

## 論文内容の要旨

### 論文題目

コヒーシンのアセチル化が減数第一分裂における  
姉妹動原体の一方向性結合を制御する  
(Cohesin acetylation regulates monopolar attachment at meiosis I)

氏名 加々美綾乃

遺伝情報が母細胞から娘細胞へと正確に受け継がれるためには、遺伝情報の担い手である染色体 DNA が正確に分配されることが必須である。従って染色体分配のメカニズムはきわめて精巧に制御されている。

S 期に複製された染色体 DNA のペア（姉妹染色分体）は直ちに接着される。体細胞分裂では、分裂中期に両極から伸びたスピンドル微小管によって姉妹染色分体それぞれの動原体が捉えられ（二方向性結合）、分裂後期に姉妹染色分体間の接着が解除されることで姉妹染色分体は二つの娘細胞へと均等に分配される（均等分配）。このときスピンドル微小管が姉妹動原体を引く力に姉妹染色分体間の接着力が拮抗することが正確な染色体分配に重要である。出芽酵母における遺伝学的解析から姉妹染色分体間の接着を担う因子としてコヒーシンが同定された。コヒーシンは酵母からヒトまで真核生物において広く保存されたタンパク質複合体（Smc1, Smc3, Scc1, Scc3）であり、そのサブユニットが構築するリング状の構造に複製された 2 本の DNA 鎖を取り込むことで姉妹染色分体間の接着を行うモデルが提唱されている。S 期に姉妹染色分体の接着が成立するメカニズムについてはまだ不明な点が多いが、近年の出芽酵母における研究から、アセチル基転移酵素 Eco1 がコヒーシンサブユニット Smc3 の 112, 113 番目のリジン残基をアセチル化することが、複製と共役した接着の確立に必須であることがわかっている。また、アセチル化された Smc3 は分裂後期から G1 期にかけて、脱アセチル化酵素

Hos1 の作用によって速やかに脱アセチル化される。このように細胞周期の進行に伴って規則正しくアセチル化と脱アセチル化を繰り返すことが、姉妹染色分体間の接着を正しく成立させるために大切であると考えられている。

一方、生殖細胞では半数体の配偶子を形成するために減数分裂が行なわれている。DNA 複製と染色体の分配が繰り返される体細胞分裂と異なり、減数分裂では一回の DNA 複製の後に二回の連続した染色体分配が起こる。減数第一分裂では姉妹動原体は同一の極からのびたスピンドル微小管によって捕らえられるため、姉妹染色分体は分かれずに同じ極へ分配される（還元分配）。続く減数第二分裂では体細胞分裂と同様に姉妹染色分体は両極へ均等分配される。

このような均等分配と還元分配の違いを生み出す最も大きな要因は姉妹動原体の方向性の違いであり、体細胞分裂期と減数分裂期で異なるコヒーシサブユニットを使い分けることがその制御に重要な意味を持っている。多くの真核生物で、減数分裂期には体細胞分裂型の Scc1 サブユニットが減数分裂型の Rec8 サブユニットに置き換わることが知られている。分裂酵母のセントロメアは動原体を形成する中央領域と、ヘテロクロマチンを構成する外側領域に区分されるが、体細胞分裂型の Rad21(Scc1 の分裂酵母ホモログ)コヒーシは主に外側領域に局在するのに対し、減数分裂型の Rec8 コヒーシは外側領域と中央領域の両方に局在する。このため体細胞分裂期の姉妹染色分体のセントロメアは外側領域のみが接着されて中央の姉妹動原体部位は両側に開いた二方向性の構造を取るのに対し、減数第一分裂期では外側領域に加えて中央領域も接着されていることで姉妹動原体が一方向性の構造を取ると考えられている（図 A）。しかしながら、Rec8 コヒーシがセントロメア中央領域の接着を確立するには減数分裂期特異的動原体因子 Moa1 (mono-polar attachment) の助けが必要である。Moa1 は Plo1 (Polo-like キナーゼの分裂酵母ホモログ) と結合してその動原体局在を制御するが、Rec8 コヒーシによるセントロメア中央領域接着を制御する分子機構については明らかとなっていない。そこで本研究では、Moa1-Plo1 複合体が一方向性結合確立に果たす役割について更に明らかにすることを目的として解析を進めた。

Yeast Two-hybrid 法を用いて Moa1 と相互作用する因子のスクリーニングを行ったところ、動原体因子 CENP-C の分裂酵母ホモログである Cnp3 が得られた。更に詳細な解析を行い、Moa1 は Cnp3 の C 末端と直接相互作用する事によって動原体に局在することを明らかにした。次に、減数第一分裂期特異的に Moa1 に依存して動原体に局在する Plo1 が、実際に一方向性結合の確立に寄与しているかどうかを調べた。Plo1 の機能を完全に抑えてしまうとスピンドル微小管に深刻な異常が生じるため、動原体に局在した Plo1 のみを特異的に不活性化させて観察を行ったところ、多くの細胞において減数第一分裂が均等分配となった。このことから動原体に局在した Plo1 の活性が一方向性結合の確立に重要であることが明らかとなった。

次に Moa1-Plo1 複合体がどのようにして姉妹セントロメア中央領域の接着を制御す

るのかについて、コヒーシンのアセチル化に注目して解析をおこなった。初めに分裂酵母の体細胞分裂期においても出芽酵母と同様なコヒーシンのアセチル化制御が存在するかどうかを確かめる実験を行った。その結果、1) アセチル基転移酵素 Eso1 (Eco1 の分裂酵母ホモログ) が Psm3 (Smc3 の分裂酵母ホモログ) の 105, 106 番目 (出芽酵母の 112, 113 番目に相当) のリジン残基をアセチル化すること、2) このアセチル化が姉妹染色分体の接着に重要であること、3) 出芽酵母の場合と同様、分裂酵母 Psm3 は S 期にアセチル化され、分裂後期に速やかに脱アセチル化されること、4) 分裂後期の脱アセチル化を行うのは Clr6 であること、を明らかにした。興味深いことに、出芽酵母の場合とは異なり、Psm3 の非アセチル化型変異 (*psm3-K105R,K106R* (*psm3-KKRR*)) を持つ細胞は生存可能であった。従って分裂酵母においては、Psm3 の K105, K106 以外にも Eso1 の必須の標的が存在することが示唆された。

これまでの出芽酵母における解析と今回私が行なった分裂酵母における解析から、コヒーシンのアセチル化が体細胞分裂期の姉妹染色分体接着に必須であることが示されたが、減数分裂期におけるアセチル化制御の重要性については不明であった。そこで、Eso1 の活性が低下した株の減数第一分裂を観察したところ、ほとんどの細胞が均等分配を示すことが明らかとなった。また、*psm3-KKRR* 変異株でもほとんどの細胞で第一分裂が均等分配となったことより、減数第一分裂における姉妹動原体の方向性制御にも Eso1 による Psm3 のアセチル化が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

次に減数分裂期における Moa1 とコヒーシンのアセチル化制御の関係を遺伝学的に解析した。Moa1 の下流にアセチル化を介した接着制御があるならば、*moa1* 遺伝子破壊株においてアセチル化を亢進することで一方向性結合の異常を回復できると考えられた。そこで Eso1 をセントロメアに局在化、あるいは *clr6* 変異を導入してコヒーシンのアセチル化を亢進させたところ、*moa1* 遺伝子破壊株の還元分配を部分的に回復させることができた。最初この現象は Psm3 の K105, K106 のアセチル化の亢進によると考えたが、予想に反して Psm3 のアセチル化がおこらない *psm3-KKRR* 変異株においても、*clr6* 変異による *moa1* 遺伝子破壊株の回復が観察された。従って、このとき Eso1 の強制発現や Clr6 の活性低下によってアセチル化が亢進され、*moa1* 遺伝子破壊株の回復を担っているのは Psm3 の K105, K106 ではなく、未知の接着促進因子 X であると結論した (図 B)。この考えは Psm3 のアセチル化模倣型変異 (*psm3-KKQQ*) が *moa1* 遺伝子破壊株の還元分配を全く回復させることができないことから支持された。X の正体は全く不明であるが、コヒーシン複合体のサブユニットあるいはコヒーシンに非常に近くで接着を制御している因子を想定している。

また、Eso1 および Moa1 の機能が必要となる時期について検討したところ、Eso1 は減数分裂前 DNA 複製の時期に必要とされるのに対し、Moa1 の機能は DNA 複製が完了した後に必要となることが明らかとなった。これらの結果を合わせて考察した結果、Moa1 は DNA 複製終了後から減数第一分裂に至るまでの間、コヒーシン (接着促進因

子 X) のアセチル化を維持することで姉妹染色分体間の接着を保持しているのであろうと結論した。

近年、染色体分配の制御機構の解明をめざした研究は大きく発展を遂げている。しかしながら、減数第一分裂特異的に還元分配を引き起こす分子メカニズムについてはほとんど分かっていない。今回の分裂酵母の研究から、Moa1 に加えて Rec8、Cnp3、Plo1、Eso1 といった真核生物間でよく保存された因子が還元分配の確立に大きな役割を果たすことが示された。分裂酵母が他の高等真核生物に類似したセントロメア構造を持つことから、今後さらにこれらの因子の機能相関を詳細に解析することは、真核生物に保存された減数第一分裂特異的な姉妹動原体の制御機構を解明する上で非常に重要と考えられる。

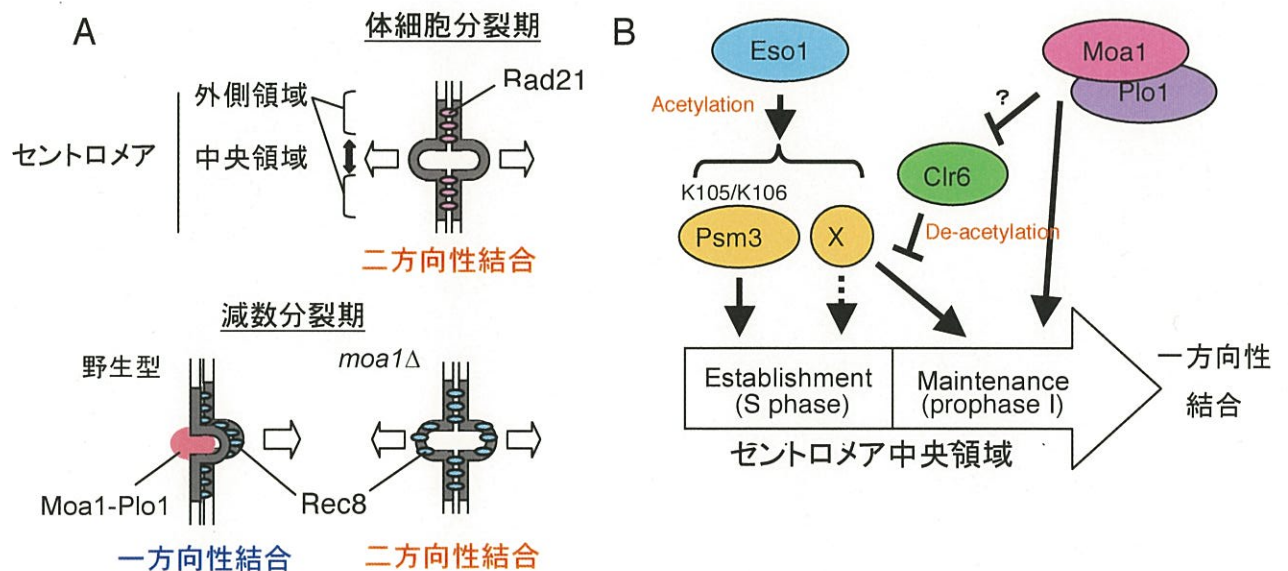


図 モデル

A) 分裂酵母のセントロメアは外側領域と中央領域に区分されており、体細胞分裂期では Rad21 コヒーシン複合体が外側領域を選択的に接着し、動原体形成部位であるセントロメア中央領域は二方向性となる。減数分裂期では Rec8 コヒーシン複合体が外側領域と中央領域の両方に局在し Moa1-Plo1 複合体と共同して一方向性の姉妹動原体を形成する。moa1 遺伝子破壊株では Rec8 は中央領域に局在するが接着がおこらないため、一方向性結合の確立には Rec8 の局在に加えて Moa1-Plo1 の機能が必要であると考えられる。

B) Eso1 と Moa1-Plo1 複合体による一方向性結合確立のモデル。Eso1 は DNA 複製期に接着を確立させ、Moa1-Plo1 複合体がその後にコヒーシンのアセチル化状態を保護し、接着を維持することで姉妹動原体の一方向性結合を成立させている。