えた。

## ウエスタンブロット

Towbin et al. 1979に従った。泳動後のSDSポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース膜にタンパクを電気泳動的に転写した。転写装置としてTrans-blot（Bio-Rad社）あるいはセミドライ型転写装置Trans-blot SD（Bio-Rad社）を用いた。Trans-blotを用いる場合、60mM Tris、127mMグリシン、20%メタノールをバッファーとして定電流60mAで3時間転写した。加熱を防ぐため、転写装置を氷中で冷却した。Trans-blot SDを用いる場合には、48mM Tris、39mMグリシン、20%メタノール、1.3mM SDSをバッファーとしてクロスリミット条件（6cm x 9 cmの小ゲルからの転写で100mA、20V）で35分間転写した。

転写後のニトロセルロース膜を5%スキムミルクに常温で1時間浸してブロッキング処理を施した後、5%スキムミルクで希釈した一次抗体を反応させ、洗浄後、二次抗体と反応させた。抗体との反応時間はそれぞれ30分以上とした。ニトロセルロース膜の洗浄にはPBS+0.2%Tween20を用いた。一次抗体としては抗HAマウスモノクローナル抗体（12CA5、Babco社、1:1200希釈）、抗mycマウスモノクローナル抗体（9E10、Oncogene Science社 1:100希釈）を用いた。二次抗体としてはHRP（horse radish peroxidase）標識した抗マウスIgG抗体（Amersham社）を1:500希釈して用いた。洗浄後、ECLキット（Amersham社）による化学発光法あるいはPODイムノステインキットによる色素染色を用いてタンパクを検出した。

## CHIP（クロマチン免疫沈降法）



Hecht et al. 1996、Orlando and Paro 1993を参考にして、分裂酵母用プロトコルを作製した。

1x10<sup>7</sup>細胞/mlまで培養した酵母培養液100mlに、10mlの11%ホルマリン溶液を加えて培養温度で10分間固定し、さらに氷水中で50分固定した（11%ホルマリン溶液:37%ホルマリン[ナカライタスク社]を希釈し、0.1M NaCl、1mM EDTA-Na[pH8.0]、50mM Tris-Cl[pH8.0]を加えた）。遠心によって集菌後、氷冷した5mlのバッファーI（50mM HEPES-KOH[pH7.5]、140mM NaCl、1mMEDTA[pH7.5]、1%Triton X-100、0.1%Na-Deoxycholate）で3度洗浄した。以降、特に述べない限り、操作は4度で行った。タンパク分解酵素阻害剤を含むバッファーIに細胞を懸濁し、ガラスビーズと混合して細胞を破碎した。遠心によってガラスビーズを除いた後、上清で沈殿を再懸濁し、超音波処理を施した（Branson社SONIFIER 450を用いた。出力3.0 duty30%のパルスで30秒間、氷上での1分間の冷却をはさみながら計4回。この操作でクロマチンDNAが0.8キロ塩基対以下に切断されることを予備実験で確認した）。5000rpm 3分、14000rpm15分の遠心後、上清を回収した。タンパク濃度が4mg/200 $\mu$ lとなるよう希釈し（全細胞抽出液 Whole Cell Extractと呼ぶ）、10 $\mu$ lのプロテインAセファロースビーズと1時間混合後（pre-clear処理）、遠心でビーズを除いた全細胞抽出液と抗HA抗体結合プロテインAセファロースビーズ10 $\mu$ lを4度で3時間混合した（バッファーで平衡化したビーズに0.5 $\mu$ lのBabco社12CA5抗体を加えて室温で3時間混合することにより抗体をプロテインAに結合させた）。ビーズを1mlのバッファーIで3回、バッファーI'（バッファーIのNaCl濃度を500mMに増加したもの）で3回、バッファーII（10mM Tris-Cl[pH8.0]、0.25M LiCl、0.5%NP-40、0.5%Na-Deoxycholate）で2回、TEバッファーで2回洗浄した後、100 $\mu$ lのTER（TE+10 $\mu$ g/ml RNaseA）に懸濁して37度で15分保温した。ビーズの洗浄はバッファーを加えて4度で10分以上攪拌することにより行った（この操作を短縮すると、バックグラウンドが上昇した）。0.25%SDSと250 $\mu$ g/ml proteinase Kを添加し、37度で一晩（8時間以上）保温した。ついで65度で6時間以上保温してホルムアルデヒド架橋を解消した。フェノール・クロロホルム抽出の後、エタノール沈殿で共沈DNAを回収した。共沈DNAは50 $\mu$ lのTEに懸濁し、冷蔵保存した。

PCRは反応容量20 $\mu$ lで行った。テンプレートとして共沈DNAは0.4 $\mu$ l、全細胞抽出液は0.025 $\mu$ l用いた。予備実験で、テンプレートの希釈シリーズを作り、PCRの条件が半定量的であることを確認した（すなわち投入したテンプレート量に応じて収量が増減する）。PCR産物をエタノール沈殿によって濃縮し、ポリアクリルアミド電気泳動後、臭化エチジウムにより染色した。産物を定量する場合は、ゲル撮影装置FASII（Toyobo社）で撮影後、画像をデジタル化し、NIH Imageソフトウェアでバンド強度を測定した。

## マイクロコッカリヌクレースによるクロマチン部分消化

基本的にTakahashi et al. 1992に従った。約 $10^9$ 細胞を集菌して10mM Tris-Cl (pH7.5) で一度洗浄した後、あらかじめ37度に加熱した10mlの50mM Tris-Cl (pH7.5) 、1Mソルビトール、0.2%  $\beta$ メルカプトエタノール、0.2mg/ml Zymolyase 100T溶液に懸濁し、攪拌しながら20分間37度で保温した(細胞壁消化)。遠心によって集菌した後、氷冷した200 $\mu$ lのSCPバッファー(20mM PIPES[pH 6.3]、0.1mM CaCl<sub>2</sub>、1M ソルビトール、1mM PMSF)で懸濁した。以降は、特に述べない限り、氷冷温度で行った。細胞懸濁液を8mlのlysisバッファー(20mM PIPES[pH6.3]、0.1mM CaCl<sub>2</sub>、9% Ficoll400、1mM PMSF)と穏やかに混合し、浸透圧差で細胞を破裂させた。10kG (TOMY社 No.4Nローターで10000rpm)で5分遠心後、沈殿を950 $\mu$ lのSCPバッファーに懸濁した。37度で2分間保温後、50 $\mu$ lのマイクロコッカルヌクレース溶液(5000Unit/mlになるようSCPバッファーに溶解したもの。-20度で保存。Worthington社)を加えて37度で保温し、0、1、2、4、8分後に200 $\mu$ lずつサンプルを採取した。採取したサンプルにはすぐに20 $\mu$ lの0.5M EDTAを混合し、氷上で保存した。サンプルを微量遠心機で12000rpm20分間遠心分離し、上清を回収した。0.2mg/mlのproteinaseKを加え、50度で4時間以上保温後、フェノール・クロロホルム抽出を3回以上繰り返した。エタノール沈殿後、DNAを50 $\mu$ lのTER (TE+10 $\mu$ g/ml RNaseA) バッファーに溶解した。一度の電気泳動には10-20 $\mu$ lを用いた。なおフェノール・クロロホルム処理を怠ると、泳動パターンが乱れることがあった(通常臭化エチジウム染色で観察されるはずのはしご状パターンが不明瞭となる)。

## シヨ糖密度勾配遠心分画

シヨ糖密度勾配はサンプラテック社NO-1密度勾配作製装置を用いて作製した。HBバッファー+100mM NaClに40%シヨ糖を加えた溶液、あるいは15%シヨ糖を加えた溶液を作製し、両者を徐々に混合しながら勾配を形成させた(5.12ml)。遠心管にはポリアロマ13x51mmチューブ(Beckman社)を用いた。200 $\mu$ lの細胞抽出液を重層し、スイングローターSW50.1(Beckman社)で40000rpm、12時間遠心した。フラクションコレクター装置を用いて、勾配上層から順に等量ずつ20画分に分けた。分画操作は氷室で行った。SDSポリアクリルアミド電気泳動後、ウエスタンブロットにより目的のタンパクを検出した。マーカーは電気泳動後、クマシーブルー染色により検出した。

## 免疫沈降、銀染色

免疫沈降はHarlow and Lane 1988を参考にした。プロテインAセファロースビーズ(Amersham社)はあら

はじめPBSで膨潤させ、0.1%アジ化ナトリウムを添加して10%スラリーとして冷蔵保存していたものを用いた。抗体を結合させる場合は、ビーズをPBSで洗浄後、50%スラリーとなるようPBSと抗体を加え、室温で3時間以上混合した。抽出バッファーで平衡化した後、実験に用いた。抗体を共有結合させる場合には、先のように抗体を結合させたビーズを0.2Mホウ酸ナトリウムバッファーに懸濁し、ピメルイミド酸ジメチルを加えてアミノ基間を架橋した後、エタノールアミンでブロッキング処理を施した。抗myc抗体は9E10モノクローナル抗体（Oncogene Science社）、抗HA抗体は12CA5あるいは16B12モノクローナル抗体（いずれもBabco社、マウス腹水）を用いた。16B12の方が酵母タンパクとの非特異的交叉反応が少ないようであった。実験に用いる抗体量、ビーズ量は予備実験を行って決定した。12CA5抗体でMis6-HAを沈降させる場合には $10^9$ 細胞に対して $1\mu\text{l}$ の腹水と $10\mu\text{l}$ のビーズを用いた時、最大の効率（50%程度）が得られた。

免疫沈降には細胞抽出液を20kGで30分遠心後、その上清を用いた。基本的に操作は4度で行った。抗体を結合していないビーズと抽出液を一時間混合してプレクリアー処理（非特異的にビーズに吸着する成分を除く）を施した後、遠心でビーズを除き、次に抗体を結合したビーズと3時間以上混合した。遠心で上清を除去した後、ビーズを10倍量の抽出バッファーで5回洗浄した。洗浄はバッファーとビーズを5分間混合し続けることにより行った。その後ビーズをSDS電気泳動サンプルバッファーに懸濁し、100度で5分間加温した後、ビーズごとウェルに重層した。あるいはビーズの2倍量の100mMグリシン（pH2.3）または20mM塩酸で沈降タンパクをビーズから溶出し、サンプルバッファーと混合して加温後ウェルに重層し、SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。

銀染色には銀染色キットワコー（和光純薬）を用いた。コンタミネーションによる染色像の劣化を防ぐため以下のような処置を施した。ゲル作製に用いるガラスプレートを0.1M塩酸ついで5%SCAT 20X-PF（第一工業製薬）洗剤溶液に浸して洗浄した。ゲル作成用の溶液はフィルター濾過し、電気泳動用のバッファーは毎回直前に新しく調製した。

## 参考文献

- Adachi Y and Yanagida M (1989). Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crml+* which encodes a 115- kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J Cell Biol* 108, 1195-207
- Alfa C, Fantes P, Hyams J, McLeod M and Warbrick E (1993). Experiments with fission yeast. Cold spring harbor laboratory press
- Allshire RC, Javerzat JP, Redhead NJ and Cranston G (1994). Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell* 76, 157-69
- Allshire RC, Nimmo ER, Ekwall K, Javerzat JP and Cranston G (1995). Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev* 9, 218-33
- Ault JG and Nicklas RB (1989). Tension, microtubule rearrangements, and the proper distribution of chromosomes in mitosis. *Chromosoma* 98, 33-9
- Awaya J, Ohno T, Ohno H and Omura S (1975). Substitution of cellular fatty acids in yeast cells by the antibiotic cerulenin and exogenous fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 409, 267-73
- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW and Elledge SJ (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86, 263-74
- Bloom KS and Carbon J (1982). Yeast centromere DNA is in a unique and highly ordered structure in chromosomes and small circular minichromosomes. *Cell* 29, 305-17
- Boddy MN, Furnari B, Mondesert O and Russell P (1998). Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science* 280, 909-12
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW and Vogelstein B (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300-3
- Cairns BR (1998). Chromatin remodeling machines: similar motors, ulterior motives. *Trends Biochem Sci* 23, 20-5
- Carbon J and Clarke L (1984). Structural and functional analysis of a yeast centromere (CEN3). *J Cell Sci Suppl* 1, 43-58
- Casey PJ (1994). Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 219-25
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-5
- Chen RH, Waters JC, Salmon ED and Murray AW (1996). Association of spindle assembly checkpoint component X MAD2 with unattached kinetochores. *Science* 274, 242-6
- Chikashige Y, Kinoshita N, Nakaseko Y, Matsumoto T, Murakami S, Niwa O and Yanagida M (1989). Composite motifs and repeat symmetry in *S. pombe* centromeres: direct analysis by integration of NotI restriction sites. *Cell* 57, 739-51
- Clarke L and Carbon J (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* 287, 504-9
- Clarke L, Amstutz H, Fishel B and Carbon J (1986). Analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci US A* 83, 8253-7

Clarke L and Baum MP (1990). Functional analysis of a centromere from fission yeast: a role for centromere-specific repeated DNA sequences. *Mol Cell Biol* 10, 1863-72

Cohen-Fix O and Koshland D (1997). The metaphase-to-anaphase transition: avoiding a mid-life crisis. *Curr Opin Cell Biol* 9, 800-6

Coleman TR and Dunphy WG (1994). Cdc2 regulatory factors. *Curr Opin Cell Biol* 6, 877-82

Comings DE and Okada TA (1971). Fine structure of kinetochore in Indian muntjac. *Exp Cell Res* 67, 97-110

Connelly C and Hieter P (1996). Budding yeast SKP1 encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression. *Cell* 86, 275-85

Cooke CA, Heck MM and Earnshaw WC (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol* 105, 2053-67

Costello G, Rodger L and Beach D (1986). Fission yeast enters the stationary phase G0 state from either mitotic G1 or G2. *Curr Genet* 11, 119-25

Demeter J, Morpew M and Sazer S (1995). A mutation in the RCC1-related protein pim1 results in nuclear envelope fragmentation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci US A* 92, 1436-40

Depinet TW, Zackowski JL, Earnshaw WC, Kaffe S, Sekhon GS, Stallard R, Sullivan BA, Vance GH, Van Dyke DL, Willard HF, Zinn AB and Schwartz S (1997). Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA. *Hum Mol Genet* 6, 1195-204

Ding R, McDonald KL and McIntosh JR (1993). Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* 120, 141-51

Doheny KF, Sorger PK, Hyman AA, Tugendreich S, Spencer F and Hieter P (1993). Identification of essential components of the *S. cerevisiae* kinetochore. *Cell* 73, 761-74

Doree M (1990). Control of M-phase by maturation-promoting factor. *Curr Opin Cell Biol* 2, 269-73

du Sart D, Cancilla MR, Earle E, Mao JI, Saffery R, Tainton KM, Kalitsis P, Martyn J, Barry AE and Choo KH (1997). A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nat Genet* 16, 144-53

Duesberg P, Rausch C, Rasnick D and Hehlmann R (1998). Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci US A* 95, 13692-7

Earnshaw WC and Rothfield N (1985). Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91, 313-21

Ekwall K, Javerzat JP, Lorentz A, Schmidt H, Cranston G and Allshire R (1995). The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* 269, 1429-31

Ekwall K, Olsson T, Turner BM, Cranston G and Allshire RC (1997). Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* 91, 1021-32

Elledge SJ (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-72

Fang G, Yu H and Kirschner MW (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev* 12, 1871-83

Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, Lerner RA and Wigler M (1988). Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell*

Fishel B, Amstutz H, Baum M, Carbon J and Clarke L (1988). Structural organization and functional analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 8, 754-63

Fitzgerald-Hayes M (1987). Yeast centromeres. *Yeast* 3, 187-200

Fukada Y, Takao T, Ohguro H, Yoshizawa T, Akino T and Shimonishi Y (1990). Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature* 346, 658-60

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, 961-76

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, 961-76

Funabiki H, Yamano H, Kumada K, Nagao K, Hunt T and Yanagida M (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* 381, 438-41

Furuya K, Takahashi K and Yanagida M (1998). Faithful anaphase is ensured by *mis4*, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase. *Genes Dev* 12, 3408-18

Gamulin V, Mao J, Appel B, Sumner-Smith M, Yamao F and Soll D (1983). Six *Schizosaccharomyces pombe* tRNA genes including a gene for a tRNA<sup>Lys</sup> with an intervening sequence which cannot base-pair with the anticodon. *Nucleic Acids Res* 11, 8537-46

Georgatos SD, Meier J and Simos G (1994). Lamins and lamin-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 347-53

Goh PY and Kilmartin JV (1993). NDC10: a gene involved in chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 121, 503-12

Gorbsky GJ (1992). Chromosome motion in mitosis. *Bioessays* 14, 73-80

Gorbsky GJ and Ricketts WA (1993). Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. *J Cell Biol* 122, 1311-21

Gorbsky GJ (1997). Cell cycle checkpoints: arresting progress in mitosis. *Bioessays* 19, 193-7

Grewal SI and Klar AJ (1997). A recombinationally repressed region between *mat2* and *mat3* loci shares homology to centromeric repeats and regulates directionality of mating-type switching in fission yeast. *Genetics* 146, 1221-38

Guacci V, Koshland D and Strunnikov A (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* 91, 47-57

Hagan I and Yanagida M (1995). The product of the spindle formation gene *sad1+* associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *J Cell Biol* 129, 1033-47

Hagan IM and Hyams JS (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 89, 343-57

Hahnenberger KM, Carbon J and Clarke L (1991). Identification of DNA regions required for mitotic and meiotic functions within the centromere of *Schizosaccharomyces pombe* chromosome I. *Mol Cell Biol* 11, 2206-15

Halverson D, Baum M, Stryker J, Carbon J and Clarke L (1997). A centromere DNA-binding protein from fission yeast affects chromosome segregation and has homology to human CENP-B. *J Cell Biol* 136, 487-500

Haraguchi T, Kaneda T and Hiraoka Y (1997). Dynamics of chromosomes and microtubules visualized by multiple-wavelength fluorescence imaging in living mammalian cells: effects of mitotic inhibitors on cell cycle progression. *Genes*

- Harlow E and Lane D (1988). *Antibodies: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Harrington JJ, Van Bokkelen G, Mays RW, Gustashaw K and Willard HF (1997). Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat Genet* 15, 345-55
- Hartwell LH and Weinert TA (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-34
- He X, Patterson TE and Sazer S (1997). The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci US A* 94, 7965-70
- Hecht A, Strahl-Bolsinger S and Grunstein M (1996). Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 383, 92-6
- Heim R, Cubitt AB and Tsien RY (1995). Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-4
- Hemmerich P, Bosbach S, von Mikecz A and Krawinkel U (1997). Human ribosomal protein L7 binds RNA with an alpha-helical arginine-rich and lysine-rich domain. *Eur J Biochem* 245, 549-56
- Hershko A, Ganoth D, Sudakin V, Dahan A, Cohen LH, Luca FC, Ruderman JV and Eytan E (1994). Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinase cdc2. *J Biol Chem* 269, 4940-6
- Heus JJ, Zonneveld BJ, de Steensma HY and van den Berg JA (1993). The consensus sequence of *Kluyveromyces lactis* centromeres shows homology to functional centromeric DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 236, 355-62
- Hirano T and Mitchison TJ (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* 79, 449-58
- Hirano T, Mitchison TJ and Swedlow JR (1995). The SMC family: from chromosome condensation to dosage compensation. *Curr Opin Cell Biol* 7, 329-36
- Hiraoka Y, Toda T and Yanagida M (1984). The NDA3 gene of fission yeast encodes beta-tubulin: a cold-sensitive nda3 mutation reversibly blocks spindle formation and chromosome movement in mitosis. *Cell* 39, 349-58
- Holloway SL, Glotzer M, King RW and Murray AW (1993). Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 73, 1393-402
- Hoyt MA, Totis L and Roberts BT (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-17
- Hudson DF, Fowler KJ, Earle E, Saffery R, Kalitsis P, Trowell H, Hill J, Wreford NG, de Kretser DM, Cancilla MR, Howman E, Hii L, Cutts SM, Irvine DV and Choo KH (1998). Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights. *J Cell Biol* 141, 309-19
- Hunt T (1989). Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Biol* 1, 268-74
- Hyman AA and Mitchison TJ (1991). Two different microtubule-based motor activities with opposite polarities in kinetochores. *Nature* 351, 206-11
- Ikeno M, Grimes B, Okazaki T, Nakano M, Saitoh K, Hoshino H, McGill NI, Cooke H and Masumoto H (1998). Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat Biotechnol* 16, 431-9
- Jiang W, Lechner J and Carbon J (1993). Isolation and characterization of a gene (CBF2) specifying a protein component of the budding yeast kinetochore. *J Cell Biol* 121, 513-9
- King RW, Peters JM, Tugendreich S, Rolfe M, Hieter P and Kirschner MW (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81, 279-88

- King RW, Deshaies RJ, Peters JM and Kirschner MW (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-9
- Kinoshita N, Ohkura H and Yanagida M (1990). Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* 63, 405-15
- Koegl M, Zlatkine P, Ley SC, Courtneidge SA and Magee AI (1994). Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem J* 303, 749-53
- Kokame K, Fukada Y, Yoshizawa T, Takao T and Shimonishi Y (1992). Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein alpha-subunit. *Nature* 359, 749-52
- Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD and Pasternack GR (1994). Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci US A* 91, 6379-83
- Kuo MH and Allis CD (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20, 615-26
- Lechner J and Carbon J (1991). A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere. *Cell* 64, 717-25
- Lee JK, Huberman JA and Hurwitz J (1997). Purification and characterization of a CENP-B homologue protein that binds to the centromeric K-type repeat DNA of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci US A* 94, 8427-32
- Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623-7
- Li R and Murray AW (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519-31
- Li R, Yerganian G, Duesberg P, Kraemer A, Willer A, Rausch C and Hehlmann R (1997). Aneuploidy correlated 100% with chemical transformation of Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci US A* 94, 14506-11
- Li Y and Benezra R (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: *hsMAD2*. *Science* 274, 246-8
- Li Y, Gorbea C, Mahaffey D, Rechsteiner M and Benezra R (1997). *MAD2* associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc Natl Acad Sci US A* 94, 12431-6
- Liao H, Winkfein RJ, Mack G, Rattner JB and Yen TJ (1995). CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol* 130, 507-18
- Lorentz A, Ostermann K, Fleck O and Schmidt H (1994). Switching gene *swi6*, involved in repression of silent mating-type loci in fission yeast, encodes a homologue of chromatin-associated proteins from *Drosophila* and mammals. *Gene* 143, 139-43
- Losada A, Hirano M and Hirano T (1998). Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev* 12, 1986-97
- Maniatis T, Shriner CL and Brautigan DL (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Masumoto H, Masukata H, Muro Y, Nozaki N and Okazaki T (1989). A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 109, 1963-73
- Matsumoto S, Yanagida M and Nurse P (1987). Histone transcription in cell cycle mutants of fission yeast *EMBO J* 6, 1093-7
- Matsumoto T, Fukui K, Niwa O, Sugawara N, Szostak JW and Yanagida M (1987). Identification of healed terminal DNA fragments in linear minichromosomes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 7, 4424-30



- Matsumoto T, Murakami S, Niwa O and Yanagida M (1990). Construction and characterization of centric circular and acentric linear chromosomes in fission yeast. *Curr Genet* 18, 323-30
- Maundrell K (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123, 127-30
- McCully EK and Robinow CF (1971). Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: a comparative study with light and electron microscopy. *J Cell Sci* 9, 475-507
- Meeks-Wagner D, Wood JS, Garvik B and Hartwell LH (1986). Isolation of two genes that affect mitotic chromosome transmission in *S. cerevisiae*. *Cell* 44, 53-63
- Mellor J, Jiang W, Funk M, Rathjen J, Barnes CA, Hinz T, Hegemann JH and Philippsen P (1990). CPF1, a yeast protein which functions in centromeres and promoters. *EMBO J* 9, 4017-26
- Meluh PB and Koshland D (1995). Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell* 6, 793-807
- Meluh PB and Koshland D (1997). Budding yeast centromere composition and assembly as revealed by in vivo cross-linking. *Genes Dev* 11, 3401-12
- Meluh PB, Yang P, Glowczewski L, Koshland D and Smith MM (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 94, 607-13
- Michaelis C, Ciosk R and Nasmyth K (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91, 35-45
- Mitchell AR, Jeppesen P, Nicol L, Morrison H and Kipling D (1996). Epigenetic control of mammalian centromere protein binding: does DNA methylation have a role? *J Cell Sci* 109, 2199-206
- Mizukami T, Chang WI, Garkavtsev I, Kaplan N, Lombardi D, Matsumoto T, Niwa O, Kounosu A, Yanagida M, Marr TG and et al (1993). A 13 kb resolution cosmid map of the 14 Mb fission yeast genome by nonrandom sequence-tagged site mapping. *Cell* 73, 121-32
- Mohamed AH, Chirala SS, Mody NH, Huang WY and Wakil SJ (1988). Primary structure of the multifunctional alpha subunit protein of yeast fatty acid synthase derived from FAS2 gene sequence. *J Biol Chem* 263, 12315-25
- Moreno S, Hayles J and Nurse P (1989). Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell* 58, 361-72
- Mueller RD, Yasuda H, Hatch CL, Bonner WM and Bradbury EM (1985). Identification of ubiquitinated histones 2A and 2B in *Physarum polycephalum*. Disappearance of these proteins at metaphase and reappearance at anaphase. *J Biol Chem* 260, 5147-53
- Murakami H and Okayama H (1995). A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. *Nature* 374, 817-9
- Murakami S, Matsumoto T, Niwa O and Yanagida M (1991). Structure of the fission yeast centromere cen3: direct analysis of the reiterated inverted region. *Chromosoma* 101, 214-21
- Murakami Y, Huberman JA and Hurwitz J (1996). Identification, purification, and molecular cloning of autonomously replicating sequence-binding protein I from fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 502-7
- Murphy TD and Karpen GH (1995). Localization of centromere function in a *Drosophila* minichromosome. *Cell* 82, 599-609
- Murphy TD and Karpen GH (1998). Centromeres take flight: alpha satellite and the quest for the human centromere. *Cell* 93, 317-20
- Murray AW and Szostak JW (1983). Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature* 305, 189-93

- Nabeshima K, Nakagawa T, Straight AF, Murray A, Chikashige Y, Yamashita YM, 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, 3211-25
- Nakaseko Y, Kinoshita N and Yanagida M (1987). A novel sequence common to the centromere regions of *Schizosaccharomyces pombe* chromosomes. *Nucleic Acids Res* 15, 4705-15
- Neumann F and Krawinkel U (1997). Constitutive expression of human ribosomal protein L7 arrests the cell cycle in G1 and induces apoptosis in Jurkat T-lymphoma cells. *Exp Cell Res* 230, 252-61
- Niwa O and Yanagida M (1985). Triploid meiosis and aneuploidy in *Saccharomyces pombe*: an unstable aneuploid disomic for chromosome III *Curr Genet* 9, 463-70
- Niwa O, Matsumoto T and Yanagida M (1986). Construction of mini-chromosome by deletion and its mitotic and meiotic behavior in fission yeast *Gen Genet* 203, 397-407
- Niwa O, Matsumoto T, Chikashige Y and Yanagida M (1989). Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* minichromosome deletion derivatives and a functional allocation of their centromere. *EMBO J* 8, 3045-52
- Nurse P, Thuriaux P and Nasmyth K (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 146, 167-78
- Nurse P and Bissett Y (1981). Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* 292, 558-60
- O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM and Nurse P (1997). Chk1 is a weel kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting *cdc2* by Y15 phosphorylation. *EMBO J* 16, 545-54
- Orlando V and Paro R (1993). Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 75, 1187-98
- Palmer DK, O'Day K, Wener MH, Andrews BS and Margolis RL (1987). A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol* 104, 805-15
- Pangilinan F and Spencer F (1996). Abnormal kinetochore structure activates the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *Mol Biol Cell* 7, 1195-208
- Polizzi C and Clarke L (1991). The chromatin structure of centromeres from fission yeast: differentiation of the central core that correlates with function. *J Cell Biol* 112, 191-201
- Rieder CL, Schultz A, Cole R and Sluder G (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J Cell Biol* 127, 1301-10
- Rieder CL and Salmon ED (1994). Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J Cell Biol* 124, 223-33
- Rieder CL, Cole RW, Khodjakov A and Sluder G (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* 130, 941-8
- Rieder CL and Salmon ED (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* 8, 310-8
- Roberts RG, Kendall E, Vetric D and Bobrow M (1996). Sequence and chromosomal location of a human homologue of LRPRI, an FSH primary response gene. *Genomics* 37, 122-4
- Robinow CF (1975). The preparation of yeasts for light microscopy. In *Methods in cell biology* (ed. DM Prescott). vol. 11, 1-22, Academic Press.

- Rothstein RJ (1983). One-step gene disruption in yeast. *Meth Enzym* 101, 202-11
- Rudner AD and Murray AW (1996). The spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 8, 773-80
- Russell P and Nurse P (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145-53
- Russell P (1998). Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem Sci* 23, 399-402
- Saka Y and Yanagida M (1993). Fission yeast *cut5+*, required for S phase onset and M phase restraint, is identical to the radiation-damage repair gene *rad4+*. *Cell* 74, 383-93
- Saka Y, Sutani T, Yamashita Y, Saitoh S, Takeuchi M, Nakaseko Y and Yanagida M (1994). Fission yeast *cut3* and *cut14*, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis. *EMBO J* 13, 4938-52
- Sazer S and Nurse P (1994). A fission yeast RCC1-related protein is required for the mitosis to interphase transition. *EMBO J* 13, 606-15
- Schneider R, Hitomi M, Ivessa AS, Fasch EV, Kohlwein SD and Tartakoff AM (1996). A yeast acetyl coenzyme A carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex. *Mol Cell Biol* 16, 7161-72
- Schneider R and Kohlwein SD (1997). Organelle structure, function, and inheritance in yeast: a role for fatty acid synthesis? *Cell* 88, 431-4
- Schweizer M, Lebert C, Holtke J, Roberts LM and Schweizer E (1984). Molecular cloning of the yeast fatty acid synthetase genes, *FAS1* and *FAS2*: illustrating the structure of the *FAS1* cluster gene by transcript mapping and transformation studies. *Mol Gen Genet* 194, 457-65
- Shurbaji MS, Kuhajda FP, Pasternack GR and Thurmond TS (1992). Expression of oncogenic antigen 519 (OA-519) in prostate cancer is a potential prognostic indicator. *Am J Clin Pathol* 97, 686-91
- Shurbaji MS, Kalbfleisch JH and Thurmond TS (1996). Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. *Hum Pathol* 27, 917-21
- Simanis V and Nurse P (1989). Characterization of the fission yeast *cdc10+* protein that is required for commitment to the cell cycle. *J Cell Sci* 92, 51-6
- Slegtenhorst-Eegdeman KE, Post M, Baarends WM, Themmen AP and Grootegoed JA (1995). Regulation of gene expression in Sertoli cells by follicle-stimulating hormone (FSH): cloning and characterization of *LRPR1*, a primary response gene encoding a leucine-rich protein. *Mol Cell Endocrinol* 108, 115-24
- Slegtenhorst-Eegdeman KE, Verhoef-Post M, Parvinen M, Grootegoed JA and Themmen AP (1998). Differential regulation of leucine-rich primary response gene 1 (*LRPR1*) mRNA expression in rat testis and ovary. *Mol Hum Reprod* 4, 649-56
- Steger DJ and Workman JL (1996). Remodeling chromatin structures for transcription: what happens to the histones? *Bioessays* 18, 875-84
- Stewart LC and Yaffe MP (1991). A role for unsaturated fatty acids in mitochondrial movement and inheritance. *J Cell Biol* 115, 1249-57
- Stoler S, Keith KC, Curnick KE and Fitzgerald-Hayes M (1995). A mutation in *CSE4*, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev* 9, 573-86
- Straight AF (1997). Cell cycle: checkpoint proteins and kinetochores. *Curr Biol* 7, R613-6
- Strunnikov AV, Larionov VL and Koshland D (1993). *SMC1*: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail

protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. *J Cell Biol* 123, 1635-48

Strunnikov AV, Kingsbury J and Koshland D (1995). CEP3 encodes a centromere protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 128, 749-60

Sugimoto K, Hagishita Y and Himeno M (1994). Functional domain structure of human centromere protein B. Implication of the internal and C-terminal self-association domains in centromeric heterochromatin condensation. *J Biol Chem* 269, 24271-6

Sun X, Wahlstrom J and Karpen G (1997). Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. *Cell* 91, 1007-19

Takahashi K, Murakami S, Chikashige Y, Niwa O and Yanagida M (1991). A large number of tRNA genes are symmetrically located in fission yeast centromeres. *J Mol Biol* 218, 13-7

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, 819-35

Takahashi K, Yamada H and Yanagida M (1994). Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality. *Mol Biol Cell* 5, 1145-58

Tanaka K and Kanbe T (1986). Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by freeze-substitution electron microscopy. *J Cell Sci* 80, 253-68

Taylor SS and McKeon F (1997). Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* 89, 727-35

Taylor SS, Ha E and McKeon F (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol* 142, 1-11

Toda T, Yamamoto M and Yanagida M (1981). Sequential alterations in the nuclear chromatin region during mitosis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: video fluorescence microscopy of synchronously growing wild-type and cold-sensitive *cdc* mutants by using a DNA-binding fluorescent probe. *J Cell Sci* 52, 271-87

Toda T, Nakaseko Y, Niwa O and Yanagida M (1984). Mapping of rDNA genes by integration of hybrid plasmids in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 8, 93-7

Tomkiel J, Cooke CA, Saitoh H, Bernat RL and Earnshaw WC (1994). CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase. *J Cell Biol* 125, 531-45

Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci US A* 76, 4350-4

Townsley FM and Ruderman JV (1998). Proteolytic ratchets that control progression through mitosis. *Trends Cell Biol* 8, 238-44

Tsukiyama T and Wu C (1997). Chromatin remodeling and transcription. *Curr Opin Genet Dev* 7, 182-91

Uzawa S and Yanagida M (1992). Visualization of centromeric and nucleolar DNA in fission yeast by fluorescence in situ hybridization. *J Cell Sci* 101, 267-75

Walworth N, Davey S and Beach D (1993). Fission yeast *chk1* protein kinase links the rad checkpoint pathway to *cdc2*. *Nature* 363, 368-71

Warburton PE, Cooke CA, Bourassa S, Vafa O, Sullivan BA, Stetten G, Gimelli G, Warburton D, Tyler-Smith C, Sullivan KF, Poirier GG and Earnshaw WC (1997). Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol* 7, 901-4

Waters JC, Chen RH, Murray AW and Salmon ED (1998). Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule

attachment, not tension. *J Cell Biol* 141, 1181-91

Weinert T and Hartwell L (1989). Control of G2 delay by the rad9 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci Suppl* 12, 145-8

Weinert T (1998). DNA damage checkpoints update: getting molecular. *Curr Opin Genet Dev* 8, 185-93

Wiens GR and Sorger PK (1998). Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell* 93, 313-6

Wiesner P, Beck JJ, Beck KF, Ripka S, Mueller G, Luecke S and Schweizer E (1988). Isolation and sequence analysis of the fatty acid synthetase FAS2 gene from *Penicillium patulum*. *Eur J Biochem* 177, 69-79

Willard HF (1998). Centromeres: the missing link in the development of human artificial chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 8, 219-25

Witt PL, Ris H and Borisy GG (1980). Origin of kinetochore microtubules in Chinese hamster ovary cells. *Chromosoma* 81, 483-505

Witte S and Krawinkel U (1997). Specific interactions of the autoantigen L7 with multi-zinc finger protein ZNF7 and ribosomal protein S7. *J Biol Chem* 272, 22243-7

Woods A, Munday MR, Scott J, Yang X, Carlson M and Carling D (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J Biol Chem* 269, 19509-15

Wool IG (1996). Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 21, 164-5

Wordeman L and Mitchison TJ (1995). Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J Cell Biol* 128, 95-104

Yamada H, Kumada K and Yanagida M (1997). Distinct subunit functions and cell cycle regulated phosphorylation of 20S APC/cyclosome required for anaphase in fission yeast. *J Cell Sci* 110, 1793-804

Yamashita YM, Nakaseko Y, Samejima I, Kumada K, Yamada H, Michaelson D and Yanagida M (1996). 20S cyclosome complex formation and proteolytic activity inhibited by the cAMP/PKA pathway. *Nature* 384, 276-9

Yanagida M (1998). Fission yeast cut mutations revisited: control of anaphase. *Trends Cell Biol* 8, 144-9

Yen TJ, Compton DA, Wise D, Zinkowski RP, Brinkley BR, Earnshaw WC and Cleveland DW (1991). CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *EMBO J* 10, 1245-54

Zeng Y, Forbes KC, Wu Z, Moreno S, Piwnica-Worms H and Enoch T (1998). Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* 395, 507-10

Zhang D and Nicklas RB (1995). The impact of chromosomes and centrosomes on spindle assembly as observed in living cells. *J Cell Biol* 129, 1287-300

## 謝辞

柳田充弘教授に感謝致します。右往左往してすぐパニック状態になる私を6年間見放すことなく、忍耐強くご指導いただきました。迷いながらもどうにかこうにかここまでたどり着けたのは、先生の厳しいご指導のおかげです。先生から受けた訓辞の数々を生涯の糧として、頑張っていきたいと思います。どうもありがとうございました。

丹羽修身博士に感謝致します。いつでも快く議論に応じていただき、いろいろ教えていただきました。

中世古幸信博士、足立康久博士、高橋考太博士に感謝致します。構造研での研究生活を支えていただきました。研究面での手ほどきを受けたばかりでなく、他愛のない雑談にまで気軽にに応じていただきました。有意義でしかも快適な研究生活が送れたのは、先生方のおかげです。

船引宏則博士に感謝致します。右も左も分からない4回生の私に優しく、かつ忍耐強く実験を指導していただきました。

本研究を行うにあたりお手伝いいただいた方々に感謝いたします。平田愛子博士には *Isd1* の電子顕微鏡観察をお手伝いいただきました。鍋島建太郎博士には *Isd1* 遺伝子の塩基配列を決定していただきました。瀧尾擴士博士には p29、p32 のペプチド配列を決定していただきました。 *mis6* の解析は高橋考太博士による多くのデータがなければ成立しませんでした。五島剛太さんによる未発表データも多く引用させていただきました。ありがとうございました。

構造研で一緒に研究生活を送らせていただいた皆さんに感謝致します。名前を挙げればきりがありますが、同級生の熊田、須谷、松坂、山下さんをはじめとする皆さんとの語らいのおかげで、刺激的で楽しく快適な6年を過ごすことができました。皆さんにはお世話になるばかりでなく、いろいろご迷惑をおかけしたと思います。感謝と共にお詫び申し上げます。

最後に、私のわがまを許し、経済的にも精神的にも支援してくれた両親に感謝いたします。

皆さん、どうもありがとうございました。