

学位申請論文

S 期における姉妹染色分体間結合の確立
に必須な分裂酵母Mis4の研究

古谷寛治

目次

要旨 序論

本研究の目的と背景	2
細胞周期・有糸分裂のダイナミクスとその制御	2
分裂期進入の制御機構	4
分裂期脱出の制御機構	5
紡錘体チェックポイント	5
染色体構造	7
姉妹染色分体間結合	7

結果

<i>mis4</i> 変異株は核分裂異常の表現型を示す	10
<i>mis4</i> 変異株は分裂期異常を示す一つ前のM 期に致死となる	10
<i>mis4</i> 変異株はG1 期に制限温度に移すとS 期に致死となる	11
<i>mis4+</i> 遺伝子のクローニング	12
Mis4はHEAT反復配列を有する	13
Mis4 は160kdのタンパク質をコードする	13
Mis4抗体の作成および検出	14
<i>mis4</i> 変異型タンパク質は量が減少している	15
<i>mis4+</i> は必須遺伝子である	15
<i>mis4</i> 変異株はDNA合成阻害剤ヒドロキシウレアに感受性を示す	15
<i>mis4</i> 変異株は紫外線照射に対し感受性を示す	16
<i>mis4</i> 変異株はDNAリガーゼの変異株と合成致死性を示す	17
<i>mis4</i> 変異株ではパルスフィールド電気泳動で検出されるようなDNA複製異常は見られない	17
<i>mis4</i> 変異株は分裂中期ですでに姉妹染色分体が分離している	18
<i>mis4</i> 変異株は複製後間期において時期尚早な染色体分離が起こってしまう	20
Mis4はクロマチン領域に局在する	21
分裂酵母 <i>rad21</i> 変異株では時期尚早な染色体分離が起こる	21
<i>rad21</i> 変異株はS期に致死となる	22
Mis4とRad21の間に物理的相互作用はみられない	22
<i>mis4</i> 変異株の中ではRad21は局在が異常になる	23
<i>mis4</i> 変異株は制限温度でM期進行遅延の表現型を示す	24
<i>mis4</i> 変異株は微小管重合阻害剤に対し感受性を示す	25
<i>mis4</i> 変異株の制限温度におけるM期進行遅延の表現型はMad2依存的である	26
<i>mis4</i> 変異株におけるMad2タンパク質の局在	27

考察

Mis4は姉妹染色分体間結合に必須な新規の因子である	29
Mis4はクロマチン領域において姉妹染色分体間結合に機能する	30
Mis4は必須タンパク質であり、進化上高度に保存されている	31
Mis4はS 期とM 期に機能する	32
Mis4はRad21の局在化に必須である	33
<i>mis4</i> 変異株は紫外線感受性を示す	34
<i>mis4</i> 変異株ではM 期にMad2依存的なスピンドルチェックポイントが活性化する	35

材料と方法

参考文献

謝辞

1
2
2
4
5
5
7
7
10
10
11
12
13
13
14
15
15
15
16
17
17
18
20
21
21
22
22
23
24
25
26
27
29
30
31
32
33
34
35
38
43

要旨

複製された姉妹染色分体同士はM期において分配されるまでつなぎ止められている。すなわち姉妹染色分体間結合（Sister Chromatid Cohesion）を形成することでM期における染色体分配を保障していることが古くからの細胞生物学的な観察より示唆されてきた。本研究において分裂酵母（*Schizosaccharomyces Pombe*）Mis4がS期で姉妹染色分体間の結合の確立に機能することが明らかとなり、姉妹染色分体間結合の分子メカニズムの一端が明らかにされた。

温度感受性 *mis4* 変異株は制限温度でS期に致死となり、その後複製された姉妹染色分体が間期においても分離してしまうことを蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション等の実験より見いだした。Mis4はクロマチン領域に局在した。これらの結果からMis4の機能はクロマチン上でDNA複製と協調して姉妹染色分体間結合を確立するものであり、*mis4* 変異株では確立できない結果、致死となり時期尚早な染色体分離が起こると思われる。Mis4は進化上保存されたタンパク質であった。近年、コヒーシ複合体（Cohesin Complex）が姉妹染色分体間結合に必須であるとして同定されたが、免疫沈降法、ショ糖密度勾配遠心法によるとMis4はこれとは異なる複合体を形成する。以上の結果からMis4を姉妹染色分体間結合に関わる新規複合体であると結論し、アドヘリン（Adherin）と命名した。*mis4* 変異ではコヒーシ複合体のサブユニットであるRad21が正常な局在を示さず、Rad21のリン酸化と思われる一部の修飾が見られなくなっていた。Mis4/アドヘリンとコヒーシ複合体は異なる複合体を形成するが、局在あるいはタンパク質の修飾を通じて相互作用をしているようである。

Mis4はM期における染色体分配にも関わるようである。温度感受性 *mis4* 変異株は微小管重合阻害剤チアベンダゾールに対して感受性を示した。さらに、温度感受性 *mis4* 変異株は制限温度においてM期でMad2依存的な紡錘体チェックポイント（動原体-動原体微小管の結合を監視するシステム）が活性化されM期進行遅延を引き起こすことを見いだした。Mis4は姉妹染色分体間結合に機能すると同時に動原体機能へも何らかの形で関与しているのかもしれない。

序論

本研究の目的と背景

細胞の遺伝情報はゲノムDNAに記憶されている。ゲノムDNAは細胞周期のS期に誤り無く複製され、複製された姉妹染色体がM期において均等に分配されることによりその安定性が維持される。この維持機構が破綻すれば重大な遺伝情報の欠失や重複が起こる。特に多細胞生物ではゲノムDNAの不安定性は重篤な結果を招く。例えばダウン症候群やターナー症候群や発癌は染色体の異数性あるいは欠失が原因となって起こる (Zinn et al 1997, Antonarakis SE 1998, Hartwell LH and Weinert T.,1994, Lengauer et al., 1998)。これらゲノムDNAは数本の線状分子・染色体として核内でおたたまれ、保存されている。染色体の数は例えばヒトでは半数体当たり23本、分裂酵母では3本である。遺伝情報はこのように分割されてコードされており、細胞周期S期でのDNA複製、M期での染色体分配を通じてその構造はダイナミックに変化する。ゲノムの安定性はこの染色体ダイナミズムの精巧な制御により保障されている。

本研究は分裂酵母Mis4を通じて、染色体の安定維持機構の解明を目的とした。解析を進めていく過程で、Mis4が姉妹染色分体間結合 (sister chromatid cohesion) の形成を通じて染色体の安定維持を保障していること、さらにその姉妹染色分体間の結合の形成と分離が細胞周期で厳密な制御を受けていることを見いだした。

序論では、まず多細胞生物、分裂酵母における細胞生物学的な知見をあわせて概説したい。さらに細胞周期のM期進行における制御機構と保障機構であるチェックポイント機能について述べたい。そして最後に染色体の構造について概説したい。

細胞周期・有糸分裂のダイナミクスとその制御

細胞周期は一般的に四つの時期に分類できる。すなわちS期、M期、G1期、G2期である。S期において染色体DNAの複製が起こり、M期において複製された染色体DNAが分配される。G1期、G2期はそれらの間の間期と呼ばれる (図1)。

細胞周期の中でもM期進行は非常にダイナミックなプロセスである。M期は高等真核細胞にお

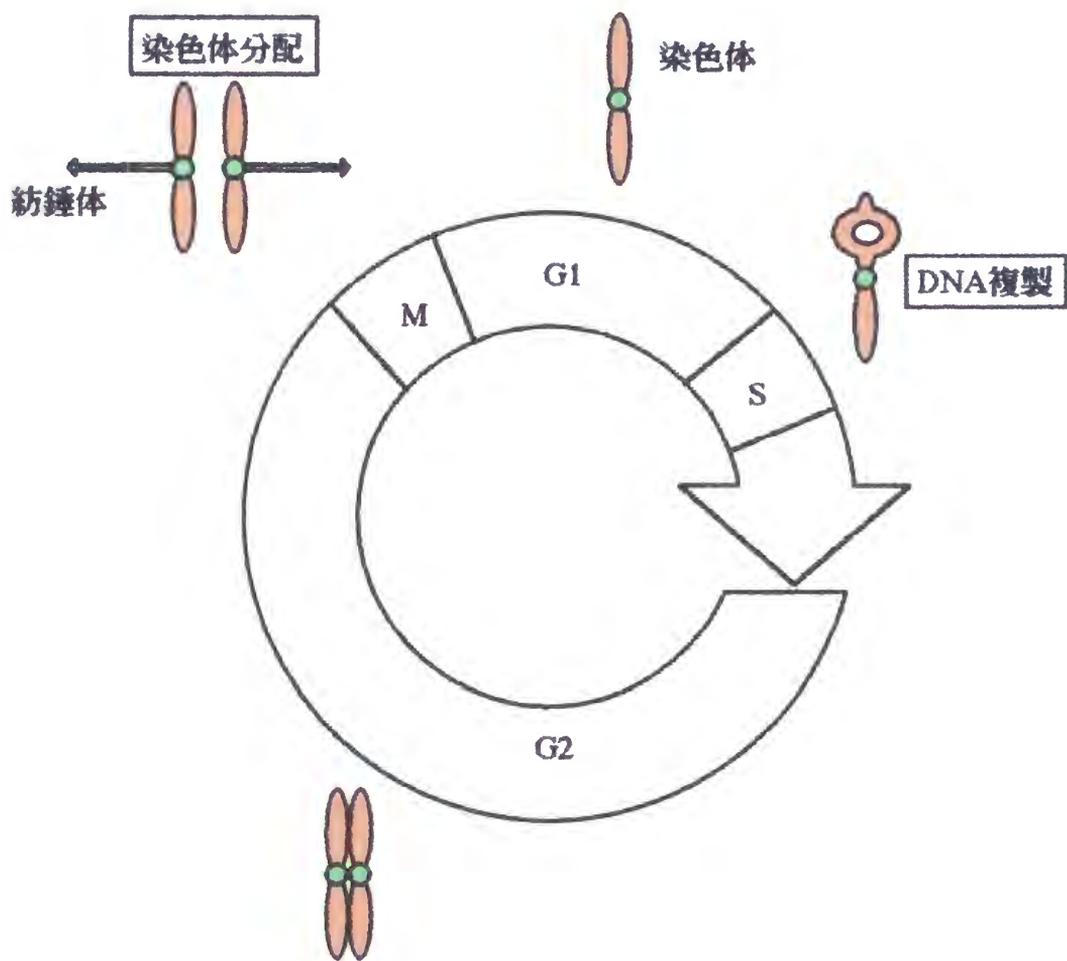


図1 細胞周期は四つのステージに分けられる

細胞周期はG1期、S期、G2期、M期の四つのステージに分けられ、染色体はS期において複製され、M期において分配される。

いては細胞生物学的な観察から次に述べる5つの時期に分けることができる (Alberts B et al., 図2)。

前期

細胞質微小管が崩壊するとともに、中心体が分離する。分離した中心体の間に紡錘体が形成され中心体は紡錘極体となる。染色体が凝縮し始める。

前中期

核膜が崩壊する。紡錘体微小管の一部が、動原体と呼ばれるセントロメア (シス配列) の両側に位置する構造体に付着する。これらの微小管は動原体微小管と呼ばれる。

中期

染色体が両極の間で一つの平面上に並ぶ。この仮想平面を中期板 (metaphase plate) と呼ぶ。このとき両側の動原体が両側の紡錘極体から伸びた動原体微小管によって捉えられる。この結合を両方向性の結合 (bipolar attachment) と呼ぶ。

後期

中期板に並んだ染色体が一斉に分離する過程を後期と呼ぶ。後期は後期A、後期Bの二つの過程に分けられる。後期Aは分離した染色分体が動原体微小管が短くなることで紡錘極体へと引っ張られる過程である。後期Bは紡錘極体間の距離が離れることでそれぞれの姉妹染色分体の距離を離していく過程である。後期A、Bは時期的にオーバーラップすることもある。

終期

分配された染色分体の周りに核膜が再形成される。染色体が脱凝縮する。

分裂酵母は一倍体で増殖するため遺伝学的手法が容易である。最近では細胞学的手法も容易になってきており、モデル生物としては非常に強力である。分裂酵母のM期は核膜は崩壊しない点

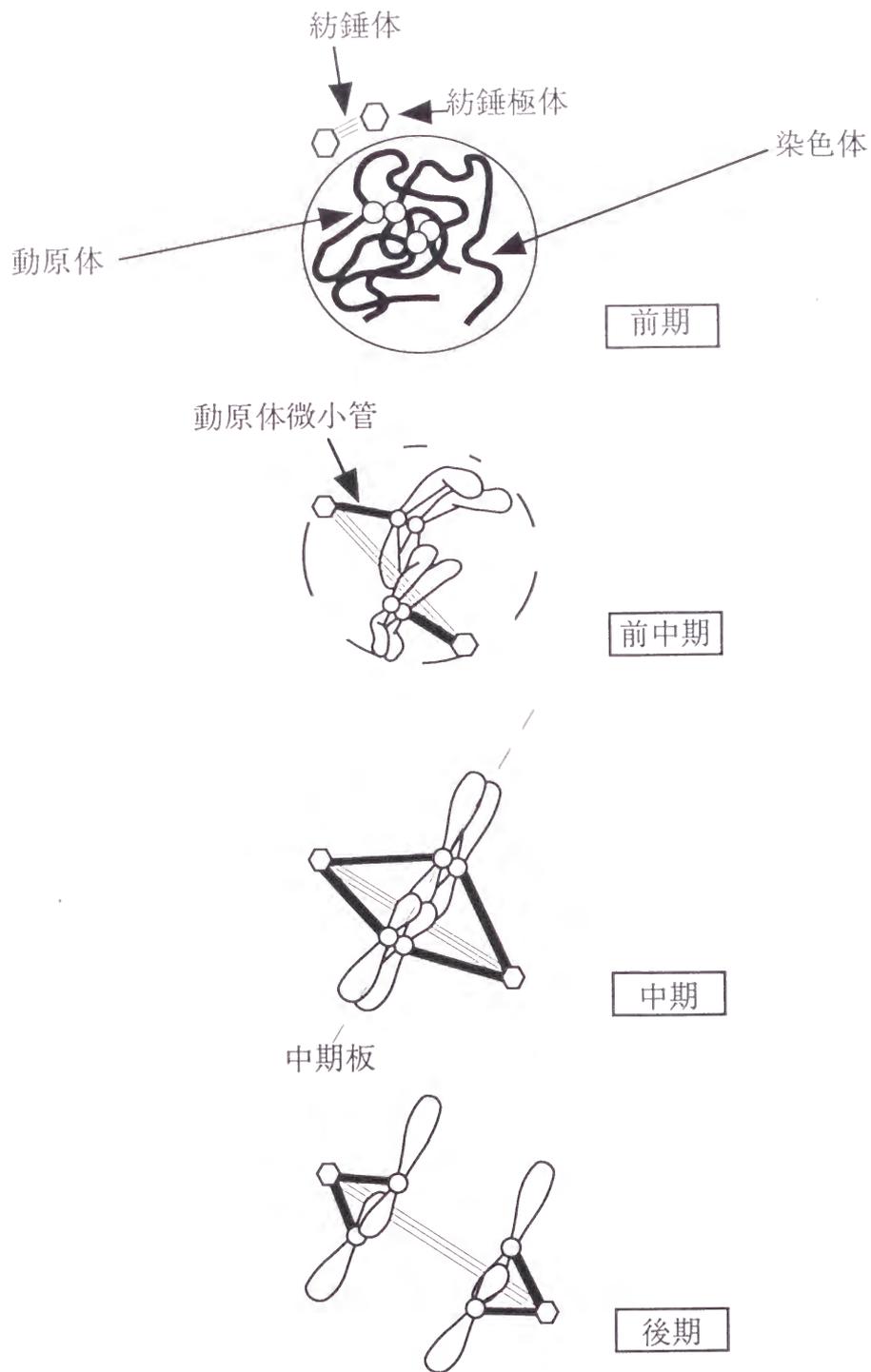


図2 分裂期は5つの時期に分けられる

分裂期は細胞生物学的な観察から前期、前中期、中期、後期、終期の5つのステージを経て進行することが分かっている。ここには前期、前中期、中期、後期の四つのステージを図示した。

が高等真核生物と異なるが、蛍光in situ ハイブリダイゼーションによる観察や、動原体結合タンパク質の挙動解析から、分裂酵母でも高等真核細胞と同じステップを踏んでM期進行がおこることが明らかとなった (Funabiki H et al., 1993, Saitoh S. et al., 1997, Nabeshima K. et al., 1998, Ding R et al., 1993)。さらに最近の生細胞における紡錘極体の挙動観察から分裂酵母では分裂期は三つの時期に定義されることが明らかとなった (Nabeshima K. et al., 1998)。すなわち第一期 (紡錘体の形成)、第二期 (紡錘体が一定の長さで保たれる時期)、第三期 (紡錘体が伸長する時期) である (Nabeshima K. et al., 1998)。第一期は高等真核生物においては前期にあたり、第二期は、中期、後期Aにあたる。第三期は後期Bにあたるということが明らかとなった (Nabeshima K. et al., 199、図3)。分裂酵母におけるM期進行の時の動原体の様子と微小管の様子を模式化した (図3)。間期には籠状の細胞質微小管が観察される。紡錘極体 (中心体) は核の辺縁部に位置し、三本の染色体のセントロメア領域は紡錘極体にクラスターを形成している。M期にはいると紡錘極体は分離を開始し、分離した紡錘極体の間に紡錘体が形成される。分裂酵母の紡錘体は微小管が線状に束ねられたような構造をしているが、この時期が第一期である (Hagan IM et al., 1988)。分離した紡錘極体間の距離が2マイクロメートル程度になると距離が一定に保たれる。セントロメア近傍配列あるいは動原体結合タンパクを視覚化し観察すると、これらが紡錘極体の間を行ったり来たりする挙動が見られ (前中期)、その後一点に集まる (中期・中期板の形成) (Funabiki H et al., 1993, Nabeshima et al., 1998, Saitoh S. et al., 1997,)。すぐに染色体分離が起こり、セントロメア領域は紡錘極体へと引っ張られる (後期A)。ここまでが第二期である。その後セントロメア領域は紡錘極体へと集まり、紡錘極体は細胞の長軸方向へと互いの距離を離していく。この時期が第三期である。紡錘極体が細胞の両端まで引っ張られると紡錘体は消失し、X字型をした細胞質微小管が再構築される。

分裂期進入の制御機構

分裂期進入はMPFと呼ばれるCdc2キナーゼ活性の上昇が引き金となって起こる (Masui Y 1982, Solomon MJ 1993)。Cdc2キナーゼの活性化は自身の15番目のチロシン残基の脱リン酸化によって起こる (Coleman TR and Dunphy WG., 1994)。この活性化を阻害するリン酸化はWee1キナーゼによって担われており、活性化させる脱リン酸化はCdc25フォスファターゼによって担われている (Coleman TR., 1994)。Cdc2キナーゼの活性化はこれら二つの酵素を介した複製・損傷チェッ

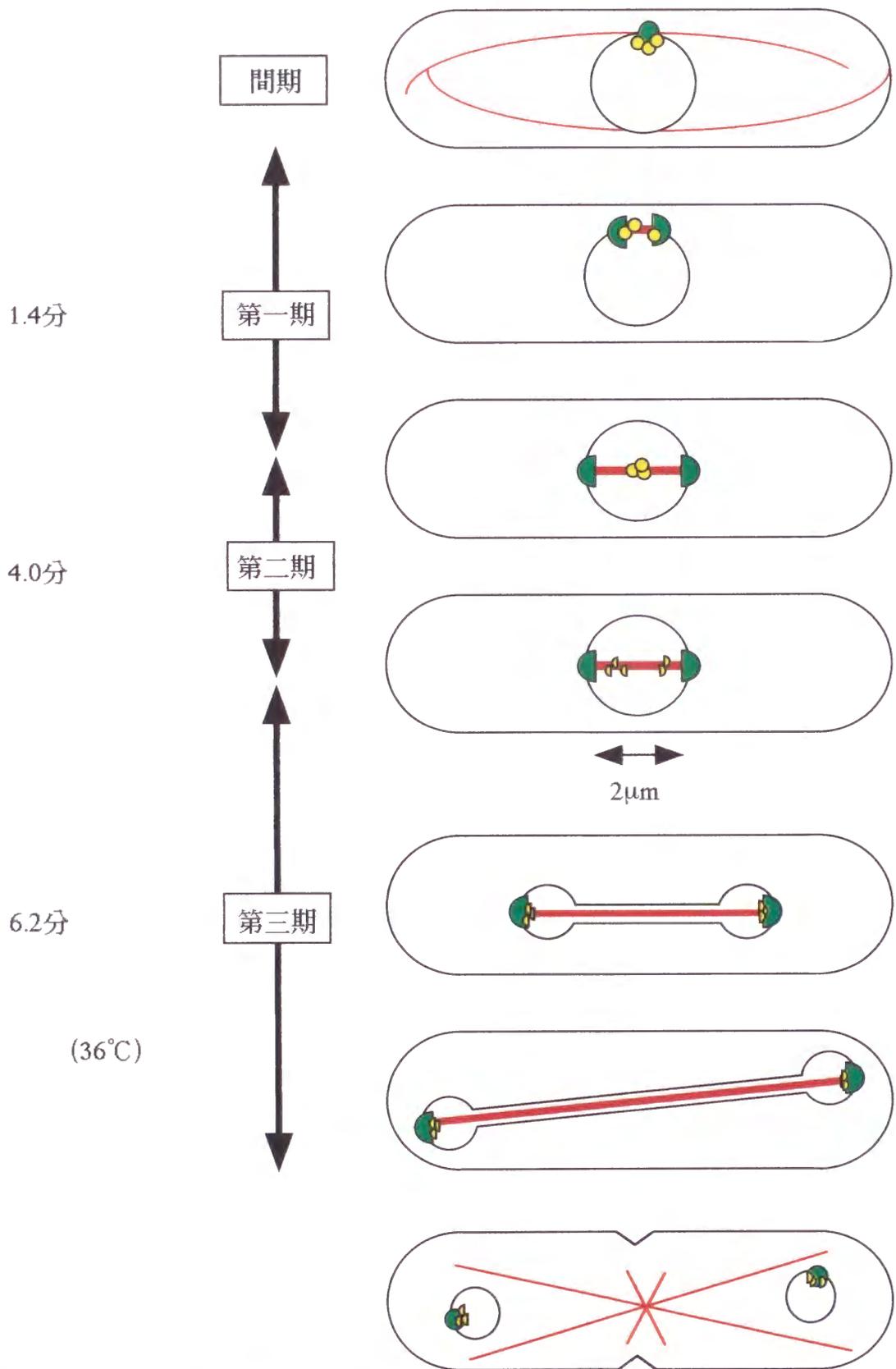


図3 分裂酵母のM期は3つの時期に分けられる

分裂酵母のM期は紡錘極体が分配されていく様子を生細胞の中で追跡していく観察から、3つの時期に分けることができる。第一期・紡錘極体が2つに分離し、2μm程度の長さまで、分離する時期。第二期・紡錘極体間の距離が一定となる時期。第三期・紡錘極体が細胞の両端まで分配されていく時期。緑色のマークが紡錘極体。赤；微小管、黄色が動原体。左に記した時間は野生株、36°Cにおいてその時期が起こる時間。

クポイントを含む厳密な制御を受けている (Hartwell LH and Weinert T., 1989, Maller JL., 1991, Rhind N and Russell P 1998)。複製・損傷チェックポイントとはDNA複製やDNA損傷の修復の状態を監視していると考えられており、複製・修復が完了せずにM期進入をすることを防ぐ機構である。修復や複製が終わらないままM期に進入し、不完全な染色体分配が起こると、染色体の不均等な分配が起こってしまう。複製・損傷チェックポイントの機構が作動するとChk1キナーゼ、Cds1キナーゼや、ヒト遺伝病Ataxia Terangiectasiaの原因遺伝子ATM (Ataxia Terangiectasia Mutated) のホモログであるRad3キナーゼ等が活性化しCdc25やWee1をつうじてCdc2キナーゼ活性を抑制する (Walworth N et al., 1993, Murakami H and Okayama H 1995, Rhind N and Russell P 1998, Caspari T and Carr AM 1999など)。

分裂期脱出の制御機構

M期からの脱出すなわち分裂期後期進入はCdc2キナーゼの不活性化によって起こる (Maller JL 1991, Doree M and Galas S., 1994)。この不活性化はCdc2キナーゼの制御サブユニットであるサイクリンの分解によって引き起こされる (Maller JL 1991, Zachariae W and Nasmyth K 1999)。サイクリンの分解にはAPC/サイクロソームと呼ばれるタンパク質複合体に依存したユビキチン化が必須である (Hershko A et al., 1994, King RW et al 1995., Zachariae W and Nasmyth K 1999)。APC/サイクロソームの構成タンパク質は進化上保存されており、分裂酵母においてはCut4、Cut9、Nuc2と呼ばれるタンパク質を含み (Yamashita YM et al., 1996, Yamada H et al., 1997, Yanagida M 1998)、これらの変異株では中期後期遷移が起こらない。サイクリンの分解によって引き起こされる中期・後期遷移もまたチェックポイント機構により監視されている。このチェックポイントは紡錘体チェックポイントと呼ばれており、MAD、BUBと呼ばれる遺伝子群が関わる (Amon A 1999)。

紡錘体チェックポイント

紡錘体チェックポイントの遺伝子群は出芽酵母において紡錘体形成異常が起こってもM期に停止できない変異株として単離された (Li R and Murray AW 1991, Hoyt MA et al., 1991,)。野生株細胞では微小管重合阻害剤の存在下では紡錘体形成ができないため、M期停止を引き起こすフィードバック制御 (紡錘体チェックポイント) が働くが、MAD1、2、3、BUB1、2、3、の変異株では

M期停止ができない。*MAD1*、*2*、*BUB1*、*3*は高等生物においても紡錘体チェックポイントに機能していることが報告されている (Li and Benezra 1996, Chen RH et al., 1996, Chen RH et al., 1998, Gorbsky et al., 1998, Taylor et al., 1998, Taylor and Mckeon 1997,)。中でも特筆すべきは*MAD2*である。ヒトの*Mad2*タンパク質がAPC/サイクロソームの活性化因子であるWDタンパク質*Slp1/Cdc20*に結合し、in vitro でAPC/サイクロソームの活性を阻害することが明らかとなっている (Wassmann K and Benezra R 1998, Li Y et al., 1997, Fang G et al., 1998, Kallio M et al., 1998)。さらに*Mad2*に結合できない*Slp1/Cdc20*はチェックポイント機能を失っていることが分裂酵母、出芽酵母において示され、紡錘体チェックポイントの標的はAPC/サイクロソームそのものであることが明らかとなった (Hwang LH et al., 1998, Kim SH et al., 1998)。*BUB1*遺伝子産物はキナーゼをコードしていることから、紡錘体チェックポイントのシグナル伝達にはリン酸化が重要な役割を演じていると考えられている (Amon A 1999)。

現在の所、紡錘体チェックポイントはおそらく動原体と動原体微小管の結合の状態を監視しているだろうと考えられているが、これに関しては二つのモデルがある (Amon A 1999)。動原体微小管と動原体の結合によって生じる張力 (tension) を感知しているというモデルと、動原体と微小管の結合そのものを感知しているというモデルである。前者については昆虫の精原細胞において研究がなされている (Li X and Nicklas RB 1995, Li X and Nicklas RB 1997)。姉妹セントロメアに動原体微小管の両方向性の結合がおこると、動原体微小管と姉妹セントロメア間結合の間に張力が生じる。張力を生じない染色体 (この場合は片方の染色分体しか持たない染色体を系として用いた) があると、M期脱出を起こさないが、この染色体に極小の針を用い、張力を人為的に与えてやると、M期脱出を起こす (Li X and Nicklas RB 1997)。これら一連の結果からは分子メカニズムは明らかにされなかったが、動原体に生じる張力がないことがM期脱出を阻害しうることが示された。一方後者については、*Mad1*、*Mad2*、*Bub1*、*Bub3*がM期に動原体に局在することがヒト、カエルなどの高等生物において示されており (Chen RH et al., 1996, Chen RH et al., 1998, Taylor et al., 1998)、*Mad1*、*Mad2*は動原体微小管の結合していない動原体に局在をすることが明らかとなっている (Chen RH et al., 1996, Chen RH et al., 1998)。また*Mad2*が微小管脱重合阻害剤により張力を失った動原体微小管が動原体に結合しても動原体から解離することから、これらのタンパク質は動原体-動原体微小管の結合により生じる張力ではなく結合そのものを認識して動原体に局在していると考えられている (Waters JC et al., 1998)。*Mad2*の動原体局在と紡錘体チェックポイントの発動の間には高い相関関係があることがわかっているが、動原体局在そのものが紡

錘体チェックポイントの発動に必須かどうかは明らかにされていない。

染色体構造

染色体DNAは単なるDNA鎖ではない。真核生物細胞の染色体はDNAとDNAに付随するタンパク質で構成されており、これらの複合体をクロマチンと呼ぶ。DNAに結合するタンパク質の中でもヒストンは八量体のタンパク質であり、長いDNAを200塩基対の秩序だった単位に折り畳んでいる。分裂酵母においてはゲノムサイズは14メガ塩基対であるが、引き延ばすと1mm以上にもなる染色体DNAがわずかに直径2マイクロメートルの核の中に詰め込まれている。そしてクロマチン構造も細胞周期を通じてダイナミックに変化する。例えばこれらの染色体DNAはM期にはいるとさらに折り畳まれる。この過程を凝縮と呼ぶ。トポイソメラーゼ及びコンデンシンと呼ばれるタンパク質複合体がこの過程に関わることがこれまでに示されてきた (Uemura T et al., 1987, Hirano T et al., 1997)。染色体凝縮に必須なコンデンシン複合体は、SMCタンパク質ファミリー (Structural Maintenance of Chromosome) に属するSmc2、4を含むタンパク質複合体である (Hirano T et al., 1997)。SMCタンパク質はアミノ末端、中央、カルボキシル末端の保存された領域がコイル-コイル構造により繋がった構造をしており、アミノ末端にはNTP結合モチーフが存在する (Hirano T 1998)。コンデンシン複合体はアフリカツメガエルにおいて五量体を形成することが示されてきた (Hirano T et al., 1997, Kimura K and Hirano T 1997)。五量体全てのサブユニットが染色体凝縮に必須であることが分裂酵母において示されている (Sutani T et al., 1999)。

姉妹染色分体間結合

姉妹染色分体間結合 (sister chromatid cohesion) も染色体の高次構造の一つである。複製された姉妹染色分体同士は非常に近傍にある。姉妹染色分体同士は分裂後期に分配されるまで結合しており、M期における正確な染色体分配を保障していると考えられている。この結合を姉妹染色分体間結合と呼ぶ (Biggins S and Murray AW 1999)。姉妹染色分体間結合はM期においてはキネトコア微小管により生ずる張力に対抗する構造体であり、このおかげで時期尚早な染色体分離が起こ

るのを防いでいる。分裂後期とは姉妹染色分体間結合の消失と紡錘体による染色体運動が協調して起こる現象である。Hollowayらによって染色体分離にはユビキチン依存的な蛋白分解が必要であることが明らかとなっており、姉妹染色分体同士をつなぎ止めている「のり」の様なものの存在が示唆されていたが、どの様なタンパク質が姉妹染色分体間結合に関わるかはほとんど明らかにされてこなかった (Holloway et al., 1993)。最初に同定されたのはショウジョウバエの Mei-S332 であり、減数分裂期における姉妹染色分体間結合の維持に必要なことが明らかとなった (Kerrebrock et al., 1995)。Mei-S332 は減数分裂、有糸分裂期においてセントロメア領域に局在し (Mei-S332 は有糸分裂期においては必須ではないが)、染色体分離が起こると同時に染色体から解離する (Moore et al., 1998)。このことは Mei-S332 の分解あるいは染色体上からの解離が染色体分離に必要なかもしれないことを示唆している。分裂酵母においても、減数分裂時の組み換えに欠損を示す *rec8-110* 変異株において減数分裂期における姉妹染色分体間結合に欠損があることが示された (Molnar et al., 1995)。分裂酵母 *mis6* 変異株では、有糸分裂期において染色体の不均等分配を起こす変異株であるが、*mis6* 変異株を有糸分裂期の分裂中期に停止させるとセントロメア領域が時期尚早に分離してしまう (Saitoh S et al., 1997)。Mis6 は G1/S 期においてセントロメア特異的なクロマチン構造の構築に機能しており、分裂後期まで姉妹セントロメア間のコネクターとして働いているらしい。

出芽酵母において遺伝学的なスクリーニングから有糸分裂における姉妹染色分体間結合に必要な因子の同定が試みられた。Mcd1/Scc1 がそのうちの一つであり、SMC タンパク質である Smc1、3 とともにコヒーシンと呼ばれる複合体を形成する (Guacci V et al., 1997, Michaelis et al., 1997, Toth A et al., 1999)。Mcd1/Scc1 は分裂酵母 Rad21 (Birkenbihl and Subramani 1992) と Rec8 と相同性を示し、高等生物にも保存されていた。Scc1 は Smc1 依存的に染色体に結合し、分裂中期後期遷移と同時に染色体から解離する。アフリカツメガエルにおいてもコヒーシンは XRAD21 (Rad21/Mcd1/Scc1 ホモログ)、XSMC1、3 (SMC ホモログ) を含む複合体を形成することが報告されている (Losada et al., 1998)。これらの結果から Rad21/Mcd1/Scc1 様のタンパク質は二つの SMC タンパク質とともにタンパク質複合体を形成することで姉妹染色分体間結合に関わっており、染色体への結合と解離により姉妹染色分体間結合と染色体分離を制御していると考えられている。また、コヒーシン複合体を制御する因子として Scc2、Eco1 が同定された (Toth A et al., 1999)。

染色体は自立複製配列、セントロメア、テロメアの三つのシス配列が備わって初めて安定に維持される。自立複製配列はDNA複製の開始に、セントロメアは微小管による染色体の分配に、テロメアは染色体の末端保護に必須な配列である。出芽酵母、分裂酵母さらに、最近ではヒトにおいて、自立複製配列、セントロメア、テロメアの三つのシス配列を含む人工ミニ染色体が構築されている (Hsiao and Carbon 1981, Matsumoto et al., T 1986, Ikeno M et al., 1998)。分裂酵母 *mis* (*minichromosome instability*) 変異株は染色体の安定維持に関わる遺伝子を探索する目的で、人工ミニ染色体を維持できないことを指標に単離された (Takahashi K et al 1994)。これまでに12の相補群に分離され、そのうちいくつかは機能解析されている。*mis1*、*10*はDNAポリメラーゼ δ のサブユニットであった (近藤、建部未発表)。*mis3*はRNA代謝に関わることが示されている (近藤投稿中)。*mis5*はDNA合成の開始に必須であるMCMタンパク質であった (Takahashi K et al 1994)。*mis6*、*12*は動原体タンパク質であった (Saitoh S et al., 1997, Goshima G et al., 1999)。本研究において解析した*mis4*変異株はM期に核分裂異常の表現型をしめし、さらにDNA合成阻害剤であるヒドロキシウレアや紫外線照射に対しても感受性を示す。これらの表現型はDNA合成と染色体分配の両方に欠損を持つことを示唆しており、非常にユニークである。今回、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション等の解析から、*mis4*変異株は複製された姉妹染色分体間を結合させることができないことが明らかとなった。*Mis4*は必須タンパク質であり、S期に機能することが明らかとなった。さらに免疫沈降による解析からこれまでに姉妹染色分体間結合に必須であることが明らかとなっているコヒーシン複合体には含まれないことが明らかとなった。考察では*Mis4*タンパク質が姉妹染色分体間の結合にどのように関わるのか、また、姉妹染色分体間の結合とはどのようなものかについて議論したい。

結果

分裂酵母三番染色体由来の人工ミニ染色体Ch10は分裂酵母野生株においては極めて安定に維持される (Niwa et al., 1989)。 *mis* 変異体はCh10の安定性を指標に単離された温度感受性変異体である (Takahashi et al., 1994)。 *mis* 変異体は26℃が許容温度であり生育可能だが、制限温度である36℃では生育できず、さらに許容温度である26℃や準許容温度である30℃において高頻度でミニ染色体を脱落する。 *mis1*から*mis12*までの12個の変異株が単離されたが、中でも*mis4*変異株は制限温度で分裂期異常の表現型を示す一方、DNA合成阻害剤であるヒドロキシウレアや、紫外線照射に対し感受性を示す (図4)。これらの表現型は*mis4*変異株がS期とM期の両方の時期に欠損を示すことを示唆しており、非常に興味深い。

*mis4*変異株は核分裂異常の表現型を示す

*mis4*変異株を、制限温度である36℃へシフトアップし表現型を観察した。DAPI染色により観察するとシフトアップ後2時間目はほとんど異常は見られなかったが、4時間目にいびつな形に凝縮した染色体を持つ細胞がみられた (図5)。これらの細胞は隔壁が形成されていることから分裂中の核と思われる。中には未分離の核が隔壁により破断される*cut*表現型を示すものも見られた (Hirano et al., 1986)。シフトアップ後の生存率、DNA含量を図6に示す。生存率の測定は制限温度で培養した細胞を許容温度である26℃でプレーティング、数日間培養した後、コロニー形成をする事のできた細胞の割合を数えることで求めた。生存率はシフトアップ直後から低下し、シフトアップ後2時間で50%、4時間で15%にまで低下した。このことは*mis4*変異株は制限温度では異常な核分裂を示すより前の時期に致死となっていることを示唆していると思われる。

分裂酵母は半数体ではあるが細胞周期の大半がG2期のため、非同調細胞においてはDNA含量は2Cピークを示す。DNA含量はシフトアップ後4時間までは2Cピークを示しており、顕著なDNA合成異常は見られなかった。5、6時間目にはピークが幅広くなっていた。*mis4*変異株では核が娘細胞の片方に寄った様な細胞 (図5・6時間目の細胞) がみられるので異数体が生じたためかもしれない。

*mis4*変異株は分裂期異常を示す一つ前のM期に致死となる

Strain	MC instability			Cytological phenotype	Sensitivity to	
	26°C	30°C	33°C		HU	UV
<i>mis1-64</i>	+	++	NA	IA	-	+
<i>mis1-223</i>	++	+++	NA	IA	-	+
<i>mis2-87</i>	+	++	+++		+	+
<i>mis2-197</i>	-	+	++		+	+
<i>mis3-224</i>	++	++	+++	IA	-	+
<i>mis4-242</i>	+++	++++	NA	<i>cut</i>	-	-
<i>mis5-268</i>	-	+++	NA	IA	-	-
<i>mis6-302</i>	+++	++++	NA	AMC	+	+
<i>mis7-322</i>	+	++	NA		+	+
<i>mis8-341</i>	++	+++	++++		+	+
<i>mis9-356</i>	+	++	NA		+	+
<i>mis10-421</i>	++	+++	NA	IA	+	+
<i>mis11-453</i>	-	++	NA	IA	+	+
<i>mis12-537</i>	+	++	++++	AMC	+	+

図4 *mis* 変異株の表現型一覧 (Takahashi *et al.*, 1994より、改変し、掲載)
MC instabilityの覧に26°C、30°C、33°Cでの各変異株中のミニ染色体の不安定化の程度をまとめた。-は野生株と同程度の安定性をしめすもの、+の数が増えるほど不安定になることを示す。NA; 33°Cが非許容温度のためコロニー形成が見られず、定量できなかったもの。

各変異株について制限温度下36°Cでの細胞および核形態をDAPIにより観察した結果、特徴的な表現型をCytological phenotype覧に記載した。IA; 間期停止、*cut*; 未分離核が隔壁により破断される*cut*表現型 (Hirano *et al.*, 1988)、AMC; 大小核を生じたもの (Takahashi *et al.*, 1994)。

右にヒドロキシウレア(HU)、紫外線照射(UV)に対する感受性を記した。HU感受性については26°Cで5mMHUを含むプレート上でコロニー形成できないもの、紫外線照射については26°Cで200J/mxmの紫外線照射に対する生存率が野生株の10%以下になるものを-で記した。

*mis4*変異株の欄を□で囲った。

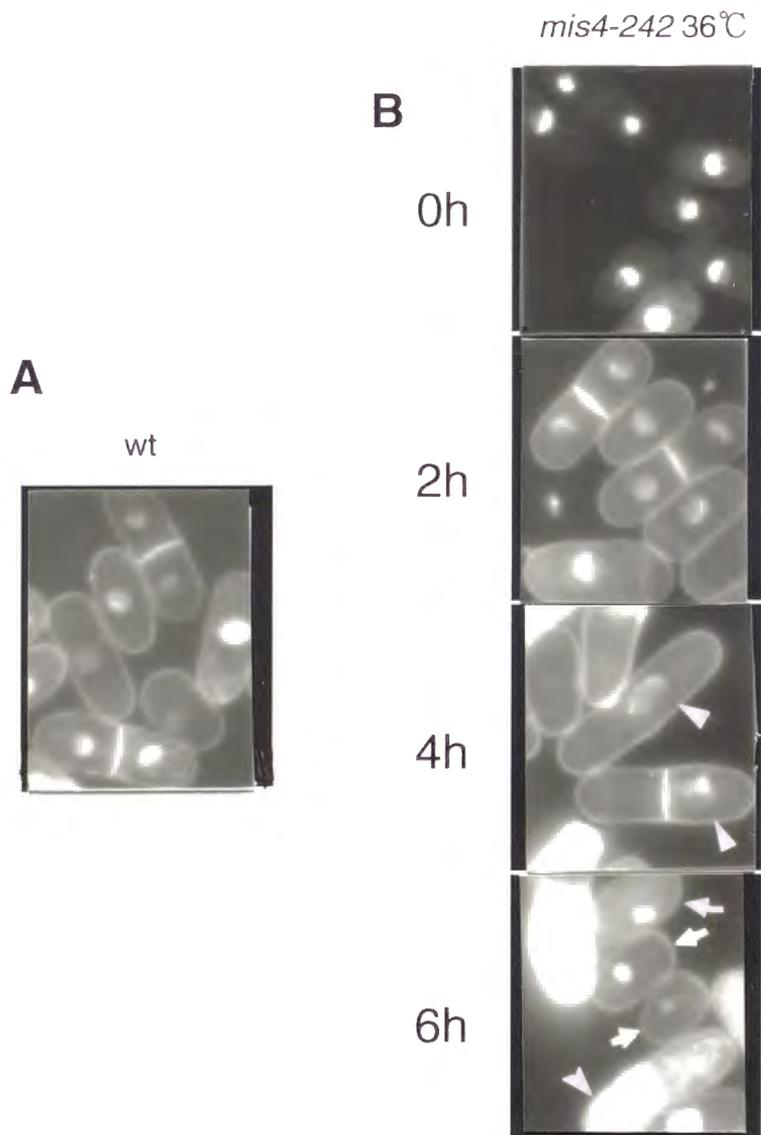


図5 制限温度における *mis4* 変異株の DAPI 像 (非同調)

26°C YPD で培養した *mis4* 変異株を 36°C にシフトアップし、0、2、4、6 時間後に DAPI 染色をおこなった。(A) 野生株。(B) *mis4* 変異株。*mis4* 変異株はシフトアップ後 0 時間目、2 時間目ではほぼ正常である。シフトアップ 4 時間後でいびつな核形態を持つ細胞 (▽) や、それらの核が隔壁に破断された細胞が観察された。シフトアップ 6 時間後では 2 核の細胞 (矢頭) や、染色体 DNA が隔壁により破断された後 (矢印) とおもわれる細胞が観察された。

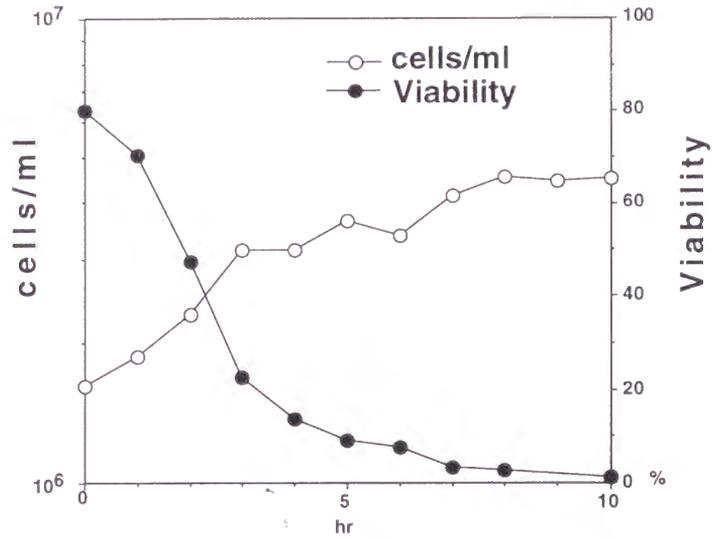
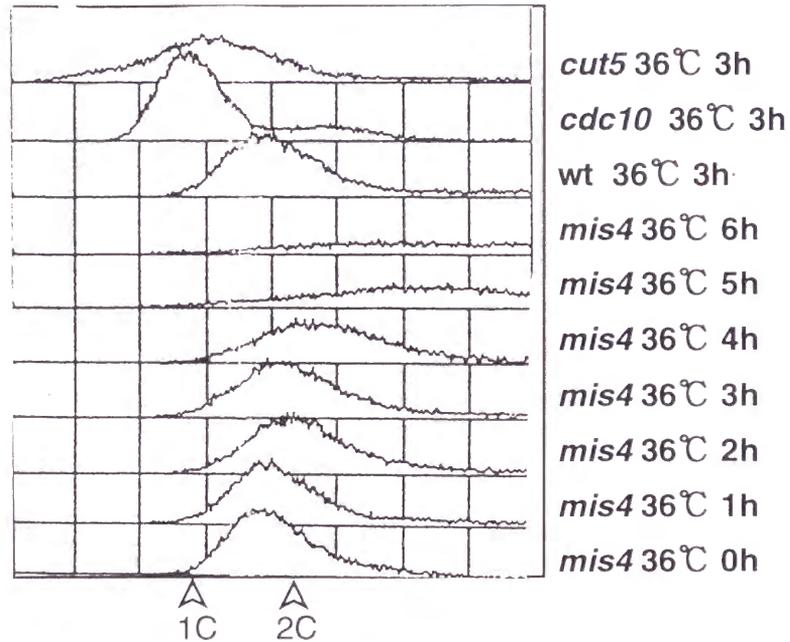
A**B**

図6 制限温度下での*mis4*変異株の細胞数、生存率、DNA含量（非同調）

26°C YPDで培養した*mis4*変異株を36°Cにシフトアップ、一時間毎にサンプリング、細胞数、生存率、DNA含量の測定を行った。(A) 制限温度における増殖曲線(○)、および生存率(●)。シフトアップ後3時間目以降に細胞数の増加がなだらかになり、増殖速度が低下した。生存率は0時間目から徐々に低下した。(B) FACscanによるDNA含量の測定結果。シフトアップ後4時間目まではほぼG2ピークをしめし、その後幅広いピークが観察される。G1ピークのコントロールとしてG1期停止する*cdc10*変異株、DNA合成がおこなわないまま分裂期進入をおこす*cut5*変異株の制限温度に移してから3時間目の波形を示した。

*mis4*変異株が細胞周期上のどの時期に致死となっているかを調べるため同調培養実験を行った。分裂酵母では細胞質分裂が完了する前にすでにDNA複製が終了しており、最も小さな細胞はG2期初期の細胞であり、エルトリエーションによりサイズの小さいG2初期の細胞のみを集めることで同調させることができる。同調させた後、制限温度にシフトアップし培養、20分おきにサンプリングを行った。生存率を図7Aに示す。生存率はシフトアップ後60分までは高いままであるが100分には50%にまで低下した。一回目の分裂期は80分から100分にかけて起こった。分裂中期と後期の遷移の時期を明確にするため短い紡錘体を持つ細胞と長い紡錘体を持つ細胞の割合を測定し、図7Bに示した。分裂前期から中期を表す短い紡錘体 (<2.5マイクロメートル) を持つ細胞は80分にピークを示し、分裂後期を表す長い紡錘体 (>2.5マイクロメートル) を持つ細胞は100分にピークを示した。80分から100分にかけて中期後期遷移がおこっていると思われる。G2初期に同調させた*mis4*変異株は分裂中期から分裂後期進行と同時に生存率が低下し出すようである。生存率はその後続くS期にかけて(120-140分)さらに低下した。

これらの結果とは対照的に、生存率の低下する一回目の分裂では染色体は均等に分配されており、紡錘体形成も顕微鏡下ではほとんど正常であった(図7B)。抗チューブリン抗体で紡錘体を染色した像を図8Aに示す(左のカラムがDNA染色、右のカラムが抗チューブリン抗体染色)。前述した異常な核分裂像はさらに後の時期、二回目の分裂にあたる200分から220分にかけてのみ見られた(図7B)。様々な核分裂異常を図8Bに示した。不均等な核分裂が高頻度にみられた。(△)に示すように染色体が娘細胞に分配されず、取り残された像(ラグging・クロモソーム)もみられた。

*mis4*変異株はG1期に制限温度に移すとS期に致死となる

*mis4*変異株をG2期からシフトアップすると2回目のM期に不均等な核分裂が見られる。*mis4*変異株をG1期からシフトアップすると一回目の分裂期において前述した不均等分配の表現型がみられるのではないかと考え、次のような実験を行った。分裂酵母細胞は窒素源枯渇させるとG1期に停止する。その後窒素源を含む培地へ戻すことでG1期停止からリリースさせることができる。*mis4*変異株を許容温度で窒素源枯渇させることで細胞をG1期に停止させたのち、制限温度にシフトアップ、栄養培地へリリースした。生存率はリリース後3時間から4時間にかけて急激に低下

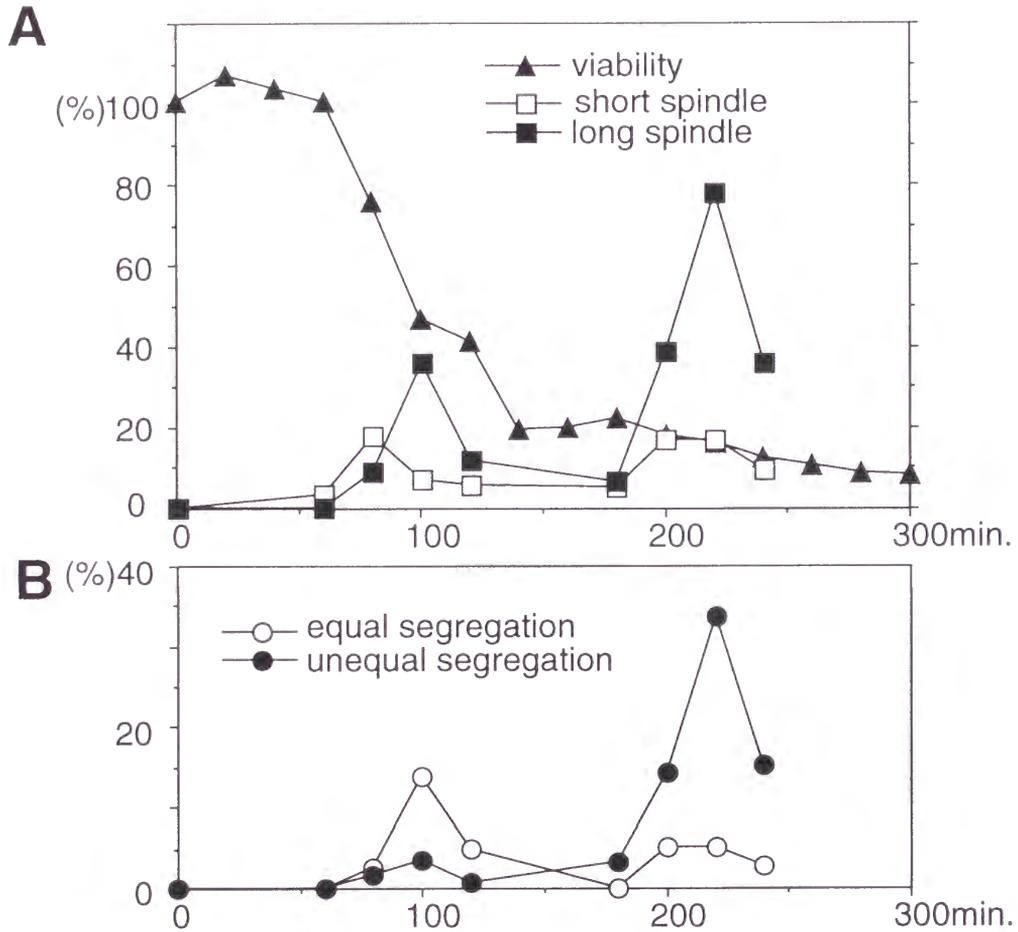


図7 *mis4*変異株の制限温度での同調培養における生存率、表現型の推移

26°CYPD培地で培養していた非同調細胞からG2初期の小さな細胞のみをエルトリエーションによってあつめることで同調させた。その後36°CYPDにてリリースし、20分毎にサンプリングをおこなった。

(A) 生存率 (▲) 及びスピンドルを持った細胞の割合。スピンドル長が2マイクロメートル以下の細胞を (□) で、2マイクロメートルより長い細胞の割合を (■) で示した。

(B) 正常な分裂期像を示す細胞の割合 (○)。明らかに不均等な核分裂を示す細胞の割合 (●)。アルデヒド固定の後、チューブリン染色をおこない、観察した。

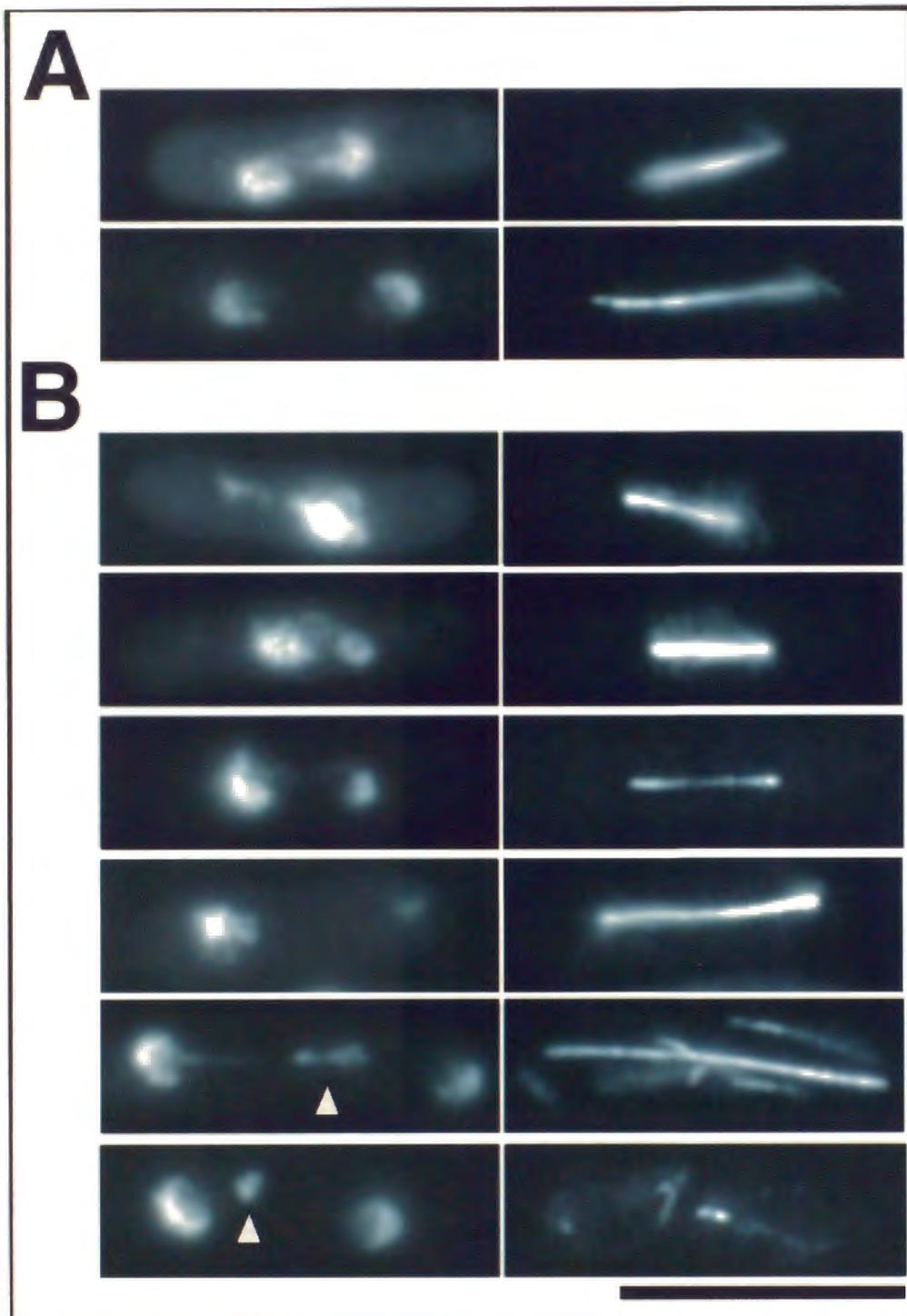


図8 *mis4*変異株の同調培養における分裂期像

図7における同調培養時のチューブリン染色像。(A)一回目の核分裂(100分)(B)2回目の核分裂(220分)一回目の核分裂は野生株で見られるのとほぼ同じであり、正常であった。2回目の核分裂は不均等な核分裂が起こっており、染色体が脱落しているように見えるのもあった(矢頭)。barは10 μ m。

した(図9A)。図9BにFACscanにより測定したDNA含量を示す。DNA含量はリリース後3時間目から4時間目にかけて1Cから2Cへと倍加しており、生存率が低下した時期はちょうどS期にあたると思われる。異常な核分裂像は続く一回目の分裂期に高頻度に観察された。これらの結果は *mis4* 変異株をG1期から制限温度に移すとS期に致死となり続く分裂期に不均等な核分裂が起こることを示している。

mis4 変異株をG1期及びG2期に制限温度に移したときにみられる生存率の低下をまとめると次のようになる。図10に示すように、G2期に *mis4* 変異株を制限温度へシフトアップさせた場合には一回目のM期に致死となり、次のサイクルのM期に不均等な核分裂を示した。G1期にシフトアップさせた場合には直後のS期に致死となり続くM期に染色体分配異常を示した。生存率が細胞周期のある時期に低下するということは、いったんその時期を通過すると死ぬことが運命づけられ、その後許容温度に戻しても回復しないことを意味する。生存率が低下する時期がその遺伝子産物が機能する時期であると思われる。これまでの結果から *Mis4* はS期とM期の二つの時期に機能することが考えられ、これらの時期に正常の機能を果たせないと、細胞は致死となり、次のM期に核分裂異常を示す。

mis4⁺ 遺伝子のクローニング

mis4 変異株の36℃における温度感受性を相補することを指標に分裂酵母ゲノムライブラリーより *mis4*⁺ 遺伝子を単離した。39個の独立のクローンが得られたがそれらはすべてオーバーラップする領域を含んでいたため一つの遺伝子座位に由来するものと結論付けた(図11A・この実験は高橋考太博士により行われた)。

クローンした遺伝子が *mis4*⁺ 遺伝子であることを確認するため、組み込みマッピングを行った。まず、クローンした遺伝子断片を *ura4*⁺ のマーカーとともに分裂酵母野生株 (*h-ura4*) にくみこむことで組み込み体を得た(図12)。この遺伝子断片が *mis4*⁺ 遺伝子を含む断片であれば、*ura4*⁺ のマーカーは *mis4*⁺ 遺伝子座位に組み込まれているはずである。組み込み体を *ura4* の *mis4* 変異株とかけ合わせたところ、温度感受性と *ura4*⁺ が常に2:2に分離したのでクローンした遺伝子断片は *mis4*⁺ 遺伝子を含むものであると結論づけた。

クローンしたpKT221をサブクローン化することで、最小相補断片pKF200を得た(図11B)。こ

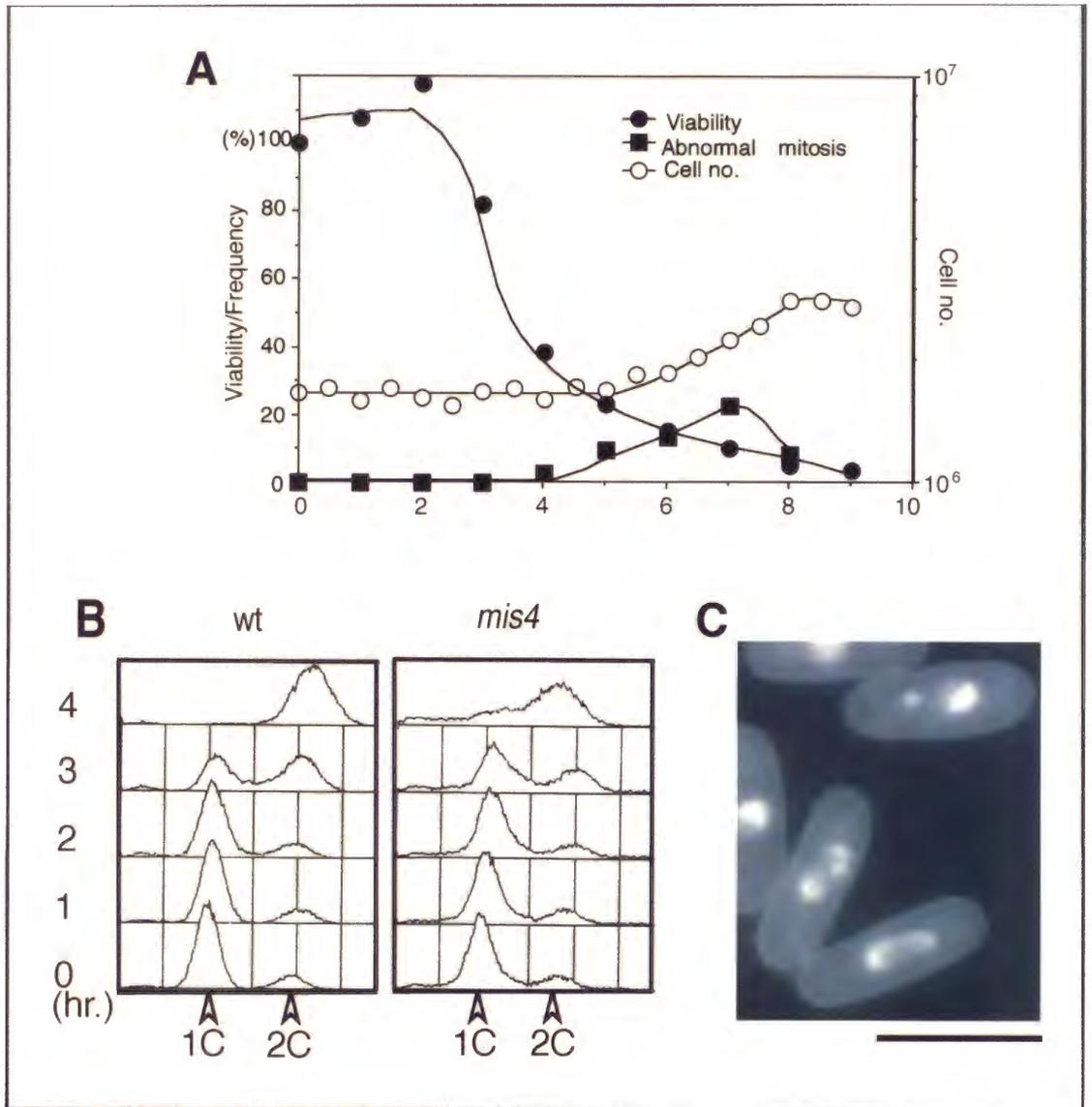


図9 制限温度における窒素源枯渇からのリリース実験

*mis4*変異株をEMM2-N培地、26℃で36時間培養させることで細胞をG1期に停止させた後、36℃ YPD培地へリリースした。リリース後1時間毎にサンプリングをおこなった。

(A) 生存率 (●)、細胞数 (○)、表現型 (核分裂異常を示す細胞・■) の推移。生存率は2時間目までは高いが3時間目以降急激に低下する。核分裂異常を示す細胞の割合は5時間目以降から徐々に増加する。

(B) FACscanでDNA含量を測定した。野生株、*mis4*変異株のほとんどの細胞を窒素源枯渇によってG1期に停止させることができた (0時間目)。リリース4時間後にDNA合成はほぼ完了した。

(C) リリース後6時間のDAPI像。barは10μm。

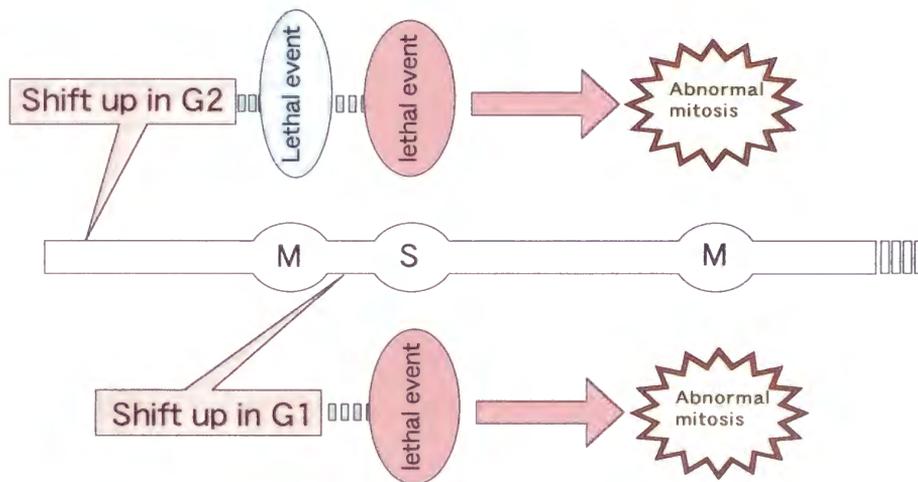


図10 Mis4はM期とS期に機能する。

*mis4*変異株における生存率の低下を模式化した。*mis4*変異株をG2期から制限温度へシフトアップすると、一回目のM期からS期にかけて致死となり、次のサイクルのM期に核分裂異常の表現型を示す。一方、*mis4*変異株をG1期から制限温度へシフトアップすると、続くS期に致死となり、その直後のM期に核分裂異常の表現型を示す。*mis4*変異株が致死となる時期はおそらくMis4が機能する時期と考えられるのでMis4はM期とS期の2つの時期に機能すると結論した。

A

transform of <i>mis4-242</i> strain with library	Tamagawa	Noguchi
Ts+ transformants	~100,000	~200,000
plasmid recover	4	~500
	4	35
grouping by EcoRI digest	10 (See Table)	
retransformation	5	

TABLE retransformation

p1 (1)	from Tamagawa library	-	
*p11 (29)	Noguchi and Tamagawa	+	====> pKT221
p9 (1)	Noguchi	-	
*p12 (1)	Noguchi	+	
*p16 (1)	Noguchi	+	
*p17 (2)	Noguchi	+	
p22 (1)	Noguchi	-	
*p24 (1)	Noguchi	+	
p45 (1)	Noguchi	-	
p48 (1)	Noguchi	-	

*p12, p16, p17 and p24 are overlapping to p11.

B

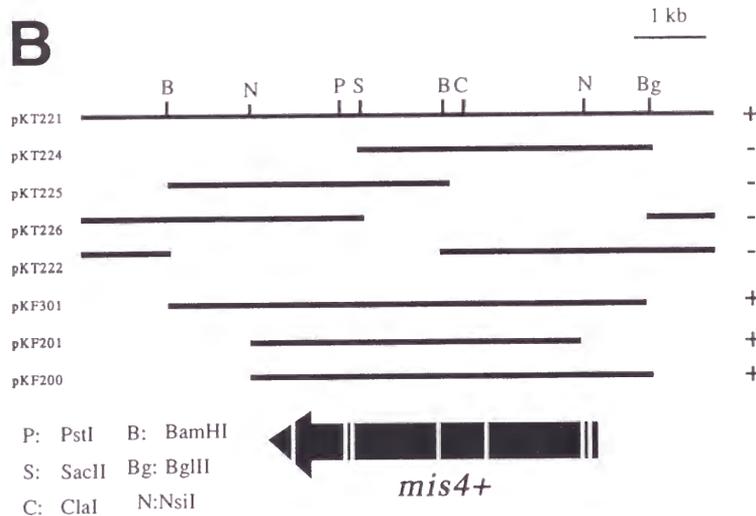


図11 *mis4⁺*遺伝子のクローニング (高橋考太博士によって行われた)

(A) 分裂酵母ゲノムライブラリーから*mis4*変異株の温度感受性を相補するクローンを探索した。得られた39のクローン全てがオーバーラップする同一の領域を含んでいた。(B) *mis4*変異株を相補する遺伝子断片の一つ、pKT221のサブクローニング。サブクローニングと塩基配列決定 (図) の結果、黒矢印に示す、7つのイントロンに分断されたORFが見つかった。

pKT221のBglII,BamHI断片

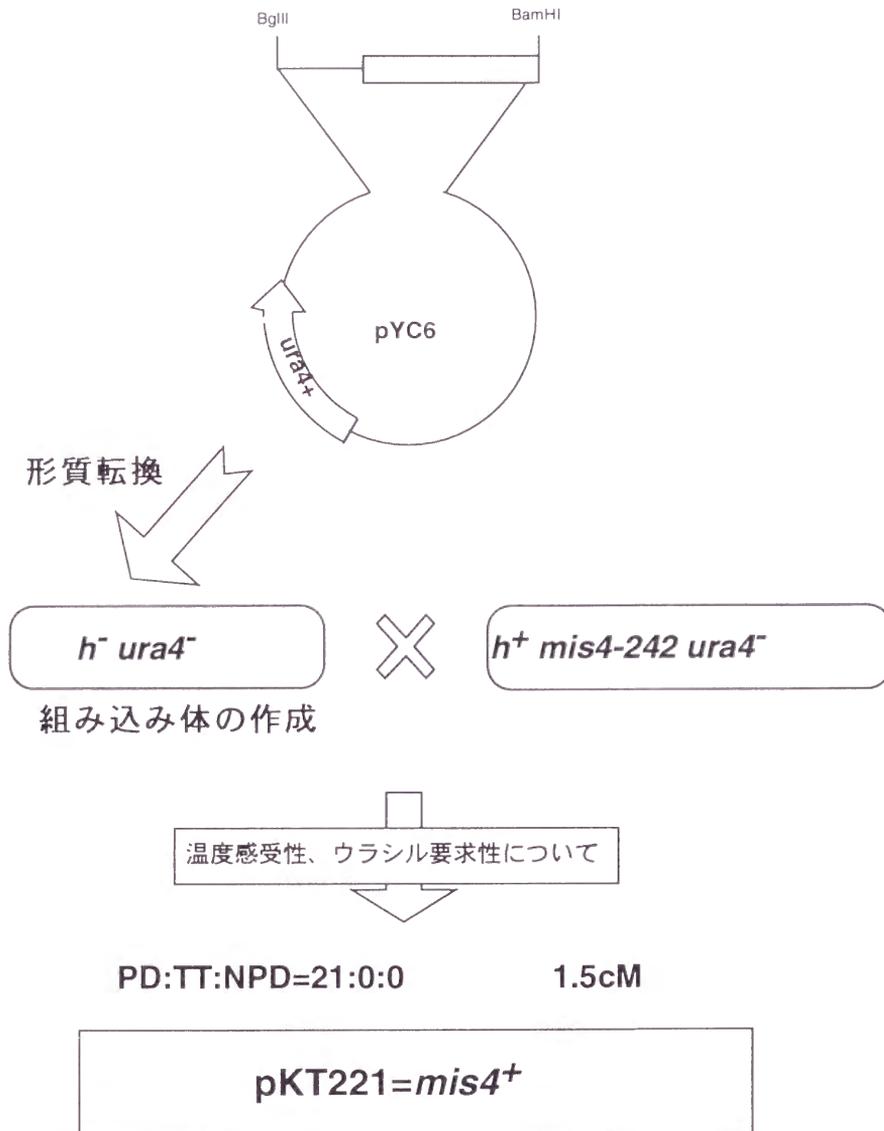


図12 組み込みマッピングによる解析

得られたゲノム断片が $mis4^+$ 遺伝子本体かを探るため組み込みマッピングをおこなった。pKT221のBamHI-BglIIの3kb断片を自律複製配列を含まないpYC6にサブクローンしたのち、野生株へ形質転換、組み込み体を得た。組み込み体と $mis4$ 変異株($h^- \text{ mis4-242 ura4}$)をかけ合わせ、四分子解析をおこなった。温度感受性(ts^-)とウラシル要求性が共分離したのでpKT221は $mis4^+$ 遺伝子本体を含むと結論した。

の塩基配列を決定したところ、7個のイントロンに分断された1583アミノ酸のタンパク質をコードしていることが明らかとなった（図13）。データベースを検索したところ、ツキヨタケ *Coprinus cinereus* のRad9（2157アミノ酸；Seitz et al. 1996）、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のScc2（1493アミノ酸；Michaelis et al. 1997）、ショウジョウバエのNipped-B（2053アミノ酸；Rollins RA et al., 1999）と相同性があることが分かった。また、ヒトにも相同タンパク質があることが当研究室の松坂らによって明らかとなった（松坂ら未発表、図14）。これらのタンパク質は全体的な相同性は低かったが、三つの領域が非常によく保存されていた（図14、15）。これらの結果からMis4タンパク質は進化上高度に保存されていることが明らかとなった。また、変異型 *mis4* 遺伝子（*mis4-242*）をクローン化し塩基配列を決定した（データは示さない）。変異部位を図15の*印に示す。1322番目のアミノ酸残基であるグリシン残基がグルタミン酸残基に置換されていた。変異部位は種間で高度に保存されている領域に含まれていた。

Mis4はHEAT反復配列を有する

Mis4の761番目のアミノ酸残基から922番目のアミノ酸残基にかけて（ドメインii）37-39アミノ酸からなる反復配列があることが明らかとなった。この反復配列は他の生物種のMis4ホモログにも存在した。これらの配列のなかでもアスパラギン酸、バリン、アルギニン残基（図16・赤字）が保存されていた。これらに類似した反復配列は2A型プロテインフォスファターゼのAサブユニットやインポーチン β 等の他のタンパク質にも見いだされており、HEAT（Huntingtin-Elongation factor-A subunit-TOR）ドメインと呼ばれる配列であることが明らかとなった（Groves MR et al., 1999, Chook YM and Blobel G 1999）。HEATドメインはループが2つの α -ヘリックスに挟まれた二次構造を取っており、その反復配列はタンパクタンパク間の相互作用ドメインとして機能していることが報告されている（Groves MR et al., 1999, Chook YM and Blobel G 1999）。

Mis4は160kdのタンパク質をコードする

Mis4タンパク質を検出するため、ヘマグルチニン抗原（HA）をMis4タンパク質のカルボキシル末端に付加させた融合遺伝子を作成した。この融合遺伝子を分裂酵母ゲノムに組み込ませた状態（単コピーで持たせたもの）と分裂酵母にプラスミドで持たせた状態（多コピーでもたせたも

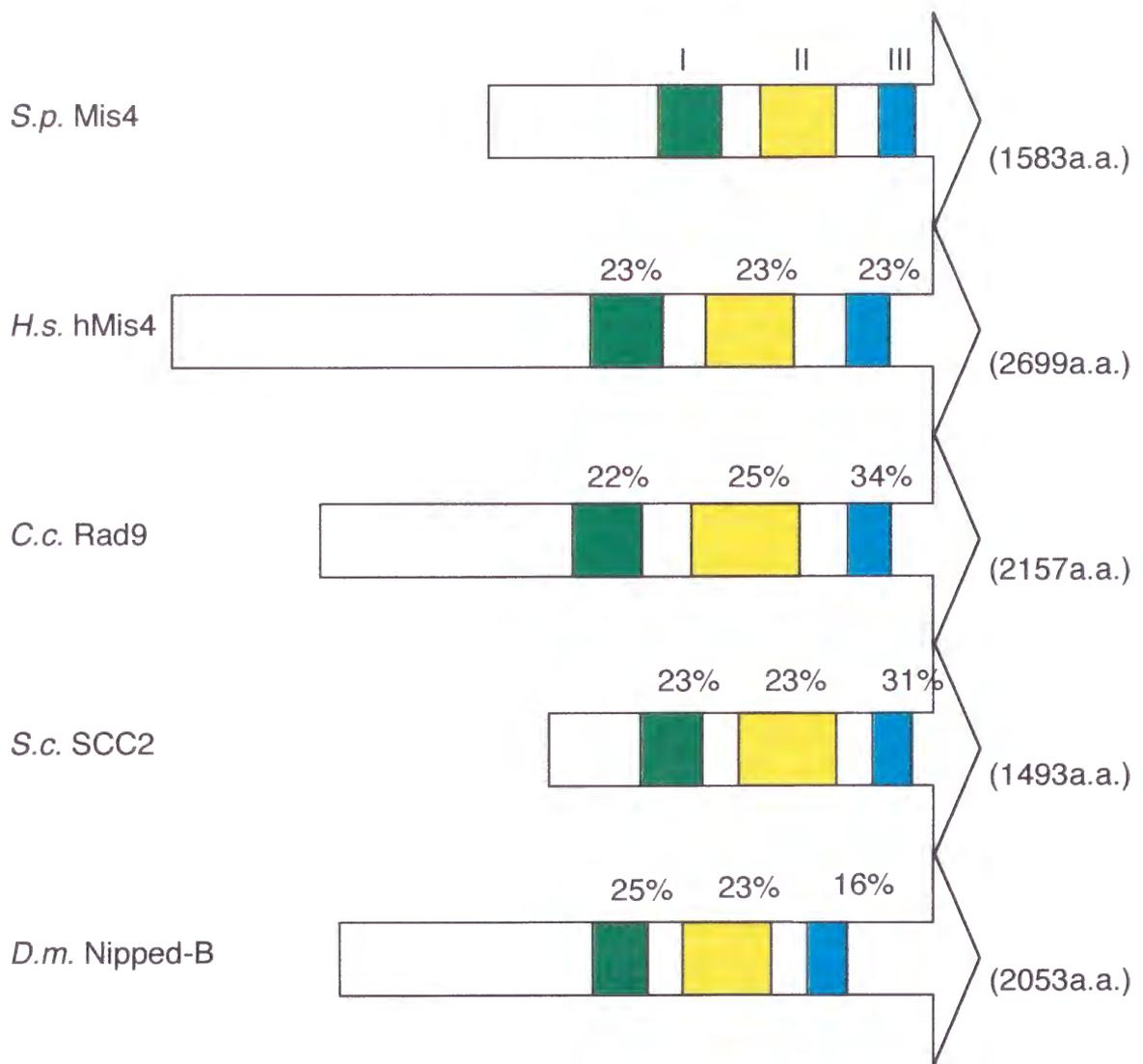


図14 Mis4と相同タンパクの相同領域の模式図

Mis4と相同性を示すタンパク質について、お互いに高い相同性を示す部位をカラーで示した。ドメインi、ii、iiiの三つの特に相同性の高い領域が見いだされた。S.p. Mis4：分裂酵母Mis4、H.s. hMis4：ヒトホモログ、C.c. Rad9：ツキヨタケ、S.c. SCC2：出芽酵母、D.m. Nipped-B：ショウジョウバエ。

```

Mis4      458:  RLRYPYQDFTEESLNTNLSHLPANSVSRTYRSL-NGKSIQYYSTLFLVRLQS
hMis4    1442:  LSRYSKHFQLLEETSLALFLTSRSLNPL--NSSDMD-GEPMYIQMVA
Rad9     846:  FSNHDDQSWATEEELTSLTSLSDTQKAGQFRLDRGRSIRT-VSALLMQLVQT
SCC2     403:  LGSFQQGFTIEELHLELLET-RIQIKLRK--VGNQNI-YITDFTFMS
Nipped-B 708:  KERYKINSLGILTSDELPSKKNLPHYL--TNNNGN-----IQMVA

511:  CSIQNLDFSEIVQS-----ESLSTEALHSGNLTEHLKT---VLSILSKSRHEEY---RIANHAYLIS---RSLKQNKTESNS
1493:  --LVLQLIQCVVHPSS-----EEDSNAEEDSNKKIDQ---BVVITNSYETAM---RTAQNTEISFLK---CGSKQGGED
899:  --SAHDVRIINARRTEKERQNALALKROESISDLNGQPKSDEPFPLDNIEMEEIRLYGGGLESATKAAKTIFPINSRAGRGTTKNSNAE
453:  ---MLENINC-YS-----CNQMDIAPENIDLLKNEY-----KKQEEFLFNIVE---HINDTIFEREK-----NPSA
755:  --LVLQLIQCATIEPDSLCDNGKFSNPFQEGNTFDEEGKLLQ-PSQILLVLQKYDVAV---SIGNLETTFLN-----CKRSRNETD

582:  FAITKILLEDLNNLSLPEWCGTE-TYRQAMNLYMTVTN--DKQAV---SSNAALCL--SLIVN-----VLALFDLSLFEKHNI
1558:  YRFENFQDLISTNKFEPFAA--LLESLRGLLVHQS--KSTEM--ALVASLLEYLTVAAARLAKDAVTSKMDQGSIE-----
987:  YRAAFENQDDELVVYWPWPAAS--LLNLSMFMVSSDDVKSNAQIDTNAASMLALHLEVIAAARLSSILKQKDEGDTSYRGLKP
510:  LRYVINEQDLILLSSQWVTEKISSLKRLLSVYSPS--MQVSA---NIETICQLC--NIGSTIF--DIKCSRDRHEDNLLKIM
833:  FEPLENFHOLLATNKEWPAAS--LLESLGTMLVRYSD--KGIEQ---SILVSLLEYLTVAAARLAKDTVESRCRVNIIDSMIQSI

658:  PAPTNNNDIISFIPSTR-LNELSQV---SFNH-FY-----F---LCKGDISLENIL--PYNYNKWFSLQLLRKVC
1636:  ---RILKQVSGEDEIQQLQKALLDYLDETTDPSLVFSRKFYIAQWFRDITTELEKAMKSKQDESESGTHHAKEI
1076:  LDEVDRRQSPVE-AIRQVHGRSPDVAHLCC--KRST-----EDQAYESARELTAAILGHELGAASLKRNVVLDHPE
592:  INYPE-TLPHFFKFEECI--AYNETIKCRRSATRF-----WNLRL-GTILILEEYTKDAK-EQIITVDNELKKI-
917:  KLEQEKEGDDVTSNNDQDLEPEEQRTDFLQKILLDFLAVNAQEENLIWDYARHFYLAQWYRDVYQRRRINDGKGLAFRKSRIKRRRT

721:  N-----DSEALIIDNCIDKNMOKSQEGFGQPSPFKADENDEIFIIISLY
1712:  T-----TGQIMHRAENRKFRLRSIIKTTPSQFSNIKDELLI---TV--YDDACSIVRYLA
1144:  Q-----DEDDLRLSSPALSFLKLTALRGVWKDPATDVFGIGSQEIVSRIDRLSEEIG
658:  -----LEQIKDGLGPELENREADFTIKLDYFSLHAFE-----
1007:  NGDYLDTSDSGSCDESDTDTNKKRIHCVDSDNFELNINIKALBARQYFINKIKPFSVFGEQNHSSNOHIK--TYIENNAQLIAQYLA

766:  HSSL-LNKKFSLIIGSDSQASRKKCLLQNMKTIPSIKRTHPVLAQIISNDQSAIVRDTVLDLQTYIMAYRETIPQIYG
1763:  SMRPAQSDIYITQIFRGENAFAIRTEHPCSEVVAVPSLRLALDMQRCHGDMNGTSVRAAVLGRFVLCRPLAEQNYD
1199:  TIQSRNSQPILNVLISADAPVIFMRKQLALGQIVTSLATLIGTASVROGTENHLDSPAPVARDAAVLRKYMIDSPVAGYVQ
693:  LLNLY-DP---YKLLISPAKDKIKRTRIKCSMLASKKVELSNPMVKETIHRFLNDSASVDAIDLS---INSSYFE-FYQ
1095:  TKRPSQSDGCKKLLNNEPSAARTRMCLANIVEVPLKRRKDMQMGNOQLTALSVRAVDLAKFVLSNQDLIDQYD

855:  CIIISGISPSTIVRKRALKCEVYEATELNRVLIASRL--TSSNDEET--FSESLVEDEKLWFSANELDCQKGYDOLTFLEKQK
1853:  MAIERILDTGISVKKRVIKILRDCIEQPTFPKITMCMVR--RANR-EBG--KKKVNETHQKLNTE--TPHNDK---DAMT---RKI
1289:  KHAERMAITGLAVKRVKIKSYGYVIDAQRKILSALALRMVA--GG--KKDAMKTEELWPLPPLPPSGMKVKKPT---SSSN
774:  QNNNNYNDSDIMVRHV--NENKMYDETNIIVTKVVIATII--MTEP-EDNDIEMARLILNRYLKVHVEVLDPQ---PKKEISSV
1185:  MASTRILITGVSVKRVKILRDCICLEYPDFSKIPICVVM--RANR-EBG--KKKVNETHQKLNTE-----CTKN--KIGI-QRKI

943:  LRQYFPILKCAPSTERHVLVTSK-TMLTSKEEI--NLSTHTQIRLLLSLQFNQLIE---VITD--QVDESTKGIYEIMSTF
1942:  LNIT--DVAAACRTGYDWFQEL--LQ-NLLKSEEDS--SYKPKKACTQLVDNVEHILKYEESDAS--DNKGVNSGRWACTITF
1372:  PNOD--KAALLSKVAIIMGTAAN---R-DRQSPLEDM--LHKISDKEGDEAASRQRYAEICETIIGLVDATDLPGFTNCRITH
859:  LLM--SRVATMNCQSQDLFL---LNFYLLNKEAHSKEAYDKTHVLTILTDFLVQKIVELNSDDTNE--KNSIVDKQNLN--LAKF
1264:  NHI--DVNHTAHTDTTWTLEGLMSFKPRDNMLRSEGCQEFKKNSEPPMDIACQ-QLADGIVRLIELEDDTNSRMLGCTTTH

1025:  PSRAPEPFDLSYLHLKPYRSASTIEEQ-RFYVVAIFRQVRFQKEISESFRSESVLQ-RITX-A-GTATMEIIVP---SICS
2022:  LDFSKIRFQAM-VKRAMTMOPTLTKCSQNDPMCNKAKILRVLMEHPSETPLATBEDDMK-LALR-Y-GMTVQHCVS---LGA
1454:  LFAAYESLPGTASTLFLYKNASTE-ELLTSDFLIKTRVSHMPKTPRQRAGADVAAA-LILPFGGVNIQEA-G---DMCA
941:  ADSTVS-PLT-KDITAYLYPMVSDKDFHYII---QPRCTEKLANKFKQKELYDETTLS-R-PP-M-NVREDEAMPLIWSAT
1351:  LAKVRFOOL-VKRAITIEEYINIKCHEATAAKFCAMADLEKVELVNNASESPLASDEHMLLVSNQAEVTS---CS---LGA

1109:  LTRINDYE-----RLKIKIVVSCLSLEEARHSENNPQKMVRLI--DLIGLSRYGDNRRNDWKHSL--DEISPECDDAYVIL-LGY
2106:  LNNKIQNFY---FWVAQFNRYGA-SKLSQHQEDPNNTSLT--NKPALRSLFTGALCFHFDLLE-DRKGNKSVNIKDKV-LEL
1540:  LVRHTDFRRLINLLKGNARLLSYRHPPTQQLNNSKTLMLLFIALLGEHNDRL-RLEQDPLADRSITQGSVMHEIYFTL
1023:  HRHDTARVA---ACSSLHSHLPHYNK--ANNEEAALVVDGKL--QRLYLSGTGFARFCPPPSN-DKI-ALQEGETLYEHIT-KC
1435:  LNNKITHNFY---LIRDQFKFYRVQVRSQVIQG NNSVDNI--YTPSRRSLFTGILMEYFDKSPIALGETNDGLPVSICE-D

1188:  LQKLLKDAKQRIHIDNMSRCLRETSFISPLMLSTLDMFAENNVNEVSVLFPKSPLELAAD-EDLIEADQKL-S-LKGQNVQSN
2188:  LMYFTKHSDEEQTAKLIGGFAFIQHPSMPEQEVENKLYNNDSDKNSSVNLK-----QDLKNL--QTYQOEDTRMQQADRDW---K
1629:  LRIYDKFDFADRPRIQQGFQFRAQPTMTKEESAAMDAPASEEEGRAR-----LKM--QDFIASEKHSAKEKESAKNKN
1102:  LVLKDKLITHVRRVAKNKTKCGNHPKLFRSHRVLHLLDKE-----QSDQLDK--VLESYLDLFLLEERKSVRN-TGVNSTLSSN
1517:  LKMLFFCRCTNQEIRQQAISLGSFVLDNG-YLTRSELKNYCEILSSIANDAGFKICMRNIW---IYTESEMFMHNKEKEWEKQSK

*G->E
1276:  KSVDRDMKRGT---KDKQWIEVSASLMEHFPCILLSCSKNLRYSMLGPELRCIHQGLVNERMCSLTALENAIKETREVIIL
2268:  KVAKQEDLREM-----GDVSSSMSSSMGLYKQDPAFHTQSSVRHFANVTAITLNGGITHVQCCFYIANGDPEPAMRNKADQO
1711:  KANTDVNMEELVGNTDGFADSVSSAVRYSHLILAAEQSQIQMAADIVITTKQGAHTLQSPVILADESPHAVLSARLIAL
1185:  SILKKKLRTN---RVEFANDVCSAATRFQDNLQLCLRLDKNSLVATR--KLIKDFSYTNEGSHSPYIATFASTSYQIRHVAYEL
1604:  ---HEDLREM-----NDVSSMASRILLYLEELLCFNRRDITVRLWAKVQIVRQGVHEVRMAYLCSSTDRHIESAHRDAD

1363:  HTVHRHES---DGLYAQSADLIFSQKTKT-EEYQTFKIGESPPQSAITVSA-DKSSSRKILIMQIKPKKEDGI---DLPSFTEE
2353:  LVLDKYYAG---FHMKAVAGMKMSYQQAINTCLKDPVRGRQDESSALCSHLYSMIGNVQHRRAFIISL-LNLF-----DDTAKT
1801:  HSIQNSRHAS---LNTSYSISARKSPDYKKI---VDGVHGERTNGHPTALLQRWYTLVREKATRQDFKSL-LKVFSENDSYQATQD
1272:  LEVDFERYETLVSSSLRSGVTKAIHYSHTDEKYYYKHDHFLSLEKLCGTGKNGPKFFVLRIMQSYDDI-LDLTS-----TNSV
1685:  LKIDKTYSG---FNMKVQFGLQLCFKQKILQINNRGKEIRGYASRGPDNITTALNDFLYTLRLTTKPPORRALVQTVTKQFDQKTS

1446:  KVSFSPCCVAGFVSVSIEPLMISTVDSVLATIGPTITGMKKLDHERFK
2435:  DVTMLYIADNACFQTEDEPLFMHHDITLTVSAGSNLQSFKESMVKDKRKRKSSPKENESSDSEEVSRPRKSRKRVDSIDIT
1885:  DVDFRYMAENASPEKTEEVYTKHLTTLVSTTGMQLLDIISPAHLLSQIQPSHSQPSQHNGDEISSNAEAVVPLATPNYIDL
1356:  QKSIIV-LCTN-SNTPVSYLISLTKT
1773:  LQQMYIADNLAY-PPVVOEPLYLHQIDLLISMAGTHLLATFKE

```

図15 Mis4相同タンパク質に対するアラインメント
 図14に示した相同タンパク質に対するアラインメントをおこなった。青枠は同一アミノ酸、水色枠は類似アミノ酸であることを表す。*は*mis4-242*において変異が起こったアミノ酸残基。グリシンがグルタミン酸に変化していた。変異部位近傍は高度に保存された領域であった(ドメインiii、図14)。

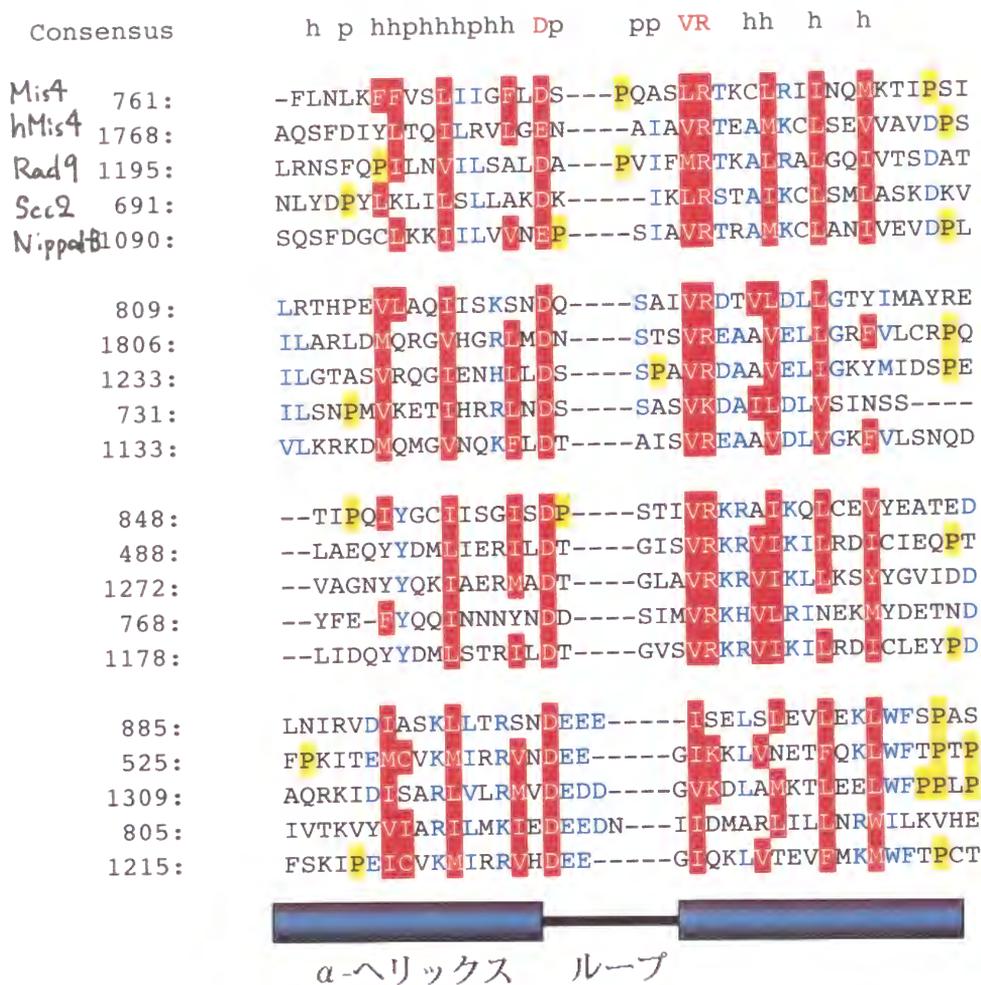


図16 Mis4はHEATドメインを有する

(上) Mis4の種間で保存された領域にHEATドメインとよばれる反復配列がドメインiiに見つかった (Groves MR et al., 1999, Chook YM and Blobel G 1999)。反復配列のコンセンサス配列を一番上に示す (h; 疎水性残基, p; 極性残基)。Mis4相同タンパク質中でコンセンサス配列とマッチする配列を赤枠で示した。コンセンサス配列以外で保存されている残基を青字で示した。黄枠はプロリン残基。(下) HEAT反復配列の構造。ループドメインが2本のヘリックスに挟まれた構造を取る。

の)で発現させた。図17に抗HA抗体でウエスタンブロットしたものを示す(レーン1・ベクターのみ< Mis4-HAを発現していない>、レーン2・単コピー、レーン3・多コピー)。ベクターのみのレーンでは見られず、多コピーで単コピーで見られるよりも量が増えるバンドが検出できた。このバンドがMis4-HAと思われるが、予想分子量である180kDよりやや小さい160kDの場所にみられた。泳動度が速くなるような修飾等を受けているのかもしれない。

既知のコピー数の分かっているCut2タンパク質と比較することでMis4タンパク質の細胞あたりのコピー数を予想した(データは示さない)。Mis4、タンパク質、Cut2タンパク質をともにカルボキシル末端にHA抗原を付加させ、それぞれ単コピーで発現させた。抗HA抗体でウエスタンブロットし、バンドの濃さを比較したところCut2タンパク質の約4倍量存在すると予想された。Cut2タンパク質は細胞あたり8000コピー存在することが分かっているのでMis4は細胞あたり30000コピー程度存在することが予想された(Funabiki et al., 1996)。

Mis4抗体の作成および検出

Mis4タンパク質の検出を容易にするため抗Mis4抗体を作製した。図18Aのような発現プラスミドを構築し、Mis4の中央ドメインの部分断片とGSTとの融合タンパク質を大腸菌の中で大量発現させ、精製した(図18B)。精製した融合タンパク質をウサギに免疫したのち血清を回収した。免疫開始後12週目の血清をアフィニティ精製後、分裂酵母粗抽出液に対しウエスタンブロットをしたのが図18Cである。レーン1が単コピー、レーン2が多コピーで*mis4*⁺遺伝子を持たせたものである。160kDの場所に多コピーにすると濃さが増すバンドが見られる。この後のMis4タンパク質のウエスタンブロットによる検出にはこのアフィニティ血清を用いた。

Mis4タンパク質の挙動が細胞周期で変動するかどうかを調べるために*cdc25*変異株を用いたブロック&リリースの実験を行った(図19)。*cdc25*変異株は制限温度36℃でG2期に停止し、その後許容温度でリリースさせると極めて高い同調性を示してG2/M期進行を起こす。Mis4タンパク質を抗Mis4抗体でウエスタンブロットをした。コントロールとして示したM期サイクリン(Cdc13)はリリース後20分から30分にかけて減少しており、この時期がM期後期と思われる。Mis4タンパク質の量の変動は1.5倍程度の増量がM期後期にみられたが、ほぼ一定であると結論した。抗PSTAIRES抗体のウエスタンブロットは細胞周期を通じて量が一定であり、ローディングコントロー

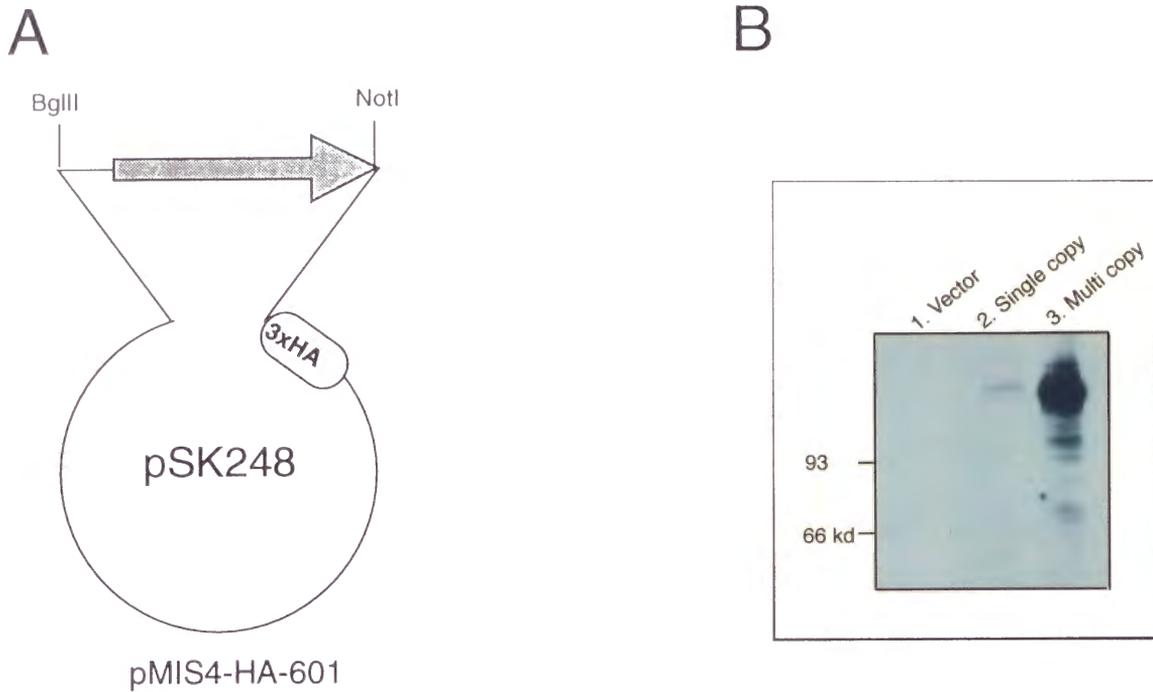
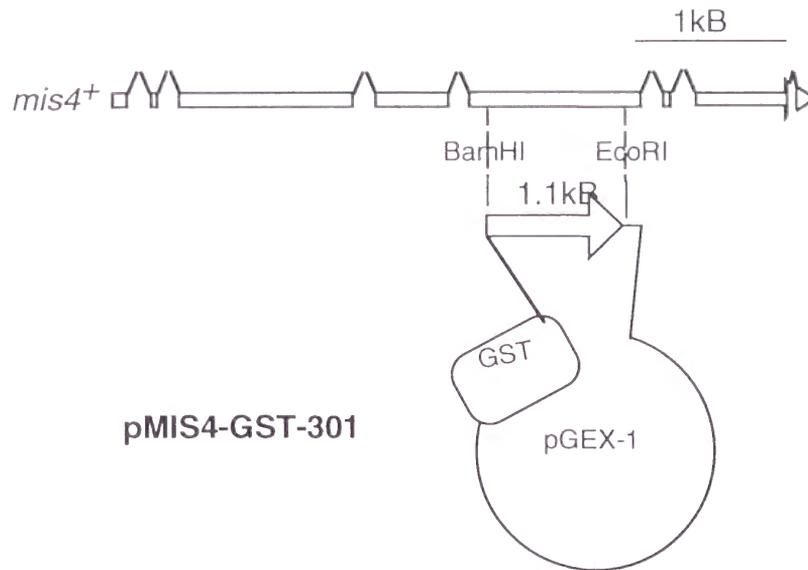


図17 Mis4タンパク質の同定

Mis4のC末端にHA抗原を付加し、ウエスタン法でMis4タンパクの同定をおこなった。(A) Mis4のC末端に3xHAをin frameで付加したプラスミドを作成した。(pMIS4-HA-601)。このプラスミドは*mis4*変異株の温度感受性を相補したため機能的であると考えられる。(B) 細胞粗抽出液をSDSポリアクリルアミド電気泳動の後、抗HA (12CA5) 抗体によるウエスタンブロットティングをおこなった。(レーン1) 野生株、(レーン2) *mis4*⁺遺伝子のC末に3xHAをin frameで付加しゲノムに組み込んだもの、(レーン3) pMIS4-HA-601をマルチコピーで持たせたものの細胞粗抽出液に対するウエスタンブロットティング。160kDの位置にMis4-HAと思われるバンドが確認できた。

(A) GST-Mis4 expression plasmid



(B) Expression in E.coli

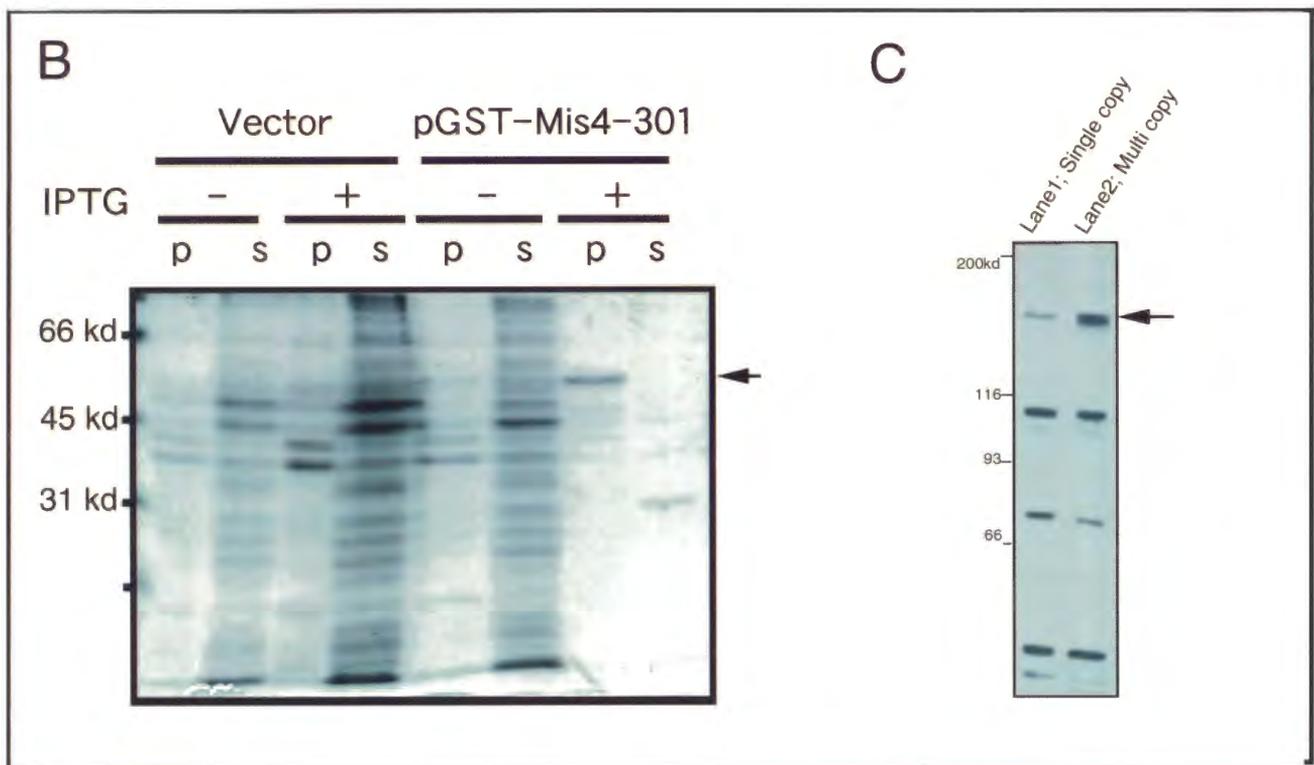


図18 抗Mis4抗体 の作成

(A) に示したようなプラスミドを作成した。GST 遺伝子の下流に *mis4+* 遺伝子の断片が in frame で付加させてある。遺伝子断片は Mis4 の 872 番目のアミノ酸から始まる 339 アミノ酸のタンパク質をコードする。融合タンパク質は 68 kD と予想された。

(B) 大腸菌での融合タンパク質の発現をクーマシー・ブルーにて染色した。IPTG で発現を誘導させた。プラスミドを持たせた株で誘導をかけたときに発現する 56 kD のバンドが存在する。このタンパクを回収し、抗原としてウサギに注射した。

s : 14000 rpm (TOMY MRX-150) 10 分の上清。p : その沈澱。

(C) 抗原を注射してから 12 週目の血清をアフィニティーした後、分裂酵母野性株粗抽出液にたいしてウエスタン法をおこなった。lane 1 はベクターをもたせたもの。lane 2 は *mis4+* 遺伝子を多コピーでもたせたもの。多コピーで増量する 160 kD のバンドが確認できた。

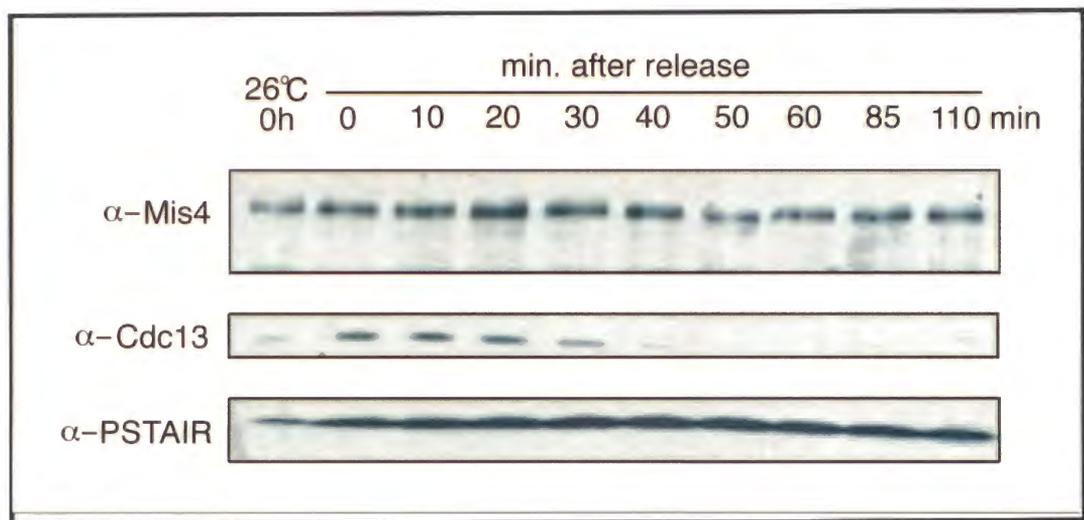


図19 *cdc25*ブロック & リリース同調培養でのMis4の挙動

上段；抗Mis4抗体によるウエスタンブロット。中段；抗Cdc13（サイクリン）抗体によるブロット（分裂中期後期マーカー）。リリース後20-40分が中期後期遷移と思われる。下段；抗PSTAIR抗体（Cdc2）によるブロット。蛋白量がそろっていることの確認。

ルとして用いた。

mis4変異型タンパク質は量が減少している

mis4変異型タンパク質をウエスタンブロットにより検出した。野生株とmis4変異株をそれぞれ制限温度に移し、経時的にサンプリングしたのち、その細胞粗抽出液に対しウエスタンブロットを行った(図20)。変異型mis4タンパク質は許容温度の時点から野生株に比べて量が少なく、制限温度に移しても量は一定であった。変異型mis4タンパク質は野生型と比較して不安定になっているのかもしれない。

mis4⁺は必須遺伝子である

mis4⁺遺伝子の遺伝子破壊を行った。Mis4タンパク質のコード領域をura4⁺遺伝子と置換したDNA断片を二倍体細胞(*h-/h+ leu1/leu1 ura4/ura4+/his2 ade6-216/210*)へ形質転換することで片方のmis4⁺遺伝子座位をura4⁺遺伝子により破壊したヘテロ二倍体を作成した(図21A、サザンブロットによる確認、図21B)。四分子解析を行った結果、四個形成された胞子のうち二個のみが生育可能であり、またそれらはウラシル要求性(*ura4-*)であった。この結果からMis4タンパク質は生育に必須であることが明らかとなった。遺伝子破壊された細胞をDAPI染色により顕微鏡観察したところ凝縮した染色体が散らばったような表現型や、未分離核が隔壁により破断されたような表現型(*cut*表現型、Hirano et al., 1986)が見られ、mis4温度感受性変異株と非常によく似た表現型を示した(図22)。

mis4変異株はDNA合成阻害剤ヒドロキシウレアに感受性を示す

mis4変異株はDNA合成阻害剤であるヒドロキシウレア(HU)に対し許容温度においても感受性を示した(図23)。例えばDNA複製チェックポイント機能に欠損を示す*cdc2-3w*変異株は、HU存在下でDNA合成がおこらないまま分裂期進行を引き起こし致死となるためHUに対し感受性を示し、5mMのHUを含むプレートの上でも生育できない(Enoch and Nurse 1990)。mis4変異株は*cdc2-3w*変異株と同等の感受性を示した。

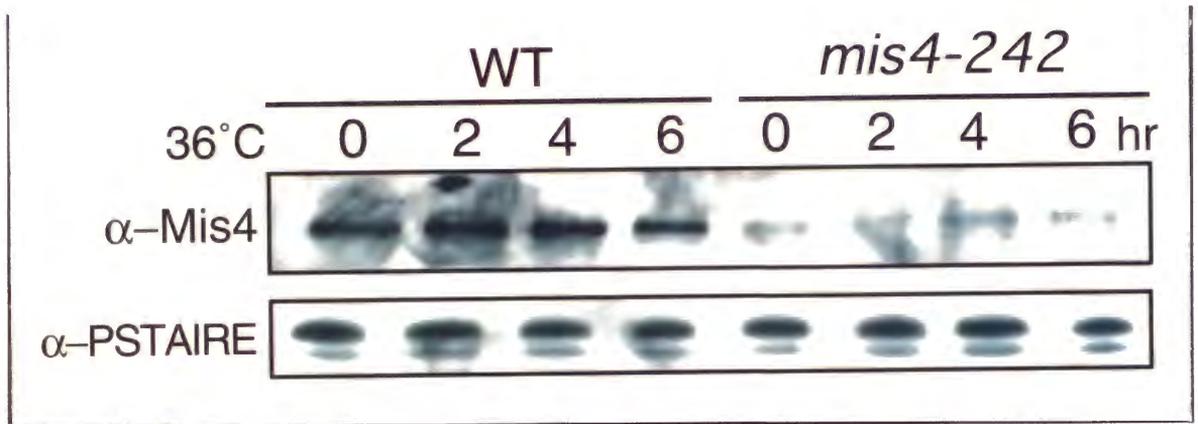
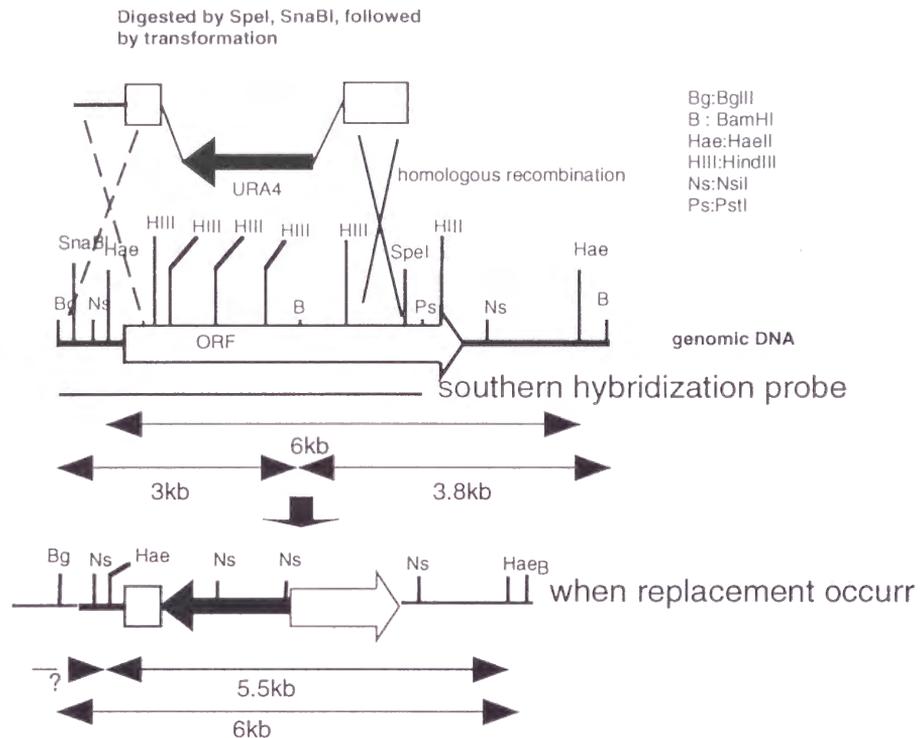


図20 *mis4*変異型タンパク質の検出。
*mis4*変異型タンパク質を抗Mis4で検出した。WT；野生株、*mis4-242*；
*mis4*変異株。非同調細胞をそれぞれ制限温度36°Cへシフトアップしたの
 ちサンプリングを行った。（上段）抗Mis4抗体によるプロット *mis4*変異
 株では許容温度から量が減少していた。（下段）抗PSTAIRES抗体による
 プロットでタンパク量が揃っていることを確認した。

A



B

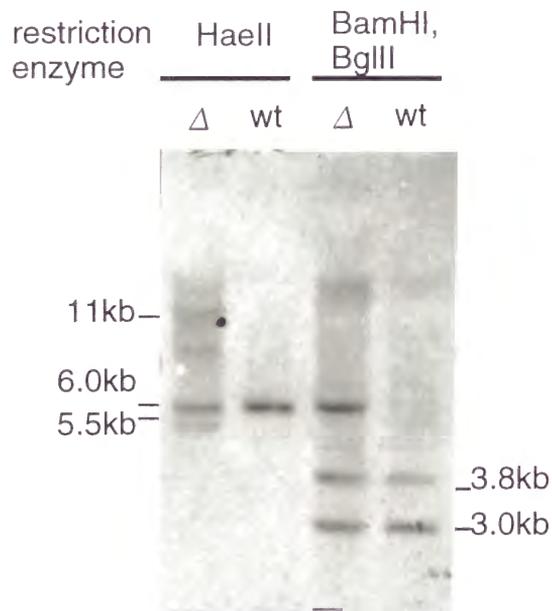
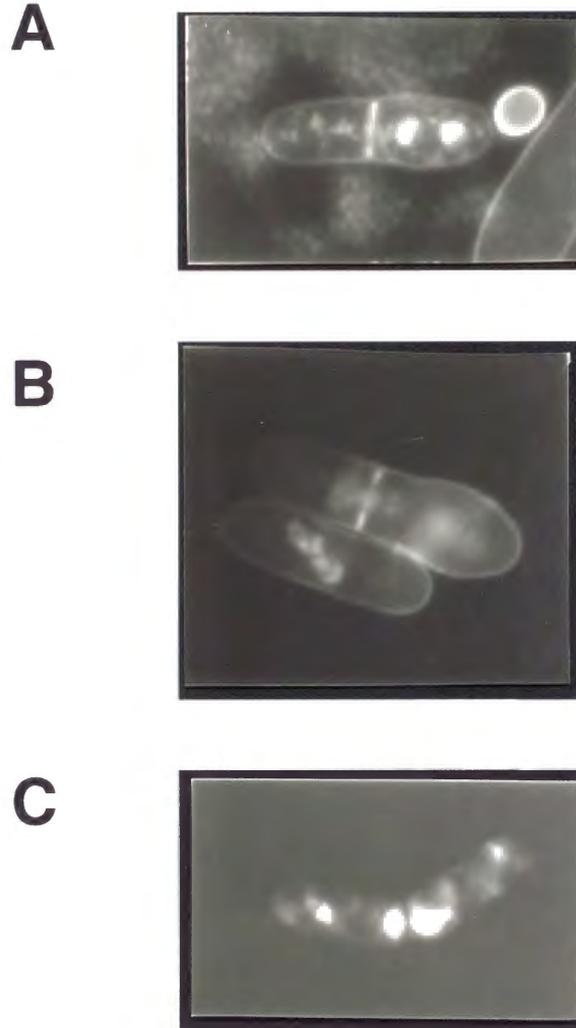


図21 *mis4⁺*遺伝子破壊株作成の戦略

(A) pKF300(材料と方法)の*mis4⁺*遺伝子領域をHindIIIで消化し、分裂酵母*ura4⁺*遺伝子で置き換えたプラスミドを構築した。プラスミドのSnaBI-SpeI断片を野生株2倍体に形質転換した。その後、安定な*ura4⁺*形質転換体に関し、サザン法をおこなった。

(B) *mis4⁺*遺伝子破壊株ゲノムに対するサザンハイブリダイゼーション
得られた安定な形質転換体のゲノムを抽出しHaeIIまたはBamHI、BglIIでそれぞれ消化した後、に図示したプローブ(A参照)にてゲノムサザンをおこなった。サザンの結果、予想通りのバンド(矢印)が確認されたので2倍体の一方の*mis4⁺*遺伝子が*ura4⁺*により破壊されていると結論した。

Δ ; *mis4⁺*遺伝子の片方が破壊されたヘテロ二倍体株。wt : 野性型二倍体株



**EMM2+Leucine+Adenine+Histidine
24hours after germination**

図22 *mis4*⁺遺伝子破壊株の表現型

得られた2倍体を胞子形成の後にウラシルを欠いた培地に移して培養した。24時間後のDAPI像を示す。この培地中では*ura4*⁺遺伝子によって遺伝子が破壊された細胞しか発芽できない。

(A) *displace*の後に核分裂を起こしたと思われるもの。(B) 隔壁により分裂中の核が破断されたもの。(C) その後細胞質分裂を起こしたと思われるもの。総じて温度感受性変異株と同じ表現型が観察された。



図23 DNA合成阻害剤ヒドロキシウレアを含むプレート上でのコロニー形成能
ヒドロキシウレアを含むYPDプレート上で4日間培養したもの。コントロールとして
野性株及びDNA合成チェックポイントに欠損があるためヒドロキシウレアに感受性を
示す *cdc2-3w* 変異株を用いた (Enoch and Nurse 1992)。

HUの*mis4*変異株への効果を見るため、26℃でのHU存在下における表現型をDAPIにより観察した。*mis4*変異株を26℃でHUを15mM含む液体培地で培養したところ細胞は一核の間期核のまま伸長した(図24C)。FACscanでDNA含量を測定すると1Cのままであり、HUにより複製チェックポイントが起動されて間期停止したものと思われる(図24A)。また生存率は8時間培養した時点では低下しなかった(図24B)。しかしながら*mis4*変異株をより長時間(20時間)HU存在下で培養したとき、低濃度(4-6mM)のHUにおいても生存率を低下させた(データは示さない)。

HU存在下の表現型をさらに解析するため制限温度36℃で実験を行った。許容温度で*mis4*変異株細胞をG1期に停止させた後、栄養培地へリリースさせると同時に36℃へシフトアップした。このとき、15mMのHUを加えた培地とHUを加えない培地へとリリースした。HUを加えた状態で培養した細胞はリリース後7時間までDNA含量は1Cのままであり、大部分のDNA合成は行われていないと思われる。一方HUを加えず培養したものはリリース後4時間でDNA合成は完了していた(図25A)。HU存在下で細胞は間期核のまま伸長しており、制限温度においてもDNA複製チェックポイントは機能していると思われる(図25B)。生存率を図25C(ii)に示す。HU存在下では生存率はリリース後4時間まで高いままであり、5時間目、6時間目と徐々に低下し10%になる。この生存率の低下の速度はHUを加えずに培養したときにみられる生存率の低下速度よりも1-2時間遅い。S期進入を抑えると生存率の低下も抑えられるのかもしれない。生存率の低下がDNA合成と並行して起こることを示しているのかもしれない。

*mis4*変異株は紫外線照射に対し感受性を示す

*mis4*変異株はHUだけではなく、紫外線照射に対しても許容温度で感受性を示す(図26)。紫外線照射によりDNA損傷が引き起こされる。このときDNA修復の時間を稼ぐため、M期進入を抑制するDNA損傷チェックポイントが誘導され、細胞周期を停止させる(Hartwell LH and Weinert TA 1989)。このチェックポイント機能に欠損があるかを調べるため26℃で培養している*mis4*変異株に100ジュール/mxmの紫外線を照射し、その後の表現型を追跡した。紫外線を照射された野生株細胞は照射後すぐに隔壁形成を起こしている細胞の頻度が低下する(図27C)。隔壁形成頻度の割合はM期細胞の指標として測定したが、その低下は紫外線照射にตอบสนองしてM期進入が抑制され、M期の細胞が減少したためと思われる。*mis4*変異株でも紫外線照射後、急激に隔壁形成の頻度は

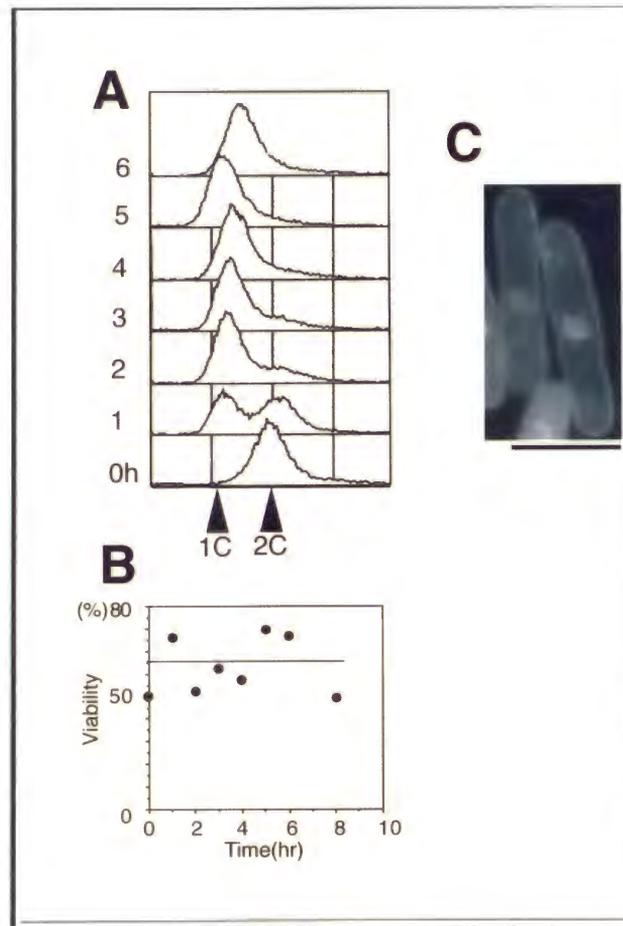
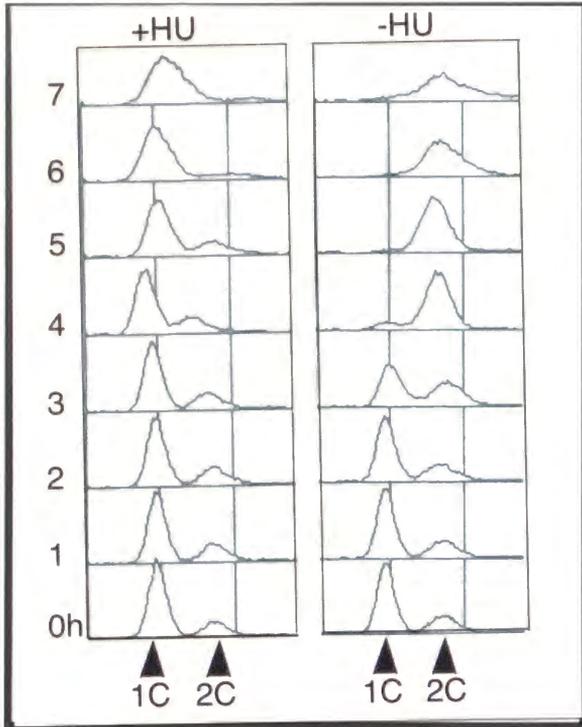


図24 許容温度におけるヒドロキシウレア存在下での細胞数、生存率、DAPI像
*mis4*変異株細胞を26℃YPDで培養しヒドロキシウレアを15mMになるように加え、その後1時間毎にサンプリングをおこなった。ヒドロキシウレアを加えた時間を0時間目とする。
 (A) DNA含量をFACSscanにて測定した。DNA合成が阻害され、1Cピークを示す細胞が蓄積した。(B) 生存率。ほぼ高いままであった。(C) 6時間目のDAPI像。細胞は間期核のまま伸び続けた。barは10 μ m。

A**B**

(7hrs at 36°C in YPD+HU)

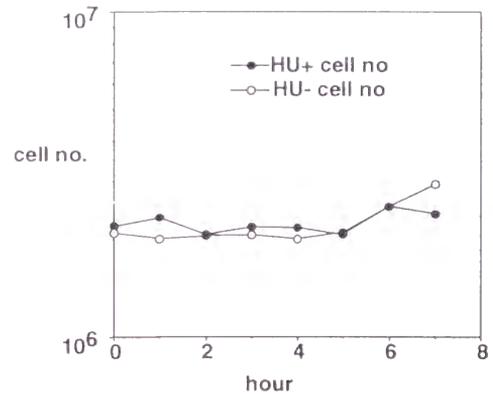
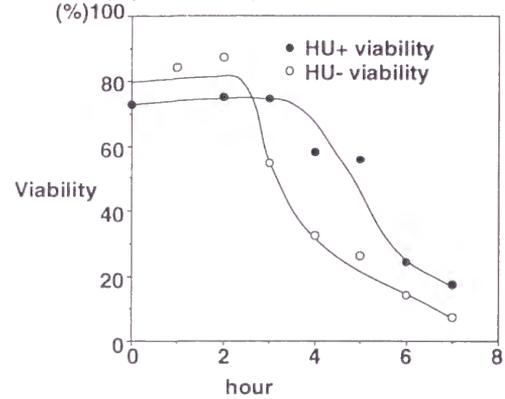
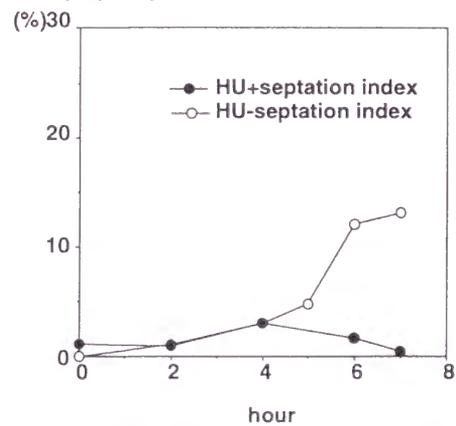
C**(i) cell number****(ii) Viability****(iii) Septation index**

図25 制限温度におけるヒドロキシウレア存在下での細胞数、生存率、DAPI像
窒素源を枯渇することで*mis4*変異株細胞をG1期に停止させた後、15mMヒドロキシウレアを含む培地、含まない培地で制限温度でリリースし、サンプリングをおこなった。

(A) FACSによるDNA含量の測定。窒素源枯渇によりほとんどの細胞がG1期に停止していた。またヒドロキシウレアを含む培地でリリースしたものはDNA合成が阻害され1Cピークを示したまま停止していた。ヒドロキシウレアを含まない培地でリリースしたものはリリース後4時間でDNA合成が完了していた。(B) ヒドロキシウレアを含む培地中で7時間培養した細胞のDAPI像。barは10 μ m (C) ヒドロキシウレアを含む培地中で培養した細胞 (●)、ヒドロキシウレアを含まない培地中で培養した細胞 (○) の (i) 細胞数、(ii) 生存率、(iii) 隔壁をもった細胞の割合。

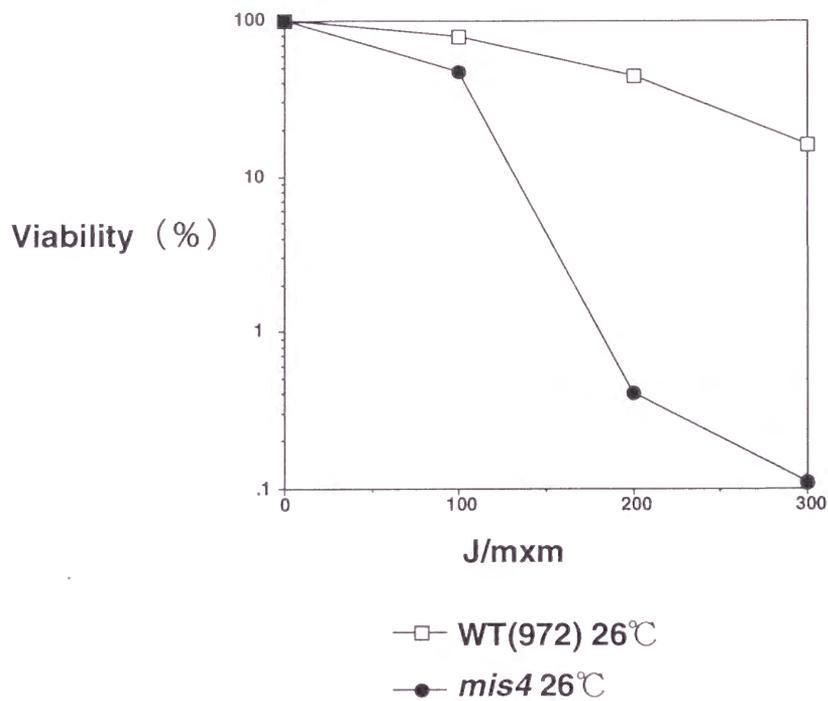
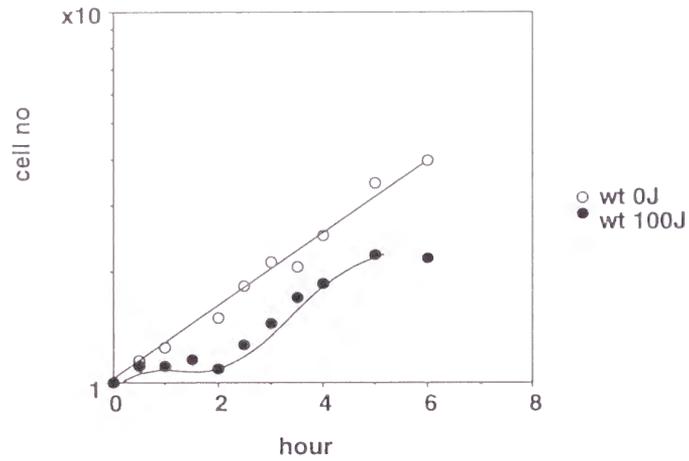
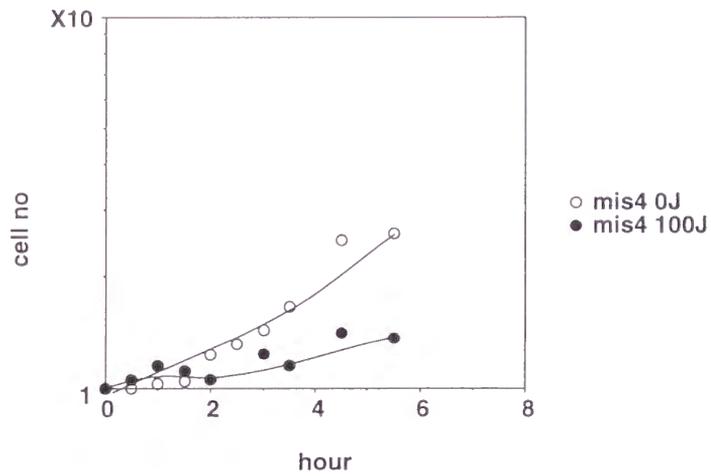


図26 *mis4*変異株の紫外線照射後の生存率
 対数増殖期にある細胞をYPDプレートにまき、各線量の紫外線を照射して、生存率を測定しプロットした。200J/mxmの線量を照射した時、*mis4*変異株は野生株に比べて100倍の感受性を示した。

A



B



C

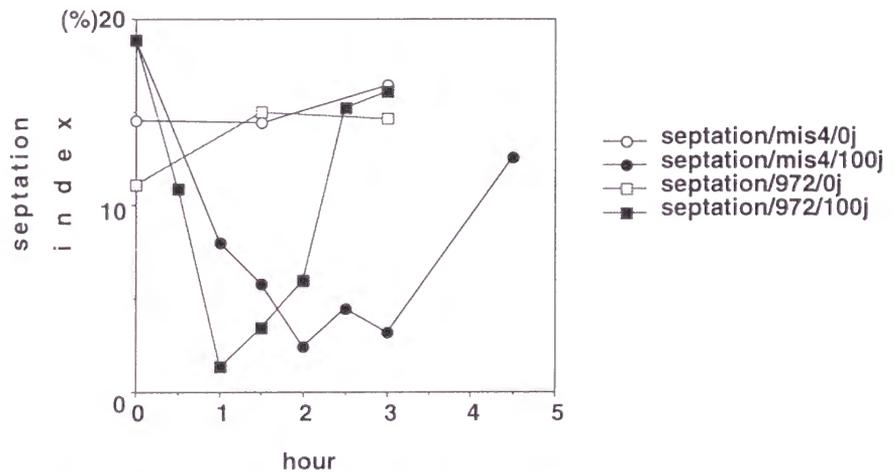


図27 許容温度における紫外線照射後の細胞数、表現型の推移

26°C YPD液体培地中で対数増殖期にある細胞に紫外線を100J/mxm照射した後、30分毎にサンプリングをおこなった。(A) 野生株細胞の細胞数の推移。紫外線を照射しなかったもの(○)。照射したもの(●)。(B) *mis4*変異株細胞の細胞数の推移。紫外線を照射しなかったもの(○)。照射したもの(●)。(C) 隔壁をもった細胞の割合。紫外線を照射しなかった(□)、照射した(■)野生株細胞。紫外線を照射しなかった(○)、照射した(●) *mis4*変異株細胞。隔壁を持つ細胞の割合を測定しプロットした。*mis4*変異株では紫外線を照射した細胞は野生株に比べて隔壁形成の回復のタイミングが遅れた。

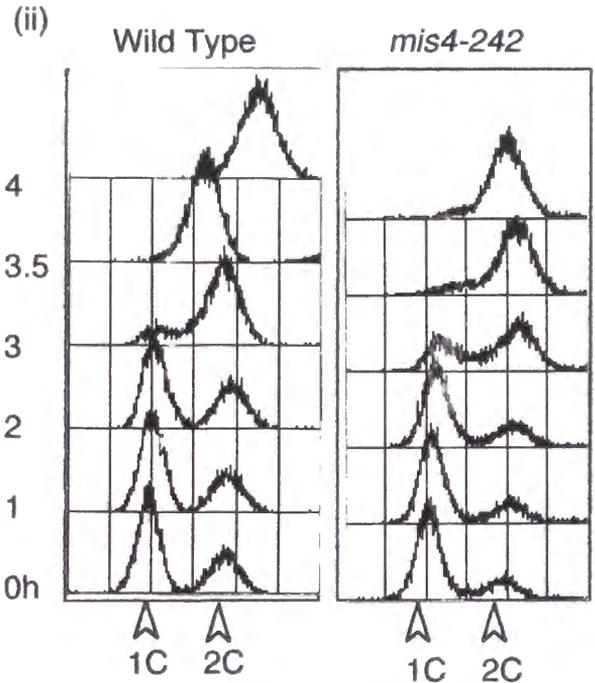
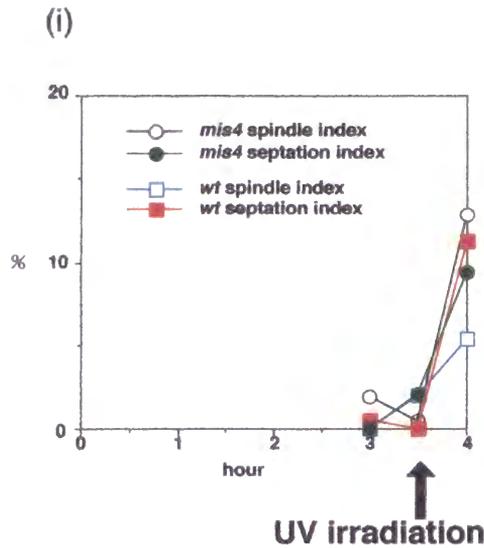
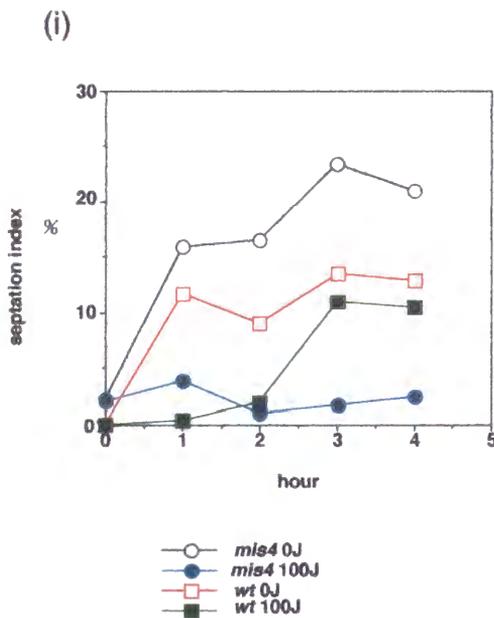
低下し（図27C）、細胞は間期核のまま伸長した。しかしながら隔壁形成の頻度は低いままであり、その回復が非常に遅れた。（野生株では1.5時間程度で回復するのに対し、*mis4*変異株では2-3時間かかった。）これらの結果は*mis4*変異株で紫外線照射に応答するチェックポイント機能は正常であるものの、細胞周期停止からの回復に欠損があることを示す。DNA修復に欠損を示すのかもしれない。

同様の実験を制限温度である36℃でも行った。*mis4*変異株は一旦S期を制限温度で通過させないと致死とならないので次のような実験を行った。窒素源枯渇によりG1期に停止させた細胞を36℃でリリースさせ、S期が通過したところ（リリース後3.5時間）を見計らって100ジュール/mxmの紫外線を照射した（図28A）。野生株細胞同様、*mis4*変異株においても紫外線照射後に隔壁形成の頻度が低下しM期進入が抑制された（図28B）。このとき*mis4*変異株細胞は間期核で伸長していた（図28B）。しかしその後野生株細胞は3時間後に隔壁形成が回復するのに対し*mis4*変異株では4時間後でも隔壁形成は全く回復しなかった。紫外線照射の効果が許容温度の時より激しく出ているようである。

*mis4*変異株はDNAリガーゼの変異株と合成致死性を示す

*mis4*変異株と遺伝的相互作用を示す変異株を探索した。遺伝的相互作用を示すものの中にはしばしば物理的な相互作用を示すものもみられる。この目的のため、様々な変異株とかけ合わせ、その二重変異株の制限温度を調べた。*mis4*変異株は*cdc17-K42*（DNAリガーゼの変異株、Johnston LH et al., 1986）と強い相互作用を示した。26℃では*cdc17*変異株、*mis4*変異株はそれぞれ生育可能であったが二重変異株はコロニー形成をすることができず、22℃でのみコロニー形成が可能であった（図29）。DNA複製に欠損を示すその他の変異株についても調べた。*mis5⁺*（DNA複製開始に必須なMCMタンパク質）（Takahashi et al., 1994）や*cdc20⁺*（DNAポリメラーゼ ϵ 、D'Urso G, Nurse P 1997）や*cdc22⁺*（リボヌクレオチド還元酵素、Fernandez Sarabia MJ et al., 1993）の変異株においてそれぞれの二重変異株がシングル変異株の制限温度より低い温度でしかコロニー形成ができなくなっていた（図30）。

*mis4*変異株ではパルスフィールド電気泳動で検出されるようなDNA複製異常は

A**B**

(ii)



図28 制限温度における紫外線照射後の細胞数、表現型の推移

(A) G1期および、S期を制限温度で通過した細胞に対し紫外線を照射するため、窒素源枯渇によりG1期に停止した細胞を36°CYPDにてリリースし、3.5時間後に紫外線を照射した。(i) チューブリン染色でスピンドルを持ったM期細胞の割合を測定しプロットしたもの。リリース後4時間後にM期細胞が蓄積した。(ii) G1期に停止した細胞を36°CYPDにてリリースしたのちFACscanでDNA含量を測定した。紫外線を照射した3.5時間目には*mis4*変異株、野生株(*wt*)ともにDNA合成を終了していた。リリース後3.5時間の細胞のほとんどはG2期にあると思われる。

(B) リリース後3.5時間の細胞に紫外線を照射した。照射した時間を0時間とし、照射後36°Cで培養、サンプリングをおこなった。(i) 隔壁を持つ細胞の割合を測定しプロットした。野生株および*mis4*変異株ともに紫外線を照射した細胞は照射しなかったものに比べて隔壁形成が遅れた。*mis4*変異株では隔壁形成が照射後4時間でも観察されなかった。野生株；紫外線を照射しなかった細胞(□)。100J/mxmの紫外線を照射した細胞(■)。野生株；紫外線を照射しなかった細胞(○)。100J/mxmの紫外線を照射した細胞(●)。(ii) *mis4*変異株の紫外線照射後4時間目のDAPI像。

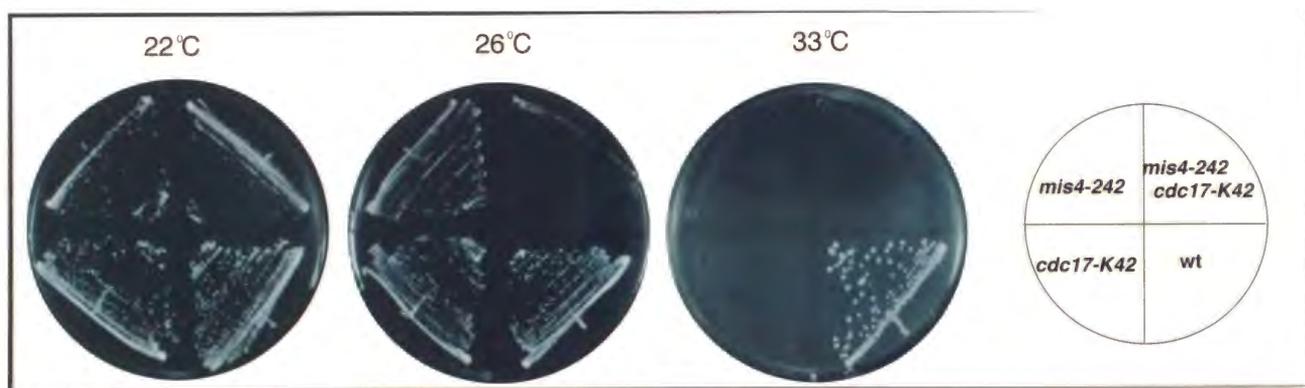


図29 *cdc17-K42* と *mis4-242* は 26°C で合成致死性を示す DNA リガーゼ変異株の *cdc17-K42* と *mis4-242* 変異株の二重変異株では制限温度が低下した。二重変異株は 26°C でコロニー形成できなかった。
mis4-242 変異株、*cdc17-K42* 変異株は 26°C でもコロニー形成できた。

	<i>mis4-242</i>	<i>mis5-268</i>		<i>cdc17-K42</i>		<i>cdc20</i>		<i>cdc6-121</i>		<i>cdc22-C1</i>	
		<i>mis5</i>	<i>mis5mis4</i>	<i>cdc17</i>	<i>cdc17mis4</i>	<i>cdc20</i>	<i>cdc20mis4</i>	<i>cdc6</i>	<i>cdc6mis4</i>	<i>cdc22</i>	<i>cdc22mis4</i>
36℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33℃	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++	-
30℃	+	+	-	+	-	++	++	ND	ND	++	+
26℃	++	++	++	++	-	++	++	++	+	++	++
22℃	++	++	++	++	+	++	++	++	+	++	++

図30 種々のS期欠損変異株との遺伝的相互作用

種々のS期欠損変異株との二重変異株を作成し、各温度でのコロニー形成能を調べた。解析に用いた株は*mis5-268*(MCM6)、*cdc17-K42*(DNAリガーゼ)、*cdc20*(DNAポリメラーゼ ϵ)、*cdc6-121*(DNAポリメラーゼ δ)、*cdc22-C1*(リボヌクレオチド還元酵素)の変異株である。*cdc17-K42*変異株との二重変異株は26℃で合成致死性を示した。また、そのほかのS期欠損変異株とも30℃で合成致死性を示すものがみられた。

-はコロニー形成が見られないことを示し、+は数が増えるとコロニー形成能が強くなることを示す。ND;まだおこなっていない。

見られない

前述したように *mis4* 変異株は様々なDNA複製欠損変異株と遺伝的相互作用を持つ。であるならば *mis4* 変異株はDNA合成そのものに欠損を示すのであろうか？パルスフィールド電気泳動ではDNA複製が完了しない染色体はゲル中に入らずバンドを形成しない (Hennessy et al., 1991)。分裂酵母には三本の染色体があり、パルスフィールド電気泳動によりこれら三本を分離する事ができるが (図31左)、例えば、HUを加えるなどしてDNA複製の完了を阻害したりすると、染色体が泳動されない (図31・wt 4h +HU、図31中央にrDNAのサザンプロットを示す)。*mis4* 変異株の染色体を回収しパルスフィールド電気泳動を行った。制限温度に移して4時間後にはほぼ80%の細胞が致死となっているが、明らかなDNA複製の欠損はみられなかった (図31左・中央)。ただ、制限温度に移してから6時間で泳動度の速いスミアバンドがみられた。図31・右に示すように *cdc17* 変異株では泳動度の速いスミアバンドがみられた。制限温度に移すとDNAニックが修復されず染色体が断片化するのかもしれない。*mis4* 変異株でも何らかの理由で断片化したDNAがある程度蓄積するのかもしれない。

mis4 変異株は分裂中期ですでに姉妹染色分体が分離している

mis4 変異株と *cut9* 変異株の二重変異株を作成し、DAPI染色により表現型を観察したところ非常に興味深い結果が得られた。*cut9* 変異株はAPC/Cyclosomeの変異株であり、サイクリン、Cut2タンパク質を分解できないため、分裂中期に停止し、染色体分離が起こらない (Samejima I et al., 1994, Yamada H et al., 1997)。モデル図32に示すように *cut9* 変異株では制限温度36℃において紡錘体が形成され、三本の凝縮した染色体が一ヶ所に集まって中期プレートを形成し、停止する。*cut9* 変異株、*cut9mis4* 二重変異株を窒素源枯渇によりG1期に停止させた後、36℃へシフトアップすると同時に栄養培地へリリースさせた。*cut9* 変異株では一回目の分裂期にあたるリリース後6時間で図33に示すような分裂中期停止を起こした細胞が蓄積し出した (Samejima I et al., 1994)。一方、*cut9mis4* 二重変異株では異なる表現型が見られた。*cut9mis4* 二重変異株は制限温度36℃では、染色体は凝縮しているのだが、それらが一ヶ所に集まらず散らばったように見えるものが見られ、中には染色体の数が4本以上見られるもの (図33・矢印) もあった。*cut9* 変異株、*cut9mis4* 二重変異株の粗抽出液中のH1キナーゼ活性、Cut2のタンパク質を図34、35に示す。H1を基質として *in*

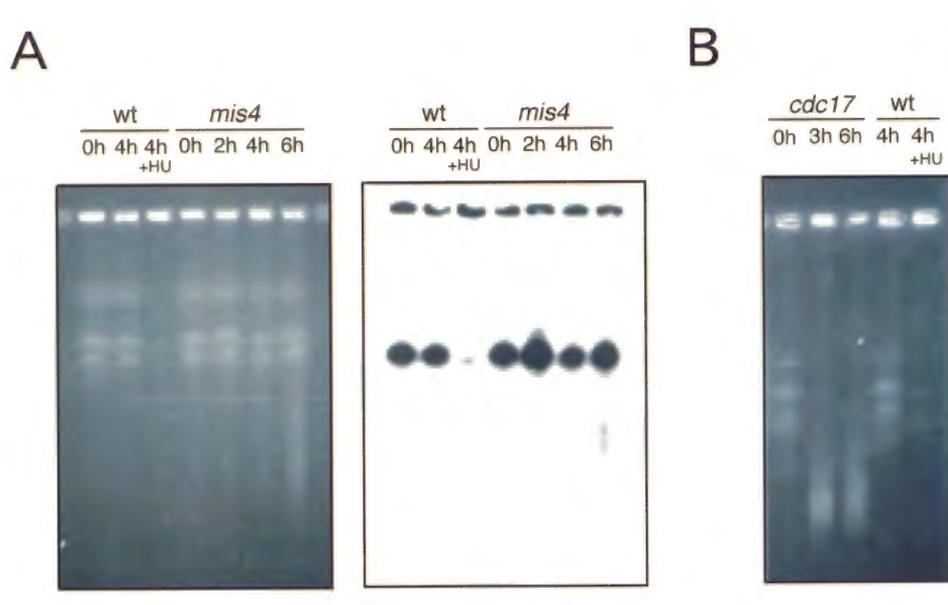
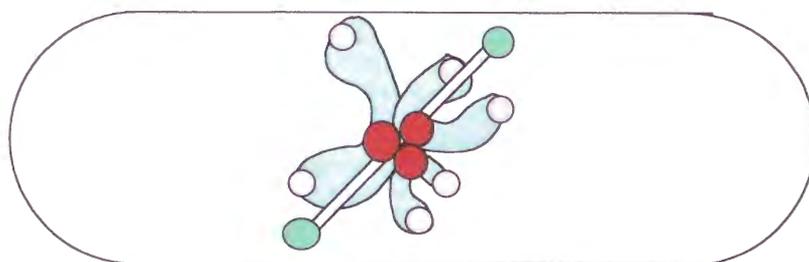


図31 パルスフィールド電気泳動による解析

*mis4*変異株を制限温度にシフトアップしゲノムを回収して泳動した（材料と方法）。

(A) *mis4*変異株においてもゲル内に3本の濃い染色体のバンドが確認できた。コントロールとして、野生株、野生株をヒドロキシウレアを含む培地で培養したものを用いた。野生株をヒドロキシウレアを含む培地で培養したものはゲル内に染色体が入らない(左、レーン3)。左のゲルに対してrDNAをプローブとしてサザン法をおこなった。(B) *cdc17-K42* (DNAリガーゼ) 変異株を制限温度で培養したときのゲノムDNAを泳動した。*cdc17-K42*変異株のゲノムDNAは制限温度で泳動度の早いスミアとして観察された。*mis4*変異株でも制限温度に移して6時間で泳動度の速いスミアバンドが見られた (A、右レーン7)。



- セントロメア領域
- テロメア領域
- 紡錘局体
- DNA
- ▭ 微小管

図32 分裂酵母の分裂中期の細胞模式図

分裂酵母の分裂中期における細胞を模式化した。姉妹染色分体同士は結合したままであり、三本の染色体は凝縮し、そのセントロメア領域が中期紡錘体の中央に中期板と呼ばれるクラスターを形成する。

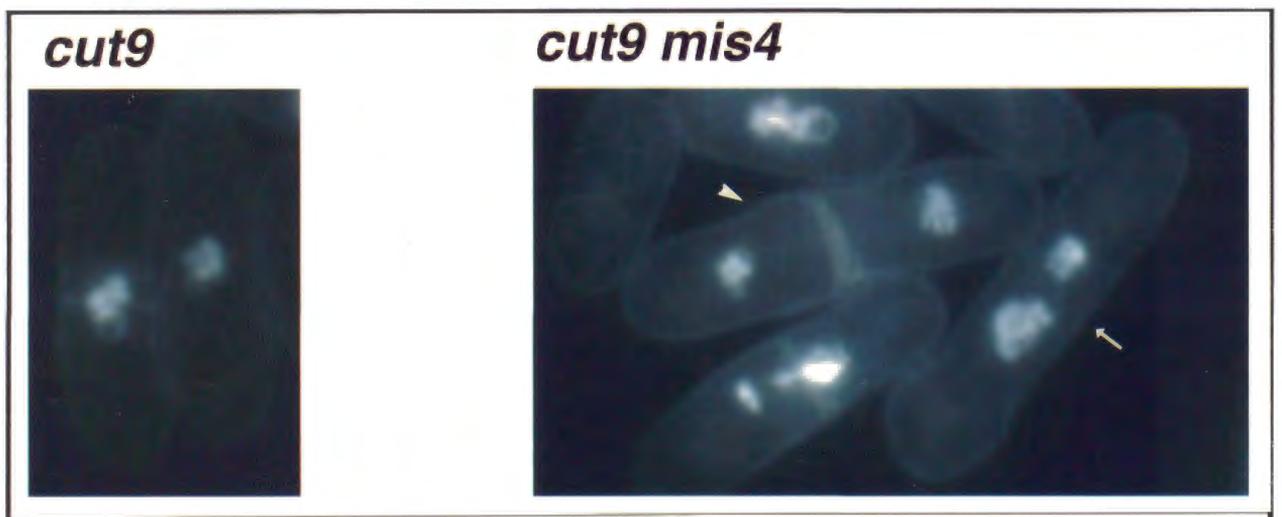


図33 *cut9*変異株および*cut9mis4*二重変異株のDAPI染色像。
窒素源枯渇からのリリース後6時間（左）*cut9*変異株。三本の染色体が一カ所に集まっているのが観察された。（右）*cut9mis4*二重変異株では過凝縮した染色体が散らばったような像が観察された。核分裂を起こしてしまっているもの（矢頭）や、染色体が4本以上観られるのもあった（矢印）。

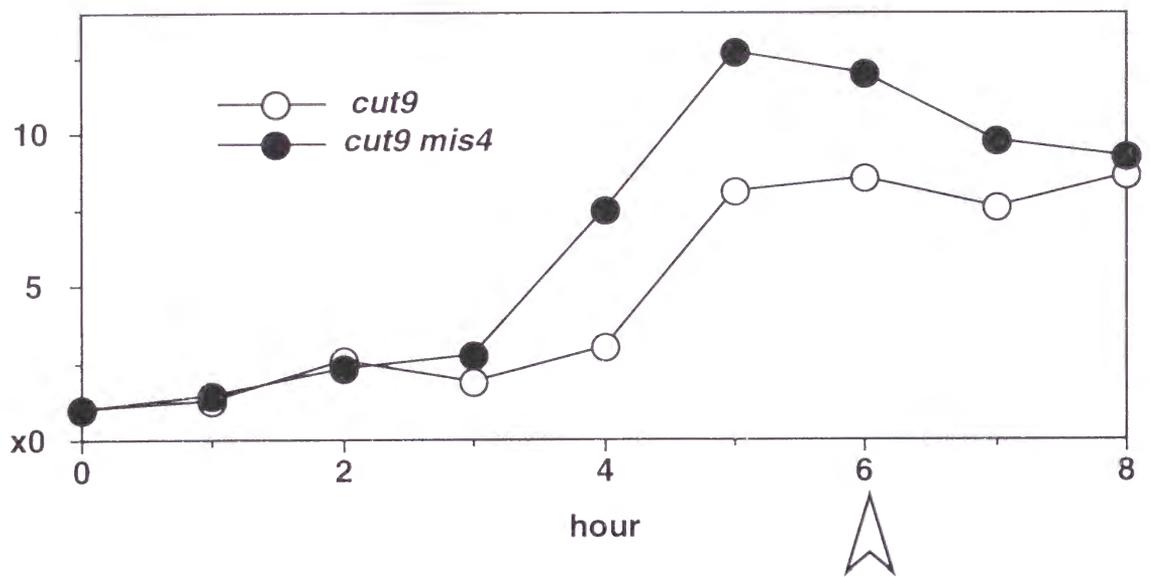


図34 *cut9*変異株および*cut9mis4*二重変異株の細胞粗抽出液中のH1キナーゼ活性
*cut9*変異株及び、*cut9 mis4*二重変異株を窒素源枯渇によりG1期に停止させ、制限温度36°CYPD培
 地へリリースした。リリース後経時的にサンプリングし、各時間における細胞粗抽出液中のH1
 キナーゼ活性を測定した。グラフはH1に取り込まれた³²Pの量を定量したもの。*cut9*変異株
 (○)、*cut9mis4*二重変異株 (●)。リリース後6時間(矢頭)が前述のDAPI染色、後述する
 FISH法で細胞を観察した時間。H1キナーゼ活性は高いままであり、分裂中期に停止したままで
 あると思われる。

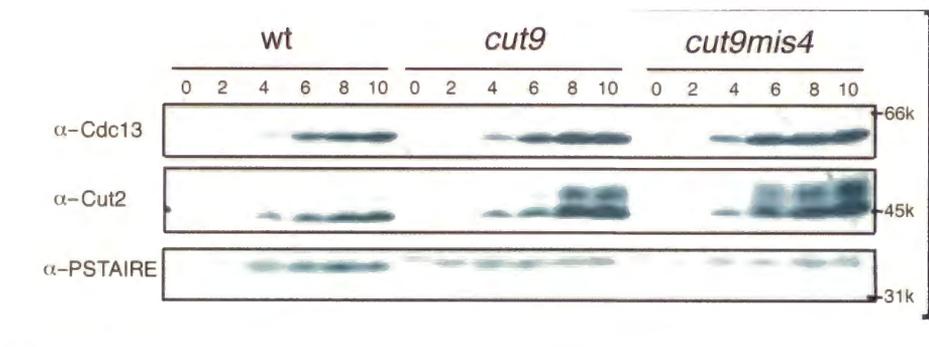


図35 *cut9*変異株および*cut9mis4*二重変異株の細胞粗抽出液に対するウエスタンブロット。

*cut9*変異株および*cut9mis4*二重変異株ともに分裂中期に停止していることを確認するため、分裂中期後期遷移時に分解されるCdc13（サイクリン）、Cut2を検出した。窒素源枯渇後6時間において、*cut9*変異株および*cut9mis4*二重変異株ともにCdc13、Cut2が蓄積しており、分裂中期に停止していると思われる。Cut2ではM期特異的なアッパーバンドが*cut9*変異株と*cut9mis4*二重変異株で観られた。

*vitro*でアッセイすることでCdc2キナーゼの活性を見ることができる。Cdc2キナーゼ活性は分裂中期に最も上昇し、分裂後期に低下する。また、Cut2タンパク質は染色体分離の阻害因子であり分裂中期後期遷移と同時に分解され、その分解が染色体分離に必須であるので (Funabiki H, et al., 1996)、Cdc2キナーゼ活性およびCut2タンパク質は分裂中期の指標として用いることができる。*cut9*変異株、*cut9mis4*二重変異株共にH1キナーゼ活性は高いままであり (通常レベルの10倍)、Cut2タンパク質も蓄積していることから、分裂中期に確かに停止していると思われる。

DAPI染色像の図33・矢印は染色体が4本以上見られる。分裂酵母染色体は三本である。そこで*cut9mis4*二重変異株中では分裂中期に停止させているにもかかわらず姉妹染色分体は分離してしまっているのではないかと考え、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (Fluorescent *in situ* Hybridization) 法を行った (FISH法)。FISH法により細胞形態を保ったまま、染色体の特定の領域を蛍光により視覚化することができる (Uzawa S and Yanagida M 1992)。*cut9*変異株、*cut9mis4*二重変異株に対し、四種類のプローブでFISH法を行った。図36にrDNA配列を、図37にdgdh配列 (動原体反復配列) を、図38にコスミド1228 (二番染色体短腕、セントロメア近傍) を、図39にコスミド1447 (二番染色体短腕テロメア近傍) をプローブとしてFISH法を行った結果を示す。

rDNA配列は三番染色体の両末端に位置する反復配列である。rDNA配列でFISH法を行うと*cut9*変異株では一ヶ所に固まった像として見える。一方*cut9mis4*二重変異株ではrDNA配列シグナルは二つの塊として見えた (図36)。

dgdh配列をプローブとして用いると分裂酵母の3本の染色体全ての動原体領域を視覚化できる (図37)。*cut9*変異株では3本の染色体の動原体が中期板を形成し、一ヶ所に集まるため、これらは一点のシグナルとして観察された。(Saitoh S et al., 1997) 一方*cut9mis4*二重変異株ではdgdh配列のシグナルはいくつかの散らばった点として観察され、4-5点のシグナルが観察されるものもあった。この結果は*mis4*変異株では分裂中期に停止させても動原体領域が時期尚早に分離してしまうことを示唆している。

さらにコスミド1228、コスミド1447の二番染色体短腕のセントロメア近傍、テロメア近傍配列のシングルプローブを用いてFISH法を行った (図38、39)。*cut9*変異株では姉妹染色分体が分離しないので一点のシグナルしか観察されなかった。しかし、*cut9mis4*二重変異株では50%以上の細胞で二点のシグナルが観察された。

これら一連の結果をまとめると図40のようになる。野生株では分裂中期では姉妹染色分体同士

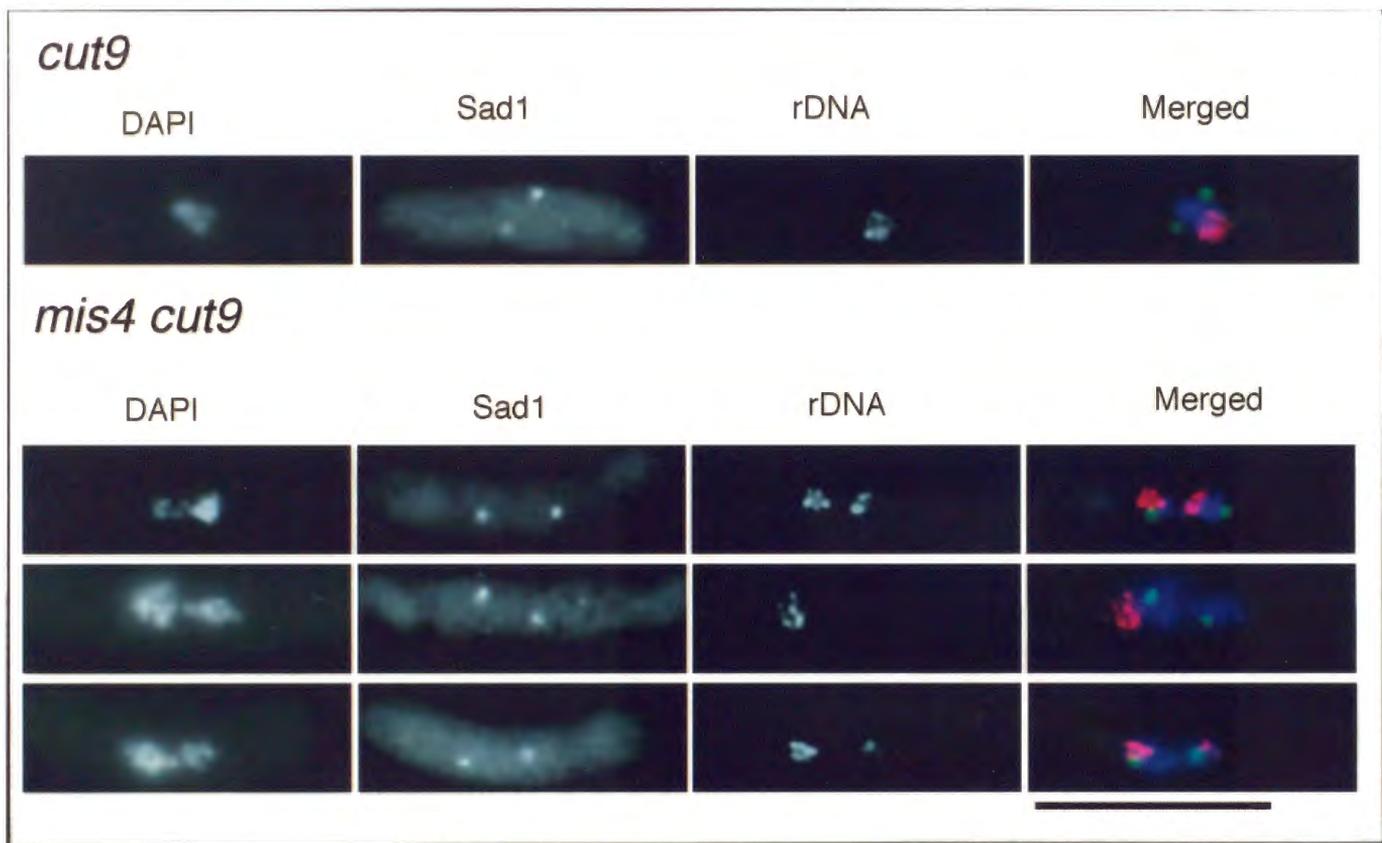


図36 *cut9*変異株および*cut9mis4*二重変異株に対するrDNAをプローブとしたFISH（蛍光 in situ ハイブリダイゼーション）。

分裂酵母第三染色体末端であるrDNA配列をプローブとしてFISH法を行った。左からDAPI染色像、抗Sad1（SPBマーカー）抗体染色像、rDNAのFISHシグナル、重ね合わせた像。青；DNA、緑；Sad1、赤；rDNA。*cut9*変異株ではrDNAのFISHシグナルは一カ所に固まって観察されたが、*cut9mis4*二重変異株では約半分の細胞で二カ所に分かれてしまっている像が観察された。barは10 μ m。

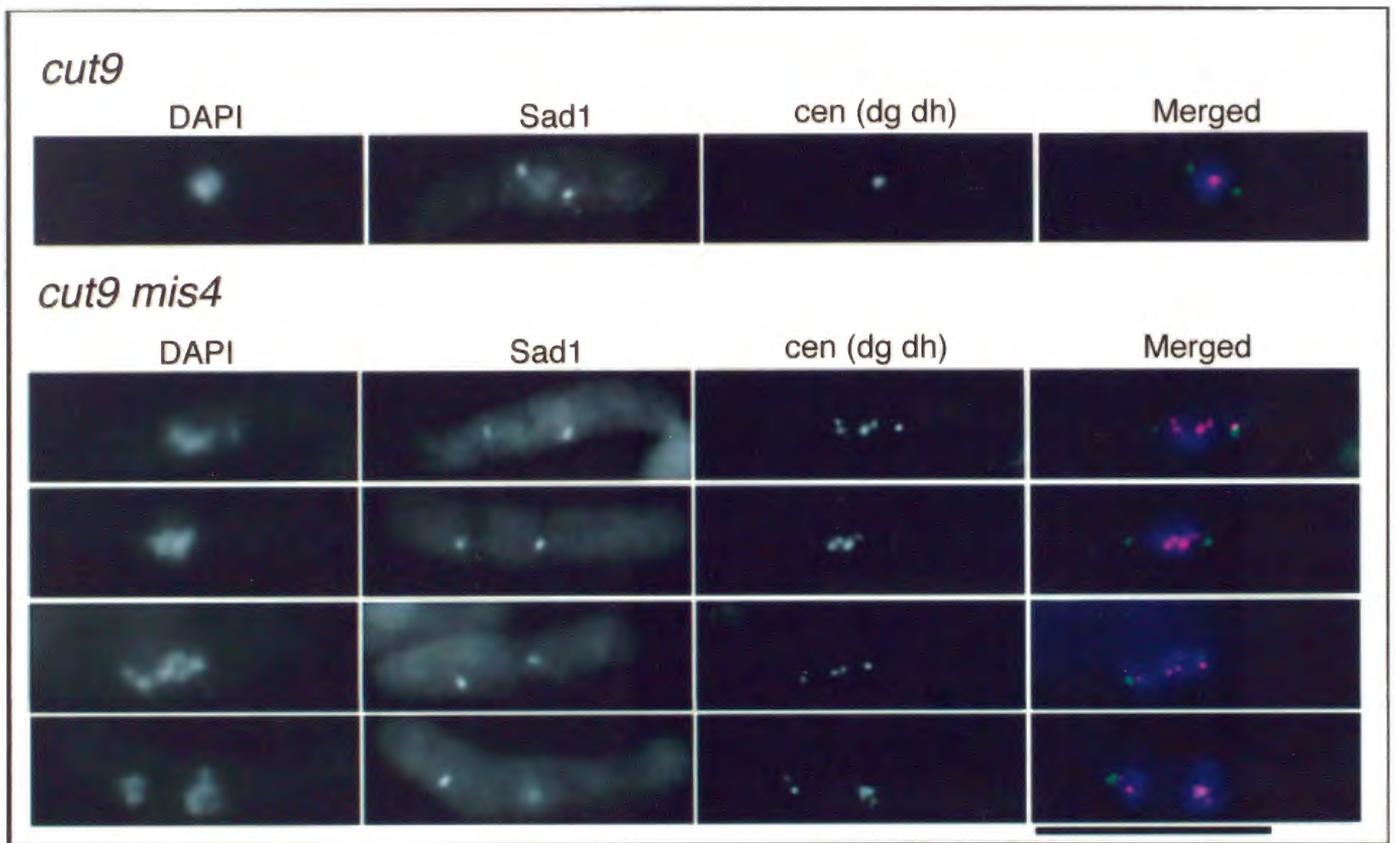


図37 *cut9*変異株および*cut9mis4*二重変異株に対するdg dh 配列をプローブとしたFISH
 分裂酵母セントロメア反復配列であるdg dh 配列をプローブとしてFISH法を行った。左から
 DAPI染色像、抗Sad1 (SPBマーカー) 抗体染色像、dg dh 配列のFISHシグナル、重ね合わせた
 像。青；DNA、緑；Sad1、赤；dg dh 配列。*cut9*変異株ではdg dh 配列のFISHシグナルは中期板
 を形成するため一カ所に固まって観察されたが、*cut9mis4*二重変異株ではFISHシグナルが散ら
 ばって観察された。分裂酵母の染色体は3本であるが、中には4点以上のシグナルが見えるのも
 あった。barは10 μ m。

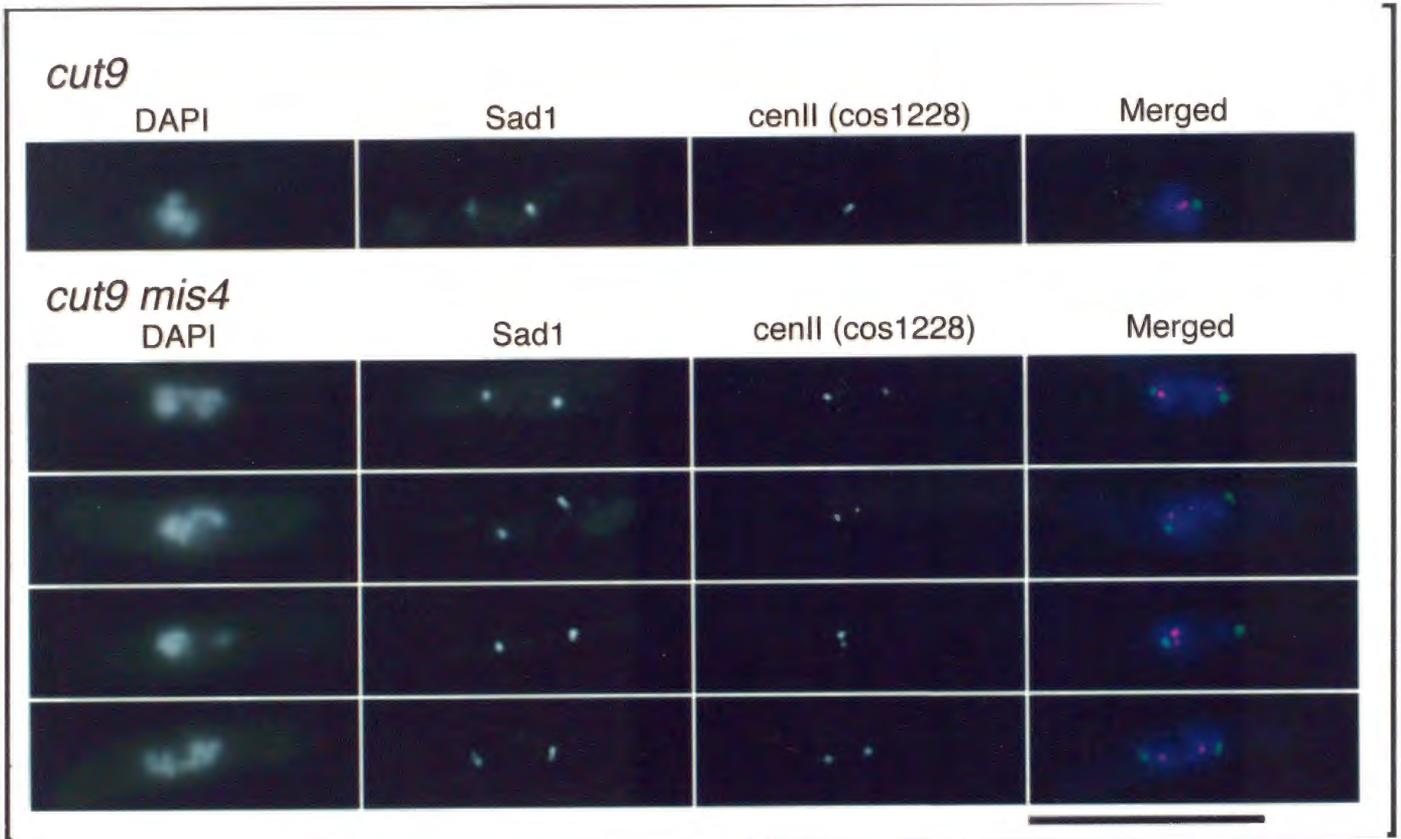


図38 *cut9*変異株および*cut9mis4*二重変異株に対するコスミド1228をプローブとしたFISH

分裂酵母二番染色体短腕セントロメア近傍配列であるコスミド1228をプローブとしてFISH法を行った。左からDAPI染色像、抗Sad1 (SPBマーカー) 抗体染色像、コスミド1228のFISHシグナル、重ね合わせた像。青; DNA、緑; Sad1、赤; コスミド1228。*cut9*変異株では姉妹染色分体は分離しないのでコスミド1228のFISHシグナルは一点であったが、*cut9mis4*二重変異株ではFISHシグナルが二点観察された。barは10 μ m。

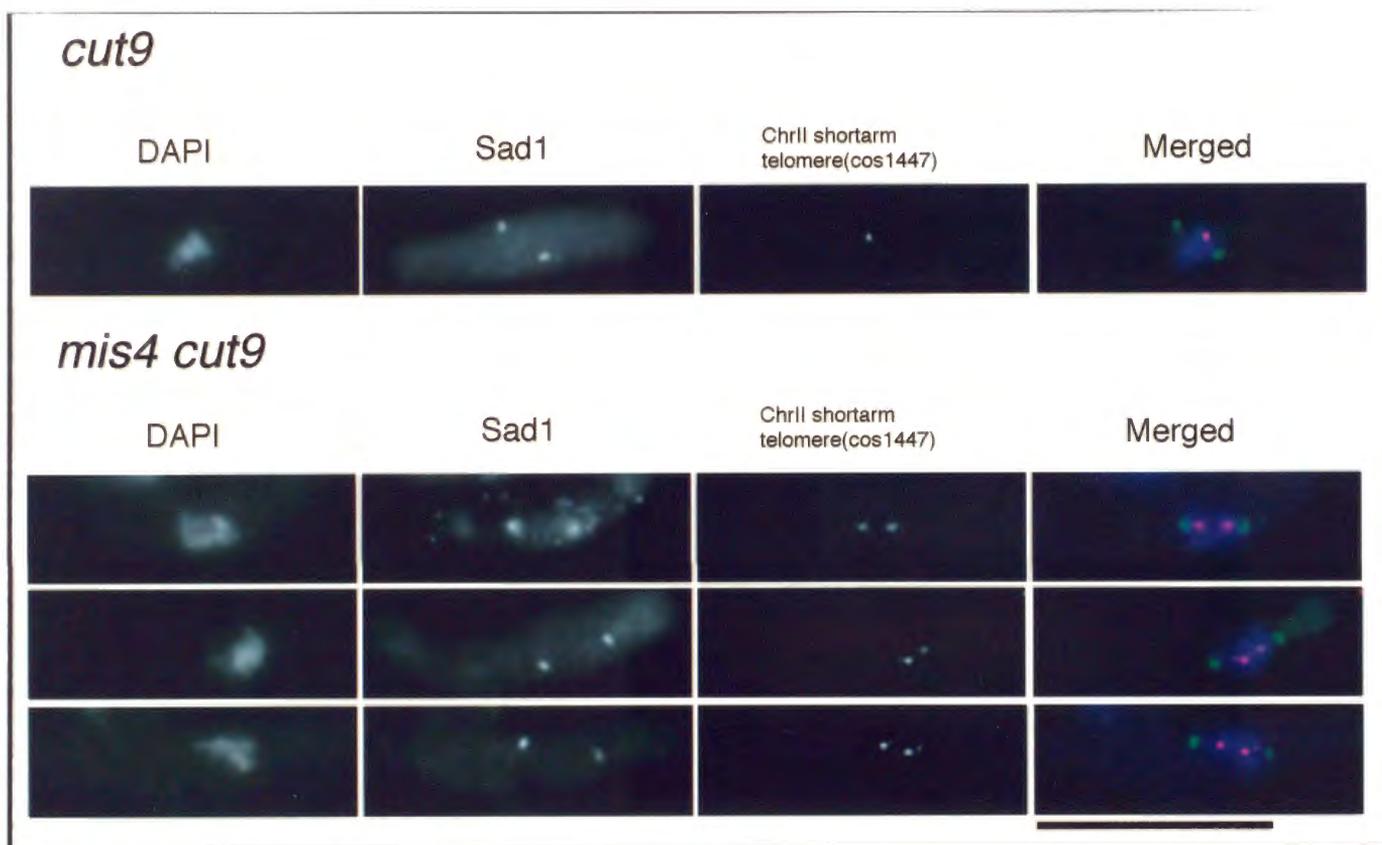


図39 *cut9*変異株および*cut9mis4*二重変異株に対するコスミド1447をプローブとしたFISH
 分裂酵母二番染色体短腕テロメア近傍配列であるコスミド1447をプローブとしてFISH法を行った。
 左からDAPI染色像、抗Sad1 (SPBマーカー) 抗体染色像、コスミド1447のFISHシグナル、重ね合わ
 せた像。青；DNA、緑；Sad1、赤；コスミド1447。*cut9*変異株では姉妹染色分体は分離しないので
 コスミド1447のFISHシグナルは一点であったが、*cut9mis4*二重変異株ではFISHシグナルが二点観察
 された。barは10 μ m。

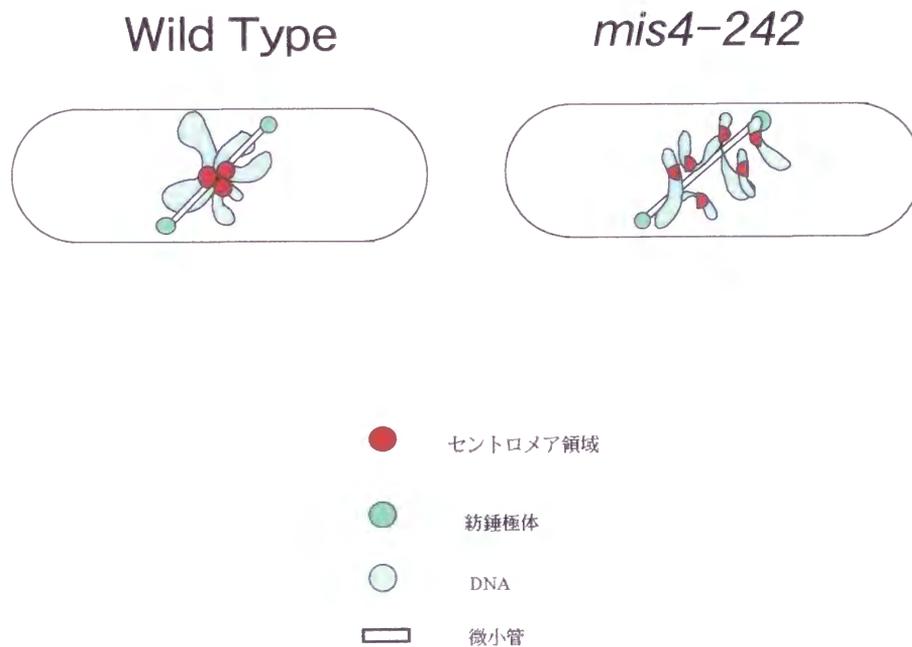


図40 *mis4*変異株では分裂中期に停止させても姉妹染色分体が分離してしまう。野生株では分裂中期に停止させても姉妹染色分体は分離しないが、*mis4*変異株では分裂中期に停止させても姉妹染色分体は分離してしまう。このとき、セントロメア近傍配列だけでなく、テロメア近傍配列も分離しているようだ。

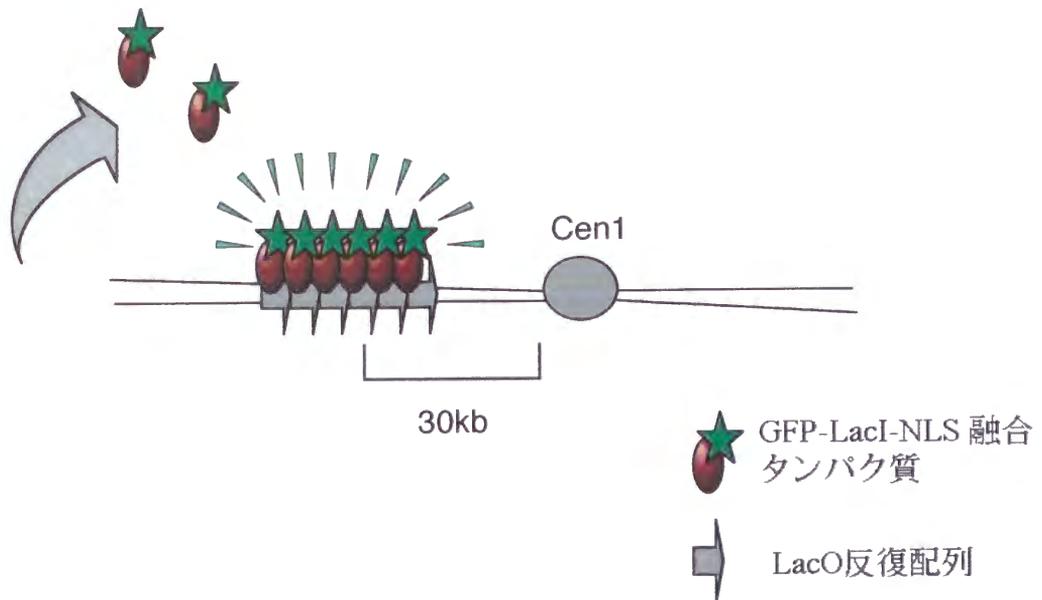
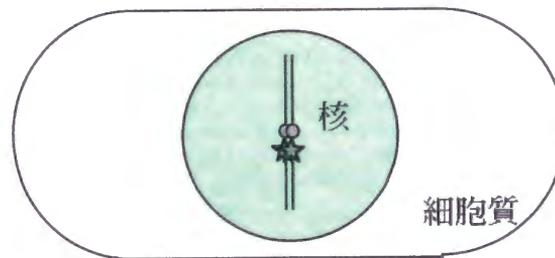
は結合したままで分離しない。しかし*mis4*変異株では分裂中期に停止させているにも関わらず、姉妹染色分体が分離してしまう。染色体の分離はセントロメア近傍領域だけでなくテロメア近傍領域、アーム領域（データは示さない）でも起こっており、おそらく染色体全域にわたって起こっているものと思われる。

*mis4*変異株は複製後間期において時期尚早な染色体分離が起こってしまう

*mis4*変異株における姉妹染色分体の時期尚早な分離はどの時期から起こっているのだろうか。間期から既に分離しているのではないかという疑問に答えるべく以下のようなシステムを用いて実験をおこなった。

分裂酵母MKY7A4株を用いると一番染色体セントロメア近傍配列（動原体領域から30kb離れた*lys1⁺*遺伝子座位）をGFPにより視覚化できる（図41、この株を*lys1⁺*-GFPと呼ぶ）。クラゲ蛍光タンパク質であるGFPは青色の励起光を当てると緑色の発色光を出し、目的のタンパク質との融合遺伝子を発現させることで生細胞中での局在を検出することができる（Nabeshima et al., 1995）。*lys1⁺*-GFP野生株では間期において薄い核染色と、*lys1⁺*遺伝子座位である核内の強い1点のシグナルを顕微鏡下で見ることができる（図41B、42C）（Nabeshima et al., 1998, Goshima et al., 1999）。この株に*mis4*変異を掛け合わせにより導入した。*lys1⁺*-GFP野生株および*lys1⁺*-GFP *mis4*変異株をそれぞれ窒素源枯渇によりG1期に停止させ、制限温度33℃、EMM2培地でリリースし、その後経時的に*lys1⁺*遺伝子座位のGFPシグナルを、非固定で観察した。*lys1⁺*-GFP野生株では*lys1⁺*遺伝子座位のGFPのシグナルはリリース後6時間まで一点であった（図42C）。一方*lys1⁺*-GFP *mis4*変異株ではリリース後2時間では*lys1⁺*遺伝子座位のGFPシグナルは1点であったが、リリース後4時間で30%の細胞で*lys1⁺*遺伝子座位のGFPシグナルが2点に分離した像が見られた。*mis4*変異株におけるDNA含量を図42Aに示した。DNA合成はリリース後4時間から6時間にかけて起こっていた。リリース後8時間でM期の細胞が見え出すこと、リリース後4時間、6時間では細胞長が7マイクロメートル程度の細胞でもGFPシグナルが2点見えていることから、二点に見えるこれらの細胞はDNA複製直後であり、まだ間期にあると思われる。2点の*lys1⁺*-GFPシグナルが見えた割合を生存率と共に図42Bに示した。*lys1⁺*-GFPシグナルが2点に見える細胞が増えるのに従い生存率は低下した。

これらの結果をまとめると以下ようになる。*mis4*変異株ではDNA複製終了後、姉妹染色分体

A**B****図41 染色体の可視化**

(A) 染色体の特定領域を可視化するため、分裂酵母細胞の一番染色体セントロメア近傍の *lys1⁺* 遺伝子座位に大腸菌の LacO 配列をタンテムにつなげたものを挿入、さらに LacO 配列に結合することのできる GFP-LacI-NLS (GFP と大腸菌 LacI と NLS <核移行シグナル> の融合タンパク質) を発現させた株 (ここでは *lys1⁺-GFP* と呼ぶ) を用いた (Nabeshima K et al., 1998)。(B) 顕微鏡下では下の模式図のように核が薄く光り核内の一点が明るく光る像が観察できる。野生株では姉妹染色分体は非常に近接しており、*lys1⁺-GFP* シグナルは一点しか見えない。

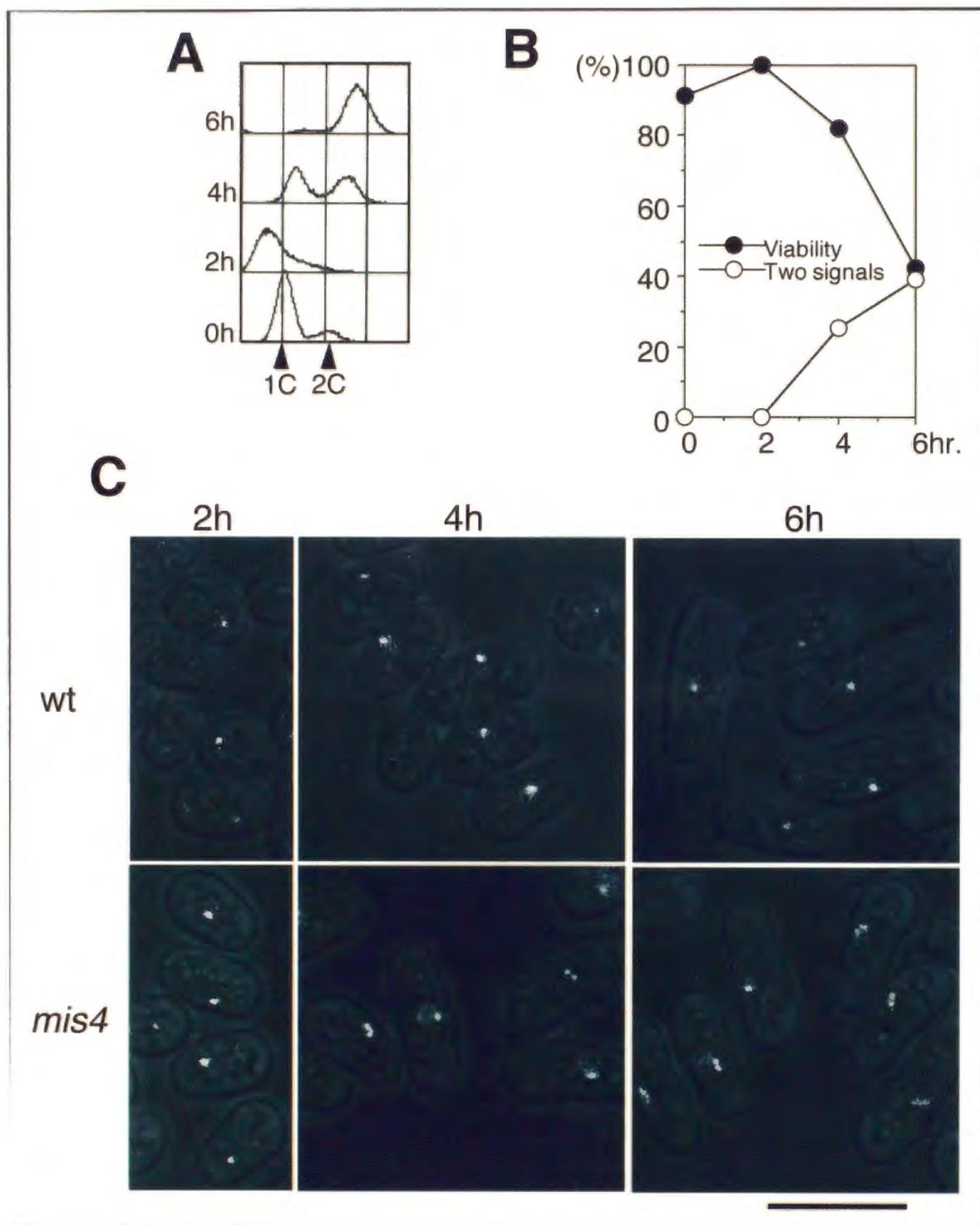


図42 *mis4*変異株では姉妹染色分体が間期ですでに分離している

*mis4*変異株に $lys1^+$ -GFPを掛け合わせにより導入した($lys1^+$ -GFP *mis4*変異株)。細胞を窒素源枯渇により、G1期に停止させ、制限温度33℃へリリースした。(A) $lys1^+$ -GFP *mis4*変異株のDNA含量の推移。リリース後2-4時間でDNA合成が起っていた。(B) $lys1^+$ -GFP *mis4*変異株の生存率(●)、 $lys1^+$ -GFPのシグナルが二点見えた細胞の割合。 $lys1^+$ -GFPのシグナルが二点見えるのに伴い生存率が低下した。(C) 野生株、*mis4*変異株内での $lys1^+$ -GFP染色像。野生株ではリリース後6時間でも一点しか見えない。*mis4*変異株ではリリース後4時間から二点のシグナルが見えた。分裂期のタイミングはリリース後8時間目と思われる(材料と方法)。barは10μm。

が（ここでは*lys1+*遺伝子座位をマーカーとした）分離してしまうことが明らかとなった。また、これらの細胞は間期にあると思われるため、紡錘体は形成されていない。*mis4*変異株で見られる時期尚早な染色体分離は紡錘体の張力により分離したものではないだろう。姉妹染色分体間をつなぎ止められないためと思われる。また、生存率は姉妹染色分体の分離が起こると並行して低下した。

Mis4はクロマチン領域に局在する

Mis4タンパク質の局在を決定した。これまでの結果からMis4タンパク質は核、あるいはクロマチン結合タンパク質であることが予想される。Mis4タンパク質のカルボキシル末端にGFPを付加させた融合遺伝子をゲノムに組み込み、置換した（図43）。Mis4-GFP融合タンパク質は*mis4+*遺伝子破壊株を相補するので機能は維持していると思われる。26℃で培養したMis4-GFP組み込み体を固定せず共焦点レーザー顕微鏡で観察した（図44）。多コピーでMis4-GFPを導入し観察したのも図44（左上）に示す。多コピーでは核全体が染色された。Mis4-GFP組み込み体（単コピー）では核内が薄く染色され、さらに3点から5点の複数のドット状のシグナルが観察された。これらの大部分のドットは核内でクラスターを作っていたが、一部のドットは核の辺縁部に離れた場所に観察された（↓印）

次にこれらの局在をDNAとの二重染色で観察した（図45）。分裂酵母では間期ではクロマチン領域は核内の半球状の領域を占め、残りの半球領域は核小体であることが分かっている。また、クロマチン領域から核小体領域へ突出する形でrDNA反復配列が突き出している（図45B）。Mis4-GFPはクロマチン領域が薄く染色され、クラスターを作っている明るいドットはちょうどrDNA領域と重なった。分裂後期の細胞（図45A・上から2段目、3段目）でもクロマチン領域が染色され、分裂前期で染色体が凝縮して停止する*nda3*変異株中でもドット状の染色が確認された（図46）。Mis4タンパク質は細胞周期を通じてDNA領域に局在するようである。

分裂酵母*rad21*変異株では時期尚早な染色体分離が起こる

さて、これまでに*mis4*変異株では複製された姉妹染色分体同士をつなぎ合わせるができなことが明らかとなった。出芽酵母においてコヒーシンと呼ばれるタンパク質複合体が姉妹染色

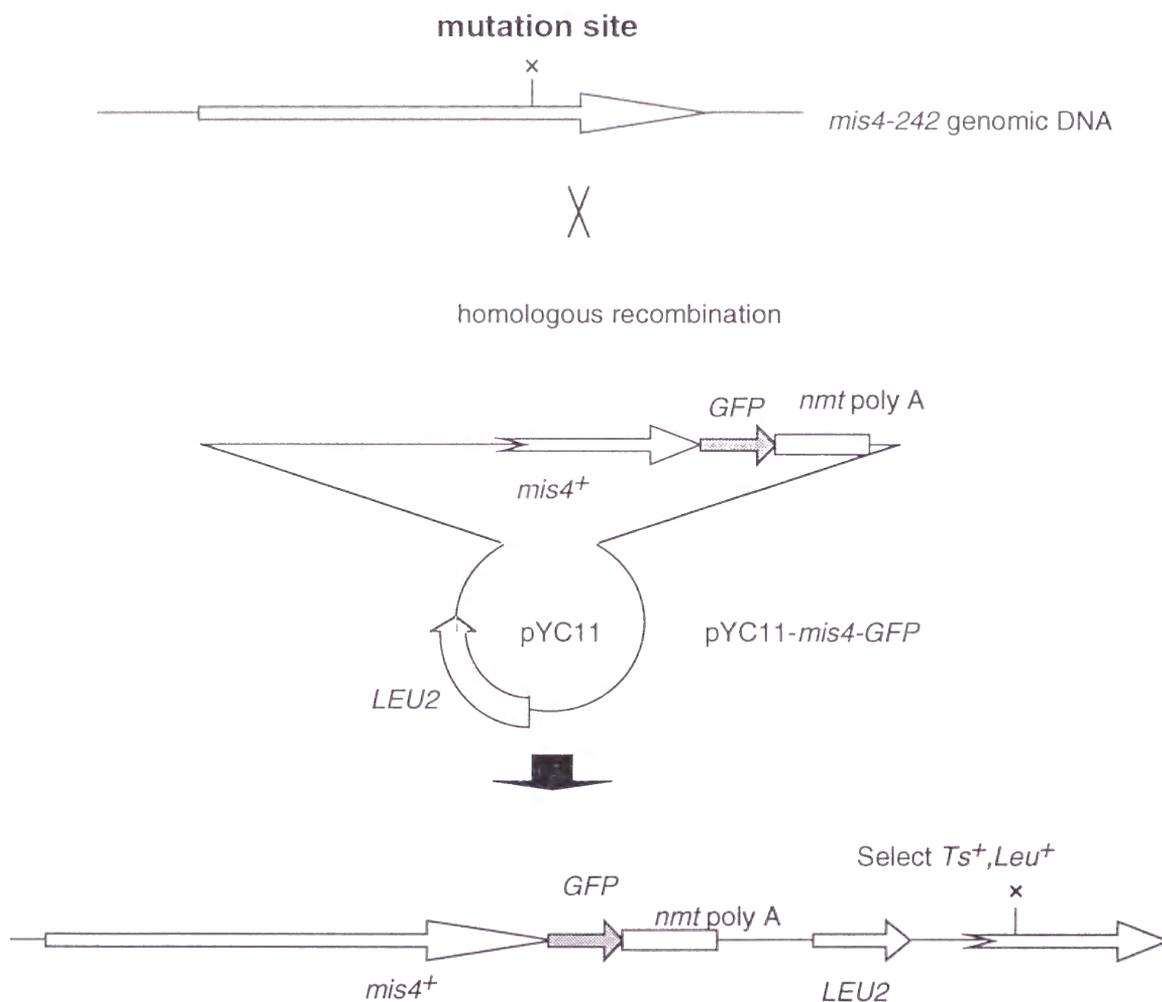


図43 Mis4-GFP組み込み体の作成

単コピーでMis4の局在を観察するため、*mis4⁺-GFP*融合遺伝子をゲノムに組み込んで観察した。組み込み体の作成の戦略を示す。変異部位がC末にあるため、真ん中に示すような*mis4⁺*遺伝子のカルボキシル末端にGFPを付加させた断片をインテグレーション用pYC11ベクターに挿入したプラスミドを作成した。このプラスミドを*mis4*変異株に形質転換したのち、温度感受性を相補し、かつロイシン非要求性となるものを選択した。得られた株は下段に示すように単コピーで*mis4⁺-GFP*が組み込まれていると思われる。

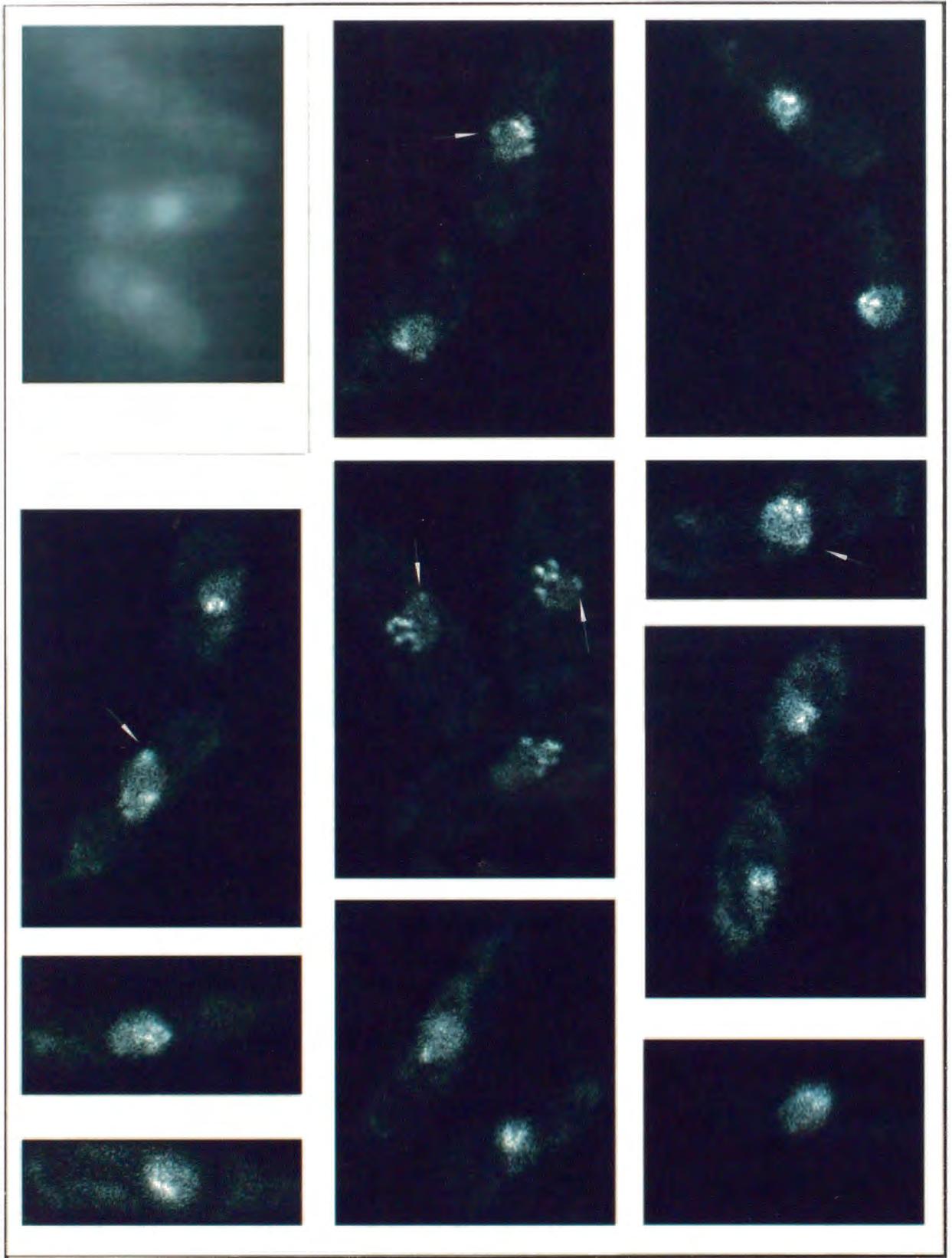
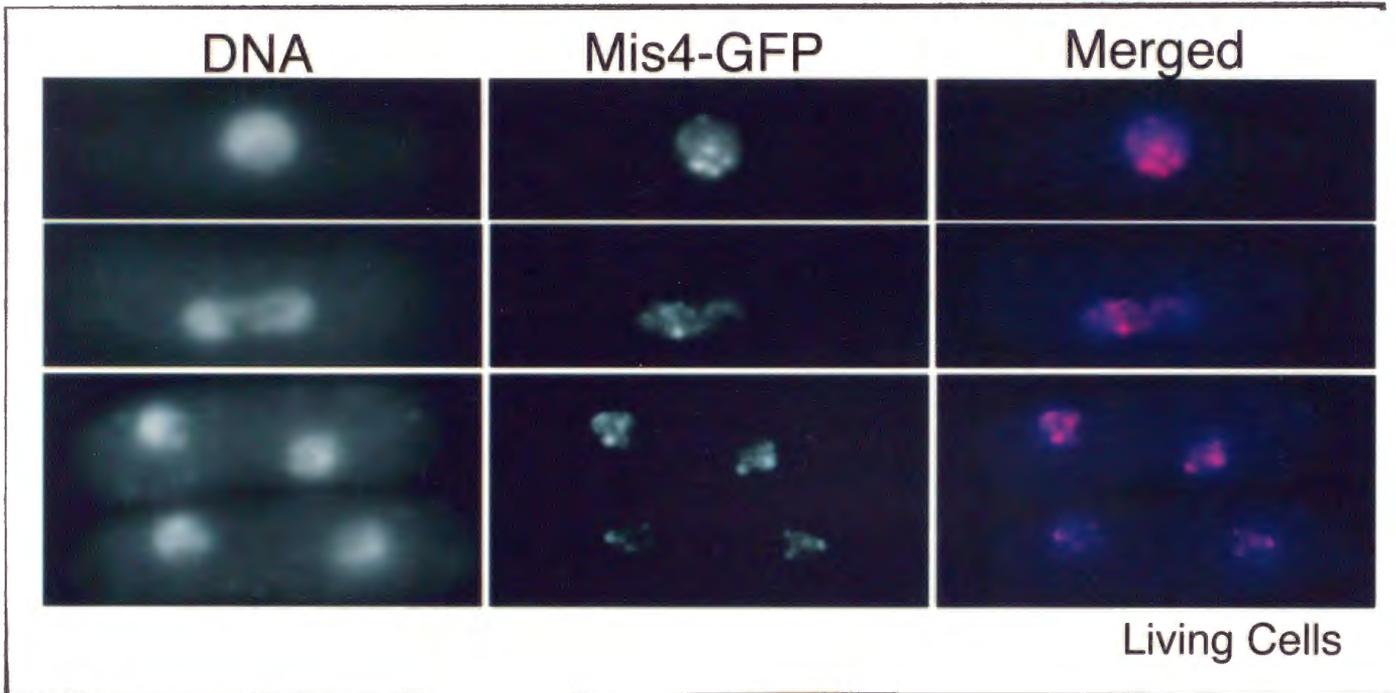


図44 GFPによるMis4の局在の観察

(左上) 多コピーで*mis4⁺-GFP*融合遺伝子をもたせたもの。核と思われる細胞の中央部分が一様に染色された。

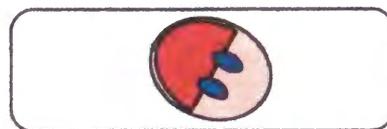
(下段) *mis4⁺-GFP*をゲノムに組み込んだ株を観察した像。核と思われる細胞の中央部分がドット状に染色された。これらのドットは主にクラスターを形成していた。またそのほかにも付随して一点観察された(矢印)。

A



分裂酵母模式図

B



-  核
-  DNA領域
-  rDNA領域

図45 DNAとGFPによる二重染色

(A) *mis4⁺-GFP*組み込み体のDNAをHoechst33342で染色することで、生きたまま二重染色して観察した。上段：間期細胞。中段および下段：分裂後期細胞。(中央) DNA領域。(左) Mis4-GFPの観察像。(右) GFP、DNAの染色像を重ね合わせたもの。GFPのシグナルはとりわけrDNA領域と一致する。またその他に、核辺縁部に点がさらに染色される細胞も観察された。

(B) 分裂酵母模式図。分裂酵母ではDNA領域は半球状のクロマチン領域とクロマチン領域から突き出た形のrDNA領域として観察される。

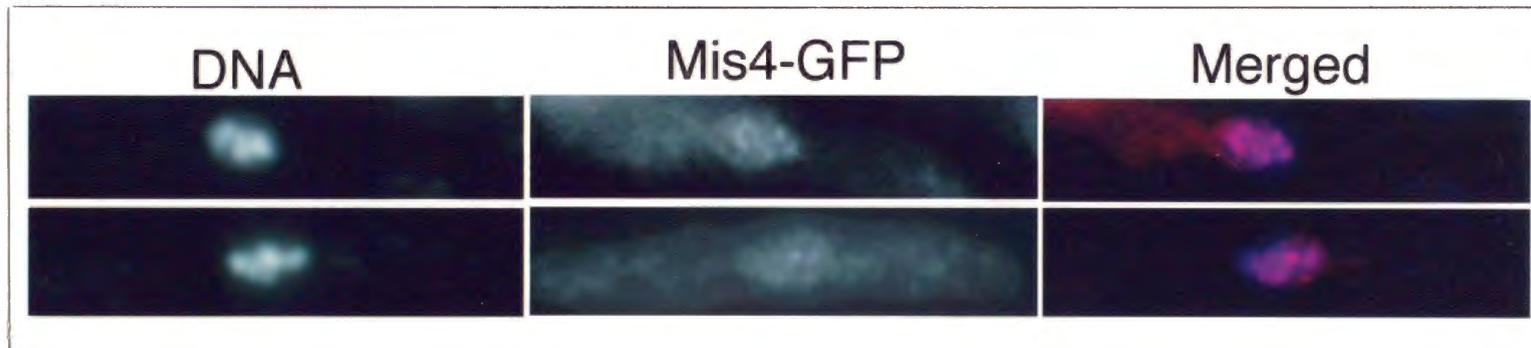


図46 分裂期停止変異株におけるMis4の局在

分裂期に停止する $nda3$ 変異株 (β -チューブリン欠損変異株) におけるMis4の局在を観察した。(左) DNA、(中) Mis4-GFP。染色体上にドット状のシグナルが観察された。

分体間の結合に必須であることが明らかにされた (Michaelis C, et al., 1997, Guacci V, et al., 1997)。コヒーシサブユニットのうち *Scc1* が細胞周期における制御をうけているらしい。*Scc1* と最も相同性の高い分裂酵母タンパク質は *Rad21* タンパク質である (Birkenbihl RP, et al., 1992)。*rad21⁺* は必須遺伝子であり、その変異株は核分裂異常の表現型を示すこと (Tatebayashi K et al., 1998)、紫外線感受性を示すことが報告されている (Birkenbihl RP, et al., 1992)。そこで分裂酵母 *Rad21* タンパク質が姉妹染色分体間の結合に必要かどうかを調べた。*rad21-K1* は温度感受性変異株であり、26℃では生育可能であるが36℃では生育できない (池田日出男先生より 供与。Tatebayashi K et al., 1998)。前述した *lys1⁺-GFP* 株に *rad21-K1* 変異をかけ合わせにより導入し制限温度36℃で観察した (図47)。野生株では36℃にシフトアップしても2点の *lys1⁺-GFP* シグナルを持つ細胞の割合は増加しない (図47C)。*rad21-K1 lys1⁺-GFP* 株細胞では2点の *lys1⁺-GFP* シグナルはシフトアップ前は10%なのに対し、制限温度にシフトアップしてから2時間後には22%の細胞で観察された (図47C)。また、それぞれの細胞長で2点のシグナルが観察された頻度を図47Bにプロットした。明らかに間期と思われる短い細胞で2点のシグナルが観察された。この結果から分裂酵母 *Rad21* タンパク質も姉妹染色分体間の結合に必要であることが明らかとなった。

*rad21*変異株はS期に致死となる

*mis4*変異株はG1期から制限温度にシフトアップするとS期に致死となる。それでは*rad21*変異株ではどうであろうか。*rad21*変異株を窒素源枯渇によりG1期に停止させ、栄養培地へリリースすると同時に36℃へシフトアップした (図48)。S期はDNA含量が倍加する3時間目から4時間目に当たると思われる (図48A)。*rad21*変異株、*mis4*変異株ともに生存率はリリース後3-4時間後に低下した (図48B)。また*rad21*変異株のDAPI染色像は*mis4*変異株と非常によく似ており、凝縮した染色体が散らばったような表現型を示した (図48C)。この表現型は一回目のM期に現れた。従って*rad21*変異株も*mis4*変異株同様、S期に致死となり、その後続くM期に核分裂異常の表現型を示すと思われる。

Mis4とRad21の間に物理的相互作用はみられない

Mis4、Rad21はともに姉妹染色分体間の結合に必要であり、S期に機能することが明らかとなっ

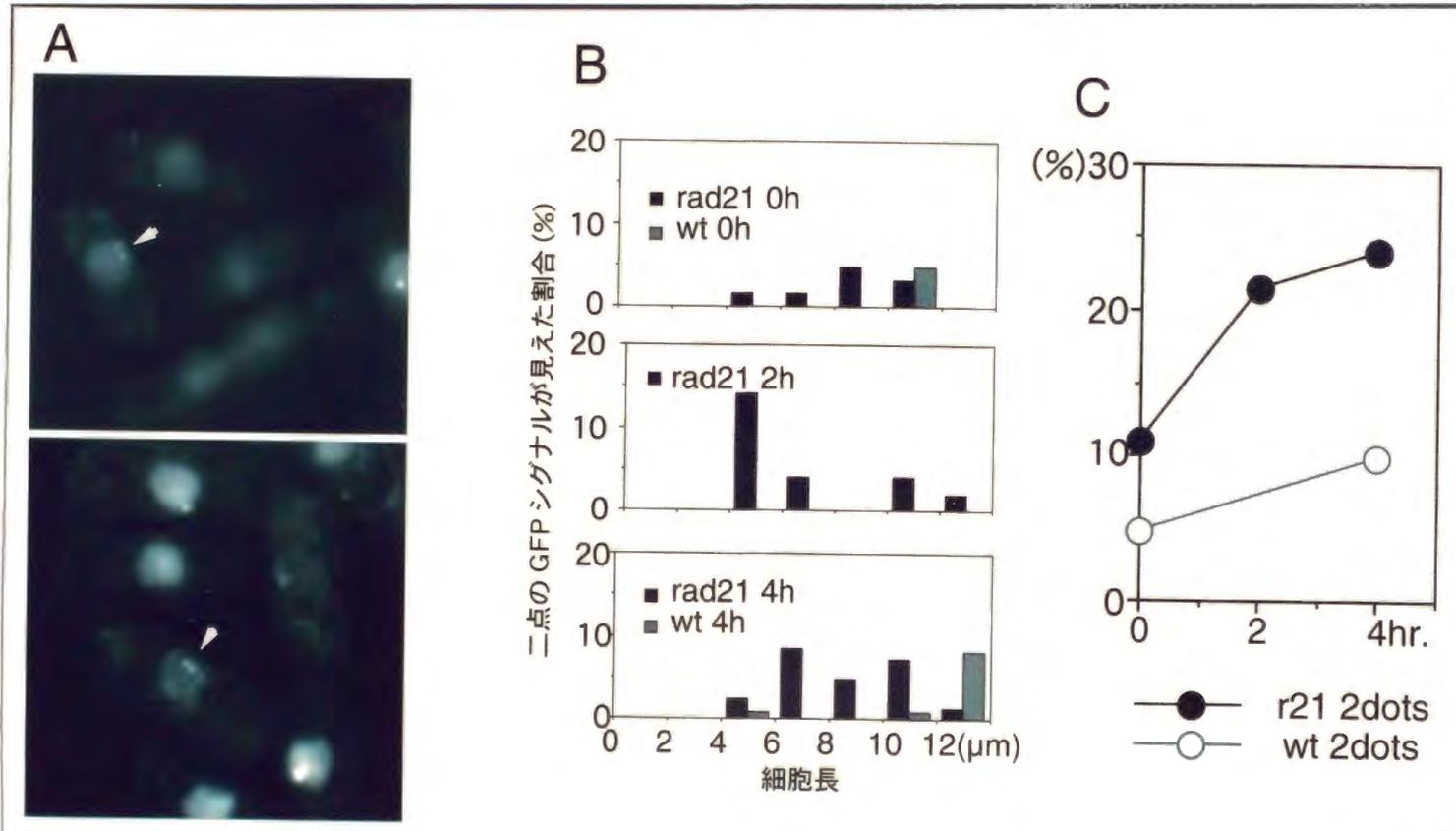


図47 *rad21*変異株では時期尚早な染色体分離が起こる

lys1⁺-GFP株（ここではMKY-7B8を用いた。材料と方法参照、Goshima G et al., 1999）に*rad21*変異をかけあわせにより導入した（*lys1⁺*-GFP *rad21*変異株）。非同調*lys1⁺*-GFP *rad21*変異株を36°Cにシフトアップした。（A）*lys1⁺*-GFP *rad21*変異株。36°C 2時間。短い、間期と思われる細胞で2点の*lys1⁺*-GFPシグナルが見られた（矢印）。（B）それぞれの細胞長において2点の*lys1⁺*-GFPシグナルが見えた細胞の割合。（全体に対する割合。）（C）2点の*lys1⁺*-GFPのシグナルが見えた割合を時間経過と共にプロットした。

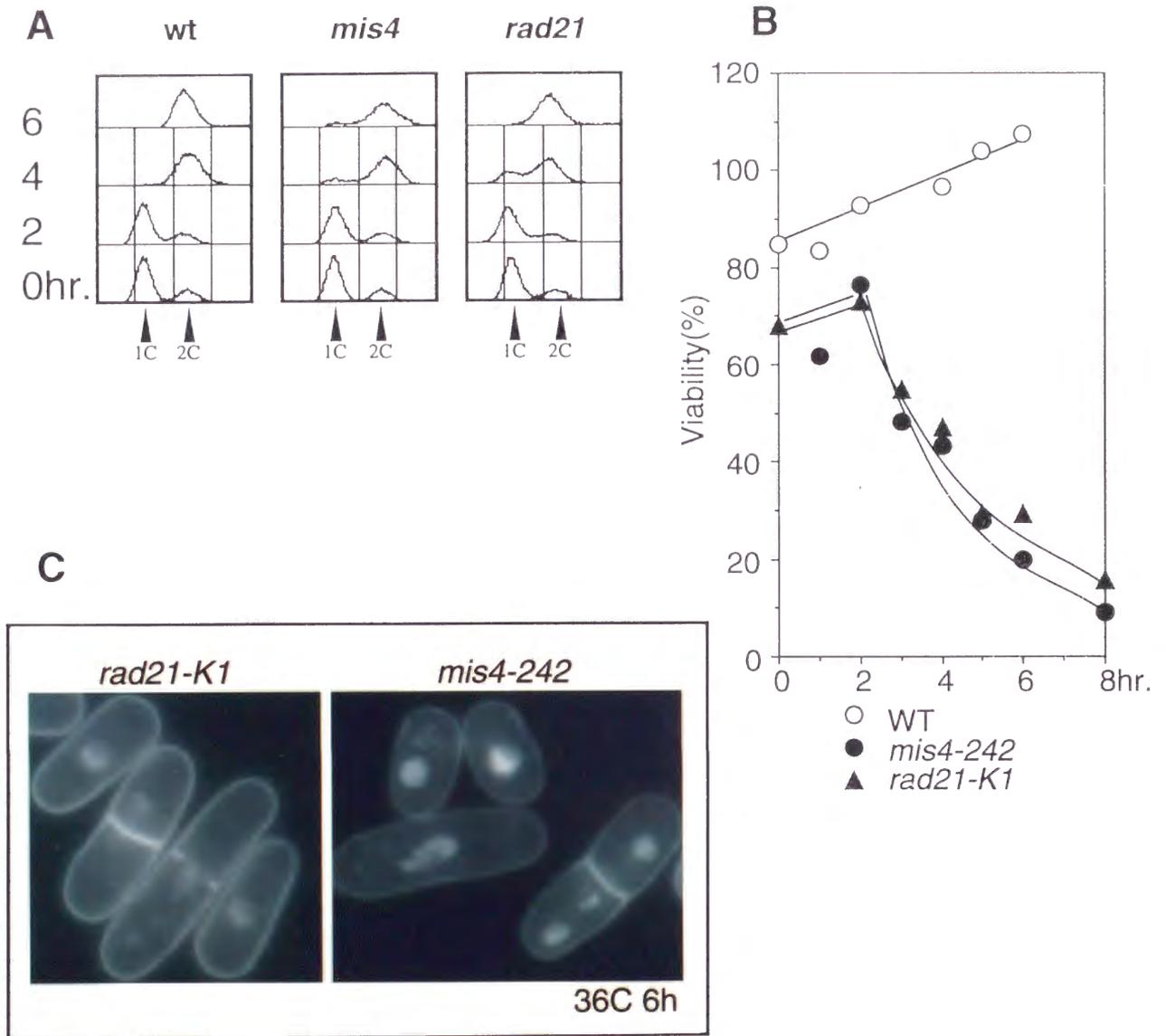


図48 *rad21*変異株はS期に致死となる。
*rad21*変異株、*mis4*変異株、野生株を窒素源枯渇によりG1期に停止させた後、制限温度へとリリースした。(A) FACSによるDNA含量の測定。S期はリリース後3時間から4時間にかけて起こっていた (B) 生存率。リリース後3時間から急激に低下した。(C) *rad21*変異株と*mis4*変異株のリリース後6時間目のDAPI染色像。

た。それではMis4とRad21は物理的な相互作用をするのであろうか。出芽酵母、アフリカツメガエルではXRad21/Sccl1はXSmc1/Smc1、XSmc3/Smc3とともにコヒーシン (Cohesin) と呼ばれる複合体を形成することが分かっている (Losada A et al., 1998, Toth A et al., 1998)。分裂酵母においてもRad21がPsm3 (Smc3相同タンパク質) と結合することが免疫沈降実験により明らかとなっている (朝長、村上未発表データ)。Mis4とRad21、Mis4とPsm3の物理的相互作用の可能性を免疫沈降実験により調べてみた (図49)。Mis4-myc、Rad21-HA (Rad21のC末端にHAを付加させた組み込み体・長尾により作成された) の二重組み込み体を作成し、非同調細胞の抽出液に対し抗Myc抗体、抗HA抗体で免疫沈降実験をおこなった。抗Myc抗体でMis4-mycは全体の4割免疫沈降させることが出来たが (一段目・レーン7) Rad21タンパク質は共沈してこなかった (二段目・レーン7)。また抗HA抗体でRad21-HAは全体の7割を沈降することが出来たが (二段目・レーン9) Mis4タンパク質は共沈してこなかった (一段目・レーン9)。次にMis4-myc、Psm3-HA (Psm3のC末端にHAを付加させた組み込み体・湯浅修士論文) の二重組み込み体を作成し、抗Myc抗体、抗HA抗体で同様の免疫沈降実験をおこなった。この時、抗Myc抗体によりMis4-mycタンパク質の4割が (三段目・レーン7)、抗HA抗体によりPsm3-HAの5割が (四段目・レーン12) 沈降していたがMis4タンパク質 (三段目・レーン12) とPsm3タンパク質が (四段目・レーン7) それぞれ共沈してくることはなかった。これらの結果は少なくともこの条件ではMis4とRad21、Mis4とPsm3の間には物理的相互作用はないということを示しており、Mis4はコヒーシン複合体とは異なる複合体を作っていることを示唆している。

*mis4*変異株の中ではRad21は局在が異常になる

Mis4とRad21の間に物理的相互作用が見られなかったので他に何か関係がないかを調べてみた。まず局在に注目した。Rad21タンパク質はGFP融合タンパク質の解析から核内でドット状に局在する事が分かっている (長尾未発表データ)。*mis4*変異株のなかでRad21の局在をみた。Rad21のカルボキシル末端にGFPを付加させた融合遺伝子をゲノムに組み込んだ (長尾未発表データ)。Rad21-GFP組み込み体に*mis4*変異をかけ合わせにより導入し制限温度36℃でRad21タンパク質の局在を観察した。野生株では図50 (上段) の様に26℃、36℃ともに核内がドット状に染色された。しかし*mis4*変異株では26℃で既にドット状の染色が薄くなり (図50・下段左)、ドット状の染色が見られない細胞も観察された。36℃にシフトアップすると4時間でドット状のシグナルは全て

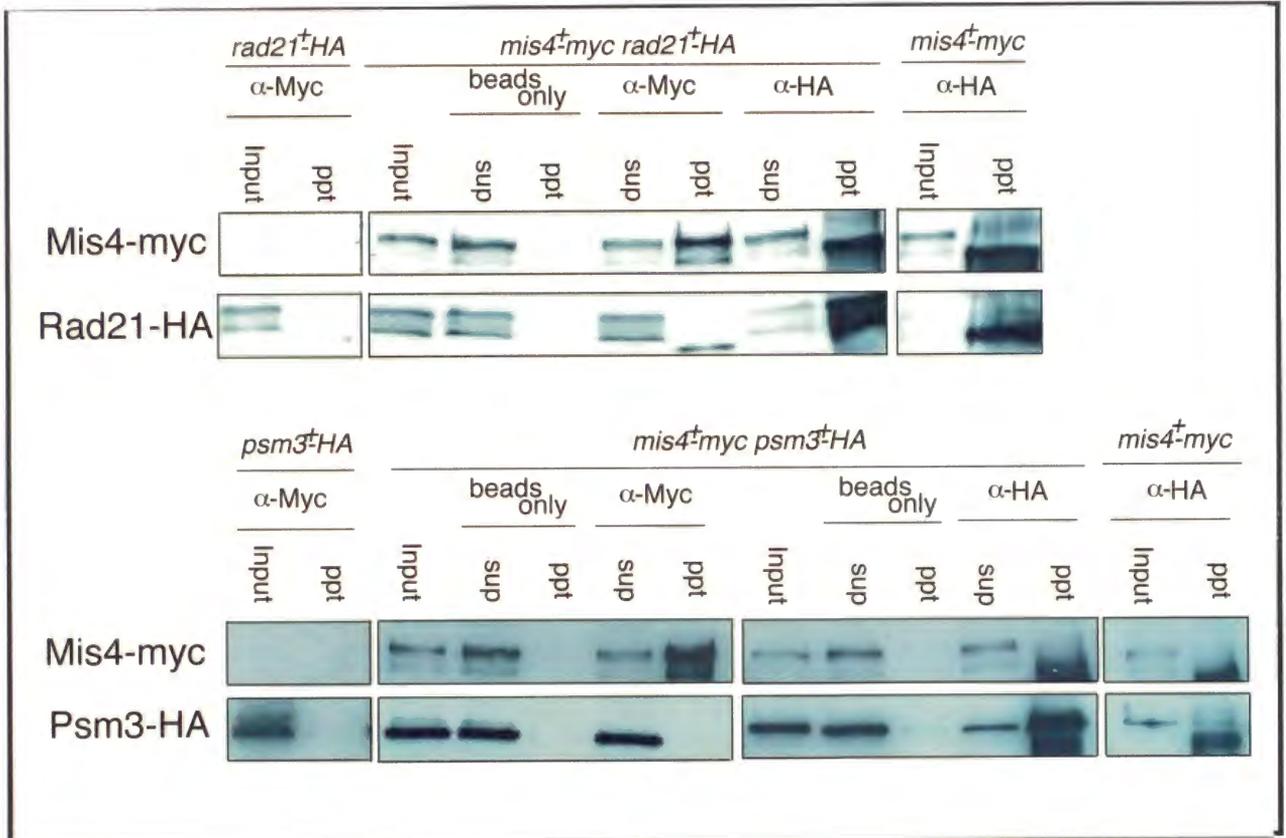


図49 Mis4はRad21ともPsm3とも免疫共沈しない

Mis4-myc Rad21-HA二重組み込み体（上段）、Mis4-myc Psm3-HA二重組み込み体（下段）をそれぞれ作成し、その非同調の細胞粗抽出液にたいし抗HA抗体、抗myc抗体により免疫沈降を行った。コントロールとしてビーズのみと反応させたもの、*mis4⁺myc*あるいは*rad21⁺HA*、*psm3⁺HA*のみを組み込んだものを用いた。Input とsup は蛋白量をそろえた。ppt にはInput の10倍量を電気泳動にロードした。免疫沈降の効率はInput からsup の分を差し引いたものが沈降されたものとして計算した。

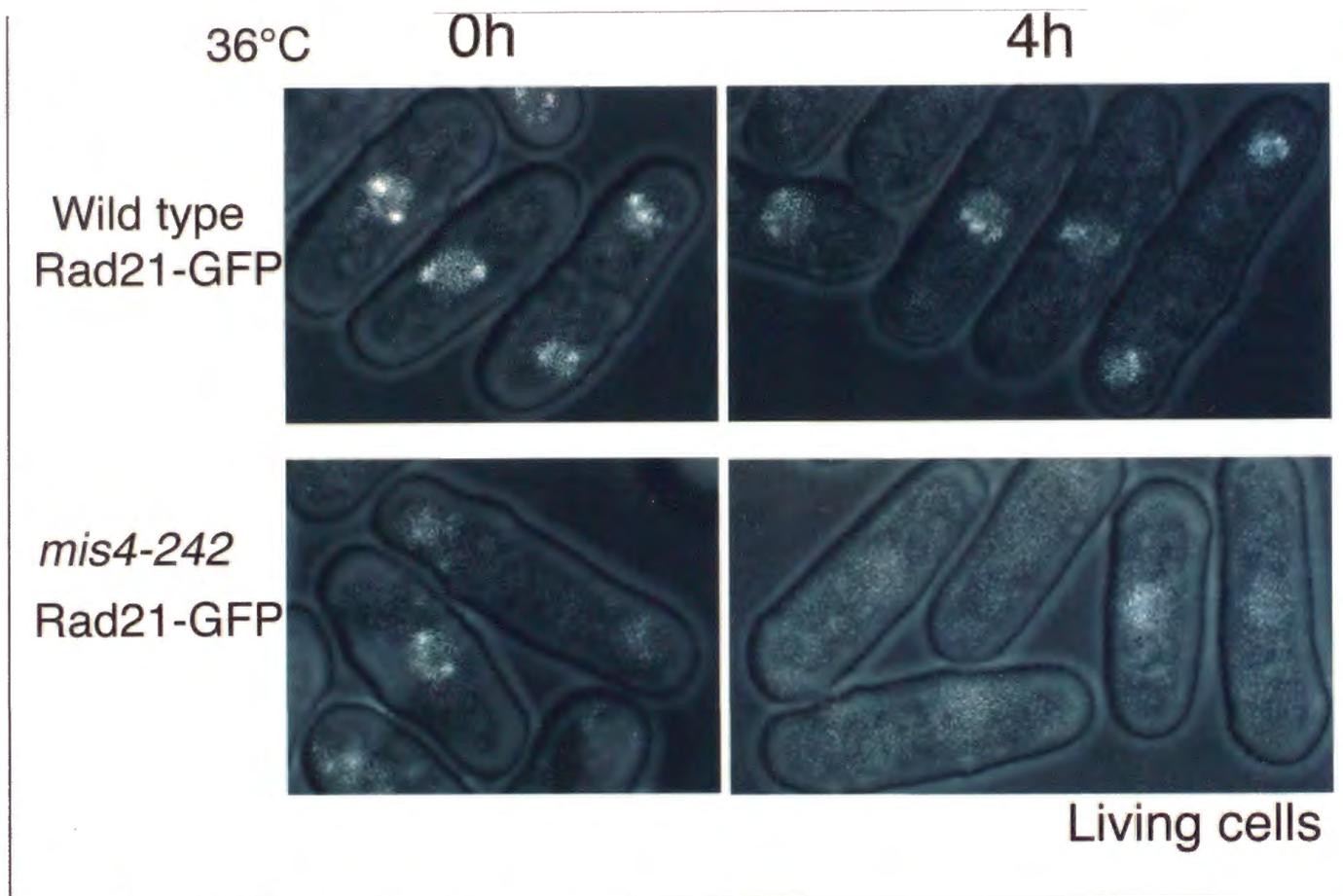


図50 *mis4*変異株ではRad21の局在が異常である

*mis4*変異株にRad21-GFPを単コピーでもたせ、制限温度で観察した。上段；野生株。下段；*mis4*変異株。野生株ではRad21-GFPは26°C、36°C共にドット状の核染色として観察された。*mis4*変異株においては許容温度ではドット状のRad21-GFPの染色が観察されたものが見られたが、制限温度36°Cでは一様な核染色しか見られなかった。

の細胞で全く観察されなくなり、滑らかな核染色しか見られなくなった（図50・下段右）。逆に、*rad21*変異株のなかでMis4タンパク質の局在をGFPにより観察したが野生株、*rad21*変異株で顕著な差は見られなかった（豊田未発表）。

次にウエスタンブロットでRad21を検出した。抗Rad21抗体をもちい、野生株、*mis4*変異株の細胞粗抽出液に対してウエスタンブロットを行った（図51・Birkenbihl RP and Subramani S 1995）。Rad21タンパク質は野生株中では100kD付近に複数のバンドが見られた。Birkenbihlらにより、Rad21タンパク質はリン酸化の修飾を受け泳動度の遅いバンドがリン酸化によるものであることが明らかとなっている（Birkenbihl RP and Subramani S 1995）。*mis4*変異株ではRad21タンパク質の最も泳動度の遅いバンドが許容温度からほとんど見られなくなっていた（図51←i>）。

これらの結果からMis4タンパク質はRad21タンパク質の正常な局在化と泳動度の遅いバンドの形成に必要であることが明らかとなった。

*mis4*変異株は制限温度でM期進行遅延の表現型を示す

*mis4*変異株は制限温度で凝縮染色体がばらけたような表現型を示す。この表現型をさらに詳細に解析するため同調培養をおこなった。より同調率をあげるため以下のような実験を行った。*mis4*変異株、野生株を窒素源枯渇によりG1期に停止させた後、制限温度でリリースし、リリースした細胞にエルトリエーションを行いG1期に同調させた。野生株ではエルトリエーション後45-60分後に、*mis4*変異株では30-45分後にかけてDNA含量1Cから2Cに移行していることからこれらの時期がS期と思われる（図52A、B赤枠およびC）。チューブリン染色により、M期細胞、すなわち紡錘体を持つ細胞を測定し、その割合を示した（図52A、B）。野生株、*mis4*変異株ともにS期が終了してから90分でM期細胞が出現しだした。M期進入のタイミングは野生株、*mis4*変異株で差はないようである。隔壁形成した細胞の割合を示した。隔壁形成は野生株ではM期進入後15分で、*mis4*変異株ではM期進入後30分から45分でおこり始めていた。*mis4*変異株では隔壁形成が野生株に比べて遅れることが分かった。さらに粗抽出液中のCdc2キナーゼの活性を測定するためヒストンH1を基質としたキナーゼアッセイを行った（図52A、B）。野生株ではキナーゼ活性は3倍程度にしか上昇しなかった。しかし*mis4*変異株ではH1キナーゼ活性が8倍まで上昇した。さらに上昇している時間も野生株より長かった。*mis4*変異株ではM期細胞が蓄積するのであろう。H1キナーゼが高いときの（180分）細胞をチューブリン染色し、紡錘体の長さの分布を示した

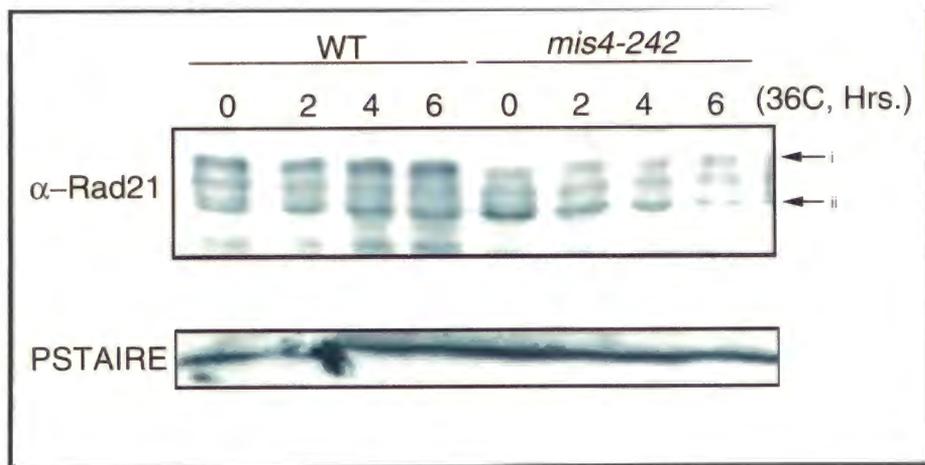


図51 *mis4*変異株中でのRad21の挙動

*mis4*変異株細胞粗抽出液中に対して抗Rad21抗体によりウエスタンブロットを行った。非同調細胞を制限温度に移し、経時的にサンプリングを行った。上段；抗Rad21抗体によるブロット。下段；抗PSTAIRE抗体によるブロット（タンパク量が揃っているかの確認）。野生株中ではRad21は4本のバンドとして検出された（iとiiの間）。*mis4*変異株では一番泳動度の遅い（i）のバンドの量が減少していた。

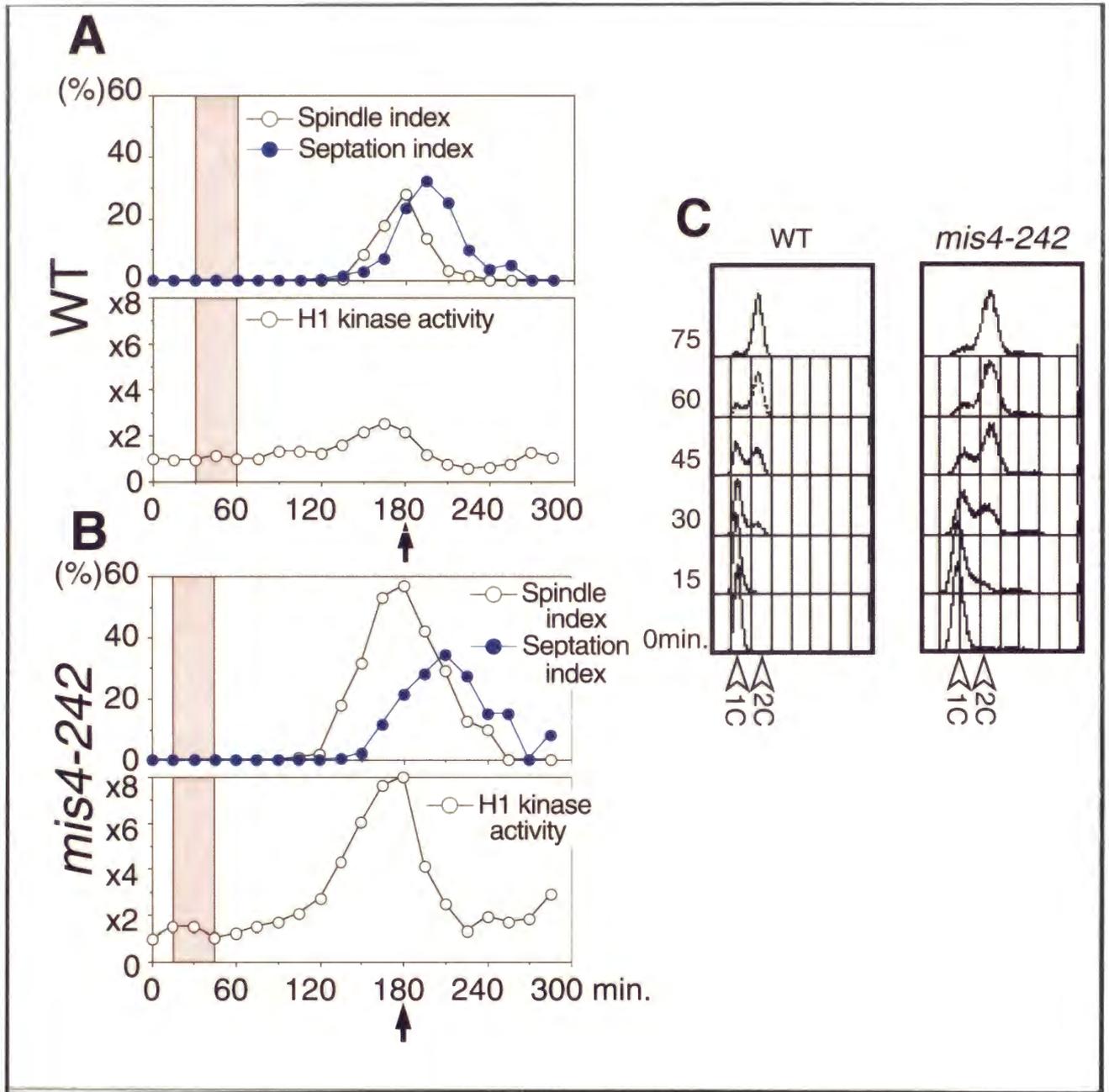


図52 *mis4*変異株は制限温度でM期遅延を引き起こす

野生株、*mis4*変異株を窒素源枯渇によりG1期に停止させた後リリースし、さらにエルトリエーションによりG1期に同調させた。(A) 野生株；(B) *mis4*変異株；スピンドルをもった細胞の割合（上段○）。隔壁形成を起こした細胞の割合（上段●）。粗抽出液中のH1キナーゼ活性（下段○）。(C) FACscanによりDNA含量を測定した。(A) (B) ではS期のタイミングを赤枠にて示した。

(図53A、B)。野生株は紡錘体の長さにはばらつきがあり、短いものから長いものまでまんべんなく存在した。しかし*mis4*変異株では紡錘体の長さはほとんどが3-4マイクロメートルであり、長い紡錘体を持つ細胞は見られなかった。210分の時点でも5 μ m以上の紡錘体を持つ細胞は*mis4*変異株においては2%未満であった。最近の五島らの結果から*mis4*変異株は分裂期の第二期(図3a)で停止すること、またそのときの紡錘体の長さが通常野生株では2マイクロメートル程度なのに対し、*mis4*変異株では4マイクロメートルであることが明らかとなっている(Goshima G et al., 1999)。これらの結果をあわせると*mis4*変異株では分裂中期様の停止をするが、そのときの紡錘体の長さは何らかの原因で野生株で見られるものより長い様である。分裂酵母の第二期における紡錘体の長さは動原体微小管が動原体を引っ張る力と姉妹動原体間の結合の力のバランスによって決定されると考えることができる。*mis4*変異株では姉妹染色分体間結合に欠損を示すため姉妹動原体間がほどけたような恰好になっており、紡錘体の長さがやや長くなるのかもしれない。

さて*mis4*変異株はH1キナーゼ活性が高い状態で停止する。このときCut2タンパク質はどうであろうか。Cut2タンパク質のカルボキシル末端にHAを付加させた融合遺伝子をゲノムに組み込み免疫抗体染色により検出した(図54)。野生株では短い(2 μ m)紡錘体を持った細胞ではCut2は紡錘体上が染色されるが、長い紡錘体を持った細胞では見られない(図54下段)。しかし、*mis4*変異株では4マイクロメートル程度の長い紡錘体を持った細胞でも紡錘体上にCut2タンパク質が見られた(図54上段および図55)。M期遅延を起こしている*mis4*変異株の細胞ではCut2の分解も起こっていない様である。

*mis4*変異株は微小管重合阻害剤に対し感受性を示す

*rad21*変異株はTBZ感受性を示すことが明らかとなっている(Tatebayashi K et al., 1998)。TBZ(チアベンダゾール)はチュープリンの重合阻害剤である。*mis4*変異株のTBZプレート上でのコロニー形成能を見た(図56)。プレート上に野生株、*mis4*変異株の培養液を順次希釈してスポットした(左から10倍ずつ希釈。一番左は10⁶の細胞をスポットした)。*mis4*変異株では野生株に比べて10 μ g/mlのTBZプレート上でのコロニー形成能が悪くなっていた。これらの結果から*mis4*変異株はチュープリンの重合阻害剤TBZに対し感受性を示すことが明らかとなった。微小管のダイナミズムが重要な役割を演じるM期のイベントそのものに*mis4*変異株では異常を示すのかもしれない

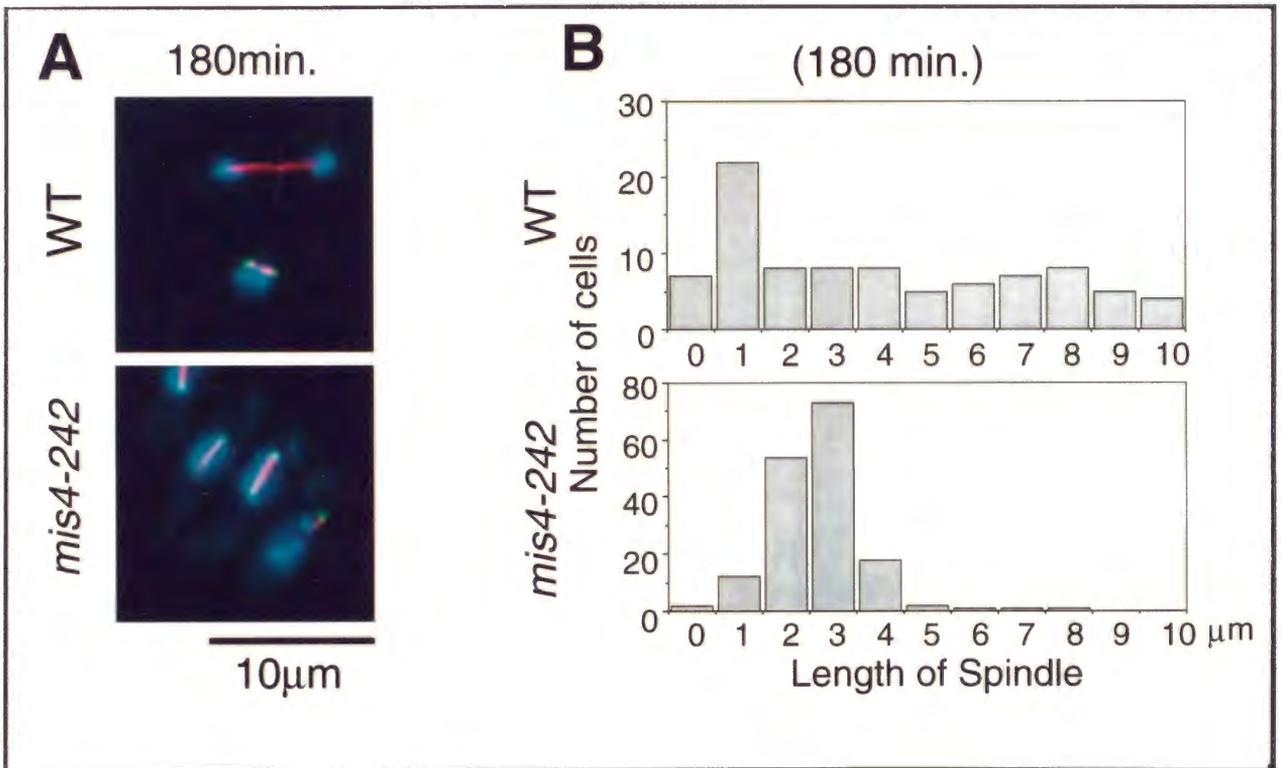


図53 *mis4*変異株は制限温度でM期遅延を引き起こす

図52の180分における細胞のチューブリン染色像 (A)、スピンドル長を測定し、その分布をプロットした (B)。

(A) 青; DNA、赤; チューブリン、緑; 紡錘極体。

mis4-242 cut2-HA

DNA

α -HA

SPB



WT *cut2-HA*
DNA

α -HA

SPB

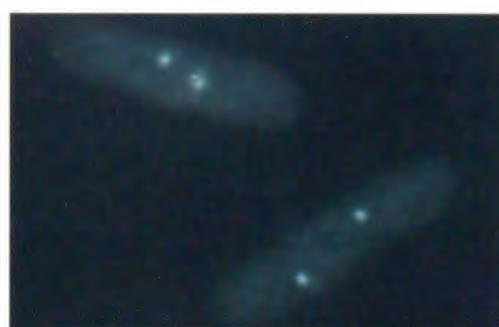
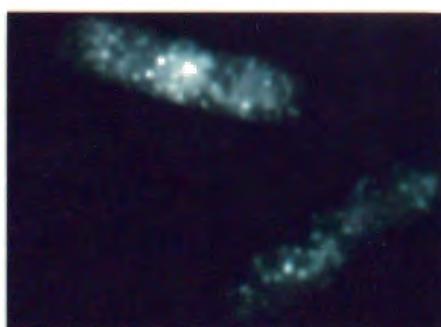
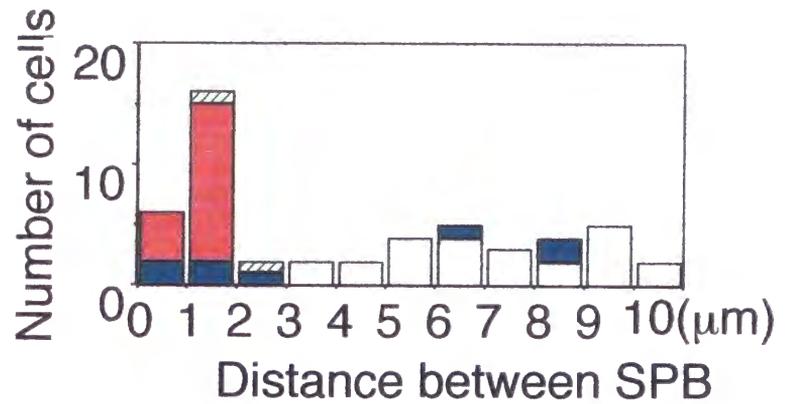


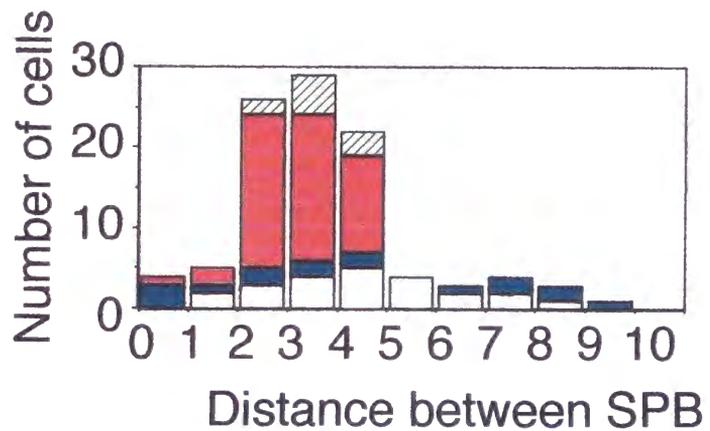
図54 *mis4*変異株ではCut2が残存している。

*mis4*変異株にCut2-HAを単コピーでもたせ、制限温度36℃に移し4時間後にサンプリング、抗HA抗体により間接蛍光抗体法を行った。上段；*mis4*変異株、下段；野生株。左よりDAPI染色、抗HA抗体染色、抗Sad1抗体による紡錘極体染色。野生株ではCut2-HAはM期の初期においてのみ（下段・左上の細胞）薄い核染色とスピンドル様の染色が見られる。*mis4*変異株ではやや長い（4 μ m）スピンドルをもつ細胞においてもCut2-HAの薄い核染色とスピンドル様の染色が見られた。barは10 μ m。

wild type



mis4-242



-  spindle
-  nuclear+spindle
-  nuclear
-  no staining

図55 *mis4*変異株ではCut2は残存している

図54の間接蛍光抗体染色について、紡錘極体を2つ持つ細胞 (M期細胞) についてCut2-HAのパターンを観察した。Cut2-HAの染色パターンを紡錘極体間の距離に対してプロットしたもの。空白；染色が見られなかったもの。青；核染色が見られたもの。赤；核染色とスピンドル染色が見られたもの。緑斜線；スピンドル染色が見られたもの。

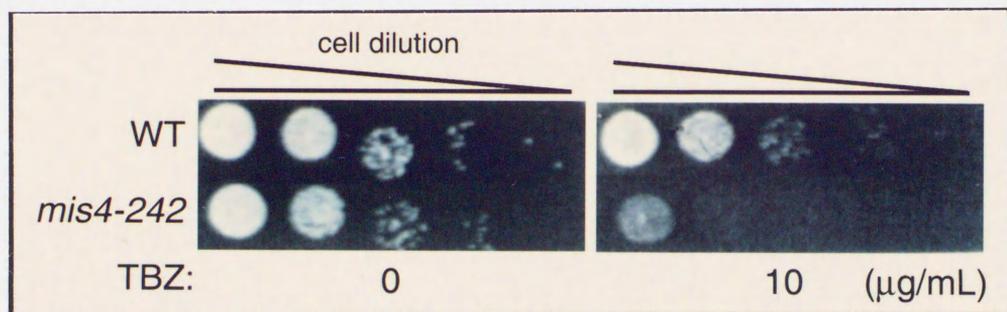


図56 *mis4*変異株はTBZに対し感受性を示す

*mis4*変異株は微小管重合阻害剤であるTBZ（チアベンダゾール）に対し感受性を示した。TBZ（10µg/ml）を含むプレートに対しスポットテストを行った。一番左のスポットには10⁶cellが含まれる。各スポットに含まれる細胞数は右へ行くに従い、10倍ずつ希釈している。

ない（考察）。

*mis4*変異株の制限温度におけるM期進行遅延の表現型はMad2依存的である

*mis4*変異株は制限温度でいわゆる第二期に停止する（Goshima G et al., 1999）。このとき、H1キナーゼ活性は高くなっており、紡錘体の伸長も起こらない。さらに*mis4*変異株は微小管重合阻害剤TBZに感受性を示す。そこで、この分裂期停止は紡錘体チェックポイント遺伝子*mad2*⁺によるものではないかと考えた。*mad2*⁺遺伝子は生育に必須ではないが、紡錘体チェックポイントの活性化には必要である。すなわち野生株ではM期において微小管重合の欠損により紡錘体形成異常が引き起こされると、H1キナーゼが高い状態で細胞周期を停止させることができるが、*mad2*⁺遺伝子破壊株（ $\Delta mad2$ ）は紡錘体形成異常が起こっても分裂期停止できない（Kim SH et al., 1998）。*mis4 $\Delta mad2$ 二重変異株を作成し、非同調で制限温度に移した後チューブリン染色を行った（図57）。*mis4*変異株は制限温度にシフトアップ後4時間で紡錘体の長さが3-4マイクロメートルの細胞が蓄積し（図57左上）、紡錘体を持った細胞の割合が20.5%と高くなった（許容温度では5.2%であった）。しかし、*mis4 $\Delta mad2$ 二重変異株では紡錘体伸長が起こっている細胞が観察され（図57右上）、さらに紡錘体を持った細胞の蓄積は見られなかった（6.4%）。*rad21*変異株においても*mis4*変異株と同様、紡錘体の伸長が起きず（図57左下）、紡錘体を持った細胞が蓄積した（28.5%）。*rad21 $\Delta mad2$ 二重変異株を作成し、*rad21*変異株と比較した。*rad21 $\Delta mad2$ 変異株では紡錘体の伸長がおきており（図57右下）、紡錘体を持った細胞の割合も低くなっていた（5.6%）。*mis4 $\Delta mad2$ 二重変異株、*rad21 $\Delta mad2$ 二重変異株のうち、一部のものは分裂後の娘核の大きさに大小ができていた（図57・矢印）。姉妹染色分体間結合は染色体の均等分配に必須なのであろう。なお、*mis4*変異株、*rad21*変異株の温度感受性は*mad2*⁺遺伝子破壊により相補されることはなかった。******

さらに、*mis4*変異株、*mis4 $\Delta mad2$ 二重変異株、*rad21*変異株、*rad21 $\Delta mad2$ 二重変異株におけるH1キナーゼ活性を測定した（図58）。これらの変異株を窒素源枯渇により、G1期に停止させ、制限温度、栄養培地へリリースさせた。リリース後6時間目がM期にあたると思われる。*mis4*変異株、*rad21*変異株ではリリース後6時間目でH1キナーゼ活性が野生株と比較して高くなった（5倍）。しかし、*mis4 $\Delta mad2$ 二重変異株、*rad21 $\Delta mad2$ 二重変異株ではH1キナーゼ活性の上昇は見られず、野生株とほぼ同レベルであった。****

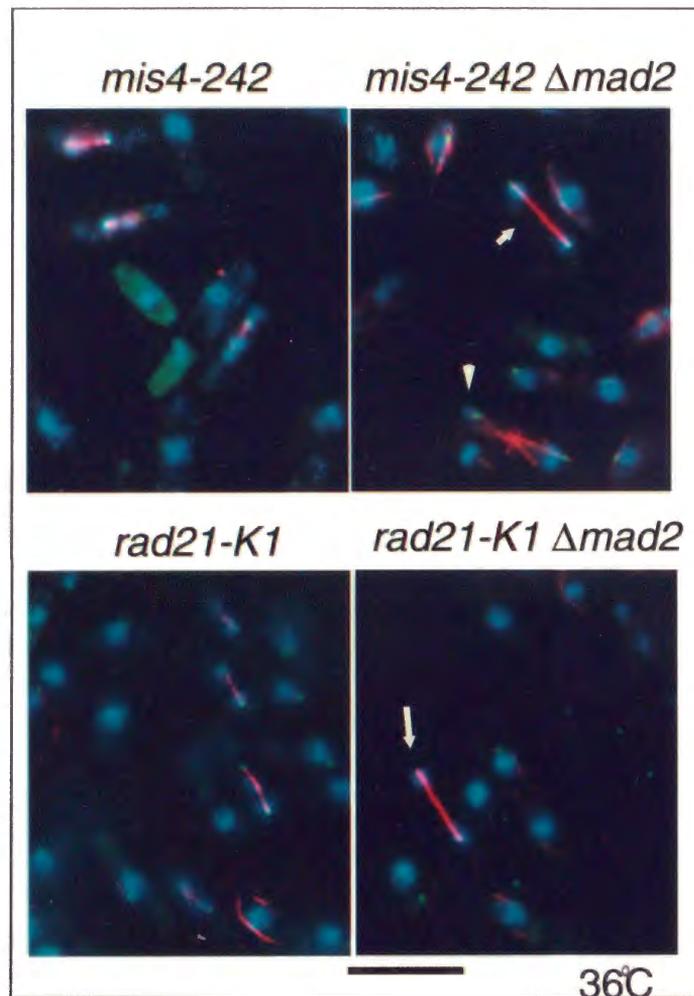
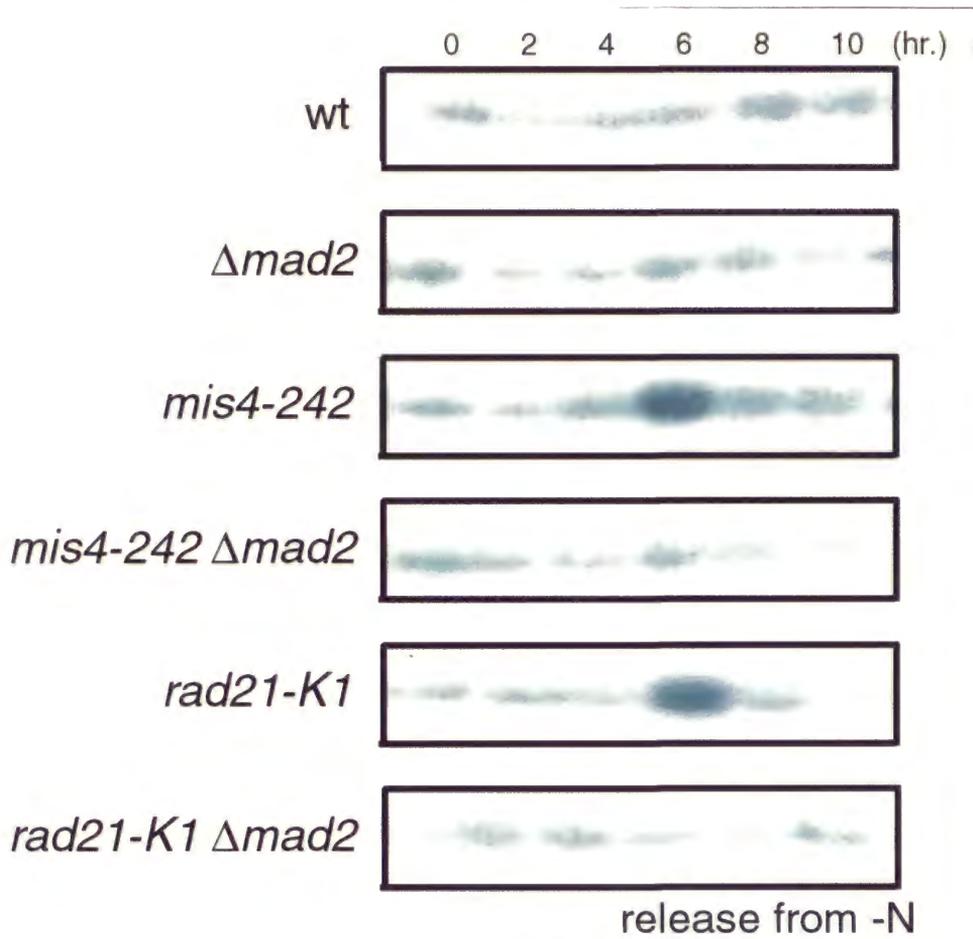


図57 *mis4*変異株のM期進行遅延はMad2に依存している。

*mis4*変異株、*mis4Δmad2*二重変異株、*rad21*変異株、*rad21Δmad2*二重変異株（36℃、4時間、非同調）に対してチューブリン染色を行った。左上；*mis4*変異株。右上；*mis4Δmad2*二重変異株。左下；*rad21*変異株。右下；*rad21Δmad2*二重変異株。*mis4*変異株、*rad21*変異株ではスピンドルが伸長した細胞が見られなかったが（ $\sim 4\mu\text{m}$ ）、*mis4Δmad2*二重変異株、*rad21Δmad2*二重変異株では伸長したスピンドル（ $7\mu\text{m}$ ）をもつ細胞（矢頭）が観察された。*mis4Δmad2*二重変異株、*rad21Δmad2*二重変異株では不均等分配を起こしている細胞も見られた（矢印）。barは $10\mu\text{m}$ 。

A



B

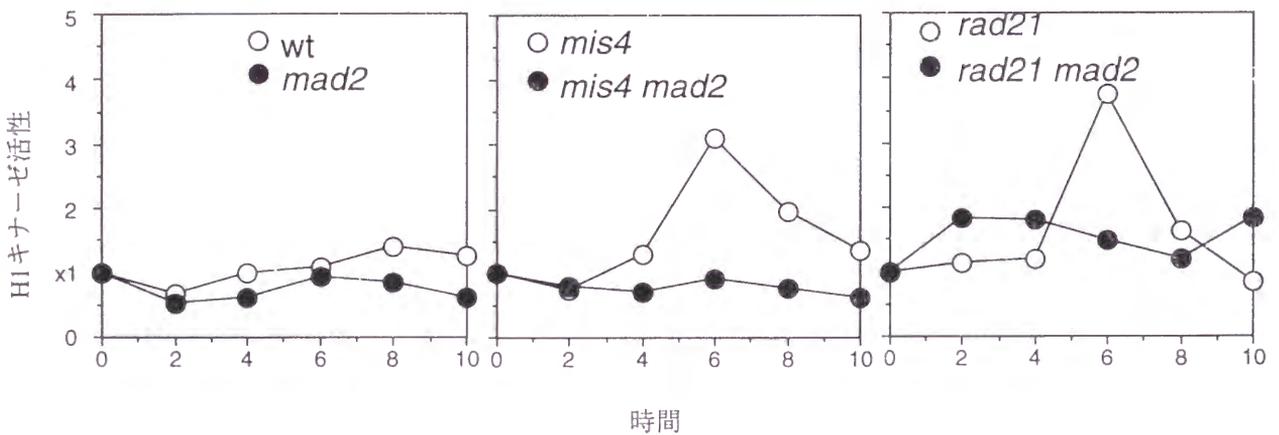


図58 *mis4*変異株のM期進行遅延はMad2に依存している。

*mis4*変異株、*mis4* $\Delta mad2$ 二重変異株、*rad21*変異株、*rad21* $\Delta mad2$ 二重変異株における細胞粗抽出液中のH1キナーゼ活性を測定した。窒素源枯渇によりG1期に停止させた後、制限温度にてリリースした。(A) (B) H1を基質としてin vitroでキナーゼアッセイを行ったオートラジオグラフィー。(B)は(A)を定量したもの。

以上の結果から *mis4* 変異株や *rad21* 変異株は制限温度では Mad2 依存的に M 期進行の遅延が起こることが分かった。*mis4* 変異株、*rad21* 変異株では制限温度では M 期において Mad2 依存的な紡錘体チェックポイントが活性化し、M 期進行の遅延が起こると思われる。

mis4 変異株における Mad2 タンパク質の局在

高等生物では Mad2 タンパク質はキネトコア微小管の結合していない (unattached kinetochore) 動原体に局在するとの報告がされており、その局在と紡錘体チェックポイントの発動の間に相関関係があることが報告されている (Waters JC et al., 1995)。*mis4* 変異株は制限温度で *mad2⁺* 遺伝子 Mad2 依存的な M 期進行の遅延を引き起こす。そこでこの時の Mad2 の局在をしらべた。Mad2 タンパク質のカルボキシル末端に GFP を付加させた融合遺伝子をゲノムに組み込み、発現させた (図 59)。野生株における局在を見た (図 60・下段)。間期には核膜様の染色とクロマチン様の染色がみられ、分裂期と思われる細胞では核膜様の染色と紡錘体、紡錘極体様の染色が見られた。*mis4* 変異株における局在を観察した (図 60・上段)。DAPI 染色とともに示す。M 期と思われる細胞では核内に 2 点あるいはそれ以上のドットが観察された。あるものは染色体上にシグナルが観察され、あるものは核の両端に観察された (図 60・矢印)。また、紡錘極体を染色する抗 Sad1 抗体との二重染色を行ったところ、核の両端に見られた Mad2-GFP のシグナルは Sad1 シグナルのやや内側に見られた (図 61)。

Mad2 タンパク質は分裂酵母では細胞周期を通じてどのような局在を示すのだろうか。様々な細胞周期停止変異株の中での Mad2 タンパク質の局在を観察した。*nda3* 変異株は β -チューブリンの変異株であり、制限温度 20°C で紡錘体が形成されず、Mad2 依存的に M 期に停止する (He et al., 1997)。*nda3* 変異株では制限温度に移すと三本の凝縮した染色体が見られる (図 62・上段、Toda et al., 1983, Umesono et al., 1983, Hiraoka et al., 1984)。このとき Mad2-GFP のシグナルはそれぞれの染色体上に一点ずつ見られた (図 62・上段)。*cut7* 変異株では M 期における紡錘極体の分離ができず、制限温度で Mad2 依存的に分裂前期に停止する (Hagan I and Yanagida M 1990, Kim SH et al., 1998)。*cut7* 変異株を制限温度に移すと、Mad2-GFP は染色体上の点局在として観察され、中には 3 点のドットとして観察されるものもみられた (図 62・中段)。次に、*nuc2* 変異株の中での局在をみた (図

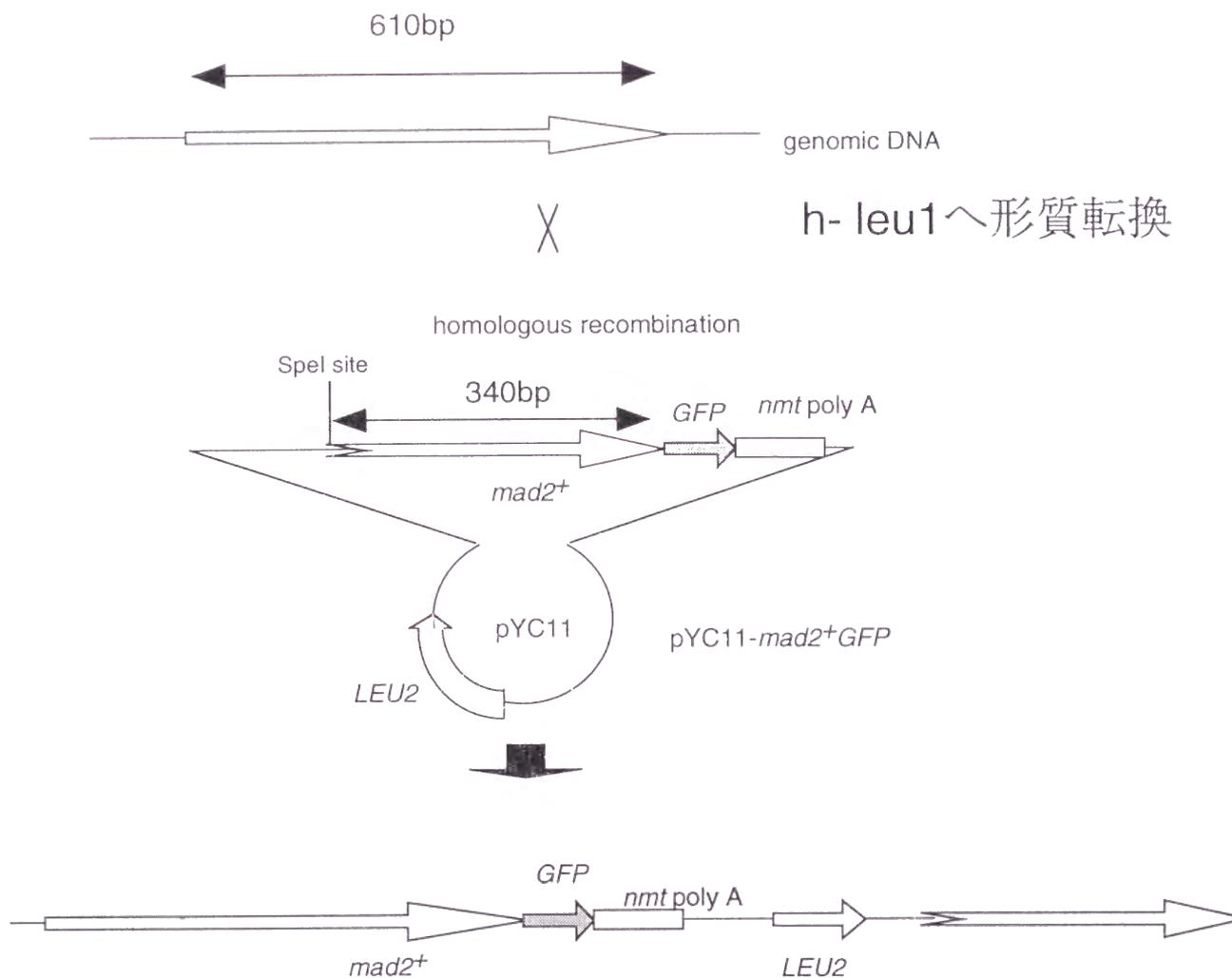


図 59 Mad2-GFP組み込み体の作成。

インテグレーション用ベクターpYC11[LEU2]を用いてMad2-GFP組み込み体を作成した。Mad2のカルボキシル末端にin frameになるようにGFPを付加し、pYC11にそのカルボキシル末端半分を挿入した。野生株に形質転換後、プラスミドを安定に保持したものを組み込み体として観察に用いた。プラスミドがmad2⁺遺伝子座位に挿入されていることをかけ合わせにより確認した。またMad2-GFPの発現を抗GFP抗体のウエスタンブロットにより確認した。

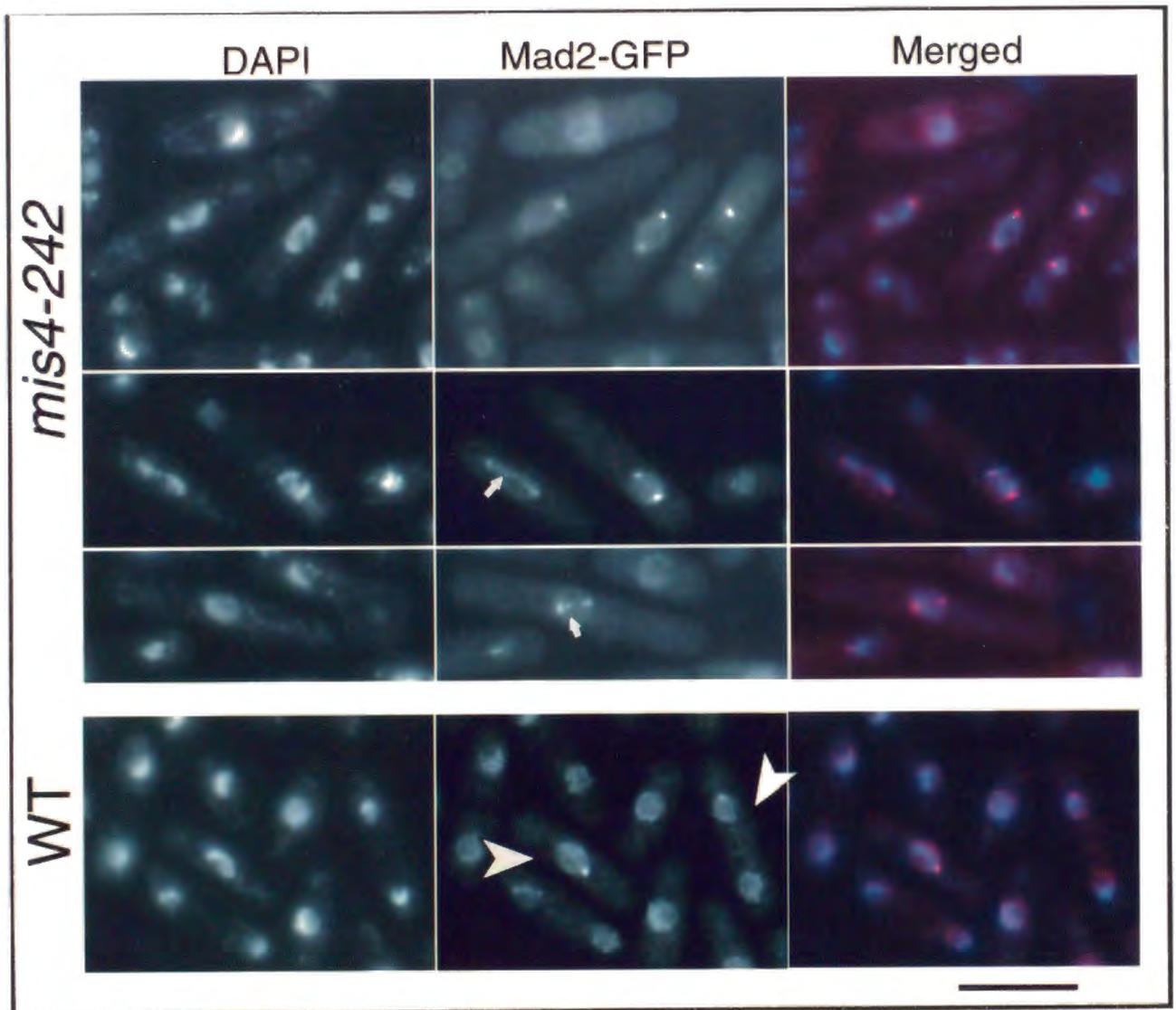


図60 *mis4*変異株の中でのMad2の局在

*mis4*変異株、野生株にMad2-GFPを単コピーでもたせ観察した。36℃、4時間。メタノール固定後、DAPI染色した。上段；*mis4*変異株。分裂中と思われる細胞で紡錘極体様の染色の他に染色体上がドット状に染色される（矢印）のが観察された。下段；野生株。分裂中と思われる細胞（矢頭）で紡錘極体様の染色が見られた。barは10μm。

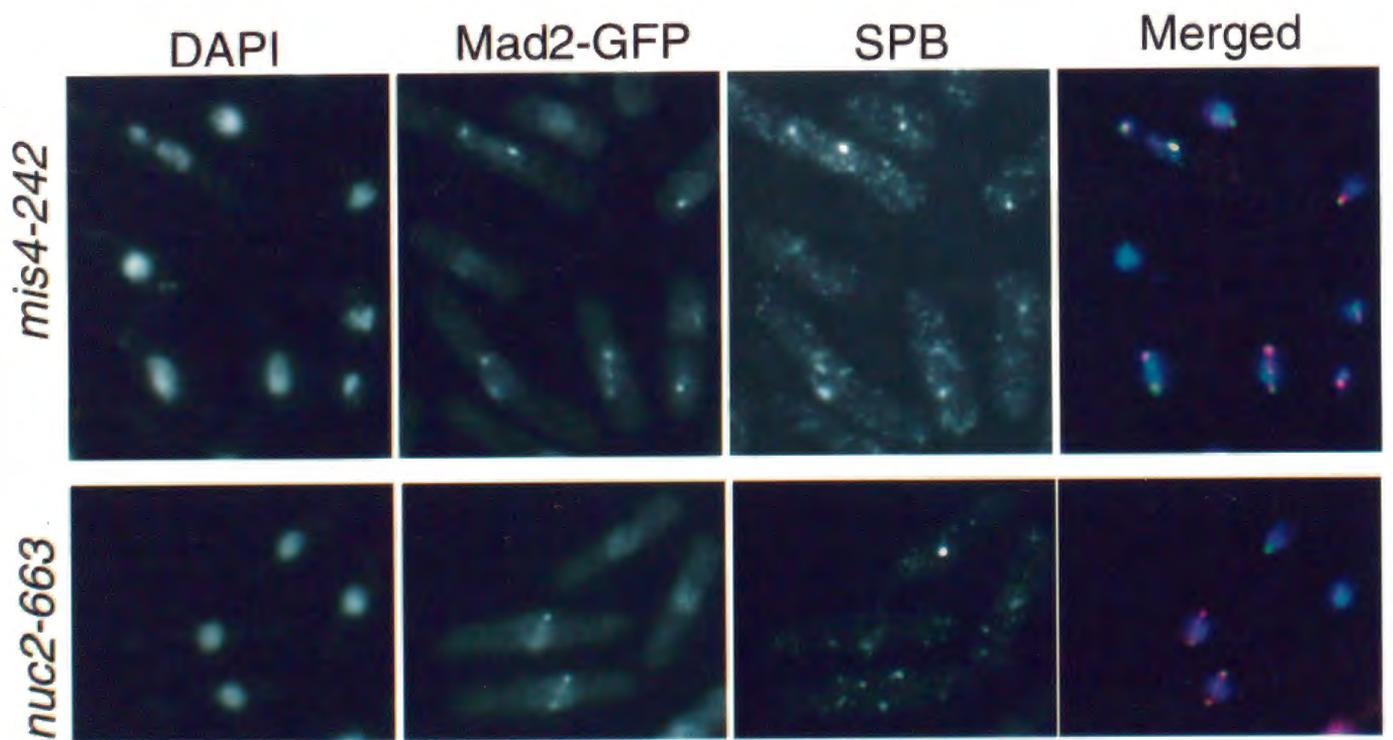


図61 Mad2-GFPとSPBの二重染色。

*mis4*変異株と分裂中期停止する*nuc2*変異株の制限温度におけるMad2の局在を抗Sad1抗体染色とともに観察した。青；DAPI、緑；SPB、赤；Mad2-GFP。SPB（緑）とMad2-GFP（赤）の染色が重なったところは黄色に染色される。Mad2-GFPはSPBのやや内側に見られた。

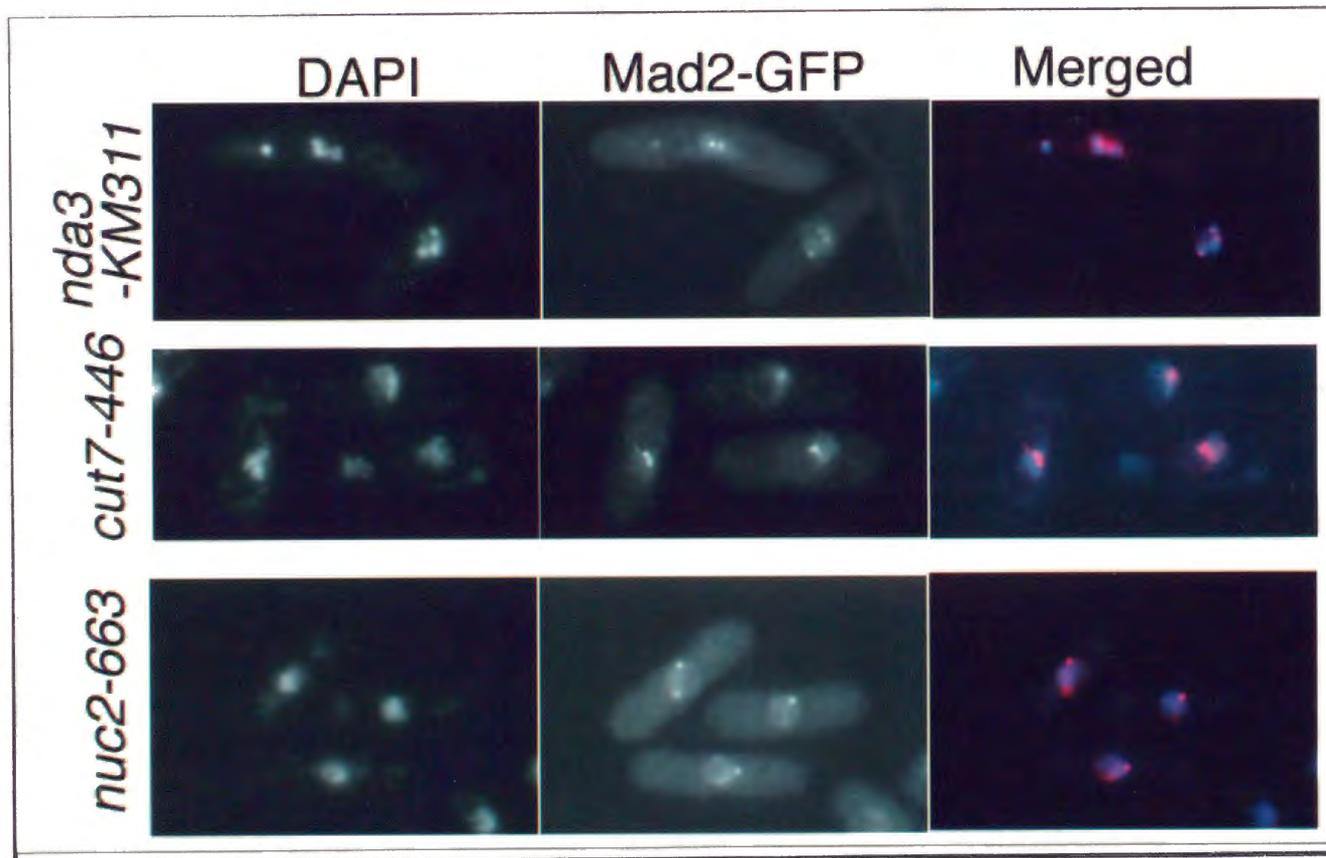


図62 様々な分裂期停止変異株におけるMad2の局在。

(上段) 分裂前期に停止する β -チューブリン欠損変異株*nda3-KM311*。(中段) 分裂前期に停止するキネシンモーター欠損変異株*cut7-446*。(下段) 分裂中期停止する*nuc2*変異株。

62・下段)。Nuc2はAPC/サイクロソームのサブユニットであり、その変異株は制限温度で分裂中期、すなわち短い紡錘体の間に凝縮した染色体が中期板を形成した状態で停止する。*nuc2*変異株を制限温度に移すと紡錘体様のMad2-GFP染色がみられ、紡錘体様染色の両端に紡錘極体様の明るいシグナルが見られた。*nuc2*変異株を制限温度に移したときの抗Sad1抗体（紡錘極体マーカー）との二重染色を示した（図61）。紡錘極体と思われた点はSad1シグナルのやや内側に見られた。G2期停止をする*cdc25*変異株の中ではMad2タンパク質は核膜とクロマチン領域に局在していた（図63A）。*dis1*変異株は動原体微小管の形成に欠損があると考えられている（Nabeshima et al., 1998）。*dis1*変異株を制限温度に移すと、Mad2-GFPは染色体上の点局在として観察された（図63B）。分裂中期停止をする*mts2*変異株では紡錘体様の局在が観察された（データは示さない）。*nda3*、*dis1*、*cut7*変異株で見られる染色体上のMad2の点局在は3点見られるものもあるので、これらは分裂酵母の3本の染色体のそれぞれの動原体領域を表しているのかもしれない。高等生物と同様、分裂酵母でもMad2は動原体微小管の結合していない動原体に局在するのかもしれない。また、その後微小管が動原体に結合し分裂中期に入るとMad2タンパク質は紡錘体極に接近した、紡錘体のマイナス端に局在するのかもしれない。

以上の結果を考え合わせると、*mis4*変異株ではM期停止がおこっているときにはMad2タンパク質は一部染色体上に見られたが、これらはMad2がこの時期に動原体局在をしているのを反映しているのかもしれない。そのMad2がM期停止を引き起こしているのかもしれない。

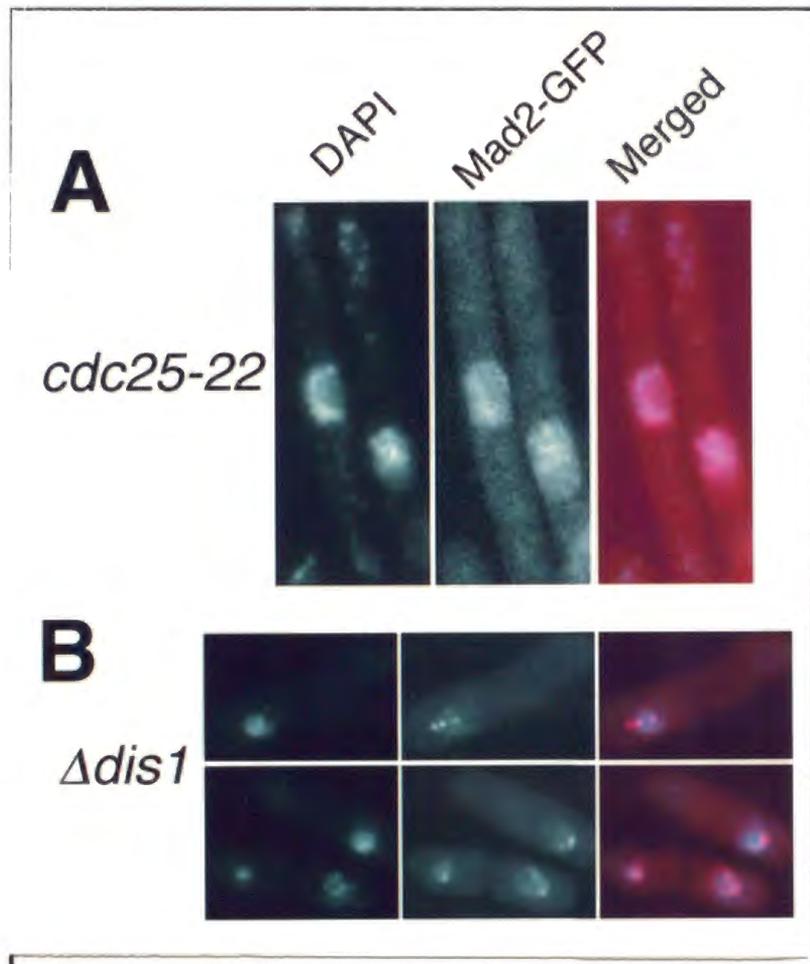


図63 細胞周期停止変異株中におけるMad2-GFPの局在

G2期停止をする*cdc25*変異株、分裂期停止をする*dis1*⁺遺伝子破壊株を制限温度に移したときのMad2の局在を観察した。*cdc25*変異株（36℃、4時間）ではクロマチンおよび核膜様の染色が見られた。*dis1*⁺遺伝子破壊株（20℃、3時間）では点状の局在が染色体上にも見られた。

考察

細胞生物学的な解析から複製された姉妹染色分体同士はM期で分配されるまでつなぎ止められていることが分かっており、この仮想構造体は姉妹染色分体間結合 (Sister Chromatid Cohesion) と呼ばれてきた。姉妹染色分体間結合を形成することで染色体の均等な分配が保障されていると考えられている。染色体分離にはユビキチン依存的なタンパク分解が必要であることが明らかとなり、姉妹染色分体同士をつなぎ止める「のり」のようなタンパク性因子が仮想されていたが近年に至るまで分子的な理解は進んではいなかった。(Holloway et al., 1993)。近年、出芽酵母においてScc1/Mcd1がSMCタンパク質ファミリーに属するSmc1、3とともにコヒーシ複合体を形成し、姉妹染色分体間結合に機能していることが示され (Guacci V et al., 1997, Michaelis et al., 1997)、さらに本研究においてコヒーシ複合体には属さない分裂酵母Mis4が姉妹染色分体間結合に必須であり、S期に機能することを示すことができた。これらにより姉妹染色分体間結合の分子的な理解を進めることができたと思われる。

Mis4は姉妹染色分体間結合に必須な新規の因子である

*mis4*変異株を分裂中期に停止させたところ、姉妹染色分体間の結合が染色体全体にわたって失われていることが四種類のプローブを用いたFISH法により明らかとなった。間期においても少なくとも一番染色体セントロメア近傍領域である、*lys1*遺伝子座位に関しては*mis4*変異株では時期尚早な染色体分離が起こっていた。間期には紡錘体は形成されていないので紡錘体の張力により無理矢理姉妹染色分体分離が起こってしまったのではないだろう。*mis4*変異株では変異型タンパク質の量が減少していることから、Mis4の機能の欠失により姉妹染色分体間の結合が失われた結果、時期尚早な染色体分離が起こったものと思われる。さらに興味深いことに*mis4*変異株では時期尚早な染色体分離が起こるのに伴い生存率が低下した。姉妹染色分体間結合が失われると致死となる様である。

Mis4はこれまでに姉妹染色分体間結合に関わる因子として同定されてきたコヒーシ複合体 (Cohesin complex) には含まれない。分裂酵母においてもRad21 (Scc1/Mcd1ホモログ) とPsm3 (SMC3ホモログ) は結合することが示されており、コヒーシ複合体を形成していると思われるが (朝長、村上未発表)、Psm3、Rad21タンパク質それぞれに特異的な抗体で免疫沈降をおこ

なっても Mis4 は沈降産物中には見られなかった。しょ糖勾配の実験から Mis4 は 15S から 20S の沈降係数を示すので、複合体を形成していると思われるが、コヒーシン複合体の 14S とは異なる（豊田未発表）。Cut3 (SMC2) は SMC タンパク質ファミリーに属する、染色体凝縮に必須なコンデンシン複合体のサブユニットであるが、これとも免疫共沈しなかった（データは示さない）。Mis4 はコヒーシン複合体やコンデンシン複合体のような染色体のダイナミズムを制御する既知の因子とは異なる複合体を形成するようである。これらの結果から、本研究においては Mis4 とコヒーシン複合体はそれぞれ姉妹染色分体間結合に必須機能を果たしているが、両者とも異なる複合体を形成していると結論付け、Mis4 を含む新規複合体をアドヘリン (Adherin) と命名した。

Mis4 は染色分体分離における挙動もコヒーシン複合体の制御サブユニットである Rad21/Scc1/Mcd1/XRAD21 とは異なる様である。出芽酵母においては Scc1 は分裂後期において部分分解を受け、それがきっかけとなって染色体分離が起こる (Uhlmann Fet al., 1999)。しかしながら、Mis4 はそのような制御は受けないようである。細胞周期に依存したタンパク量の変動は見られなかった。Mis4 は Scc1 あるいはコヒーシン複合体とは異なる制御を染色体分離の際に受けているのかもしれない。Mis4 はタンパク分解でなく、Mis4 自身が多量体から単量体になることで二つに分割され姉妹染色分体間の結合が失われるようにしているのかもしれない。脱リン酸化などの翻訳後調節を受けることで染色体分離の制御をしている可能性もある。

Mis4 はクロマチン領域において姉妹染色分体間結合に機能する

Mis4 は核内の特別な領域に局在した。GFP により Mis4 の細胞内局在を観察したところクロマチン領域、とりわけ rDNA 領域と共局在した。さらに、核の辺縁部にも濃いドット状の染色が見られた。最近、出芽酵母においてコヒーシン複合体のサブユニットである Scc1/Mcd1 がセントロメア領域に非常に富んでいるとの報告がなされている (Blat Y and Kleckner N., 1999, Tanaka T et al., 1999, Megee PC et al., 1999)。分裂酵母ではセントロメア領域はクラスターを形成し核の辺縁部に局在しているので、(Funabiki H et al., 1993) Mis4 も rDNA 領域だけでなくセントロメア領域とも共局在する可能性は高い。温度感受性 mis4 タンパク質は制限温度でクロマチン領域に局在しなくなるという予備的な結果が得られており (豊田未発表)、Mis4 のクロマチン局在と機能とは密接な相関関係がありそうである。Mis4 は高度に保存されていたが、これらに既知の DNA 結合配列は見いだされなかった。しかしながら Mis4 はおそらく何かの DNA 配列、あるいはクロマチンタンパク質

(ヒストンなど)を認識することでこれらの領域に局在をしていると思われるので、今後クロマチン免疫沈降法 (CHIP) などで検討していく必要がある。CHIP法で細かく調べていくことで染色体上への結合の有無だけでなく、その結合しているシス領域を明らかにすることができる。Mis4はS期に機能することが本研究で明らかとなったが(後述)、複製起点のように、DNA複製と密接に関連する様な染色体上の領域を認識して結合している可能性もあり、非常に興味深い。これらの領域で姉妹染色分体同士をMis4自身が直接橋渡しすることでつなぎ止めているのかもしれない。

Mis4は必須タンパク質であり、進化上高度に保存されている

mis4⁺遺伝子産物は必須遺伝子であり、配列上進化的に保存されたタンパク質であった。姉妹染色分体間結合は生育にも必須な構造体なのであろう。出芽酵母のMis4相同タンパク質Scc2の変異株は姉妹染色分体間結合に欠損を示すこと (Michaelis C et al., 1997)、ツキヨタケのMis4相同タンパク質Rad9の変異株は紫外線感受性を示すことが報告されており、Mis4は機能的にも進化上保存されていると思われる (Seitz LC et al., 1996)。Mis4にはHEAT反復配列と呼ばれる37-43アミノ酸の反復配列が存在し、Mis4、Scc2等、相同タンパク質間で保存されていることが明らかとなった。HEAT反復配列はPP2Aの制御サブユニットやImportin β などに見いだされており、タンパク-タンパク間相互作用を担っていると考えられている (Groves MR et al., 1999, Chook YM and Blobel G 1999)。Mis4のHEATドメインがどのような機能をになっているのか興味深い。他のタンパク質と相互作用している可能性が高いと思われる。Mis4/アドヘリンはショ糖密度勾配遠心法により15S程度の沈降係数を示す。例えばカタラーゼは250kDの複合体であり12Sの沈降係数を示すのでMis4はそれよりやや大きい約300kD~の分子量の複合体を形成していると思われる。予備的な観察から温度感受性*mis4*タンパク質は15Sの沈降係数を示さなくなることから(豊田未発表)、Mis4/アドヘリンは複合体を形成していることが姉妹染色分体間結合に重要であると思われる。HEATドメインを介して他のサブユニットと相互作用をしているのかもしれない。あるいはHEATドメインを介してコヒーシ複合体などMis4/アドヘリン以外のタンパク質と相互作用を行っているのかもしれない。*mis4*変異株と遺伝学的相互作用を示すDNAリガーゼもその候補として考えられる。Mis4タンパク質がどの様なタンパク質と複合体を形成しているのかを知ることが機能を知る上での手がかりとなるであろう。HEATドメインと相互作用する因子を生化学的手法や、

two-hybrid 法等で探索することは今後の課題である。

Mis4のアミノ末端にはCdc2キナーゼの仮想リン酸化部位が3カ所並列に並んでいる。この部位はツキヨタケの相同遺伝子Rad9にも保存されており、ヒトにも同様の部位にMAPキナーゼのリン酸化部位が並列に並んでいる。Mis4のこれらの部位を3カ所ともアラニンに置換させたが必須機能は失われなかった。チェックポイント機能のように必須でない機能を担っているのかもしれない。また、アミノ末端の200アミノ酸はMis4タンパク質の核局在に必須であることが分かっている（豊田未発表）。

Mis4はS期とM期に機能する

*mis4*変異株はS期とM期の二つの時期に致死となった。*mis4*変異株をG2期から制限温度に移すと、M期中期・後期遷移の時期に生存率を低下させ、G1期から制限温度に移すと、S期進行と同時に生存率を低下させた（図10）。S期における生存率の低下は*mis4*変異株においては複製された姉妹染色分体同士をつなぎ止めることができないためと思われる（図64）。その結果続くM期で核分裂異常の表現型を示すのであろう。生存率が低下するという事は不可逆的に致死となることを意味するので、一旦S期を通過し、G2期にはいるとMis4（あるいは変異型*mis4*）は姉妹染色分体間結合を形成することができないと思われる。Mis4はDNA複製と協調することで姉妹染色分体間を結合させているのだろう。*mis4*変異株はDNA複製に関わる様々な因子（DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ等）と遺伝学的な相互作用を示した。DNA複製装置と相互作用をしながら姉妹染色分体間結合を形成しているのかもしれない。*mis4*変異株は生存率を間期に低下させることはなかった。Mis4に依存した姉妹染色分体間結合はいったんS期に確立されるとMis4が失活しても失われまいと思われる。Mis4が一旦S期で機能すると姉妹染色分体間結合が安定化するのかもしれない。一つにはMis4（あるいは温度感受性*mis4*）がクロマチン上で姉妹染色分体間のリンクを形成するとMis4自身が安定化し、温度感受性でなくなるというものが考えられる。安定なコンフォメーションを取るのかもしれない。もう一つとしては姉妹染色分体間結合には確立と維持の二つのステップがあり、Mis4は姉妹染色分体間結合の確立のステップに働いているとこのことである。例えば姉妹染色分体間結合のS期における確立をMis4が、S期からM期までの維持を別の因子が行っているのかもしれない。出芽酵母においてはコヒーシ複合体ともMis4ホモログであるScc2とも異なるEco1タンパク質がS期において姉妹染色分体間結合の確立に働いているとの

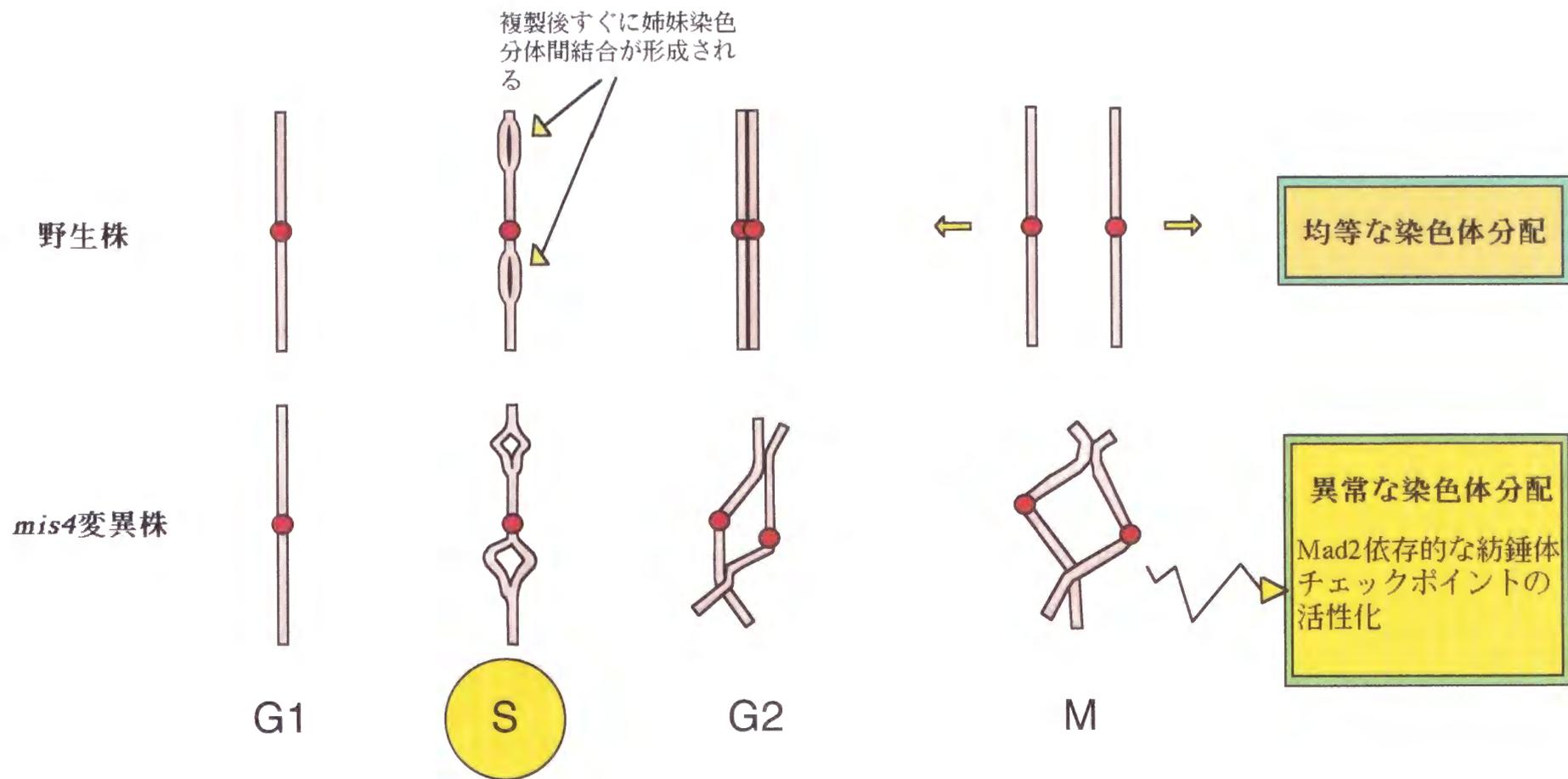


図64 *mis4*変異株は複製された姉妹染色分体同士を結合させることができない

野生株ではS期においてDNA複製と協調する形で姉妹染色分体間結合が形成され、均等な染色体分配を保障していると思われる。*mis4*変異株では複製された姉妹染色分体同士をつなぎ止めることができない。おそらくG2期においては*mis4*変異株では姉妹染色分体の大部分（少なくとも*lys1*⁺遺伝子座位）が分離しているのだろう。その結果致死となり、続くM期において核分裂異常を示す。このときMad2依存的なスピンドルチェックポイントが活性化しているようである。

報告がされている (Toth A., 1999)。

それではM期におけるMis4の機能はどのようなものであろうか。*mis4*変異株をG2期から制限温度に移すと、一度目のM期に不可逆的に致死となった。しかしながら致死となったときのM期における染色体分配はほぼ正常に起こった。核分裂異常の表現型は致死となった次のサイクルのM期にのみ見られた。一つの解釈は、Mis4はM期における染色体の構造変換に関わっており、その構造変換が続くS期における姉妹染色分体間結合の確立に必須である、というものである。M期には染色体凝縮を含め、ダイナミックな染色体構造の改変が行われる (Losada A et al., 1998)。これらと並行して次のS期の準備をするのかもしれない。また、動原体タンパク質であるMis12は一つ前のM期において次のサイクルのM期における均等な染色体分配を保障しているということが明らかとなっている (Goshima et al., 1999)。染色体分配というイベントは多段階からなるステップを経て保障されているのかもしれない。また、M期に致死と見える一つの理由として分裂酵母の細胞周期ではG1期が非常に短いからではないかということも挙げられる。このため分裂酵母においてはM期と続くS期を分離するのは極めて難しい。M期に致死となっているように見えるが実際には致死となっている時期はS期であるという可能性も残っている。

Mis4はRad21の局互化に必須である

*mis4*変異株ではRad21は正常な局在を示さなかった。分裂酵母Rad21は姉妹染色分体間結合に必須であることが今回明らかとなった。Rad21はGFPによる観察からクロマチン上にドット状の染色を示すが、*mis4*変異株ではこれらのドット状の染色が失われ、滑らかなものになっていた。また、*mis4*変異株では、Rad21タンパク質のリン酸化バンドと思われる最も泳動度の遅いバンドが減少していた。逆に、*rad21*変異株の中ではMis4の局在は野生株とほぼ同じであり、さらにSDS電気泳動における泳動度や、量の違いも見いだされなかった (古谷、豊田未発表)。前述したようにRad21はコヒーシン複合体のサブユニットであり、Mis4/アドヘリンはこれとは異なる複合体を形成する。*mis4*変異株においてもRad21とSMCタンパク質は野生株においてと同様、複合体を形成していることが免疫共沈によって示されているので (村上未発表)、Mis4はRad21の複合体形成には必要でないが、Rad21の局在化あるいは泳動度の遅いバンドの形成 (あるいはリン酸化バンドの形成) に必須と思われる。

Mis4はRad21 (もしくはコヒーシン複合体の他のサブユニット) を介して姉妹染色分体間結合

に関わっているのではないかということが考えられる。本研究により、*rad21*変異株もG1期から制限温度に移すとS期に致死となることが明らかとなった。仮にMis4が姉妹染色分体間結合のS期における確立のステップに効いてると仮定すると、Rad21はMis4より受け渡された姉妹染色分体間結合をS期からM期まで維持していると考えることができる。姉妹染色分体間結合の維持をRad21が担っているか否かは*rad21*変異株に対してG2期からの同調培養を行い、制限温度でG2期においても生存率を低下させるか否かを調べてみるとわかるだろう。*mis4*変異株の中ではコヒーシン複合体が姉妹染色分体間をつなぎ止める機能を果たせないのかもしれない。Mis4のドット状の局在とRad21のドット状の局在が共局在するかどうかは本研究ではわからなかったが、例えばMis4が特定の染色体領域を認識することでコヒーシン複合体をリクルートしたり、Mis4がコヒーシンが結合できるような染色体構造（例えば姉妹染色分体間の仮止めみたいなもの）を構築しているということが考えられる。Rad21のリン酸化は細胞周期依存的に変動すること、すなわちG1期にリン酸化状態が低く、G2期にリン酸化状態が高いことが報告されている（Birkenbihl RP and Subramani S 1995）。例えば、このリン酸化がコヒーシン複合体の機能に必須であり、Mis4はそのリン酸化を促進させることで姉妹染色分体間結合に機能しているという可能性も考えられる。

*mis4*変異株は紫外線感受性を示す

*mis4*変異株は紫外線感受性を示した。*mis4*変異株では紫外線照射後の回復が非常に遅れた。例えば分裂酵母Rad21の変異株の一つは γ 線、紫外線に感受性となる変異株として同定されており、 γ 線照射後の二本鎖切断の修復が起らない（Birkenbihl, R. P. and Subramani, S. 1992）。*mis4*変異株でもDNA損傷を修復する事ができないのではないだろうか。

一つの可能性として*mis4*変異株は姉妹染色分体間結合に欠損を示したが、このため本来近くにあるべき姉妹染色分体同士が離れたところにあるということが考えられる。それ故*mis4*変異株では姉妹染色分体間での組み換え修復が起りにくいのかもかもしれない。

また、もう一つの可能性としてMis4自身がDNA修復等の活性の一部を担っている可能性もある。出芽酵母、アフリカツメガエルにおいてコヒーシン複合体に含まれることがわかっているSMC1、3のホモログはウシでは組み換え活性をもつ因子RC-1としてDNAポリメラーゼ ϵ 、DNAリガーゼと共に複合体を形成することがわかっている（Jessberger, R. et al., 1996）。姉妹染色分体間結合に関わる因子のいくつかは組み換え修復などDNA修復時にも機能するのかもしれない。姉妹染色

分体間結合は姉妹染色分体間の相同配列を認識し、対合させるものとも考えられるが、組み換え中間体のようなものを介してそれらを見分けている可能性がある。Mis4は例えば組み換え修復と姉妹染色分体間結合の両方に関わるような分子なのかもしれない。*mis4*変異株はDNAリガーゼ変異株と合成致死性を示す。DNAリガーゼはDNAニックをつなぎ合わせる酵素であり、DNA修復あるいは複製の最終ステップに関わると考えられる。分裂酵母*cdc17*変異株（DNAリガーゼ変異株）においてそのゲノムをパルスフィールド電気泳動すると泳動度の速いスミアバンドが見られたが、*mis4*変異株のゲノムをパルスフィールド電気泳動したときにも、一部泳動度の速いスミアバンドが観察された。*mis4*変異株では組み換えが不完全に起こってしまったものが蓄積し、DNAニックが生じやすくなっているのかもしれない。

*mis4*変異株ではM期にMad2依存的な紡錘体チェックポイントが活性化する

*mis4*変異株を制限温度に移したときに見られる染色体分配異常の表現型を詳しく解析したところ、*mis4*変異株細胞はMad2依存的にM期進行遅延を起こしていることが明らかとなった。野生株の後期Bで見られるような紡錘体の伸長が*mis4*変異株ではほとんど見られなかった。*mis4*変異株では分裂期の第二期の時期で20分以上（野生株では4分程度で第三期に移行する）遅延するようである（第二期の定義については図3参照、Nabeshima K et al., 1998, Goshima G et al., 1999、*rad21*変異株においても同様の結果を得ている；データは示さない）。

これらの変異株で見られるM期進行遅延はMad2依存的な紡錘体チェックポイントが活性化されたため起こると思われる。具体的にどのような欠損を関知して紡錘体チェックポイントが活性化されるのであろうか。一つの可能性としては姉妹染色分体間結合の状態をMad2が監視していることが考えられる（図65A）。姉妹染色分体間結合そのものを何らかの機構で監視しているのかもしれない。あるいは、分裂中期において動原体微小管の両方向性の結合が確立されると、動原体微小管が染色分体を引っ張る力（pulling force）に対抗して姉妹染色分体間結合によって生じる力（opposing force）が働くと思われるが、Mad2がこの姉妹染色分体間結合によって生じるopposing forceあるいは張力を感知しているのかもしれない。例えば昆虫の精原細胞では減数分裂時に動原体-動原体微小管の結合によって生じる張力を感知して、細胞周期を遅延させる機構の存在が示唆されている（Li X and Nicklas RB 1995, Li X and Nicklas RB 1997）。しかしながらこの機構がMad2によるものなのか、分裂酵母にも存在するのかわかっていない。

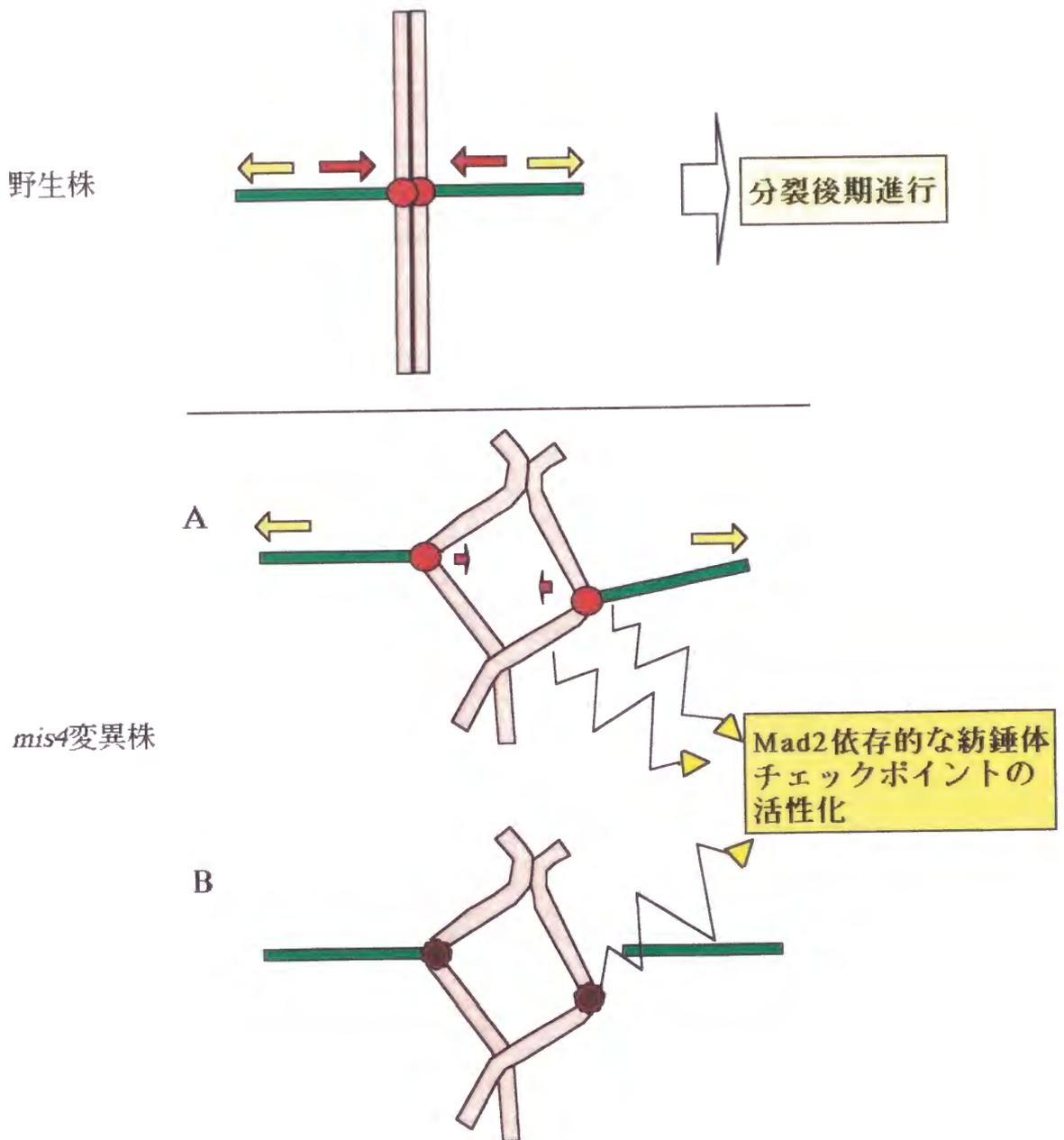


図65 *mis4*変異株ではM期においてMad2依存的な紡錘体チェックポイントが活性化

化する
*mis4*変異株ではMad2依存的な紡錘体チェックポイントが活性化しM期進行遅延を起こす。
 (A) 姉妹染色分体間結合を直接、あるいは間接的にMad2が関知しているのかもしれない。野生株においては分裂中期に両方向性の結合が確立され、動原体微小管から生じる力 (pulling force 黄矢印) とこれに対抗する姉妹染色分体間結合によって生じる力 (opposing force 赤矢印) が釣り合うと思われる。姉妹染色分体間結合によって生じる力が減少しているのをMad2が関知しているのかもしれない。
 (B) *mis4*変異株では動原体機能が低下しているのかもしれない。動原体-動原体微小管の結合がうまくいかず、Mad2依存的な紡錘体チェックポイントが発動するのかもしれない。

もう一つの可能性は*mis4*や*rad21*変異株では動原体微小管-動原体の結合がうまく行かないためMad2依存的な紡錘体チェックポイントが活性化されるのではないかというものである(図65B)。現在、Mad2は動原体微小管-動原体の結合を監視していると考えられており(Waters JC et al., 1998)、高等生物ではBub1キナーゼや、Mad2は微小管の結合していない動原体に局在しているようである(Waters JC et al., 1998)。本研究ではMad2の局在を決定し、分裂酵母においても高等生物とよく似た挙動を示すことを明らかにした。さらに*mis4*変異株においてMad2の局在を見たところM期において一部動原体に結合していると思われる像が観察された。この結果はさらなる解析が必要ではあるものの、*mis4*変異株では動原体微小管-動原体の結合がうまく行かないのが原因でMad2依存的な紡錘体チェックポイントが活性化されるのではないか、という可能性を示唆する。*mis4*変異株や*rad21*変異株は微小管重合阻害剤であるTBZに対し感受性を示した(本研究およびTatebayasi et al., 1998)。*mis4*変異株や*rad21*変異株では微小管が極度に不安定化すると動原体微小管-動原体の結合の効率がさらに落ちるのかもしれない。このモデルとして、*mis4*変異株や、*rad21*変異株では動原体が機能的でないということが考えられる。姉妹染色分体間結合が確立されない動原体が機能を発揮できないのかもしれない。あるいはMis4やRad21は動原体部分の姉妹染色分体間の結合とは独立に動原体そのものの高次構造の構築に機能しているのかもしれない。分裂酵母セントロメア領域には厳密な線対称の一次構造をとっているimr領域と、反復配列に富むotr領域が存在する(Chikashige Y et al., 1989, Murakami S et al., 1991, Takahashi K et al., 1992)。例えば、Mis4やRad21は、姉妹染色分体間の相同配列部分をリンクする因子と考えられるが、セントロメア領域においては姉妹染色分体内の相同配列部分をリンクしているのではないかと考えられる。セントロメア領域は、Mis4やRad21に依存してimr領域がステムループ状に束ねられたような構造をとったり、反復配列が折り畳まれた様な構造をとったりしているのかもしれない。*mis4*変異株や*rad21*変異株ではこれらの構造が構築されないため、機能的な動原体が作られないのではないだろうか。*mis4*変異株や*rad21*変異株における動原体領域のクロマチンの様子をマイクロコッカルヌクレアーゼ処理などで調べてみるのは今後の課題である(Saitoh et al., 1997, Goshima et al., 1999)。

材料と方法

1. 菌株

本研究で用いた主な菌株は次の通り。

<野生株>

972:h-

975:h+

HM123:h- *leu1*

JY6:h+*leu1 his2*

:h- *ura4*

5A:h- *leu1 ura4 ade6-M216*

1D:h+*leu1 his2 ura4 ade6-M210*

<*mis4-242*>

KT8:h- *leu1 ade6-704 mis4-242 CM3112(sup3-5)*

KT45:h- *leu1 mis4-242*

KT47:h- *leu1 his2 mis4-242*

11-2-D:h- *mis4-242*

rad21-K1; 池田日出男先生より供与していただいた。

<遺伝子破壊株>

$\Delta 10$:h-/h+ +/*mis4::ura4⁺ leu1/leu1 his2/+ ade6-M216/M210 ura4/ura4*

なお、取り扱いにはGutz *et al.* (1974) によった。

また大腸菌はMM294を用いた。

2. 培地

酵母の完全培地にはYPD(1%yeast extract,2%polypepton,2%glucose)を、最小培地にはEMM2(Mitchison,1970)を用い、必要に応じてサプリメントを加えた。胞子形成にはSPA(0.1%KH₂PO₄,EMM2培地と同量のvitamine mixture)を用いた。大腸菌にはLB(0.5%yeast extract,1%polypepton,0.5%NaCl)を用いた。寒天培地は1.7%寒天末を加えたものを用いた。

ヒドロキシウレアはnacalai社製のものを用いた。

3. プラスミド

プラスミドの大量調製は、アルカリ法を用い、精製には塩化セシウム密度勾配遠心を用いた(Nishizawa Protocol)。少量調製はboil法(Nishizawa Protocol)を用いた。

pKTプラスミドのクローニングベクターに用いたのはKS(+)(stratagene La jolla CA)である(高橋学位論文)。pKFプラスミドのクローニングベクターに用いたのはSK(-)である。

インテグレーション用のプラスミドには*leu*マーカーのにはpYC11を、*ura*マーカーのにはpYC6を用いた。これらのプラスミドはともに自立複製配列を持たない。

大量発現に用いたベクターには*nmt1*プロモーターを含むpREP1を用いた

大腸菌発現ベクターにはpGEX-1(Pharmacia)を用いた。

4. 形質転換

分裂酵母の形質転換にはリチウム法を用いた(Ito *et al.*,1983)。

大腸菌の形質転換にはカルシウム法を用いた(Maniatis *et al.*,1982)。

5. 塩基配列の決定

塩基配列決定はABI社の373Aを用い、dye-terminator法により行った。templateに用いた欠失プラスミドはTAKARA社のKilo Sequence Deletion Kitを用い、step wise deletion法により行った。

6. オリゴDNAの作製及びPCR法

自動DNA合成装ABI社 392を用いた。イントロン決定のためのPCRに用いたプライマーは次の通り。

10:GGTAAGCAAGACGTTTCAG<4339-4356>

11:CGTTCCAAAGTGCCTATAC<4845-4827>

また、C末へのNotIサイト導入には

14:AGCACTCGAATCCAATGC<4651-4668>

18:AAAGCGGCCGCAGACAACCTGTAAGCTGTTCCCCTTC<[AAANotI]5404-5382>

を、変異部位決定は

19:AAGTTAACTGTCGACGTCCTGAGTGTGATGATGC<[AAHpaI,SaI]4058-4076>

および18

を用いてPCRをおこなった。

N末へのNdeI site導入は

pOP-mis4-401に関しては

20:TTGTCGACATATGGAGATGACACCTGAAAC<[TTHincII,NdeI]368-383>

21:TTGCGGCCGCCCGCGGGTTTCTCCTTGGGTTTCAC<[TTNotI,SacII]868-851>

pOP-mis4-402に関しては

23:CTTGGGTTTCACACATCAACATATG<[TCGACNdeI]844-857>

24:TCGACATATGTTGATGTGTGAACC<861-841[ATG]>

またPCRは本体装置にPERKIN ELMER GeneAmp9600を用い、bufferおよび酵素はPERKIN ELMER Ampli Taqを用いた。反応条件は基本的に47℃1分、70℃1分15秒（1サイクル毎に2秒追加）94℃30秒でおこなった。cDNAをtemplateとしたときはこの反応を2回くり返した。2回目の反応は1回目の生成物を10分の1量くわえておこなった。またtemplateとなるcDNAは（）から供与されたものを用いた。

7. サザンハイブリダイゼーション法

基本的にSambrook *et al.* (1989)に従った。DNAを泳動したアガロースゲルを、0.5 M NaOH、1.5 M NaClに1時間浸したのち、Biodyne A（孔径0.2 mm、ナイロンメンブレン; Pall）へ転写した。そのメンブレンはUV Stratalinker 2400 [120,000 mJ; Strategene]でクロスリンクした。6X SSC、0.5 % SDS、5 % dextran sulfate、5X Denhardt's solution中にて65℃、30分プレハイブリダイゼーションをおこない、プローブDNAをランダムプライム法により、[α -³²P]dCTPで標識したのちハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーションは、100 mg/ml salmon sperm DNAを加えたハイブリダイゼーション溶液中において、65℃で24時間おこなった。また、パルスフィールド電気泳動後のゲルはアルカリ処理の前に0.2N HClにて酸処理を10分おこなった。

8. FACSscanに依るDNA含量の測定

基本的にcostello *et al.*,(1986)と木下典行博士論文（1991）に従った。菌体を回収し蒸留水で洗浄したのちに70 % エタノールで固定した。測定時には5 μ g/ml propidium iodideを加え、測定にはBecton-Dickinson社製のものを用いた。

9. 窒素源枯渇によるG1期増殖停止及びリリース

基本的には、Saka and Yanagida(1993)に従った。EMM2で対数増殖期にある細胞を集菌し、窒素源を抜いた最小培地EMM2-Nで3回洗浄したのち、 2×10^7 Cells/mlの濃度になるようにEMM2-Nに懸濁した。その後、24時間以上許容温度で培養した後、 1×10^6 cells/mlになるよう完全培地に再懸濁し制限温度に移してサンプリングをおこなった。

10. エルトリエーションによる同調培養

Moreno *et al.*,(1989)およびKinoshita *et al.*,(1990)にしたがった。許容温度で培養していた株のうちBeckman社製のerutriator rotorにてG2初期の細胞のみを集め、完全培地に懸濁し制限温度で培養した。

11. DAPI染色、免疫蛍光染色法、FISH法

分裂酵母のDAPI染色はAdachi and Yanagida(1989)によった。免疫蛍光染色及びFISH法は船引博士論文に従った。チューブリン染色はアルデヒド固定でおこなった。GFPによる局在観察にはメタノール固定を用いた。蛍光観察はZeiss Axiophotoを用いた。

12. 遺伝子破壊及び胞子発芽法

基本的にはRothstein(1983)に従った。図()のpKT221のBglII-PstI断片をSK-にサブクローンしpKF222とした。*mis4*遺伝子ORF中のHindIII部位で切り抜き、分裂酵母*ura4*遺伝子で置換したのちblueskriptにサブクローンしpKF230とした。pKF230のSnaBI-SpeI消化産物をリチウム酢酸法(Ito *et al.*, 1983)によりUra⁺二倍体(5A/1D)に形質転換した。安定なUra⁺を示す株についてサザンハイブリダイゼーションを行い、予想通り*mis4*遺伝子が破壊されたヘテロ二倍体株をΔ10とした。

13. パルスフィールド電気泳動

泳動装置はCHEFF DR-IIを用いた。泳動緩衝液には0.5xTBEを使用した。泳動アガロースゲルはFMC SEA KEM LE Agaroseを用い、ゲル濃度は0.6%、パルス時間3600秒、50V、泳動緩衝液温度14℃、泳動時間160時間で泳動した。

泳動サンプルは1%低融点アガロース(FMC InCert Agarose)に包埋した。サンプルは細胞を制限温度で完全培地にて指定時間 1×10^7 cells/mlになるように培養し、200ml回収した。インサートの作製手順は高橋博士論文に従った。

14. 紫外線照射

基本的には坂博士論文に従った。YPD角シャーレ(14cm x 10cm)に $2 \sim 3 \times 10^8$ cellの集菌した対数増殖期にある細胞をまき、26℃または36℃で15分培養した。その後、0J/mxmまたは100J/mxmのUVを照射し、あらかじめ26℃または36℃にあたためておいたYPD液体培地30mlに再懸濁した。36℃におけるこれらの操作は36℃恒温室でおこない、UV照射には36℃恒温室に設置したStratageneのStratalinkerを用いた。再懸濁した細胞をすぐに26℃または36℃にて培養し、UV照射時間を0時間とし、30分あるいは1時間おきに細胞数を測定、同時に一部をグルタルアルデヒド固定した。固定した細胞は、カリコフラワー染色しSI%および細胞長を測定した。

15. 生細胞におけるMis4-GFPの観察

共焦点顕微鏡(MRC-1024)での観察は基本的に齋藤修士論文に従った。励起条件は励起波長：488nm、バリヤフィルター：522DF32、レーザー出力：10%、iris：4.5、Gain：1200。

DNAとの二重染色は基本的にはChikasige *et al.*,(1994)に従った。最小培地中(EMM2+1mg/ml

leucine)で 5×10^5 にある細胞を $2 \mu\text{g/ml}$ のHoechst33342をとかした滅菌水中で15分室温にて低張処理した。その後再び最小培地中で1時間培養したのちサンプリングをおこなった。観察用プレパラートの作製は齋藤修士論文に従った。観察は冷却ccd (Hamamatsu社c5985)で行い、取り込んだ画像はMacintoshコンピューター (Apple社) を使って、コントラストの最適化および、疑似着色をおこなった。

16. *lys1*⁺-GFPの観察

mis4 変異株においてはMKY7A4 (Nabeshima et al., 1998) を、*rad21* 変異株にはMKY7B8 (Goshima et al., 1999) をもちいた。MKY7A4はGFPのシグナルが温度感受性のため、36℃ではシグナルが弱くなり観察できず、33℃で行った。また、非固定で観察したため培地はEMM2を用いた。*mis4*変異株は33℃EMM2培地においても36℃と同じ表現型を示した。ただし、EMM2培地では生育が遅くなるためS期及び分裂期のタイミングが遅くなる (S期終了がリリース後6時間、M期細胞は8時間頃から出現した)。MKY7B8は高温に耐性となるよう、改変されたもの (Goshima et al., 1999) 。

17. 細胞破碎法

船引博士論文を参考にした。破碎バッファーは主にHBバッファーを用いた。Cut2タンパクの検出のみTEEGバッファーを用いた。HB; 25mM Tris-Cl(7.5) 15mM EGTA 15mM MgCl₂ 0.1% NP40 0.1mM NaF 60mM β -glycerophosphate p-nitrophenyl phosphate 1mM DTT、TEEG; 50mM Tris-Cl[pH7.5]、10mM EDTA-Na、10% Glycerol、1mM EGTA。

18. 免疫沈降法

Harlow and Lane 1998を参考にした。

洗浄バッファー (25mM Tris-Cl(7.5) 15mM EGTA 15mM MgCl₂ 0.1% NP40) で膨潤させたPAS (Protein A sepharose, pharmacia) 100 μ lを抗体 (HA; 12CA5, マウス腹水液BABCO, MYC; 9E10) と一時間インキュベートする事で吸着させた。これを一サンプルあたり2mgの細胞粗抽出液と反応させた。

19. H1キナーゼ活性の測定

Moreno et al., 1989、を参考にした。HBバッファー (細胞破碎法の項参照) 中に行った。0.1 μ g/ μ lの細胞粗抽出液を10 μ lにKINバッファー (Histon H1 1 μ l(5mg/ml, Boehringer Mannheim), 2 μ l ATP[1mM], 6.9 μ l HBバッファー, 0.1 μ l [γ -³²P]ATP[10Ci/ μ l]) を加え、22℃、15分反応させた。キナーゼ活性の測定はMolecular Imager (Bio Rad)を用いた。

20. ウエスタンブロッティング

Towbin et al., (1979) に従った。SDS-PAGEをおこなったゲルは、転写バッファー (25 mM Tris、192 mM glycine、20 % methanol [pH 8.4]) 中で、50V4時間、あるいは20V 終夜によりニトロセルロースメンブレン (Toyo Roshi Kaisha) へ転写した。一次抗体は、12CA5 (1/1200希釈)、アフィニティー精製Mis4梅(12wk)抗体 (1/10希釈) を用いた。二次抗体は、HRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (1/500希釈; Bio-rad)、HRP標識ヒツジ抗マウスIg抗体 (1/500希釈; Amersham) を用いた。

21. 融合タンパク質の大腸菌における発現および精製

1) プラスミドの作製

pGSTmis4-301:pKT235のBamHI-EcoRIをpGEX-1(Pharmacia)にサブクローンした。

2) fusion proteinの発現と精製

基本的にPharmacia GST Gene Fusion Systemに従った。GSTmis4-301をDH5 α に形質転換した。その形質転換体を26℃で終夜培養したものを100分の1に希釈した後ODが0.8になったところでIPTGを終濃度が1mMになるように加えて融合タンパクの発現を誘導した。さらに8時間培養した後、集菌した。発現されたタンパク質は不溶性だった。集菌したのちPBSで洗浄して-20℃で凍結。溶解後バッファーA(50mM Tris-Cl pH8.3,2mM EDTA,1mM PMSF,0.1mM DTT,5%glycerol)+0.2mg/ml lysozymeに懸濁し30分氷上で反応させたあとブレンダーで細胞を破碎した。この破碎液を10,000 x g、4℃、10分遠心した後上清を捨てる。ペレットをbufferAに溶かしたのち10秒間超音波でDNAを切断。その後0.5%のNa-deoxycholateをくわえ、氷上に15分おいた後10,000 x g、4℃、10分遠心ペレットを再び0.5% Na-deoxycholate、1% Triton-X100に懸濁したのち10,000 x g、4℃、10分遠心して、そのペレットを回収した。

抗原にはさらに、SDSポリアクリルアミドゲルで泳動し、該当するバンドを切り出してS&S BIOTRAP(Schleicher&Schuell)にて精製した。

22. Mad2-GFP組み込み体の作成

*mad2+*遺伝子のカルボキシル末端にNotIサイトを挿入し、in frameとなるようGFPを挿入した。GFPの3'末端にはnmt polyAを付加させてある。*mad2+*遺伝子のSpeIサイトよりC末端とGFP、polyA配列をインテグレーション用ベクターpYC11にサブクロニングした(pYC11-Mad2G)。pYC11-Mad2Gを野生株に形質転換し、プラスミドを安定に維持することができる株を組み込み体とした。pYC11-Mad2Gが*mad2+*遺伝子座位に組み込まれていることは、 $\Delta mad2$ 株とかけ合わせても組み換え体が取得できないこと、抗GFP抗体のウエスタンブロッティングにより予想通り(約50kd[Mad2 22kd、GFP 30kd])のバンドが出ることで確認した。

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL Third edition. (1994):

Amon, A. The spindle checkpoint. Curr Opin Genet Dev 9 (1 1999): 69-75.

Antonarakis, S. E. 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. Genomics 51 (1 1998): 1-16.

Biggins, S. and A. W. Murray. Sister chromatid cohesion in mitosis. Curr Opin Genet Dev 9 (2 1999): 230-6.

Birkenbihl, R. P. and S. Subramani. Cloning and characterization of rad21 an essential gene of *Schizosaccharomyces pombe* involved in DNA double-strand-break repair. Nucleic Acids Res 20 (24 1992): 6605-11.

Birkenbihl, R. P. and S. Subramani. The rad21 gene product of *Schizosaccharomyces pombe* is a nuclear, cell cycle-regulated phosphoprotein. J Biol Chem 270 (13 1995): 7703-11.

Blat, Y. and N. Kleckner. Cohesins bind to preferential sites along yeast chromosome III, with differential regulation along arms versus the centric region. Cell 98 (2 1999): 249-59.

Caspari, T, Carr, AM. DNA structure checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. Biochimie 81 (1-2 1999): 173-81.

Chen, R. H., J. C. Waters, E. D. Salmon, and A. W. Murray. Association of spindle assembly checkpoint component X_{MAD2} with unattached kinetochores. Science 274 (5285 1996): 242-6.

Chen RH, Shevchenko A, Mann M, Murray AW. Spindle checkpoint protein X_{mad1} recruits X_{mad2} to unattached kinetochores. J Cell Biol 143 (2 1998): 283-95.

Ciosk R, Zachariae W, Michaelis C, Shevchenko A, Mann M, Nasmyth K. An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. Cell 93 (6 1998): 1067-76.

Cohen-Fix O, Peters JM, Kirschner MW, Koshland D. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. Genes Dev 10 (24 1996): 3081-93.

Coleman, T. R. and W. G. Dunphy. Cdc2 regulatory factors. Curr Opin Cell Biol 6 (6 1994): 877-82.

D'Urso, G. and P. Nurse. *Schizosaccharomyces pombe* cdc20⁺ encodes DNA polymerase epsilon and is required for chromosomal replication but not for the S phase checkpoint. Proc Natl Acad Sci U S A 94 (23 1997): 12491-6.

- Ding, R., K. L. McDonald, and J. R. McIntosh. Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindles from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. J Cell Biol 120 (1 1993): 141-51.
- Doree, M. and S. Galas. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. Faseb J 8 (14 1994): 1114-21.
- Enoch, T. and P. Nurse. Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on DNA replication. Cell 60 (4 1990): 665-73.
- Fang, G., H. Yu, and M. W. Kirschner. 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 (12 1998): 1871-83.
- Funabiki, H., I. Hagan, S. Uzawa, and M. Yanagida. Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. J Cell Biol 121 (5 1993): 961-76.
- Funabiki, H., K. Kumada, and M. Yanagida. Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. Embo J 15 (23 1996): 6617-28.
- Funabiki, H., H. Yamano, K. Kumada, K. Nagao, T. Hunt, and M. Yanagida. Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. Nature 381 (6581 1996): 438-41.
- Furuya, K, Takahashi, K, Yanagida, M. Faithful anaphase is ensured by Mis4, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase. Genes Dev 12 (21 1998): 3408-18.
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature 349 (6305 1991): 132-8.
- Gorbsky, G. J., R. H. Chen, and A. W. Murray. Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. J Cell Biol 141 (5 1998): 1193-205.
- Goshima, G., S. Saitoh, and M. Yanagida. Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation. Genes Dev 13 (13 1999): 1664-77.
- Guacci V, Koshland D, Strunnikov A. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. Cell 91 (1 1997): 47-57.
- Hagan, I. M. and J. S. Hyams. The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J Cell Sci 89 (Pt 3 1988): 343-57.
- Hagan, I. and M. Yanagida. Kinesin-related cut7 protein associates with mitotic and meiotic spindles in

fission yeast. Nature 356 (6364 1992): 74-6.

Hartwell, L. H. and T. A. Weinert. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science 246 (4930 1989): 629-34.

Hartwell, L., T. Weinert, L. Kadyk, and B. Garvik. Cell cycle checkpoints, genomic integrity, and cancer. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 59 (1994): 259-63.

He, X., T. E. Patterson, and S. Sazer. The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. Proc Natl Acad Sci U S A 94 (15 1997): 7965-70.

Hennessy, K. M. and D. Botstein. Regulation of DNA replication during the yeast cell cycle. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 56 (1991): 279-84.

Hershko, A., D. Ganoh, V. Sudakin, A. Dahan, L. H. Cohen, F. C. Luca, J. V. Ruderman, and E. Eytan. Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinase cdc2. J Biol Chem 269 (7 1994): 4940-6.

Hirano, T., Y. Hiraoka, and M. Yanagida. A temperature-sensitive mutation of the *Schizosaccharomyces pombe* gene *nuc2+* that encodes a nuclear scaffold-like protein blocks spindle elongation in mitotic anaphase. J Cell Biol 106 (4 1988): 1171-83.

Hirano, T., R. Kobayashi, and M. Hirano. Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. Cell 89 (4 1997): 511-21.

Hirano, T. SMC protein complexes and higher-order chromosome dynamics. Curr Opin Cell Biol 10 (3 1998): 317-22.

Hiraoka, Y., T. Toda, and M. Yanagida. 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 (2 Pt 1 1984): 349-58.

Holloway SL, Glotzer M, King RW, Murray AW. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. Cell 73 (7 1993): 1393-402.

Hoyt, M. A., L. Totis, and B. T. Roberts. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. Cell 66 (3 1991): 507-17.

Hsiao, C. L. and J. Carbon. Characterization of a yeast replication origin (*ars2*) and construction of stable minichromosomes containing cloned yeast centromere DNA (*CEN3*). Gene 15 (2-3 1981): 157-66.

Hwang, L. H., L. F. Lau, D. L. Smith, C. A. Mistrot, K. G. Hardwick, E. S. Hwang, A. Amon, and A. W. Murray. Budding yeast Cdc20: a target of the spindle Science 279 (5353 1998): 1041-4.

Ikeno, M., B. Grimes, T. Okazaki, M. Nakano, K. Saitoh, H. Hoshino, N. I. McGill, H. Cooke, and H. Masumoto. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes Nat Biotechnol 16 (5 1998): 431-9.

Jessberger, R., B. Riwar, H. Baechtold, and A. T. Akhmedov. SMC proteins constitute two subunits of the mammalian recombination complex RC-1. Embo J 15 (15 1996): 4061-8.

Johnston LH, Barker DG, Nurse P. Cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* DNA ligase gene CDC17. Gene 41 (2-3 1986): 321-5.

Kallio, M., J. Weinstein, J. R. Daum, D. J. Burke, and G. J. Gorbsky. Mammalian p53/CDC mediates association of the spindle checkpoint protein Mad2 with the cyclosome/anaphase-promoting complex, and is involved in regulating anaphase onset and late mitotic events. J Cell Biol 141 (6 1998): 1393-406.

Kerrebrock, A. W., D. P. Moore, J. S. Wu, and T. L. Orr-Weaver. Mei-S332, a *Drosophila* protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions [see comments]. Cell 83 (2 1995): 247-56.

Kim SH, Lin DP, Matsumoto S, Kitazono A, Matsumoto T. Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. Science 279 (5353 1998): 1045-7.

Kimura, K. and T. Hirano. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. Cell 90 (4 1997): 625-34.

King, R. W., J. M. Peters, S. Tugendreich, M. Rolfe, P. Hieter, and M. W. Kirschner. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. Cell 81 (2 1995): 279-88.

Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K, Nasmyth K. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. Cell Jul 9; 98 (1 1999): 91-103.

Kumada, K., T. Nakamura, K. Nagao, H. Funabiki, T. Nakagawa, and M. Yanagida. Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. Curr Biol 8 (11 1998): 633-41.

Lengauer, C., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. Genetic instabilities in human cancers. Nature 396 (6712 1998): 643-9.

Li, R. and A. W. Murray. Feedback control of mitosis in budding yeast [published erratum appears in Cell 1994 Oct 21;79(2):following 388]. Cell 66 (3 1991): 519-31.

- Li, Y. and R. Benezra. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. Science 274 (5285 1996): 246-8.
- Li X, Nicklas RB. Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. Nature 373 (6515 1995): 630-2.
- Li X, Nicklas RB. Tension-sensitive kinetochore phosphorylation and the chromosome distribution checkpoint in praying mantid spermatocytes. J Cell Sci 110 (Pt 5 1997): 537-45.
- Li Y, Gorbea C, Mahaffey D, Rechsteiner M, Benezra R. χ MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. Proc Natl Acad Sci U S A 94 (23 1997): 12431-6.
- Losada A, Hirano M, Hirano T. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. Genes Dev 12 (13 1998): 1986-97.
- Lowndes, N. F., C. J. McInerny, A. L. Johnson, P. A. Fantes, and L. H. Johnston. Control of DNA synthesis genes in fission yeast by the cell-cycle gene *cdc10+* [see comments]. Nature 355 (6359 1992): 449-53.
- Maller, J. L. Mitotic control. Curr Opin Cell Biol 3 (2 1991): 269-75.
- Masui, Y. Oscillatory activity of maturation promoting factor (MPF) in extracts of *Rana pipiens* eggs. J Exp Zool 224 (3 1982): 389-99.
- Matsumoto, T., K. Fukui, O. Niwa, N. Sugawara, J. W. Szostak, and M. Yanagida. Identification of healed terminal DNA fragments in linear minichromosomes of *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Cell Biol 7 (12 1987): 4424-30.
- Megee, P. C., C. Mistrot, V. Guacci, and D. Koshland. The centromeric sister chromatid cohesion site directs Mcd1p binding to adjacent sequences. Mol Cell 4 (3 1999): 445-50.
- Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. Cell 91 (1 1997): 35-45.
- Molnar, M., J. Bahler, M. Sipiczki, and J. Kohli. The *rec8* gene of *Schizosaccharomyces pombe* is involved in linear element formation, chromosome pairing and sister-chromatid cohesion during meiosis. Genetics 141 (1 1995): 61-73.
- Moore, D. P., A. W. Page, T. T. Tang, A. W. Kerrebrock, and T. L. Orr-Weaver. The cohesion protein MEI-S332 localizes to condensed meiotic and mitotic centromeres until sister chromatids separate. J Cell Biol 140 (5 1998): 1003-12.
- Murakami, H. and H. Okayama. A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. Nature 374 (6525 1995): 817-9.

- Nabeshima, K., H. Kurooka, M. Takeuchi, K. Kinoshita, Y. Nakaseko, and M. Yanagida. p93dis1, which is required for sister chromatid separation, is a novel microtubule and spindle pole body-associating protein phosphorylated at the Cdc2 target sites. Genes Dev 9 (13 1995): 1572-85.
- Nabeshima, K., S. Saitoh, and M. Yanagida. Use of green fluorescent protein for intracellular protein localization in living fission yeast cells. Methods Enzymol 283 (1997): 459-71.
- Nicklas RB, Campbell MS, Ward SC, Gorbsky GJ. Tension-sensitive kinetochore phosphorylation in vitro. J Cell Sci 111 (Pt 21 1998): 3189-96.
- RB, Nicklas. Chromosome segregation mechanisms. Genetics 78 (1 1974): 205-13.
- Rhind, N. and P. Russell. Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. Curr Opin Cell Biol 10 (6 1998): 749-58.
- Rhind, N. and P. Russell. Tyrosine phosphorylation of cdc2 is required for the replication checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Cell Biol 18 (7 1998): 3782-7.
- Rollins, R. A., P. Morcillo, and D. Dorsett. Nipped-B, a *Drosophila* homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes. Genetics 152 (2 1999): 577-93.
- Saitoh, S., K. Takahashi, and M. Yanagida. Mis6, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation. Cell 90 (1 1997): 131-43.
- Samejima, I. and M. Yanagida. Bypassing anaphase by fission yeast cut9 mutation: requirement of cut9+ to initiate anaphase. J Cell Biol 127 (6 Pt 1 1994): 1655-70.
- Schaak, J., J. Mao, and D. Soll. The 5.8S RNA gene sequence and the ribosomal repeat of *Schizosaccharomyces pombe*. Nucleic Acids Res 10 (9 1982): 2851-64.
- Seitz, L. C., K. Tang, W. J. Cummings, and M. E. Zolan. The rad9 gene of *Coprinus cinereus* encodes a proline-rich protein required for meiotic chromosome condensation and synapsis. Genetics 142 (4 1996): 1105-17.
- Solomon, M. J. Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. Curr Opin Cell Biol 5 (2 1993): 180-6.
- Strunnikov, A. V., V. L. Larionov, and D. Koshland. SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. Journal of Cell Biology 123 (6 1993): 1635-48.
- Sutani, T., T. Yuasa, T. Tomonaga, N. Dohmae, K. Takio, and M. Yanagida. Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. Genes Dev 13 (17 1999): 2271-83.

- Takahashi, K., H. Yamada, and M. Yanagida. Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality. Mol Biol Cell 5 (10 1994): 1145-58.
- Tanaka, T., M. P. Cosma, K. Wirth, and K. Nasmyth. Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms. Cell 98 (6 1999): 847-58.
- Tanaka T, Cosma MP, Wirth K, Nasmyth K. Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms. Cell 98 (6 1999): 847-58.
- Tatebayashi, K., J. Kato, and H. Ikeda. Isolation of a *Schizosaccharomyces pombe* rad21ts mutant that is aberrant in chromosome segregation, microtubule function, DNA repair and sensitive to hydroxyurea: possible involvement of Rad21 in ubiquitin-mediated proteolysis. Genetics 148 (1 1998): 49-57.
- Taylor, S. S. and F. McKeon. Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. Cell 89 (5 1997): 727-35.
- Taylor, S. S., E. Ha, and F. McKeon. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. J Cell Biol 142 (1 1998): 1-11.
- Taylor, S. S., E. Ha, and F. McKeon. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. J Cell Biol 142 (1 1998): 1-11.
- Toda, T., K. Umesono, A. Hirata, and M. Yanagida. Cold-sensitive nuclear division arrest mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J Mol Biol 168 (2 1983): 251-70.
- Toth A, Ciosk R, Uhlmann F, Galova M, Schleiffer A, Nasmyth K. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. Genes Dev 13 (3 1999 Feb 1;): 320-33.
- Uemura, T., H. Ohkura, Y. Adachi, K. Morino, K. Shiozaki, and M. Yanagida. DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. Cell 50 (6 1987): 917-25.
- Uhlmann F, Nasmyth K. Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. Curr Biol 8 (20 1998 Oct 8;): 1095-101.
- Uhlmann F, Lottspeich F, Nasmyth K. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. Nature 400 (6739 1999): 37-42.
- Umesono, K., T. Toda, S. Hayashi, and M. Yanagida. Cell division cycle genes *nda2* and *nda3* of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* control microtubular organization and sensitivity to anti-mitotic benzimidazole compounds. J Mol Biol 168 (2 1983): 271-84.
- Uzawa, S. and M. Yanagida. Visualization of centromeric and nucleolar DNA in fission yeast by

fluorescence in situ hybridization. J Cell Sci 101 (Pt 2 1992): 267-75.

Walworth, N., S. Davey, and D. Beach. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2 [see comments]. Nature 363 (6427 1993): 368-71.

Wassmann, K. and R. Benezra. Mad2 transiently associates with an APC/p55Cdc complex during mitosis. Proc Natl Acad Sci U S A 95 (19 1998): 11193-8.

Waters JC, Chen RH, Murray AW, Gorbsky GJ, Salmon ED, Nicklas RB. Mad2 binding by phosphorylated kinetochores links error detection and checkpoint action in mitosis. Curr Biol 9 (12 1999): 649-52.

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

Yamada, H., K. Kumada, and M. Yanagida. Distinct subunit functions and cell cycle regulated phosphorylation of 20S APC/cyclosome required for anaphase in fission yeast. J Cell Sci 110 (Pt 15 1997): 1793-804.

Yamamoto A, Guacci V, Koshland D. Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol 133 (1 1996): 85-97.

Yamashita, Y. M., Y. Nakaseko, I. Samejima, K. Kumada, H. Yamada, D. Michaelson, and M. Yanagida. 20S cyclosome complex formation and proteolytic activity inhibited by the cAMP/PKA pathway. Nature 384 (6606 1996): 276-9.

Yanagida, M. Fission yeast cut mutations revisited: control of anaphase. Trends Cell Biol 8 (4 1998): 144-9.

Zachariae, W. and K. Nasmyth. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. Genes Dev 13 (16 1999): 2039-58.

Zinn, A. R. Growing interest in Turner syndrome [news; comment]. Nat Genet 16 (1 1997): 3-4.

Chikashige, Y., N. Kinoshita, et al. (1989). "Composite motifs and repeat symmetry in *S. pombe* centromeres: direct analysis by integration of NotI restriction sites." Cell 57(5): 739-51.

Murakami, S., T. Matsumoto, et al. (1991). "Structure of the fission yeast centromere cen3: direct analysis of the reiterated inverted region." Chromosoma 101(4): 214-21.

謝辞

柳田充弘教授に感謝いたします。不肖な私を6年間忍耐強く面倒を見て下さりありがとうございました。6年間お叱りを頂戴してばかりで、時には涙する事もありました。しかしながら、サイエンスとはどういうものなのかということを始め、その素晴らしさ、さらには厳しさを教えていただいたことは何事にも代えられない財産となったと思います。まだまだ未熟な私ですがこの6年間で経験したことを糧に今後の研究生活を続けていこうと思います。

中世古幸信博士から頂いた科学的な知識は非常に新鮮でした。研究の合間の雑談もいい思い出です。足立康久博士には当時4年生の私に研究の基礎を教えていただきました。高橋考太博士には研究を進めていく上での心構えを教えていただきました。時には厳しく、時には親身になって支えて下さりました。近藤祥司さんには一年間隣の席で、研究の相談から人生の相談まで先輩として、親友として（年下の身ですが敢えてそう呼ばせていただきます。）つきあって下さいました。また、本論文を完成させる上で大変お世話になりました。木下和久博士、石井浩二郎博士には研究室だけでなく居酒屋でもお世話になりました。様々な場所で研究の素晴らしさを説いて下さったことはいい思い出です。須谷尚史博士には厳しい目で研究の指導をして下さり非常に頼りになる先輩でした。湯浅達朗君、持田悟君、豊田雄介君、小原隆之君には忙しい中、本論文の作成を手伝っていただき感謝します。同期の建部恒君、そして他の構造研の皆様には公私ともどもつきあって下さり感謝の気持ちでいっぱいです。

挫けそうになったとき慰めてくれ、励ましてくれた、理学部の同期の皆様、京大硬式庭球同好会の皆様に感謝します。また、わがままな私に叱責と経済援助をして下さった両親に感謝いたします。

齋藤成昭博士には研究に詰まったときだけでなく、私事においても親身になって相談に乗って下さりました。愛情にあふれたご指導は構造研での生活で常に心の支えとなりました。最後にこの場を借りて感謝いたします。

平成12年 1月 6日
古谷寛治