

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)	長坂浩太
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

要旨	4
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 II α	
1-6. 従来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 II α 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 II α 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 II α 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 II α 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 II α 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	53
第八章 材料と方法	57
参考文献	64
謝辞	71

要旨

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 II α 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 IIα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 IIα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 IIα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 II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 IIα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 IIα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 II α 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 II α

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 II α とTopo II β 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 II α が生存に必須である一方で、Topo II β 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 II α 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 II α 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 II α の機能が必要であることから (Wang et al., 2010)、Topo II α 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が

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 II α 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。

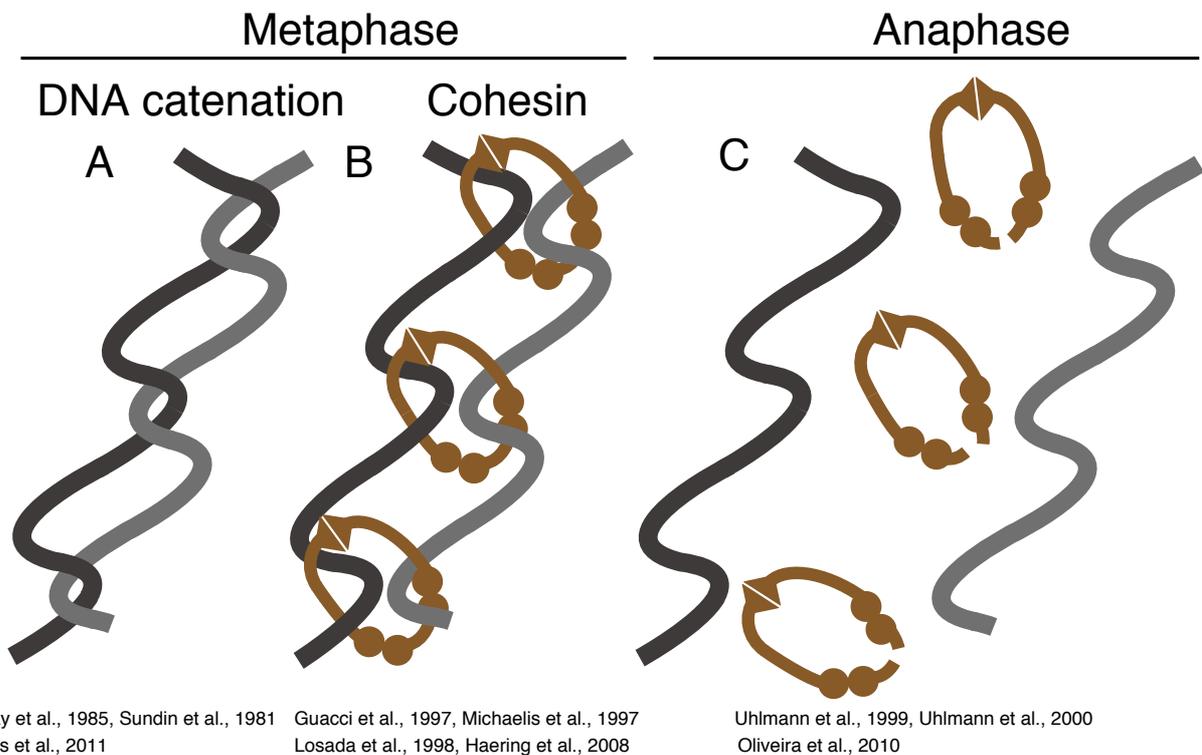


Fig. 1 姉妹染色分体間接着は、CohesinとDNA catenationによって制御されている

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ス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 ($\text{Non-OLs (\%)} = \text{Non-OLs (\mu\text{m}^3)} / \text{Total chromosome volume (\mu\text{m}^3)}$)。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)。

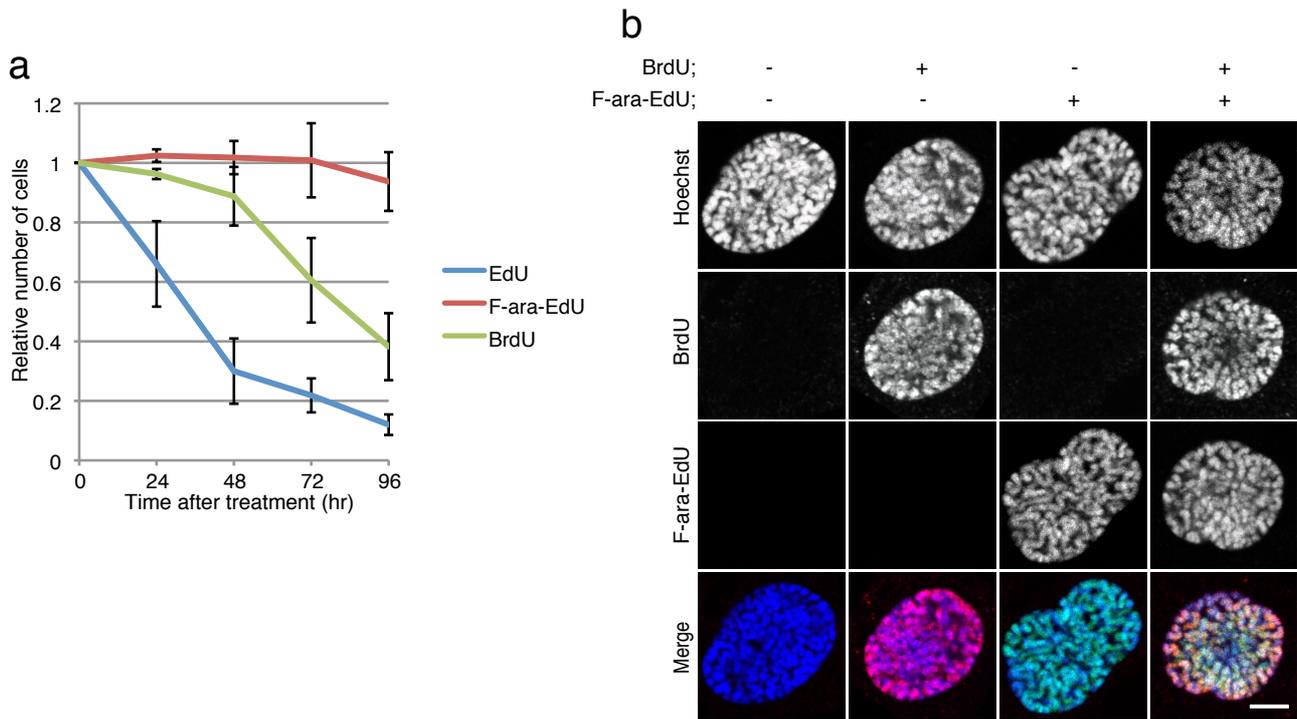


Fig. 2-1 F-ara-EdUとBrdUの毒性と、蛍光ラベルの特異性の検討

a, RPE1細胞を、DMEM (コントロール)、EdU (10 μ M)、F-ara-EdU (10 μ M)、BrdU (6 μ M)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 \pm [SD])。 **b**, RPE1細胞を、DMEM (コントロール)、F-ara-EdU (10 μ M)、BrdU (6 μ M)、F-ara-EdU/BrdUを含有する培地で18時間培養し、固定の後にF-ara-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 μ m)。

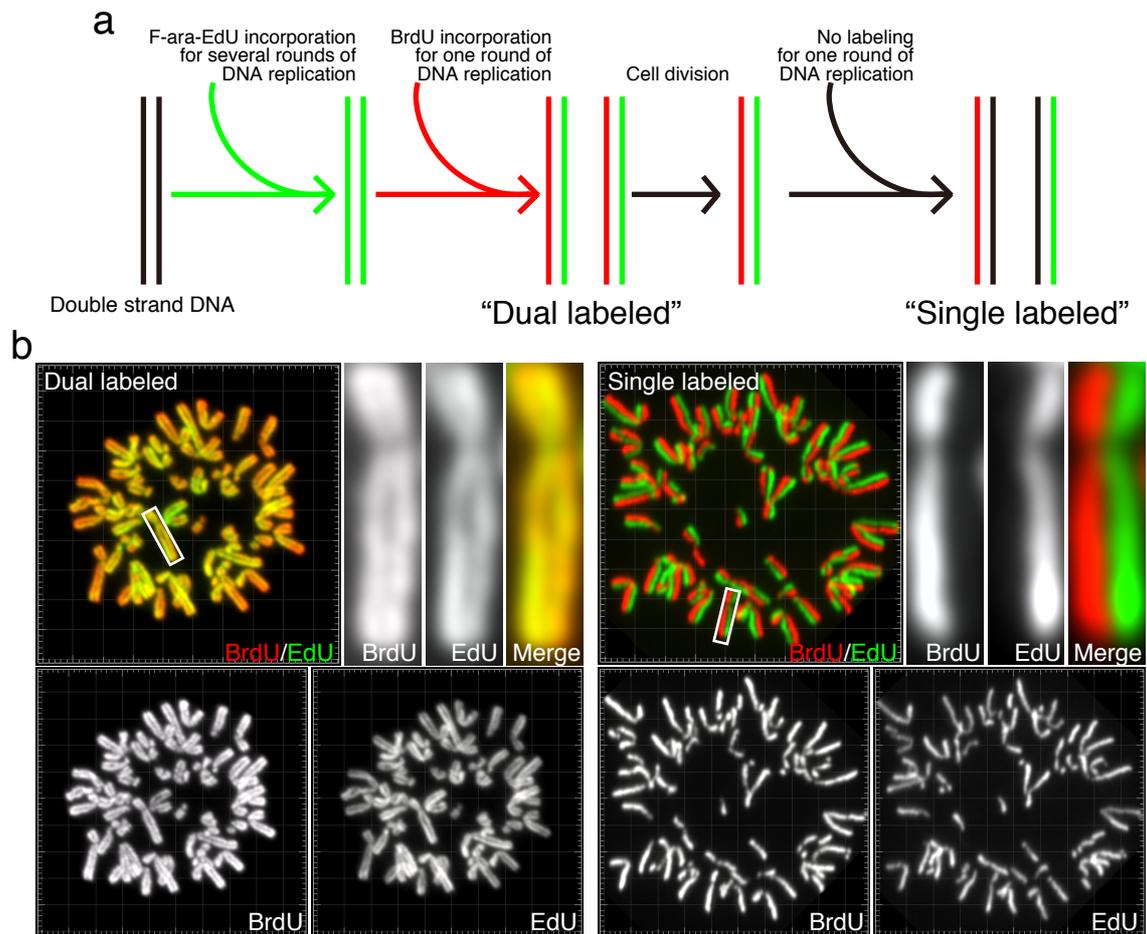


Fig. 2-2 姉妹染色分体を染め分ける方法論

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)。

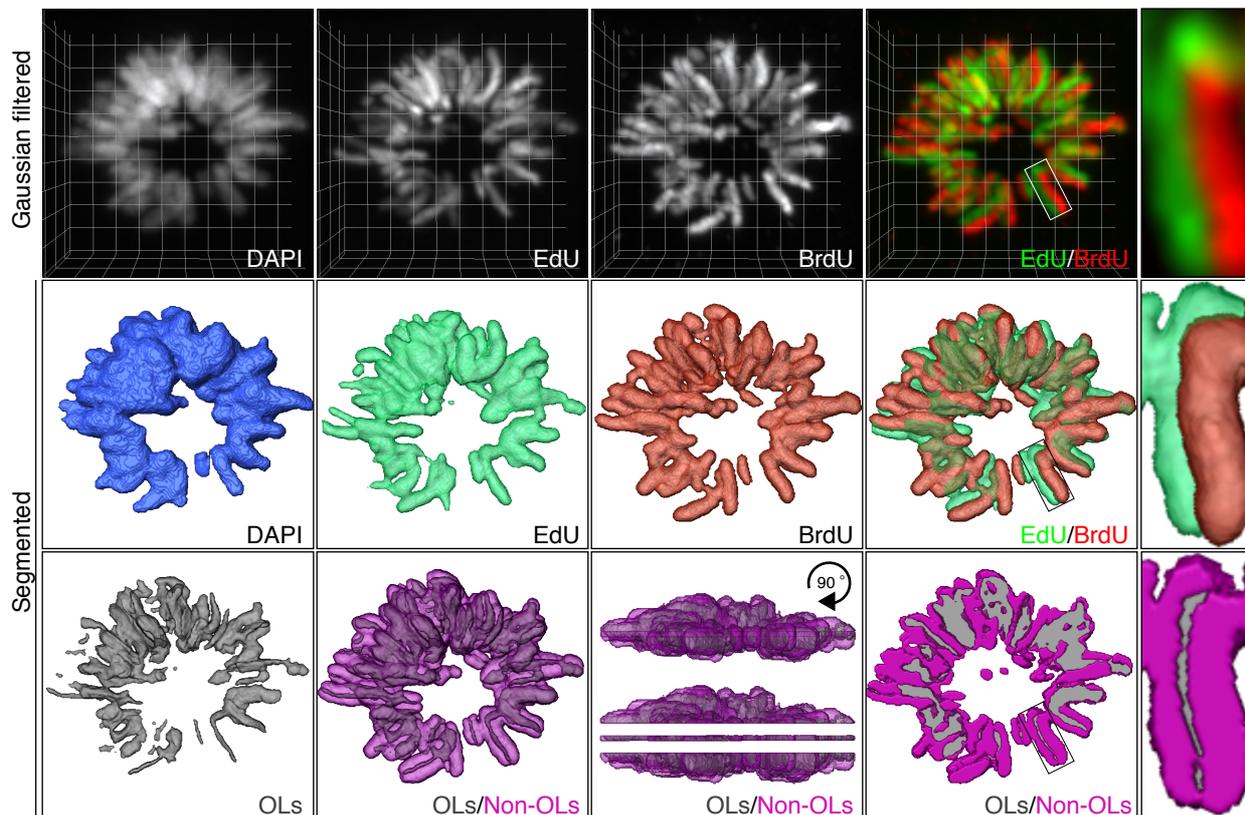


Fig. 2-3 分離した姉妹染色分体を抽出する方法論

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。

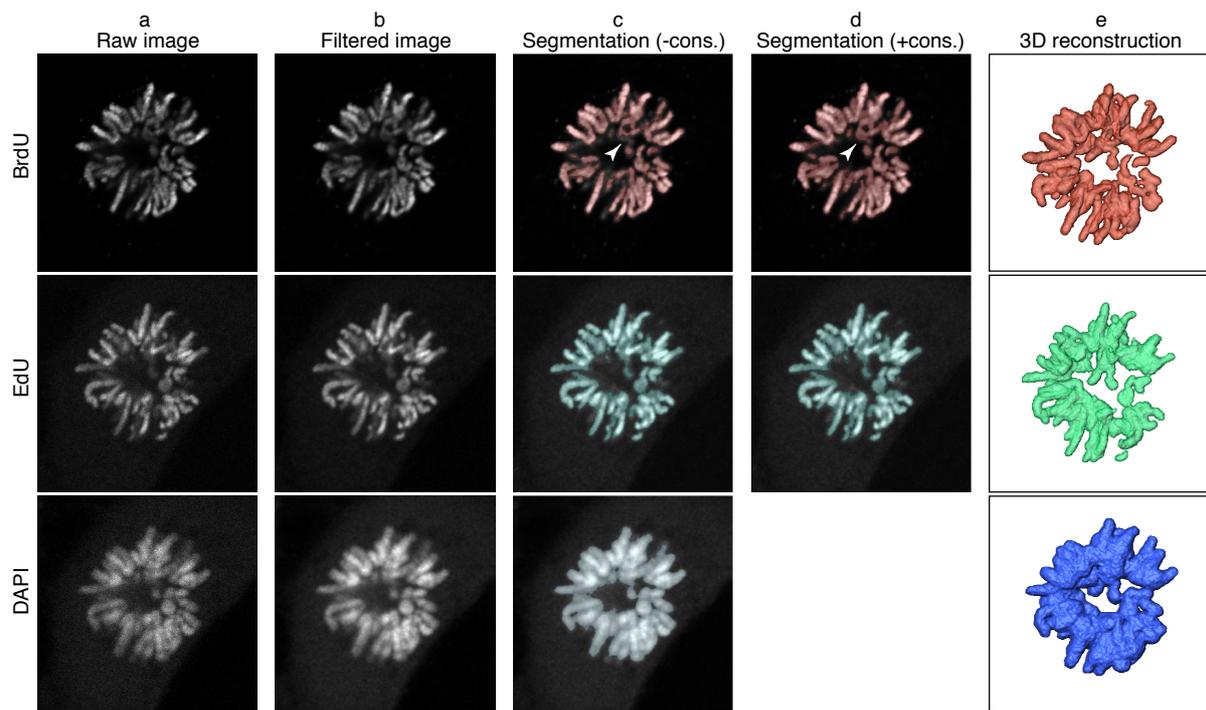


Fig. 2-4 閾値補正による画像解析のプロセス

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を用いた閾値の補正を行うことによって(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をロックダウンの実験によって検討した。またSgo1のロ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, Early 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 ($18.4 \pm 4.2\%$)と比較してEarly prophase ($30.6 \pm 5.8\%$)からすでにその値が上昇しており、その後Late prophase ($46 \pm 5.3\%$)、Prometaphase ($50.7 \pm 7.4\%$)、Metaphase ($56.4 \pm 6.1\%$)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、Single、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

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。

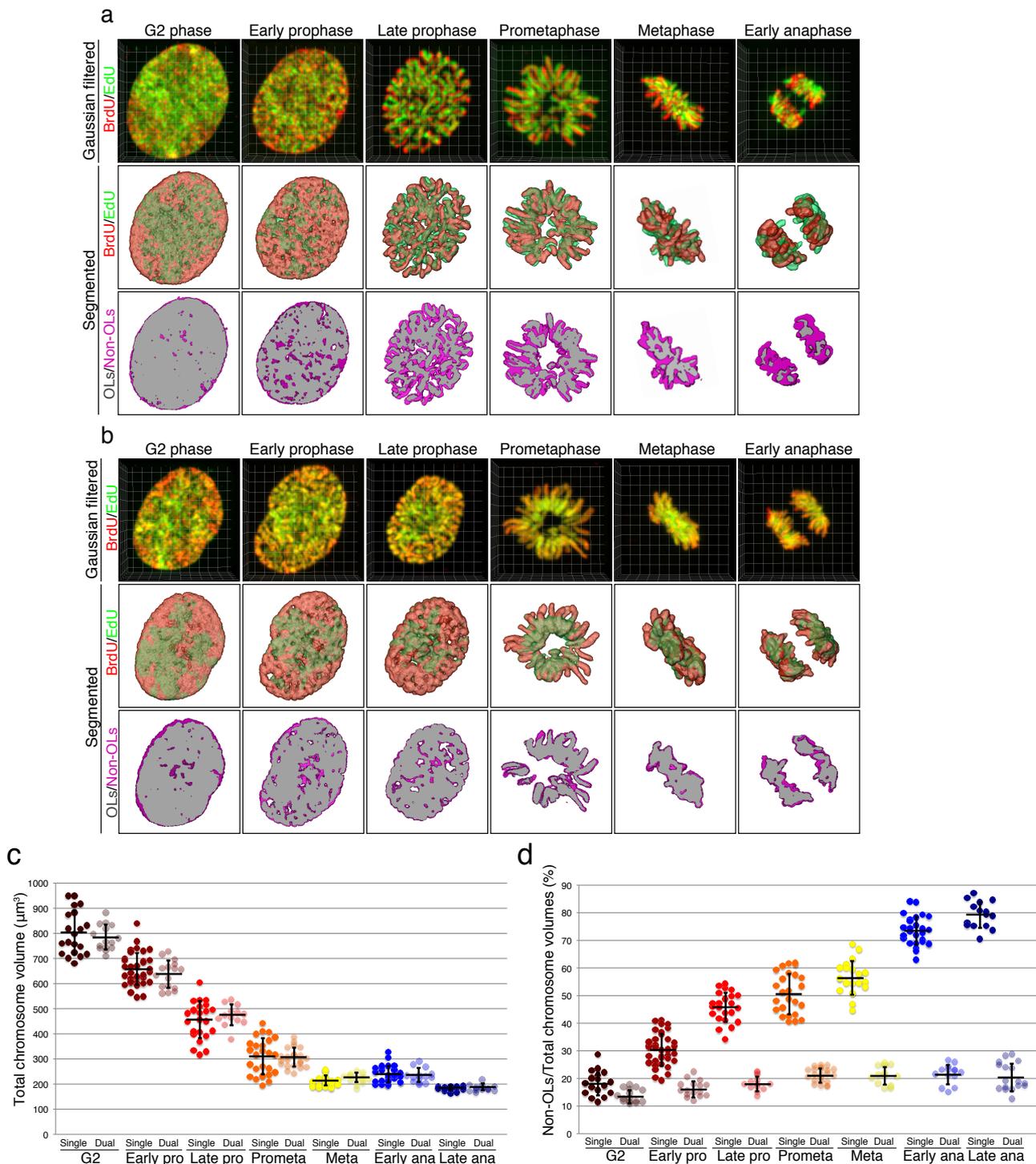


Fig. 3-1 姉妹染色分体の分離は、Prophaseの初期から進行する

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 \pm [SD])。一つ一つの点が一細胞から得たデータを示している。

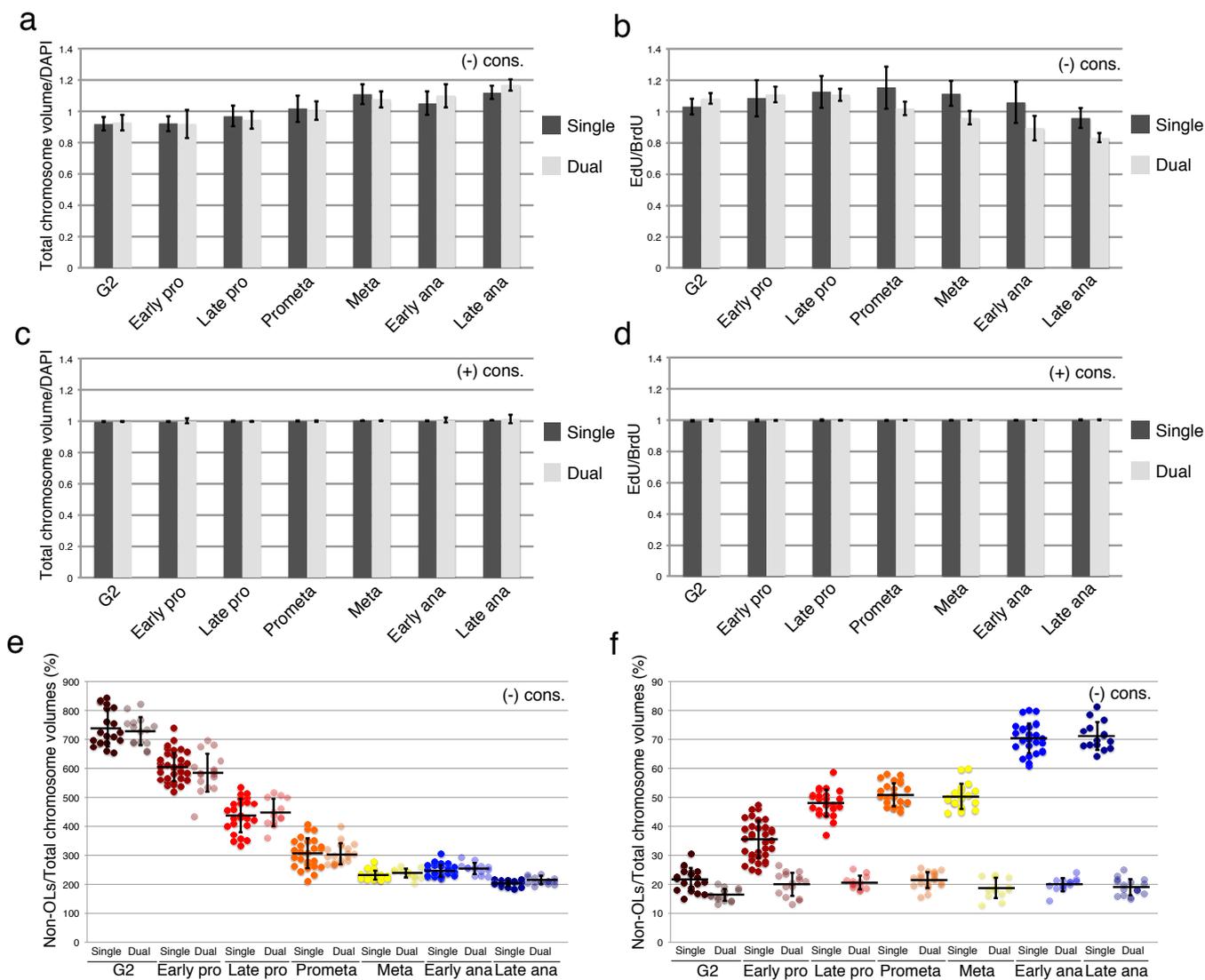


Fig. 3-2 閾値補正によって得られる定量結果の比較検討

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の体積との体積の比 (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])。

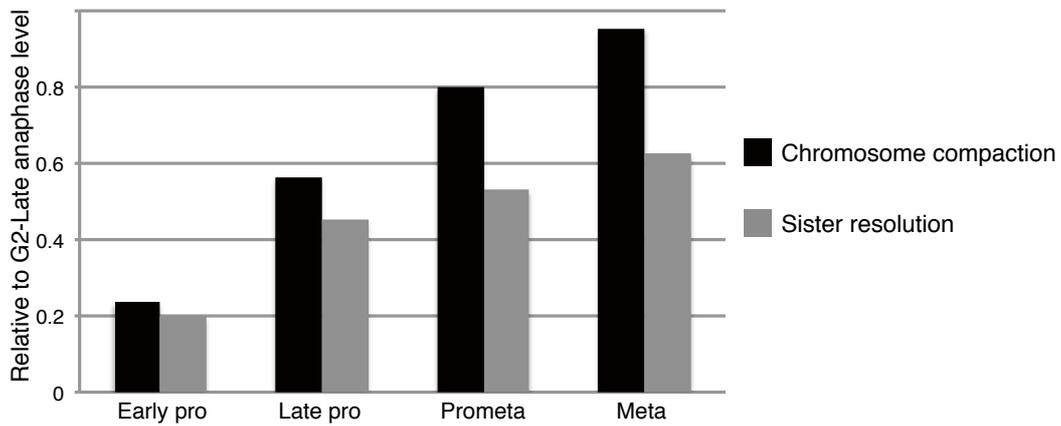


Fig. 3-3 染色体の凝縮と姉妹染色分体の分離は、Prophaseにおいて相関して進行する

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。

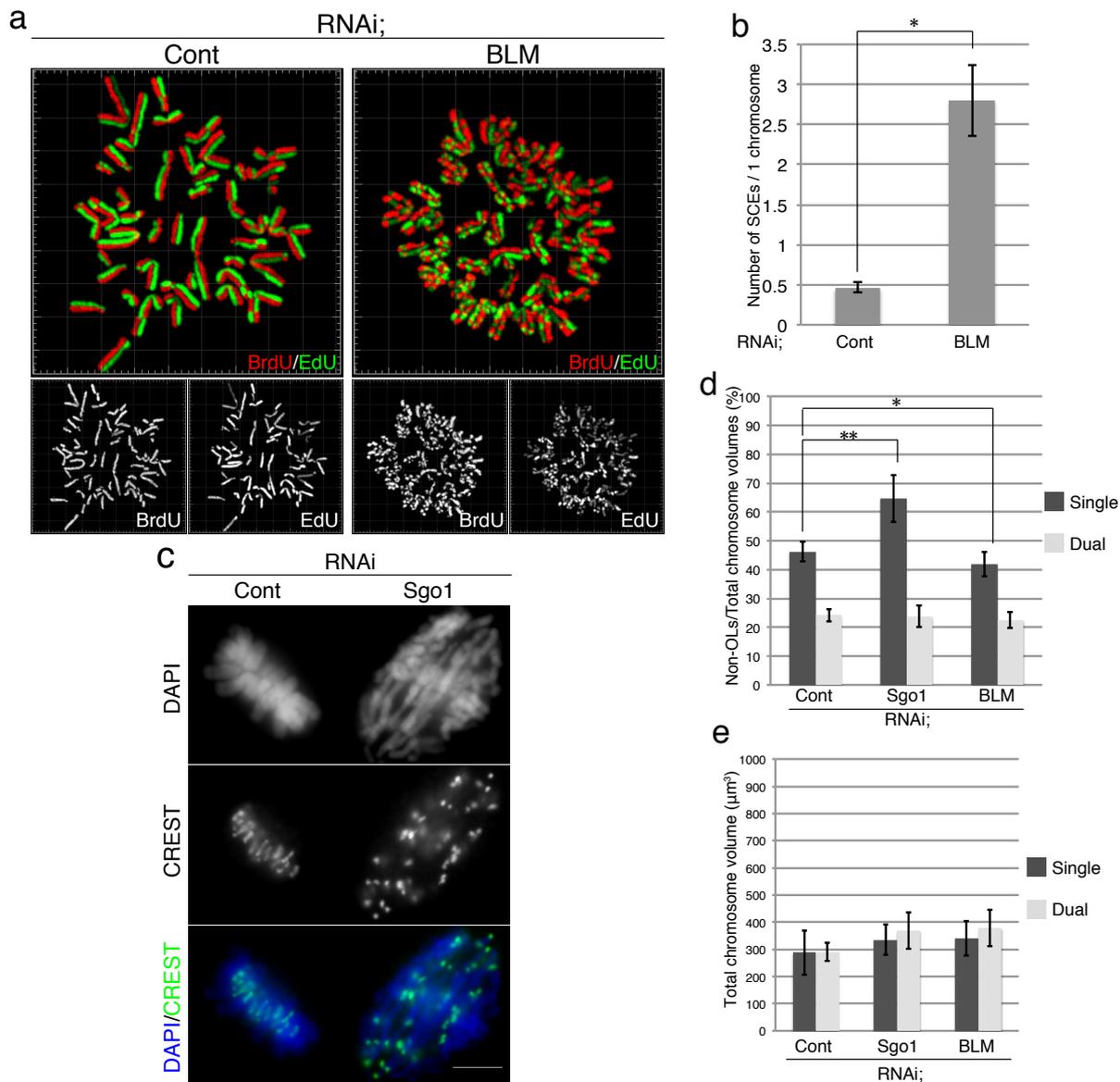


Fig. 3-4 姉妹染色分体交換(SCE)は、姉妹染色分体の分離解析に大きな影響を与えない

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, two-tailed student's t-test)。

第四章 WaplとTopo II α 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カタ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 II α 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 Δ Wapl)によって、Prophase (Cont; 41.4 \pm 6.6 %、 Δ Wapl; 34.8 \pm 4.4 %)、Prometaphase (Cont; 52.1 \pm 5.5 %、 Δ Wapl; 41.4 \pm 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 II α 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 II α をノックダウンした条件(Δ Topo II α)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 II α 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 II α 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 \pm 3.0 %、 Δ Topo II α -#1; 37.1 \pm 3.1 %、 Δ Topo II α -#2; 34.5 \pm 6.1 %)、Prometaphase (Cont; 47.0 \pm 2.9 %、 Δ Topo II α -#1; 38.3 \pm 4.3 %、 Δ Topo II α -#2; 37.5 \pm 2.3 %)における分離が、コントロールと比較して、Topo II α 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 II α 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 II α 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 II α 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 II α 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 II α の機能を阻害した時に比べて、Prophase (Cont; 46.6 \pm 5.8 %、ICRF-193; 22.8 \pm 1.7 %)、Prometaphase (Cont; 49.5 \pm 5.6 %、ICRF-193; 22.5 \pm 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 II α 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 II α 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 II α 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 II α の機能は、Cohesinの解離に必要ではない

Topo II α 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 II α 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 II α 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 II α 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。

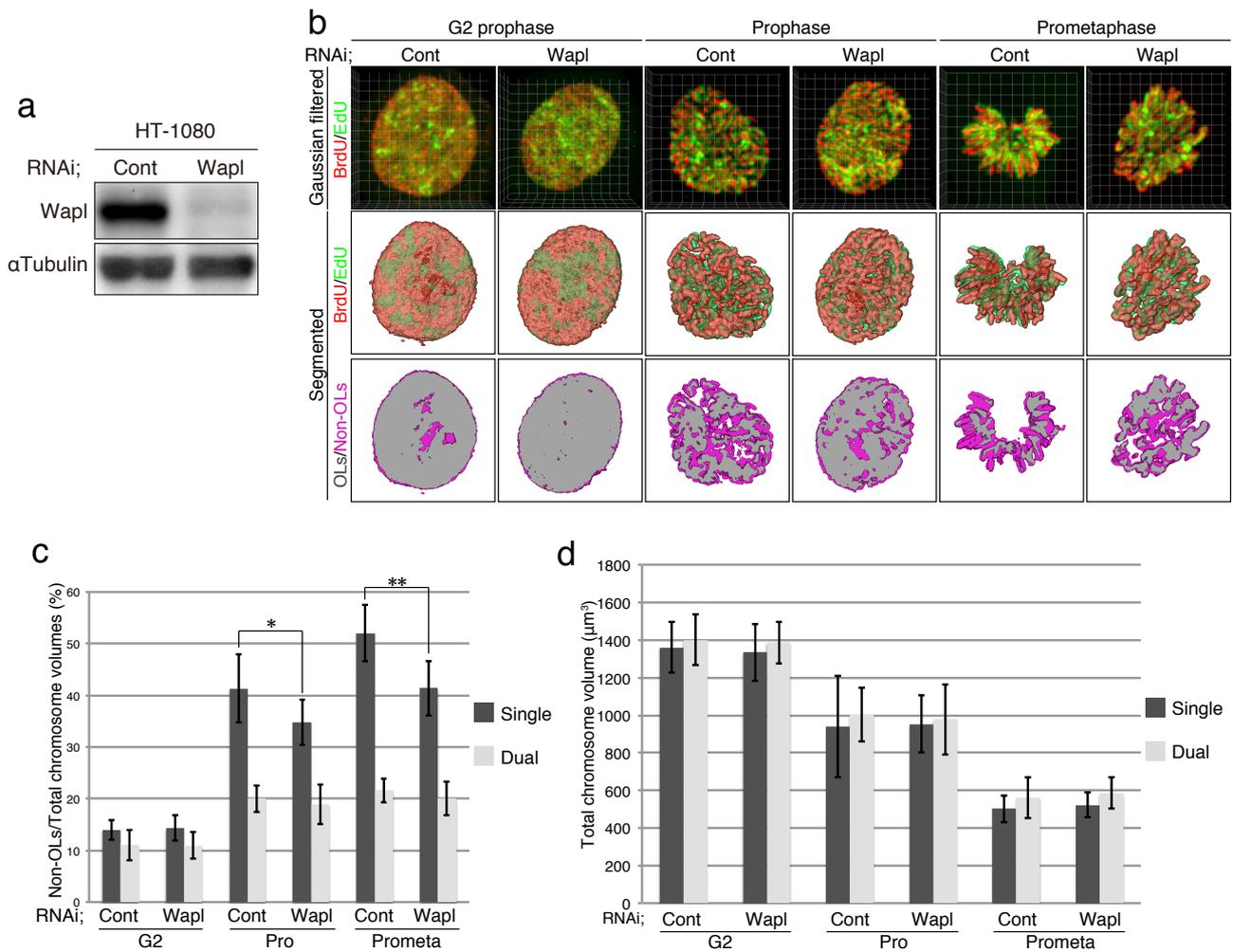


Fig. 4-1 Waplは、Prophase、Prometaphaseにおける姉妹染色分体の分離に必要である

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 α Tubulin 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 \geq 11 cells, mean \pm [SD]; *P < 0.01, **P < 0.001, two-tailed student's t-test)。

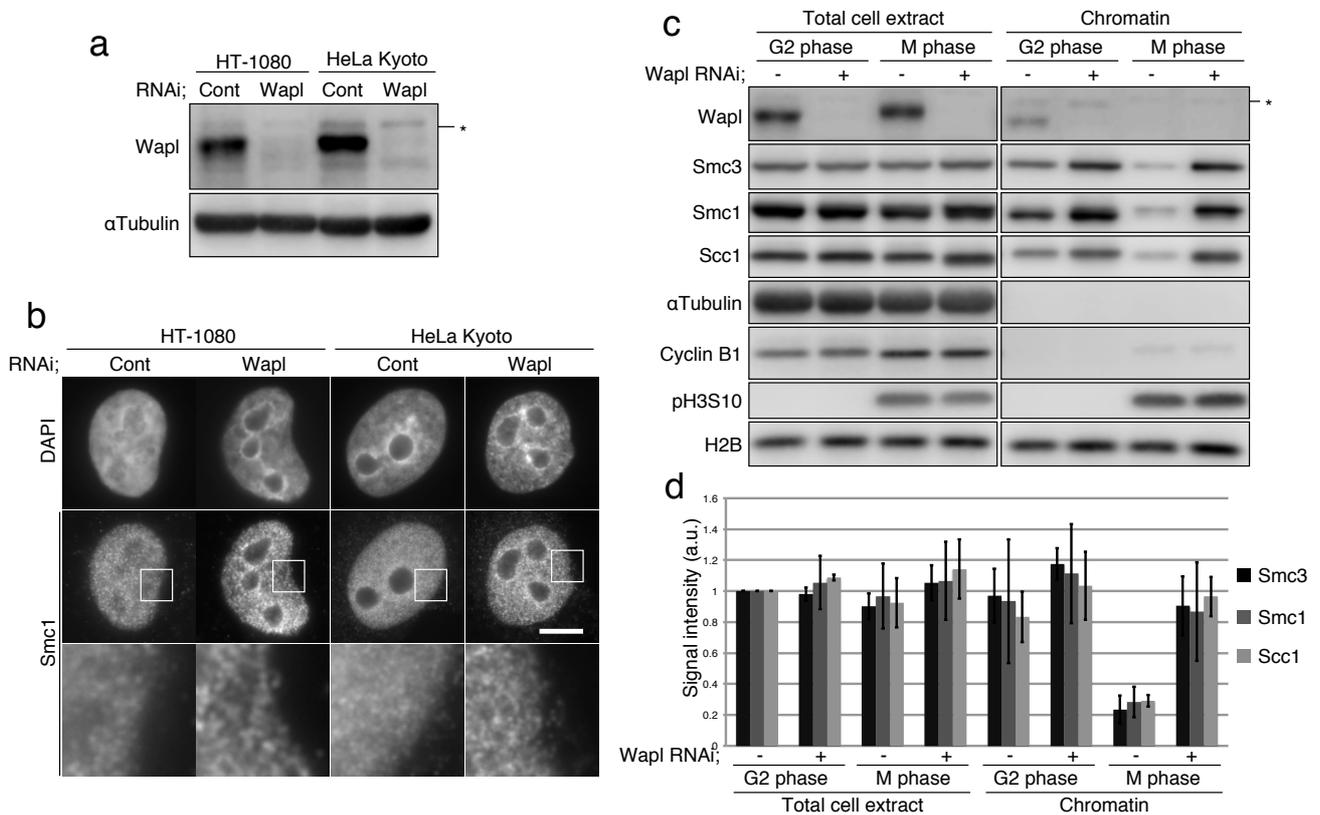


Fig. 4-2 Waplのノックダウンによって、大部分のCohesinの解離が抑制される

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 αTubulin 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、αTubulin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)。

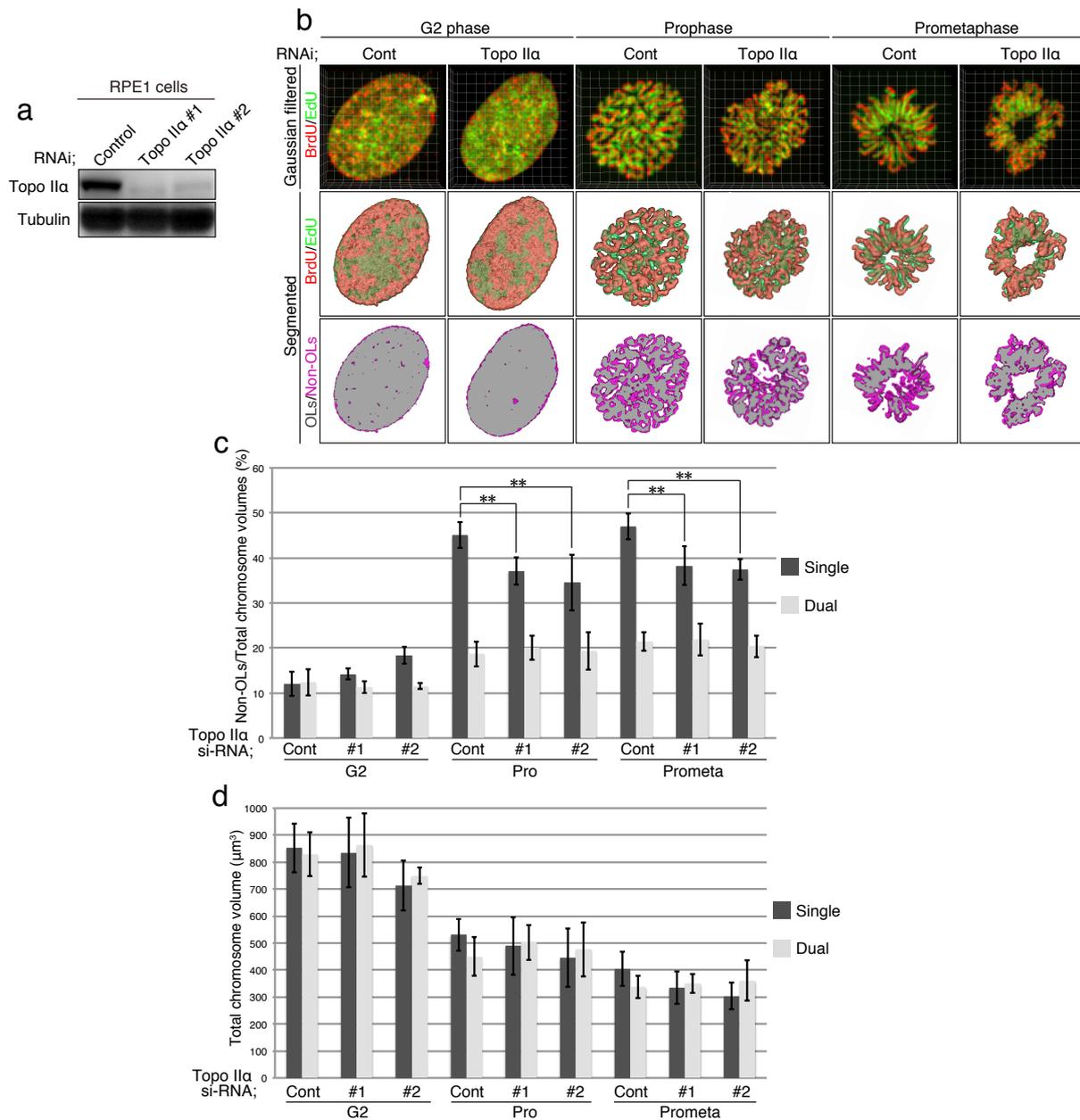


Fig. 4-3 Topo IIaは、姉妹染色分体の分離に必要である

a, Topo IIaをターゲットする2種類のsi-RNAを用いてTopo IIaをノックダウンし、その細胞抽出液を抗 Topo IIa 抗体と抗 α Tubulin 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 label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 labelした染色体から得たデータも同様に示す ($n \geq 8$ cells, mean \pm [SD], $**P < 0.001$, two-tailed student's t-test)。

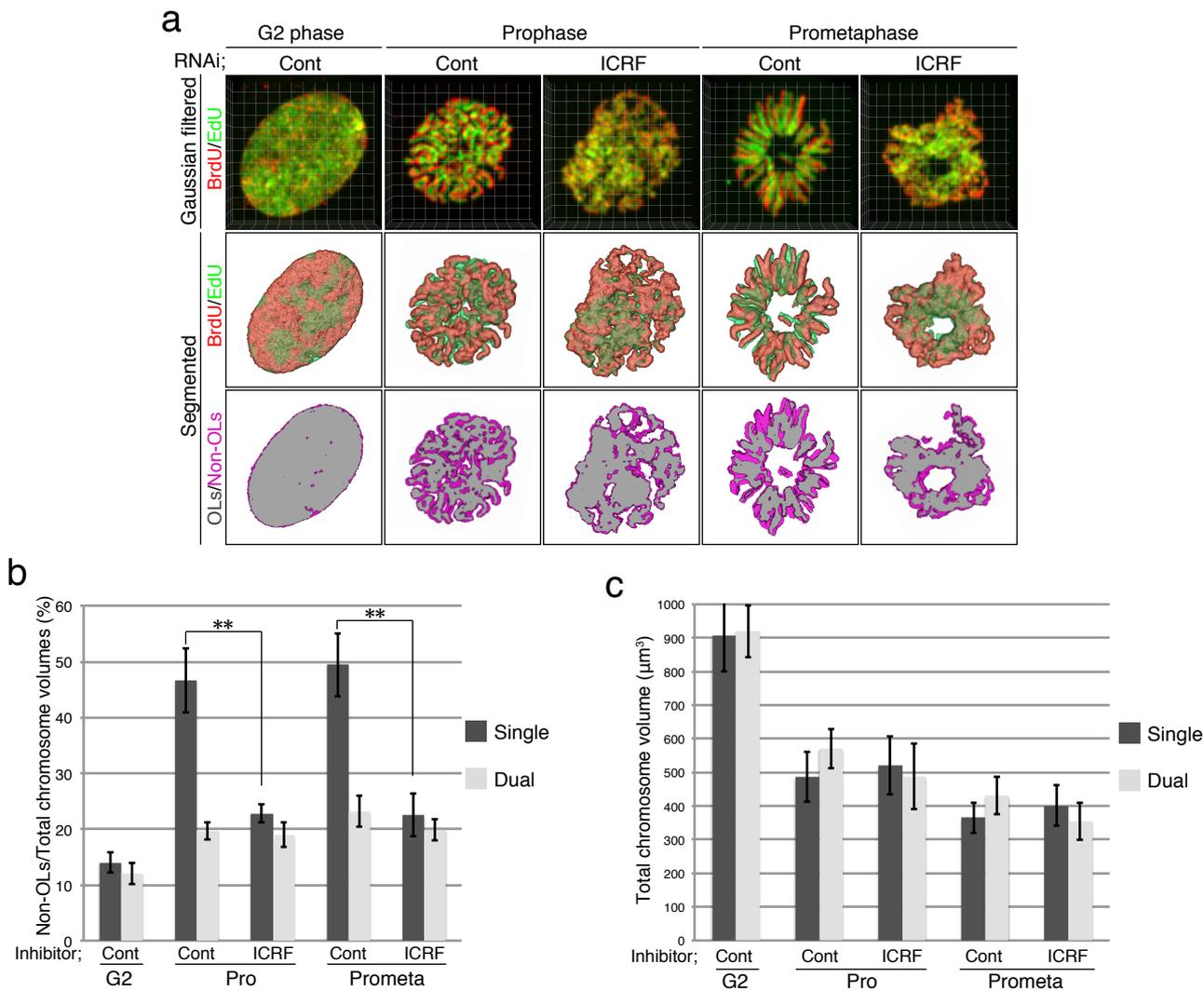


Fig. 4-4 Topo IIαの機能は、姉妹染色分体の分離に必須である

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)。

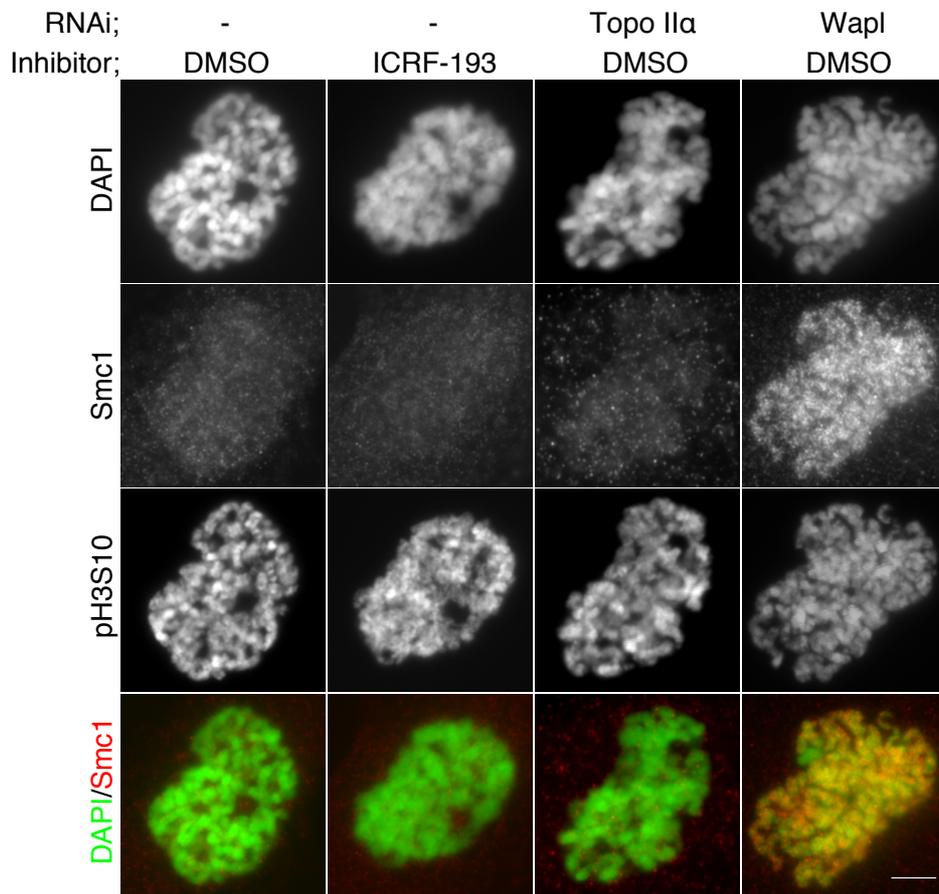


Fig. 4-5 Topo II α の機能は、M期におけるCohesinの解離に必要なではない
Control (DMSO)、ICRF-193で処理、Topo II α とWaplをそれぞれRNAi法によってノックダウンした細胞をPre-extraction後に固定し、抗 Smc1 抗体と、抗 pH3S10 抗体を用いて免疫染色を行った。DNAはDAPIを用いて染色した。それぞれの条件下でのProphaseの細胞の典型例を示す (Scale bar, 5 μ m)。

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 II α 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、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 II α 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 II α 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 II α 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 imagingを用いてTopo II α 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 II α 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 II α 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 II α はCondensin IIによって制御されるProphaseの染

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 II α 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。

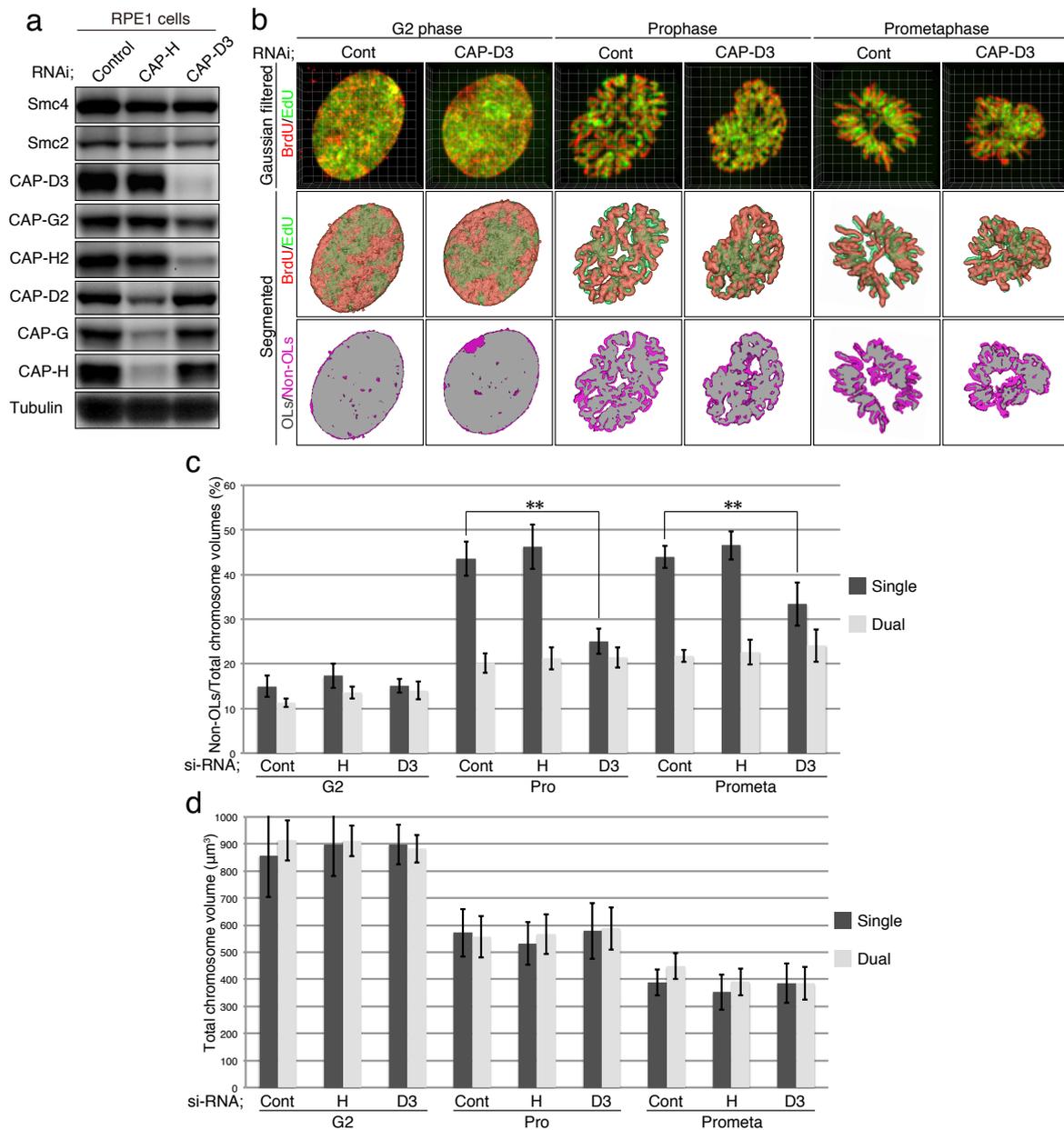


Fig. 5-1 Condensin IIは、Prophase、Prometaphaseにおける姉妹染色分体の分離に必要である

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 α Tubulin 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 ($n \geq 13$ cells, mean \pm [SD], ** $P < 0.001$, two-tailed student's t-test)。

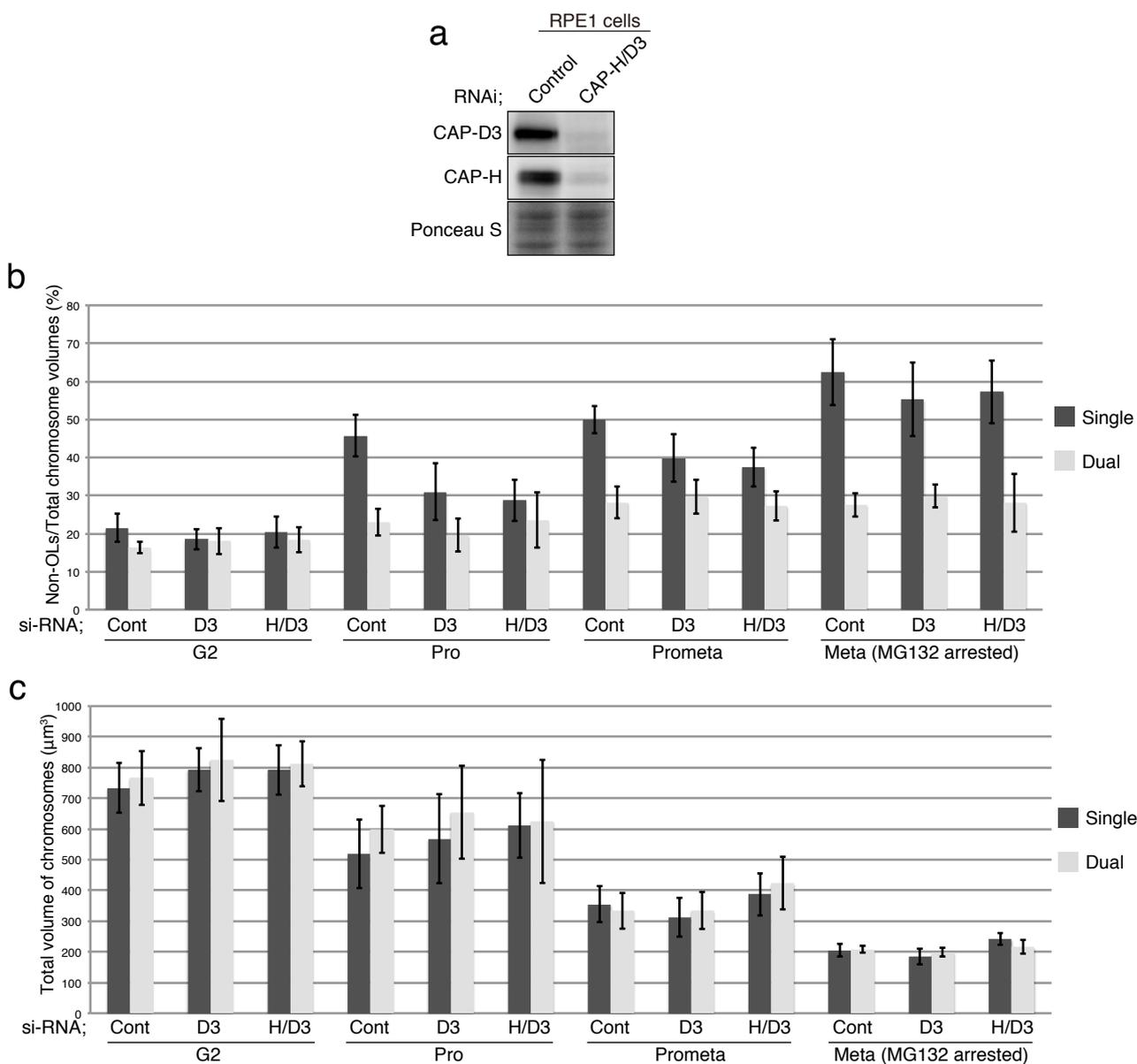


Fig. 5-2 Condensin II阻害による分離異常は、Condensin Iの機能によってでは補完されない

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 ($n \geq 8$ cells, mean \pm [SD])。

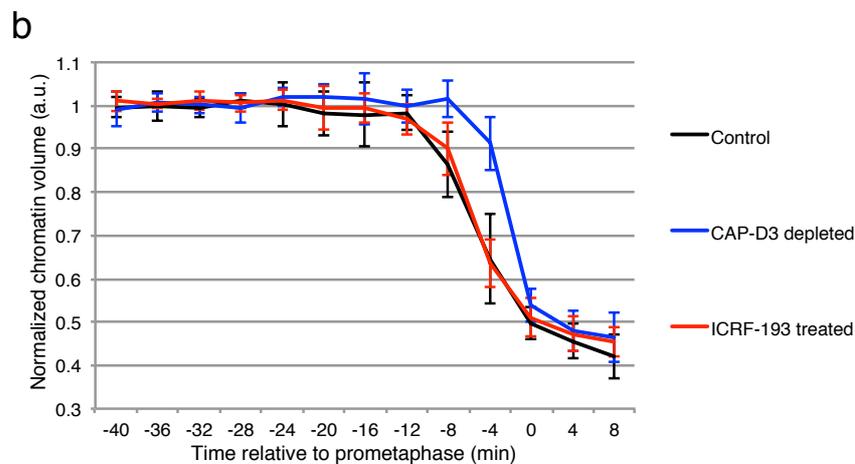
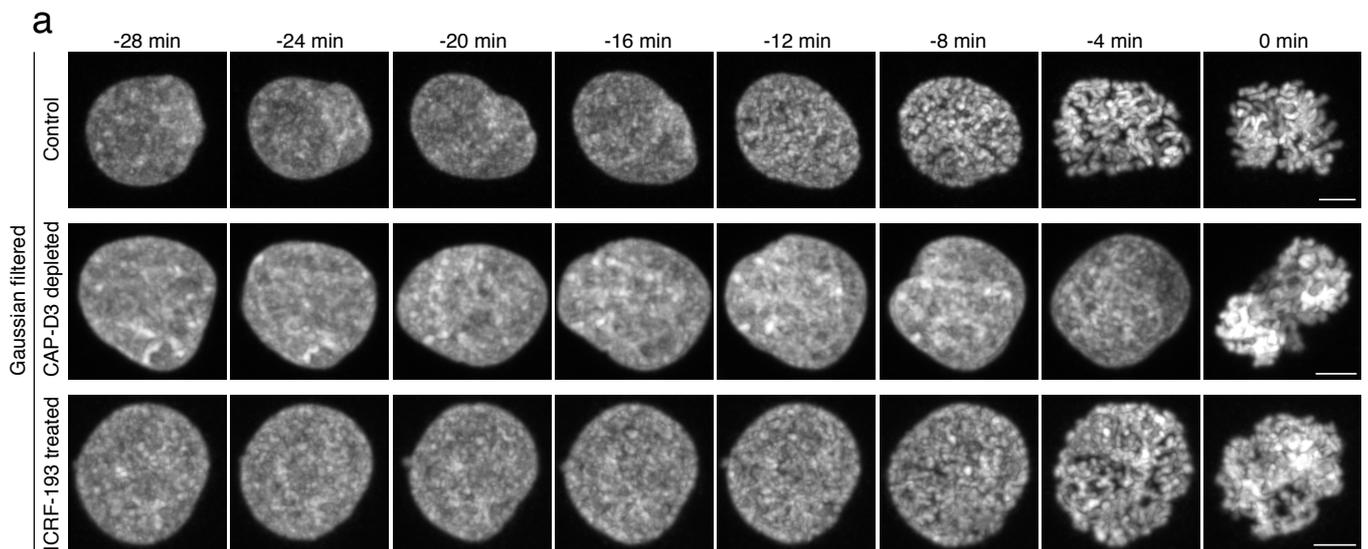


Fig. 5-3 Topo II α の機能は、Condensin IIによるProphaseの染色体凝縮には必要ない

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 μ m)。 **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 \pm [SD]), n = 8 (Control), n = 11 (CAP-D3 depleted), n = 12 (ICRF-193 treated))。

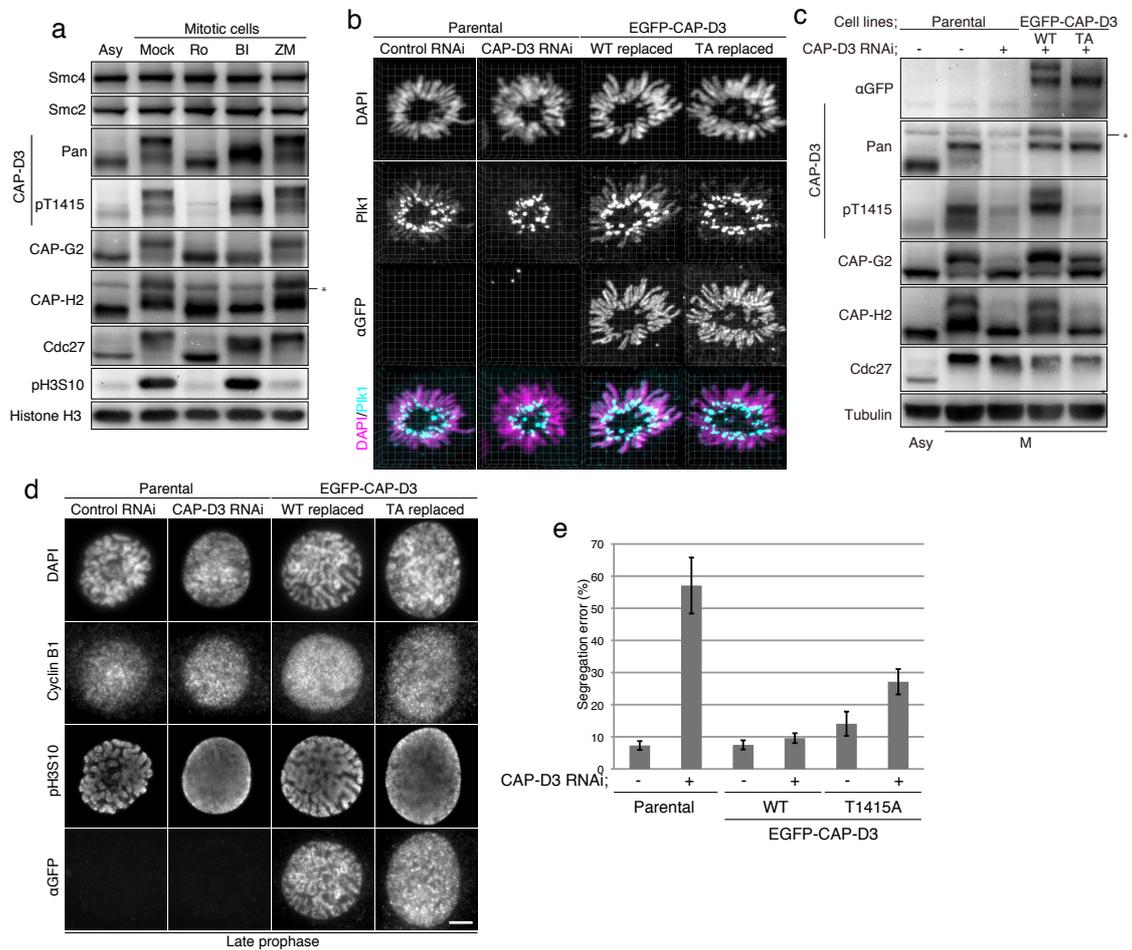


Fig. 5-4 CAP-D3 pT1415は、M期におけるCondensin IIの機能に必要である
a, 非同調のRPE1細胞と、以下のように同調したM期細胞回収した ("Mock"; 20 μ M STLC添加12時間後、"Ro"; 20 μ M STLC添加12時間後に8 μ M Ro-3306 (Cdk1 inhibitor)を添加してさらにその30分後、"BI"; 100 nM BI-2536 (Pik1 inhibitor) 添加後12時間後、"ZM"; 20 μ M STLC添加12時間後に、10 μ M MG132を添加して30分、さらに2 μ M ZM447439 (Aurora 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 Pik1抗体、抗 GFP抗体を用いて免疫染色を行った (Grid size, 2 μ m)。**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を用いてWestern blottingを行った。M期細胞は20 μ M 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 μ m)。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 \pm [SD]), 各条件で200以上の細胞を解析した)。

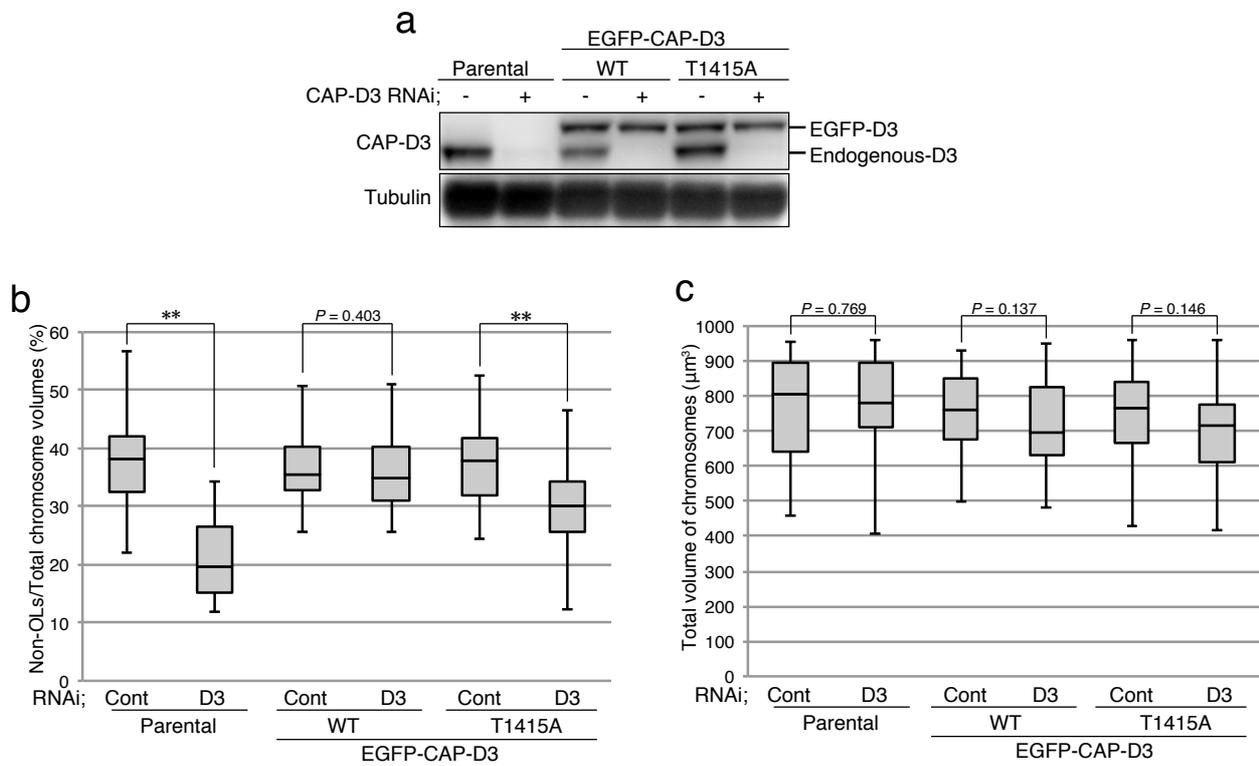


Fig. 5-5 CAP-D3 T1415Aのリン酸化は、Prophaseにおける姉妹染色分体の分離に必要である

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 α Tubulin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、Single 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 \geq 50 cells, **P < 0.001, two-tailed student's t-test)。

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 IIα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 of 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つ

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Waplの阻害によって引き起こされる分離異常は、Topo II α 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、Wapl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、Wapl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、Wapl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 II α 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 II α 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 II α 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るか？このような疑問に対する最も有力な説は、Topo II α 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)。この現象を説明す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 II α 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 II α 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 II α 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 II α 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をロックダウンした条件下におけるSingle 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きことにより、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る、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られる。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 II α を阻害した時や (Fig. 4-3, 4)、CAP-D3をロ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―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 II α 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 µg/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の発現細胞は、pLenti easyベクターを用いて作成したウイルスを、上記した方法でHeLa細胞に感染させた。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、pH3S10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 II α 、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 II α (#1), 5'-UAACAAUCGAGCCAAAGAGCUGAGC-3'
Topo II α (#2), 5'-UGAAAGCGACUAAACAGGCAGGACC-3'
Wapl, 5'-ACACGAAUGAUACUGAUGAAUGUUC-3'
BLM, 5'-ACAGGGAAUUCUAUGAAGGAGUAAA-3'
Sgo1, 5'-CCCAAUAGUGAUGACAGCUCCAGAA-3'

Western blotting

細胞抽出液は、RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 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; Millipore)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°C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, “CRTNVDLKNQTPSE” - “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10 μM 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。Single 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 -glucose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 MgSO_4 /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 MgSO_4 /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 µg/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°C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、Digital 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 μm、Alexa-488/Alexa-647には52 μm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., Schwartzman, 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). Condensin-dependent 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 cohesin-binding 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 5-iododeoxyuridine: 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 cohesin-independent 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 IIbeta 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.

謝辞

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。研究生生活のスムーズな進行に尽力して頂き、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生活を過ごさせて頂いた方々には、充実した研究生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。