

論文内容の要旨

シュゴシン-PP2A 複合体は

I 型カゼインキナーゼ依存的なセパレーズによる Rec8 の切断に拮抗する

(Shugoshin-PP2A counteracts casein-kinase-1-dependent Rec8 cleavage by separase.)

石黒 伸茂

<序>

真核生物が分裂の過程で遺伝情報を安定に保持していくためには、遺伝情報の本体である染色体を正確に分配する必要がある。染色体分配を正常に進めるにあたって必須なプロセスの一つが、複製と連動して生じる姉妹染色分体ペアの物理的な「接着」である。姉妹染色分体ペアに接着が存在すると、分配するべきペアを識別できるだけでなく、動原体が両極から伸びてきたスピンドル微小管によってそれぞれ捉えられた場合、スピンドル微小管による牽引力に拮抗する形で姉妹動原体間に張力が発生する。細胞はこの張力が発生した場合にのみ正しい分配の準備ができたと認識するチェックポイント機構を有することで、正確な染色体分配を保証している。

姉妹染色分体間の接着を担う因子はコヒーシン複合体と呼ばれ、Smc1、Smc3、Scc3/SA さらに α -kleisin の 4 つのサブユニットからなるリング状の構造を取っている。コヒーシン複合体はそのリング内に姉妹染色分体ペアを抱え込む形で接着を確立し、その接着は分裂中期まで維持されると考えられている。分裂中期に染色体の整列が完了すると、チェックポイントが解除され、その結果活性化されるセパレーズ(separase)と呼ばれるプロテアーゼによって α -kleisin サブユニットが切断される。これによって、コヒーシンによる染色体の接着が解除され、分裂後期が開始される。 α -kleisin には体細胞分裂期型(Rad21)と減数分裂期型(Rec8)のものが存在するが、両者の間には separase による切断制御に違いが見られ

る。体細胞分裂期で主に発現する Rad21 は、分裂後期への進行に伴い染色体全体に渡り一過的に切断される一方、減数分裂期でのみ発現する Rec8 は減数第一分裂後期において染色体腕部では切断を受けるが、セントロメア周辺の Rec8 の切断は減数第二分裂まで保護される。このようなコヒーシンの段階的な分解により、減数第一分裂で相同染色体の分離が起き、続く減数第二分裂で姉妹染色分体の分離が起きることを保証している。この減数第一分裂におけるセントロメア Rec8 の切断保護を担うのがシュゴシン(Sgo1)-プロテインフォスファターゼ(PP2A)複合体である。Sgo1 は進化的に保存された因子で分裂酵母では減数第一分裂期特異的に発現しセントロメア周辺に局在化する。また Rec8 の保護には、Sgo1 との相互作用を介してセントロメア周辺に濃縮された PP2A の脱リン酸化酵素活性が必要であることが知られている。このことから、Rec8 の切断の促進には何らかのキナーゼを介したリン酸化反応の寄与が示唆されるが、これまでにそのキナーゼが何であるか、あるいは Rec8 の切断を促進するリン酸化が何を標的とするかについては明らかになっていなかった。そこで私は、減数分裂期に Sgo1-PP2A に拮抗して Rec8 の切断を促進するキナーゼとその標的因子を同定することで、減数分裂期に特徴的なコヒーシン複合体の段階的な分解制御を担う分子機構を明らかにすることを目的とし本研究を行った。

<結果>

上記のキナーゼの取得のために、遺伝学的スクリーニングを行った。通常、発現がみられない Rec8 を体細胞分裂期に強制的に発現させると Rad21 を発現している野生型と同様に Rec8 は一過的な切断制御を受ける。しかし同時に Sgo1 を発現させると Sgo1-PP2A によってセントロメア周辺の Rec8 が切断から保護されるために細胞は染色体不分離に伴う生育阻害を示す。よって、体細胞分裂期においても Sgo1-PP2A に拮抗する何らかのキナーゼに依存した Rec8 の切断制御機構の存在が示唆される。したがって、このキナーゼの活性が低下するような変異株では Rec8 の切断効率が低下する結果、染色体不分離に伴う生育阻害を示すと考えられる。そこで、Rec8 の発現誘導が可能な分裂酵母株に対するランダムな変異誘発により、Rec8 の発現に依存した生育阻害と染色体不分離が起こる変異体のスクリーニングを行った結果、I型カゼインキナーゼ(CK1)をコードする *hhp2*⁺の変異株が単離された。次に、減数分裂期においても Hhp2 が Rec8 の切断を促進する機能をもつか検討を行った。もう一つの CK1 パラログである Hhp1 と Hhp2、両者の活性を抑えた CK1 変異体を作製し解析した結果、減数分裂期においても Rec8 のリン酸化レベルおよび切断性の低下が見られたことから、実際に CK1 が減数分裂期において Rec8 コヒーシンの切断を促進する制御を担うキナーゼであることが示された。また *in vitro* において Rec8 は CK1 によるリン酸化の基質となることが明らかになったことから、次に Rec8 の減数分裂期における CK1

依存的なリン酸化残基を同定する目的で、野生型および *CK1* 変異株の減数第一分裂中期からそれぞれ調製した *Rec8* タンパク質を質量分析により解析した。その結果、*CK1* による *Rec8* のリン酸化残基としてセリン 412 番(S412)が同定された。またこの周辺には S412 を含めて 7 か所の *CK1* 標的コンセンサスが密集して存在したため、それら全てをアラニンに置換した *rec8-7A* 変異体を作製したところ、減数第一分裂期の染色体分配が完全に阻害された。また *in vitro* で *Rec8-7A* タンパク質が *CK1* によってリン酸化されないことに加え、減数分裂期で *Rec8-7A* タンパク質の切断効率が著しく低下していることも明らかになった。これらの結果から、*CK1* が *Rec8* を直接リン酸化することによって、その切断を促進的に制御していることが示唆された。

減数第一分裂期で *CK1* は、*Sgo1-PP2A* と同様にセントロメア周辺に局在することから、セントロメアでは *Sgo1-PP2A* の脱リン酸化活性と *CK1* のリン酸化活性が拮抗し、それらのバランスによって、*Rec8* の切断性が変化するのではないかと考えられた。そこで、通常 *CK1* のリン酸化活性を上回る *Sgo1-PP2A* の脱リン酸化活性により *Rec8* が切断から保護されていると推測されるセントロメアへ過剰量の *CK1* を局在化させたときに、*sgo1* 破壊株と同様の、セントロメアの *Rec8* が切断から保護されない表現型を示すかどうかを検証した。*Sgo1-PP2A* はセントロメア内のヘテロクロマチン領域に局在する。そこでヘテロクロマチン局在化能を有するペプチド配列であるクロモドメイン(CD)を *CK1* に融合した *CK1-CD* を発現したところ、キナーゼ活性依存的に減数第二分裂前期にセントロメア *Rec8* の消失が観察された。このとき *Sgo1-PP2A* の局在量には変化が見られなかったことから、*CK1-CD* は *Sgo1-PP2A* の脱リン酸化活性を上回り、セントロメアの *Rec8* をリン酸化型にすることで減数第一分裂後期の段階で *separase* による切断を誘起したものと考えられる。以上の結果から、次のようなモデルが想定される(図 1)。減数第一分裂期に入ると *Rec8* は染色体全体にわたり *CK1* によるリン酸化をうけ *separase* によって切断されやすい状態となる一方、セントロメアでは *Sgo1-PP2A* が集積していることから、*CK1* 依存的なリン酸化に拮抗する脱リン酸化がおこり *Rec8* は切断されにくい状態が維持される。その結果、減数第一分裂後期で *separase* が活性化すると染色体腕部の *Rec8* は切断されるがセントロメアの *Rec8* は切断から保護されると予想される。本研究を通じて、減数分裂期に特徴的である一回の複製に続く連続した二回の染色体分配の履行を支える分子基盤の一端が、*CK1* と *Sgo1-PP2A* による *Rec8* のリン酸化を介した切断制御によって担われていることを明らかにした。

<まとめと展望>

本研究において、分裂酵母 *Rec8* の S412 の周辺残基を巡る CK1 のリン酸化と Sgo1-PP2A の脱リン酸化のバランスが、段階的な *Rec8* の切断制御を可能にしていることが明らかになった。しかし、*rec8-7A* 変異体がほぼ切断されないのに対し *CK1* 変異株では効率は下がるものの *Rec8* の切断自体は有意に観察された。この原因として他のキナーゼが *Rec8* の切断に対して重複する機能を有している可能性が考えられる。最近、出芽酵母を用いた研究から CK1 と DDK(Dbf4 dependent kinase)が *Rec8* の切断を促進的に制御するという報告があり、分裂酵母でも DDK は CK1 と重複した機能を持つ候補因子の一つである。また、本研究で行った *Rec8* の切断を促進的に制御するキナーゼのスクリーニングは体細胞分裂期の細胞で行ったため、減数分裂期特異的に発現している遺伝子は単離されない。したがってそれらの中に *Rec8* の切断を促進するキナーゼが存在する可能性も考えられる。上記のことを踏まえて、将来的には DDK の寄与について調べるとともに、さらなるキナーゼの特定のために減数分裂期の cDNA 発現ライブラリーを用いて、*Rec8* 依存的な生育阻害を抑圧できるような遺伝子の探索も進めたい。また、CK1 依存的な *Rec8* の切断制御メカニズムが進化的に広く保存されている可能性についても検討したい。

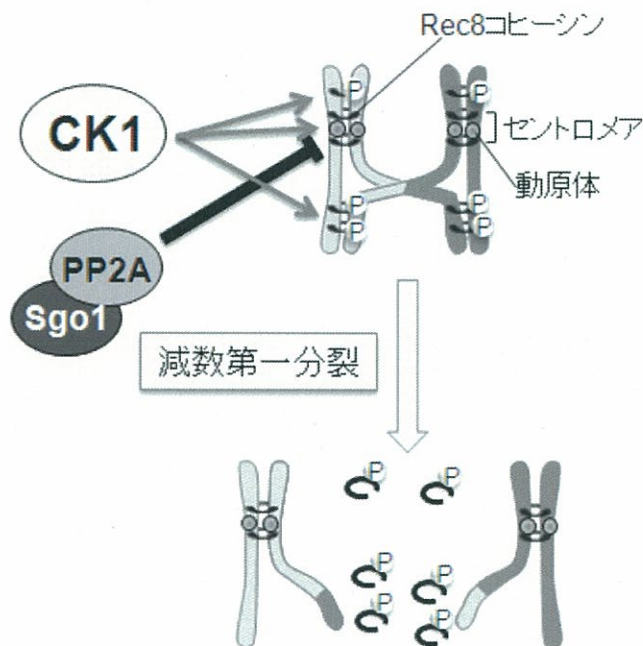


図 1. *Rec8* の切断制御における CK1 と Sgo1-PP2A の拮抗モデル