

分裂酵母 CENP-C は CENP-A の局在を制限する

須摩 美智子

目次

要旨	3
序論	5
1 細胞周期	5
有糸分裂（高等真核生物）	6
有糸分裂（分裂酵母）	6
2 動原体とセントロメアタンパク質 CENP-A、CENP-B、CENP-C	7
3 染色体の構造とセントロメア	8
4 CENP-A をセントロメア領域に局在させる制御機構は何か	8
結果	10
1 仮説検証のための変異株のスクリーニング方法	10
2 原因遺伝子の単離	11
3 <i>cnp3-1</i> 変異株の表現型	11
4 <i>Cnp3Δ</i> 変異株の表現型	12
5 GFP-Cnp1 の発現が生理的条件である時の <i>cnp3-1</i> 変異株の表現型	12
6 <i>cnp3-1 mis18</i> 二重変異株の表現型	13
7 <i>cnp3-1 mis6-302</i> 二重変異株と <i>cnp3-1 mis16-53</i> 二重変異株の表現型	14
8 <i>cnp3-1mis18-818</i> 二重変異株の染色体のクラスター	14
1. Mis12-mCherry の局在観察	14
2. FISH によるセントロメア領域の検出	15
9 核膜タンパク質と Cnp3 の関係	16
10 ヘテロクロマチンに関与する遺伝子と Cnp1 の局在と Cnp3 の関係	17
考察	19
Cnp3-1 変異型タンパク質の特性	19
<i>cnp3-1</i> 変異株における Cnp1 の集積	20
<i>cnp3-1</i> 変異株における GFP-Cnp1 は何処に局在するのか	21
Cnp3-1 はどのように Cnp1 を認識しているか	22
ヒト CENP-C の機能	22
材料と方法	24
参考文献	28
謝辞	35

要旨

動原体は微小管の結合領域であり、染色体の均等分配に必須な構造体である。ヒストン H3 のバリエーションである CENP-A は、動原体形成に重要な役割を持ち、進化的に保存されたタンパク質である。CENP-A の局在は、多くの真核生物において染色体上のセントロメア領域に限定されているが、CENP-A はセントロメア以外の領域に局在した場合、その場にセントロメアを形成するネオセントロメア現象が報告されている。ネオセントロメアは、染色体の分配異常をはじめ、様々な疾患の原因となることから、不要な CENP-A の局在は排除される必要があると考えられる。

本研究は、分裂酵母を用いて CENP-A(分裂酵母 Cnp1)の局在を非セントロメア領域から排除する機構を明らかにすることを目的として行った。Cnp1 を過剰発現させると野生型と異なる Cnp1 の局在を示し、かつ高温感受性を示す変異株取得するためにスクリーニングを行なったところ、動原体タンパク質である CENP-C (分裂酵母 Cnp3) が原因遺伝子として単離された (*cnp3-1* 変異株)。*cnp3-1* 変異体は Cnp1 過剰発現下で高温感受性を示し、制限温度 36℃では GFP-Cnp1 の局在が核全体に見える細胞や、核内に複数点観察される細胞が存在した。野生型 Cnp3 タンパク質は、Cnp1 と共にセントロメア領域に局在することが知られている。蛍光顕微鏡観察により、Cnp1 過剰発現における変異型タンパク質 Cnp3-1 の局在を観察したところ、許容温度 26℃では Cnp1 と共にセントロメアへの局在が観察された。しかし、制限温度 36℃では、その局在がセントロメアから消失することが分かった。

通常の Cnp1 発現下における *cnp3-1* 変異株の形質を観察すると、温度感受性は示さないが、Cnp1 のみならず、変異型タンパク質 Cnp3-1 のセントロメア領域の局在が減少していることが分かった。次に、*cnp3-1* 変異株において Cnp1 をセントロメアに局在できなくすると、その局在がどのように見えるのか調べた。このため *cnp3-1* 変異株と、Cnp1 をセントロメアにリクルート出来ない *mis18-818* 変異株との 2 重変異株 (*cnp3-1mis18-818*) を作製した。すると、Cnp1 の局在が核内に複数点観察された。分裂酵母の染色体は 3 本あるが、3 つの動原体はクラスターを形成するため、通常 Cnp1 は核内に 1 点観察され、M 期中期のみ 3 点観察される。*cnp3-1mis18-818* 変異株で見られたこの局在は染色体のクラスタリングが崩壊していることに起因するのか、或いはセントロメア以外の領域に局在するか確かめるために、Cnp1 の局在に非依存的である動原体タンパク質 Mis12 に着目し、*cnp3-1mis18-818* 変異株における Mis12 の局在を調べた。その結果、*cnp3-1mis18-818* 変異株では Mis12 は核内に 1 点のみ観察された。またセントロメア領域のプローブを用いて FISH を行ったところ、Mis12 と同様にプローブも核

内に1点のみ観察された。これらのことから、*cnp3-1mis18-818* 変異株で複数点観察される Cnp1 の局在は、クラスタリング異常によるものではなく、セントロメア以外の領域に存在することが示唆された。

これらの結果から、*cnp3-1* 変異株においてセントロメア領域に局在出来ない Cnp1 が細胞内に多く存在する場合、Cnp1 の局在は本来の局在領域と異なる領域に入り込みやすいことが示唆された。また、変異型タンパク質 Cnp3-1 は Cnp1 と共局在する結果から、変異型タンパク質 Cnp3-1 はセントロメア以外の領域に局在する Cnp1 を安定化する働きを持つことが示唆された。以上のことから、野生型の Cnp3 は Cnp1 の局在をセントロメア領域に限定させ、ネオセントロメアの形成を防ぐ役割を担っているのではないかと提唱した。

序論

1 細胞周期

生物は自己複製することで、新たな細胞を生み出す。自己複製する際には、自己の DNA を複製させて細胞分裂を行う（図 1）。一つの細胞から 2 つの細胞に分裂する一連のサイクルを細胞周期と呼ぶ。細胞周期には S、M、G1、G2 と呼ばれる時期が存在する。細胞は分裂する前に自身の DNA を複製する S (Synthesis) 期を経て娘細胞へと DNA を分配する M (mitosis) 期に入る。M 期と S 期の間に G1 (Gap1) 期、G2 (Gap2) 期と呼ばれる時期があるが、生物種により Gap の期間が異なる。酵母は G1 期が短く G2 期が長い、ヒトは G1 期の方が G2 期よりも長い。G1 期は、S 期に入る前に自己複製を続けるか判断するために必要な時期である。例えば栄養飢餓状態にあり、自己複製が出来ないと判断されると G 0phase (休止期) と呼ばれる時期に入り、分裂をしない。M 期は細胞周期の中で染色体の分配と細胞質分裂が起こる時期である。高等真核生物で起こる M 期は更に前期、前中期、中期、後期、終期に分類されている。また、ヒトの M 期では核膜の崩壊が起こるが、分裂酵母では核膜の崩壊が起こらない。細胞周期の進行は厳密に制御されており、細胞周期を進行するかどうかを制御する 4 つのチェックポイント、G1/S 期チェックポイント、G2/M 期チェックポイント、DNA 複製チェックポイント、M 期チェックポイントの機能が備わっている。G1/S 期チェックポイントは開始点とも言われている。G1/S チェックポイントは G1 期中期から後期への移行を制御しており、この時期に細胞の成長が不十分な場合や DNA の損傷が起こると、G1 期で細胞周期が停止する。G2/M 期チェックポイントも DNA の損傷修復が未完成な場合に細胞周期が進行しないように制御しているチェックポイントである

(Rhind N and Russell P 1998)。DNA 複製チェックポイントは、DNA を複製する際に誤った複製が生じると G2 期で細胞周期を停止させるチェックポイントである。M 期チェックポイントは染色体と紡錘糸の結合が不十分なうちに染色体分配が起こらないよう制御しているチェックポイントである。全ての染色体の動原体と紡錘糸が結合しないうちに染色体が分配されると、染色体の不均等分配や異数体を生じる原因となる。スピンドルチェックポイントはこのような事態を避けるために働いている。このように、細胞周期は 4 つのチェックポイント機能を備えることにより、正確に DNA を複製し、染色体の均等な分配が出来るようなシステムを有している。次にヒトと分裂酵母における M 期のイベントについて述べる(図 2)。

有糸分裂期(高等真核生物)

前期：クロマチンが凝縮し、個々の染色体が識別出来る。S 期に複製された中心体が両極に別れ、その間に紡錘糸を形成する。中心体は2つの円筒状の中心小体と呼ばれる構造が L 字型に配置した構造をとるものと、中心小体周辺の中心小体周辺物質から構成されており、微小管形成中心として機能する（図3）。

前中期：核膜が崩壊し、中心体と染色体間を結ぶ動原体微小管が動原体を捕捉し、紡錘糸と染色体が相互作用する。この相互作用により、後に続く中期で **metaphase plate** と呼ばれる細胞の中央に染色体を整列させる事や、染色体を両極に引っ張ることが可能となる。また、動原体微小管と動原体が正しく結合しなければ、染色体の不均等分配を起こす原因となるため、両極に存在する紡錘体から双方向性結合（アンフィテリックな結合）が確立されることが重要となる（図4）。動原体はこの双方向性結合を確立するために、動原体微小管が1対の姉妹染色分体に結合することを保証する重要な役割を果たすと考えられている。動原体を構成するタンパク質に異常が起きると、染色体と動原体微小管の結合が正常に起こらず、メロテリック結合（姉妹動原体の片方の動原体が微小管と結合した状態）やシンテリック結合（両方の姉妹動原体に片方の紡錘体極から伸びた微小管が結合した状態）、メロテリック結合（姉妹動原体の片方の動原体が両方の紡錘体極から伸びた微小管と結合した状態）が起こる。

中期：全ての染色体上の動原体と紡錘糸が結合し、中期板に並ぶ。

後期：姉妹染色分体が解離する

終期：細胞が分裂し、核膜が形成され始める。染色体は再び脱凝縮する

有糸分裂期（分裂酵母）

分裂酵母における M 期は、高等真核生物の中心体に相当する SPB スピンドル極体の距離の変化により3段階に分類されている(図2)。

Phase1. 紡錘糸形成期と言われており、SPB が複製されて分離し、SPB 間に紡錘糸が形成される。M 期の前期に相当する。

Phase2. 紡錘糸長一定期と言われ、M 期の全中期、中期後期に相当する。紡錘糸の長さは $2\sim 3\mu\text{m}$ で一定している。染色体が紡錘糸に沿って運動し、姉妹染色分体が分離する。

Phase3. 紡錘糸伸長期で、後期に相当する。紡錘糸が細胞の両極まで伸長し、染色体のセントロメアは SPB 付近に観察される。

2. 動原体の構造とセントロメアタンパク質 CENP-A、CENP-B、CENP-C

セントロメアは染色体の均等分配に必須なシス因子である。有糸分裂において、セントロメアには紡錘糸の接続部位である動原体が構築される。動原体は多くのタンパク質が集合した構造体であり、内層、中間層、外層の三層構造を取っている。内層には CENP-A、CENP-C が局在する。中間層は CENP-A のリクルート因子である Mis6 (ヒトでは CENP-I) 複合体が局在する。中間層に位置するタンパク質群は細胞周期を通してセントロメアに局在することから、CCAN (constitutive centromere associated network: 構成的動原体タンパク質群) と呼ばれている。この CCAN は、動原体の土台を形成する役割を持つ(図 5)。外層は分裂酵母で動原体タンパク質として報告された Mis12 タンパク質や微小管と結合して、活性を持つと報告されている Ndc80 複合体タンパク質などが局在する。セントロメアに局在するタンパク質、CENP-A、CENP-B、CENP-C は、CREST と呼ばれる自己免疫不全患者の血清の中の抗体が認識するタンパク質として発見された (Ernshaw, W.C. et al 1985)。CREST とは自己免疫疾患の症状から、その病名の頭文字を取った総称である。C: calcium deposit (石灰沈着)、R: Raynaud phenomenon (指先が青白くなり痺れる)、E: Esophageal, dysfunction (食道の機能障害)、S: Sclerodactyly (皮膚硬化)、T: Telangiectasia (毛細血管拡張症、皮膚に小さな斑点が出る)。1987 年から 1994 年の間に CENP-B、CENP-C、CENP-A がクローニングされた。CENP-A (分裂酵母は Cnp1 と表記す) は酵母からヒトまで保存されているヒストンタンパク質で、ヒストン H3 のバリエーションであり(図 7)、動原体形成に必須である。CENP-B は(分裂酵母は Abp1、Cbh1、Cbh2 の 3 つの CENP-B ホモログが報告されている) トランスポゾンの発現抑制に関与していることが報告されている (Daulny A, et al 2016)。そして CENP-C は、ヒト、マウスで DNA および CENP-A に結合し、動原体との接続に必須であることが報告されている。分裂酵母の CENP-C (Cnp3 と表記) はカルボキシ末端 (C 末端) 側に CENP-C モチーフ、そのモチーフより更に C 末端側に Mif12 のホモログ領域を持つ。これまでの報告によると、Cnp3 の N 末端側では Sim4 複合体、Mde4 複合体と結合し、C 末端側では Moa1 と結合することが知られている。N 末端側の複合体との結合は、動原体や微小管との結合に関与し、Moa1 との結合は減数分裂に必要であることが知られている (Tanaka, K. et al 2009)。

3. 染色体の構造とセントロメア

染色体はヒストン（H2A、H2B、H3、H4）と呼ばれる 8 量体から成るタンパク質に 147bp の DNA が左巻きに巻きついた構造をしており、これをヌクレオソームと呼ぶ（図 6 A）。ヌクレオソームはおよそ 200bp 毎に形成され、これが幾重にも折りたたまれクロマチン構造を形成する（図 6 B）。クロマチンはより凝縮した構造を持つヘテロクロマチンと、弛緩した構造を持つユークロマチンがあり、前者は転写が抑制されており、後者は転写が起こっている領域である。染色体上で動原体が形成される領域をセントロメア領域と呼ぶ。セントロメア領域の大きさと塩基配列は生物種間で保存性が見られない。線虫やチョウ目（害虫と称されているガなど）は、染色体全体に動原体が分散するホロセントリック染色体を持つ。一方で出芽酵母のセントロメア領域は 125bp でヌクレオソーム一つ分の大きさしかない点セントロメアを形成している。その他の生物では領域型セントロメアを形成することが知られている。分裂酵母のセントロメア領域は 30～110kbp にわたって **cnt** (**center**: 対称構造のない中央領域) 領域を中心に **imr** (**inner most repeat**: 対称な配列を持つ中央領域)、**otr** (**outer repeat**: **dg**、**dh** という配列が反復した配列を持つ領域) を持っている(図 3)。分裂酵母は 3 本の染色体を持ち、**imr** と **otr** は各セントロメアで特異的な配列から構成されており、**otr** は各セントロメアに共通に存在する反復配列からなる。ヒトでは α サテライト DNA と呼ばれる 171bp から成る配列がセントロメア領域で 200～9000kbp に渡って反復している。

4. CENP-A をセントロメア領域に局在させる制御機構は何か

CENP-A は一部ホロセントリックな染色体を持つ生物種を除き、多くの真核生物ではセントロメア領域にのみ局在する。いかなるメカニズムで CENP-A の局在をセントロメア領域 1 箇所に限定するかは、未だに不明である。

CENP-A の局在に関してこれまでに報告されていることは、CENP-A にはリクルート因子が存在することである。分裂酵母においては Cnp1 のセントロメアへのリクルートに mis6/Sim4、mis16/mis18、Scm3 などが必要であることが報告されている(Hayashi, et al 2004、Pidox AL. et al 2009)。また、CENP-A が局在する近傍はヘテロクロマチン化されていることが報告されている

(Folco H.D, et al 2008)。CENP-A の取り込みに関して、セントロメア領域の DNA 配列は生物種間で類似性がない。また、ヒトにおいては癌や発達遅延患者の細胞から、セントロメア以外の領域に CENP-A が取り込まれ、そこに動原体が形成されるネオセントロメア現象の報告がある (David J. Amor et al 2002、Voullaire, L. et al. 1999)。このように、動原体が構築される領域が染色体上の 1 箇所に限定されることは、細胞分裂や個体形成において非常に重要である。

ネオセントロメア が出来ることから、CENP-A のリクルート因子だけでは、CENP-A の局在をセントロメア領域に限定することは出来ないと推察する。そこで、非セントロメア領域に取り込まれた CENP-A を排除する機構を仮定した(図 8)。本研究は、この仮定を検証することを目的としてスタートした。分裂酵母を用いて CENP-A が非セントロメア領域にも局在する変異株 (*cnp3-1*) を単離した。*cnp3-1* 変異株の原因遺伝子はヒト CENP-C の相同体 (Cnp3) をコードする。本研究では *cnp3-1* 変異株の表現型を解析することで、Cnp3 タンパク質の機能を理解することを目的とした。

結果

1. 仮説検証のための変異株のスクリーニング方法

非セントロメア領域から Cnp1 を排除する機構の存在を検証するため、染色体上の様々な領域に Cnp1 を取り込む変異株（Cnp1 を非セントロメア領域から排除出来ない変異株）を取得し、解析するアプローチを取ることにした。セントロメア以外の領域にも Cnp1 を取り込ませるために、細胞内の Cnp1 の発現量を上げ、染色体に Cnp1 を取り込ませやすい状況を作ることが必要と考えた。そこで、nmt プロモーターを使用した。nmt プロモーターは人為的に遺伝子を強制発現させることの出来るプロモーターで、nmt1>nmt41>nmt81の順に発現が強い。また、nmt プロモーターは Thiamine を用いて nmt プロモーター下流に繋がれた遺伝子の発現を制御出来るプロモーターで、Thiamine 存在下では nmt プロモーターの働きが抑制され、下流の遺伝子の発現が抑制される。Thiamine 存在下 (+Thi) と、Thiamine が無い(-Thi)場合で GFP-Cnp1 の発現を ON と OFF に出来る系を構築した。

野生型の株に nmt1GFP-cnp1 の配列を組み込んだ後、変異誘発剤である NTG (nitrosoguanidine) で変異処理を施し、変異株ライブラリーを作成した。

Cnp1 が染色体に過剰に取り込まれると、動原体が複数構築され、染色体分配に異常が起き、生育阻害を起こすことが予測された。これらのことを踏まえ、次の条件を満たす変異株を取得した。

- 1) GFP-Cnp1 発現依存的に温度感受性を示す
- 2) ヒストン H3 の過剰発現では温度感受性を示さない
- 3) GFP-Cnp1 の局在が野生型と比較して異常を示す
- 4) 染色体分配（核分裂）に異常を起こす

およそ 2 万変異株から上記の条件を満たす株を検定し、16 株に絞り込んだ。16 株は単一遺伝子変異であるか調べるため、野生型と交配する戻し交配を行った。また、変異点が同一のものが無いか調べるため、変異株同士の交配も行った。16 株の中から GFP-Cnp1 の局在が野生型と異なる株を 5 株に絞り込んだ。この 5 株は CSM (cnp1 sensitive mutant) 変異体と命名し、*csm18-2*、*csm32-8A*、*csm32-8B*、*csm9-59*、*csm10-60* をクローニングの候補とした。

高温感受性が弱い株を選択してしまうと、ゲノムライブラリーを形質転換後、高温感受性の相補が分かりにくいため、5 株のうち高温感受性が最も強い *csm10-60* を選択し、原因遺伝子を明らかにするためにゲノムライブラリーを変異株に形質転換した。高温感受性が相補されたコロニーを取得し、取り込まれたプラスミドに含まれる遺伝子が何か調べた。

2. 原因遺伝子の単離

高温感受性が相補された *csml0-60* 変異株のコロニーからプラスミドを回収したところ、動原体タンパク質をコードする *cnp3*⁺を含むプラスミドが単離された。分裂酵母のゲノムライブラリーを鋳型に *cnp3*⁺を PCR で増幅し、*cnp3*⁺のみをプラスミドに持たせ、*csml0-60* に形質転換したところ、高温感受性が相補された(図 9)。

次に *csml0-60* 変異株のゲノム DNA を鋳型に *cnp3* をクローニングし、*cnp3* のシーケンスを行った。分裂酵母のゲノムデータベース (pombase: <https://www.pombase.org/>) より、*cnp3*⁺の配列を比較したところ、508 番目のアミノ酸がセリン (S) からフェニルアラニン (F) に置換していることが分かった。*Cnp3* には C 末端寄りに CENP-C モチーフと Mif2 ドメインを持つが、508 番目のセリンは進化的に保存されていない領域である(図 10A)。これより、*cnp3*⁺遺伝子に温度感受性を相補される *csml0-60* 変異株を *cnp3-1* 変異株と表記し、変異型 *Cnp3* タンパク質を *Cnp3-1* と表記する。

3. *cnp3-1* 変異株の表現型

cnp3-1 変異株は GFP-*Cnp1* を過剰発現すると 36 °C で高温感受性を示す。その一方で *Cnp1* と類似性の高いヒストンタンパク質 H3 を過剰発現しても高温感受性は示さない(図 10B)。次に、顕微鏡 (Δ vision) で *cnp3-1* 変異株の GFP-*Cnp1*、*Cnp3-1* の局在を観察した。*Cnp3-1* は C 末端に mCherry のタグをつけて可視化した。26 °C で EMM+Thiamine 培地で前培養したのち、thiamine を取り除くため、EMM 培地で 3 回細胞を洗浄した。その後 *nmt* プロモーターからの GFP-*Cnp1* を発現誘導させるため 26 °C で 20 時間培養した。20 時間後、36 °C にシフトアップして 6 時間培養した(図 11A)。*cnp3-1* 変異株は細胞分裂に 4~5 時間かかるため、36 °C にシフトしてから最低 1 回は細胞周期を 1 周させるために 6 時間培養した。*cnp3-1* 変異株における GFP-*Cnp1* の局在は 26 °C で野生型と同様に核内にシグナルが 1 点観察されるが、36 °C では核全体が緑色に光って見える細胞や GFP-*Cnp1* のドットが複数見られる細胞が観察され、大小不均等な核を持つ細胞も観察された(図 11B 矢印)。

Cnp3-1mCherry の局在は 26 °C で野生型と同様に核内に 1 点のみ観察されるが、36 °C では mCherry のシグナルが観察されなかった(図 11B)。

また、GFP-*Cnp1* と *Cnp3*、*Cnp3-1* の細胞内での GFP-*Cnp1*、*Cnp3*、*Cnp3-1* レベルを確認するためにウェスタンブロットを行った。GFP-*Cnp1* は GFP 抗体を用い、*Cnp3*、*Cnp3-1* については HA タグを繋げた株を用い、HA 抗体を使用した。その結果、+Thiamine (+Thi)、-Thiamine (-Thi) 共に *cnp3-1* 変異株は 26 °C、36 °C 共に野生型よりも GFP-*Cnp1*、*Cnp3-1HA* の減少が見られた(図 12)。

4. *Cnp3* Δ 破壊株の表現型

Cnp3 には *Cnp3* 破壊株(*cnp3* Δ)が存在する。*cnp3* Δ 破壊株では GFP-*Cnp1* の局在はどのように見られるのだろうか？*cnp3-1* 変異株の表現型と比較するため、*cnp3-1* 変異株と *cnp3* Δ 破壊株における GFP-*Cnp1* の局在を観察した。*cnp3* Δ は 26 °C で生育しないため、30 °C で培養した。*cnp3* Δ 破壊株で GFP-*Cnp1* を過剰に発現させた場合、GFP-*Cnp1* のシグナルは WT と同様に 1 点のみ観察される細胞と、GFP シグナルが細胞内に散在した様な細胞が多く観察された (図 13)。また、36 °C で GFP-*Cnp1* のシグナルが何点見えるか測定した (図 14A)。GFP のシグナルにおいて、*cnp3-1* 変異株は複数点見える細胞が 30%であるのに対し、*cnp3* Δ 破壊株は複数点見える細胞は観察されなかった。GFP-*Cnp1* が 2 点見える細胞は観察されたが、これは分裂期の可能性もある。更に細胞内で GFP-*Cnp1* が発現しているか確認するためにウェスタンブロットを行った (図 14B)。WT、*cnp3-1* 変異株、*cnp3* Δ 破壊株で同程度の GFP-*Cnp1* の発現が確認された。ここまでで、*cnp3* Δ 破壊株における細胞内の GFP-*Cnp1* は *cnp3-1* 変異株と異なることが分かった。このことから、*cnp3-1* 変異株で GFP-*Cnp1* の局在が異常を示すのは、*cnp3-1* 変異株特有の表現型であることが示唆された。*cnp3-1* 変異株は GFP-*Cnp1* を染色体上に取り込みやすくする機能を持つのかもしれない。

5. GFP-*Cnp1* の発現が生理的条件である時の *cnp3-1* 変異株の表現型

次に、GFP-*Cnp1* の発現レベルが生理的な条件下にある場合 (過剰発現させない場合)、*cnp3-1* 変異株はどのような表現型を示すか調べた。*cnp3-1* 変異株は GFP-*Cnp1* を過剰発現させると温度感受性を示すが、YPD、YES、EMM のそれぞれの培地でスポットテストをしたところ、GFP-*Cnp1* を過剰に発現しない場合でも、EMM 培地では野生型より生育が悪い結果となった (図 28)。図 10B では GFP-*Cnp1* の発現を抑えた時に温度感受性は示していないが、*nmt* プロモーターを持たない *cnp3-1* 変異株では EMM で生育が野生型より悪くなることから、遺伝子型の違いが影響しているかもしれない (図 28 EMM 培地のスポットテスト、材料と方法の菌株参照)。完全培地 YE を用いて培養し、26 °C と 36 °C の表現型を観察した所、GFP-*Cnp1* の局在は WT とほぼ同じ局在を示した。しかし、36 °C で 24 時間培養すると、*cnp3-1* 変異株は不均等な核が観察され、GFP のシグナルも WT のシグナルより弱かった (図 15A)。*cnp3-1* 変異株が不均等分配を起こす割合は 36 °C で 20%、GFP-*Cnp1* のシグナルが複数見える細胞は 10%未満だった (図 15B)。一方で *Cnp3*-mCherry のシグナルは GFP-*Cnp1* 過剰発現時と同様に、WT は 1 点シグナルが観察されるのに対し、*cnp3-1* 変異株は 36 °C で殆ど *Cnp3*-mCherry のシグナルが観察されなかった。そこで、GFP タグを C 末端に繋げた *Cnp3*-GFP、*Cnp3-1*-GFP を

用いて、セントロメア領域 (cnt、imr、dg 領域 図 16A) のクロマチン免疫沈降を行った。26 °C と 36 °C の両方で Cnp3-1-GFP はセントロメア領域における局在が減少していることが分かった (図 16B)。この時の Cnp3-GFP の発現レベルを調べるため、ウェスタンブロットを行った (図 16C)。野生型と比較して *cnp3-1* 変異株の GFP-Cnp1 は 36 °C で減少していた。

では、Cnp3-1 のセントロメア局在が減少しているならば、Cnp3-1 のセントロメア結合能力は下がっているのだろうか？Cnp3 はアミノ酸配列の 416-613 番目がセントロメア領域との結合に必要であると報告されている (Tanaka et al. 2009)。Cnp3-1 はセントロメアの結合能があるのか調べるため、*cnp3-1* 変異株の変異点 (508 番目) を含む領域と、その C 末端に GFP タグを付け、*nmt81* プロモーターを持つプラスミド pREP81 に繋ぎ、WT の細胞内で発現させた (図 17A)。また、クラスターが形成されるセントロメア付近の SPB を可視化するため、Sad1-mCherry も WT の細胞に組み込んだ。WT 内で発現した Cnp3-GFP は 26 °C と 36 °C の両方で GFP のシグナルが 1 点観察され、Sad1-mCherry とともに共局在したが、Cnp3-1GFP は 36 °C で GFP のシグナルが観察されず、Sad1-mCherry のみ観察された (図 17B)。また、ウェスタンブロットにより、細胞内で Cnp3-GFP が発現しているか確認したところ、Cnp3-1-GFP の方が WT より発現量は減少していた (図 18)。

更に、セントロメア機能への影響を調べるために、人工染色体の脱落頻度を温度別に調べたところ、*cnp3-1* 変異株は 36 °C で顕著に脱落頻度が上がった (表 1, 図 19)。この結果から、Cnp3-1 はセントロメア結合能が WT より落ちており、染色体分配に異常を起こしていることが示唆された。

6. *cnp3-1 mis18-818* 二重変異株の表現型

cnp3-1 変異株は 36 °C で GFP-Cnp1 を過剰発現すると複数のシグナルが観察された。そこで、Cnp1 が細胞内に過剰に存在すると Cnp3-1 は Cnp1 をセントロメア以外の領域に局在させるのではないかと考えた。GFP-Cnp1 を生理的な条件下で発現させた状態でこの仮説を検証するためには、セントロメアに取り込まれる Cnp1 を減少させることが必要と考え、Cnp1 のリクルート因子である Mis18 に着目した。*mis18* 変異株は、36 °C で Cnp1 をセントロメアにリクルートすることが出来ず、不均等分配を起こすことが知られている

(Hayashi et al. 2004)。この時、*cnp3-1* 変異株の細胞内では、セントロメアに局在せず染色体上に取り込まれない GFP-Cnp1 が一時的に増えると思われる。そこで、*mis18-818* 変異株と *cnp3-1* 変異株の二重変異株を作成した (図 20)。*cnp3-1 mis18-818* の二重変異株を完全培地 YE で細胞培養し、顕微鏡観察を行った (図 21A)。すると、二重変異株の顕微鏡観察では、GFP-Cnp1 の局在が 36 °C で複数のドットとして観察された (図 21B)。GFP-Cnp1 のウェスタ

ンブロットを行ったところ、*cnp3-1 mis18* 二重変異株における GFP-Cnp1 の発現量は WT より減少していた(図 22A)。また、GFP-Cnp1 のドットが複数点見える細胞の割合をグラフで示した(図 22B)。2 点見える細胞が最も多く、続いて 3 点、4 点見える細胞が存在した。分裂酵母は 3 本の染色体がクラスターを形成しているので、GFP-Cnp1 が 3 点見えるのはクラスターが崩壊している可能性もあるが、4 点見えるということは、セントロメア以外の領域に GFP-Cnp1 が局在していることが考えられる。*cnp3-1 mis18-818* の二重変異株のセントロメア領域における GFP-Cnp1 のクロマチン免疫沈降(ChIP)を行った所、*cnp3-1* 変異株、*mis18* 変異株、*cnp3-1 mis18* の二重変異株でセントロメア領域の GFP-Cnp1 の局在が減少しており、なかでも *cnp3-1 mis18* の二重変異株がかなり減少していた(図 23、24)。この結果からも、*cnp3-1 mis18-818* の二重変異株は、セントロメア以外の領域に GFP-Cnp1 が局在することが示唆された。次に、36 °C での Cnp3-mCherry、Cnp3-1-mCherry の局在観察を行なった。*cnp3-1* 変異株は、Cnp3-1-mCherry のシグナルがかなり弱くなっていた(図 25)。恐らくセントロメアの結合能力は下がっているからだろう。*cnp3-1 mis18* 二重変異株では、Cnp3-1-mCherry と GFP-Cnp1 が共局在する様子が観察された。この結果から、Cnp3-1 はセントロメア局在が減少しても、Cnp1 と共局在していることが分かった。

7. *cnp3-1 mis6-302* 二重変異株と *cnp3-1 mis16-53* 二重変異株の表現型

Cnp1 のリクルート因子の変異株ならば、*cnp3-1 mis18-818* の二重変異株と同様の表現型が見られるかを調べるために、*mis6-302 cnp3-1*、*cnp3-1 mis16-53* の二重変異株を作製し、表現型を観察した。

cnp3-1 mis18 の二重変異株と同様に、*mis6-302 cnp3-1*、*cnp3-1 mis16-53* の二重変異株は 36 °C で GFP-Cnp1 のシグナルが複数のドットとして観察された(図 26、27)。スポットテストにより生育の様子を観察したところ、二重変異株で発育阻害が観察された(図 28)。

8. *cnp3-1 mis18-818* 二重変異株の染色体のクラスター

1) Mis12-mCherry の局在観察

cnp3-1 mis18-818 二重変異株および、Cnp1 のリクルートに関与する因子と *cnp3-1* 変異株の二重変異株では、36 °C で GFP-Cnp1 の局在がマルチドット状に観察された。これは、染色体上の様々な領域に GFP-Cnp1 が局在するのか、それとも染色体のクラスターが崩壊し、3 本の染色体がばらばらになり、GFP-Cnp1 が複数見られるのかを調べるために、Cnp1 の局在に依存しない動原体タンパク質 Mis12 の C 末端に mCherry のタグを付け、Mis12-mCherry の

局在を観察することにした。通常、WTにおける分裂酵母では3本の染色体のセントロメア領域が核膜にテザーリングされ、3つの動原体が束になり、1点に観察される。M期の中期のみ、3本の染色体が赤道面に並ぶと動原体は3点観察される。

もし二重変異株で染色体のクラスタリング構造が壊れていれば、Mis12-mCherryの局在も複数点（～3点）観察されることが予測される。

WT、*cnp3-1* 変異株、*mis18-818* 変異株、*cnp3-1 mis18-818* 変異株の染色体上に *mis12-mCherry* が組み込まれている (integrant) 株を作製し、顕微鏡観察を行った。培養条件は、EMM 培地を用いて 26 °C で培養した後、36 °C にシフトアップして6時間培養しメタノール固定を行った。ライブ観察では *mCherry* の減衰が激しかったためメタノール固定を行った。

26 °C では GFP-Cnp1、Mis12-mCherry とともに細胞内に1点のみ共局在する様子が観察された(図 29)。36 °C では *cnp3-1 mis18-818* の二重変異株で GFP-Cnp1 がマルチドットとして観察されるのに対し、Mis12-mCherry は1点のみ観察された。また、マルチドット状に見える GFP-Cnp1 のうちの1点と Mis12-mCherry が共局在する細胞と、全く共局在しない細胞が観察された(図 30)。

Mis12-mCherry の局在が1点に見えたことから、染色体のクラスタリング構造は保たれていると考えられる。また ChIP の結果も併せて考慮すると、GFP-Cnp1 は染色体上のセントロメア以外の領域に取り込まれていると考えられる。

さらに、*mis18* 変異株には別の遺伝子座に変異を持つ *mis18-262* 変異株が存在する。*mis18-262* 変異株は温度感受性株で、その感受性は *mis18-818* 変異株より強い。*cnp3-1 mis18-818* 二重変異株の表現型と比較するために、*cnp3-1 mis18-262* 変異株を作成し、同様の培養条件で顕微鏡観察を行った。

mis18-262 変異株における GFP-Cnp1 のシグナルは、36 °C でかなり弱く観察された。また、*cnp3-1 mis18-262* の二重変異株では GFP-Cnp1 のシグナルが 26 °C では1点だが、36 °C ではマルチドットが観察された(図 31、32)。

2) FISH によるセントロメア領域の検出

染色体のクラスタリングが保持されているか調べるため、FISH も試みた。分裂酵母のセントロメア領域 (otr 領域) を認識するプローブ pRS140 を用いて、蛍光色素 Alexa488 で標識し、プローブが染色体上の何処で光るか調べた (Chikashige et al, 1989)。pRS140 は一番染色体のセントロメア領域の dg dh 領域の配列を持ったプラスミドである。分裂酵母のセントロメア otr 領域である dg、dh 領域は1番染色体から3番染色体までホモロジーを持つため、pRS 140 のプラスミドを使ったプローブを作成すると、3本の染色体のそれぞれ

れの otr 領域で、プローブは染色体とハイブリダイズすることができる (図 33A)。仮に染色体のクラスタリングが壊れていればプローブも複数点観察されることが予測される。実際に観察してみたところ、36 °C の全ての細胞でプローブは染色体上の 1 箇所でのみシグナルが観察された(図 33B)。以上より、Mis12-mCherry の局在観察と FISH による顕微鏡観察の結果から、*cnp3-1 mis18-818* の二重変異株の染色体クラスタリング構造は保持されていると考えられた。

9. 核膜タンパク質と Cnp3 の関係

これまで観察された Cnp1 のリクルート因子の変異株 (*mis6*、*mis16*、*mis18*) と *cnp3-1* 変異株の二重変異株は、GFP-Cnp1 のシグナルが複数みられた。このシグナルの核内配置を詳細に観察するために、 Δ vision を用いて単軸方向に沿って 180°細胞写真を回転させた。例えば、細胞を回転する前の GFP-Cnp1 のシグナルが核内の中央付近に見える場合でも、短軸方向に 90° 回転すると辺縁部に GFP-Cnp1 のシグナルが見えたとする。この場合、GFP-Cnp1 は核膜寄りに位置すると考えられ、GFP-Cnp1 が中央に局在すれば、核の中心部に局在していると考えられる。二重変異株の写真をそれぞれ短軸方向に沿って 90°回転したところ、GFP のドットが左側に局在して見えたので、核膜寄りに局在すると考えられた(図 34~37)。そこで核膜に局在するタンパク質 Rpt3、Cut8 と Cnp3 が GFP-Cnp1 の局在に影響を及ぼすのか調べることにした。

Rpt3 はプロテアソームのサブユニットであり、Cut8 はプロテアソームのアンカーであり、染色体の分配に異常を起こす *cut* 変異体として単離され、プロテアソームの核膜局在に必要なことが報告されている (Tatebe et al. 2000、Takeda et al. 2005)。Rpt3 は 19S プロテアソームを構成する因子で、進化的に保存されており、核膜に局在し、その局在は Cut8 に依存することが知られている。また、先行研究である北川博士の報告によると、Rpt3 はセントロメアにも局在し、Cnp1 の取り込みを制御していることが示唆されている

(Kitagawa et al. 2014)。Cnp3 と Rpt3 が GFP-Cnp1 の局在に影響するのか調べるために、*rpt3-1 cnp3-1* 二重変異株を作成し、26 °C と 36 °C で顕微鏡観察を行い、GFP-Cnp1 の局在を観察した(図 38、39)。*rpt3-1* 変異株は 26 °C、36 °C 共に GFP-Cnp1 のシグナルが核内に 1 点のみ観察されたが、36 °C の *rpt3-1* 変異株は野生型よりも GFP-Cnp1 が強く観察された。これは北川博士の報告と一致しており、*rpt3-1* 変異株ではセントロメア領域の GFP-Cnp1 の取り込みが野生型より多くなっているためと考えられる。一方で、*rpt3-1 cnp3-1* の二重変異株では 36 °C で GFP-Cnp1 のシグナルが弱く観察されたが、*rpt3-1* と同様に核内に 1 点のみ観察されたため、Rpt3 と Cnp3 が GFP-Cnp1 の局在に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

Rpt3 と同様の目的で、*cut8 cnp3-1* の二重変異株を作成し、顕微鏡を用いて GFP-Cnp1 の局在を観察した。*cut8* は 26 °C と 36 °C で、GFP-Cnp1 のシグナルは 1 点観察された (図 40、41)。しかし、36 °C では野生型より GFP-Cnp1 が少し強く観察された。これも、*cut8-563* 変異株では野生型に比べ、セントロメア領域の GFP-Cnp1 の取り込みが上がっている北川博士のデータと一致する (Kitagawa et al. 2014)。北川博士のデータでは、*cut8-563* 変異株に GFP-Cnp1 を過剰発現させた細胞を使用しているが、Thiamine 存在下で GFP-Cnp1 の発現を抑制した時でも、*cut8-563* 変異株のセントロメア領域の GFP-Cnp1 の取り込みは野生型より増えていた。*cut8cnp3-1* の二重変異株においては、26 °C と 36 °C で GFP-Cnp1 のシグナルは核内に 1 点のみ観察され、GFP-Cnp1 のシグナルが核内に複数点見られることはなかった。ただし、この時の二重変異株の GFP-Cnp1 のシグナルは野生型よりも強く観察された。これは *cut8-563* 変異株の表現型が反映されていると考えられる。このことから、Cut8 と Cnp3 が Cnp1 の局在に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。また、*rpt3-1 cnp3-1*、*cut8 cnp3-1* の二重変異株のスポットテストを行ったところ、*rpt3-1 cnp3-1*、*cut8 cnp3-1* の二重変異株で強い温度感受性を示した (図 42、43)。

10. ヘテロクロマチンに関与する遺伝子と Cnp1 の局在と Cnp3 の関係

Cnp1 はセントロメア以外の領域に局在する場合、Cnp1 の局在する周辺領域がヘテロクロマチン化されているという報告がある (Folco HD, et al. 2008)。Cnp1 の取り込みにはヘテロクロマチン化されている領域が必要であるのか、それともヘテロクロマチン化されていなくても Cnp3-1 が局在する所に Cnp1 も局在するのだろうか。Cnp1 の局在が領域 (DNA の配列) に関与するのか或いは Cnp3-1 に関与するのかを調べるために、ヘテロクロマチンに関与する遺伝子を破壊した株を使い、これらの株と *mis18 cnp3-1* の三重変異株を作り、*mis18 cnp3-1* の二重変異株で複数見えた GFP-Cnp1 の局在がどうなるか調べた。使用したヘテロクロマチン化に関与する遺伝子は、*clr4⁺*、*swi6⁺*、*chp1⁺*、*dcr1⁺* の 4 遺伝子で、それぞれ破壊した株と *mis18 cnp3-1* の二重変異株を掛けあわせ、テトラド解析により三重変異株を作製した。もしも Cnp1 の取り込みにヘテロクロマチン領域が必要であるとするならば、三重変異株ではヘテロクロマチン化が起こらないため、GFP-Cnp1 の局在領域が減少することが予測された。しかし、実際に顕微鏡観察を行った所、GFP-Cnp1 のシグナルは二重変異株と同様に観察された (図 44~51)。また、スポットテストの結果、EMM 培地で *swi6 Δ* 破壊株は生育しなかった。*swi6 Δ* 破壊株は培地による影響を受けるのかもしれない。三重変異株のスポットテストでは、野生型と比較すると生育障害が観察された (図 52~54)。この結果から、セントロメア以外の領域に局在する Cnp1 は、ヘテロクロマチン化された領域よりも Cnp3-1

の局在の影響を受けていると考えられる。また、この観察に用いた顕微鏡 Δ vision では、三重変異株で見られた複数の GFP-Cnp1 のドットがはっきり見られるが、GFP-Cnp1 のシグナルの強度は野生型と比較するとかなり弱い。そのため、三重変異株で見られる GFP-Cnp1 のシグナル強度で野生型や *cnp3-1* 変異株を観察すると GFP-Cnp1 がかなり強くなってしまった。本来、36 °C では *cnp3-1* 変異株の GFP-Cnp1 はシグナルが弱くなる表現型であるが、そのように観察されなかったのは、使用した顕微鏡による影響と考えられる。別の顕微鏡 (KEYENCE) でも観察してみると、*cnp3-1* 変異株の GFP-Cnp1 は 36 °C でシグナルが弱く観察されたが、三重変異株の GFP-Cnp1 のシグナルが殆ど見えなかった。この実験では、GFP-Cnp1 の局在を詳細に観察したかったので、 Δ vision を用いた結果を記載した。

考察

本研究では、Cnp1 を過剰発現した場合と、生理的な条件下で発現させた場合における Cnp3-1 変異株における特徴を述べた。以下に、本研究で扱った変異株の表現型をまとめた。これらの表現型から、Cnp3、Cnp3-1 の機能について議論したい。

36 °C での GFP-Cnp1 の局在

	GFP-Cnp1 を過剰発現した場合の表現型	GFP-Cnp1 を生理的な条件下で発現した場合の表現型
野生型	核内に 1 点見える	核内に 1 点見える
<i>cnp3-1</i> 変異株	核内に複数点見える。 核全体が GFP に染まって見える	核内に 1 点見えるがシグナルが弱い
<i>cnp3</i> Δ 破壊株	核内に 1 点見える	
<i>mis18-818</i> 変異株		核内に 1 点見えるがシグナルが弱い
<i>cnp3-1 mis18-818</i> 変異株		核内に複数点見える

Cnp3-1 変異型タンパク質の特性

cnp3-1 変異株の変異点は、Cnp3 の DNA 結合ドメイン内である 508 番目にあり、セリン (S) がフェニルアラニン (F) に置換していた。

GFP-Cnp1 を生理的な条件下で発現した場合、*cnp3-1* 変異株は 26 °C から 36 °C の温度で生育することができる。顕微鏡観察とクロマチン 免疫沈降 (ChIP) の結果から、36 °C における Cnp3-1 のセントロメア結合の活性は失われていると考えられた。更に、Cnp1 のセントロメア結合も減少していた。ヒトでは *in vitro* における実験で CENP-C が CENP-A と相互作用することにより、CENP-A ヌクレオソームを安定化させると報告されている (Falk et al. 2015)。このこと

から、セントロメアの Cnp1 レベルが減少することは、セントロメアの Cnp3-1 を不安定にすると予測される。

Cnp1 を過剰発現させた場合、*cnp3-1* 変異株は 36 °C で高温感受性を示す。顕微鏡観察において、*cnp3-1* 変異株では 36 °C で GFP-Cnp1 が複数点観察された。少なくとも 32% の細胞で 3 点以上の GFP-Cnp1 が観察されたことから、GFP-Cnp1 は異所的なところへ局在していると推測される。GFP-Cnp1 を過剰発現させた *cnp3* Δ 破壊株においては、大多数の細胞で GFP-Cnp1 の焦点は観察されなかった。この結果は、*cnp3*⁺ の機能欠失が、Cnp1 を無秩序に蓄積させる結果になったわけではないことを示している。それゆえに、508 番目のアミノ酸配列に変異を持つ Cnp3-1 は獲得機能変異であると考えられる。また、Cnp3-1 は本来のセントロメアに結合出来ない一方で、Cnp1 と共局在することから Cnp1 ミクロソーム を安定化させる機能は維持していると考えられる。

***cnp3-1* 変異株における Cnp1 の集積**

Mis18 タンパク質は、Mis16 と複合体を形成し、Scm3 のセントロメア局在に必要である (Hayashi, et al. 2004、Williams, et al. 2009)。Mis18 の変異株 *mis18-818* 変異株では、制限温度でセントロメアに取り込まれる GFP-Cnp1 が減少する。興味深いことに、*mis18-818* 変異株は *cnp3-1 mis18-818* 変異株の二重変異株にすると、生理的な条件で Cnp1 を発現させているにも関わらず、GFP-Cnp1 の複数のドットが観察された。Cnp1 の局在に依存せず動原体に局在する Mis12 タンパク質は 1 点のシグナルのみ観察されたことから、この二重変異株におけるセントロメアクラスターは保たれていると考えられた。分裂酵母の染色体は 3 本であるため、3 点以上観察された Cnp1 のシグナルは異所的なところにあると予測される。更に、Cnp3-1 はこれらの Cnp1 と共局在することから、Cnp3-1 は Cnp1 を異所的なところに局在させてしまう機能を持つことが示唆された。

ヒトでは、CENP-A が過剰発現しているがん細胞において、CENP-A がヒストン H3 とヘテロミクロソーム を形成し、セントロメア以外の領域に、不適切に取り込まれていると報告されている (Lacoste, et al. 2014)。in vitro の実験に

において、ヘテロヌクレオソーム はホモヌクレオソーム と同様に安定であり、CENP-C と結合することができるという報告もある (Arimura, et al. 2014)。更には、Cnp1 の蓄積は Cnp3 に依存するとの報告もある (Tanaka, et al. 2009)。これらの報告と、本研究結果から以下の 3 点が示唆された。

- ・ Cnp3-1 は CENP-A ホモヌクレオソーム が多く存在するクロマチン領域 (セントロメア) で特異的に結合する能力が失われている
- ・ Cnp3-1 は Cnp3 よりも効率よくヘテロヌクレオソームと結合している可能性がある
- ・ セントロメアに取り込まれない Cnp1 が細胞内に過剰に存在する場合、Cnp3-1 はセントロメア以外の領域でヘテロヌクレオソームと結合して安定に局在するか、或いは Cnp3-1 がセントロメア以外の領域で不適切に分布した Cnp1 の局在を安定化しているのかもしれない

Cnp3-1 変異型タンパク質の特性から、野生型 Cnp3 タンパク質は、セントロメアに特異的に結合し、Cnp1 の蓄積を安定化・促進するものと類推できる。この機能により、Cnp3 は Cnp1 の局在を制限し、新規のセントロメア形成を防ぐエピジェネティックなメカニズムの一旦を担っているものと考えられる (図 55)。

***cnp3-1* 変異株における GFP-Cnp1 は何処に局在するのか**

cnp3-1 変異株、*cnp3-1 mis18-818* 変異株で見られる GFP-Cnp1 は何処に局在するかについて議論したい。36 °C での *cnp3-1 mis18-818* 変異株の細胞を、 Δ vision を用いて短軸方向に 180° 回転させたところ、核膜よりに GFP-Cnp1 のシグナルが観察された (図 34~37)。この結果を受け、核膜局在タンパクである Rpt3、Cut8、Cnp3 が Cnp1 の取り込みに関与するか調べるために、*cnp3-1 rpt3-1* 変異株と *cnp3-1 cut8-563* 変異株における GFP-Cnp1 の局在を観察したが、両者とも GFP-Cnp1 は 1 点しか観察されなかった。この結果から、核膜タンパク Rpt3 と Cut8 は Cnp1 の局在には影響しないことが示唆された。分裂酵母では、

テロメア近傍にネオセントロメア が形成されることが報告されている

(Ogiyama, et al. 2013)。分裂酵母のテロメアは核内でセントロメアと反対側の核膜上に散在している。*cnp3-1 mis18-818* 変異株で核膜寄りに観察された GFP-Cnp1 はテロメア近傍に局在するのかもしれない。

Cnp3-1 はどのように Cnp1 を認識しているか

Cnp3-1 はセントロメアを認識できない一方で、異所的なところに局在する Cnp1 と共局在する様子が観察された。この結果から、Cnp3-1 はセントロメアを正確に認識できず、似た配列を持つ DNA 領域に結合し、そこに Cnp1 が存在すると、Cnp1 の局在が安定化してしまうことが考えられる。

cnp3-1 変異株で Cnp1 がセントロメア領域に局在出来なくなるのは、Cnp3-1 がセントロメアに局在できないため、Cnp1 の局在が不安定だからだと考えられる。

ヒト CENP-C の機能

本研究では分裂酵母の Cnp3 の機能について述べてきたが、ヒトにおける研究結果からも、CENP-C が CENP-A の局在を安定化させる報告が挙げられている。

BenE.Black と Cheeseman のグループでは、ヒト培養細胞で CENP-C の Central Domain(分裂酵母にはこのドメインがなく、哺乳類に保存されたドメイン)の 522 番目のアルギニンが CENP-A のセントロメア局在の安定に必要であると報告している (Lucie Y.Guo, et al. 2018)。ヒトの CENP-C にはアルギニンアンカーと呼ばれる、CENP-A と CENP-C が相互作用するために必要なアミノ酸が特定されている (Kato.H, et al. 2013)。

更に Don Cleveland のグループでは、Hela 細胞を用いて、次のようなことが報告されている (Gordon Research Conference 2018)。

- ・ セントロメア以外の領域に取り込まれた CENP-A は、DNA の複製フォークによって取り除かれる

- ・セントロメア領域の CENP-A が DNA 複製フォークによって取り除かれないのは、CENP-C が存在するためである

Hela 細胞で CENP-A を過剰発現させ、染色体腕部に CENP-A を局在させた細胞を同調培養し、一斉に細胞周期をスタートさせたところ、S 期が終わった後にはセントロメアの CENP-A が残り、染色体腕部の CENP-A の局在は減少した。逆に、CENP-C を過剰発現させ、染色体腕部に CENP-C を取り込ませた状態で、細胞を同調培養し、細胞周期を一斉にスタートさせると S 期を経ても CENP-A は染色体腕部に局在したままだった。このことから、CENP-C は CENP-A の局在をセントロメアに留めておくために必要だと考えられる。本研究の結果とヒトで報告されている CENP-C の働きを考えると、CENP-A が染色体上に適切に分布、局在できるのは CENP-C に起因するのかもしれない。

材料と方法

分裂酵母株、大腸菌株、培地

本研究で用いた分裂酵母株の野生型は *h⁻SP972*、*h⁺975* に由来する。培養には完全培地として YES、YPD、最少培地として EMM 2 を、また孢子形成培地には MEA、SPA を使用した。TBZ、HU、カフェインは培地作製直前に培地に添加した。大腸菌は DH5 α 、MM294 を使用し、培養には LB 培地、SOC、SOB 培地を使用した。

本研究に用いた分裂酵母株

菌株	遺伝子型
MS01	<i>h⁻ leu1-32 pREP41-H3.3</i>
MS02	<i>h⁻ leu1-32 pREP41-cnp1</i>
MS03	<i>h⁻ leu1-32 cnp3-1 pREP41-H3.3</i>
MS04	<i>h⁻ leu1-32 cnp3-1 pREP41-cnp3-1</i>
MS168	<i>h⁺ leu1-32::nmtGFP-cnp1-leu1⁺ cnp3::kanR ade6-M216</i>
MS213	<i>h⁻ leu1-32 lys::nmtGFP-cnp1-lys1⁺ cnp3-mCherry-leu1⁺</i>
MS216	<i>h⁺ leu1-32::nmtGFP-cnp1-leu1⁺ ade6-M216</i>
MS217	<i>h⁻ leu1-32 lys::nmtGFP-cnp1-lys1⁺ cnp3-1+mCherry-leu1⁺</i>
MS262	<i>h⁺ leu1-32::nmtGFP-cnp1-leu1⁺ cnp3-1 ade6-M216</i>
MS343	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph</i>
MS344	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-1</i>
MS413	<i>h⁻ leu1-32 cnp3-1 ade6-M210 chl6</i>
MS468	<i>h⁻ leu1-32 cnp3-GFP-leu1⁺</i>
MS497	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph mis16-53</i>
MS503	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph mis18-818</i>
MS508	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph mis6-302</i>
MS525	<i>h⁻ leu1-32 lys::nmtGFP-cnp1-lys1⁺ cnp3-3HA6his-leu1⁺</i>
MS527	<i>h⁻ leu1-32 lys::nmtGFP-cnp1-lys1⁺ cnp3-1-3HA6his-leu1</i>
MS532	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph mis6-302 cnp3-1</i>
MS533	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph mis16-53 cnp3-1</i>
MS534	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-1 mis18-818</i>
MS544	<i>h⁻ leu1-32 cnp3-1-GFP-leu1⁺</i>
MS545	<i>h⁺ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-1-mCherry-leu1⁺ mis18-818</i>
MS546	<i>h⁺ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-mCherry-leu1⁺ mis18-818</i>
MS548	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-mCherry-leu1⁺</i>
MS549	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-1-mCherry-leu1⁺</i>
MS568	<i>h⁻ leu1-32 Sad1-mCherry<<kanR pREP81-cnp3-GFP</i>
MS569	<i>h⁻ leu1-32 Sad1-mCherry<<kanR pREP81-cnp3-1-GFP</i>
MS587	<i>h⁺ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-1-mCherry-leu1⁺ mis18-818 swi6::kanR</i>
MS588	<i>h⁺ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-1-mCherry-leu1⁺ mis18-818 chp1::kanR</i>
MS589	<i>h⁺ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-1-mCherry-leu1⁺ mis18-818 dcr1::hyg</i>
MS596	<i>h⁺ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-1-mCherry-leu1⁺ mis18-818 clr4::kanR</i>
MS603	<i>h⁺ leu1-32 GFP-cnp1-hph cut8-563</i>
MS604	<i>h⁺ leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-1 cut8-563</i>
MS605	<i>h² leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-mCherry-leu1⁺ rpt3-1</i>
MS606	<i>h² leu1-32 GFP-cnp1-hph cnp3-1-mCherry-leu1⁺ rpt3-1</i>
MS615	<i>h² leu1-32 GFP-cnp1-hph mis12-mCherry-leu1⁺</i>
MS616	<i>h² leu1-32 GFP-cnp1-hph mis12-mCherry-leu1⁺ cnp3-1</i>
MS617	<i>h⁺ leu1-32 GFP-cnp1-hph mis12-mCherry-leu1⁺ cnp3-1 mis18-818</i>
MS618	<i>h² leu1-32 GFP-cnp1-hph mis12-mCherry-leu1⁺ mis18-818</i>

菌株	遺伝子型
MS620	<i>h⁻ leu1-32 GFP-cnp1-hph mis12-mCherry-leu1⁺ mis18-262</i>
MS621	<i>h⁺ leu1-32 GFP-cnp1-hph mis12-mCherry-leu1⁺ cnp3-1 mis18-262</i>
TK28	<i>h⁻ leu1-32 lys::nmtGFP-cnp1-lys1⁺</i>
TK5	<i>h⁻ leu1-32::nmtGFP-cnp1-leu1⁺</i>
TK85	<i>h⁻ leu1-32 ade6-M210 chl6</i>

プラスミド

プラスミドの調整にはアルカリ法を用いた。精製には QiAprep(QIAGEN), High pure purification kit(Roche)を用いた。組み込み用ベクターには LEU マーカーを持つ pBS を用いた。大量発現に用いたベクターには nmt プロモーターを含む pREP41、81 を用いた。

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)。

GFP-Cnp1 を過剰発現すると温度感受性を示す変異体の単離方法

基本的には北川氏 (2014) のスクリーニング方法と同様である。野生型の株 (SP6 *h⁻leu1-32*) に pBR322-nmt1GFP-cnp1 を形質転換し、野生型の染色体に組み込んだ。この株にニトロソグアニジン (NTG) 処理を施し、DNA への変異を誘発させ、変異体ライブラリーを作製した。対数増殖期にあるこの細胞を TMbuffetr (50mM Tris malate(pH6.0)) で懸濁し、NTG (500μg/ml) を作用させた (26°C、20 分)。その後、TMbuffetr で細胞を 3 回洗浄して YES の液体培地で培養した (26°C 4 時間)。細胞を EMM2+Thiamin 培地で洗浄し、同じ培地に再度懸濁して培養した (26°C 4 時間)。その後、培養液を EMM2+Thiamine プレートにまいた (26°C)。コロニー形成を確認し、レプリカプレートを作製した (EMM2+Tiamine)。レプリカプレートを 36°C で培養し、GFP-Cnp1 が発現した時のみ高温感受性を示すクローンを単離した。次に、得られた個々のクローンのうち GFP-Cnp1 の局在異常を示すものを選択的に単離した。また、これらのクローンが H3 の過剰発現に高温感受性を示さないこと、核分裂に異常を示すものを選択的に単離した。さらに、四分子解析により変異体が 1 遺伝子変異であることを確認し、*cnp3-1* 変異体を含む 5 株を単離した。

***cnp3*⁺遺伝子の単離**

GFP-Cnp1 を過剰に発現させると高温感受性を示す変異体に、ゲノムライブラリー（下田ライブラリー）を形質転換させ、GFP-Cnp1 過剰発現下で高温感受性を相補する遺伝子を単離した。シーケンスによって *cnp3*⁺遺伝子に変異があることを確認したところ、*cnp3-1* 変異体は 508 番目のアミノ酸がセリンからフェニルアラニンに置換していた。

ウェスタンブロッティング

分裂酵母を 1.0×10^7 cells/ml まで培養した。Lysis buffetr (50mM HEPES (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0.1% NP-40, 2mM PMSF, protease inhibitor cocktail(SIGMA)) を用いてガラスビーズで破碎した (4°C)。破碎には BeadsSmash (和研薬) を用いた。遠心後、上清を SDS-PAGE に用い、その後ウェスタンブロッティングを行った。用いた抗体は α -GFP (Roche), α -HA (12CA5, Roche), α -TAT (TAT1, KGull 博士より供与) 抗体処理後は、ECL (GE healthcare) を用いてタンパクの検出を行った。

ChIP 法

対数増殖期の細胞培養液 (1.0×10^8 cells) にホルムアルデヒド (終濃度 1%) を添加して固定した (30 分)。固定反応は終濃度 330mM になるようにグリシンを加えてクエンチングした (5 分)。細胞を回収し、PBS で細胞を 3 回洗浄した。細胞抽出液は、集菌した細胞を FA lysis buffer (50mM HEPES-KOH(pH7.5), 1510mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% sodium deoxycholate, Protease inhibitor cocktail(SIGMA), 1mM PMSH)+0.05%SDS で懸濁し (4°C)、ガラスビーズで破碎した。遠心後に沈殿したクロマチン画分を FA lysis buffetr+0.1%SDS で 1 回洗浄した (4°C)。その後、同じバッファーに懸濁し 4°C でソニケーションを行った (Bioruptor, Cosmo Bio)。クロマチン断片は平均 500bp になるように切断した。その後遠心して上清を回収した。クロマチン抽出液に tritonX-100 を終濃度 1% になるように加えクロマチン免疫沈降を行った。以下に、使用した抗体を記載する。

抗 GFP モノクローナル抗体 (Roche) 1:1000

抗 HA モノクローナル抗体 (Roche, 12CA5) 1 : 3000

抗体チューブリン抗体 (TAT1, K.Gull 博士より供与) 1 : 5000

顕微鏡観察

細胞内における GFP、mCherry タグをつけた融合タンパク質の蛍光を観察した。顕微鏡は DeltaVisionElite (airix 社)、KEYENCE BZ-x700、BZ-9000 を用いた。

スポットテスト

細胞は対数増殖期 5.0×10^6 cells/ml になるまで YE で培養した。その後、細胞培養液を 10 倍ずつ希釈した ($5.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^6$ cells/ml)。YE、EMM, YPD プレートに培養液を 5 μ l スポットした。

ミニクロモソームロスアッセイ

細胞に人口ミニ染色体である ch16 を保持させ、それが安定に保持されるか調べた。YE-ade 培地に細胞を植菌し、ch16 の保持率を測定した(I)。Ch16 を保持している細胞はコロニーが白く、ch16 をロスした細胞はアデニンの要求性が出るために、細胞が赤くなる。ch16 を保持している白いコロニーを非選択培地に懸濁し(F)、その後再度選択培地に植菌し、ch16 の保持頻度を調べた(表 1)。分裂あたりの ch16 脱落頻度は以下の式によって求めた。

$\text{loss rate} = 1 - (F/I)^{1/N}$ (I; the initial percentage of cells carrying mini-chromosome, F; the final percentage of cells carrying mini-chromosome, N; the number of generations between F and I)

遺伝子組み換え株の作成

タグを付加した融合遺伝子株の作製には、プラスミドを分裂酵母に形質転換し、染色体に組み込んだ。GFP-Cnp1 の過剰発現系には nmt プロモーターを持つ nmtGFP-cnp1+を持つプラスミドを分裂酵母細胞に形質転換し、染色体に組み込んだ。遺伝子組み換え株が出来たか確認するために、PCR、四分子解析を行った。

FISH 法

基本的に Funabiki et al 1993 に従った。プローブは Chikasige et al 1989 を参照に調整した。

Abraham, A. L., M. Nagarajan, J. B. Veyrieras, H. Bottin, L. M. Steinmetz *et al.*, 2012 Genetic modifiers of chromatin acetylation antagonize the reprogramming of epimorphisms. *PLoS Genet* 8: e1002958.

Adcock, I. M., P. Ford, K. Ito and P. J. Barnes, 2006 Epigenetics and airways disease. *Respir Res* 7: 21.

Allshire, R. C., and G. H. Karpen, 2008 Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* 9: 923-937.

Alonso, A., B. Fritz, D. Hasson, G. Abrusan, F. Cheung *et al.*, 2007 Co-localization of CENP-C and CENP-H to discontinuous domains of CENP-A chromatin at human neocentromeres. *Genome Biol* 8: R148.

Amor, D. J., K. Bentley, J. Ryan, J. Perry, L. Wong *et al.*, 2004 Human centromere repositioning "in progress". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6542-6547.

Amor, D. J., and K. H. Choo, 2002 Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet* 71: 695-714.

Arimura, Y., K. Shirayama, N. Horikoshi, R. Fujita, H. Taguchi *et al.*, 2014 Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3. *Sci Rep* 4: 7115.

Bassett, E. A., S. Wood, K. J. Salimian, S. Ajith, D. R. Foltz *et al.*, 2010 Epigenetic centromere specification directs aurora B accumulation but is insufficient to efficiently correct mitotic errors. *J Cell Biol* 190: 177-185.

Bernad, R., P. Sanchez, T. Rivera, M. Rodriguez-Corsino, E. Boyarchuk *et al.*, 2011 *Xenopus* HJURP and condensin II are required for CENP-A assembly. *J Cell Biol* 192: 569-582.

Black, B. E., and D. W. Cleveland, 2011 Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-a nucleosomes. *Cell* 144: 471-479.

Black, B. E., L. E. Jansen, P. S. Maddox, D. R. Foltz, A. B. Desai *et al.*, 2007 Centromere identity maintained by nucleosomes assembled with histone H3 containing the CENP-A targeting domain. *Mol Cell* 25: 309-322.

Carroll, C. W., K. J. Milks and A. F. Straight, 2010 Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J Cell Biol* 189: 1143-1155.

Castillo, A. G., A. L. Pidoux, S. Catania, M. Durand-Dubief, E. S. Choi *et al.*, 2013 Telomeric repeats facilitate CENP-A(Cnp1) incorporation via telomere binding proteins. *PLoS One* 8: e69673.

Catania, S., and R. C. Allshire, 2014 Anarchic centromeres: deciphering order from apparent chaos. *Curr Opin Cell Biol* 26: 41-50.

Chikashige, Y., 1989 composite motifs and repeat symmetry in *S.pombe* centromeres:direct analysis by integration of Not1 restriction site. *cell* 57: 739-751.

Choi, E. S., A. Stralfors, A. G. Castillo, M. Durand-Dubief, K. Ekwall *et al.*, 2011 Identification of noncoding transcripts from within CENP-A chromatin at fission yeast centromeres. *J Biol Chem* 286: 23600-23607.

Choi, E. S., A. Stralfors, S. Catania, A. G. Castillo, J. P. Svensson *et al.*, 2012 Factors that promote H3 chromatin integrity during transcription prevent promiscuous deposition of CENP-A(Cnp1) in fission yeast. *PLoS Genet* 8: e1002985.

Collins, K. A., S. Furuyama and S. Biggins, 2004 Proteolysis contributes to the exclusive centromere localization of the yeast Cse4/CENP-A histone H3 variant. *Curr Biol* 14: 1968-1972.

Dong, Q., F. X. Yin, F. Gao, Y. Shen, F. Zhang *et al.*, 2016 Ccp1 Homodimer Mediates Chromatin Integrity by Antagonizing CENP-A Loading. *Mol Cell* 64: 79-91.

Dunleavy, E. M., N. L. Beier, W. Gorgescu, J. Tang, S. V. Costes *et al.*, 2012 The cell cycle timing of centromeric chromatin assembly in *Drosophila* meiosis is distinct from mitosis yet requires CAL1 and CENP-C. *PLoS Biol* 10: e1001460.

Erhardt, S., B. G. Mellone, C. M. Betts, W. Zhang, G. H. Karpen *et al.*, 2008 Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation. *J Cell Biol* 183: 805-818.

Falk, S. J., L. Y. Guo, N. Sekulic, E. M. Smoak, T. Mani *et al.*, 2015 Chromosomes. CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere. *Science* 348: 699-703.

Folco, H. D., A. L. Pidoux, T. Urano and R. C. Allshire, 2008 Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science* 319: 94-97.

Foltz, D. R., L. E. Jansen, A. O. Bailey, J. R. Yates, 3rd, E. A. Bassett *et al.*, 2009 Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* 137: 472-484.

Foltz, D. R., L. E. Jansen, B. E. Black, A. O. Bailey, J. R. Yates, 3rd *et al.*, 2006 The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol* 8: 458-469.

Funabiki, H., I. Hagan, S. Uzawa and M. Yanagida, 1993 Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol* 121: 961-976.

Gascoigne, K. E., K. Takeuchi, A. Suzuki, T. Hori, T. Fukagawa *et al.*, 2011 Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes. *Cell* 145: 410-422.

Gonzalez, M., H. He, Q. Dong, S. Sun and F. Li, 2014 Ectopic centromere nucleation by CENP--a in fission yeast. *Genetics* 198: 1433-1446.

Grosjean, Y., R. Rytz, J. P. Farine, L. Abuin, J. Cortot *et al.*, 2011 An olfactory receptor for food-derived odours promotes male courtship in *Drosophila*. *Nature* 478: 236-240.

Guo, L. Y., P. K. Allu, L. Zandarashvili, K. L. McKinley, N. Sekulic *et al.*, 2017 Centromeres are maintained by fastening CENP-A to DNA and directing an arginine anchor-dependent nucleosome transition. *Nat Commun* 8: 15775.

Hayashi, T., Y. Fujita, O. Iwasaki, Y. Adachi, K. Takahashi *et al.*, 2004 Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell* 118: 715-729.

Hewawasam, G., M. Shivaraju, M. Mattingly, S. Venkatesh, S. Martin-Brown *et al.*, 2010 Psh1 is an E3 ubiquitin ligase that targets the centromeric histone variant Cse4. *Mol Cell* 40: 444-454.

Hewawasam, G. S., and J. L. Gerton, 2011 Cse4 gets a kiss-of-death from Psh1. *Cell Cycle* 10: 566-567.

Hildebrand, E. M., and S. Biggins, 2016 Regulation of Budding Yeast CENP-A levels Prevents Misincorporation at Promoter Nucleosomes and Transcriptional Defects. *PLoS Genet* 12: e1005930.

Ishii, K., Y. Ogiyama, Y. Chikashige, S. Soejima, F. Masuda *et al.*, 2008 Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction. *Science* 321: 1088-1091.

Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura, 1983 Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163-168.

Kato, H., J. Jiang, B. R. Zhou, M. Rozendaal, H. Feng *et al.*, 2013 A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C. *Science* 340: 1110-1113.

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

Kumaran, R. I., R. Thakar and D. L. Spector, 2008 Chromatin dynamics and gene positioning. *Cell* 132: 929-934.

Lacoste, N., A. Woolfe, H. Tachiwana, A. V. Garea, T. Barth *et al.*, 2014 Mislocalization of the centromeric histone variant CenH3/CENP-A in human cells depends on the chaperone DAXX. *Mol Cell* 53: 631-644.

- Lejeune, E., M. Bortfeld, S. A. White, A. L. Pidoux, K. Ekwall *et al.*, 2007 The chromatin-remodeling factor FACT contributes to centromeric heterochromatin independently of RNAi. *Curr Biol* 17: 1219-1224.
- Mason, P. B., and K. Struhl, 2003 The FACT Complex Travels with Elongating RNA Polymerase II and Is Important for the Fidelity of Transcriptional Initiation In Vivo. *Molecular and Cellular Biology* 23: 8323-8333.
- Matsumoto, T., and D. Beach, 1991 Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. *Cell* 66: 347-360.
- Matsumoto, T., K. Fukui, O. Niwa, N. Sugawara, J. W. Szostak *et al.*, 1987 Identification of healed terminal DNA fragments in linear minichromosomes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 7: 4424-4430.
- Matsuyama, A., A. Shirai, Y. Yashiroda, A. Kamata, S. Horinouchi *et al.*, 2004 pDUAL, a multipurpose, multicopy vector capable of chromosomal integration in fission yeast. *Yeast* 21: 1289-1305.
- Mellone, B. G., K. J. Grive, V. Shteyn, S. R. Bowers, I. Oderberg *et al.*, 2011 Assembly of *Drosophila* centromeric chromatin proteins during mitosis. *PLoS Genet* 7: e1002068.
- Moree, B., C. B. Meyer, C. J. Fuller and A. F. Straight, 2011 CENP-C recruits M18BP1 to centromeres to promote CENP-A chromatin assembly. *J Cell Biol* 194: 855-871.
- Moreno, S., A. Klar and P. Nurse, 1991 Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 194: 795-823.
- Moreno-Moreno, O., M. Torras-Llort and F. Azorin, 2006 Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres. *Nucleic Acids Res* 34: 6247-6255.
- Nelson, J. D., O. Denisenko and K. Bomsztyk, 2006 Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat Protoc* 1: 179-185.

Nicolas, E., T. Yamada, H. P. Cam, P. C. Fitzgerald, R. Kobayashi *et al.*, 2007 Distinct roles of HDAC complexes in promoter silencing, antisense suppression and DNA damage protection. *Nat Struct Mol Biol* 14: 372-380.

Ogiyama, Y., Y. Ohno, Y. Kubota and K. Ishii, 2013 Epigenetically induced paucity of histone H2A.Z stabilizes fission-yeast ectopic centromeres. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1397-1406.

Ohzeki, J., J. H. Bergmann, N. Kouprina, V. N. Noskov, M. Nakano *et al.*, 2012 Breaking the HAC Barrier: histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly. *EMBO J* 31: 2391-2402.

Perpelescu, M., and T. Fukagawa, 2011 The ABCs of CENPs. *Chromosoma* 120: 425-446.

Quenet, D., and Y. Dalal, 2012 The CENP-A nucleosome: a dynamic structure and role at the centromere. *Chromosome Res* 20: 465-479.

Ranjitkar, P., M. O. Press, X. Yi, R. Baker, M. J. MacCoss *et al.*, 2010 An E3 ubiquitin ligase prevents ectopic localization of the centromeric histone H3 variant via the centromere targeting domain. *Mol Cell* 40: 455-464.

Rottach, A., E. Kremmer, D. Nowak, H. Leonhardt and M. C. Cardoso, 2008 Generation and characterization of a rat monoclonal antibody specific for multiple red fluorescent proteins. *Hybridoma (Larchmt)* 27: 337-343.

Sato, H., F. Masuda, Y. Takayama, K. Takahashi and S. Saitoh, 2012 Epigenetic inactivation and subsequent heterochromatinization of a centromere stabilize dicentric chromosomes. *Curr Biol* 22: 658-667.

Sato, H., and S. Saitoh, 2013 Switching the centromeres on and off: epigenetic chromatin alterations provide plasticity in centromere activity stabilizing aberrant dicentric chromosomes. *Biochem Soc Trans* 41: 1648-1653.

Schleiffer, A., M. Maier, G. Litos, F. Lampert, P. Hornung *et al.*, 2012 CENP-T proteins are conserved centromere receptors of the Ndc80 complex. *Nat Cell Biol* 14: 604-613.

Shang, W. H., T. Hori, N. M. Martins, A. Toyoda, S. Misu *et al.*, 2013 Chromosome engineering allows the efficient isolation of vertebrate neocentromeres. *Dev Cell* 24: 635-648.

Tada, K., H. Susumu, T. Sakuno and Y. Watanabe, 2011 Condensin association with histone H2A shapes mitotic chromosomes. *Nature* 474: 477-483.

Takahashi, K., 2000 Requirement of Mis6 Centromere Connector for Localizing a CENP-A-Like Protein in Fission Yeast. *Science* 288: 2215-2219.

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

Thrower, D. A., and K. Bloom, 2001 Dicentric chromosome stretching during anaphase reveals roles of Sir2/Ku in chromatin compaction in budding yeast. *Mol Biol Cell* 12: 2800-2812.

Thrower, D. A., J. Stemple, E. Yeh and K. Bloom, 2003 Nuclear oscillations and nuclear filament formation accompany single-strand annealing repair of a dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 116: 561-569.

Voullaire, L., R. Saffery, J. Davies, E. Earle, P. Kalitsis *et al.*, 1999 Trisomy 20p resulting from inverted duplication and neocentromere formation. *Am J Med Genet* 85: 403-408.

Williams, J. S., T. Hayashi, M. Yanagida and P. Russell, 2009 Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin. *Mol Cell* 33: 287-298.

謝辞

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Michiko Suma, Teppei Kitagawa, Yukiko Nakase, Norihiko Nakazawa, Mitsuhiro Yanagida,
and Tomohiro Matsumoto

Fission Yeast CENP-C (Cnp3) Plays a Role in Restricting the Site of CENP-A Accumulation
G3|Genes|Genomes|Genetics Volume8 2723-2733 August 2018

博士論文を纏めるにあたり、松本先生をはじめ、松本研の中瀬さん、先輩である北川さん、松本研の皆様、また沖縄大学院大学（OIST）の柳田先生、中沢さん、G0ユニットの皆様に心より感謝申し上げます。

大変時間がかかってしまいましたが、皆様のご指導、ご協力のもと、漸く学位論文を形にすることが出来ました。

ピペットマンも握ったことのない私に、北川さんは一から実験指導して下さいました。中瀬さんには、実験指導のみならず、トラブルシューティング、日々の議論等で大変お世話になりました。また、投稿論文が受理されるまでの最も辛い時期は、OISTの柳田先生と中沢さんをはじめ、G0ユニットの皆様にとても支えて頂きました。実験のアドバイス、株やプラスミドの提供もG0ユニットの皆様にして頂きました。精神的に辛かった時は、ラボメンバーのみならず、京都市内の飲食店の方々にも支えて頂きました。感謝申し上げます。思うように実験が進まず、学位取得の目処が全くたたない時には、片手にウィスキーのグラスを握り、泣きながら話を聞いて頂きました。あの時、バーテンダーさんから渡して頂いた「お絞りの暖かさ」は一生忘れません。

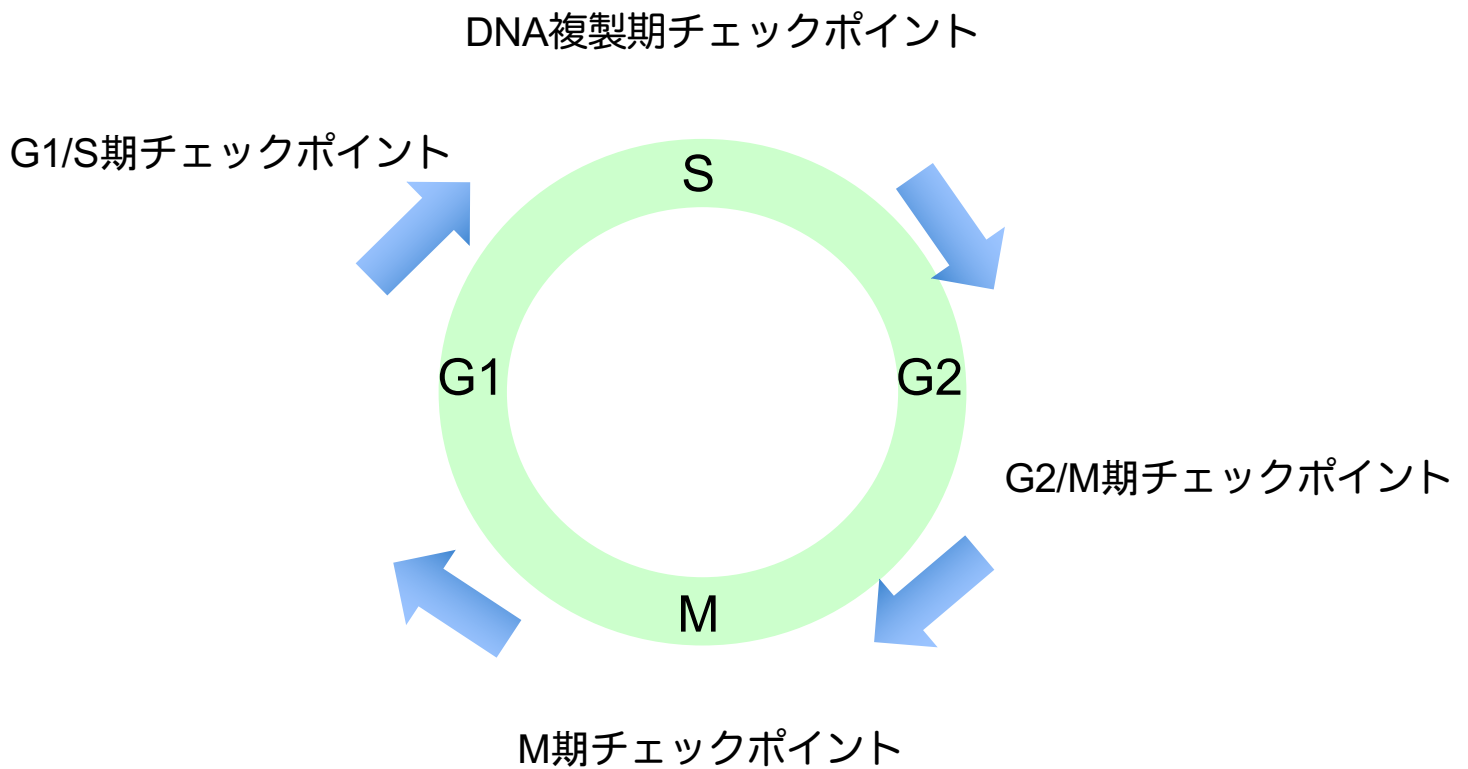
そして、投稿論文が受理された後、松本先生からの「ご苦勞様。おめでとう。」の一言は涙腺を崩壊させる破壊力がありました。

己の非力さを痛感すると同時に、周囲の方々の支えが本当に有り難いと思える院生生活でした。松本先生をはじめ、この研究テーマを通して関わった全ての皆様に感謝致します。そして、私がこの世界に踏み込むきっかけを与えてくださった学部時代の師匠である矢吹先生に感謝致します。

最後に一番のサポーター兼スポンサーである家族に心より感謝申し上げます。

2018 年 12 月 11 日

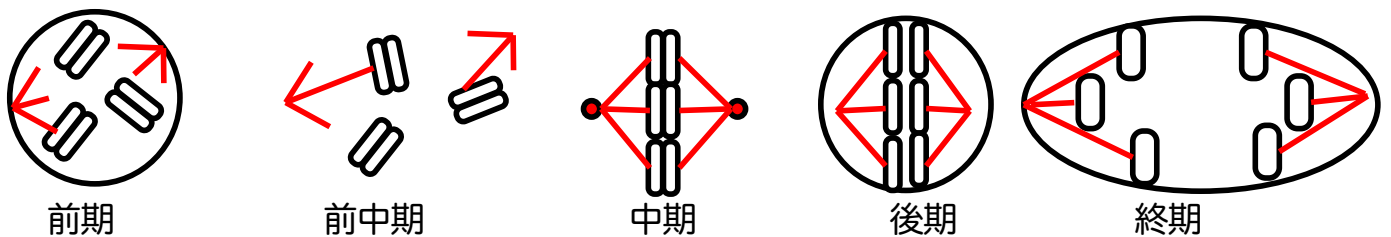
須摩 美智子



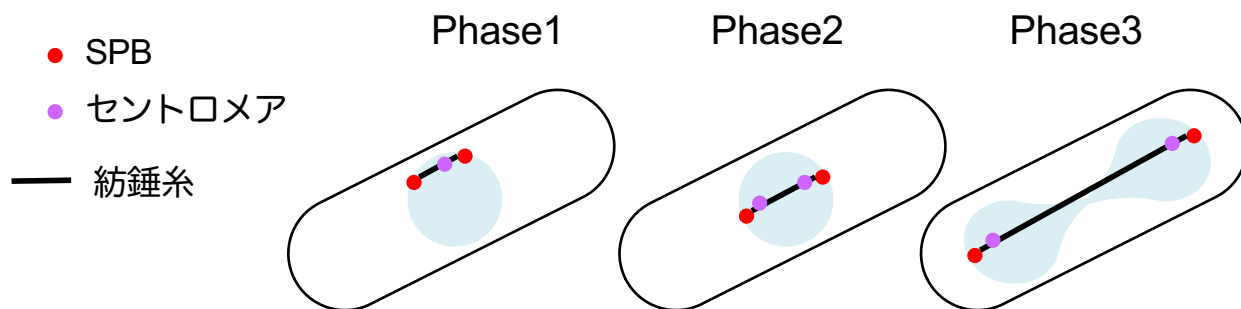
(図1) 細胞周期

細胞周期にはそれぞれの時期にチェックポイントがあり、適切に染色体分配と細胞分裂が起こるように制御されている。

高等真核生物のM期

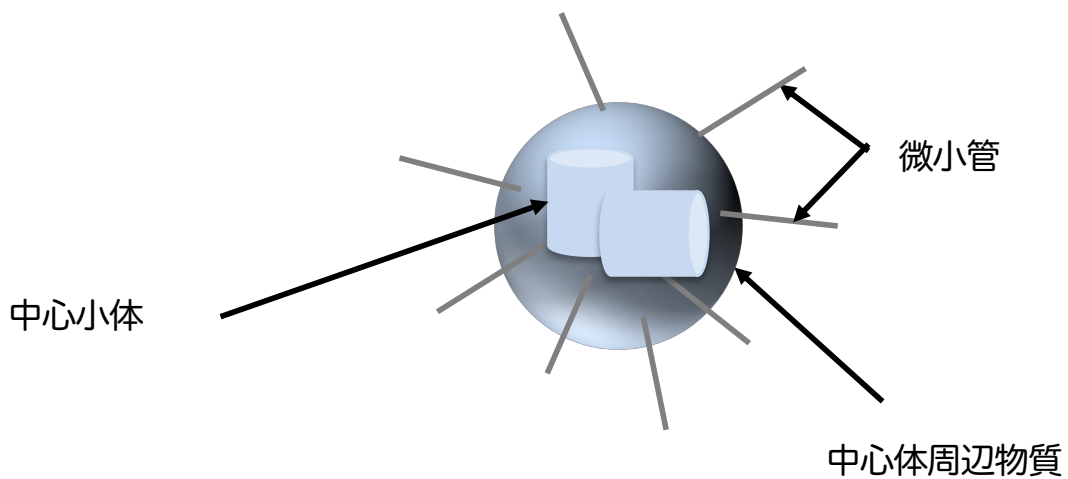


分裂酵母のM期



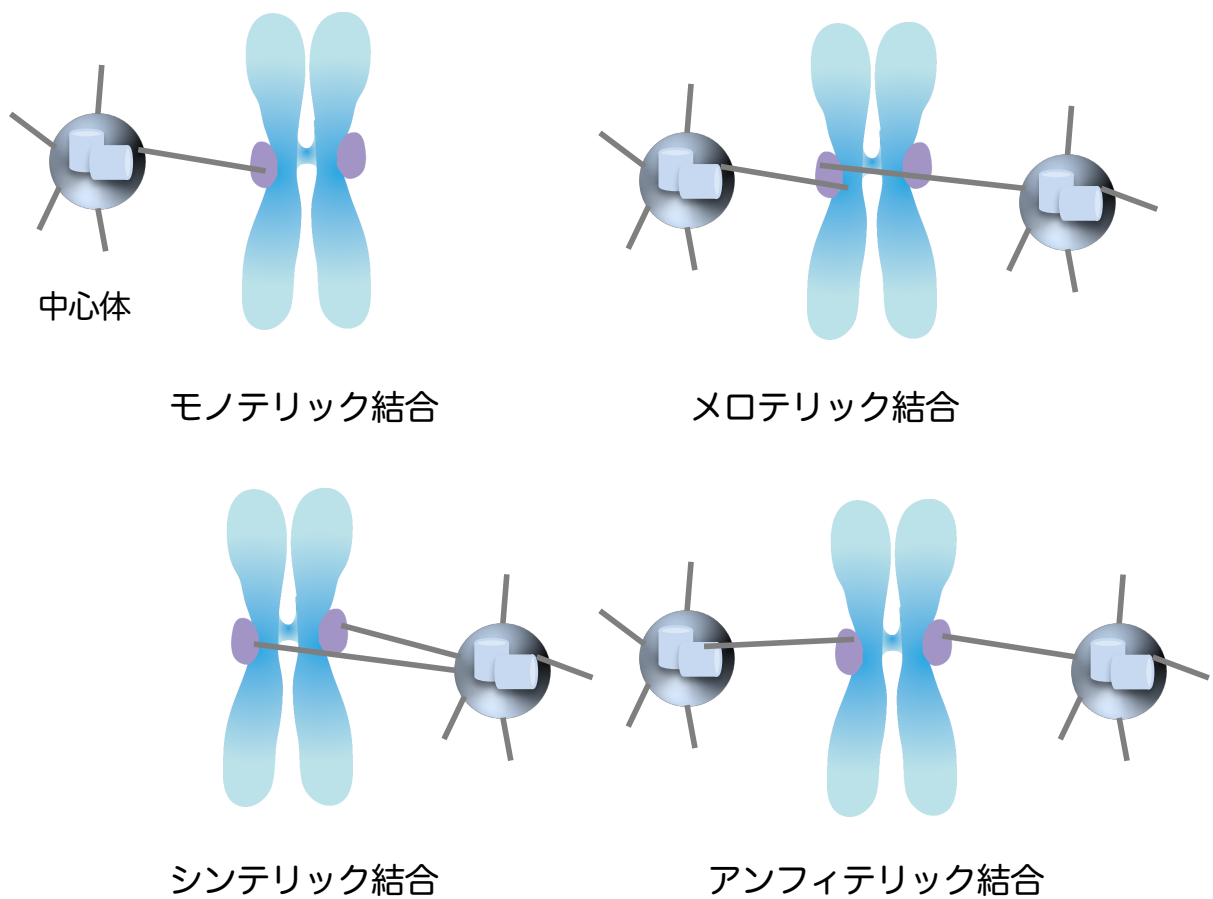
(図2) 高等真核生物と分裂酵母の細胞分裂の様子

高等真核生物の有糸分裂（上）では核膜が崩壊し、分裂酵母ではM期に核膜の崩壊が起こらない。



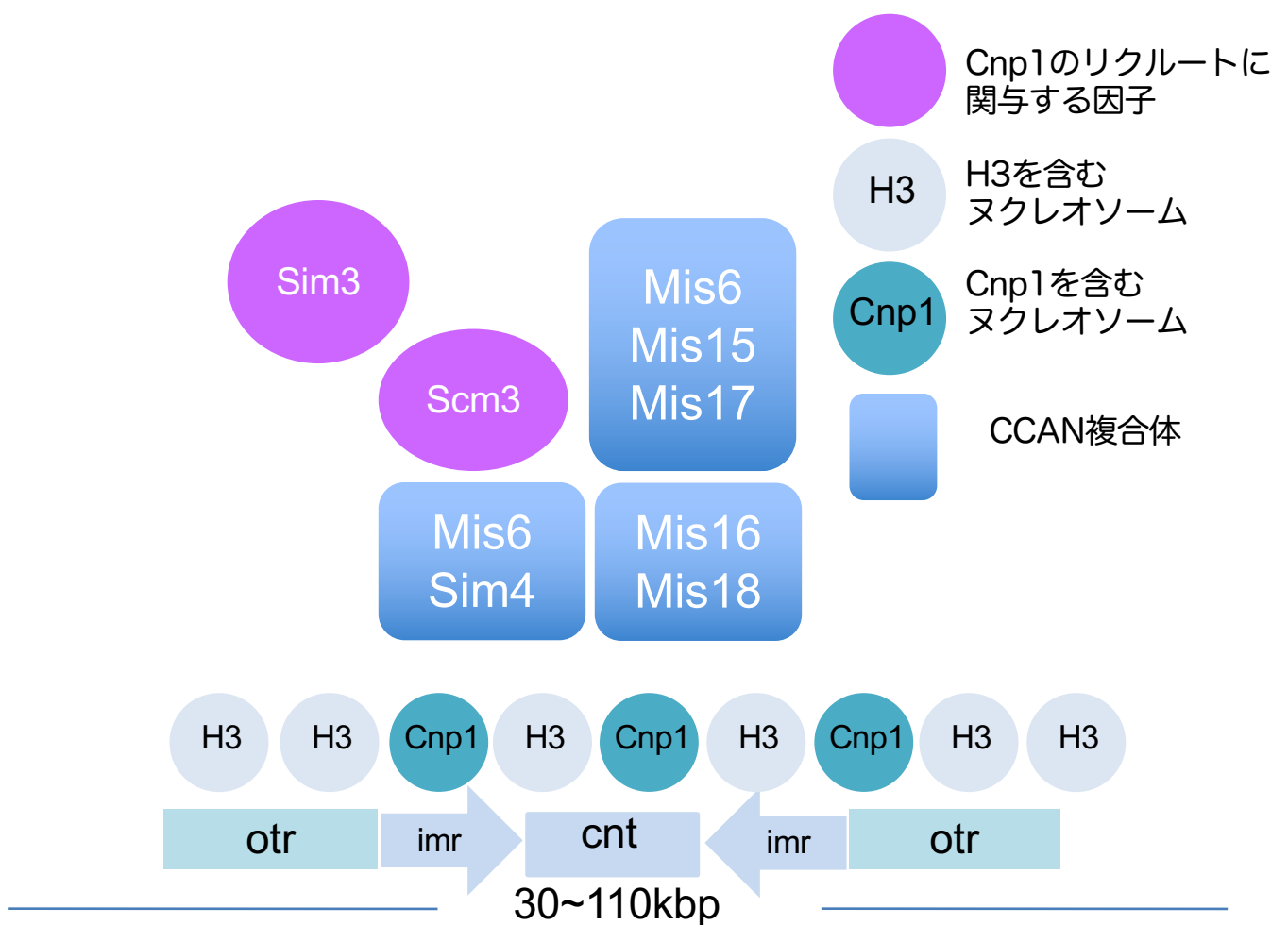
(図3) 中心体の構造

中心体を構成する中心小体。中心小体は円筒状のものが2つL字型に配置されている。中心小体の周辺に中心周辺物質が存在する（球状で表した）。

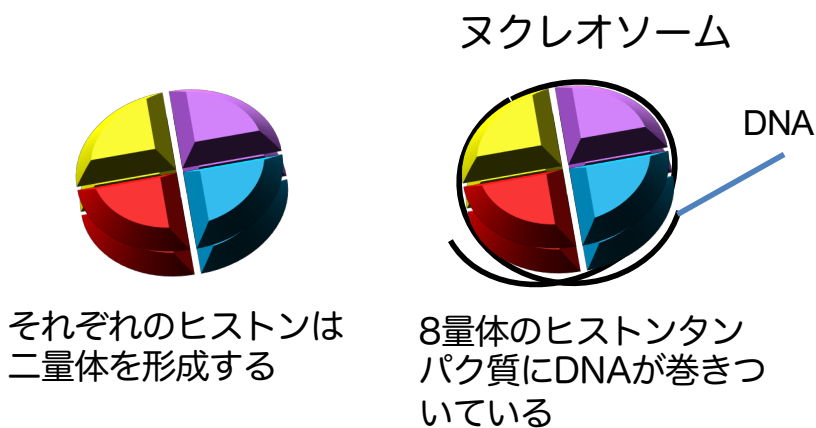
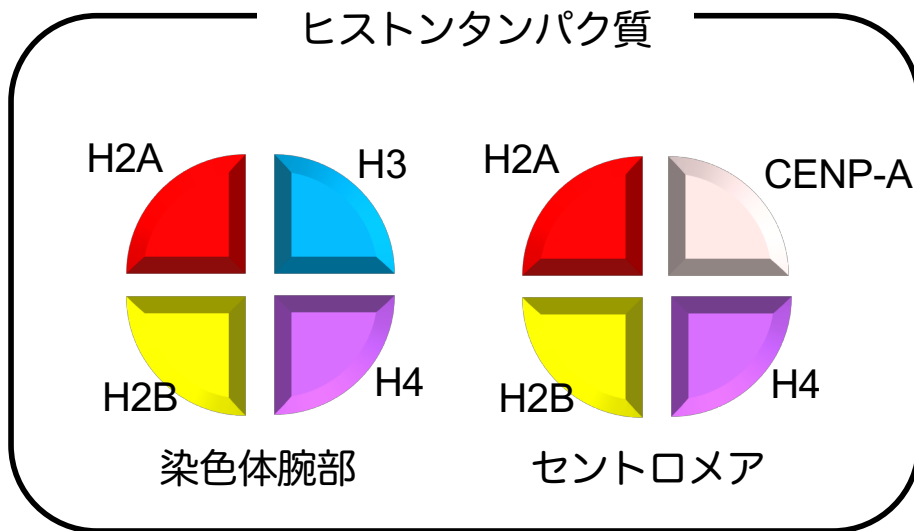
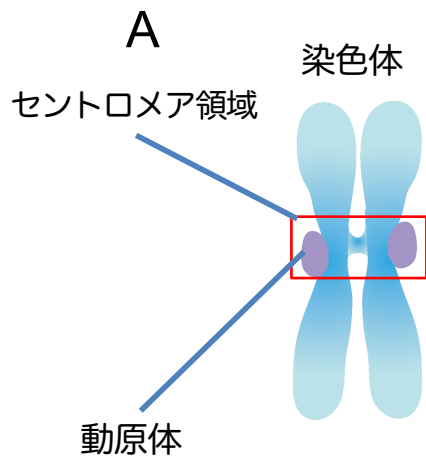


(図4) 動原体と微小管の結合の仕方

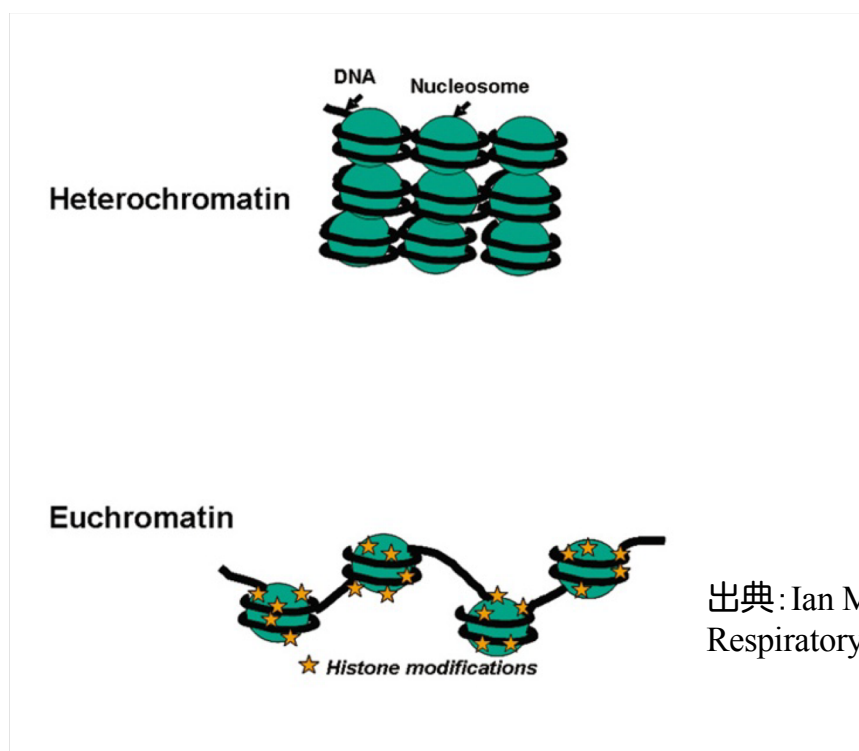
モノテリック、メロテリック、シンテリックな結合は後に染色体の不均等分配の原因となる。染色体が均等に分配されるためには、アンフィテリックな結合(右下)をすることが重要である。



(図5) 分裂酵母におけるCnp1の局在に関与する因子とセントロメア領域
 分裂酵母のセントロメア領域は30~110kbpほどである。セントロメアのcnt領域を中心にimr,otr領域が左右対称に存在している。otr領域の配列の詳細は図28に記載した。



B

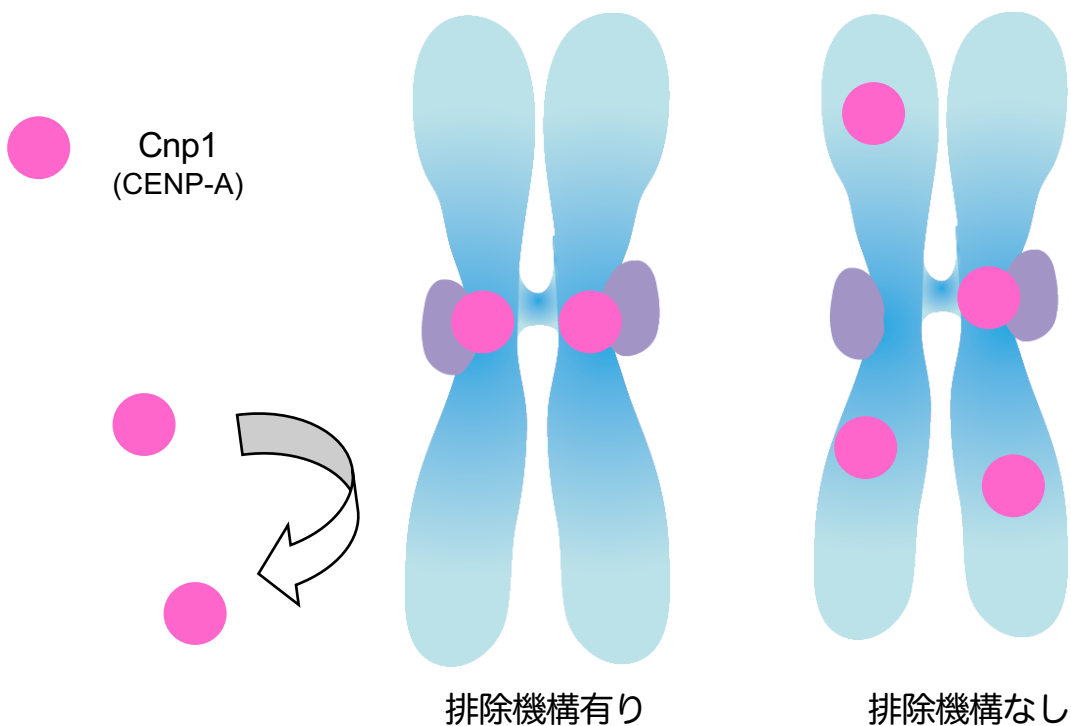


(図6) 染色体の基本構造

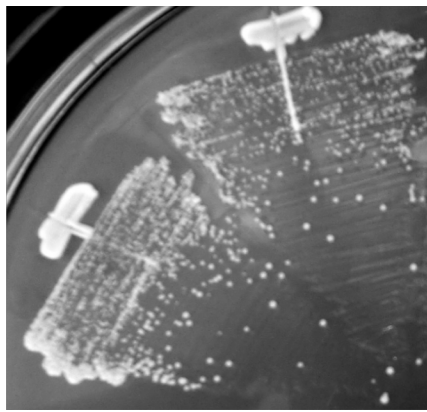
(A)染色体構造（左）とヌクレオソーム構造（右）。セントロメア領域のヒストンタンパク質はH3の代わりにCENP-Aが取り込まれている。(B)ヘテロクロマチンとユークロマチン。クロマチンはDNAが固く折りたたまれている。一方でユークロマチンはDNAの折りたたみが緩い。DNAヒストンタンパク質が様々な修飾を受けることでクロマチンの構造が変化する。

cnp1	1:-----MAKKSLMAE-PGDPIPR-PRKKRYRPGTTALREIRKYQRS	38
h3.3	1:MARTKQTARKSTGGKAPRKQLASKAARKAAPATGGVKKPH--RYRPGTVALREIRRYQKS	58
cnp1	39:TDLLIQRLPFSRIVREISSEFVANFSTDVGLRWQSTALQCLQEAAEAFVHLFEDTNLCA	98
h3.3	59:TELLIRKLFPQRLVREIAQDEKT----D--LRFQSSAIGALQEAVEAYLVSLFEDTNLCA	112
cnp1	99:IHAKRVTIMQRDMQLARRIRGA--	120
h3.3	113:IHGKRVTIOPKDMOLARRRLRGERS	136

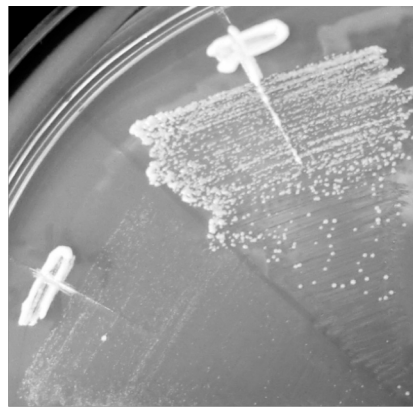
(図7)分裂酵母のCnp1とH3のアミノ酸配列
赤色で示した部分が類似性の高い領域。



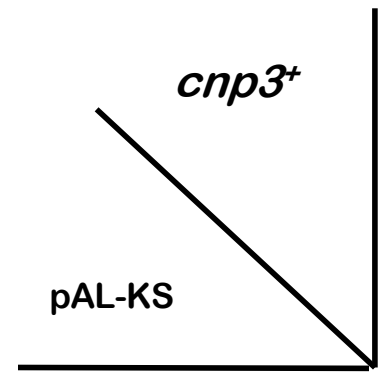
(図8)Cnp1の局在を染色体上の一か所に限定するメカニズムの仮説
野生型ではセントロメア以外の領域にくるCnp1は排除され、Cnp1の局在が1箇所に限定される(左)。Cnp1の排除機構が働かない変異株では、Cnp1を染色体の様々な領域に取り込んでしまう。



EMM+Thi

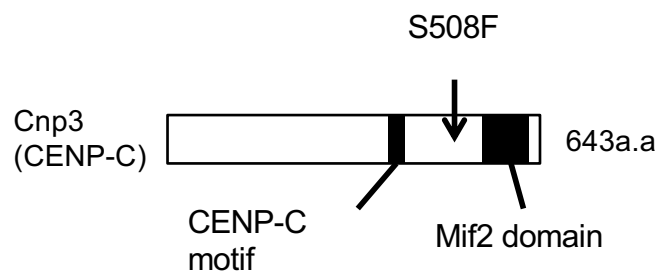


EMM

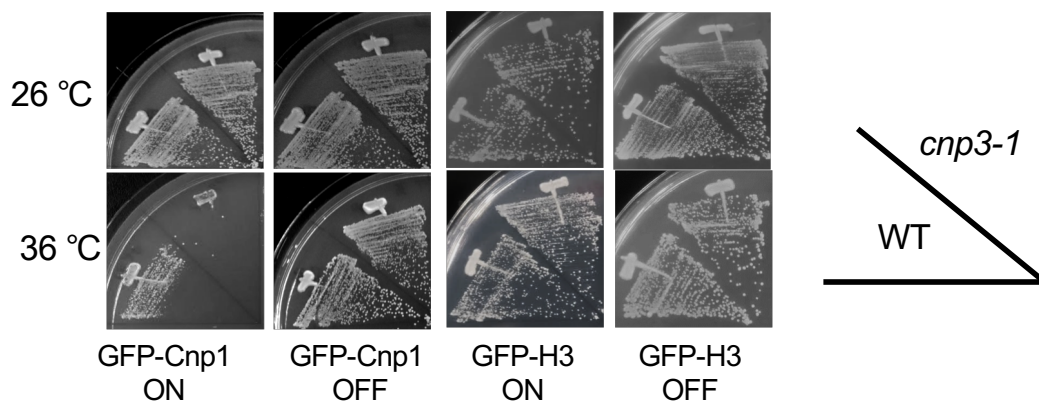


(図9) *csm10-60*変異株は*cnp3⁺*によって高温感受性を相補する
EMM、EMM+Thiamine培地に野生型、*csm10-60*変異株をスト
リークして36 °Cで2日培養した。

A



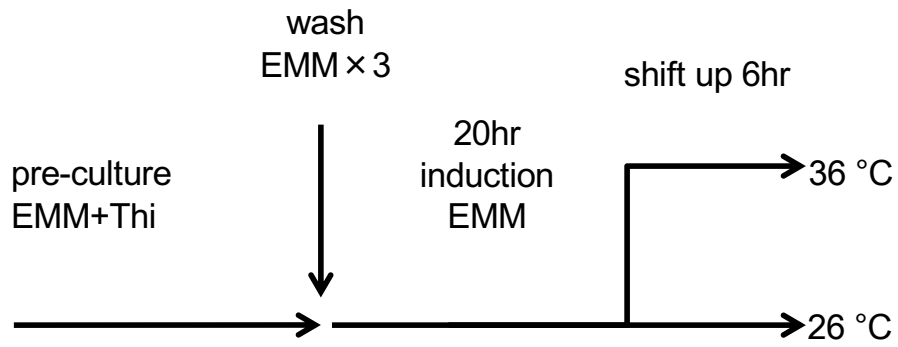
B



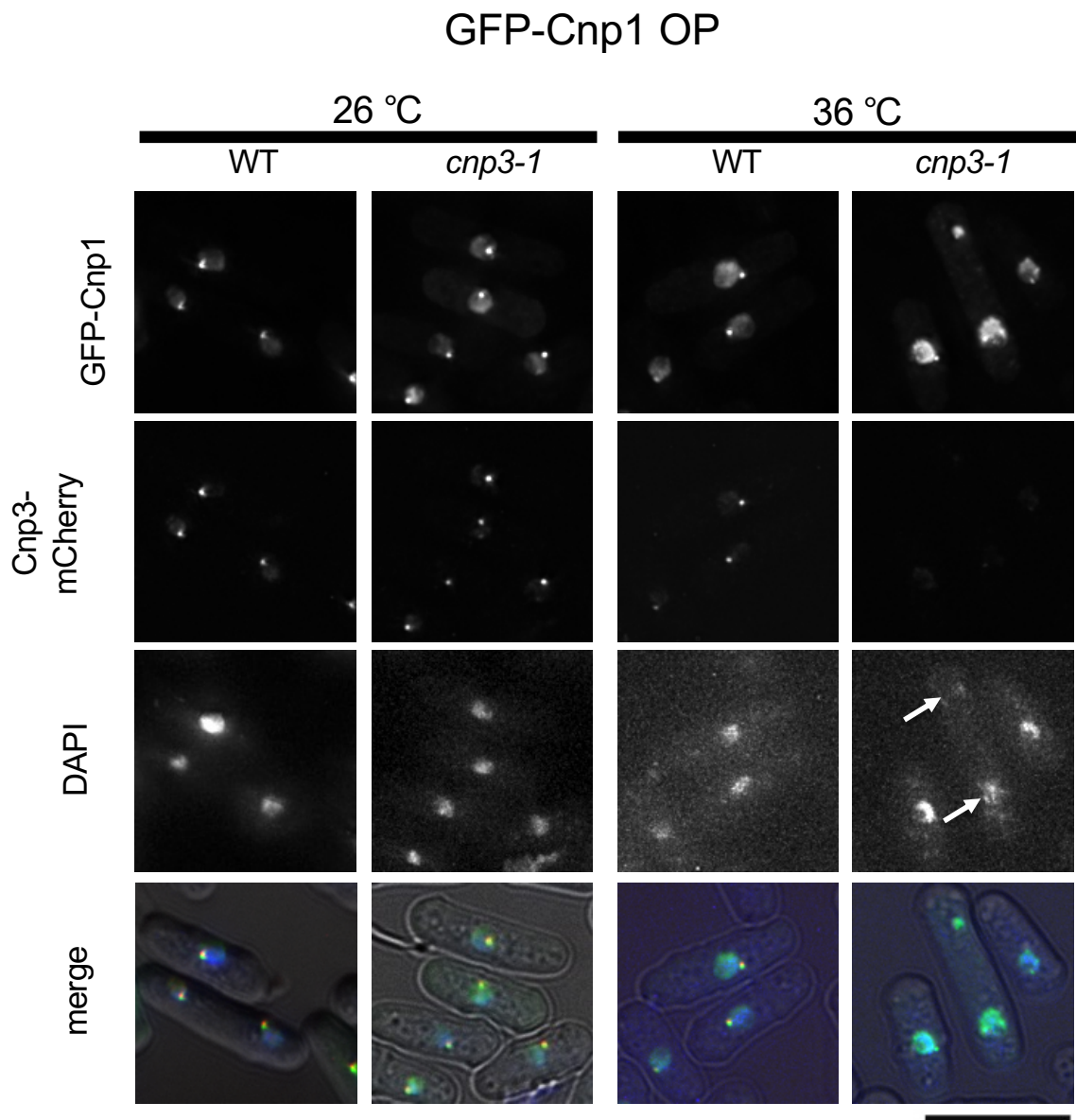
(図10) 単離した*cnp3-1*変異株の表現型

(A)Cnp3のドメイン領域と変異点。(B)H3とCnp1を過剰発現した時(-Thi)と、していない時(+Thi)のストリークの結果。*cnp3-1*はGFP-Cnp1過剰発現の時に温度感受性を示す。H3を過剰発現しても温度感受性は示さない

A



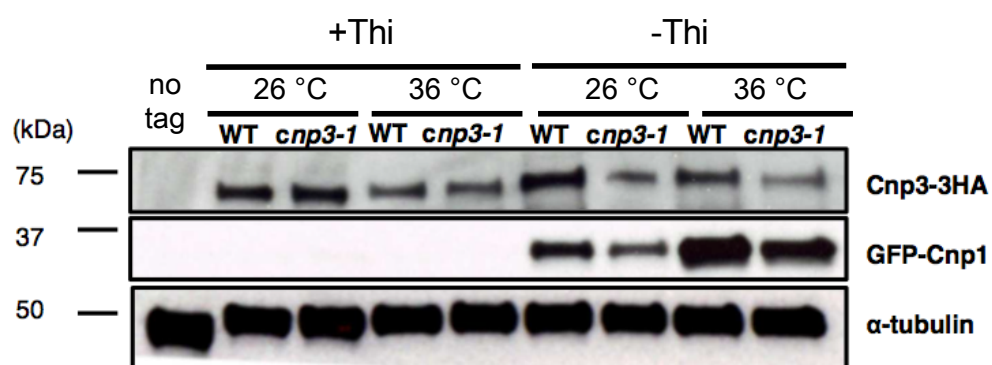
B



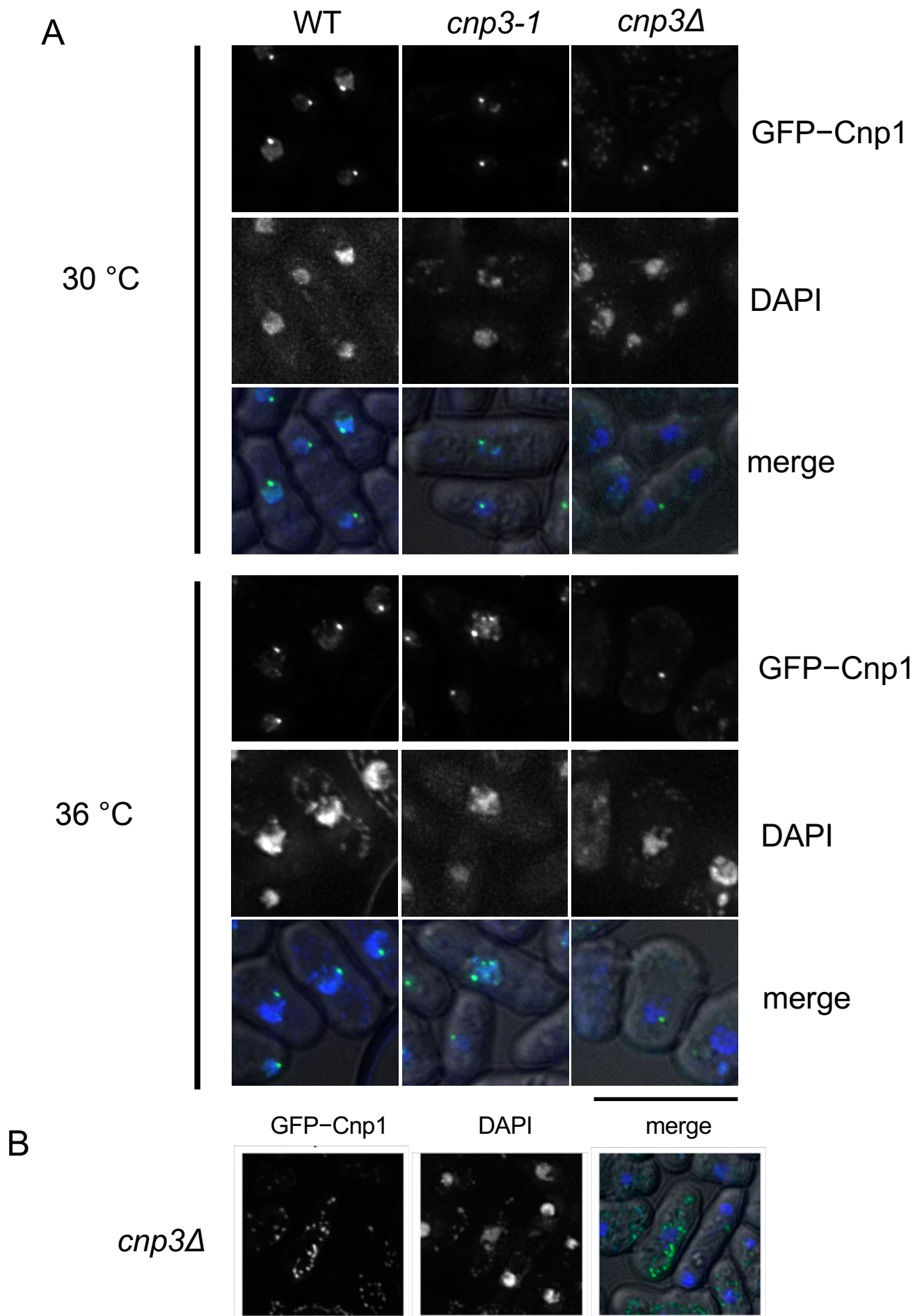
(図11) *cnp3-1*変異株の顕微鏡観察

(A)顕微鏡観察のための培養条件。

(B)WTと*cnp3-1*のGFP-Cnp1、Cnp3-mCherry、*Cnp3-1*mCherryの局在観察。
Δvision使用。scale bar 5μm

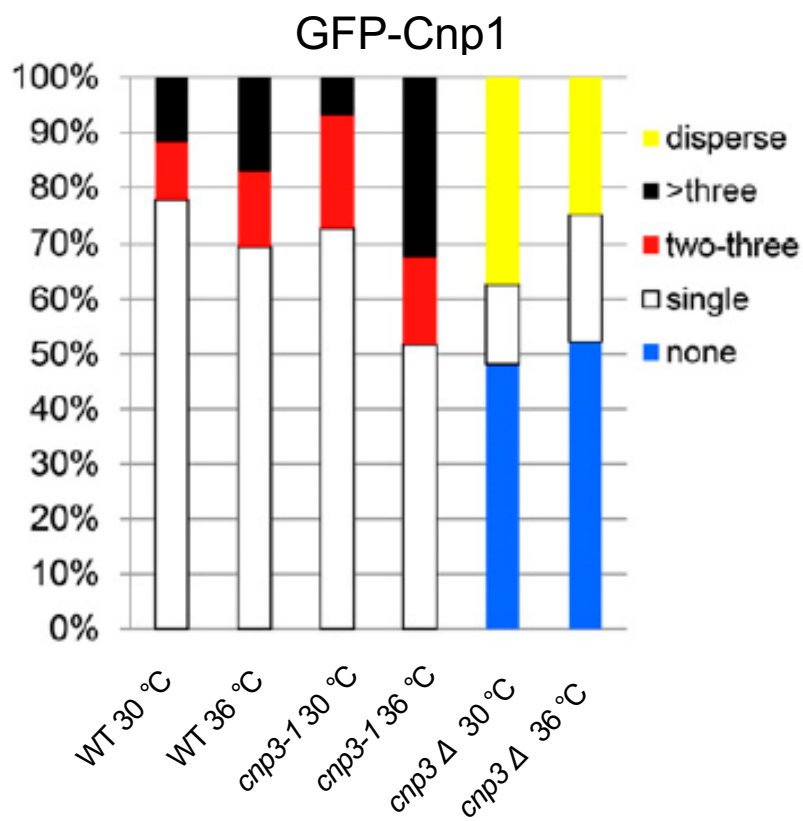


(図12) GFP-Cnp1、Cnp3-HAのウェスタンブロット
 GFP-Cnp1発現抑制(+Thi)、過剰発現(-Thi)。α-tubulinは
 ローディングコントロールとして使用した。培養条件は
 図11Aと同様。

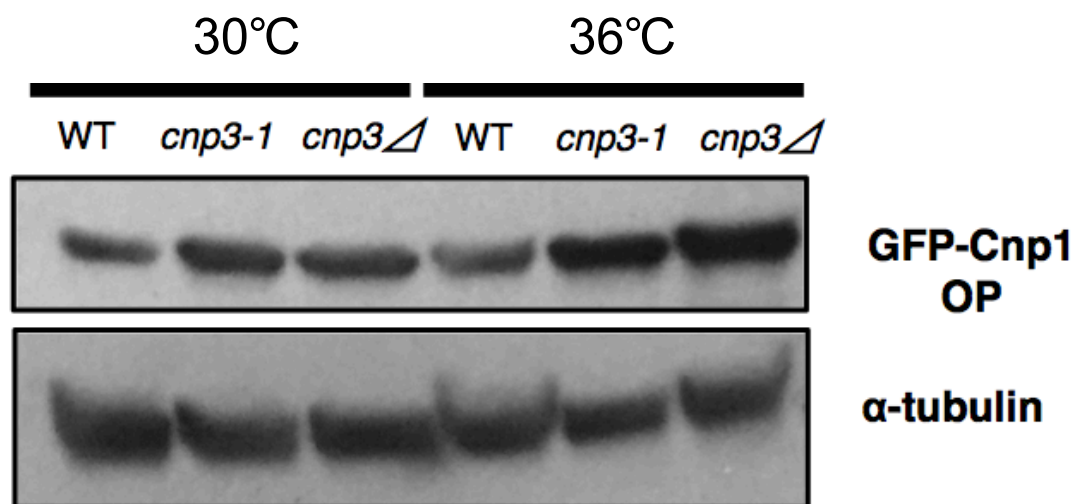


(図13) WT、*cnp3-1*、*cnp3Δ*における30 °C（上）と36 °C（下）GFP-Cnp1の局在観察
 (A)(図8)と同様の手順で培養した。前培養、発現誘導の温度は30 °Cで行った。その後、
 36 °Cにシフトアップし、6時間培養した。尚、*cnp3Δ*は26 °Cで生育しないため、30 °Cで
 培養した。(B) *cnp3Δ*の細胞では、GFP-Cnp1が散在したような表現型も観察された。
 Δvision使用。scale bar 5μm

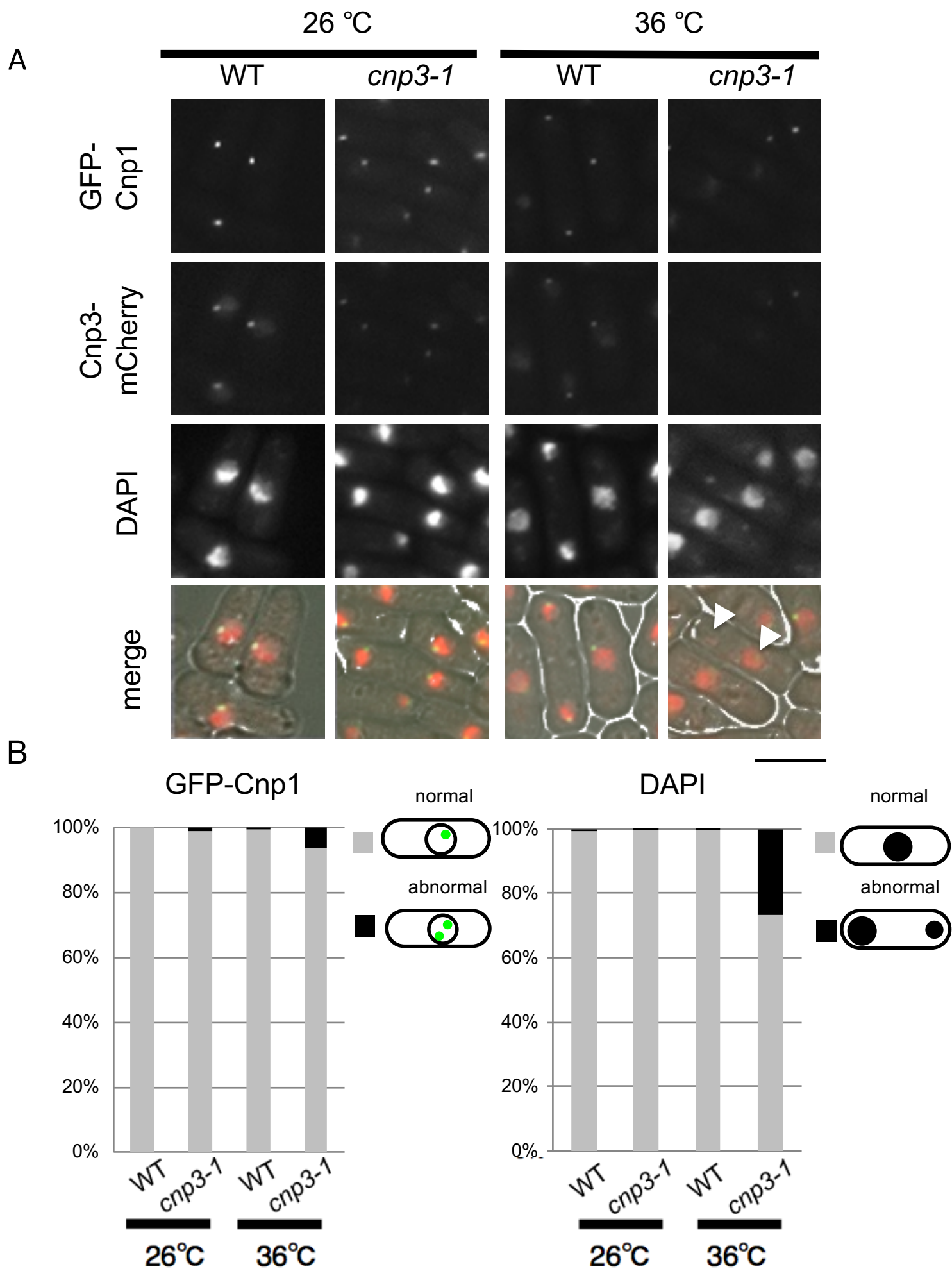
A



B



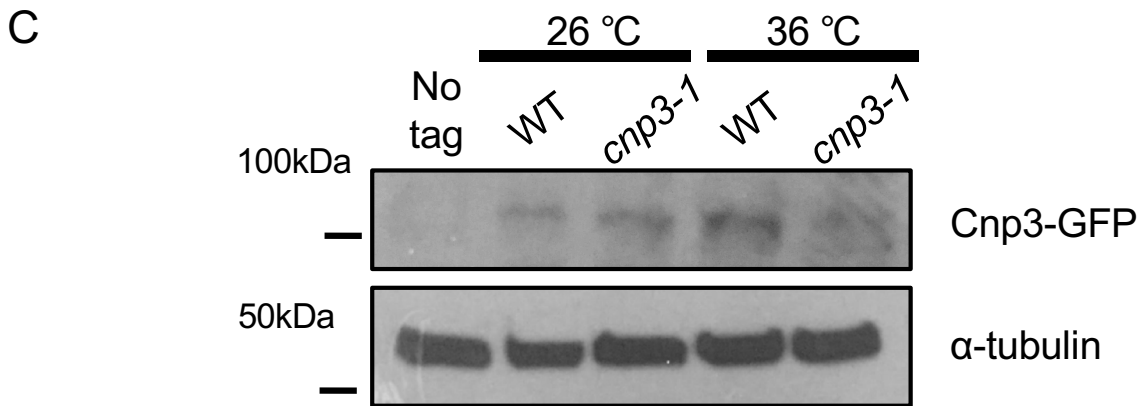
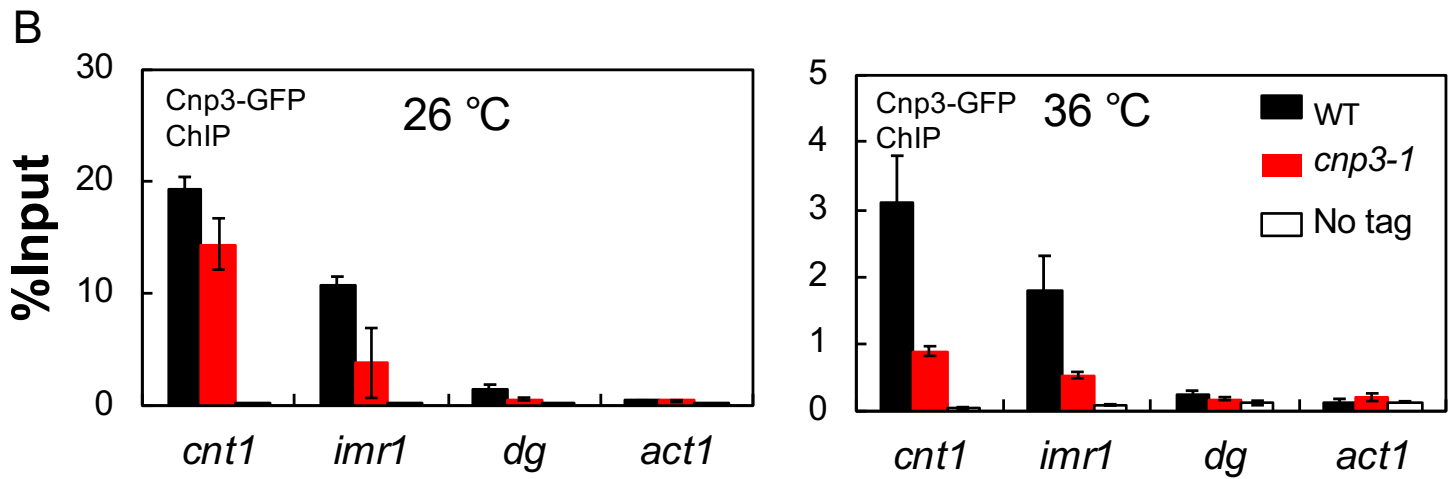
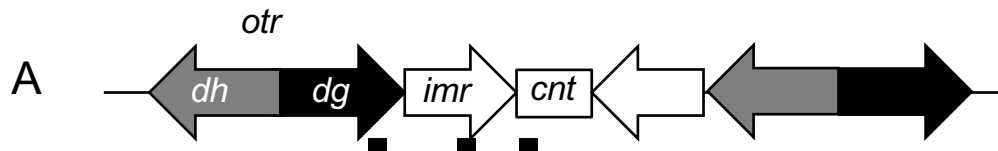
(図14) WT、*cnp3-1*、*cnp3Δ*における表現型の割合とGFP-Cnp1の発現量
 (A) GFP-Cnp1のシグナルの見え方をそれぞれ計測した。
 (B) GFP-Cnp1 を過剰発現させた時のウェスタンブロット。α-tubulinはローディングコントロールとして使用した。



(図15) 生理的な条件でGFP-Cnp1を発現させた時のWT,*cnp3-1*の顕微鏡観察

(A) WT,*cnp3-1*のGFP-Cnp1,Cnp3-mCherryの局在観察。KEYENCE使用。scale bar5μm

(B) GFP-Cnp1とDAPI染色による表現型の割合

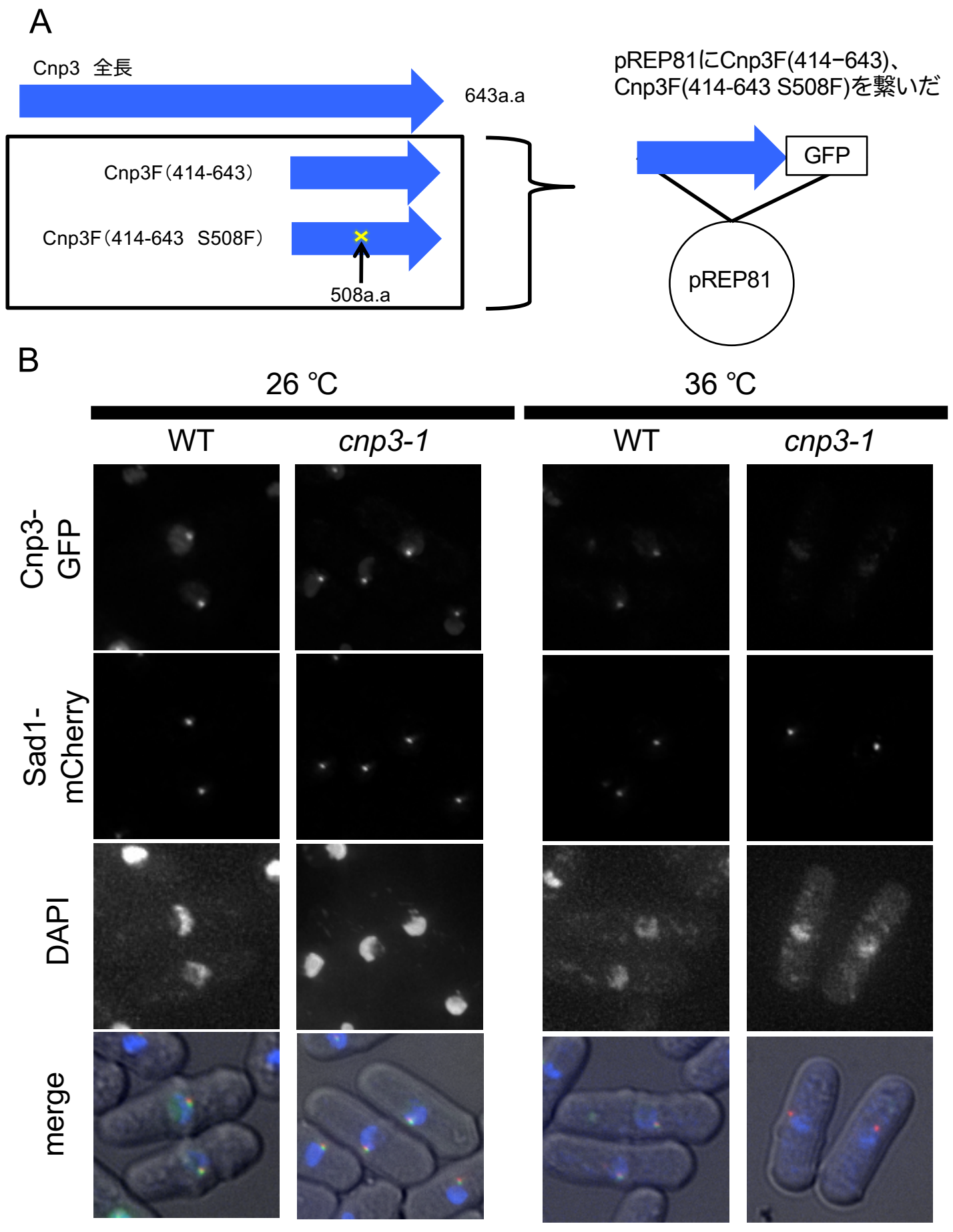


(図16) Cnp3-GFPのChIP解析

(A) ChIPに使用したプライマーの設計領域(黒線)

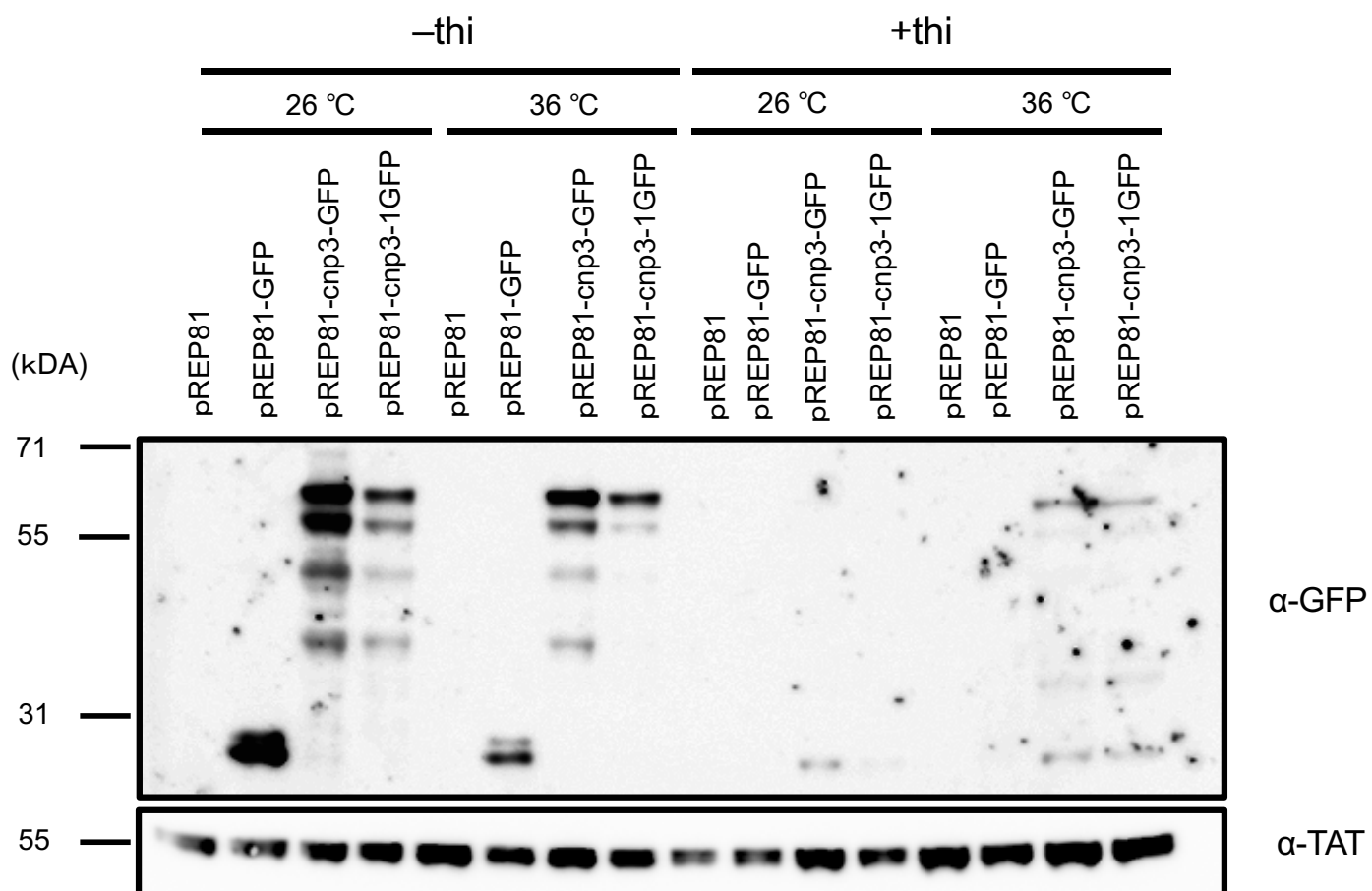
(B) セントロメア領域*cnt1*,*imr1*,におけるCnp3-GFP のChIPの結果。

(C) ChIPに使用したCnp3-GFPのウェスタンブロット。α-tubulinはローディングコントロールとして使用した。



(図17) Cnp3-1GFPの局在観察

(A) Cnp3のC末端側のアミノ酸配列414～643番目にGFPを付け、pREP81プラスミドに繋いだ。*pREP81-cnp3-GFP* と *pREP81-cnp3-1 GFP*はWTに形質転換した。(B) 26 °Cと36 °Cにおける表現型を観察した。Δvision使用。scale bar 5μm。

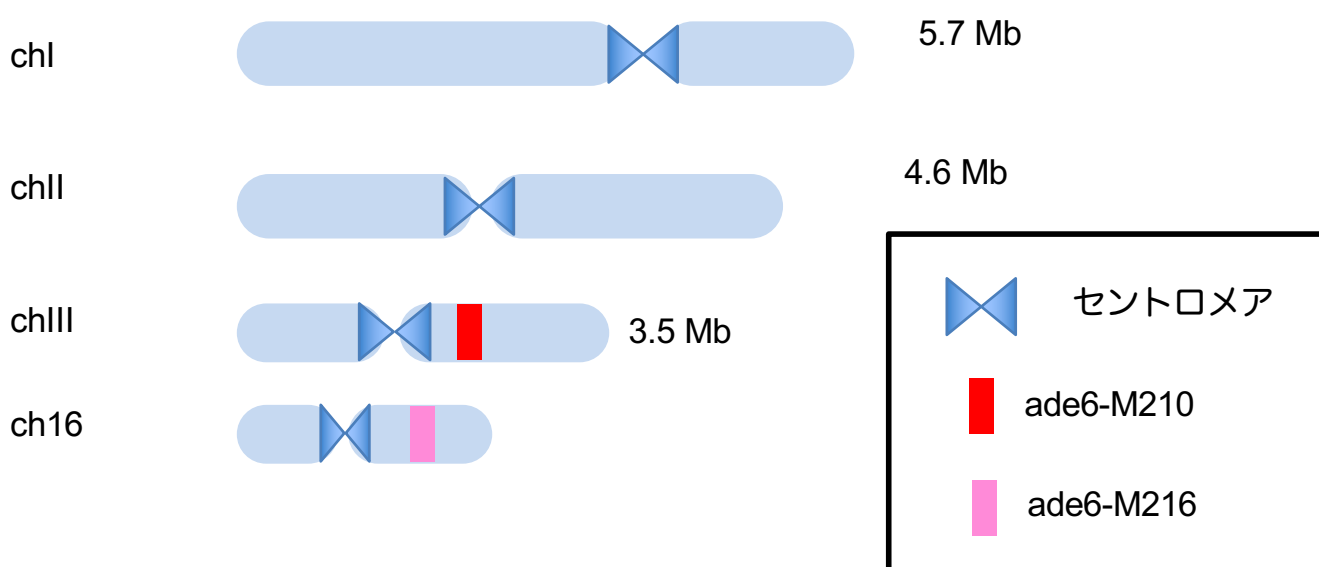


(図18) Cnp3-GFP、変異型Cnp3-1GFPの発現量

WTに*cnp3-1-GFP*を持つプラスミドを形質転換し、26 °Cと36 °Cにおけるウェスタンブロットを行った。nmtプロモーターの発現を抑制したのが+Thiamine（右）,発現誘導したのが-Thiamine（左）。培養条件は図8と同様である。

Loss rate				
	Background	Per division	Percent division(%)	Fold increase in loss rate
26 °C	WT	1.4×10^{-4}	0.014	1
	<i>cnp3-1</i>	3.4×10^{-2}	3.4	243
30 °C	WT	3.4×10^{-4}	0.034	1
	<i>cnp3-1</i>	6.7×10^{-3}	0.67	20
32 °C	WT	2.8×10^{-4}	0.028	1
	<i>cnp3-1</i>	1.03×10^{-2}	1.03	37
36 °C	WT	2.3×10^{-4}	0.023	1
	<i>cnp3-1</i>	1.2×10^{-1}	12	522

(表1) minichromosome ch16ロスの割合
 26 °C、30 °C、32 °C、36 °CにおけるWT,*cnp3-1* のch16ロスの頻度を計測した。*cnp3-1*は30 °C、32 °Cでは比較的安定してch16を保持しているが、26 °Cや36 °Cだとch16を保持しづらくなる。

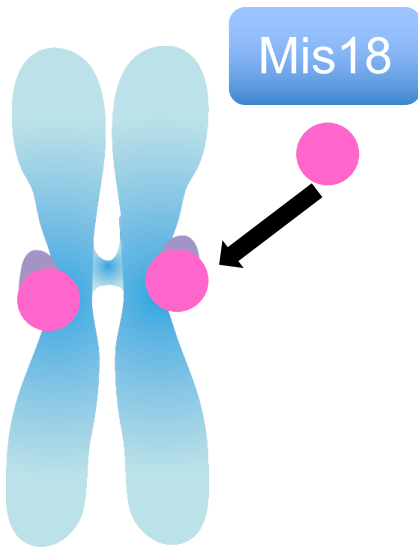


(図19)分裂酵母の3本の染色体と人工染色体

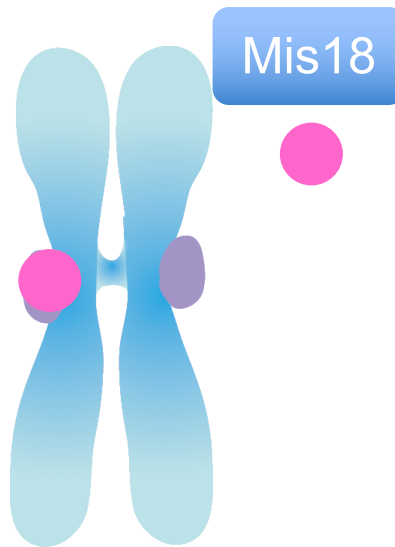
Allshire, R. C., Ekwall, K. 2015 Cold Spring Harb Perspect Biol Fig2,
 Tomohiro Mtsunoto et al 1987 Mol. Cel.Bio Fig2を参照に作図。

● Cnp1
(CENP-A)

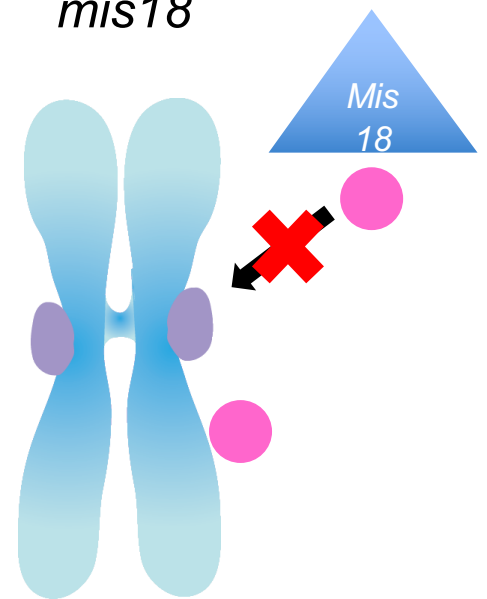
WT



cnp3-1



mis18



Cnp1をリクルートできるが、
Cnp1 のセントロメア局在
は減少する

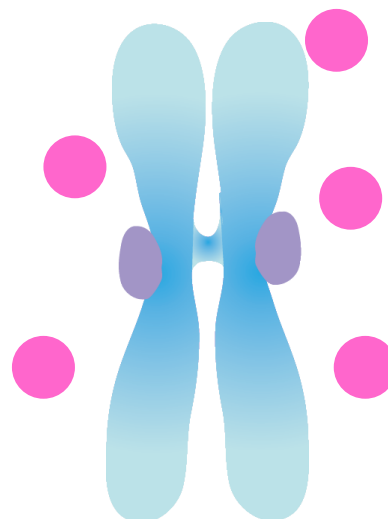
Cnp1をリクルートできない



Cnp1をリクルートできず、Cnp1 の
セントロメア局在は減少する

cnp3-1 mis18

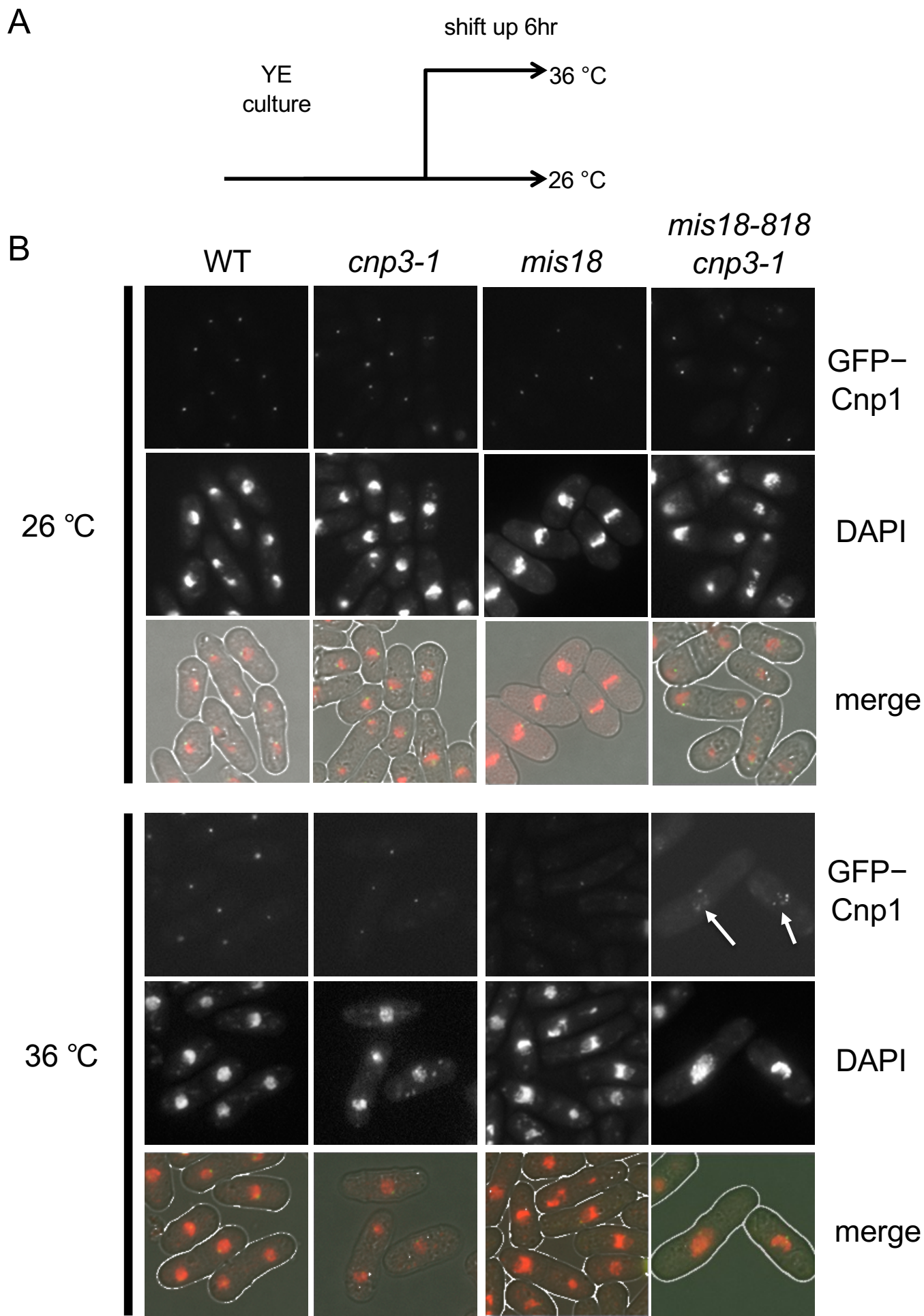
染色体上に取り込まれないCnp1が一
時的に増える



GFP-Cnp1過剰発現時を模倣している
のではないかと

GFP-Cnp1が染色体上の様々な領域に
取り込まれるだろうか？

(図20) *cnp3-1 mis18* の二重変異株作成に至った経緯

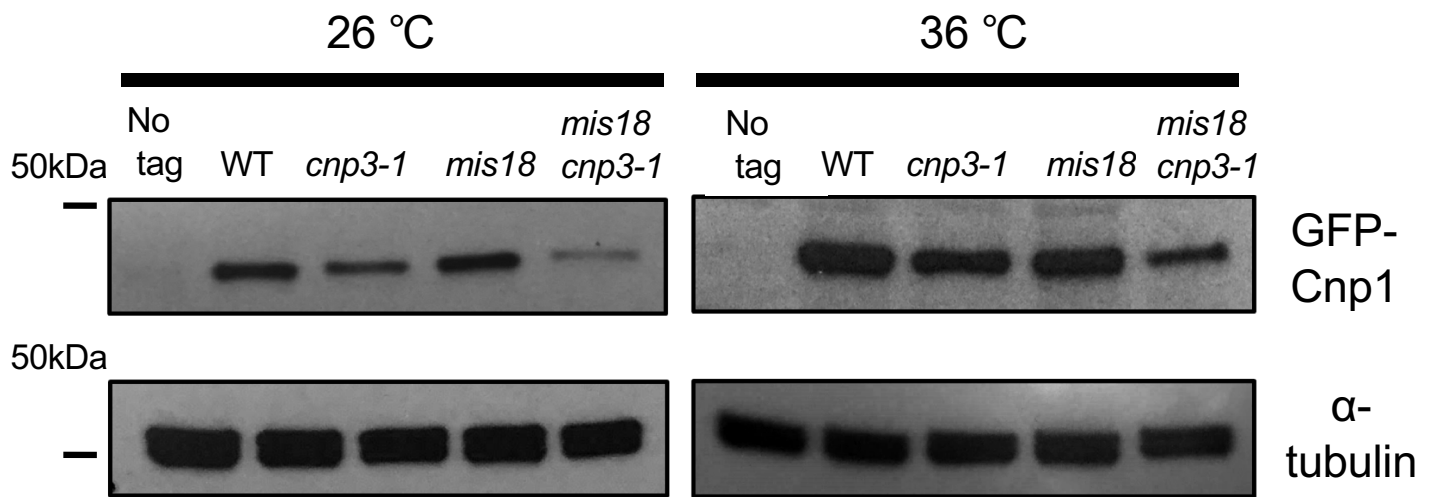


(図21) *cnp3-1 mis18-818*におけるGFP-Cnp1の顕微鏡観察

(A) 培養条件。(B) 26 °Cでは、野生型と*cnp3-1*,*mis18-818*,*cnp3-1 mis18-818*で表現型はほぼ変わらなかった。36 °Cでは、*cnp3-1*,*mis18-818*でGFP-Cnp1のシグナルが弱くなり、二重変異株ではGFP-Cnp1がマルチドット状に観察された。(矢印)KEYENCE使用。

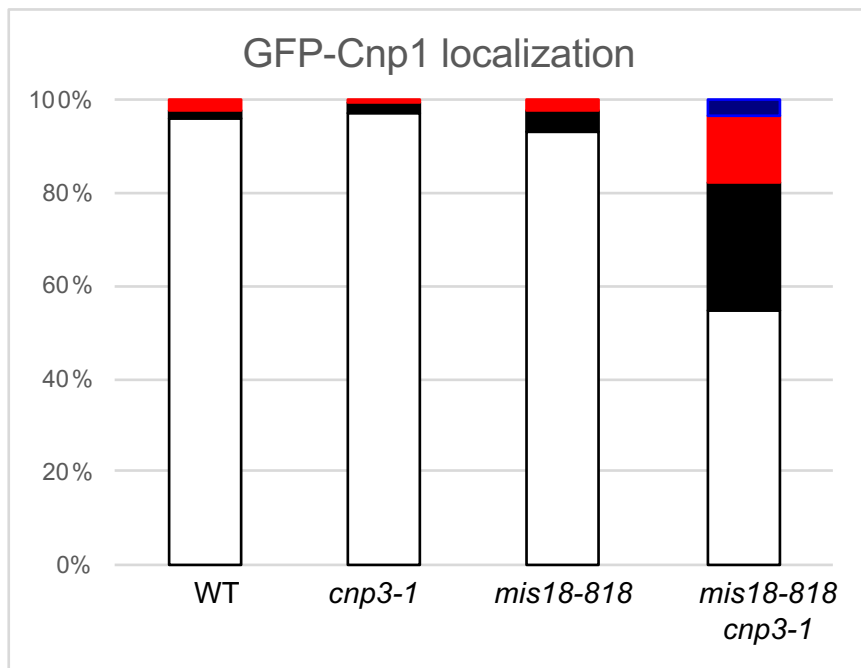
scale bar 5μm

A



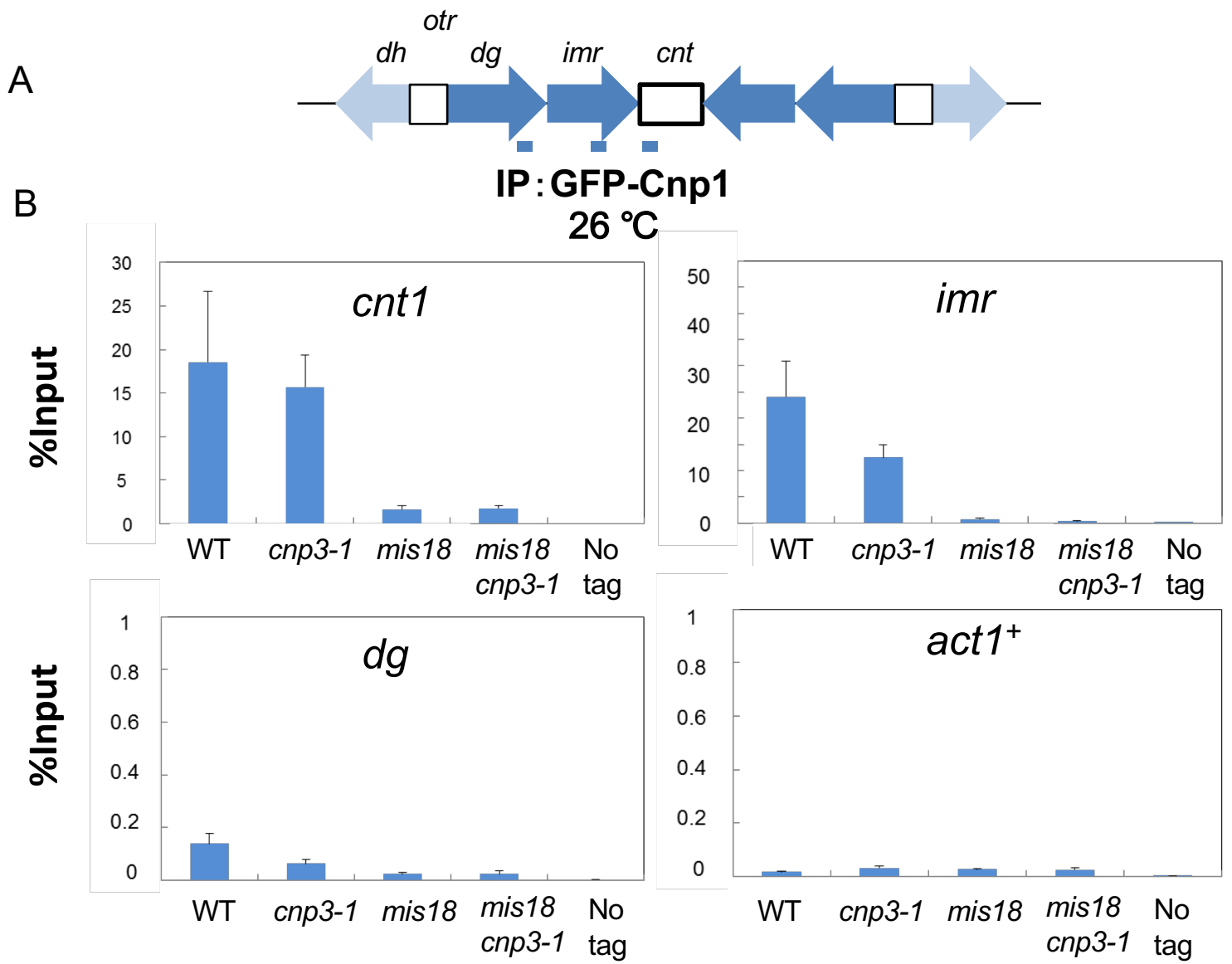
B

36 °C



(図22) *cnp3-1 mis18-818* の表現型

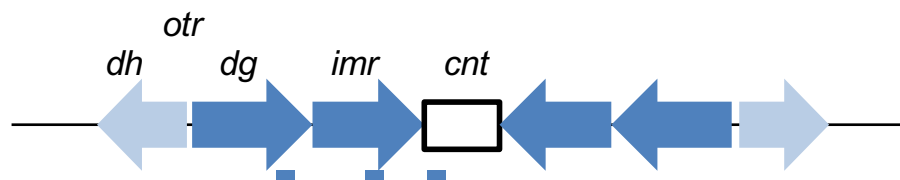
(A) GFP-Cnp1のウェスタンブロット。GFP-Cnp1は生理的な条件で発現した（過剰発現していない）。26 °Cと36 °Cの両方で、二重変異株*cnp3-1 mis18-818*はGFP-Cnp1の発現量が低下していた。α-tubulinはローディングコントロールとして使用した。（C） GFP-Cnp1の表現型の割合。



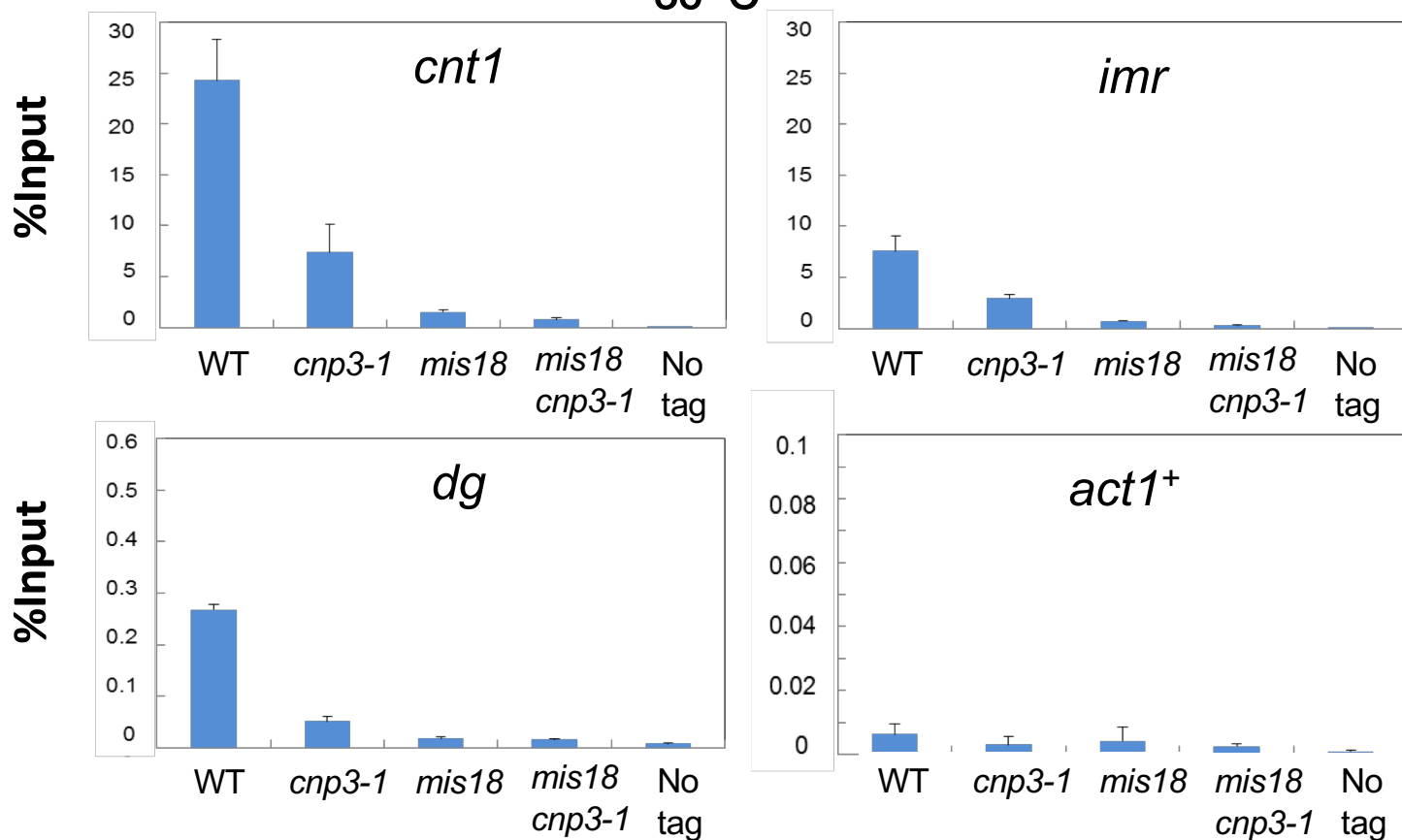
(図23) 26 °Cにおける*cnp3-1 mis18-818*のChIP

(A) ChIPに用いたプライマー領域を青色のバーで示した。

(B) RT-PCRによるセントロメア領域*cnt1*, *imr1dg*, のGFP-Cnp1の定量結果。



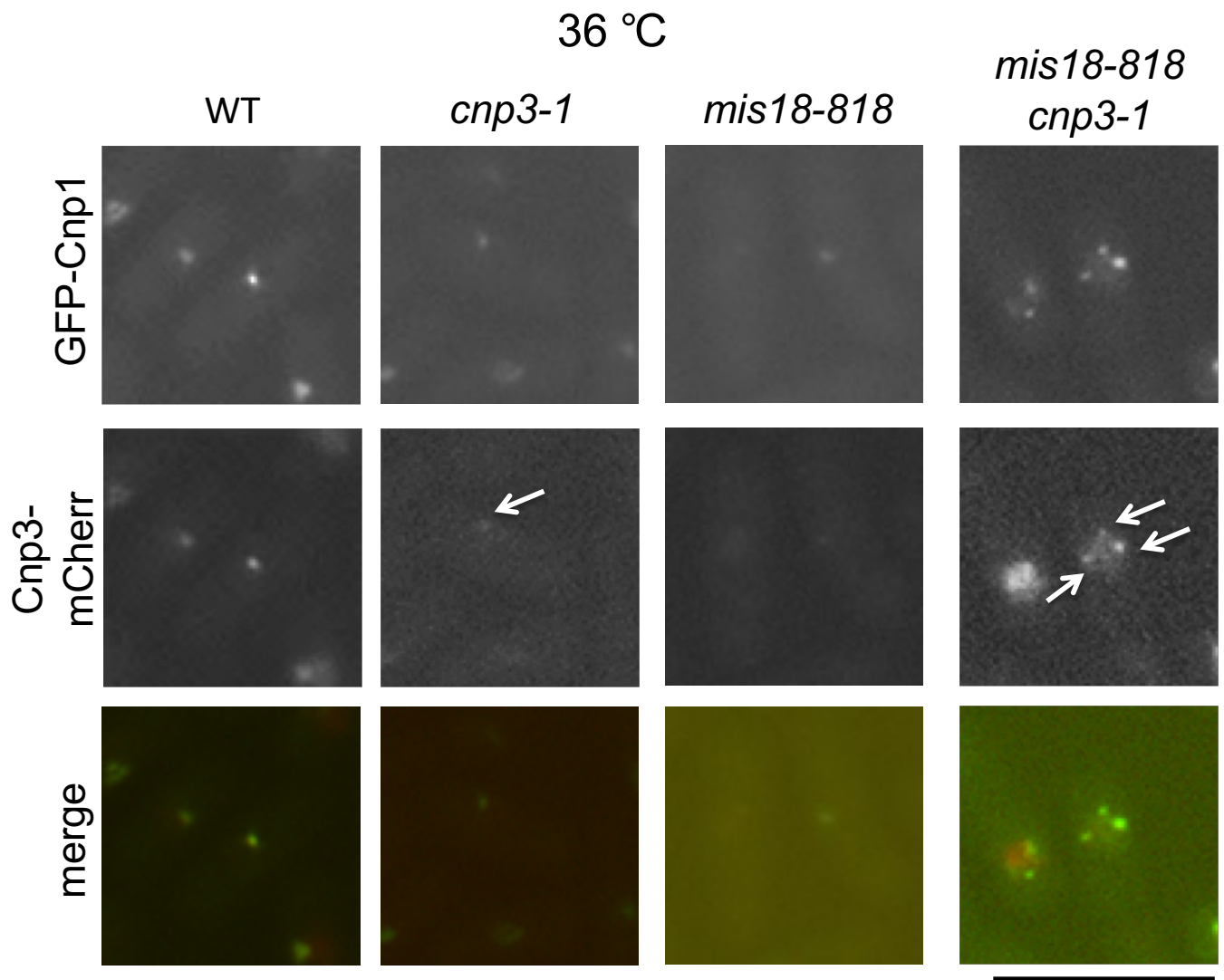
IP: GFP-Cnp1
36 °C



(図24) 36 °Cにおける*cnp3-1 mis18-818*のChIP

(A) ChIPに用いたプライマー領域を青色のバーで示した。

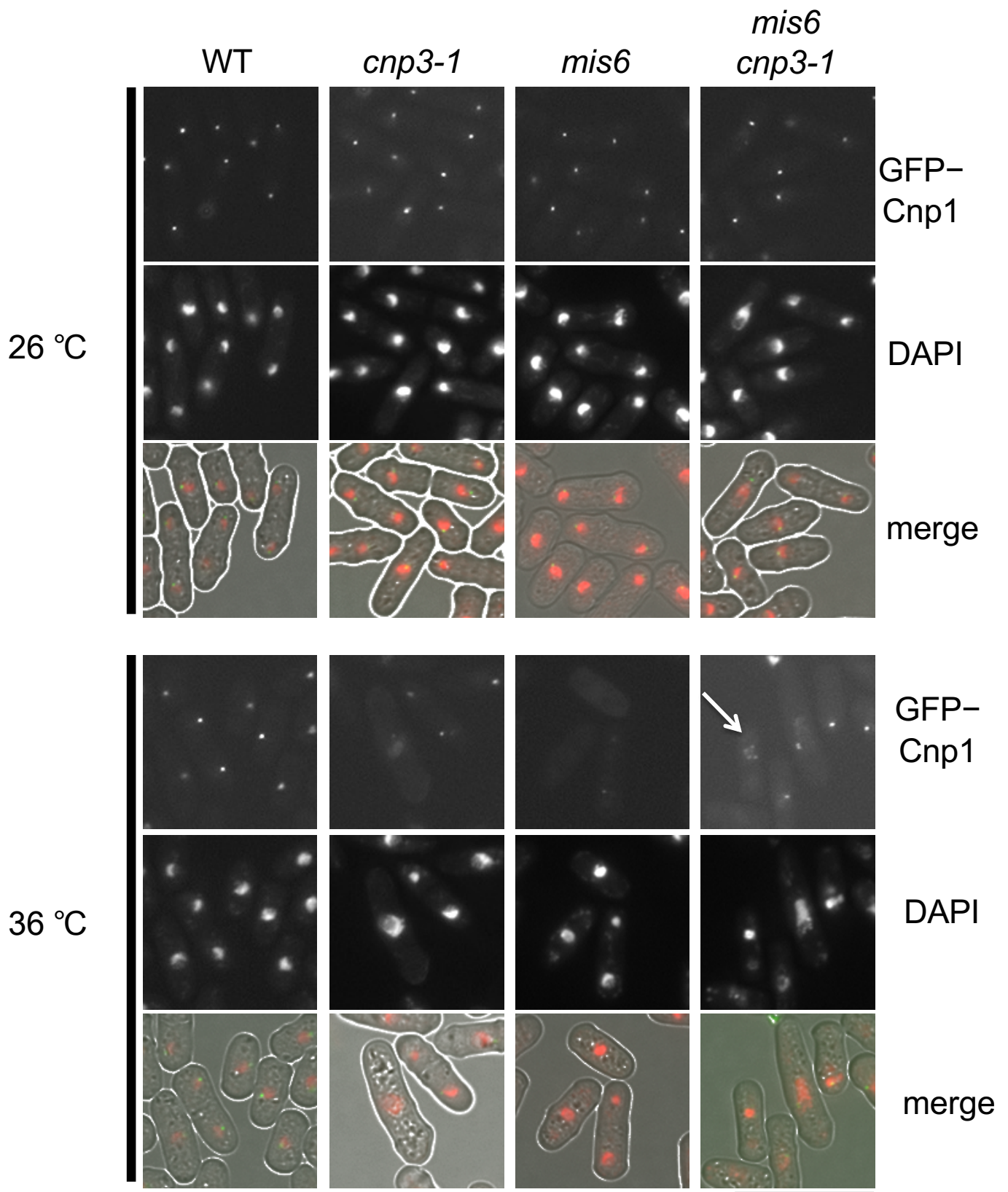
(B) RT-PCRによるセントロメア領域*cnt1*, *imr1*, *dg*領域の GFP-Cnp1の定量結果。26 °Cと比較すると、セントロメア領域に局在するGFP-Cnp1が減少していた。



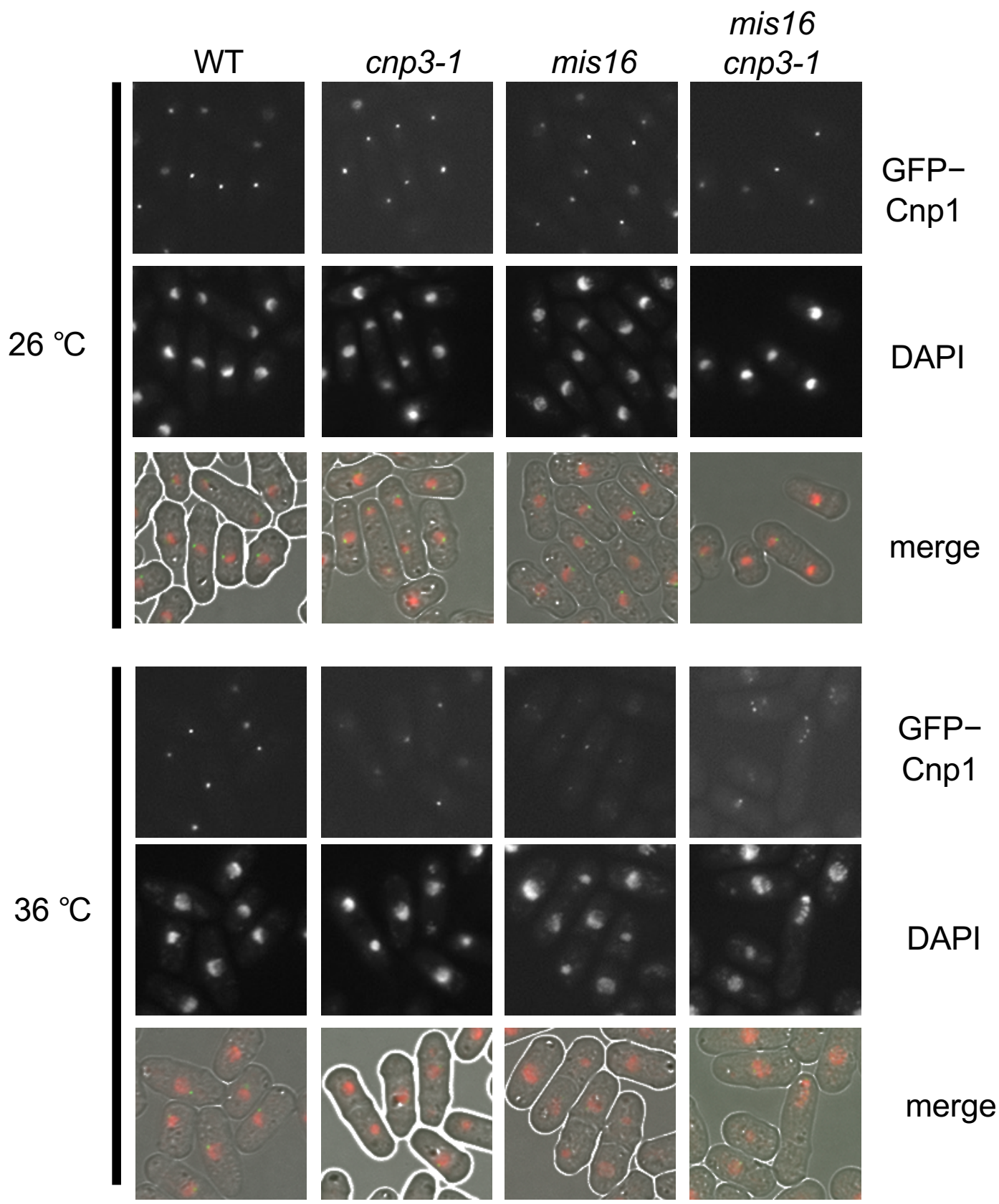
(図25) 36 °CにおけるCnp3-mCherryの局在観察

*cnp3-1mis18-818*の2重変異株におけるCnp3タンパク質の局在を観察した。培養は、完全培地YEを用いて26 °C培養したのち、36 °Cにシフトアップして6時間培養した。*cnp3-1mis18-818*ではGFP-Cnp1と同様に、変異型タンパク質Cnp3-1mCherryも36 °Cでマルチドットとして観察された（矢印）。

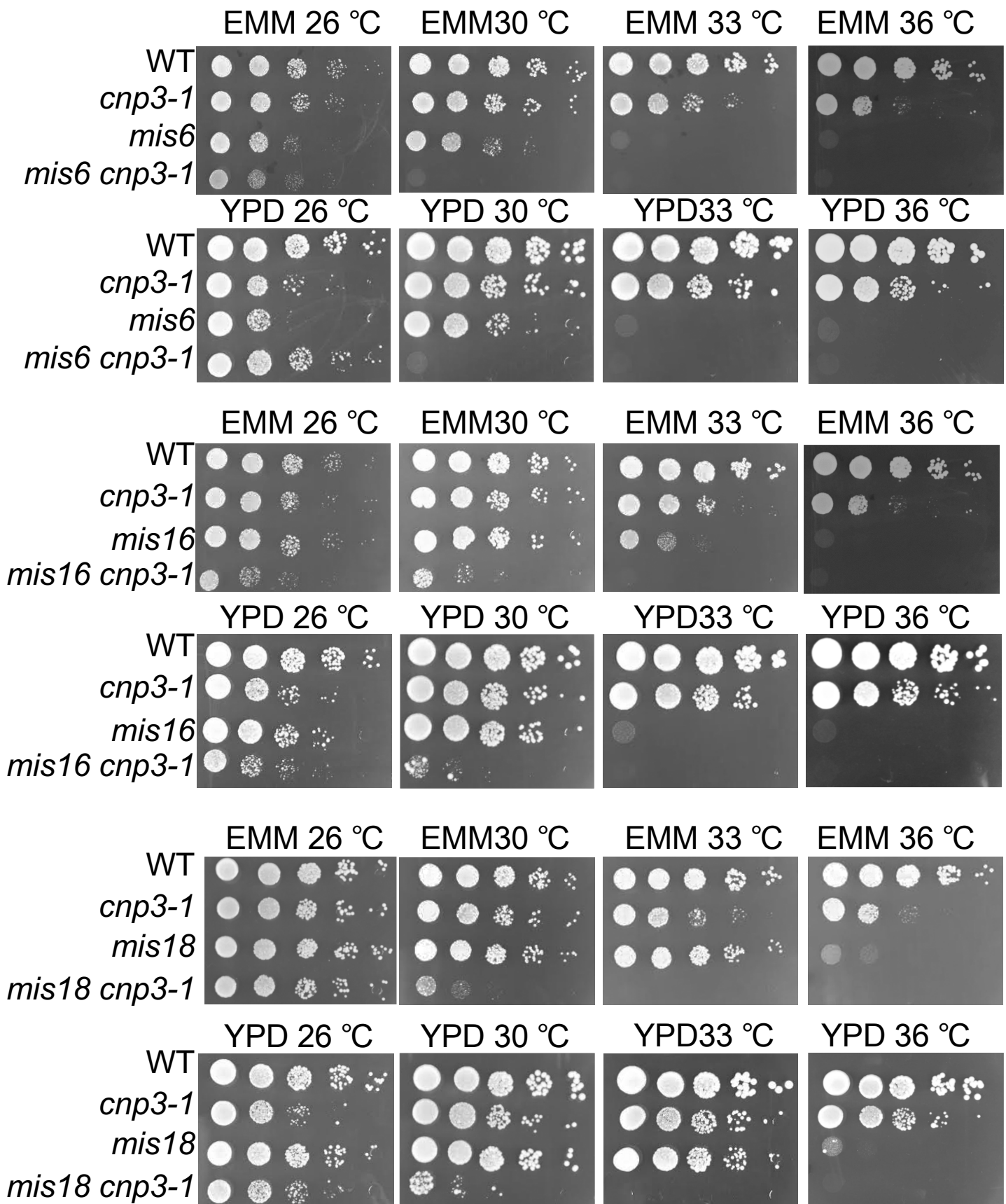
KEYENCE使用。scale bar 5μm



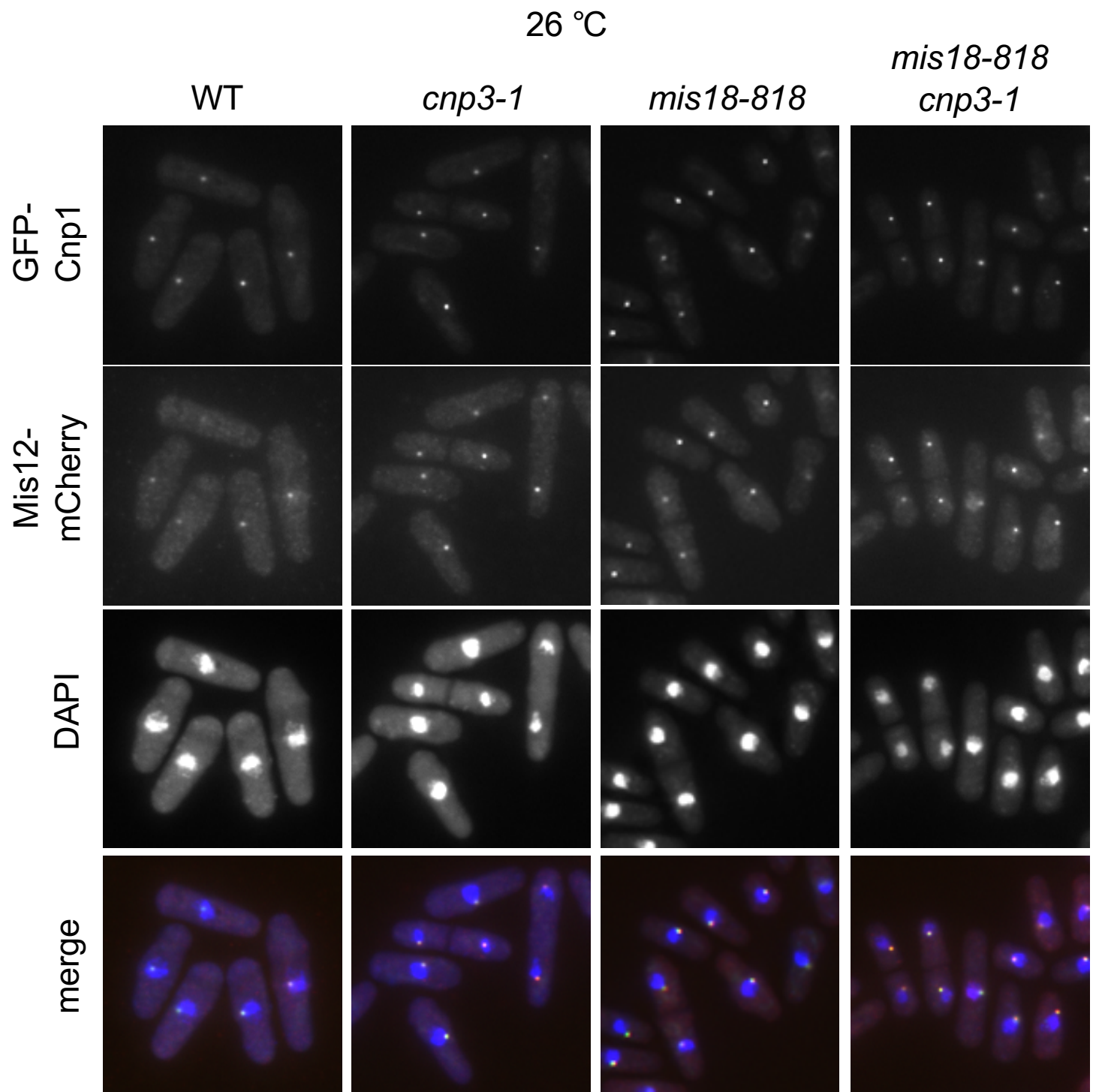
(図26) *cnp3-1 mis6-302*におけるGFP-Cnp1の局在観察
*cnp3-1 mis6-302*の二重変異株でも、制限温度である36 °Cで
 GFP-Cnp1のマルチドットが観察された (矢頭)。KEYENCE使
 用。scale bar 5μm



(図27) *cnp3-1 mis16-53*におけるGFP-Cnp1の局在観察
*cnp3-1 mis16-53*の二重変異株でも、制限温度である36 °Cで
 GFP-Cnp1のマルチドットが観察された。KEYENCE使用。
 scale bar 5μm

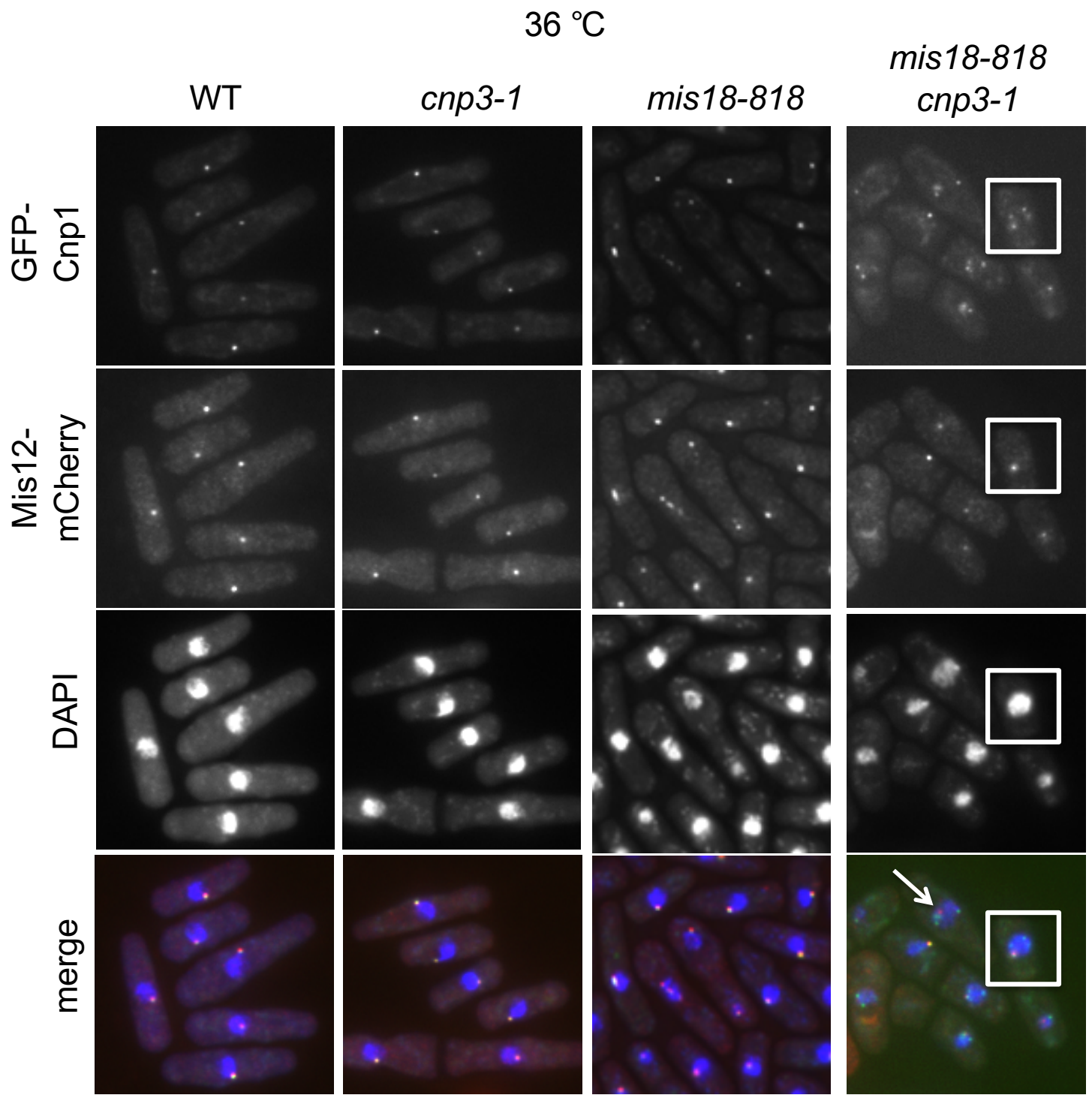


(図28) Cnp1のリクルート因子と*cnp3-1*の二重変異株の表現型
mis6、*mis16*、*mis18*と*cnp3-1*の二重変異株のスポットテスト。
 26 °Cは3日、30 °C、33 °C、36 °Cは2日培養した。



(図29) 26 °Cにおけるmis12-mCherryの局在

*cnp3-1 mis18-818*の二重変異株におけるmis12-mCherryの局在観察。
許容温度である26 °Cでは、GFP-Cnp1,Mis12-mCherryともに一点のみ
核内に共局在する様子が観察された。KEYENCE使用。scale bar 5μm



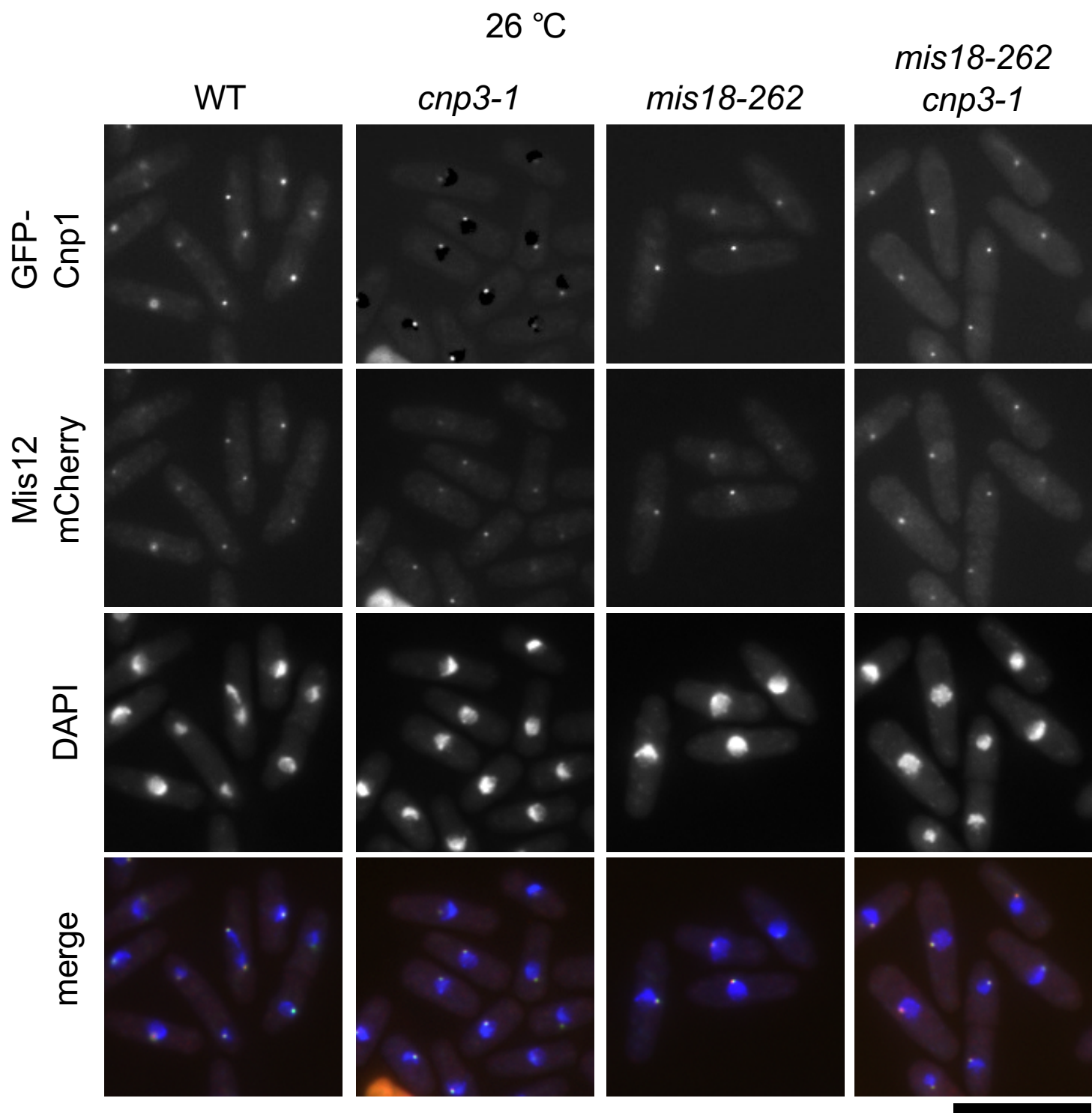
mis18-818 cnp3-1



(図30) 36 °Cにおけるmis12-mCherryの局在

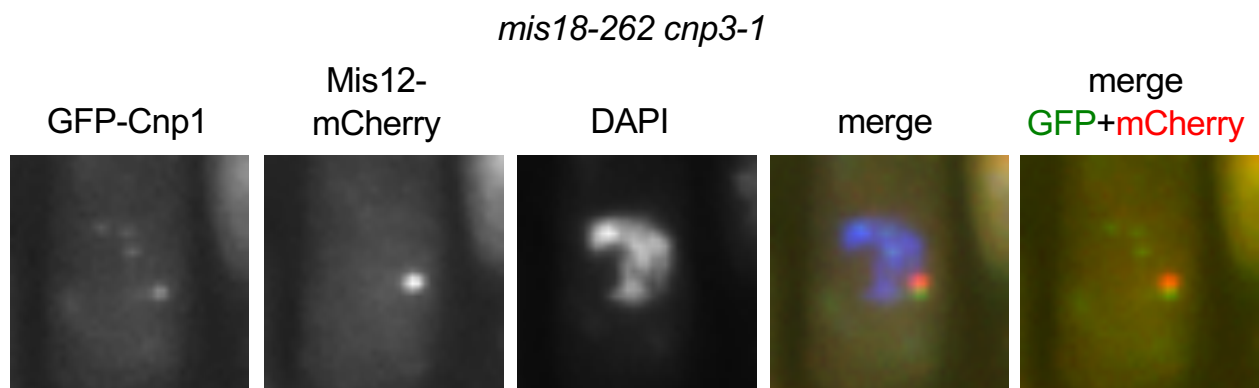
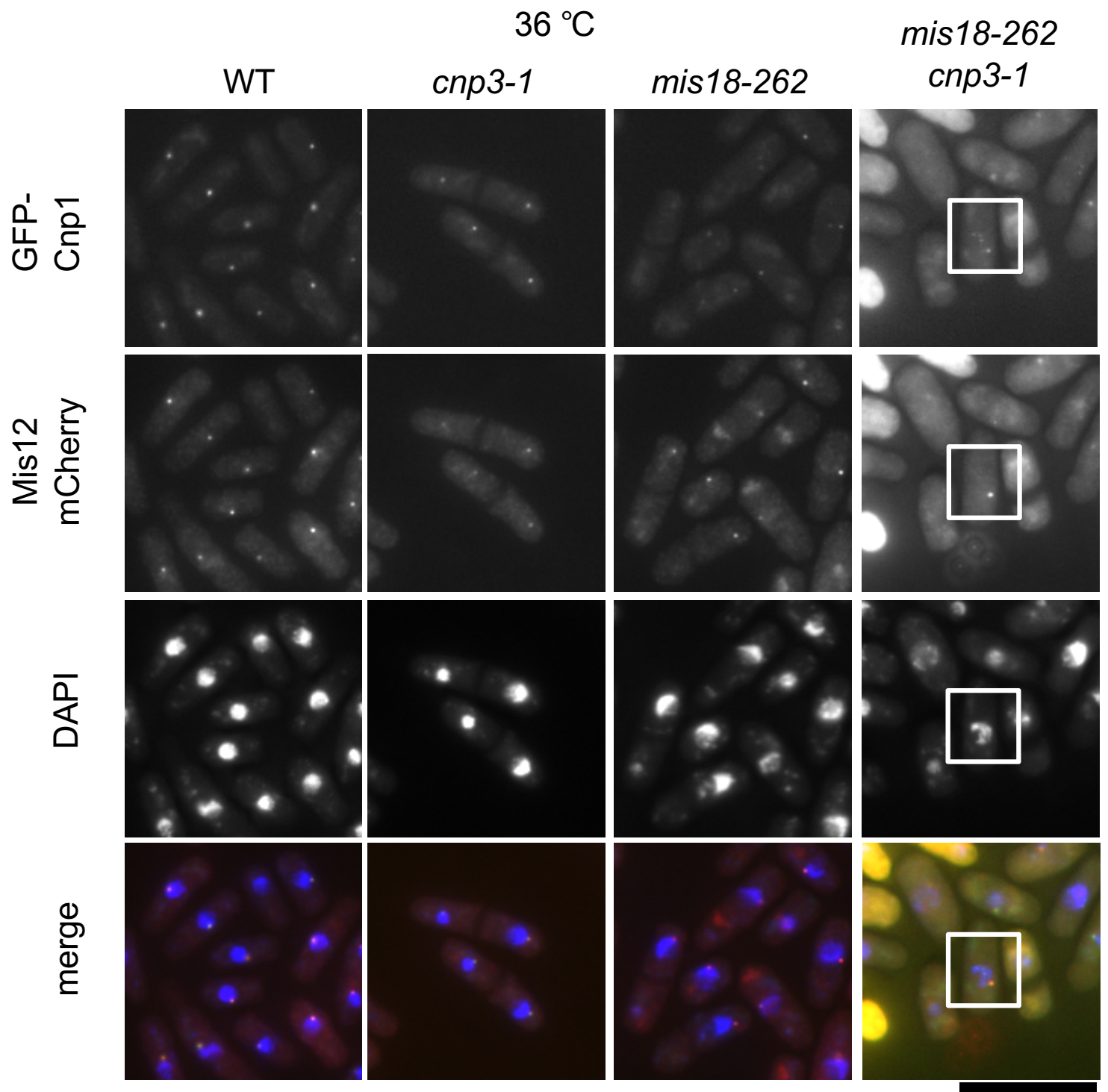
(上) *cnp3-1 mis18-818*の二重変異株におけるmis12-mCherryの局在観察。制限温度である36 °CではMis12-mCherryが核内に1点のみ観察されるが、GFP-Cnp1と共局在する細胞（白枠）と全く共局在していない細胞（矢頭）が察された。

(下) *cnp3-1 mis18-818*の白枠の部分拡大した写真。KEYENCE使用。scale bar 5μm



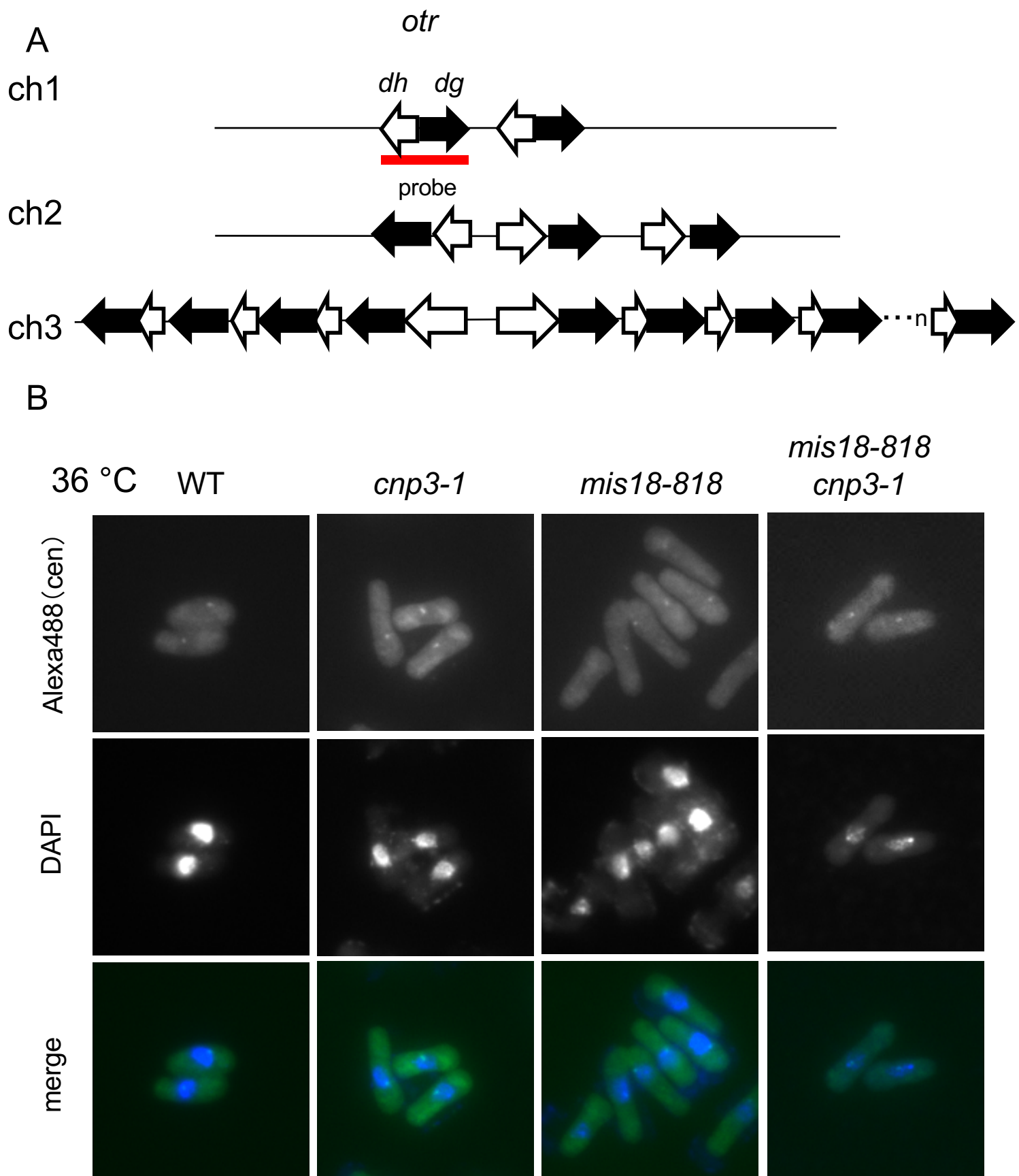
(図31) 26 °Cにおけるmis12-mCherryの局在

*cnp3-1 mis18-262*の二重変異株におけるmis12-mCherryの局在観察。
許容温度である26 °Cでは、*cnp3-1 mis18-818*と同様にGFP-Cnp1は
核内に1点のみ観察された。KEYENCE使用。scale bar 5μm.



(図32) 36 °Cにおけるmis12-mCherryの局在

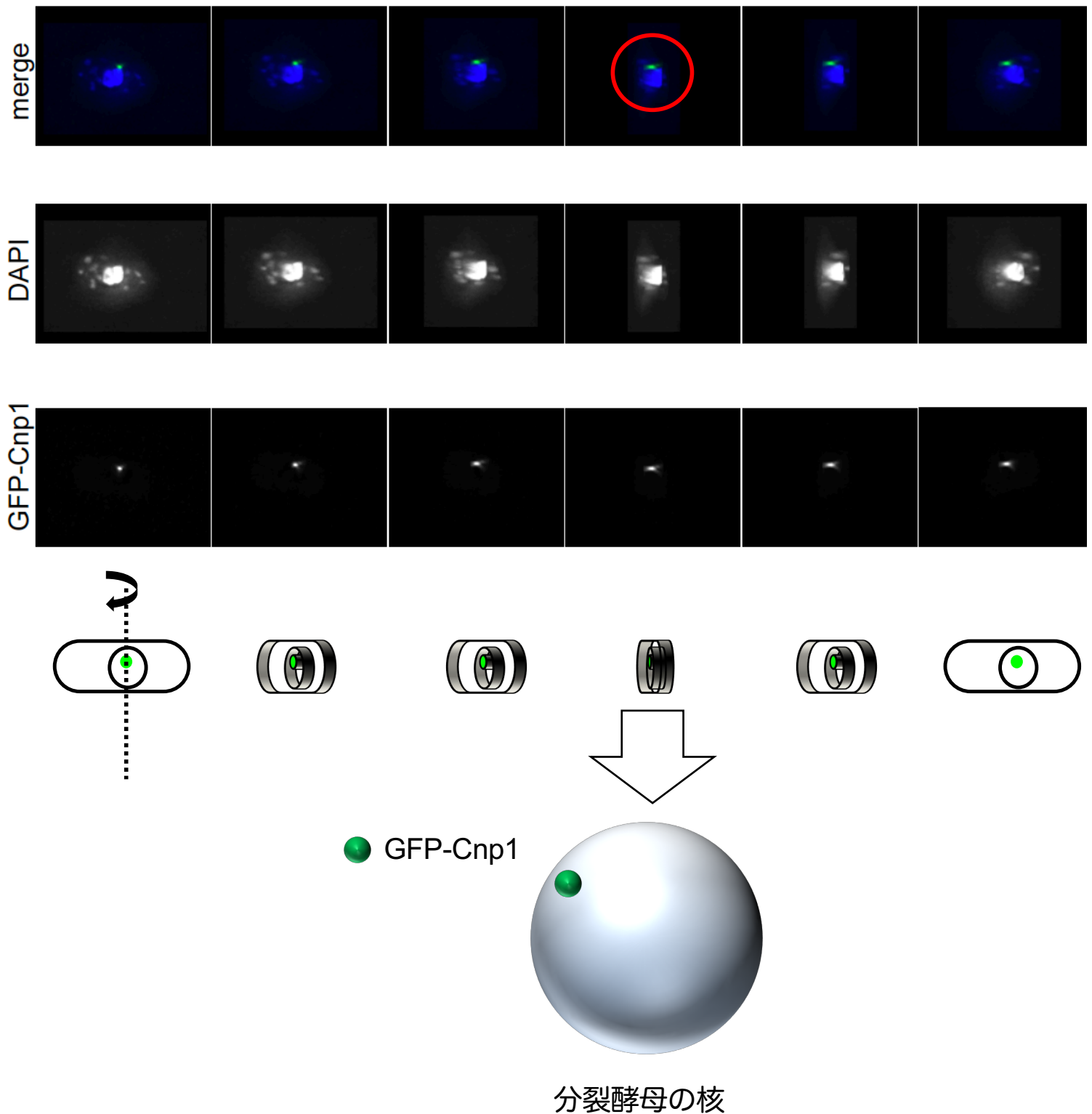
(上) 制限温度である36 °Cでは、mis12-mCherryが核内に1点のみ観察され、*cnp3-1 mis18-262*と同様にGFP-Cnp1は複数点核内に観察された。(下) *cnp3-1 mis18-262*の二重変異株の白枠部分を拡大した写真。KEYENCE使用。scale bar 5μm。



(図33) 36 °CでのFISHによるセントロメア領域の検出

(A) 分裂酵母のセントロメア領域 (*otr*領域) の模式図とpRS140が持つ配列領域 (青線)。図3の*otr*の詳細を示しており、一番染色体 (ch1) 二番染色体 (ch2)、三番染色体 (ch3) で*otr*領域の配列は異なる。しかし染色体間でホモロジーの高い配列を持つため、pRS140のプロープはすべての染色体のセントロメア*otr*領域でハイブリダイズすることができる(Chikashige et al 1989参照)。(B) FISHによる制限温度36 °Cでの顕微鏡観察。*cnp3-1mis18-818*の二重変異株でセントロメア領域のシグナルは1点のみ観察された。

36 °C WT

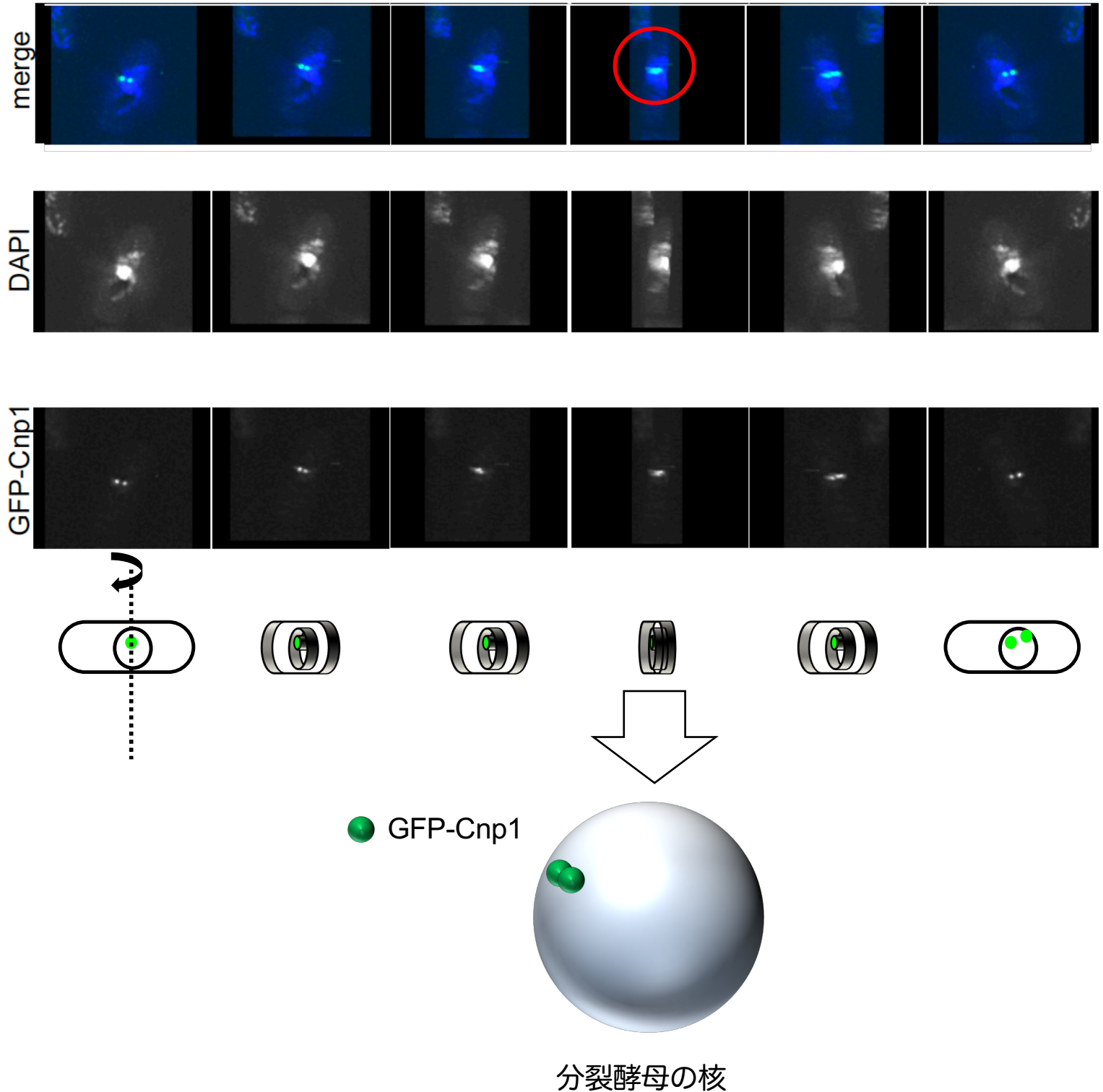


(図34) GFP-Cnp1の局在観察

36 °CのWTにおけるGFP-Cnp1の局在観察。Δvisionで撮影後、Y軸に沿って180°回転させた写真（上）。細胞を回転させている様子と、顕微鏡写真（上）で赤枠で囲った細胞の核をイラストで示した（下）。球状になっている核の中で、GFP-Cnp1のシグナルは核の左側（核膜）寄りに観察された。

36 °C

mis6 cnp3-1

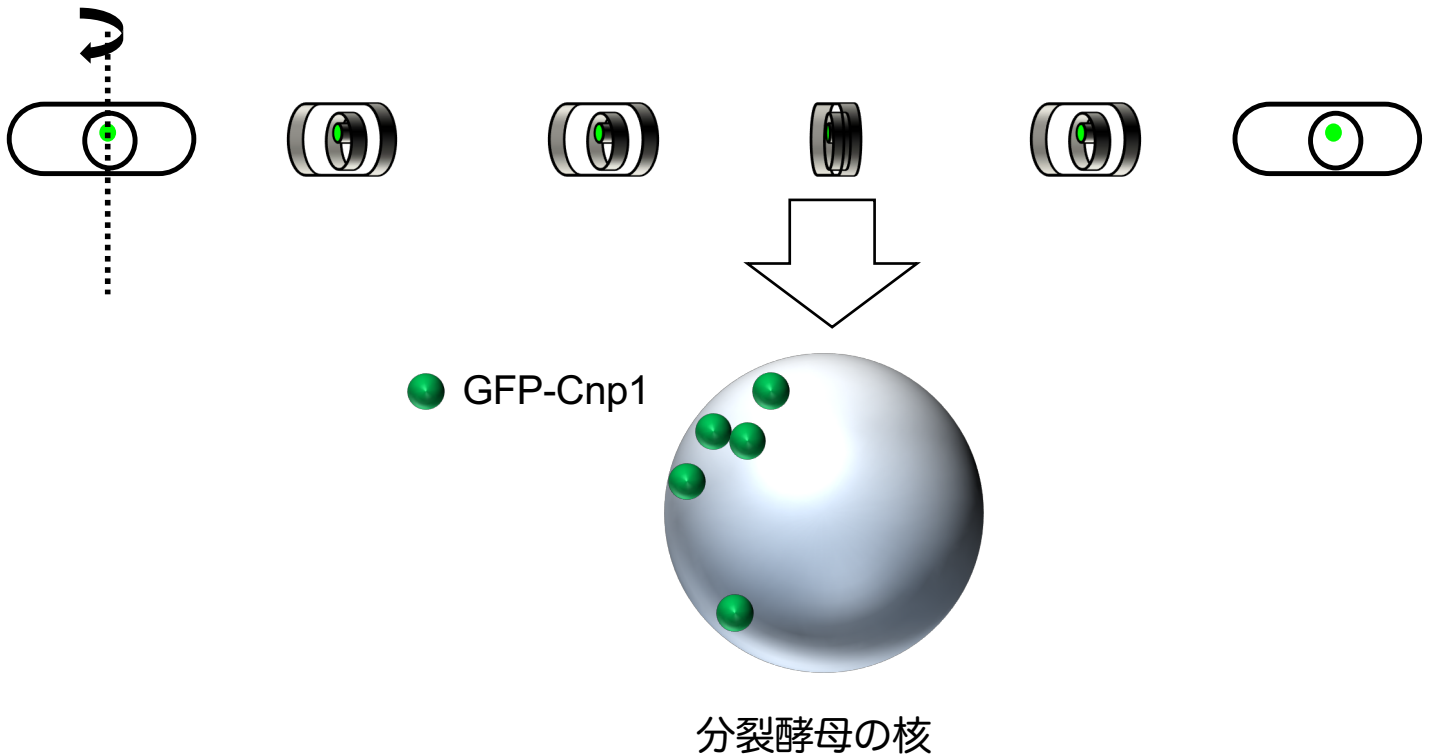


(図35) GFP-Cnp1の局在観察

制限温度である36 °Cの*cnp3-1 mis6-302* 二重変異株におけるGFP-Cnp1の局在観察。Δvisionで撮影後、Y軸方向に180°回転させた写真（上）。細胞を回転させている様子と、顕微鏡写真（上）で赤枠で囲った細胞の核をイラストで示した（下）。球状になっている核の中で、GFP-Cnp1のシグナルは核の左側（核膜）寄りに観察された。GFP-Cnp1のシグナルは核の左側（核膜）寄りに、二点重なって観察された。

36 °C

mis16 cnp3-1

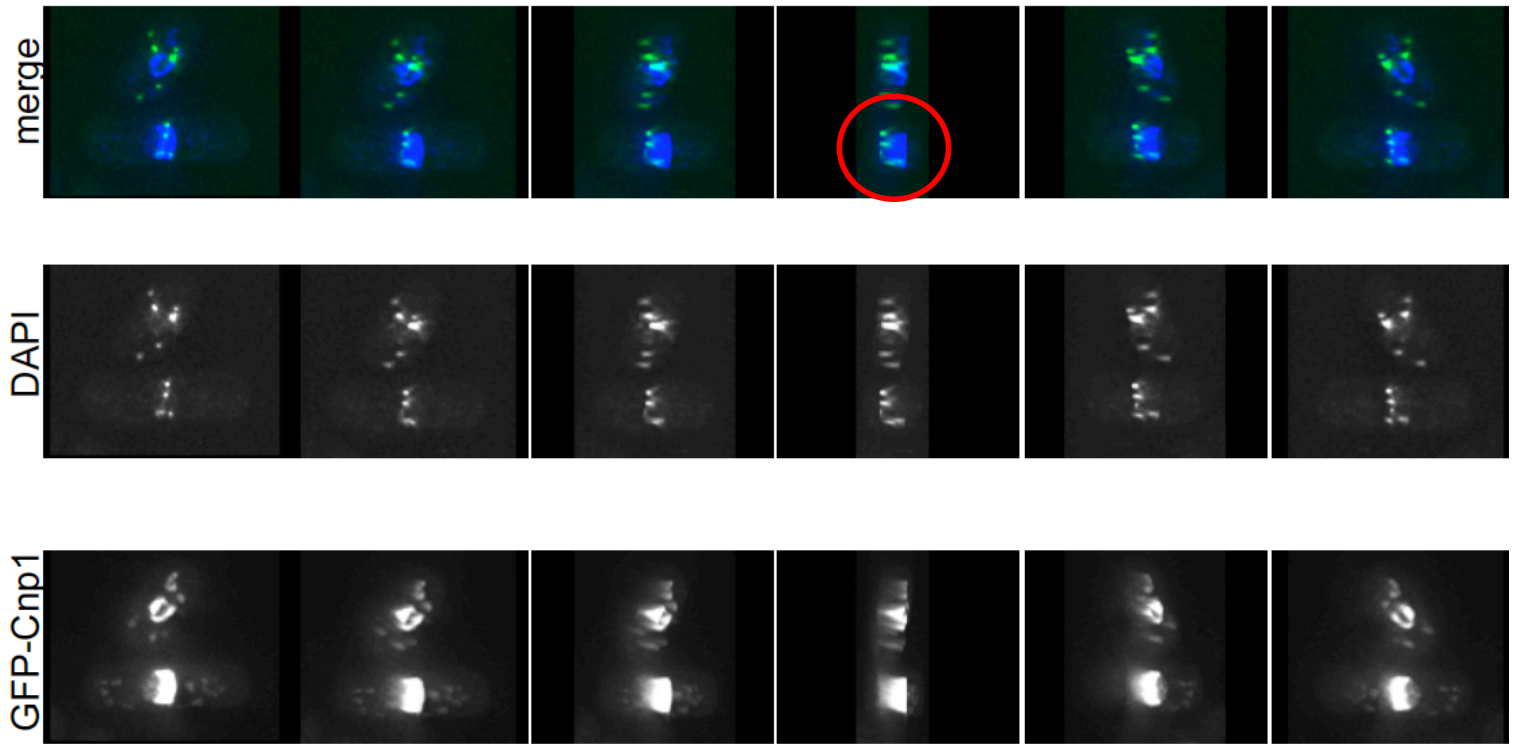


(図36) GFP-Cnp1の局在観察

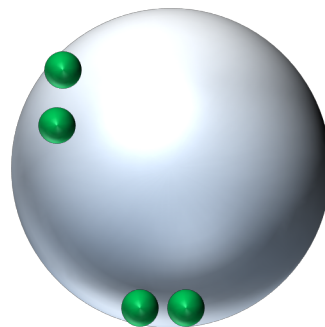
制限温度である36 °Cの *cnp3-1mis16-53* におけるGFP-Cnp1の局在観察。Δvisionで撮影後、Y軸方向に180°回転させた写真（上）。細胞を回転させている様子と、顕微鏡写真（上）で赤枠で囲った細胞の核をイラストで示した（下）。球状になっている核の中で、GFP-Cnp1のシグナルは核内の左側（核膜）寄りに複数点観察された。

36 °C

mis18 cnp3-1



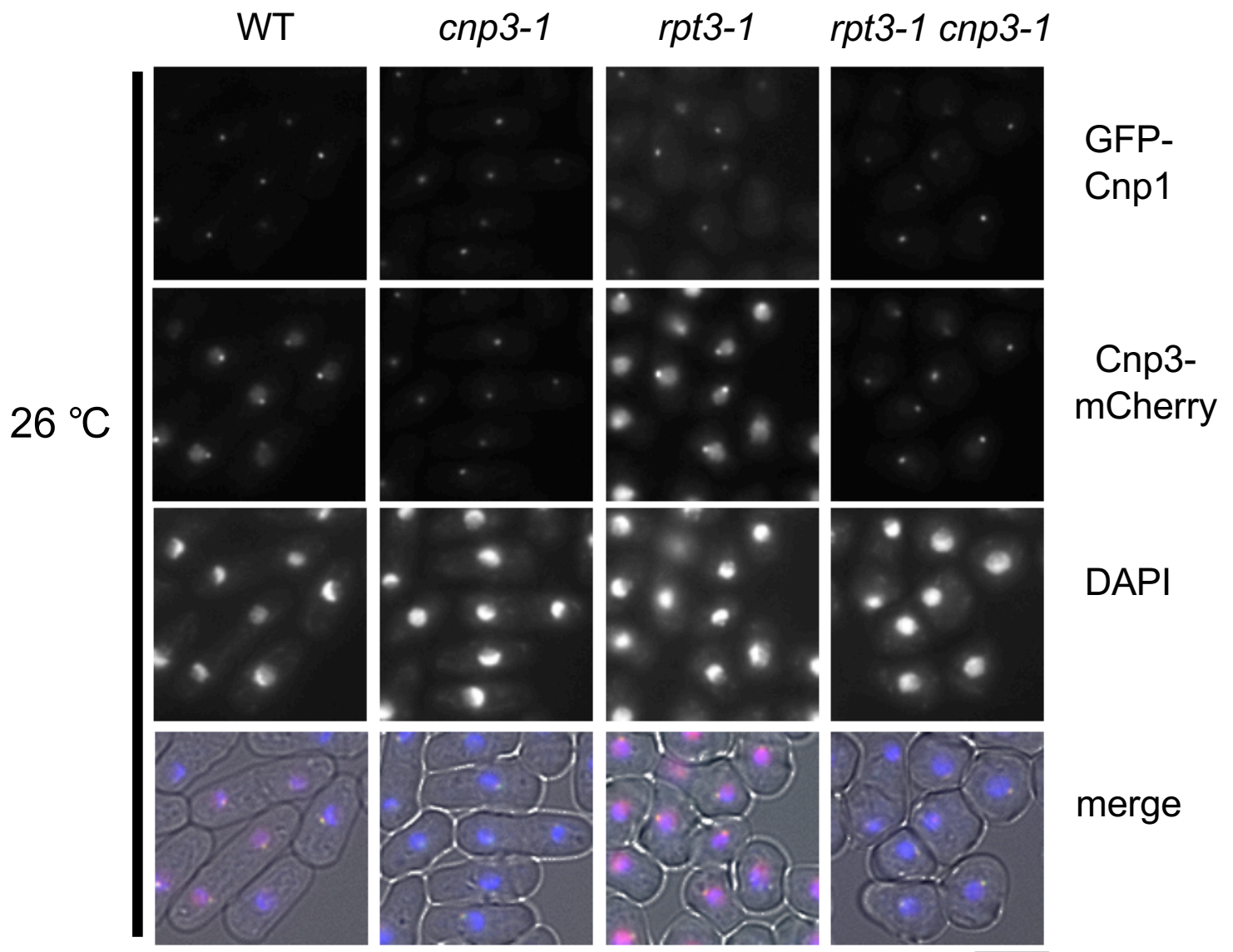
● GFP-Cnp1



分裂酵母の核

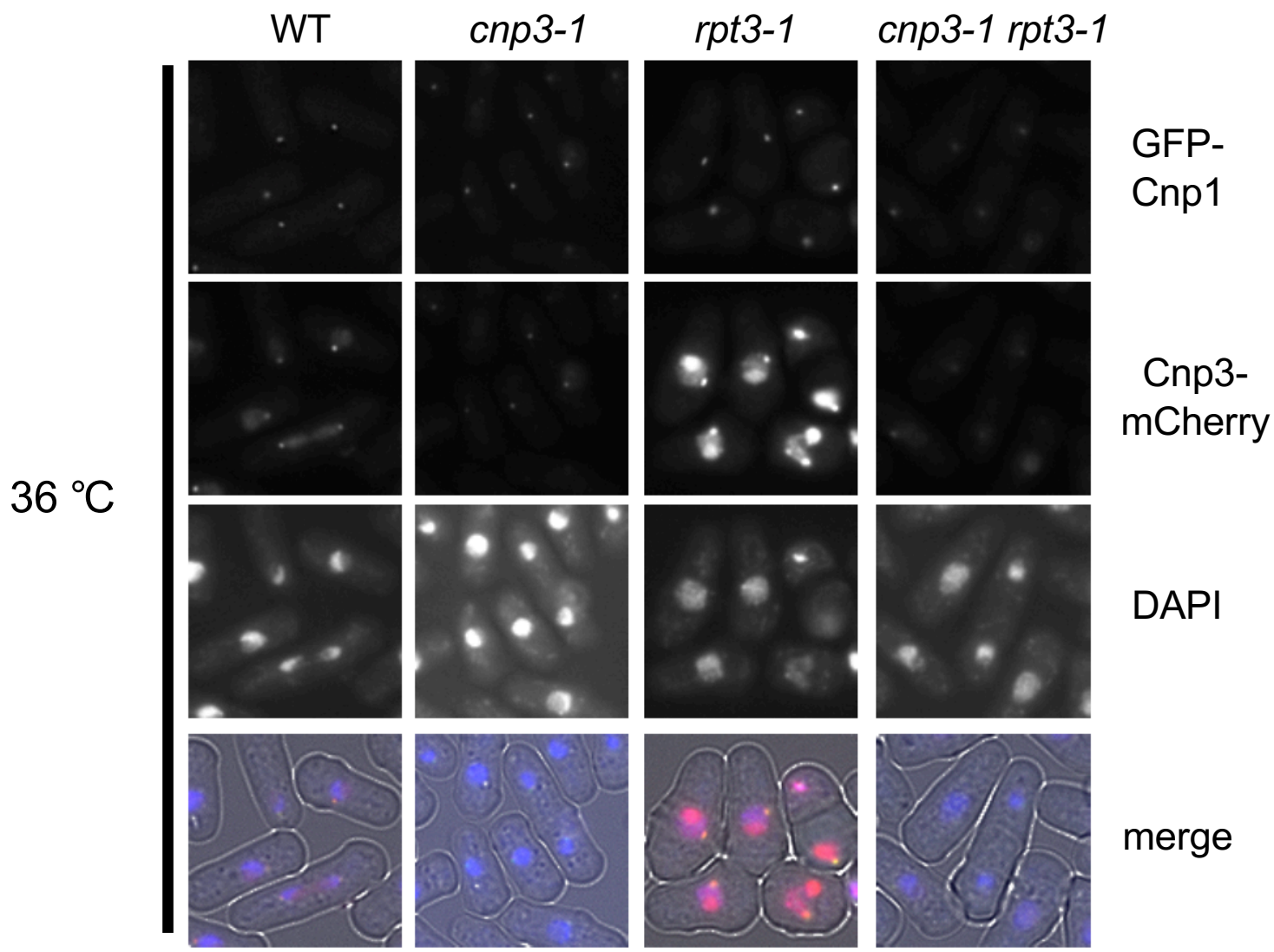
(図37) GFP-Cnp1の局在観察

制限温度である36 °Cの*cnp3-1 mis18-818* におけるGFP-Cnp1の局在観察。
 Δ visionで撮影後、Y軸方向に180°回転させた写真（上）。細胞を回転させている様子と、顕微鏡写真（上）で赤枠で囲った細胞の核をイラストで示した（下）。球状の核内で、GFP-Cnp1のシグナルが複数点観察された。



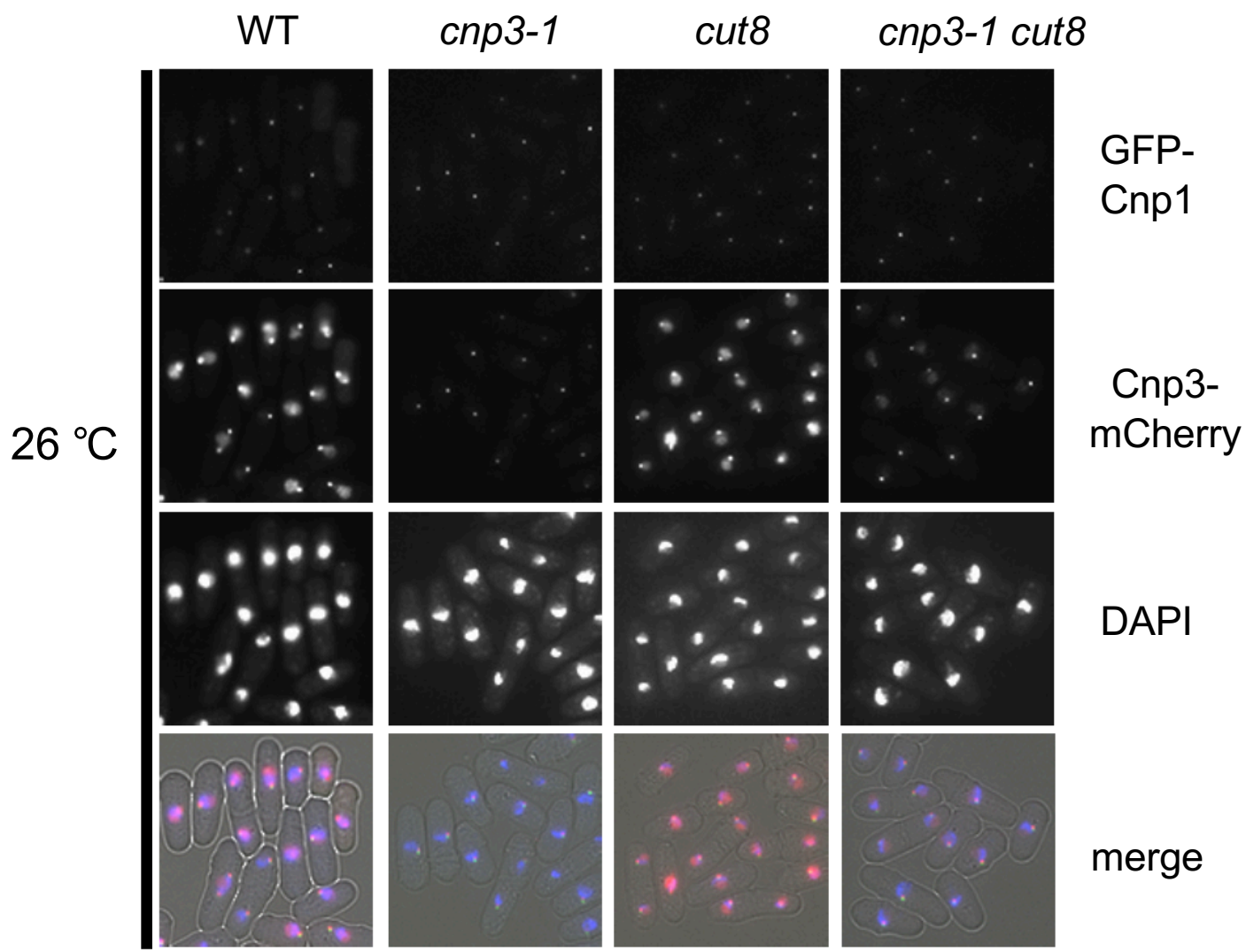
(図38) *cnp3-1rpt3-1*の二重変異株の表現型

許容温度である26 °Cでの*cnp3-1 rpt3-1*の二重変異株の顕微鏡観察。
 許容温度である26 °Cでは、*cnp3-1 rpt3-1*の二重変異株も野生型と同様に、核内にGFP-Cnp1が1点のみ観察された。KEYENCE使用。
 scale bar 5μm。



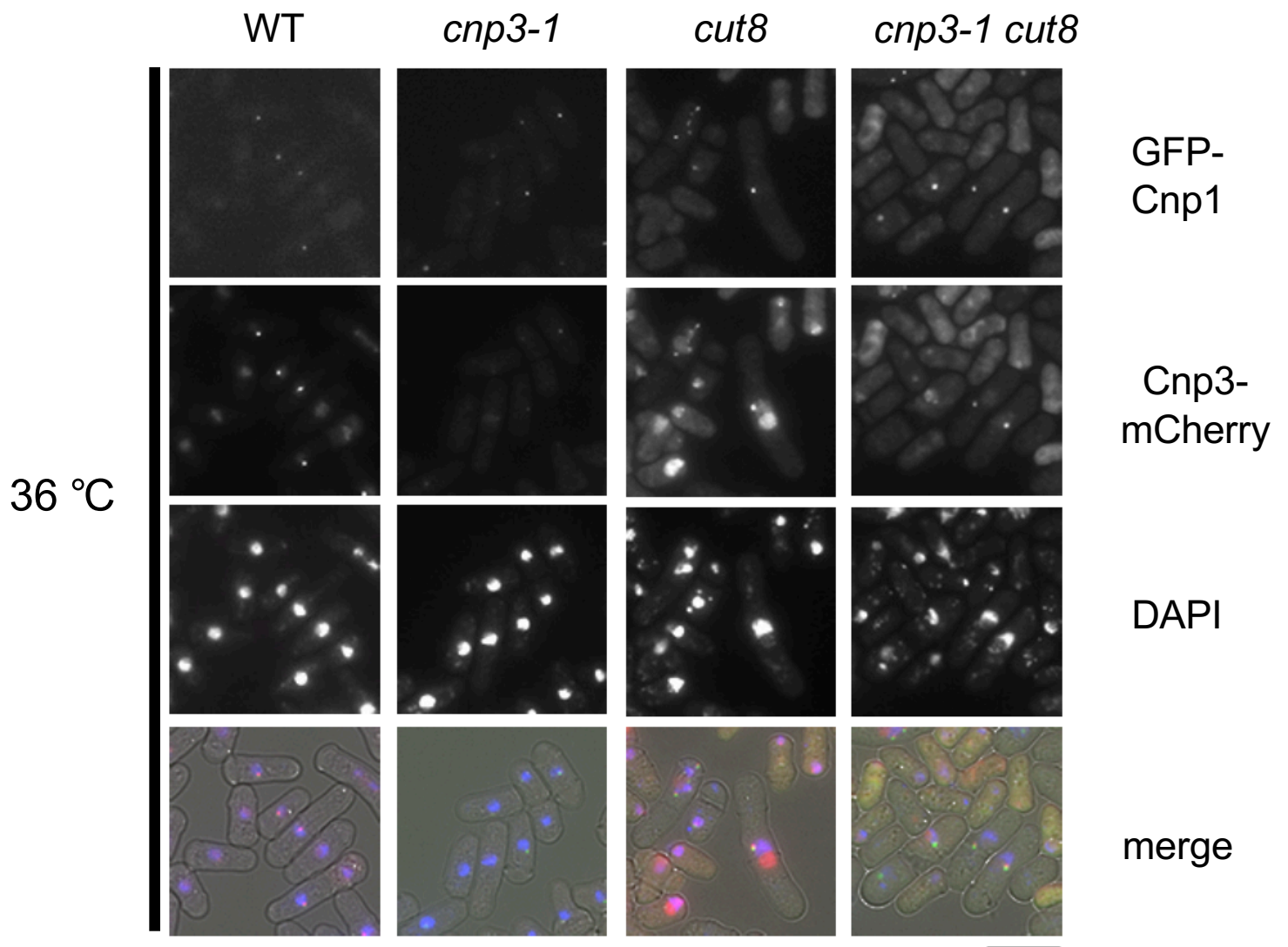
(図39) *cnp3-1 rpt3-1*の二重変異株の表現型

制限温度である36 °Cでの*cnp3-1 rpt3-1*の二重変異株の顕微鏡観察。
 制限温度である36°Cでも、*cnp3-1 rpt3-1*の二重変異株は野生型と同様に、核内にGFP-Cnp1が1点のみ観察された。KEYENCE使用。
 scale bar 5μm。



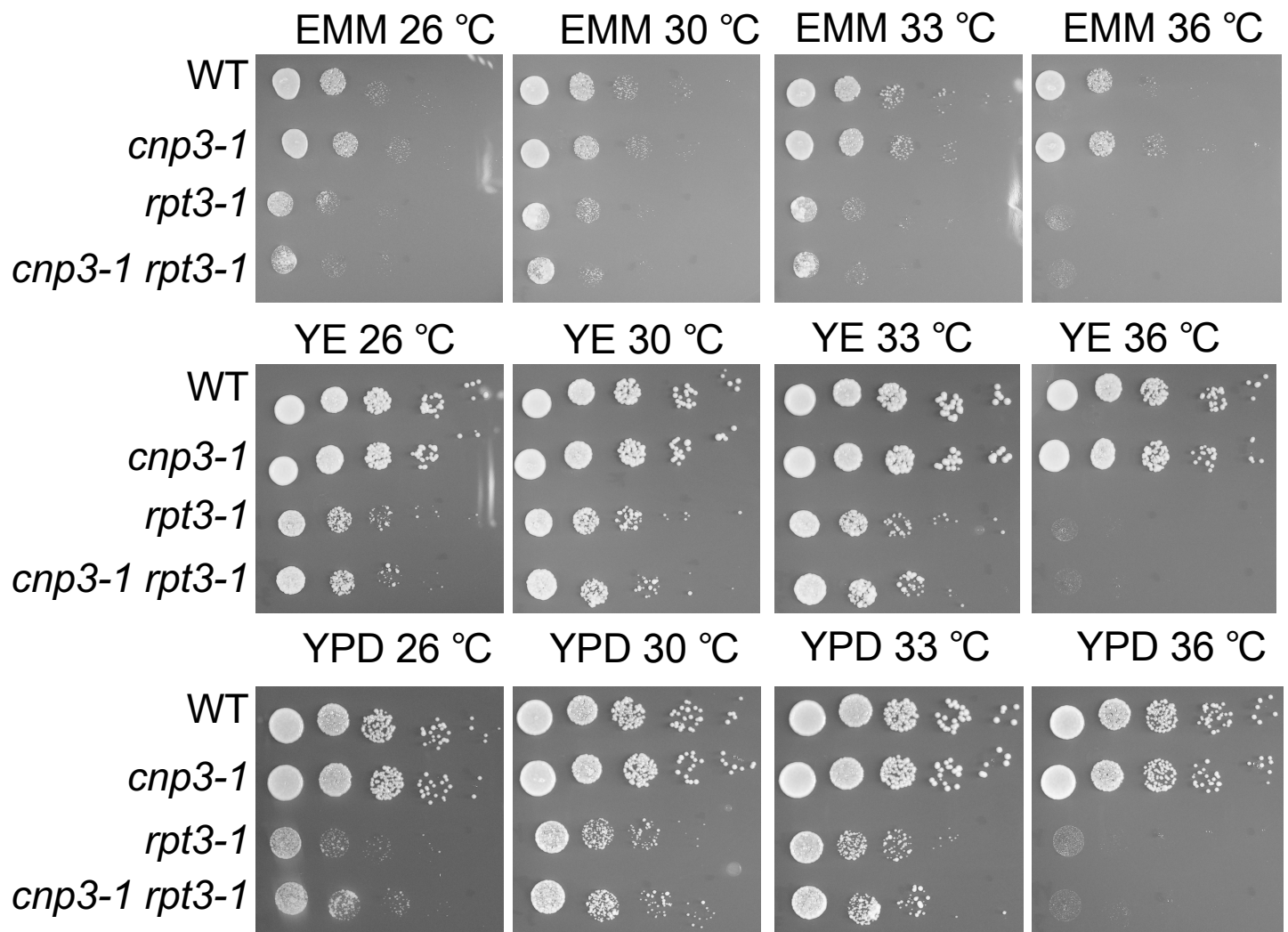
(図40) *cnp3-1 cut8-563*の二重変異株の表現型

許容温度である26 °Cでの*cnp3-1 cut8-563*の二重変異株の顕微鏡観察。許容温度である26 °Cでも、*cnp3-1 cut8-563*の二重変異株は野生型と同様に、核内にGFP-Cnp1が1点のみ観察された。KEYENCE使用。scale bar 5μm。



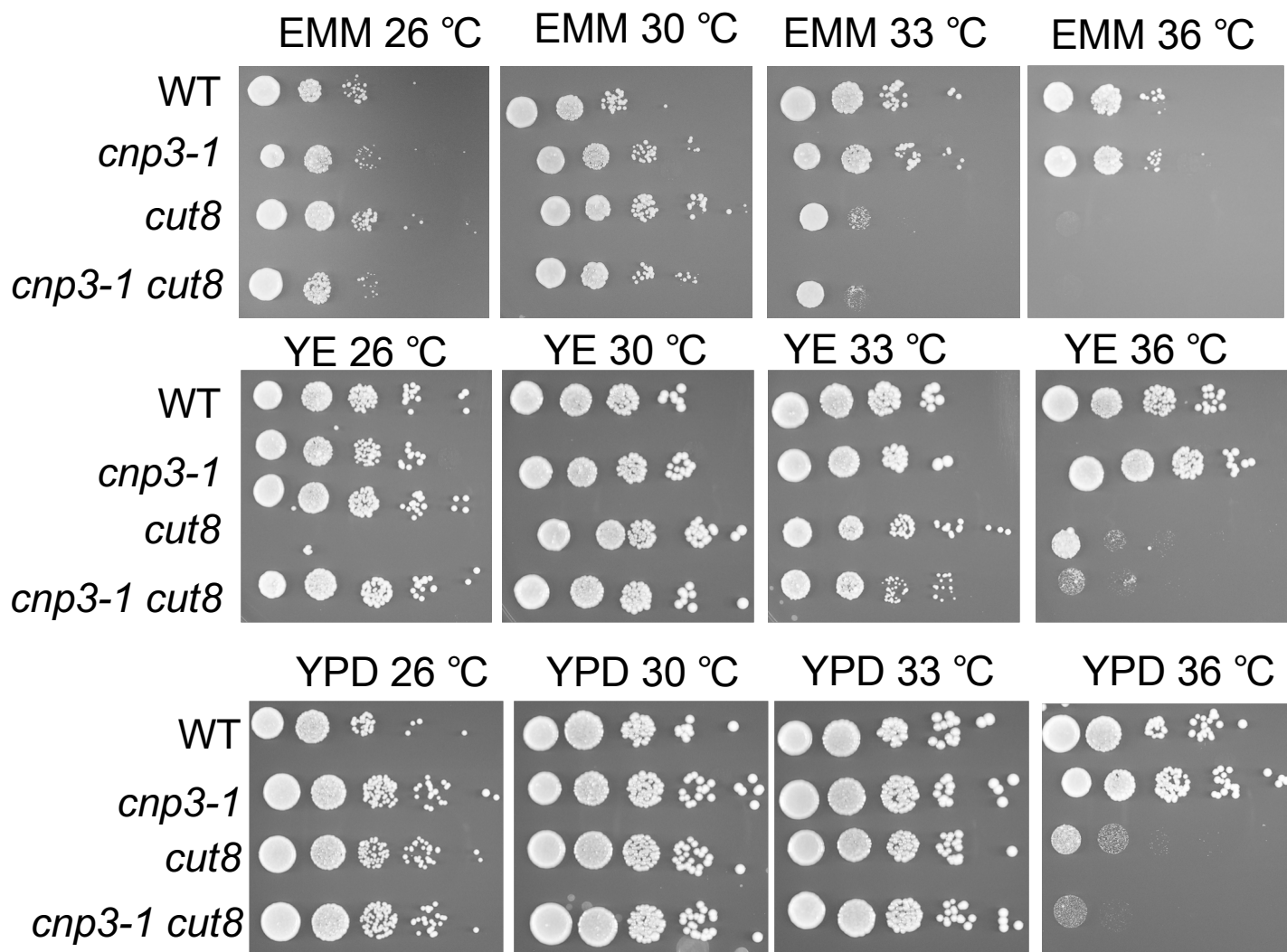
(図41) *cnp3-1 cut8-5630*の二重変異株の表現型

制限温度である36 °Cでの*cnp3-1 cut8-563*の二重変異株の顕微鏡観察。
 制限温度である36 °Cでも、*cnp3-1 cut8-563*の二重変異株は野生型
 と同様に、核内にGFP-Cnp1が1点のみ観察された。KEYENCE使用。
 scale bar 5μm。



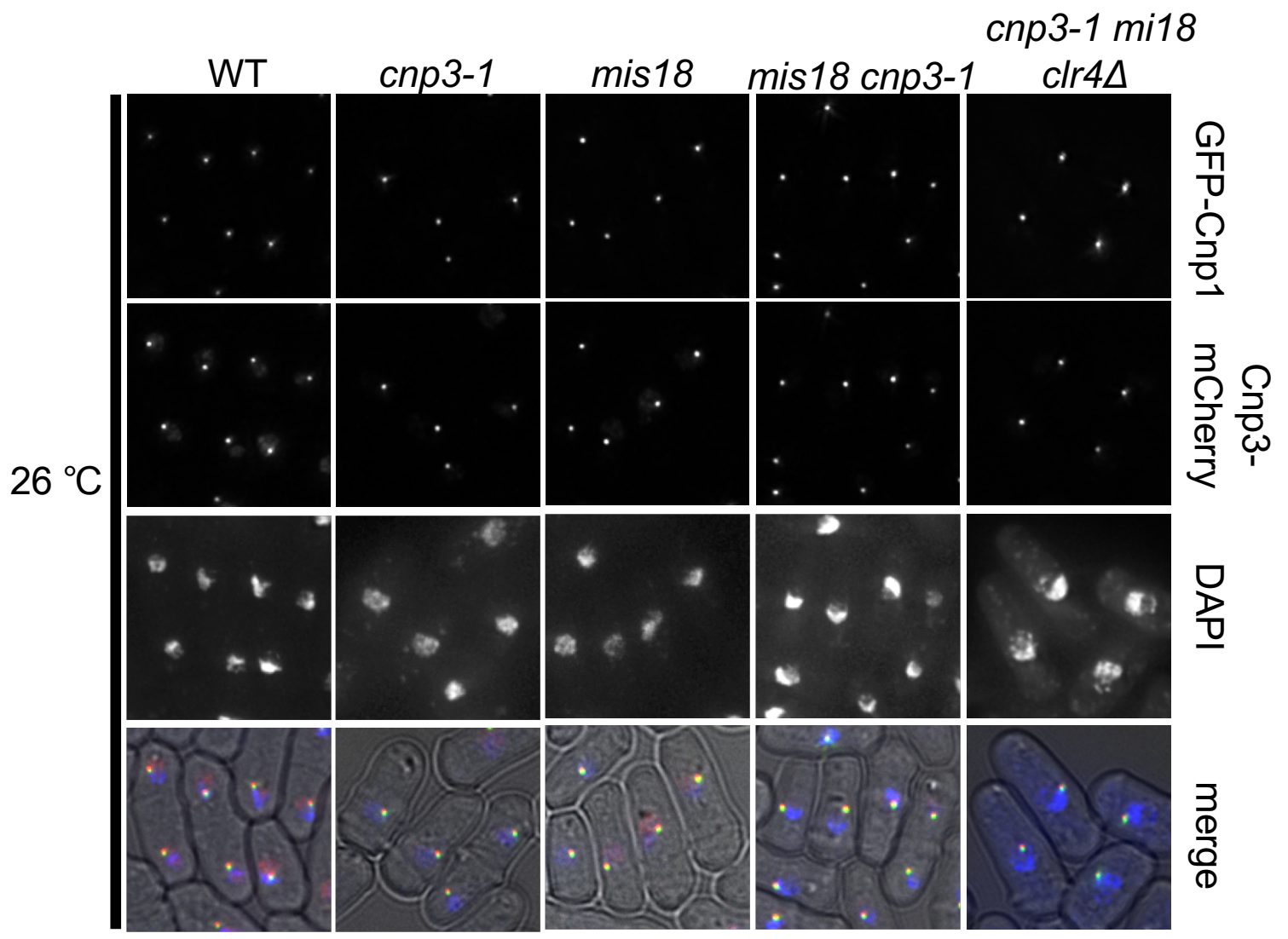
(図42) *cnp3-1 rpt3-1* の二重変異株の表現型

EMM、YE、YPD培地を用いて野生型、*cnp3-1*、*rpt3-1*、*cnp3-1rpt3-1* のスポットテストを行い、26 °C、30 °C、32 °C、36 °Cで培養した。



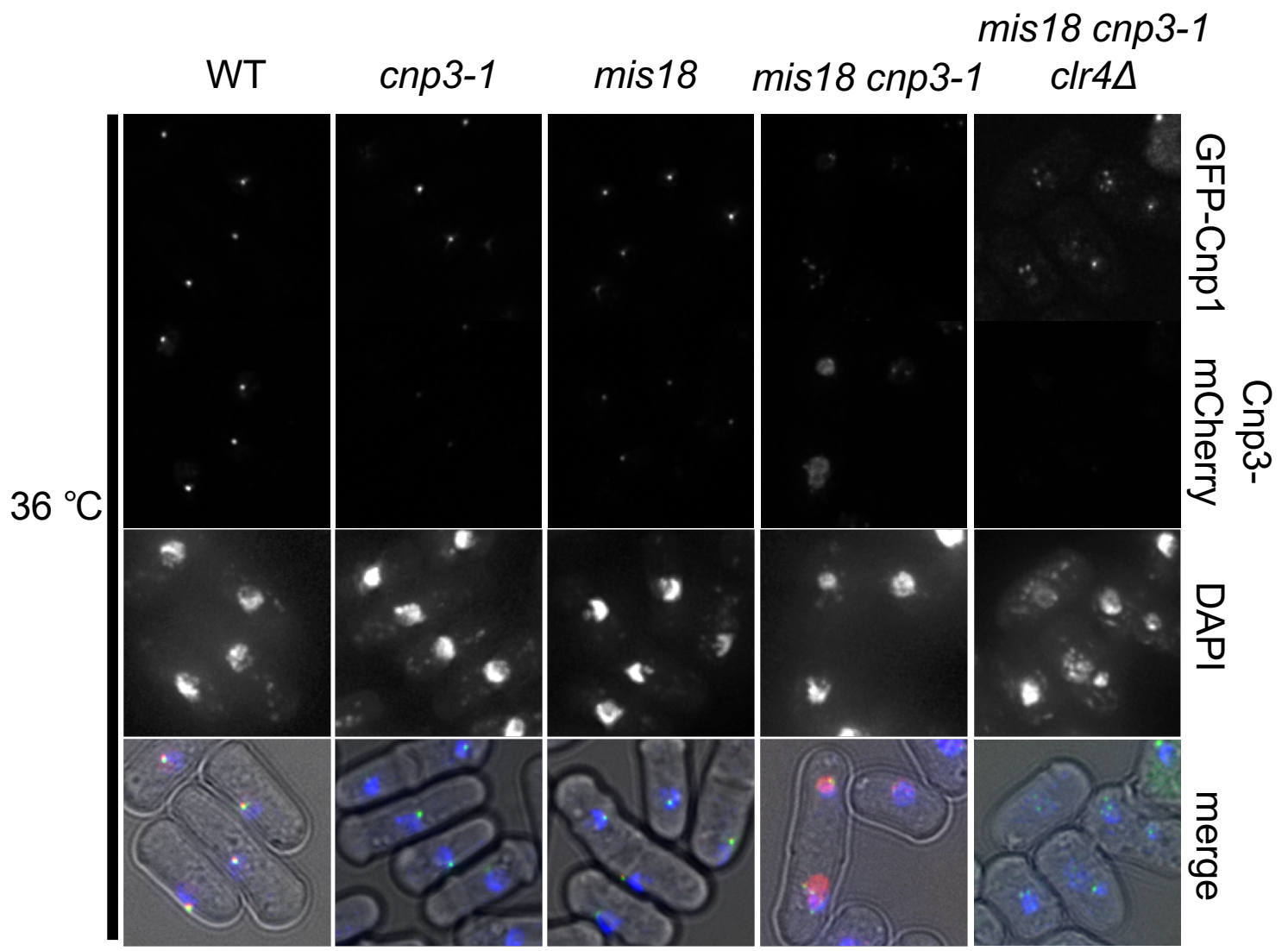
(図43) *cnp3-1 cut8-563* の二重変異株の表現型

EMM、YE、YPD培地を用いて野生型、*cnp3-1*、*cut8-563*、*cnp3-1cut8-563* のスポットテストを行い、26 °C、30 °C、32 °C、36 °Cで培養した。*cut8*、*cnp3-1cut8* では33 °Cと36 °Cで野生型に比べて発育が阻害された。



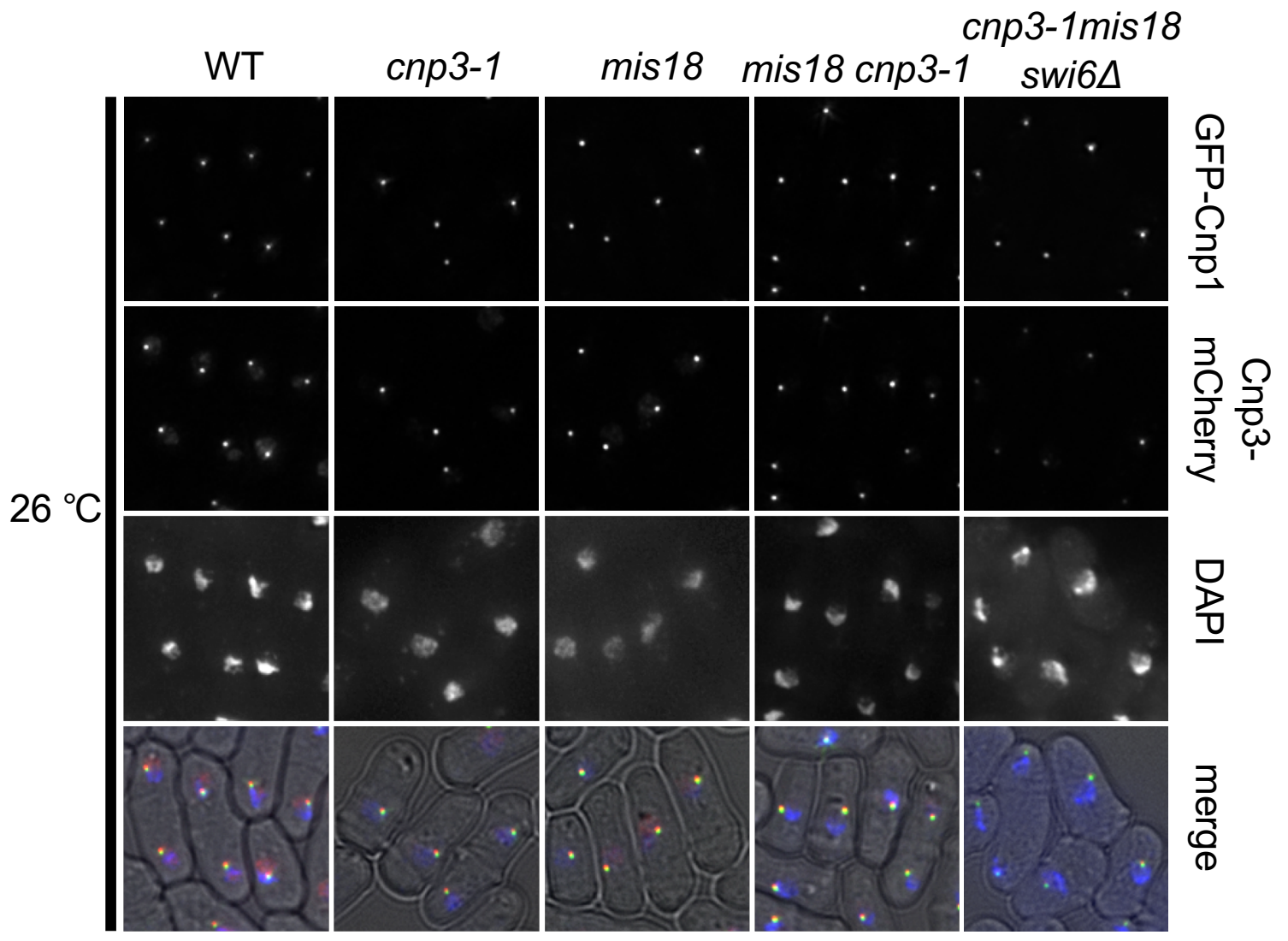
(図44) *cnp3-1 mi18 clr4Δ* 三重変異株の表現型

ヘテロクロマチン化に関与する*clr4*破壊株を用いて*cnp3-1 mis18-818 clr4Δ*の三重変異株を許容温度である26 °Cで培養し、顕微鏡観察を行った。三重変異株は許容温度の26 °Cでは野生型と同様に、GFP-Cnp1が核内に1点のみ観察された。
Δvision使用。scale bar 5μm。



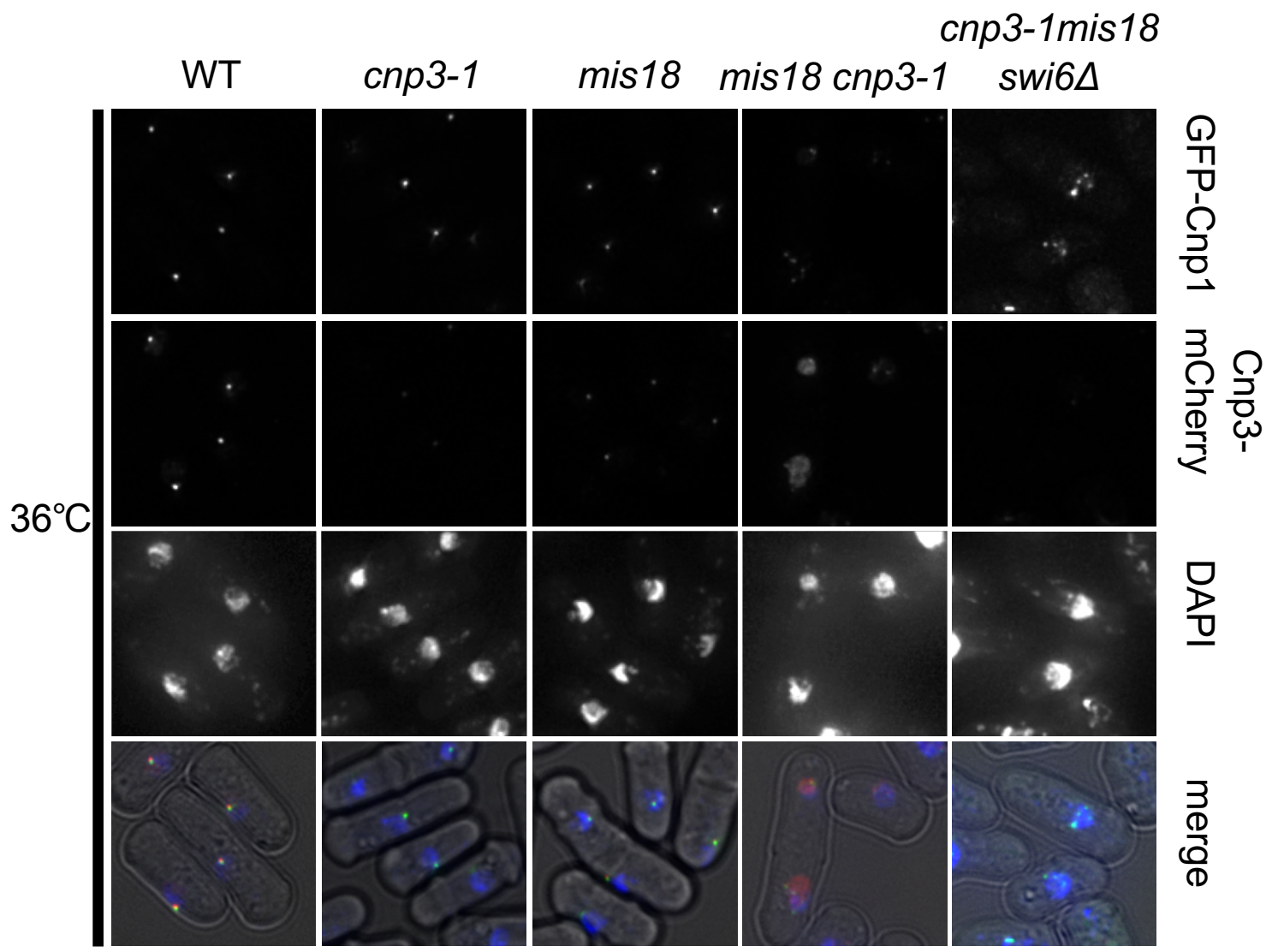
(図45) *cnp3-1 mi18 clr4Δ* 三重変異株の表現型

ヘテロクロマチン化に関与する遺伝子*clr4*の破壊株を用いて*cnp3-1 mis18-818 clr4Δ*の三重変異株を制限温度である36 °Cで培養し、顕微鏡観察を行った。三重変異株は制限温度の36 °CでGFP-Cnp1が核内に複数点観察された。Δvision使用。scale bar 5μm。



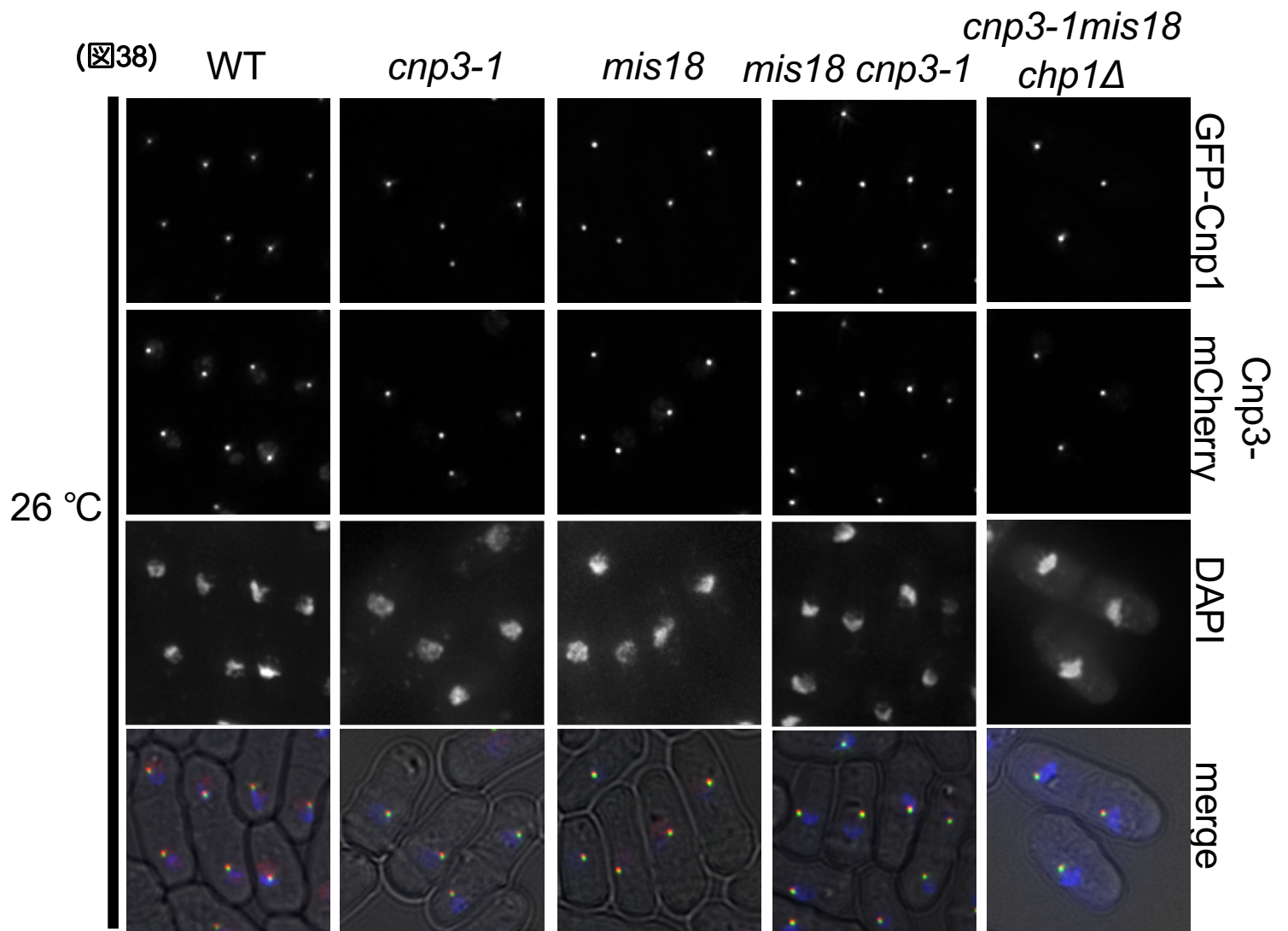
(図46) *cnp3-1 mi18 swi6Δ* 三重変異株の表現型

ヘテロクロマチン化に関与する遺伝子の*swi6*破壊株を用いて*cnp3-1 mis18-818 swi6Δ*の三重変異株を許容温度である26 °Cで培養し、顕微鏡観察を行った。三重変異株は許容温度の26 °CでGFP-Cnp1が核内に1点のみ観察された。Δvision使用。scale bar 5μm。



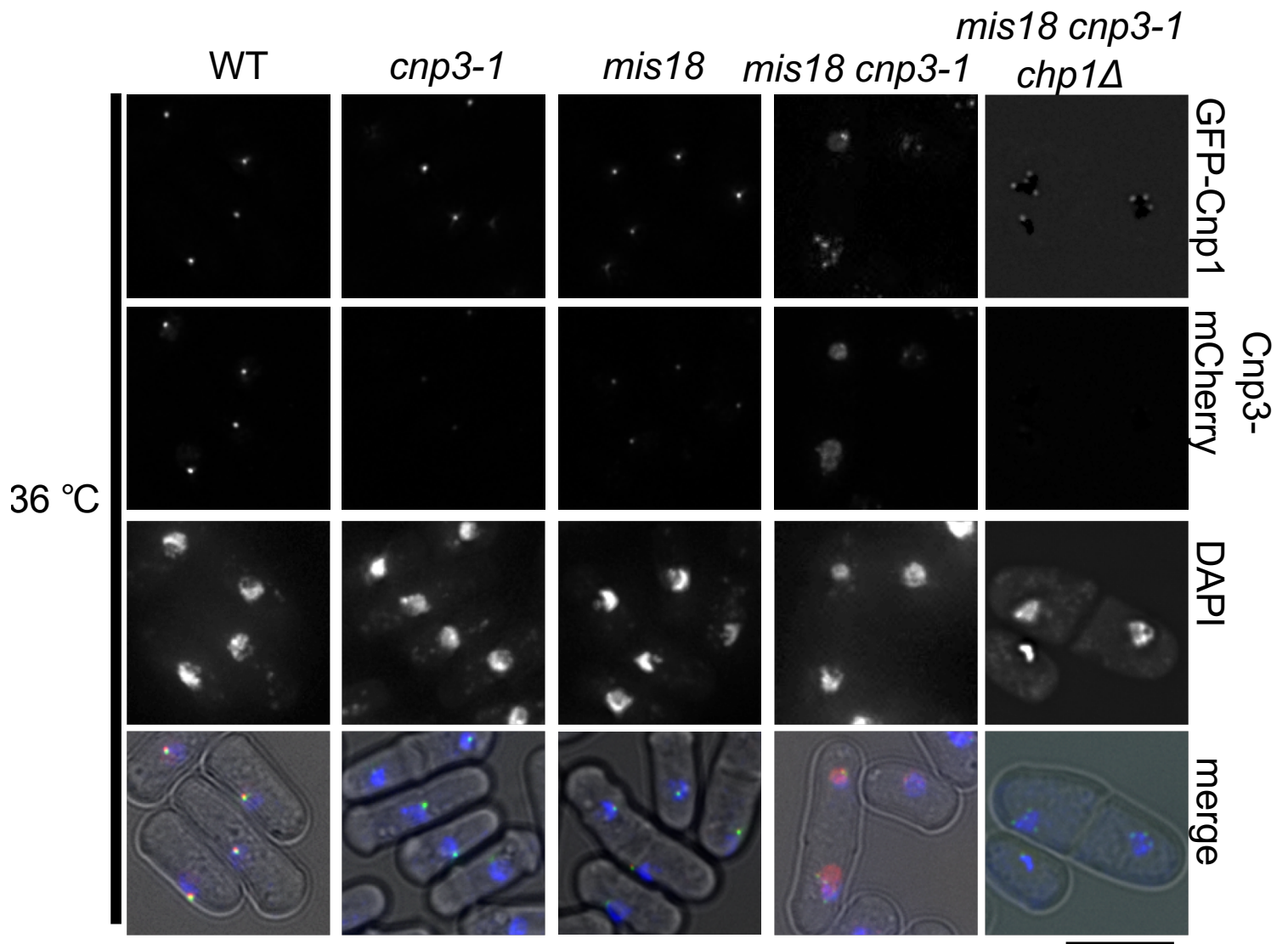
(図47) *cnp3-1 mi18 swi6Δ* 三重変異株の表現型

ヘテロクロマチン化に関与する遺伝子*swi6*の破壊株を用いて*cnp3-1 mis18-818 swi6Δ*の三重変異株を制限温度である36 °Cで培養し、顕微鏡観察を行った。三重変異株は制限温度の36 °CでGFP-Cnp1が核内に複数点観察された。Δvision使用。scale bar 5μm。



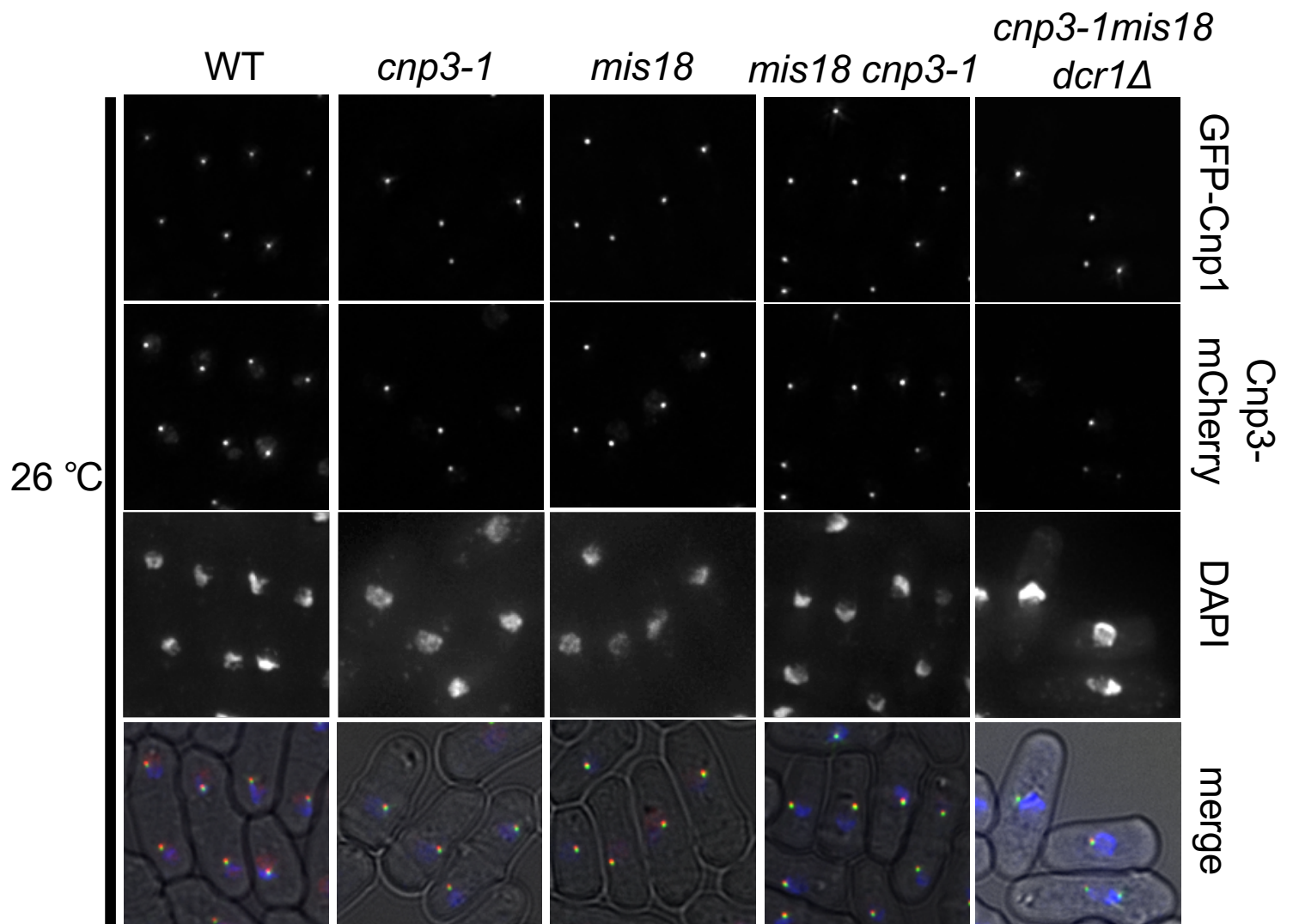
(図48) *cnp3-1 mi18 chp1Δ* 三重変異株の表現型

ヘテロクロマチン化に関与する遺伝子 *chp1* の破壊株を用いて *cnp3-1 mis18-818 chp1Δ* の三重変異株を許容温度である 26 °C で培養し、顕微鏡観察を行った。三重変異株は許容温度の 26 °C で GFP-Cnp1 が核内に複数点観察された。Δvision 使用。scale bar 5μm。



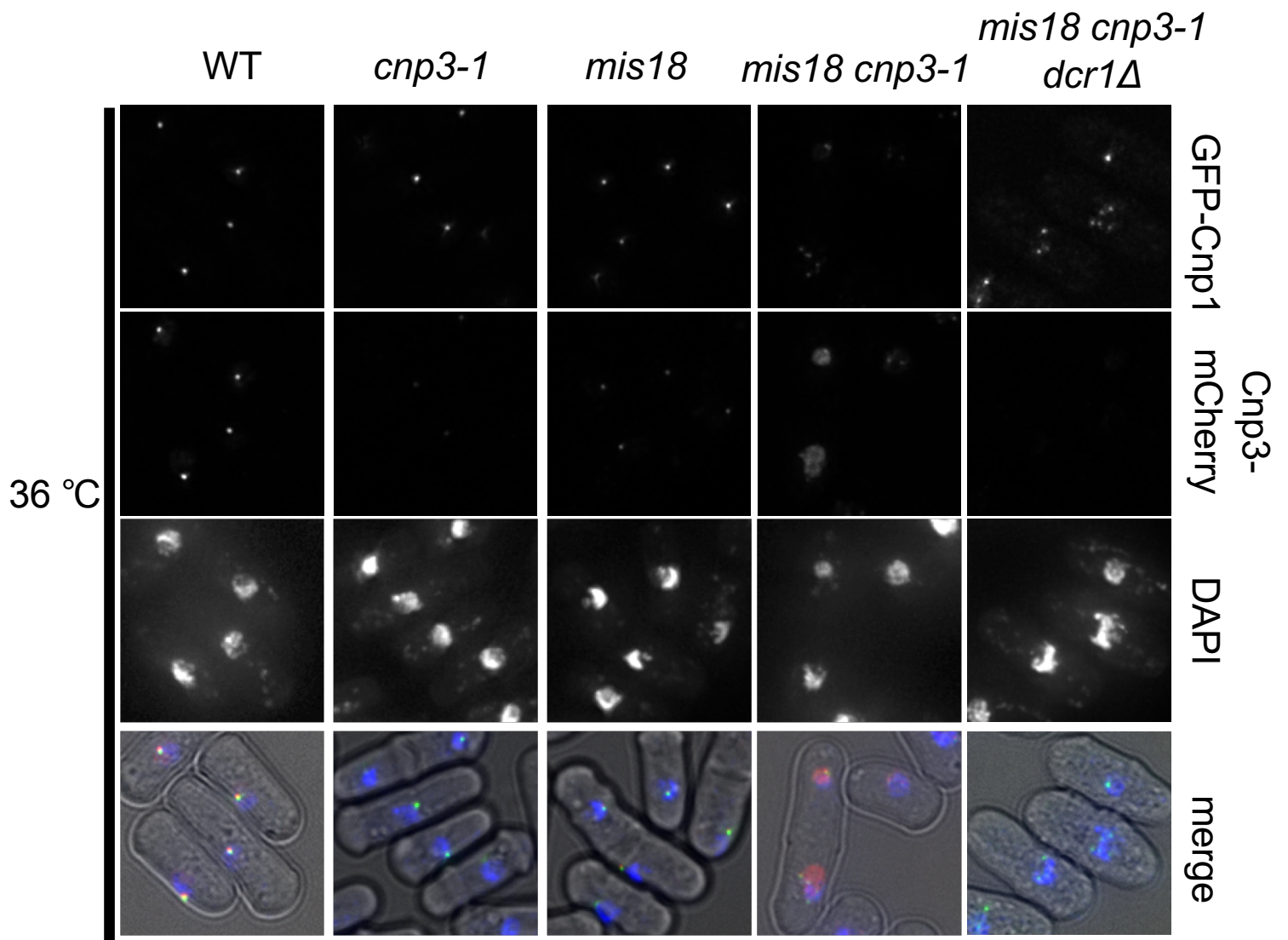
(図49) *cnp3-1 mis18 chp1Δ* 三重変異株の表現型

ヘテロクロマチン化に関与する遺伝子*chp1*の破壊株を用いて*cnp3-1 mis18-818 chp1Δ*の三重変異株を制限温度である36 °Cで培養し、顕微鏡観察を行った。三重変異株は制限温度の36 °CでGFP-Cnp1が核内に複数点観察された。Δvision使用。scale bar 5μm。



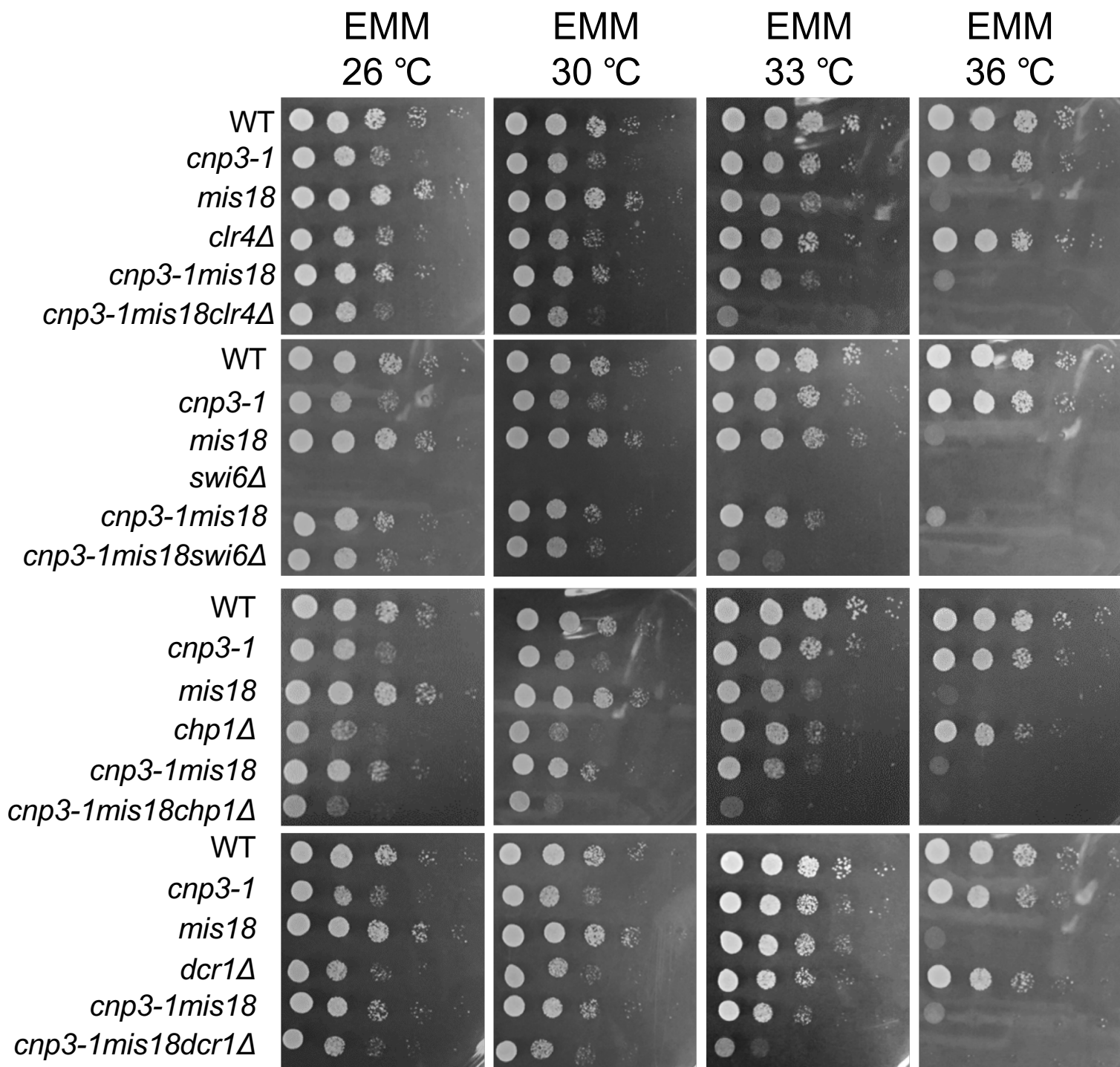
(図50) *cnp3-1 mi18 chp1Δ* 三重変異株の表現型

ヘテロクロマチン化に関与する遺伝子*chp1*の破壊株を用いて*cnp3-1 mis18-818 dcr1Δ*の三重変異株を許容温度である26°Cで培養し、顕微鏡観察を行った。三重変異株は許容温度の26 °CでGFP-Cnp1が核内に1点のみ観察された。Δvision使用。scale bar 5μm。

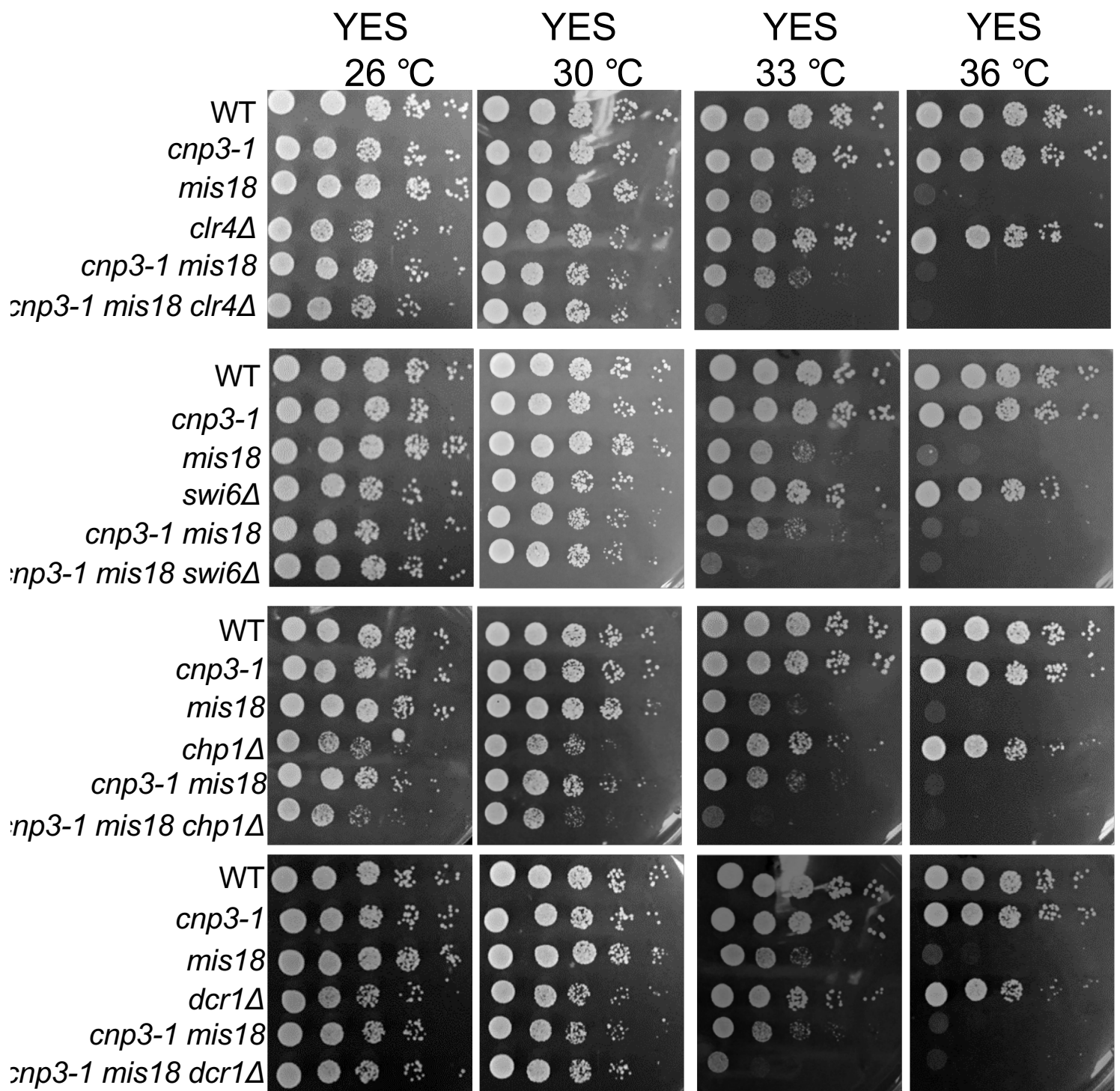


(図51) *cnp3-1 mi18 chp1Δ* 三重変異株の表現型

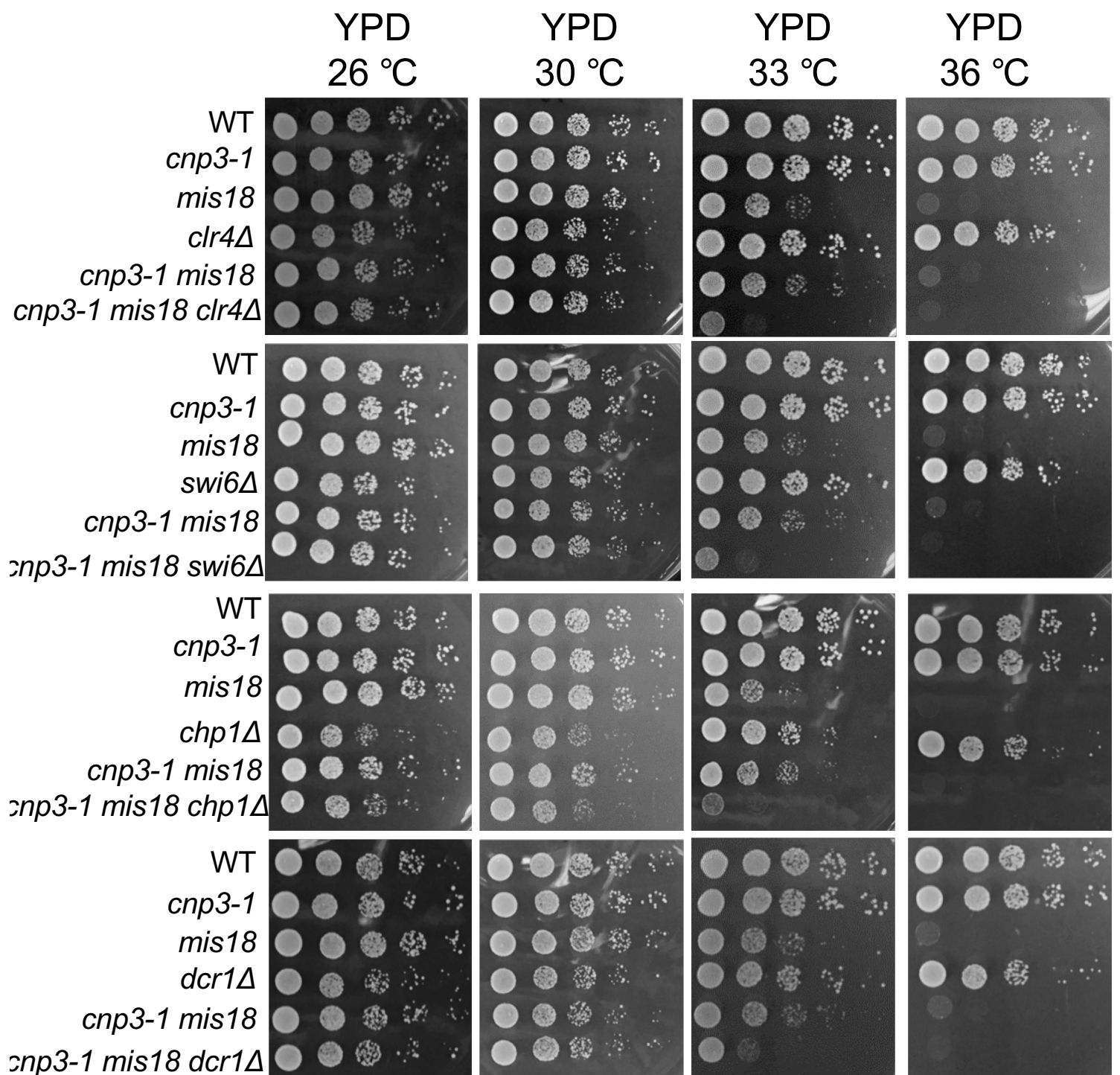
ヘテロクロマチン化に関与する遺伝子*chp1*の破壊株を用いて*cnp3-1 mis18-818 dcr1Δ*の三重変異株を制限温度である36 °Cで培養し、顕微鏡観察を行った。三重変異株は制限温度の36 °CでGFP-Cnp1が核内に複数点観察された。Δvision使用。scale bar 5μm。



(図52) *cnp3-1*とヘテロクロマチンに関与する因子の破壊株のスポットテスト
 EMM培地を用いて26 °C、30 °C、33 °C、36 °Cで感受性を調べた。
 全ての三重変異株において、どの温度でも発育阻害が起きた。

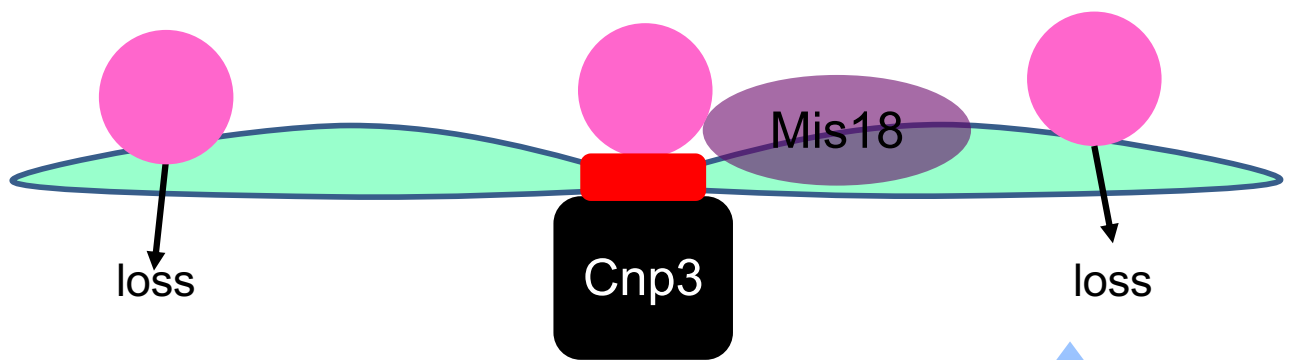


(図53) *cnp3-1*とヘテロクロマチンに關与する因子の破壊株のスポットテスト
YESを用いて、26 °C、30 °C、33 °C、36 °Cで感受性を調べた。33 °Cと36 °Cで、
全ての三重変異株で發育阻害が起きた。

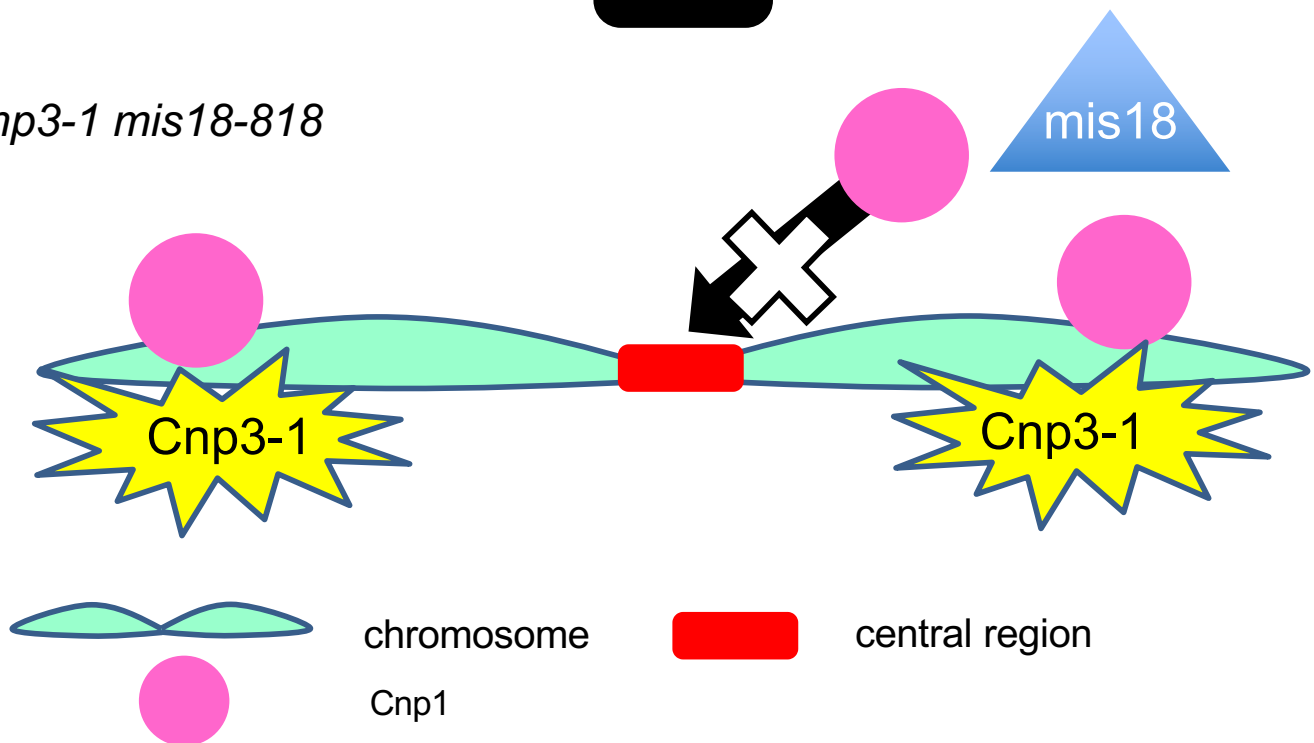


(図54) *cnp3-1*とヘテロクロマチンに關与する因子の破壊株のスポットテスト
 YPDを用いて26 °C、30 °C、33 °C、36 °Cで感受性を調べた。33 °Cと36 °Cで、全
 ての三重変異株で發育阻害が起きた。

WT



cnp3-1 mis18-818



(図55) Cnp3の役割を示すモデル図

WTはCnp3がセントロメア領域でDNAと結合し、Cnp1が染色体からロスさせないよう機能する。Cnp1はMis18などのリクルート因子により、セントロメアに局在しやすいが、稀にセントロメア以外の領域に局在しても、Cnp3がいなければ染色体からロスしてしまう。

cnp3-1 mis18-818 二重変異株では、Cnp3-1がセントロメア領域のDNAと結合出来ず、他の領域に局在してしまう。またCnp1はセントロメアにリクルートされないため、Cnp1はCnp3-1が局在する領域で安定に局在してしまう。