T2R2東京工業大学リサーチリポジトリ Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報 Article / Book Information

題目(和文)	 姉妹染色分体分離の定量的解析手法の確立
Title(English)	
著者(和文)	
Author(English)	Kouta Nagasaka
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10266号, 授与年月日:2016年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:太田 啓之,岩崎 博史,駒田 雅之,木村 宏,中戸川 仁,広田 亨
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10266号, Conferred date:2016/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
 学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

学位論文

平成27年度

姉妹染色分体分離の定量的解析手法の確立

東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生体システム専攻

長坂 浩太

目次

- 第一章 背景と目的 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7
 - 1-1. 分裂期染色体によって保証されるゲノム情報継承メカニズム
 - 1-2. 分裂期を制御するM期キナーゼ
 - 1-3. 分裂期染色体形成過程の形態学的観察
 - 1-4. 分裂期染色体形成におけるCondensin複合体の役割

1-4-1. In vitroにおけるCondensinの活性と機能

- 1-4-2. In vivoにおけるCondensinの局在と機能
- 1-5. 姉妹染色分体間接着の維持と解除

1-5-1. Cohesinの機能と制御因子

1-5-2. DNA catenation と Topo IIα

- 1-6. 従来の姉妹染色分体分離の解析手法
- 1-7. 本研究の目的と結果の概要
- 第二章 姉妹染色分体分離の定量的解析手法の確立 ・・・・・・・・・15
 - 2-1. 半保存的複製を利用した姉妹染色分体の分染手法
 - 2-2. 分離した姉妹染色分体を抽出する方法論
- 第三章 分裂期における姉妹染色分体の分離過程の解析 ・・・・・・・22
 - 3-1. 姉妹染色分体の分離はProphaseの初期から進行し、その大部分をProphaseまでに終える
 - 3-2. Dual label染色体解析による分離解析手法の妥当性の検証
 - 3-3. 姉妹染色分体分離の定量的解析手法の妥当性の検証
 - 3-4. 姉妹染色分体交換が姉妹染色分体の分離に与える影響の検証

3-5. 姉妹染色分体分離の定量的解析手法の検出限界の検証

第四章 WaplとTopo IIαによる姉妹染色分体の分離の制御 ・・・・・・30

4-1. WaplによるCohesinの解離は姉妹染色分体の分離に必要である

4-2. RNAi法によるWaplのノックダウン効率の検討

4-3. Topo IIαの機能がProphaseにおける分離において中心的役割を果たす

4-4. Topo IIαの機能は、Cohesinの解離に必要ではない

第五章 Condensin IIによる姉妹染色分体の分離の制御 ・・・・・・・39

5-1. Condensin IIは姉妹染色分体の分離に必要である

5-2. Condensin Iの姉妹染色分体の分離への関与の検討

5-3. Topo IIαのProphaseにおける染色体凝縮への関与の検討

5-4. Condensin IIのM期特異的なリン酸化制御

5-5. CAP-D3 T1415のリン酸化修飾は、姉妹染色分体の分離に必要である

第六章 考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・50

6-1. Prophase pathwayの意義

6-2. 染色体上におけるCohesinとDNA catenationの分布の考察

6-3. Condensin IIとTopo IIαによる分離の分子メカニズム

6-4. 姉妹染色分体分離手法の問題点と今後のについての考察

第七章	総	括	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 5	3
第八章	材	料	と	方	法		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 5	7
参考文南	¢	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 6	4
謝辞 ·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 7	'1

遺伝情報を次世代へと伝播する過程は、母細胞の複製したゲノムDNAを姉妹細 胞へ均等に分配することによって完了する。この分配過程は、ゲノムDNAが分 裂期染色体と呼ばれる高度に凝縮した構造体へと変換された後に遂行される。 分裂期染色体の形成過程は、染色体の凝縮と姉妹染色分体の分離過程の大きく 分けて2つのプロセスから成り、迅速かつ正確な染色体分配を保証している。 染色体の凝縮は、DNAを巻き取る活性を有するCondensin複合体が中心的役割 を担っており、特に分裂期初期における凝縮にはCondensin IIが重要である。 姉妹染色分体の分離は、姉妹染色分体を繋ぎ留めているCohesin複合体とDNA catenationが、WaplとTopoisomerase IIaによってそれぞれ解除されることによ って進行する。これら2つの過程において重要な役割を担う因子の存在、そして それらの機能が明らかにされつつある中で、姉妹染色分体の分離が分裂期染色 体形成過程においていつ進行しているのか、また染色体の凝縮過程との関連に ついても不明であった。

この命題に取り組むべく、本研究では、先ず姉妹染色分体の分離の程度をヒト 培養細胞において可視化、定量化する実験系の構築を試みた。半保存的複製機 構を利用し、2種類の核酸誘導体のアナログであるF-ara-EdUとBrdUを用いて 姉妹染色分体を別々の色に染め分ける実験系を作成した。染め分けた姉妹染色 分体が重ならない領域、つまり個別の構造物として認識される領域を抽出し、 染色体全体に対するその領域の体積を算出することによって分離の程度を数値 化することに成功した。

この手法を用いて、まず、姉妹染色分体の分離過程が分裂期を通じていつ、どのようにして進行しているのか検討した。その結果、姉妹染色分体の分離は Prophaseのごく早い段階からすでに観察され、核膜崩壊に先立ってその大部分

が完了することを見出した。さらに、WaplをノックダウンすることでCohesin の解離を抑制すると分離が抑制されることから、Prophaseで見られる分離には Cohesinの解離が必要であることがわかった。一方で阻害剤を用いてTopo IIaの 機能を抑制すると、Waplの機能阻害と比較してより顕著に分離が抑制されるこ とがわかった。また、Topo IIaの機能が阻害されても、大部分のCohesinは通常 の細胞と同様に分裂期染色体から解離している。これらの結果から、Prophase における分離にはCohesinの解離も必要であるが、DNA catenationを解除する Topo IIaの機能がより大きな役割を担っていることが示された。

続いて姉妹染色分体の分離と染色体の凝縮の関連について検討すると、その二 つの過程は、Prophaseにおいて相関して進行することがわかった。この結果を 踏まえ、Prophaseにおける染色体凝縮を促進するCondensin IIの姉妹染色分体 の分離への役割を検討した。Condensin IIサブユニットの一つであるCAP-D3を ノックダウンすることによって、Prophase、Prometaphaseにおける分離が大 きく抑制された。また、Condensin IIのM期特異的なリン酸化修飾を抑制する ことによってもProphaseにおいて分離異常が見られた。一方で、Condensin I の機能阻害による分離への影響は検出されなかった。この結果から、姉妹染色 分体の分離と染色体の凝縮の2つの過程は、Condensin IIの機能によって密接に 関連しており、それはCondensin Iによってでは相補できないことがわかった。 また、Condensin IIによって制御されているProphaseにおける染色体の体積の 変化は、Topo IIaの機能阻害によってではほとんど影響を受けなかった。この 結果は、Condensin IIはProphaseにおける染色体凝縮と姉妹染色分体の分離の 両方に関与している一方で、Topo IIaは分離過程において特異的に機能している 可能性を示唆している。

本研究により、新たに姉妹染色分体の分離過程を定量的に解析する手法を確立 することに成功した。この実験手法がブレークスルーとなり、これまで古くか ら観察されていたProphaseで見られる染色体の凝縮過程は、実は姉妹染色分体 の分離の進行を伴っているということ、そしてProphaseにおいて染色体形成過 程における姉妹染色分体の分離のおよそ70%が完了することが新たに明らかと なった。さらにこの過程における分子背景には、従来から示されていた Cohesinの解離に加えて、新たにDNA catenationの解除に必要なTopo Ilaと、M 期特異的なCondensin IIの機能が重要な役割を担っているということがわかっ た。

第一章 背景と目的

1-1. 分裂期染色体によって保証される遺伝情報の継承メカニズム

原核生物からヒトに至る全ての生物種のゲノム情報は、DNAにコードされてい る。真核生物のゲノムDNAは、DNAがヒストンに巻ついたヌクレオソームを最 小単位としたクロマチンとして細胞内に存在し、クロマチンを介してそのゲノ ム情報を次世代の細胞へと伝達される。このゲノム継承過程は、S期においてゲ ノムDNAのコピーを正確に複製し、それらのペア (=姉妹染色分体)をM期におい て姉妹細胞へと均等に分配することによって完了する。分配に先立ち姉妹染色 分体は、分裂期染色体と呼ばれるクロマチンが高度に凝集した棒状の構造体へ と変換される。分裂期染色体によってクロマチンを伝搬することにより、M期 の後期 (Anaphase)において姉妹染色分体を引き離しやすく、かつ分配時に生じ うる染色体の破損を防ぐことができ、正確な染色体の分配過程が保証されてい る。染色体の形成異常は、癌化の原因である染色体数の異数化と密接に結びつ いており、"染色体不安定性"と呼ばれる癌のマーカーとしても知られる。した がって分裂期染色体の形成は、細胞レベルのみならず、個体レベルでの恒常性 維持においても極めて重要なプロセスである。

1-2. 分裂期を制御するM期キナーゼ

M期の開始から終了までは、種々のタンパク質翻訳後修飾システムによって厳密に制御されている。中でもタンパク質のリン酸化修飾は、M期の様々な局面において重要な役割を果たしている。酵母からヒトに至る全ての真核生物のM期進行においては、Cdk (cyclin-dependent kinase)ファミリーであるCyclin B-Cdk1複合体が中心的役割を担っている (Nigg, 2001)。種々のリン酸化、脱リン酸化修飾によるポジティブフィードバックループ制御によってCdk1の活性化が促されてM期開始を促し (Lindqvist et al., 2009)、M期終了時にcyclin BがAPC/C

(anaphase-promoting complex/cyclosome)によってポリユビキチン化されてプ ロテアソームにより分解されることでCdk1は不活性化し、M期終了がもたらさ れる (Buschhorn and Peters, 2006)。その他にM期において重要な役割を果た す因子としては、Plk1 (polo like kinase 1)と、Aurora A, Bキナーゼが挙げられ る。Plk1は、Cyclin B-Cdk1の迅速な活性化、中心体の分離と成熟、紡錘体の形 成、細胞質分裂などM期の過程において多岐に渡ってその機能が知られている (Archambault and Glover, 2009; Barr et al., 2004)。さらにPlk1は、HeLa細胞と において分裂期染色体の軸索構造に濃縮し、Cyclin B1-Cdk1と共に染色体形成 すること (Abe et al., 2011)、酵母に置いては染色体分配時においてそのリン酸 化制御によりAnaphaseにおける正確な染色体分配仮定に機能していることが 報告されている (St-Pierre et al., 2009)。Aurora Aは中心体成熟や双極性紡錘体 形成において (Barr and Gergely, 2007)、Aurora Bは正確な染色体分配と細胞質 分裂においてそれぞれ重要な役割を担っていることが知られている (Jeyaprakash et al., 2007; Ruchaud et al., 2007)。

1-3. 分裂期染色体形成過程の形態学的観察

染色体が凝縮する様子は、光学顕微鏡で分裂期初期 (Prophase)から観察する ことができ、古くからM期開始の標識として用いられてきた。Prophaseにおい て凝縮した染色体は、一本のソーセージ状の構造体として出現することが電子 顕微鏡を用いた観察によって報告されている (Sumner, 1991)。その後 Prometaphase、MetaphaseとM期の進行に伴ってさらなる染色体腕部の短縮が 進む一方で (=染色体の凝縮)、染色体の間に徐々に溝が出現し、姉妹染色分体 を別々のものとして認識することができるようになる (=姉妹染色分体の分 離)。染色体腕部間の接合は、微小管重合阻害剤などによって細胞をM期に長く 留めおくことによって完全に解除されるが、セントロメア領域と呼ばれる染色

体の中心箇所の接合は強く維持されており、最終的によく知られているX形を した染色体となる (Mole-Bajer, 1958; Rieder and Palazzo, 1992)。

1-4. 分裂期染色体形成におけるCondensin複合体の役割

染色体の凝縮過程において中心的役割を果たす因子として、これまでに Condensin複合体の存在が明らかにされている (Hirano, 2006)。Condensinは、 原核生物からヒトに至るまで高度に保存されたタンパク質複合体であり、それ ら全ての生物種の遺伝情報伝達過程において中心的役割を担っている (Hirano, 2012)。

1-4-1. In vitroにおけるCondensinの活性と機能

Condensin複合体は、In vitroの実験系においてATPとTopoisomerase Iの存在下 でプラスミドDNAに正の DNA超らせんを導入する活性を有しており (Kimura and Hirano, 1997)、M期特異的なリン酸化修飾によってその活性が増加する (Kimura et al., 1998; St-Pierre et al., 2009)。また、M期のカエルの抽出液から 精製したCondensinは、カエルの精子核を分裂期染色体様の凝縮した構造物に 変換する機能を有することから、CondensinはDNAを巻き取ることによって染 色体凝縮を促進していると考えられている。

1-4-2. In vivoにおけるCondensinの局在とその機能

多くの真核生物には、Condensin IとIIの2種類の複合体が存在していることが 確認されている (Hirano, 2012)。それぞれの共通サブユニットであるSmc2、 Smc4に加えて、Condensin IはCAP-H/Kleisin-γ、CAP-G、CAP-D2から、 Condensin IIはCAP-H2/Kleisin-β、 CAP-G, CAP-D3からそれぞれ成り、その二 つのCondensinはよく似た複合体を形成するが (Onn et al., 2007; Ono et al., 2003; Schleiffer et al., 2003; Yeong et al., 2003)、細胞内におけるそれらの動態

及びその役割は全く異なっている。Condensin Iは核膜崩壊 (NEBD)の後に染色 体に取り込まれてCentromere間の染色体構造の維持に寄与している一方で (Gerlich et al., 2006; Oliveira et al., 2005)、Condensin IIは細胞周期を通じて染 色体上に局在し、Prophaseから染色体の軸索構造に濃縮し始める (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004)。Condensin II非存在下の細胞では、Prophaseにおける 染色体の凝縮の遅延が見られ、染色体の分配エラーが引き起こされる (Abe et al., 2011; Green et al., 2012; Heriche et al., 2014; Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004)。そのためCondensin IIは、染色体凝縮の開始に必要な因子であるという だけでなく、姉妹染色分体の分離過程においても重要な役割を担っていること が示唆されている (Ono et al., 2013)。

1-5. 姉妹染色分体間接着の維持と解除

姉妹染色分体は、S期に複製されM期に分配されるまでの間、姉妹染色分体間 接着 (Sister chromatid cohesion; 以下コヒージョン)によって繋ぎとめられてい る (Fig. 1)。染色体分配に先立ってコヒージョンが解除されてしまうと、姉妹染 色分体をペアとして認識することができなくなり、染色体の均等分配が困難と なる。また、Anaphaseにおけるコヒージョンの解除が不完全であった場合も同 様に、染色体の分配エラーが引き起こされる。姉妹染色分体のペアを分配の瞬 間まで繋ぎ止め、かつAnaphaseにおいてその接着を完全に解除することによっ て初めて、姉妹染色分体を姉妹細胞へと均等に分配することが可能となる。し たがって姉妹染色分体の分離は、分裂期染色体の形成過程において、染色体が 分配されるタイミングでコヒージョンを完全に解除するための準備段階として 重要な役割を担っているといえる。

1-5-1. Cohesinの機能と制御因子

コヒージョンは、Cohesinと呼ばれるリング状の複合体が姉妹染色分体を束ね ることによって形成、維持されている (Fig. 1B)(Haering et al., 2008)。Cohesin を形成するコアコンポーネントは、Smc1, Smc3, Scc1/Rad21/kleisin-α, SA1/2 であり、Pds5A/B, Wapl, SororinといったCohesinの相互作用因子によってその 機能は制御されている (Nasmyth, 2011)。Anaphaseにおいては、Separaseと呼 ばれるProteaseによってCohesinのサブユニットが限定解除されることで Cohesinが染色体から解離し、染色体の分配が促される (Fig. 1C)(Oliveira et al., 2010; Uhlmann et al., 1999; Uhlmann et al., 2000)。Separaseによる切断は、主 に分裂期染色体の接合部位であるセントロメアに存在するCohesinの解除を促 進するが、染色体腕部に存在する大部分のCohesinは、M期に侵入する際に Separaseの機能非依存的に染色体から解離する (Waizenegger et al., 2000)。こ の過程は"Prophase Pathway"と呼ばれており、これまでの研究からWaplがその 中心的役割を担っていることが明らかとなっている (Gandhi et al., 2006; Kueng et al., 2006)。Waplをノックダウン、もしくはノックアウトすることに よってその機能を阻害すると、Cohesinの分裂期染色体からの解離が抑制さ れ、光学顕微鏡で姉妹染色分体の分離が抑制されていることを観察することが できる (Kueng et al., 2006; Tedeschi et al., 2013)。

1-5-2. DNA catenationとTopo IIα

姉妹染色分体は、Cohesinによる制御に加えて複製時に生じるDNAの絡まり (=DNA catenation)によっても繋ぎとめられている (Fig. 1A)(Farcas et al., 2011; Murray and Szostak, 1985; Sundin and Varshavsky, 1980, 1981)。DNA catenationは、DNAの2重鎖結合を一時的に切断して絡まりを解いた後にDNAを 再度結合する活性を有するType II Topoisomerase (以下Topo II)の機能に依存し て解除される (Wang, 2002)。哺乳類にはTopo IIαとTopo IIβの2種類のTopo IIが

存在するが、すべての生物種においてTopo IIaが生存に必須である一方で、 Topo IIβの機能の重要性は神経発生における限定的なものであるということが 報告されている (Tsutsui et al., 2001)。Topo IIaの機能を阻害すると、分裂期染 色体の形成異常と重度な染色体分配異常が引き起こされる (Gimenez-Abian et al., 2000; Gimenez-Abian et al., 1995)。また、Topo IIaは分裂期染色体の軸索 構造に濃縮することから、Condensin複合体と同様に分裂期染色体の形成過程 において重要な役割を担っていると考えられてきた (Maeshima and Laemmli, 2003)。さらにAnaphaseにおいて染色体が分配するタイミングでもTopo IIaの 機能が必要であることから (Wang et al., 2010)、Topo IIaは分裂期染色体形成か ら染色体分配に至るM期を通じた姉妹染色分体の分離過程において必須な因子 であるといえる。

1-6. 従来の姉妹染色分体分離の解析手法

上述したように、分裂期染色体形成における姉妹染色分体の分離過程は、正 確な染色体分配のために必須なプロセスであり、重要な研究課題として位置付 けられてきた。これまでに最も広く用いられてきた姉妹染色分体の分離を解析 する方法としては、スライドガラス上に展開した染色体をギムザ染色液によっ て赤紫色に染め、染色体腕部の接着の有無に着目した形態学的解析によって分 離を評価する手法が挙げられるが、分離の程度を定量的に解析することはでき ない。また、分裂期染色体の軸索構造に濃縮するタンパク質群を銀染色によっ て可視化し、軸索構造間の距離から分離の程度を見積もる方法や (Gimenez-Abian et al., 2000)、FISH (fluorescence in situ hybridization)法によって染色体 の一部分を特異的に蛍光標識し、ペアとなる姉妹染色分体のスポット間の距離 を測る方法なども報告されているが (Ono et al., 2013)、いずれの方法によって も間接的、もしくは局所的な分離の知見を得るに留まっている。最近では、2 度の複製に渡って染色体にBrdUを取り込ませると姉妹染色分体間で核染色剤か

ら得られるシグナルに濃淡の差が現れることを利用し、姉妹染色分体のシグナ ルをそれぞれ分けて抽出し、分離の程度を算出する方法が報告された (Liang et al., 2015)。しかし、この手法による解析では、電子顕微鏡による解析と同様、 分離が核膜崩壊(NEBD)前後に起きていることを示唆するにとどまっており、M 期を通じて姉妹染色分体の分離がいつ、どのように進行しているのかは不明で あった。以上のように、これまでの手法によってでは"分離が始まるタイミング はいつであるのか?"また、"染色体の凝縮と姉妹染色分体の分離過程がどのよ うに関連して進行するのか?"といった根本的な疑問は依然として未解決のまま である。

1-7. 本研究の目的と概要

本研究では、姉妹染色分体の分離過程がM期を通じていつ、どのように進行す るのかを明らかにすることを目的として、分離を定量的に解析する実験系の構 築を試みた。

第2章では、姉妹染色分体を別々の色に染め分ける手法と、分染した染色体を 用いて姉妹染色分体の分離を定量的に解析する方法論を述べる。

第3章では、新たに確立した姉妹染色分体の分離を定量解析する手法を用い

て、M期を通じて姉妹染色分体の分離がいつ進行しているかについて検討し

た。さらに分離の定量的解析手法の妥当性、姉妹染色分体交換が分離に与える 影響、そして定量解析の検出限界についてそれぞれ検討した。

第4章では、姉妹染色分体間接着の解除の機能が知られているWapl, Topo IIαの 分離過程における役割を検討した。

第5章では、染色体の凝縮への関与が知られているCondensin複合体の分離への関与について検討した。



Murray et al., 1985, Sundin et al., 1981Guacci et al., 1997, Michaelis et al., 1997Farcas et al., 2011Losada et al., 1998, Haering et al., 2008

Uhlmann et al., 1999, Uhlmann et al., 2000 Oliveira et al., 2010

Fig. 1 姉妹染色分体間接着は、CohesinとDNA catenationによって制御されている

A, 複製の副産物であるDNA catenationによって、姉妹染色分体が繋ぎとめられ ている様子を示す。B, 姉妹染色分体がCohesinのリング構造によって束ねられ ている様子を示す。C, Anaphaseにおいて、Separaseの活性によってCohesin サブユニットのScc1が切断され、染色体分配が促される様子を示す。

第二章 姉妹染色分体分離の定量的解析手法の確立

これまでの研究報告では、NEBD前後に分離した姉妹染色分体が確認されてい たが (Liang et al., 2015; Sumner, 1991)、実際に姉妹染色分体の分離がどのタイ ミングから進行しているかは不明である。この研究課題に取り組むべく、姉妹 染色分体を別々の色に染め分けて、姉妹染色分体の分離過程を定量解析する手 法の確立を試みた。以下第二章では、姉妹染色分体を分染する実験手法と、分 染した染色体から分離の程度を算出する方法論について述べる。

2-1. 半保存的複製を利用した姉妹染色分体の分染手法

姉妹染色分体を分染するために、核酸誘導体Thymidineのアナログであり、古 くから細胞増殖のマーカーとして使用されている5-bromo-2'-deoxyuridine (以下 BrdU)(Gratzner, 1982)と、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (以下EdU)の改変体として 近年開発された (2'S)-2'-Deoxy-2'-fluoro-5-ethynyluridine (以下F-ara-EdU)(Neef and Luedtke, 2011)を用いた。F-ara-EdUは、EdUと同等の検出感度を有しなが ら、EdUと比べて細胞毒性が低くなるよう改良されたもので、F-ara-EdU存在 下の培地で長期間の細胞培養が可能である (Fig. 2-1a)。hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cell (以下RPE1細胞)を1週間F-ara-EdU存在下の培地で 培養すると、大部分の染色体は新たにF-ara-EdUを取り込んだ2本鎖DNAへと置 換される (Fig. 2-2a)。その2本鎖DNAを鋳型としてBrdU存在下の培地で1度複製 が起こると、F-ara-EdUとBrdUを取り込んだ1本鎖DNAから成る2本鎖DNAをそ れぞれが持つ姉妹染色分体となる (以下Dual label)。さらにM期においてその姉 妹染色分体が姉妹細胞へと分配され、その後いずれの核酸誘導体も含まない通 常の培地で再度複製を起こさせる。するとBrdUとF-ara-EdUを取り込んだ1本 鎖DNAを鋳型として新たに姉妹染色分体が合成されるため、姉妹染色分体それ ぞれをBrdU、もしくはF-ara-EdUを取り込んだ1本鎖DNAによって別々に認識

することが可能となる (以下;Single label)。ラベルした染色体をスライドガラス 上に展開し、抗 BrdU抗体とClick chemistryによってBrdUとF-ara-EdUをそれぞ れを特異的に蛍光標識すると (Fig. 2-1b)(Salic and Mitchison, 2008)、当初の狙 い通りに姉妹染色分体が別々の色に染め分けられていることを確認することが できた (Fig. 2-2b)。

2-2. 分離した姉妹染色分体を抽出する方法論

姉妹染色分体の分離の程度を定量化するために、姉妹染色分体が分離している 領域、つまり染め分けた染色体が重なり合わない領域 (Non-overlappings;以下 Non-OLs)を抽出した (Fig. 2-3)。得られた3次元画像データを1辺が90 nmの立 方体を最小単位とした3次元データへと変換し、閾値の設定によってシグナル を2値化し、BrdU、F-ara-EdUのシグナルを基にした染色体を、90 nm四方の立 方体の集合体として再構築した。それらの染色体が重なり合う領域 (Overlappings;以下OLs)を抽出し、全体の染色体からOLsを差し引いたものを Non-OLsとし、全体の染色体に占めるNon-OLsの割合を分離の程度の指標とし た (Non-OLs (%) = Non-OLs (µm³)/ Total chromosome volume (µm³))。これら の作業によって再構築した染色体は、BrdUとF-ara-EdUのシグナル強度を基に するために、その体積値は染色の程度に依存する。しかし、F-ara-EdUとBrdU はそれぞれ免疫染色とClick chemistryという異なった手法によって染色してい るために、染色のムラを起因とする過剰もしくは過小な見積もりによる定量解 析への影響が懸念された。実際に、F-ara-EdUとBrdUのシグナル強度を基に 別々にそれぞれの体積を算出して比較すると、Dual, Single label共に、時期に よって若干の数値のズレがあるということが見て取れる (後述)。この染色ムラ による影響を最小限とするために、DAPI染色のシグナルを基にして得られた染 色体の体積を染色体の体積と定義し、F-ara-EdUとBrdUを基にして算出した染

色体の体積がこの値と等しくなるよう (F-ara-EdU-positive U BrdU-positive =
DAPI volume)、また同時に、F-ara-EdUとBrdUによって得られた体積が等しくなるように閾値を補正した (F-ara-EdU-positive = BrdU-positive volume)(Fig.
2-4)。



Fig. 2-1 F-ara-EdUとBrdUの毒性と、蛍光ラベルの特異性の検討

a, RPE1細胞を、DMEM (コントロール)、EdU (10 µM)、F-ara-EdU (10 µM)、 BrdU (6 µM)を含有する培地で培養し、その後24時間毎にそれぞれの条件下で 得られた細胞数を、コントロールの細胞数によって標準化してグラフで示す (mean ± [SD])。**b**, RPE1細胞を、DMEM (コントロール)、F-ara-EdU (10 µM)、 BrdU (6 µM)、F-ara-EdU/BrdUを含有する培地で18時間培養し、固定の後にFara-EdU、BrdUをそれぞれ蛍光標識した。DNAは、Hoechst 33342を用いて染 色した。それぞれの条件における典型的なProphaseの細胞を示す (Scale bar, 5 µm)。



Fig. 2-2 姉妹染色分体を染め分ける方法論

a, F-ara-EdUとBrdUを用いて姉妹染色分体を分染する実験手法の模式図 **b**, Single label、Dual labelした染色体をスライドガラス上に展開し、F-ara-EdU、 BrdUをそれぞれ免疫染色法と、Click it chemistryによって蛍光標識した。それ ぞれの典型例を示す (Grid size, 2 µm)。



Fig. 2-3 分離した姉妹染色分体を抽出する方法論

上段のパネルでは、Single labelした染色体のDAPI、BrdU、F-ara-EdUのシグナ ルから得た画像データをGaussian filter処理し、三次元の画像として示した (Grid size, 2 µm)。中段のパネルは、それぞれのシグナルを元に再構築した染色 体を示す。下段のパネルでは、EdUとBrdUの染色体から重なりあった領域 (Overlappings; OLs、グレー)と、重なり合わない領域 (Non-Overlappings; Non-OLs、マゼンタ)を抽出したものを示す。右下段の2枚のパネルでは、分離した 領域を明確に示すことを目的としてZ軸の一部を抽出したセクションを示す。



Fig. 2-4 閾値補正による画像解析のプロセス

a, b, Single labelしたPrometaphaseにおける染色体の、BrdU、F-ara-EdU (EdU)、DAPIから取得した画像データ (a)と、Gaussian filter処理を施したデー タ (b)を示す。c, d, (b)を基に閾値の補正をせずに画像解析したもの (c)と、補正 をして解析したもの (d)をそれぞれ示す。両者の間に大きな違いはほとんど見受 けられないが、(c)では矢頭に示す検出されていない領域が、DAPIを用いった 閾値の補正を行うによって(d)で検出されており、結果的に(b)の画像とほとんど 重なっていることが見て取れる。e, 閾値補正を行って3次元で再構築した染色 体を示す。

第三章 分裂期における姉妹染色分体の分離過程の解析

新たに確立した姉妹染色分体の分離過程を定量的に解析する手法を用いて、第 三章では、分裂期染色体形成過程において姉妹染色分体の分離がどのタイミン グで進行するのかを検証した。また、この手法による分離解析の結果の妥当性 をDual labelした染色体の解析と、BLMをノックダウンの実験によって検討し た。またSgo1のノックダウンの実験によって分離解析の検出限界を検討した。

3-1. 姉妹染色分体の分離はProphaseの初期から進行し、その大部分を

Prophaseまでに終える

M期を通じて姉妹染色分体の分離がいつ進行するかについて検討するために、 G2期からM期 (G2 phase, Ealry prophase, Late prophase, Prometaphase, Metaphase, Early anaphase, Late anaphase)におけるSingle labelした染色体の 体積とNon-OLsをそれぞれ算出した (Fig. 3-1a, d)。その結果、染色体の体積 は、G2期からMetaphaseの間におよそ1/3程度にまで減少することがわかった (Fig. 3-1c)。この結果は過去に同様の手法を用いて得られた結果と一致してお り (Heriche et al., 2014; Mora-Bermudez et al., 2007)、M期の進行につれて染色 体の凝縮が徐々に進んでいることを示している。一方でNon-OLsは、G2期 (18.4±4.2 %)と比較してEarly prophase (30.6±5.8 %)からすでにその値が上昇し ており、その後Late prophase (46±5.3%)、Prometaphase (50.7±7.4 %)、 Metaphase (56.4±6.1 %)と、M期が進行するにつれて値が上昇していることが わかった (Fig. 3-1d)。さらに、染色体の体積とNon-OLsが最大、最小となるよ うに標準化してグラフ化することにより (Fig. 3-3)、染色体の凝縮と姉妹染色分 体の分離は、NEBD後と比較してNEBD前、つまりProphaseにおいてより相関 して進行していること、そしてLate prophaseの時点ですでにMetaphaseまでに 達する70%以上の分離が進行していることが明らかとなった。これらの結果 は、姉妹染色分体の分離はProphaseの初期から凝縮とともに進行し、NEBDま での間にその大部分を完了していることを示唆している。

3-2. Dual label染色体解析による姉妹染色分体分離解析手法の妥当性の検証

Single labelの結果から得られた分離の結果が妥当なものであるかを検証する ために、理論上はBrdUとF-ara-EdUのシグナルが完全に重なり合うDual labelし た染色体からNon-OLsを算出した。その結果、Single labelの結果とは異なり、 その値はM期を通じてほぼ一定の値を示した (Fig. 3-1b, d)。これは、Single labelした染色体から抽出したNon-OLsの値を分離の程度の指標とすることが妥 当であることを示している。Dual labelから得られたNon-OLsの値はおおよそ 20%程度となったが、これはZ軸方向に見られる僅かなずれや、不均一な染色 などが原因であると考えられる。

また、Dual labelした染色体の体積を算出すると、Singe、Dual labelした染色 体の両方の間に、それぞれの時期で染色体全体の体積にはほとんど違いがない ことがわかった (Fig. 3-1c)。これは、染色体全体の体積を算出するまでの解析 過程が両者において同等に進行しており、Single labelした染色体から得られた Non-Olsの値が確かであることを裏付けるものである。Dual labelした染色体か ら算出したNon-OLsと全体の体積を対照実験とするSingle labelから得られた実 験結果の妥当性の検討は、後述する全ての実験において実施しているがその記 述については以下省略する。

3-3. 姉妹染色分体分離の定量的解析手法の妥当性の検証

続いて、解析のプロセスの妥当性を検証するために、第二章で記述した閾値の 調整を用いて得られた結果 (+Const)と、閾値の調整をせずに算出した結果 (-Const)を比較した (Fig. 3-1c, d, Fig. 3-2)。DAPIシグナルを基にして得られた染

色体全体の体積と、閾値調整をせずにF-ara-EdUとBrdUのシグナルを基に算出 した染色体全体の体積には若干の違いが見られる (Fig. 3-2a)。また、F-ara-EdUとBrdUのシグナルから再構築した染色体の体積を比較すると、M期を通じ て若干のズレが確認出来る (Fig. 3-2b)。これらを上述したような方法によって 補正して得た結果と (Fig. 3-2c, d)、補正をせずに得たNon-OLsと全体の染色体 の体積を比較した (Fig. 3-1c, d, Fig. 3-2e, f)。二つの方法によって得られた結果 にはそこまで大きな値の変動は見られないことから、補正そのものが定量デー タに大きな影響を与えることはなかった。しかし、より満遍なく染色すること のできるDAPI染色から再構築した染色体の体積をベースとし、F-ara-EdUと BrdUの体積を算出していることから、この補正によってより確かなデータとな っていると結論付けた。

3-4. 姉妹染色分体交換が姉妹染色分体の分離に与える影響の検証

スライドガラス上に展開したSingle labelした染色体を観察すると、姉妹染色分 体交換 (Sister chromatid exchange, 以下SCE)が起きていることがわかる (Fig. 2-2b)。SCEは、DNA損傷に対してHomologous recombinationを利用して修復 した際に起こるものであり、通常の培養条件や、姉妹染色分体の染め分けの過 程において引き起こされているものであると考えられる。そこで、SCEがどの 程度分離の解析に影響を与えうるか、BLM (Bloom syndrom protein)をノックダ ウンすることによって検討した (Fig. 3-4)。これまでに報告されている通り、 BLMをノックダウンすることで通常条件に比べて5倍以上の頻度 (1染色体あた り3つ程度の割合)でSCEが引き起こされたが (Fig. 3-4a, b)(German et al., 1977)、Non-OLsについては、コントロールと比較してわずか5 %程度の上昇に とどまった (Fig. 3-4d)。この結果は、通常の条件下において見られるSCEは、 分離の解析には大きな影響を与えないということを示している。

3-5. 姉妹染色分体分離の定量的解析手法の検出限界の検証

Early anaphaseにおけるNon-OLsの値は73.5±5.1 %であった。これは、全ての 姉妹染色分体間の接着は解除されているのにも関わらず、20 %以上の染め分け た染色体間に重なり合った領域が残っていることを示している。また、M期に おいてセントロメア間の姉妹染色分体間接着を保護する機能を持つShugoshin (Sgo1)をノックダウンしたprometaphaseの細胞においても (Fig. 3-4c)、ほとん どのコヒージョンは解除されているのにも関わらずNon-OLsの値は64.7±8.1 % となり、Early anaphaseにおいて得られた結果と同様に依然として重なり合っ た領域が検出された (Fig. 3-4c, d)。これらは、蛍光顕微鏡の分解能の限界によ って生じる隣り合った染色体同士間の重なりが反映されているからであると考 えられる。





a, **b**, G2、Early prophase、Late prophase、Prometaphase、Metaphase、 Early anaphaseにおけるSingle label、Dual labelした染色体の典型例を示す。 Gaussian filterで処理したシグナルデータ (上段)(Grid size, 2 µm)、上段のシグ ナルを基に再構築した染色体 (中段)、OLsとNon-OLs (下段)をそれぞれ示す。**c**, **d**, (a), (b)から算出した染色体の体積 (c)とNon-OLs (d)の定量データをグラフで 示す (mean ± [SD])。一つ一つの点が一細胞から得たデータを示している。



Fig. 3-2 閾値補正によって得られる定量結果の比較検討

a-d, Fig. 3-1c, dの解析で使用したサンプル群を用いて、BrdUとF-ara-EdUのシ グナルから算出した染色体全体の体積とDAPIのシグナルから算出した染色体全 体との体積の比 (a, c)と、BrdUとEdUの体積の比 (b, d)をそれぞれ解析した。閾 値の補正をせずに得た結果と (a, b)、補正して得た定量結果 (c, d)をそれぞれグ ラフに示す (mean ± [SD])。**e**, **f**, 閾値の補正をせずに算出した染色体の体積 (e) と、Non-OLs (f)の定量結果をFig. 3-1c, dと同様に示す (mean ± [SD])。



Fig. 3-3 染色体の凝縮と姉妹染色分体の分離は、Prophaseにおいて相関して進行する

Fig. 3-1c, dで示した各Phaseにおける染色体の体積とNon-OLsの平均値を、G2 とLate anaphaseにおける平均値 (体積とNon-OLsの最大値と最小値)で標準化 し、グラフに示す。



Fig. 3-4 姉妹染色分体交換(SCE)は、姉妹染色分体の分離解析に大きな影響を 与えない

a, Controlと、BLMのノックダウン条件下において、Single labelした染色体の BrdUとF-ara-EdUをそれぞれ蛍光ラベルし、その典型例を示す (grid size, 5 µm)。**b**, (a)の条件下でSCEの頻度をカウントし、1染色体あたりのSCEの頻度 をグラフで示す (mean ± [SD], n ≥ 12 per condition, *P < 0.001, two-tailed student's t-test)。**c**, Controlと、Sgo1をノックダウンした細胞を固定し、キネ トコアをCRESTによって、そしてDNAをDAPIによってそれぞれ蛍光標識し た。それぞれのPrometaphaseにおける典型例を示す (Scale bar, 5 µm)。**d**,e, Controlと、Sgo1、BLMをノックダウンした条件下において、Single label、 Dual labelした染色体からNon-OLs (d)と、染色体の体積 (e)を算出したものを グラフで示す (mean ± [SD]; n ≥ 8 per condition; **P < 0.001, *P < 0.05, twotailed student's t-test)。

第四章 WaplとTopo IIαによる姉妹染色分体の分離の制御

これまでの結果から、姉妹染色分体の分離過程は、主にProphaseにおいて進行していることがわかった。第四章では、Prophaseにおける姉妹染色分体の分離過程において、コヒージョンの解除、すなわちCohesinの解離とDNAカテネーション解除がどの程度寄与するか検討することを目的として、WaplとTopo IIαの機能を阻害し、分離に与える影響を調べた。

4-1. WaplによるCohesinの解離は姉妹染色分体の分離に必要である

M期におけるCohesinの解離を抑制するためにHT-1080細胞を用いて、RNAi法 によってWaplをノックダウンした。Western blottingによって、大部分のWapl がノックダウンできていることを確認した (Fig. 4-1a)。同条件下における Single labelした染色体のNon-OLsを、G2期、Prophase, Prometaphaseにおい てそれぞれ算出し、コントロールの条件(以下Cont)とそれぞれ比較した (Fig. 4-1b, c)。その結果、Waplのノックダウン(以下ΔWapl)によって、Prophase (Cont; 41.4±6.6 %、ΔWapl; 34.8±4.4 %)、Prometaphase (Cont; 52.1±5.5 %、 ΔWapl; 41.4±5.3 %)においてそれぞれ、コントロールと比べて僅かではある が、Non-OLsの値の上昇が優位に抑制されるということがわかった。これは、 WaplによるCohesinの分離が部分的な姉妹染色分体の分離に必要であるという ことを示している。一方で、Waplをノックダウンしても染色体の体積には大き な影響を与えないということがわかった (Fig. 4-1d)。この結果は、Cohesinの 解離が抑制されても、染色体の長さ、凝縮の程度には大きな影響を与えないと いうこれまでの報告と一致する (Kueng et al., 2006; Tedeschi et al., 2013)。

4-2. RNAi法によるWaplのノックダウン効率の検討

コヒージョンの形成と維持はCohesinの機能に依存しているのにも関わらず、 Waplのノックダウンによって引き起こされる分離異常は予想外に軽微なもので あった (Fig. 4-1c)。これは、RNAi法による不十分なWaplのノックダウンによっ て、Cohesinの解離が十分に抑制できていないことが原因の一つとして考えら れる。その可能性について検討するために、免疫染色法によってWapl非存在下 で引き起こされる間期の染色体の形成異常と、染色体分画法によって分裂期染 色体上に残存するCohesinの量をそれぞれ解析した (Fig. 4-2)。この実験におい ては、同調実験に有用であるHeLa細胞を使用した。HeLa細胞と、分染の実験 に使用したHT-1080細胞の両方においてWaplをノックダウンし、残存するWapl の量をWestern blottingによって検証したところ、両者ともに同程度ノックダウ ンできていることを確認した (Fig. 4-2a)。Waplのノックアウトによって、 Vermicelli (イタリア語でミミズの意味)と呼ばれるCohesinが染色体上で軸索構 造が形成されるという近年の研究報告に基づいて (Tedeschi et al., 2013)、 Cohesinのサブユニットの一つであるSmc1の免疫染色法を用いてノックダウン の条件下における間期染色体の様子を観察した。その結果、ノックアウトで見 られる表現型と比較すると弱いものではあったが、両細胞においてCohesinが 軸索構造を形成する様子を観察することができた (Fig. 4-2b)。続いて、Waplを ノックダウンした条件下において、HeLa細胞をG2期とM期に同調し、染色体 分画法によって全細胞抽出液を細胞質画分と染色体画分に分け、染色体画分に 存在するCohesinの量をWestern blottingで検証した (Fig. 4-2c)。その結果、 Waplをノックダウンした細胞の分裂期染色体上には、コントロール細胞のG2 期染色体上のCohesinとほぼ同程度のCohesinが残存していることがわかった (Fig. 4-2d)。以上の結果から、RNAi法によるWaplのノックダウンによって得ら れた分離異常の表現型は、大部分のCohesinの解離が抑制されている条件下で 得られたものであると結論付けた。

4-3. Topo IIαの機能が、Prophaseにおける分離において中心的役割を果たす 続いて、Prophaseで進行する姉妹染色分体の分離におけるDNA Catenationの 解除の寄与を検討するために、2種類のsi-RNAを用いてTopo llαをノックダウン した条件(ΔTopo IIα)で分離の程度を解析した (Fig. 4-3)。Western blottingによ って残存するTopo IIαの量を調べた結果、2種類のsi-RNA (#1, #2)によってほと んどのTopo IIαをノックダウンできていることがわかった (Fig. 4-3a)。この条 件においてSingle labelした染色体上のNon-OLsを調べると、Prophase (Cont; 45.1±3.0 %、ΔTopo IIα-#1; 37.1±3.1 %、ΔTopo IIα-#2; 34.5±6.1 %)、 Prometaphase (Cont; 47.0±2.9 %、 ΔΤορο ΙΙα-#1; 38.3±4.3 %、 ΔΤορο ΙΙα-#2; 37.5±2.3 %)における分離が、コントロールと比較して、Topo IIαのノックダウ ンによって優位に抑制されているということがわかった (Fig. 4-3b, c)。しか し、Topo IIαのノックダウンによって得られた結果は、S期、G2期において Topo IIaが非存在下であるために引き起こされた間接的な分離異常として検出 された可能性が考えられる。そこでM期特異的なTopo IIαの分離への関与を検 証するために、Topo IIのcatalytic inhibitorとして知られるICRF-193を用いて、 G2期からM期への移行時に時期特異的にTopo IIaの機能を阻害した条件で分離 への影響を検証した (Fig. 4-4)。その結果、ノックダウンによってTopo IIαの機 能を阻害した時に比べて、Prophase (Cont; 46.6±5.8 %、ICRF-193; 22.8±1.7) %)、Prometaphase (Cont; 49.5±5.6 %、ICRF-193; 22.5±3.8 %)においてより顕 著な分離異常が引き起こされることがわかった (Fig. 4-4a, b)。この結果は、G2 期からM期への移行のタイミングにおける姉妹染色分体の分離過程に、Topo IIa の機能が大きな役割を担っていることを示している。阻害剤によってTopo IIα の機能を抑制することで引き起こされる分離異常は、ノックダウンによって得 られた結果と比較してより強いものであったが、これはICRF-193処理によって

Closed clamp complexと呼ばれるDNAとTopo IIαの複合体が形成されるために (Roca et al., 1994)、タンパク質の減少によってもたらされる機能阻害と比較し てより顕著な分離異常が引き起こされるのではないかと考えられる。

4-4. Topo IIαの機能は、Cohesinの解離に必要ではない

Topo IIαの阻害によって引き起こされる分離異常が、Cohesinの解離と関与し ているかどうかを、Smc1の免疫染色によって検証した (Fig.4-5)。その結果、 Topo IIαをノックダウン、もしくはICRF-193によってその機能を阻害しても、 Prophaseにおいてコントロールの条件と同程度までCohesinが染色体から解離 しており、Topo IIαの機能は、M期におけるCohesinの解離には必要ではないと いうことがわかった。これらの結果から、Topo IIαの機能阻害によってもたら された姉妹染色分体の分離異常は、Cohesinの解離の失敗によるものではな く、DNA catenationの解除の失敗によって引き起こされたものであると考える ことができる。



Fig. 4-1 Waplは、Prophase、Prometaphaseにおける姉妹染色分体の分離に 必要である

a, Controlと、Waplをターゲットするsi-RNAで処理した細胞を回収し、抗 Wapl 抗体と抗 αTubulin 抗体を用いてWestern blottingを行った。b, (a)の条件で、G2 phase、Prophase、PrometaphaseにおけるSingle labelした細胞の典型例を示 す。Gaussian filterで処理した画像データ (上段)(Grid size, 2 µm)、上段のシグ ナルを基に再構築した染色体 (中段)、OLsとNon-OLs (下段)をそれぞれ示す。c, d, (b)から算出したNon-OLs (c)と体積 (d)の定量データを、Dual labelした染色 体から得たデータと合わせてグラフで示す (n ≥11 cells, mean ± [SD]; *P < 0.01, **P < 0.001, two-tailed student's t-test)。



Fig. 4-2 Waplのノックダウンによって、大部分のCohesinの解離が抑制される a, RNAi法によってWaplをノックダウンしたHT-1080とHeLa細胞の抽出液を回 収し、抗 Wapl抗体と抗 α Tubulin 抗体を用いてWestern blottingを行った。b, (a) で回収した細胞を固定し、抗 Smc1 抗体を用いて免疫染色を行った。DNAは、 DAPIによって染色した (Scale bar, 5 µm)。WaplによるSmc1の局在パターンの 変化を、四角で示した領域を下段で拡大して示す。c, RNAi法によってControl とWaplをノックダウンしたHeLa細胞を、チミジンと8 µM Ro-3306によってG2 期とM期に同調した。その細胞抽出液 (Total cell extract)を染色体分画法によっ て、細胞質画分とクロマチン画分 (Chromatin)に分け、各タンパク質を特異的に 認識する抗体でWestern blottingを行った。CohesinサブユニットであるSmc1、 Smc3、Scc1に加え、 α Tubulinを細胞質画分の、Histone H2Bをクロマチン画分 のコントロールとして、そしてCyclin B1とpH3S10はG2期とM期を分けるコン トロールとしてそれぞれ解析した。d, (c)で解析したCohesinのシグナル強度を 定量し、H2BのシグナルとG2期のControlのシグナルを用いて標準化したものを グラフに示す (mean ± [SD], 独立した3回の実験から得た結果から算出した)。


Fig. 4-3 Topo IIαは、姉妹染色分体の分離に必要である

a, Topo IIαをターゲットする2種類のsi-RNAを用いてTopo IIαをノックダウン し、その細胞抽出液を抗 Topo IIα 抗体と抗 aTubulin 抗体を用いたWestern blottingによって解析した。b, (a)の条件で、G2 phase、Prophase、 PrometaphaseにおけるSingle Iabelした染色体の典型例として、Gaussian filter で処理した画像データ (上段)(Grid size, 2 µm)、上段のシグナルを基に再構築し た染色体 (中段)、OLsとNon-OLs (下段)をそれぞれ示す。c, d, (b)から得られた Non-OLs (c)と、染色体の体積 (d)の定量結果をグラフに示す。Dual Iabelした染 色体から得たデータも同様に示す (n ≥ 8 cells, mean ± [SD], **P < 0.001, twotailed student's t-test)。



Fig. 4-4 Topo IIαの機能は、姉妹染色分体の分離に必須である

a, 8 μM Ro-3306を添加してG2期に同調したSingle label、Dual labelしたRPE1 細胞を、温めた培地で洗浄してM期に移行させる。その際の培地に10 μM ICRF-193を添加することで、Topo IIαの機能を阻害した。G2、Prophase、

PrometaphaseにおけるSingle labelした染色体の典型例の、Gaussian filterで処 理した画像データ (上段)(Grid size, 2 µm)、上段のシグナルを基に再構築した染 色体 (中段)、OLsとNon-OLs (下段)をそれぞれ示す。**b**, **c**, (a)から得たNon-OLs (b)と、染色体の体積 (c)の定量データをグラフで示す。Dual labelした染色体か ら得たデータも同様に示す (mean ± [SD]; n ≥ 8 per condition, two-tailed student's t-test)。



Fig. 4-5 Topo IIαの機能は、M期におけるCohesinの解離に必要ではない Control (DMSO)、ICRF-193で処理、Topo IIαとWaplをそれぞれRNAi法によっ てノックダウンした細胞をPre-extraction後に固定し、抗 Smc1 抗体と、抗 pH3S10 抗体を用いて免疫染色を行った。DNAはDAPIを用いて染色した。それ ぞれの条件下でのProphaseの細胞の典型例を示す (Scale bar, 5 μm)。

第五章 Condensin IIによる姉妹染色分体の分離の制御

これまでの結果から、姉妹染色分体の分離は、WaplとTopo IIαの機能によって Prophaseの早い段階から進行していることが明らかとなった。さらに興味深い ことに、染色体の凝縮と姉妹染色分体の分離過程は、Prophaseにおいてよく相 関して進行していることがわかった (Fig. 3-3)。これは姉妹染色分体の分離が、 染色体の凝縮と関連して進行していることを示唆している。この可能性につい て検証するために、第五章では、Prophaseにおける染色体凝縮に必要である Condensin IIの機能が、姉妹染色分体の分離へも関与しているか検討した。

5-1. Condensin IIは、姉妹染色分体の分離に必要である

Prophaseにおける染色体の凝縮に必要であることが知られるCondensin IIの阻 害によって、分離に与える影響について調べた。Condensin IIの機能阻害は、 Condensin II特異的なサブユニットであるCAP-D3をRNAi法を用いてノックダ ウンすることによって実施した。そのノックダウン効率は、Condensin IIの各 サブユニットを特異的に認識する抗体を用いたWestern blottingによって検討 し、大部分のCAP-D3をノックダウンできていることを確認した (Fig. 5-1a)。 この条件下におけるSingle labelした染色体のNon-OLsを算出した結果、 Prophaseにおける分離が、Dual labelによって得られた結果と同程度にまで強 く抑制されることがわかった (Fig. 5-1b-d)。また、Prometaphaseにおいてもコ ントロールと比較して優位に分離が抑制されていた。これらの結果は、 Condensin IIが、Prophaseにおける染色体の凝縮だけでなく、姉妹染色体分離 においても中心的役割を果たしていることを示している。

5-2. Condensin Iの姉妹染色分体の分離への関与の検討

CAP-D3のノックダウンによって引き起こされたPrometaphaseで見られる分 離異常の表現型は、Prophaseにおけるそれと比較して軽度なものであった (Fig. 5-1c)。これは、Prophase以降においてCondensin II非依存的な機能によ り染色体凝縮と、姉妹染色体の分離が進行している可能性を示唆している。 Condensin IはNEBD後に分裂期染色体に取り込まれることから (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004)、Prometaphaseにおいて分離を促進する候補因子とし て考えられる。そこで、Condensin Iが、Condensin II非存在下のProphaseから Prometaphaseにかけて進行する分離に関与している可能性について検討するた めに、Condensin I単独と、Condensin IとCondensin IIを同時に機能阻害した時 に分離へ与える影響について比較した (Fig. 5-1, 5-2)。Condensin Iの機能阻害 は、Condensin I特異的なサブユニットであるCAP-HをRNAi法を用いたノック ダウンによって実施した。そのノックダウン効率は、CAP-D3と同様に Condensin Iのサブユニットに対する抗体を用いてWestern blottingによって検討 した (Fig. 5-1a, Fig. 5-2a)。Single labelした染色体からNon-OLsの値を算出 し、コントロールの結果と比較すると、CAP-Hの単独のノックダウンによる分 離異常は、Prophase、 Prometaphaseにおいても見られず (Fig. 5-1b-d)、ま た、CAP-D3とのダブルノックダウンによってもCAP-D3の単独のノックダウン と同程度の分離異常しか見られなかった (Fig. 5-2b. c)。さらに、細胞をM期に 長く留めおくことで姉妹染色分体の分離が進行するというこれまでの観察事実 に基づき、プロテアソーム阻害剤であるMG132を処理することで細胞を長期間 M期に滞留させ、同様に分離の程度を検討した。しかし、CAP-H単独のノック ダウンによる分離異常は、Prophase、 Prometaphaseにおいても見られず (Fig. 5-1c, d)、CAP-D3とのダブルノックダウンによってもCAP-D3の単独のノック ダウンと同程度の分離異常しか観察されなかった (Fig. 5-2b, c)。これらの結果 は、Condensin IはProphase、Prometaphaseにおける姉妹染色分体の分離過程

にはほとんど関与しておらず、またCondensin IIの機能を補完して Prometaphaseにおける分離を促進することはできないと解釈することができ る。

5-3. Topo IIαのProphaseにおける染色体凝縮への関与の検討

これまでの結果から、Condensin IIはProphaseにおいて、染色体の凝縮だけで なく姉妹染色分体の分離にも必要であることがわかった。Topo IIαもProphase における姉妹染色分体の分離においても中心的役割を果たしていることが明ら かとなったが (Fig. 4-4)、Topo IlαがProphaseにおいて分離だけでなく、染色体 の凝縮過程にも必要であるかは不明であった。その可能性について検討するた めに、Live cell imaginingを用いてTopo IIα阻害時におけるM期の進行に伴って 推移する染色体の体積を算出し、コントロール、Condensin II阻害の条件下で 得た結果と比較した (Fig. 5-3)。この実験を実施するにあたり、EGFP-H2Bと DHB-mKO2を発現するHeLa細胞株を樹立した。前者は染色体のシグナルを、 後者はM期に近い細胞を得るためのマーカーとして使用した (Spencer et al., 2013)。Condensin IIとTopo IIaの機能阻害は、CAP-D3をRNAi法によってノッ クダウンすることで、ICRF-193を処理することによってそれぞれ実施した (Fig. 5-3a)。それぞれの条件下でNEBD以前の染色体の体積の推移を比較する と、コントロール細胞ではNEBDのおよそ12分前から凝縮が開始するのに対し て、CAP-D3をノックダウンすると凝縮に明らかな遅延が見られた (Fig. 5-3b)。NEBD後にはコントロールと同程度にまで凝縮が進行するが、この結果 はこれまでに同様な手法によって得られた結果と一致している (Heriche et al., 2014)。一方でTopo IIaの機能をICRF-193によって阻害しても、コントロールと 同様に染色体の体積が減少し、凝縮過程が進行することがわかった (Fig. 5-3b)。この結果は、Topo IIαはCondensin IIによって制御されるProphaseの染

色体凝縮には関与しておらず、分離のプロセスにおいて特異的に機能している ことを示唆している。以上の結果から、Topo IIαの機能は特に分離過程におい て重要な役割を果たす一方で、Condensin IIは染色体の凝縮と分離の両方の過 程において重要であることが明らかとなった。

5-4. Condensin IIのM期特異的なリン酸化制御

これまでに、M期におけるCondensin IIの機能は、M期をドライブする中心的 な役割を果たすM期キナーゼであるCdk1と、Poloキナーゼファミリーである Plk1によるリン酸化修飾によって制御されていることを当研究室から報告して いる (*Abe* and Nagasaka* et al., 2011, *equal contribution*)。以下にその要点を まとめる。

1, Condensin IIは、M期にCdk1とPlk1依存的なリン酸化修飾を受ける

2, Condensin IIのサブユニットであるCAP-D3 Thr1415を、Cdk1のリン酸化サ イトとして同定した

3, Plk1はリン酸化されたCAP-D3 Thr1415を足場として染色体の軸索に集積

し、Condensin IIの各サブユニットをリン酸化する

4, Thr1415のリン酸化修飾は、Condensin IIによるProphaseにおける染色体凝縮と正確な染色体分配に必要である

このM期特異的なCondensin IIのリン酸化制御が、Prophaseにおける姉妹染色 分体の分離に関与している可能性について検証することを最終的な目的とし、 RPE1細胞を用いた追試実験を実施した (Fig. 5-5)。その結果、M期において2つ のキナーゼ活性を阻害することで、RPE1細胞においてもHeLa細胞と同様に、 M期におけるリン酸化依存的なCondensin IIサブユニットのバンドのシフトアッ プが抑制されることから、Condensin IIはCdk1、Plk1依存的なリン酸化修飾を

受けていることを改めて確認した (Fig. 5-4a)。また、CAP-D3をノックダウン することでPlk1の分裂期染色体の軸索構造への集積が見られなくなり、Plk1依 存的なCondensin IIのリン酸化修飾が抑制されることがわかった (Fig. 5-4b, c)。さらに、Cdk1の基質として同定したCAP-D3 Thr1415の非リン酸化型変異 体であるThr1415Ala (以下T1415A)を恒常的に発現するRPE1細胞株を樹立して 解析を行ったところ、Plk1が軸索構造へ集積できずPlk1依存的なCondensin II へのリン酸化が抑制されていること (Fig. 5-4b, c)、Prophaseにおける染色体の 凝縮が抑制されること (Fig. 5-4d)、そして染色体の分配異常が引き起こされて いることを確認した (Fig. 5-4e)。これらの結果は、HeLa細胞によって得られた 実験結果と一致する (Abe et al., 2011)。

5-5. CAP-D3 T1415のリン酸化修飾は、姉妹染色分体の分離に必要である

Cdk1によるCAP-D3 T1415のリン酸化修飾が、姉妹染色分体の分離に必要であ るかを検証するために、内在性のCAP-D3をノックダウンし、細胞内において 外来生のCAP-D3 WTとT1415Aと置き換え、姉妹染色分体の分離の解析を実施 した。置き換えの実験系の検証は、Western blottingによって実施した (Fig. 5-5a)。それぞれの条件下におけるSingle labelしたProphaseの細胞の染色体の 体積と、Non-OLsの値を算出したところ、 CAP-D3 WTを発現している細胞株 では内在性CAP-D3をノックダウンしたことによる分離異常がほとんどコント ロールのレベルにまで相補されているのに対して、T1415Aを発現する細胞株で は完全に相補するまでには至らないことがわかった (Fig. 5-5b, c)。これは、 Cdk1によるCAP-D3 T1415のリン酸化修飾がProphaseにおける染色体凝縮だけ でなく、姉妹染色分体の分離にも必要であることを示している。しかし、 T1415Aを発現する細胞株では、親株で内在性CAP-D3をノックダウンした時と 比べると分離異常が部分的であったことから、Condensin IIの機能が完全に抑

制されたわけではなく、部分的に活性が損なわれていると考えられる。これ は、CAP-D3のノックダウンによる染色体分配時における異常が、T1415A発現 株においても部分的に相補している結果とも一致する (Fig. 5-4e)。以上の結果 は、M期におけるCdk1によるリン酸化修飾が、ProphaseでのCondensin IIによ る染色体の凝縮と姉妹染色分体の分離の両方においてその機能を促進している ことを示唆している。



Fig. 5-1 Condensin IIは、Prophase、Prometaphaseにおける姉妹染色分体の 分離に必要である

a, RNAi法を用いて、CAP-D3、CAP-Hをノックダウンし、その細胞抽出液を Condensin I、IIの各サブユニットを特異的に認識する抗体と、抗 αTubulin 抗体 でWestern blottingによって解析した。b, (a)の条件において、G2 phase、 Prophase、PrometaphaseにおけるSingle labelした染色体の典型例を示す。 Gaussian filterで処理したシグナルデータ (上段)(Grid size, 2 µm)、上段のシグ ナルを基に再構築した染色体 (中段)、OLsとNon-OLs (下段)をそれぞれ示す。c, d, (b)から得られたNon-OLs (c)と、染色体の体積 (d)の定量結果をグラフに示 す。Dual labelした染色体から得たデータも同様に示す (n ≥ 13 cells, mean ± [SD], **P < 0.001, two-tailed student's t-test)。





Fig. 5-2 Condensin II阻害による分離異常は、Condensin Iの機能によってでは補完されない

a, RNAi法によってCAP-D3とCAP-Hの両方をノックダウンした細胞を用いて、 抗 CAP-D3抗体、抗 CAP-H抗体でWestern blottingを行った。Ponceau Sを、 タンパク質のローディングコントロールとして示す。**b,c,** (a)の条件において、 Single label、Dual labelした細胞から得たNon-OLs (b)と、染色体の体積 (c)の 定量データをグラフに示す (n ≥ 8 cells, mean ± [SD])。



Fig. 5-3 Topo IIαの機能は、Condensin IIによるProphaseの染色体凝縮には必 要ない

Time relative to prometaphase (min)

-4 0 4 8

-40 -36 -32 -28 -24 -20 -16 -12 -8

0.3

CAP-D3 depleted

ICRF-193 treated

a, EGFP-H2BとDHB-mKate2を恒常的に発現するHeLa細胞を、Live cell imagingによって観察した。コントロール、CAP-D3をノックダウンして72時間 後、ICRF-193を処理してから30分後のそれぞれの条件下においてEGFP-H2Bの シグナルを取得し、核膜が崩壊したタイミングを0 minとしたそれ以前の画像 データを示す (Scale bar, 5 µm)。b, (a)で得た三次元画像データから算出した染 色体の体積を、G2期における染色体の体積の平均値で標準化し、時間軸におけ る染色体の体積の推移をグラフに示した (mean ± [SD]), n = 8 (Control), n = 11 (CAP-D3 depleted), n = 12 (ICRF-193 treated))_o



Fig. 5-4 CAP-D3 pT1415は、M期におけるCondensin IIの機能に必要である

a, 非同調のRPE1細胞と、以下のように同調したM期細胞回収した ("Mock";20 μM STLC添加12時間後、"Ro": 20 μM STLC添加12時間後に8 μM Ro-3306 (Cdk1 inhibitor)を添加してさらにその30分後、"BI"; 100 nM BI-2536 (Plk1 inhibitor) 添加後12時間後、"ZM"; 20 µM STLC添加12時間後に、10 µM MG132 を添加して30分、さらに2 µM ZM447439 (Aurora B inhibitor) を添加して30分 後)。それぞれの条件における細胞抽出液を用いて、各タンパク質を特異的に認 識する抗体でWestern blottingを行った。b, RPE1細胞 (Parental)と、CAP-D3 WT、T1415Aを発現する細胞株において、RNAi法によって内在性CAP-D3を ノックダウンし、固定後、抗 Plk1抗体、抗 GFP抗体を用いて免疫染色を行っ た (Grid size, 2 µm)。**c**, (b)の条件における細胞を、各タンパク質を特異的に認 識する抗体用いてWestern blottingを行った。M期細胞は20 µM STLC添加の12 時間後にシェイクオフで回収した。d, (b)の条件における細胞を固定し、抗 Cyclin B1抗体、抗 pH3S10抗体、抗 GFP抗体を用いて免疫染色を行い、典型 的なLate prophaseの細胞を示す (Scale bar, 5 µm)。pH3S10とCyclin B1のシグ ナルが核内に検出できる細胞をLate prophaseとした。e, (b)の条件の染色体分 配において、ラギング、もしくはブリッジといった染色体の分配異常が起こる 頻度をグラフに示す (mean ± [SD]), 各条件で200以上の細胞を解析した)。



Fig. 5-5 CAP-D3 T1415のリン酸化は、Prophaseにおける姉妹染色分体の分離に必要である

a, RPE1細胞 (Parental)と、EGFP-CAP-D3 WT、T1415Aを恒常的に発現する細胞株に おいて、RNAi法によって内在性CAP-D3をノックダウンし、それらの細胞抽出液を、 抗 CAP-D3抗体と抗 aTubulin 抗体を用いてWestern blottingによって解析した。b, c, (a)の条件において、Singe labelした染色体から得たNon-OLs (b)と、染色体の体積 (c) の定量データをグラフに示す (箱ヒゲ図は中央値と、25 %、75%パーセンタイルを示 し、バーは最小値と最大値を示す。n ≥ 50 cells, **P < 0.001, two-tailed student's ttest)。

第六章 考察

6-1. Prophase pathwayの意義

大部分のCohesinが分裂期染色体から解離するProphase pathwayは、分配に先 立ってコヒージョンを失うことになりかねない。それにも関わらず、なぜ多く の真核生物でこの現象が保存されているのであろうか?大部分のコヒーシンが 染色体上に残存する条件下において引き起こされるProphaseの分離異常は、予 想外に弱いものであったが (Fig. 4-1b, c)、Wapl非存在下の細胞ではAnaphase において重篤な染色体の分配エラーが起こる (Tedeschi et al., 2013)。しかしな がら、そのような条件下においても染色体上に存在するCohesinは、Anaphase においてSeparaseの機能によりそのほとんどが染色体から解離される (Tedeschi et al., 2013)。つまり、Waplの機能阻害による分配エラーの原因は、 Cohesin切断の失敗によるものではなく、他に理由があると考えられる。一つ の可能性としては、染色体形成過程におけるDNA catenationの解除が不十分で あったことが挙げられる。近年の研究から、Cohesinの解離がTopo IIによる DNA catenationの解除に必要であることが実験的に示されている (Farcas et al., 2011; Wang et al., 2010)。これは、CohesinがDNAを束ねていることでTopo IIa が絡まったDNAへアクセスすることができず、DNA catenationを効率的に解除 できないことが原因であると考えられている。つまり、Waplの阻害によって引 き起こされる分離異常は、DNA catenationの解除の失敗が原因となっているこ とが予想される。以上を踏まえると、通常の分裂期染色体の形成過程において は、Prophase pathwayによって大部分のCohesinが解除されることにより、間 接的にDNA catenationの解除が促進され、姉妹染色分体の分離が進行すると考 えられる。一方で、Topo IIαの機能を阻害してもCohesinの解離は抑制されなか

ったことから (Fig. 4-5)、DNA catenationの解除がCohesinの解離を促すという ことは考え難い。

6-2. 染色体上におけるCohesinとDNA catenationの分布の考察

それではWapIの阻害によって引き起こされる分離異常は、Topo IIαの阻害によって引き起こされるそれと比較してなぜ軽微なのか?その理由の一つとしては、通常、Cohesinは染色体上の特定の領域に局在しており、WapIの阻害によってその局在が染色体上に広がることはなく、特定の箇所に存在するCohesinの量が増大することが挙げられる (Tedeschi et al., 2013)。つまり、WapI阻害時における分離エラーは、特定の箇所における過剰なコヒージョンによって引き起こされていることによるものであると考えられる。そのため、WapI非存在下でも、特定の領域以外の姉妹染色分体の分離は進行しており、全体として検出された分離異常は軽微なものであったと解釈することができる。一方で、DNA catenationは複製の過程において生じる副産物であることから、Cohesinとは異なり、染色体全長にわたって存在している可能性が考えられる。そのため、Topo IIaの機能阻害によって染色体全長に渡って分離が抑制されることにより、重度な分離異常として検出されたと解釈することが可能である (Fig. 4-4)。

6-3. Condensin IIとTopo IIαによる分離の分子メカニズム

本研究によって、Prophaseにおける姉妹染色分体の分離過程には、Condensin IIとTopo IIαの2つ因子が主要な役割を担っていることが新たに明らかとなり、 これら2つの因子が協調的に機能している可能性が改めて浮き彫りとなった。 しかし、真核生物において両者の間にはっきりとした相互作用があるわけでは なく (Bhat et al., 1996; Hirano and Mitchison, 1994)、また互いの因子が互いを 染色体上へ局在させるために必要というわけではない (Coelho et al., 2003; Cuvier and Hirano, 2003; Hirota et al., 2004; Hudson et al., 2003)。それでは一 体どのようにして両者は姉妹染色分体の分離を促進するのであろうか?このよ うな疑問に対する最も有力な説は、Topo IIαによるDNA catenationの解除は、 DNAの凝縮によって促進されるというものである (Baxter et al., 2011; Charbin et al., 2014)。この現象を説明しうる分子メカニズムとしては、DNAに超らせん が導入されることで絡まったDNAが露出され、Topo IIaがより効率的にDNA catenationの解除することができる、つまり染色体が凝縮すること自体が、 DNA catenationの解除を促しているというものである。この説に基づくと、 Prophaseにおいては、Condensin IIによって染色体が凝縮されることでTopo IIa の機能が間接的に亢進されている可能性が考えられる。このような間接的な機 能の相互作用によって分離が促進されているのであれば、CondensinとTopo IIa が互いの局在に大きな影響を与えないことや、両者の間に強い相互作用がない というこれまでの報告と矛盾しない。CondensinとTopo II間の機能的相互作用 は、酵母のrDNAの分配時にも存在しているということが報告されており (D'Ambrosio et al., 2008; D'Amours et al., 2004; Sullivan et al., 2004)、正確な 染色体分配を達成するために広く保存されたメカニズムであると考えられる。 しかしながら、Condensin IIとTopo IIαは分裂期染色体の軸索構造上で共局在し ていることから、上述したように間接的に機能しているだけであると結論付け るのはまだ時期尚早であり、両者が分裂期染色体形成過程において、いかにし て凝縮と分離過程を制御しているのかを明らかにすることは今後の重要な研究 課題である。

6-4. 姉妹染色分体分離手法の問題点と今後のについての考察

分離の定量的解析手法においてのコントロールとして、両方の姉妹染色分体の Single strand DNAそれぞれがBrdUとF-ara-EdUを取り込んだDual labelした染 色体が重なり合わない領域を抽出し、全体の染色体の体積における割合を検討 した。理論的には重なり合わない領域 (Non-OLs)は0となるはずだが、結果は

どの時期の染色体においてもNon-OLsがおよそ20%程度算出された (Fig.

3-1d)。また、Anaphaseにおける、もしくはSgo1をノックダウンした条件下に おけるSinge labelした染色体間のNon-OLsは、すべての姉妹染色分体間接着が 完全に解除されているのにもかかわらず0とはならない。これらの原因として 考えられる主たるものは、BrdUとF-ara-EdUを異なる方法によって染色するた めに生じる染色ムラ(a)と、顕微鏡の解像度の限界(b)が考えられる。以下それぞ れについての詳細を述べる。

(a) 抗BrdU抗体の抗体反応によって検出するBrdUのシグナルは、染色体の外縁 部が強く、そして内部が弱くなる傾向がある (Fig. 3-1b)。これは抗体のサイズ が大きいことにより、染色体内部へ侵入しにくいことが原因として考えられ る。このような染色ムラは、ヒストンに対する種々の抗体を用いた免疫染色で も同様に見られる。一方でF-ara-EdUの検出は、蛍光物質を付加したAzideを用 いたClick-chemistryの反応によって行うため、染色体内部と外縁部のシグナル 間にムラが見られず、DAPIなどのDNA染色剤などとほとんど同様の染色パター ンを示す。さらに、BrdUを染色する際には、抗体と抗原が結合できるようにす るためにDNase IによってゲノムDNAに切れ目を入れる、もしくは切断する必 要があり、抗体反応がDNaseの働きに影響されることもムラが起きる一因とな っていると考えれる。さらに大きな問題点としては、DNaseを使用することに よって染色体の構造そのものが変化を受けている可能性がある。しかし、この ような条件下においても、Single labelした染色体のProphaseにおいて優位な Non-OLsの上昇が見られることとDual labelした染色体では見られないこと (Fig. 3-1d)、そして、Topo IIaを阻害した時や (Fig. 4-3, 4)、CAP-D3をノックダ ウンした際には (Fig. 5-1)、Non-OLsの上昇が顕著に抑制されることから、姉妹 染色分体の分離過程は、Prophaseにおいて進行していると結論づけることがで きると考えられる。

(b) 分染した染色体の画像データは、共焦点レーザー顕微鏡LSM710 (Carl ZEISS)を用いてx:y:z = 90:90:360 nmの条件で取得した。染色体の体積を算出 する際には、画像処理によってシグナルデータを2値化し、染色体を構成する 最小単位を1辺が90 nmの立方体とした。つまり、染色体の体積はそのような 立方体の集合体の総和として算出される。従ってその最小単位以下のあらゆる 詳細な構造の情報は、2値化することによって排除されることになる。つま り、染色体と検出される領域の境界線が微妙に異なることで、Non-OLsの解析 に大きな影響を及ぼす。主たる原因としてはBrdUとF-ara-EdUを蛍光標識する 手法が異なることから生じる染色ムラが考えられ、その例としてG2期、M期の どの時期においても染色体の外縁部においてNon-OLsが観察される (Fig. 3-1b)。これは、染色体の外縁部におけるBrdUの蛍光シグナルが、F-ara-EdUか ら得られる蛍光シグナルと比較して強いからであると考えられる。さらに、共 焦点レーザー顕微鏡は、XY方向における解像度の限界は、200 nm程度である が、Z軸方向における解像度の限界はXY方向におけるそれと比較し、2倍程度 の400~500 nmとされている。従って現時点の3次元画像データでは、それ以下 の解像度の情報を得るのは技術的に困難であり、その結果3次元画像解析の精 度が低くなることでNon-OLsの値が大きくなると考えられる。以上述べたよう な原因によって、現状ではDual label (理論的にはNon-OLsの数値は0となる条) 件)においてもNon-OLsがおよそ20%程度見られると考えられる。また、現状 の蛍光色素を用いた解析によってでは、隣り合った染色体の重なりを排除する ことはできず、また90 nm以下の詳細な構造の情報を得ることはできないため に、すべての姉妹染色分体間接着が解除されたAnaphaseにおけるNon-OLsの値 が0とはならない。これは、現状の手法によってでは、姉妹染色分体間接着の 程度を正確に計測することが技術的に困難であることを示している。

これらの問題点を解決するためには、BrdUに代わるClick-chemistryで蛍光標識 できる核酸誘導体の開発によってDNase I処理による染色体構造の変化が起き ている可能性を排除し、染色ムラによる影響を低減することがまず重要な課題 である。また、超解像度蛍光顕微鏡による解析によって隣り合う染色体の重な りを可能な限り減らすことで、姉妹染色分体の分離がどのように進行するの か、特にEarly prophaseにおける現象の詳細な情報を得ることができると考え られる。

第六章 総括

本研究によって、姉妹染色分体の分離を一細胞レベルで解析する手法を確立す ることに成功した。姉妹染色分体を完全に独立したものとして区別し、M期を 通じて分離過程を初めて定量的に解析することを可能にした点が、従来の手法 とは一線を画すものである。その方法論を以て、姉妹染色分体の分離は、M期 初期において染色体の凝縮と同じタイミングで進行するということを新たに見 出した。さらに大部分の分離過程は、Prometaphaseに移行する前に完了して いることがわかった。染色体の凝縮が開始する時期はProphaseと定義され、古 くからM期開始のマーカーとして知られていたが、本研究によって、Prophase は姉妹染色分体の分離を進行するために重要なプロセスであることを初めて浮 き彫りにすることができた。Prophaseにおける姉妹染色分体分離が進行するた めにはWaplに加え、主にTopo IIaとCondensin IIがその中心的役割を担っている こと、そして染色体の凝縮と姉妹染色分体の分離の二つの過程は、Condensin IIによって密接に関連付けられたプロセスであることを明らかにした。

第七章 材料と方法

細胞の培養と同調

RPE1細胞、HeLa細胞 (Kyoto株)、HT-1080細胞は、抗生剤物質含有培地(DME 培地 (Invitrogen)、10 % FCS、0.2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin)で、37°C 5% CO₂のインキュベータ中で培養した。EGFP-CAP-D3-WT、-T1415Aを恒常的に発現する細胞株は、pLenti6/Ubc/V5 Gateway systemを用いることでレンチウイルスを作成し、細胞に感染させるこ とで樹立した。ウイルスは、293FT細胞 (Invitrogen)を用いて作成し、細胞の感 染には2 ug/ml Polybrene (Santa Cruz Biotechnology)を添加した培地を使用し た。ウイルス感染後、50 µg/ml Blasticidinを含む培地によるセレクションによ ってそれぞれのタンパク質を発現する細胞を選別した。DHB-mKO2の発現細胞 胞に感染させた。ウイルス感染後は、G418を含む培地によるセレクションによ って目的のタンパク質を発現する細胞を選別した。各細胞株の評価は、蛍光顕 微鏡による観察と、Western blottingによって実施した。

HeLa細胞の同調は、チミジンブロック法とCdk1のインヒビターである Ro-3306 (Roche)によって行った。培地に終濃度1.5 mMのチミジンを添加して S期に停止させ、24時間後にPBSと培地によってチミジンを洗浄し、通常の培 地で培養した。その6時間後に8 µM Ro-3306の培地で3時間培養しM期の直前に 細胞を同調した。その後培地でRo-3306を洗浄し、シェイクオフ法によりM期 細胞を浮遊させて回収した。

Early prophaseとLate prophaseを分ける方法論

ProphaseをEarly prophaseとLate prophaseに分けて認識するために、Histone H3 Ser10のリン酸化修飾(pH3S10)と、Cyclin B1を特異的に認識する抗体を用 いて免疫染色を実施した。前者は染色体の凝縮開始とともに核全体にシグナル が現れることから、核膜が崩壊する以前に核全体に渡ってそのシグナルが見ら れるものをProphaseと定義した。そしてCyclin B1は核膜崩壊の5分ほど前から 核内に流入する観察事実から、pH3S10とCyclin B1のシグナルが核内において 共に陽性な細胞をLate prophaseとして、そしてCyclin B1が陰性、pH310が陽性 な細胞をEarly prophaseとそれぞれ定義した。

Single label、Dual labelした細胞を解析する際には (Fig. 3-1)、染色体の体積値 によって境界線を引き、Early prophaseとLate prophaseを区別した。境界値を 決めるために、非同調の細胞においてpH3S10、Cyclin B1の免疫染色し、かつ DAPIによってDNA染色したものを用意し、Early prophase、Late prophaseと 定義した細胞における染色体の体積値を算出した。Late prophase、つまり Cyclin B1陽性細胞の方が、Early prophaseよりも全体的染色体の体積が低い傾 向にあることから、Cyclin B1のシグナルが陽性な細胞が正規分布していると仮 定し、95 %がLate prophaseとして含まれる体積値をEarly prophaseとLate prophaseの境界線とした。

RNAi法

抗生物質非含有培地 (DMEM、10% FCS、0.2 mM L-glutamine)に、OptiMEM と終濃度 15 nM (RPE1細胞)、50 nM (HeLa細胞、HT-1080細胞)のsi-RNA oligonucleotideとRNAiMAX (Invitrogen)の混合液を加え培養した。対照実験で は、si-RNAの代わりにH₂Oを使用した。RNAi処理をしてから、Sgo1 は24時 間、Topo IIα、CAP-D3、CAP-Hは36時間、BLMは48時間、Wapl は72時間それ ぞれ培養してから実験に用いた。si-RNAのターゲット配列は以下に示す。

CAP-D3, 5'-CAGCAGUCAGCAGAAUCCCAAUUCA-3'; CAP-H, 5'-UACACAACCUAACUCUGGCAACUCG-3' Topo IIα (#1), 5'-UAACAAUCGAGCCAAAGAGCUGAGC-3' Topo IIα (#2), 5'-UGAAAGCGACUAAACAGGCAGGACC-3' Wapl, 5'-ACACGAAUGAUACUGAUGAAUGUUC-3' BLM, 5'-ACAGGGAAUUCUAUGAAGGAGUUAA-3' Sgo1, 5'-CCCAAUAGUGAUGACAGCUCCAGAA-3'

Western blotting

細胞抽出液は、RIPA buffer (50 mM Tris-HCI (pH 8.0), 150 mM NaCI, 1.0 % NP-40, 0.5 % Sodium deoxycholate 0.5% and 0.1 % SDS, 1 mM DTT)によって 調整し、抽出液中のタンパク質濃度はBradford法 (Protein Assay System, Bio-Rad Laboratories)によって計測し、サンプル間のタンパク質濃度を調整した。 細胞抽出液をSDS PAGEによって展開し、ウェット方式でPVDFメンブレン (Immobilon; Millpore)にblottingした。メンブレンは、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (Toyobo)に希釈した一次抗体と4℃で一晩 反応させ、TBS-Tで洗浄後、二次抗体と室温で1時間反応させ、TBS-Tで洗浄し た。ECL plus (GE Healthcare)による発光を検出した。 Western blottingと免疫染色実験に使用した市販の一次抗体は以下に示す。 Plk1; F8, Santa Cruz Biotechnology, Cyclin B1; clone 18, BD Biosciences, α-tubulin; B512, Sigma, Cdc27; clone 35, BD Biosciences phosphorylation of histone H3S10; Cell Signaling Technology, 6G3, Smc3; Abcam, ab9263、Smc1; Abcam, ab9262、H2B; Abcam, ab52599、GFP; Abcam, ab290、BrdU; 3D4, BD Pharmingen (カバーガラス上でSingle、Dual labelした染色体を染色する際に使用)、BrdU; sc-51514, Santa Cruz

Biotechnology (スライドガラス上に展開したSingle、Dual labelした染色体を染 色する際に使用)

当研究室で作成した抗体は、以下に示すような1,もしくは2種類のペプチドを 抗原に用いてウサギに免疫させ、抗原ペプチドによって抗体を精製した。 Smc4, "AGEKILGPFHKRFSC" - "VAVNPKEIASKGLC" CAP-D2, "EFHLPLSPEELLKSC" - "CTTPILRASARRHR" CAP-G, "FRLAQQPHQNQAKL" - "YKREPA VERVIEF" CAP-D3, "CTKRAISTPEKSISD" - "CSRRSLRKTPLKTAN" CAP-H2, "CRTNVDLKNDQTPSE" - "CKRFQTYAAPSMAQP" CAP-G2, "CGEDNMETEHGSKMR" - "CYESSSRTLGELLNS" CAP-D3 pT1415, "CTKRAIS(pT)PEKSISDVTF" Wapl, "CLGQKRPNFKPDIQEI" - "CEPNQKDDGVFKAPA"

染色体分画解析

細胞をスクレーパーで回収後、PBSで洗浄し、Buffer A (10 mM HEPES (pH 7.9), 20mM KCl, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 % (v/v) glycerol, 0.34 M Sucrose, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 0.25 % Triton X-100, 0.1 µM Okadaic acid and protease inhibitor cocktail (Complete Mini EDTA-free; Roche)によって 溶解し、氷上で10分静置する。その後、細胞抽出液 (Total cell extract)を1,300g で5分遠心し、上清を細胞質画分とし、沈殿物はBuffer Aで3回の洗浄の後に染 色体画分 (Chromatin)としてそれぞれWestern blottingによって解析した。

Dual, Single labelの手法

Dual labelした染色体を得る際は、PRE1細胞、もしくはHT-1080細胞を10µM F-ara-EdU存在下の培地で1週間培養し、その後、BrdU (BD Pharmingen)存在 下の培地でさらに18時間培養してBrdUを取り込ませて固定した。Signle label した染色体を得る場合は、BrdUを洗浄後、通常の培地でさらに12-15時間培養 してから細胞を固定した。RPE1細胞をG2期に同調する際は、BrdUを洗浄後8 時間培養し、そこから終濃度8 µM Ro-3306を添加してさらに12時間培養し た。M期に同調する場合は、これらの細胞を温めた培地で洗浄し、さらに15-30 分間培養した。Prophaseの細胞は15分、Prometaphaseは30分間それぞれ培養 することによってそれぞれの時期の細胞を効率良く得た。染色体をスライドガ ラス上に展開する場合は、Ro-3306を洗浄後15分間培養し、その後終濃度20 µM S-trityl-L-cysteine (STLC; Tokyo Chemical industry)を添加し、さらに3時間 培養することによってM期に同調した。M期細胞はシェイクオフ法によって回 収し、PBSで洗浄後、低張処理液 (PBS:水道水 = 4:6)に置換して5分室温で静置 した後にカルノア液で固定した。細胞をカルノア液で3回洗浄後、スライドガラ スに展開した。

免疫染色とClick-it chemistry

細胞の固定は、4 % Formaldehydeと、2 % α-glcoseを含有するPBSに置換して 10分間室温で静置することで行った。その後0.01 % Triton X-100/PBS (PBS-T) で洗浄し、0.2 % Triton X-100/PBSに置換して5分間静置することで透過処理し た。その後、5 mM MgSO4/PBS-Tに置換して10分間シェイカーで3回繰り返し 洗浄し、3 % BSA, 5 mM MgSO4/PBS-Tに置換し、室温で30分静置する (Blocking)。抗 BrdU抗体 (BD Pharmingen, 1:30)と、リコンビナントDNase I (Roche, 50 units/ml)を含むBlockingで使用したBufferで37 °C 90分インキュベー トする。その後マウスの二次抗体を含む3 % BSA/PBS-Tで1時間インキュベー トする。EdUは、Click-iT EdU imaging kits (Invitrogen)のプロトコルに従い、銅 (I)触媒を用いてアルキン(F-ara-EdUのアルキル基)とアジド(Azide-Alexa-647)か ら1,4-二置換-1,2,3-トリアゾールを形成するHuisgen 1,3-双極子付加環化反応 によって蛍光ラベルした。

カルノア液で固定後スライドガラス上に展開したSingle、Dual labelした染色体 は、スライドガラスを乾燥させたのちに、1M HCl液中に4°Cで10分間静置し、 その後2M HCl液中に37°Cで30分間静置する。その後、1.5 M Tris-HCl液に置換 し、室温で10分静置する作業を3回繰り返し、PBS-Tで3回洗浄後、3 % BSA/ PBS-Tに置換して室温で30分静置する。抗BrdU抗体 (sc-51514, 1:10)を含む Blockingで使用したBufferで室温で2時間インキュベートする。その後、マウス の二次抗体を含む3 % BSA/PBS-Tで1時間インキュベートする。上記した同 Click chemistryによってF-ara-EdUを蛍光標識し、Prolong goldを用いてカバー ガラスによってサンプルを封入した。

M期細胞においてSmc1を染色する際は、固定前に0.1 % Triton X-100/PBSに置換し、1分間静置することで、Pre-extractionを行った (Fig. 4-5)。また、間期の細胞でSmc1を観察する場合とその他の免疫染色では、Pre-extractionを行わずに固定した (Fig. 2-1b, Fig. 3-4, Fig. 4-2b, Fig. 5-4b, d)。透過処理後、3 % BSA/PBS-T (Blocking buffer)に置換し、室温で30分静置する。各タンパク質を特異的に認識する抗体を含むBlocking bufferで4 °C O/Nでインキュベートする。その後マウス、ラビット、ヒトの二次抗体を含むBlocking bufferで1時間インキュベートする。DNAは、DAPI (0.1 μ g/ml)/PBSで10分間静置することでラベルした。カバーガラスを、Prolong Gold (Life technologies)を用いてスライドガラスに封入した。

Live cell imaging解析

EGFP-H2BとDHB-mKO2を恒常的に発現するHeLa Kyoto細胞をLab-Tek chambered coverslips (Nunc)に蒔き、観察の直前にCO₂₋independent medium without phenol red (Gibco)に置き換え、シリコングリースでChamberを密閉す る。観察は37℃条件下の共焦点レーザー顕微鏡 LSM880 (Carl Zeiss)を用い

て、63×/1.4NA、220×220×36 voxels (voxel size x×y×z: 0.18×0.18×0.9 μm)の 条件で4分間隔で12時間観察した。観察の1時間前に終濃度10 μM ICRF-193の 培地と置換、もしくは72時間前にCAP-D3をターゲットするsi-RNAによって処 理した。染色体の体積は、EGFP-H2Bのシグナルをもとにして定量した (Heriche et al., 2014)。Late S、もしくはG2期の細胞を探す際は、DHB-mKO2 が細胞質に局在していることを指標とした (Spencer et al., 2013)。

Single、Dual labelした染色体の画像取得手法と解析方法

Single labelとDual labelした染色体の画像データは、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710を用いて、63×/1.4NA、320×320×35 voxels (voxel size x×y×z: 0.09×0.09×0.36 µm)の条件で取得した。Gainはすべての条件において700、 Dasital Gainは1、Laser powerの条件は、405 nm: 1.2%、488 nm: 1.2%、561 nm: 4.0 %、633 nm: 4.0%、Beam splitterは、DAPIはMBS-405、Alexa-488、 Alexa-568、Alexa-647に対してはMBS 488/561/633を使用し、Pinholeのサイズ は、DAPI/Alexa-568については46 um、Alexa-488/Alexa-647には52 umとし た。Gaussian filter処理をした三次元画像データは、IMARIS softwareを用いて 透視図で示した。BrdU、EdU、DAPIの各シグナルから染色体の体積を算出す るプログラムは、Matlabによって作成した。

参考文献

- Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., and Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. Genes & development 25, 863-874.
- Archambault, V., and Glover, D.M. (2009). Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. Nature reviews Molecular cell biology 10, 265-275.
- Barr, A.R., and Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. Journal of cell science 120, 2987-2996.
- Barr, F.A., Sillje, H.H., and Nigg, E.A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. Nature reviews Molecular cell biology 5, 429-440.
- Baxter, J., Sen, N., Martinez, V.L., De Carandini, M.E., Schvartzman, J.B., Diffley, J.F., and Aragon, L. (2011). Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. Science 331, 1328-1332.
- Bhat, M.A., Philp, A.V., Glover, D.M., and Bellen, H.J. (1996). Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II. Cell 87, 1103-1114.
- Buschhorn, B.A., and Peters, J.M. (2006). How APC/C orders destruction. Nature cell biology 8, 209-211.
- Charbin, A., Bouchoux, C., and Uhlmann, F. (2014). Condensin aids sister chromatid decatenation by topoisomerase II. Nucleic acids research 42, 340-348.
- Coelho, P.A., Queiroz-Machado, J., and Sunkel, C.E. (2003). Condensindependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. Journal of cell science 116, 4763-4776.

- Cuvier, O., and Hirano, T. (2003). A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. The Journal of cell biology 160, 645-655.
- D'Ambrosio, C., Kelly, G., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2008). Condensin-dependent rDNA decatenation introduces a temporal pattern to chromosome segregation. Current biology : CB 18, 1084-1089.
- D'Amours, D., Stegmeier, F., and Amon, A. (2004). Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. Cell 117, 455-469.
- Farcas, A.M., Uluocak, P., Helmhart, W., and Nasmyth, K. (2011). Cohesin's concatenation of sister DNAs maintains their intertwining. Molecular cell 44, 97-107.
- Gandhi, R., Gillespie, P.J., and Hirano, T. (2006). Human Wapl is a cohesinbinding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. Current biology : CB 16, 2406-2417.
- Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, J.M., and Ellenberg, J. (2006). Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in live cells. Current biology : CB 16, 333-344.
- German, J., Schonberg, S., Louie, E., and Chaganti, R.S. (1977). Bloom's syndrome. IV. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes. Am J Hum Genet 29, 248-255.
- Gimenez-Abian, J.F., Clarke, D.J., Devlin, J., Gimenez-Abian, M.I., De la Torre, C., Johnson, R.T., Mullinger, A.M., and Downes, C.S. (2000).
 Premitotic chromosome individualization in mammalian cells depends on topoisomerase II activity. Chromosoma 109, 235-244.
- Gimenez-Abian, J.F., Clarke, D.J., Mullinger, A.M., Downes, C.S., and Johnson, R.T. (1995). A postprophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes. The Journal of cell biology 131, 7-17.

- Gratzner, H.G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science 218, 474-475.
- Green, L.C., Kalitsis, P., Chang, T.M., Cipetic, M., Kim, J.H., Marshall, O.,
 Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Vagnarelli, P., Samejima, K., et al.
 (2012). Contrasting roles of condensin I and condensin II in mitotic chromosome formation. Journal of cell science 125, 1591-1604.
- Haering, C.H., Farcas, A.M., Arumugam, P., Metson, J., and Nasmyth, K. (2008). The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. Nature 454, 297-301.
- Heriche, J.K., Lees, J.G., Morilla, I., Walter, T., Petrova, B., Roberti, M.J., Hossain, M.J., Adler, P., Fernandez, J.M., Krallinger, M., et al. (2014).
 Integration of biological data by kernels on graph nodes allows prediction of new genes involved in mitotic chromosome condensation. Molecular biology of the cell 25, 2522-2536.
- Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. Nature reviews Molecular cell biology 7, 311-322.
- Hirano, T. (2012). Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. Genes & development 26, 1659-1678.
- Hirano, T., and Mitchison, T.J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. Cell 79, 449-458.
- Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., and Peters, J.M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. Journal of cell science 117, 6435-6445.
- Hudson, D.F., Vagnarelli, P., Gassmann, R., and Earnshaw, W.C. (2003).
 Condensin is required for nonhistone protein assembly and structural integrity of vertebrate mitotic chromosomes.
 Developmental cell 5, 323-336.
- Jeyaprakash, A.A., Klein, U.R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E.A., and Conti, E. (2007). Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex

reveals how chromosomal passengers travel together. Cell 131, 271-285.

- Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., and Hirano, T. (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. Science 282, 487-490.
- Kimura, K., and Hirano, T. (1997). ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. Cell 90, 625-634.
- Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B.H., Lipp, J.J., Schleiffer, A., Mechtler, K., and Peters, J.M. (2006). Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. Cell 127, 955-967.
- Liang, Z., Zickler, D., Prentiss, M., Chang, F.S., Witz, G., Maeshima, K., and Kleckner, N. (2015). Chromosomes Progress to Metaphase in Multiple Discrete Steps via Global Compaction/Expansion Cycles. Cell 161, 1124-1137.
- Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V., and Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. The Journal of cell biology 185, 193-202.
- Maeshima, K., and Laemmli, U.K. (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. Developmental cell 4, 467-480.
- Mole-Bajer, J. (1958). Cine-micrographic analysis of C-mitosis in endosperm. Chromosoma 9, 332-358.
- Mora-Bermudez, F., Gerlich, D., and Ellenberg, J. (2007). Maximal chromosome compaction occurs by axial shortening in anaphase and depends on Aurora kinase. Nature cell biology 9, 822-831.
- Murray, A.W., and Szostak, J.W. (1985). Chromosome segregation in mitosis and meiosis. Annu Rev Cell Biol 1, 289-315.
- Nasmyth, K. (2011). Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? Nature cell biology 13, 1170-1177.
- Neef, A.B., and Luedtke, N.W. (2011). Dynamic metabolic labeling of DNA in vivo with arabinosyl nucleosides. Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America 108, 20404-20409.

- Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. Nature reviews Molecular cell biology 2, 21-32.
- Oliveira, R.A., Coelho, P.A., and Sunkel, C.E. (2005). The condensin I subunit Barren/CAP-H is essential for the structural integrity of centromeric heterochromatin during mitosis. Mol Cell Biol 25, 8971-8984.
- Oliveira, R.A., Hamilton, R.S., Pauli, A., Davis, I., and Nasmyth, K. (2010). Cohesin cleavage and Cdk inhibition trigger formation of daughter nuclei. Nature cell biology 12, 185-192.
- Onn, I., Aono, N., Hirano, M., and Hirano, T. (2007). Reconstitution and subunit geometry of human condensin complexes. EMBO J 26, 1024-1034.
- Ono, T., Fang, Y., Spector, D.L., and Hirano, T. (2004). Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. Molecular biology of the cell 15, 3296-3308.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., and Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. Cell 115, 109-121.
- Ono, T., Yamashita, D., and Hirano, T. (2013). Condensin II initiates sister chromatid resolution during S phase. The Journal of cell biology 200, 429-441.
- Rieder, C.L., and Palazzo, R.E. (1992). Colcemid and the mitotic cycle. Journal of cell science 102 (Pt 3), 387-392.
- Roca, J., Ishida, R., Berger, J.M., Andoh, T., and Wang, J.C. (1994).
 Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp.
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 1781-1785.

- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. Nature reviews Molecular cell biology 8, 798-812.
- Salic, A., and Mitchison, T.J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 2415-2420.
- Schleiffer, A., Kaitna, S., Maurer-Stroh, S., Glotzer, M., Nasmyth, K., and Eisenhaber, F. (2003). Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. Molecular cell 11, 571-575.
- Spencer, S.L., Cappell, S.D., Tsai, F.C., Overton, K.W., Wang, C.L., and Meyer, T. (2013). The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. Cell 155, 369-383.
- St-Pierre, J., Douziech, M., Bazile, F., Pascariu, M., Bonneil, E., Sauve, V., Ratsima, H., and D'Amours, D. (2009). Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity. Molecular cell 34, 416-426.
- Sullivan, M., Higuchi, T., Katis, V.L., and Uhlmann, F. (2004). Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesinindependent cohesion during budding yeast anaphase. Cell 117, 471-482.
- Sumner, A.T. (1991). Scanning electron microscopy of mammalian chromosomes from prophase to telophase. Chromosoma 100, 410-418.
- Sundin, O., and Varshavsky, A. (1980). Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. Cell 21, 103-114.
- Sundin, O., and Varshavsky, A. (1981). Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers: dissection of the final stages of SV40 DNA replication. Cell 25, 659-669.

- Tedeschi, A., Wutz, G., Huet, S., Jaritz, M., Wuensche, A., Schirghuber, E., Davidson, I.F., Tang, W., Cisneros, D.A., Bhaskara, V., et al. (2013).Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation. Nature 501, 564-568.
- Tsutsui, K., Sano, K., Kikuchi, A., and Tokunaga, A. (2001). Involvement of DNA topoisomerase Ilbeta in neuronal differentiation. The Journal of biological chemistry 276, 5769-5778.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. Nature 400, 37-42.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M.A., Koonin, E.V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. Cell 103, 375-386.
- Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J.M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. Cell 103, 399-410.
- Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. Nature reviews Molecular cell biology 3, 430-440.
- Wang, L.H., Mayer, B., Stemmann, O., and Nigg, E.A. (2010). Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division. Journal of cell science 123, 806-813.
- Yeong, F.M., Hombauer, H., Wendt, K.S., Hirota, T., Mudrak, I., Mechtler, K., Loregger, T., Marchler-Bauer, A., Tanaka, K., Peters, J.M., et al. (2003). Identification of a subunit of a novel Kleisin-beta/SMC complex as a potential substrate of protein phosphatase 2A. Current biology : CB 13, 2058-2064.

本研究を進めるにあたり、広田 亨部長には適切かつ丁寧な御指導を続けて頂 き、研究に集中して打ち込める環境を与えて頂きました。また、海外での研究 活動を積極的に後押しして下さいましたことに心から感謝致します。 太田 啓之 教授には、大学からがん研究所に出向して研究を進めるために様々な面でのサ ポートを頂きましたことに深く感謝致します。日頃から気にかけて頂き、有益 な御助言や、時には厳しい御言葉を頂いたお茶の水女子大学の岸本 健雄教授に 感謝致します。ドイツにおける3か月間の短期留学中に、有益なアドバイスと技 術的なサポートを頂き、その後も論文作成まで御尽力頂きましたJan Ellenberg 博士に深く感謝致します。共同研究を開始した時から論文投稿に至るまで、日々 密接なコミュニケーションをとり、論文作成にあたって非常に大きなお力添え 頂いたJulius Hossain博士に深く感謝致します。研究生活のスムーズな進行に尽 カレて頂き、学部生の時から支えて下さった藤谷 千鶴子さんに心から感謝致し ます。学部生から現在に至る研究生活の間に、技術的サポートと有意義な議論 をして頂いた熊田 和貴博士、内田 和彦博士、高垣 謙太郎博士、加藤 詩子博 士、阿部 聡司博士、阿部 優介博士、平山 榕子さん、がん生物部の高橋 暁子博 士に感謝致します。短期留学中の研究生活を様々な面で支えて下さった Nathalie Daigle博士、Sylvia Schattschneiderさん、Julia Roberti博士に感謝致 します。がん研究所で実験を続けるために実務的サポートをして頂いた太田研 究室の細野 晶子さんに感謝致します。研究室の現メンバーの皆様、そして過去 に共に研究生活を過ごさせて頂いた方々には、充実した研究生活を送れた事に お礼申し上げます。

最後に、長い学生生活の間、苦しい時もいつも変わらず支えてくれた両親に心から感 謝致します。