

論文の内容の要旨

論文題目

保存されたタンパク質シュゴシンは姉妹セントロメア間の接着を保護する

The conserved protein shugoshin protects centromeric cohesion of sister chromatids

氏名 北島 智也

細胞分裂は、遺伝情報の運び手である染色体が複製され、それらが娘細胞に均等に分配されることによって、遺伝的に同一の娘細胞を生み出す過程である。染色体の分配を失敗すると、そのような細胞は遺伝子発現の制御を失い、死に至るか癌化する可能性が高い。また、生殖細胞における染色体分配の失敗は、ダウン症などの先天性の疾患の原因となる。このため、染色体が分配される分子機構を解明することは、細胞がいかに遺伝情報を受け継ぐかという生命現象の基本的な問題に答えるのみならず、医学的な観点からも重要な理解を与えるものと考えられる。

細胞が増殖するときに用いる体細胞分裂の過程では、DNA 合成期に複製されてできた姉妹染色分体のペアの間に、コヒーシン複合体によって接着が確立する。この接着は、分裂期の後期にセパレーズと呼ばれるペプチダーゼが活性化され、コヒーシン複合体のサブユニット Rad21 を切断することによって解除される。これにより姉妹染色分体が分離し、紡錘体微小管により 2 つの娘細胞へ均等に分配される。

一方、生殖細胞における減数分裂の過程では、1 回の DNA 合成のあと 2 回の連続した染色体分配が行われることによって染色体数が半分の配偶子が形成される。減数分裂前 DNA 合成期には、やはりコヒーシン複合体によって姉妹染色分体間に接着が確立されるが、これに加え、組み替えによって形成されたキアズマにより相同染色体間にもつながりが生まれる。また、コヒーシン複合体のサブユニットとして、Rad21 に代わり減数分裂特異的な相同因子である Rec8 が用いられる。減数第一分裂には、染色体腕部のコヒーシン複合体が解離することによりキアズマを支えていた染色体腕部の接着が失われ、相同染色体が分離する。ところが、セントロメアにおいてはコヒーシン複合体が残存して、姉妹染色分体間の接着を維持する。この姉妹セントロメア間の接着は、続いて起こる第二分裂において解除され、これが引き金となり姉妹染色分体が分離する。

これらの染色体分配の様式は真核生物において広く保存されており、分裂酵母は研究に有用なモデル生物の 1 つである。分裂酵母においては、減数分裂における染色体分離を引き起こすメカニズムは分かっていなかった。セパレーズが減数分裂においても染色体分離に必要である可能性を調べるため、セパレーズの温度感受性株を用いて減数分裂の染色体分配を観察したところ、セパレーズを不活性化すると染色体分離が強く阻害されることが分かった。また、野生株では Rec8 が減数分裂の進行に伴って分解されるのに対し、セパレ

ースを不活性化した株では Rec8 が減数分裂終了時まで残存していた。そこで、Rec8 上にセパレーズが認識して切断する配列を探索したところ、Rec8 には 2 箇所の切断を受ける配列があることを見出した。さらに、それらの両方の配列に変異を導入した非切断型 Rec8 を発現させた減数分裂では、染色体分離がほとんど起きなかった。これらのことから、減数分裂においてはセパレーズがコヒーシンサブユニット Rec8 を切断することが引き金となり相同染色体の分離が引き起こされることが明らかになった。

減数第一分裂においては、Rec8 が染色体腕部で分解されることにより相同染色体が分離する一方で、姉妹染色分体がつなぎとめられているセントロメアでは Rec8 が残存する。このことは、Rec8 はセントロメアではセパレーズから保護されていることを示唆する。そこで、減数第一分裂のセントロメア特異的に未知なる Rec8 のプロテクターが存在することを仮定し、これを同定するため、以下のような遺伝学的スクリーニングを考案した。

体細胞分裂において、Rec8 を強制発現させることによりコヒーシン複合体中の Rad21 サブユニットを Rec8 に置き換えても、分裂期には Rec8 はセントロメアで分解され、姉妹染色分体は正常に分離して分配される。したがって、生まれる娘細胞は生育可能である。しかし、ここにもし Rec8 プロテクターをさらに発現すると、分裂期において Rec8 がセパレーズの切断から保護されてしまい、その結果姉妹染色分体の不分離を引き起こし、生まれる娘細胞は致死となると考えた。そこで、Rec8 強制発現株に減数分裂時の細胞から調整した cDNA ライブラリーを導入し、Rec8 と共発現させたときにのみ細胞が死に至るような遺伝子を探した。その結果、新規遺伝子 *sgo1*⁺ (シュゴシン) を候補として同定し、命名した。

Sgo1 は減数分裂特異的に発現し、減数第一分裂の前期から中期にかけてセントロメアに局在し、後期の間に分解されるタンパク質であった。*Sgo1* が減数第一分裂におけるセントロメア Rec8 の保護に必要であるかを検討するため、*sgo1* 遺伝子破壊株 (*sgo1Δ*) を作成して減数分裂期の Rec8 の挙動を観察した。すると、野生型では第一分裂後期においてセントロメアの Rec8 が残存したのに対し、*sgo1Δ* 株ではセントロメアの Rec8 が保護されずに消失していた。これに伴い、*sgo1Δ* 株では、第二分裂まで維持されるべき姉妹セントロメア間の接着が第一分裂後に失われてしまうことが分かった。続いて起こる第二分裂では、姉妹染色分体ペアの間の接着がすでに失われているために、分裂装置が正しい姉妹染色分体のペアを認識できず、その結果、ランダムな染色体分配が引き起こされていた。以上の結果から、*Sgo1* は減数第一分裂のセントロメアにおいて Rec8 をセパレーズによる分解から保護する因子であることが明らかになった。

Sgo1 と相同性を持つ因子を探したところ、*Sgo1* 様のタンパク質がさまざまな真核生物で広く見出され、シュゴシンタンパク質ファミリーとして定義できることが分かった。哺乳動物であるヒトおよびマウスにおいては、2 つのシュゴシン様タンパク質 *Sgo1*、*Sgo2* が見出された。分裂酵母におけるシュゴシンの機能が哺乳動物でも保存されているかどうかを検討するため、これらのタンパク質の機能を解析した。

まず、ヒト HeLa 細胞において *Sgo1* および *Sgo2* の発現を調べると、意外にもいずれの

タンパク質も体細胞分裂においても発現していた。またその局在を調べると、いずれも分裂期の前期から中期までセントロメアに局在し、後期の間に消失していた。

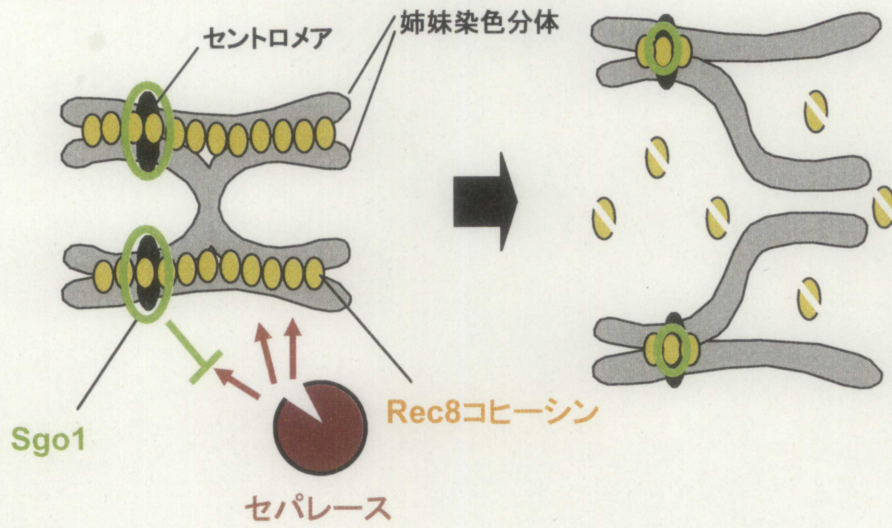
哺乳動物における体細胞分裂の分裂期においては、姉妹染色分体間の接着は段階的に解除されることが知られている。DNA 合成期に染色体全長に渡って確立した姉妹染色分体間の接着は、まず分裂期の前期と前中期においてコヒーシン複合体が染色体の腕部から解離することで解除される。一方、セントロメアでは分裂中期までコヒーシン複合体の局在が維持される。後期になると、セパレーズが活性化し、セントロメアに残ったコヒーシン複合体の Rad21 サブユニットを切断することで姉妹染色分体間の接着が完全になくなり、染色体分離が引き起こされる。このことから、セントロメアのコヒーシン複合体は分裂前期と前中期の間、解離しないように保護されている可能性が考えられる。

Sgo1 と Sgo2 がこの保護機能に必要である可能性を検討するため、それぞれを HeLa 細胞において RNAi によりノックダウンした。すると、いずれの場合においても、前中期においてセントロメアのコヒーシン複合体が保護されずに失われ、姉妹染色分体が早期に分離してしまった。その結果、紡錘体チェックポイントが活性化され、細胞はこの時期に停止していた。これらのことから、ヒトの Sgo1 および Sgo2 は分裂前中期におけるセントロメアのコヒーシン複合体の保護に必要であることが分かった。

続いて、シュゴシンの作用機構を理解するために、Sgo1 に相互作用する因子を探索した。共同研究により、Sgo1 を免疫沈降するとプロテインフォスファターゼ 2A (PP2A) が特異的に共沈することが分かった。そこで、PP2A の免疫染色を行ったところ、PP2A は分裂前期から中期にかけて Sgo1 と共にセントロメアに局在することが分かった。PP2A が分裂前中期における接着の保護に必要であるかを探るため、PP2A-A を RNAi によりノックダウンした。すると、やはり分裂前中期において姉妹染色分体が早期に分離してしまうことが分かった。さらに、Sgo1、Sgo2、PP2A の相互関係を明らかにすることを目的として、それぞれの局在依存性を調べたところ、Sgo2 は PP2A の局在に、PP2A は Sgo1 の局在に必要であることが分かった。これらのことから、哺乳動物の分裂前中期においては、PP2A が Sgo2 依存的にセントロメアに局在し、次に Sgo1 をリクルートして複合体を形成し、姉妹セントロメア間の接着を保護することが分かった。染色体腕部からのコヒーシンの解離は Polo キナーゼによるコヒーシンサブユニットのリン酸化に依存していることから、Sgo1 は、PP2A のフォスファターゼ活性を利用して Polo キナーゼと拮抗的に働くことで、セントロメアのコヒーシン複合体を保護しているのかもしれない。

以上の解析から、シュゴシンは高度に保存された機能を持ち、酵母では減数分裂で、ヒトでは少なくとも体細胞分裂において姉妹セントロメア間の接着を保護していることが示された。今後は、哺乳動物の減数分裂においても同様の機能を持つか、また、Sgo1 が PP2A と協同してどのようなメカニズムでコヒーシン複合体を保護するのかを調べるのが課題となるだろう。

分裂酵母 減数第一分裂



哺乳動物 体細胞分裂

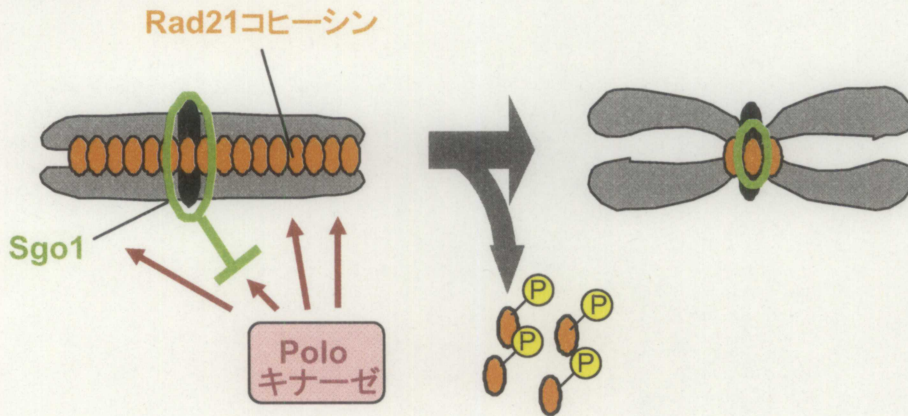


図1: 分裂酵母の減数第一分裂および哺乳動物の体細胞分裂において Sgo1は姉妹セントロメア間の接着を保護する

減数第一分裂では、セパレーズが染色体腕部のRec8を切断されることによって相同染色体が分離するが、セントロメアのRec8はSgo1によって保護されているため、姉妹セントロメア間の接着が維持されて姉妹染色分体は分離しない。哺乳動物の体細胞分裂の分裂前中期においては、染色体腕部のコヒーシンがPoloキナーゼによってリン酸化されることで解離するが、セントロメアのコヒーシンはSgo1によって保護されているため解離せず、姉妹セントロメア間の接着が維持される。