

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640086

研究課題名(和文) 姉妹染色分体間コヒージョン制御の顕微鏡的解析手法の開発

研究課題名(英文) Quantitative microscopic analysis of sister chromatid cohesion in mitosis

研究代表者

広田 亨(Hirota, Toru)

公益財団法人がん研究会・がん研究所・実験病理部・部長

研究者番号：50421368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は、分裂するたびにDNAを複製しM期で「姉妹染色分体」と呼ぶ染色体のペアを形成しそれを一対ずつ分配する。本研究では、姉妹染色分体を別々の色に標識して、M期における姉妹染色分体の分離過程を解析した。姉妹染色分体の解離は、分裂期の早くに始まり、染色体の凝縮と相俟って進行することが判明した。姉妹染色分体の「解離」と染色体の「凝縮」という一見相異なる営みが、実は共通の因子のはたらきによって進むことが分かり「分けながら凝縮していく」という染色体をつくる仕組みが見えた。

研究成果の概要(英文)：The formation of mitotic chromosomes requires both compaction of chromatin and the resolution of replicated sister chromatids. Compaction occurs during prophase, depending on the activity of condensin II. Exactly when sister chromatid resolution occurs has been largely unknown, as has its molecular requirements. In this study, we visualized sister resolution by sequential replication labelling with two distinct nucleotide derivatives. Quantitative analyses allowed us to find that sister resolution starts already at the beginning of prophase, proceeds concomitantly with chromatin compaction and is largely completed by the end of prophase. Sister resolution was abolished by inhibition of topoisomerase II and by inactivation of condensin II, whereas blocking cohesin dissociation from chromosomes had little effect. Sister resolution is thus an intrinsic part of mitotic chromosome formation in prophase, and shares the molecular requirement for condensin II with prophase compaction.

研究分野：細胞生物学、染色体動態学

キーワード：細胞分裂 染色体分配 姉妹染色分体 コヒージョン カテネーション コヒーシン コンデンシン  
トポイソメラーゼ II

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞が分裂するときには、ゲノムを担うクロマチンは大きな構造変換を遂げて、染色体を構築し、その姉妹染色分体は二等分される。しかし細胞にとって、染色体構築から分配までの一連の過程を、M期という限られた時間内に滞りなく進めることは必ずしも容易ではなく、M期はゲノム安定性を損なう可能性のある危険な時期であることが、近年の研究により分かってきた。実際に、多くのがん細胞は、M期での染色体構築・分配過程を高い頻度で失敗する。

(2) M期での染色体構築・分配異常の成因は二つに大別される。

第一に、M期における染色体動態制御の異常である (Thompson et al. 2010)。我々は先行研究で中期から後期への移行期において、姉妹染色分体結合 (=コヒージョン) の解除が完了していない状態で、紡錘体極への引き寄せ運動が起こると、多数のDNAブリッジが出現することを指摘した (進藤ら 2012)。

第二に、M期の異常ではなく、複製した姉妹DNA鎖間に解 (ほど) けていない構造 (=未解構造) が解消されずに残存するという異常がある。この場合も染色体分配の失敗を招きゲノム不安定性に至ることが指摘されている (図; Reviewed in Mankouri et al. 2013)。

第二に、M期の異常ではなく、複製した姉妹DNA鎖間に解 (ほど) けていない構造 (=未解構造) が解消されずに残存するという異常がある。この場合も染色体分配の失敗を招きゲノム不安定性に至ることが指摘されている (図; Reviewed in Mankouri et al. 2013)。

(3) これらのことから、細胞が安定してゲノムを維持するためには、M期後期の開始までに姉妹染色分体間の結合をあまねく解消することが求められ、それを実現している細胞機能を解明することは必須課題であると考えられた。しかしながら、姉妹染色分体の結合を検出・測定する実験系を欠いているために、姉妹染色分体が分離していく過程の研究は大きく立ち後れていた。

<引用文献>

Thompson SL, Bakhoun SF, Compton DA. (2010) Mechanisms of chromosomal instability.

Review. *Curr Biol*. 20: R285-295.

Shindo N, Kumada K, Hirota T. (2012) Separase sensor reveals dual roles for separase coordinating cohesin cleavage and cdk1 inhibition. *Dev Cell*. 23: 112-123.

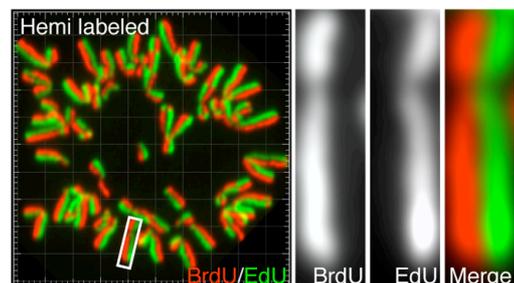
Mankouri HW, Huttner D, Hickson ID. (2013) How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond. *Review. EMBO J*. 32: 2661-2671.

2. 研究の目的

本研究では、姉妹染色分体の結合を検出・測定する実験系を構築することを目的とした。即ち、光学蛍光顕微鏡解析に基づいた検出法を作り出し、免疫細胞染色と組み合わせた解析方法を構築することである。この実験系を用いて、細胞分裂と相俟って進行する姉妹染色分体の分離過程を定量的に測定し、そのデータをもとに、姉妹染色分体間の結合解消に関わる分子群を明らかにすることを試みた。

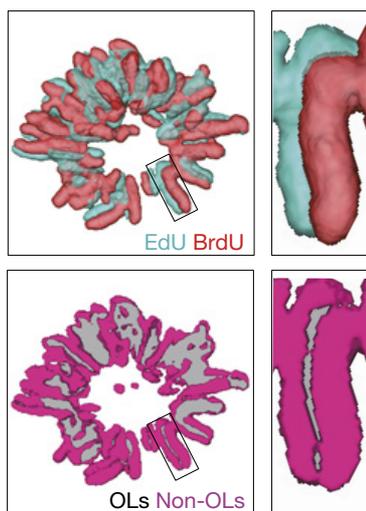
3. 研究の方法

(1) 2種類の deoxyuridine 誘導体により姉妹染色分体を別々に蛍光標識する。姉妹染色分体をそれぞれ高い S/N 比で描出するために、一種類で姉妹染色分体を分染する従来法をもとにして、二種類の deoxyuridine 誘導体を用いる (EdU と BrdU を DNA 複製の際に順次取り込ませ DNA 複製の際に順次取り込ませるといふ) 方法を確立する。具体的には、EdU の添加培地にて複製を数回経ることにより両アリルともに標識する (“Dual labeled”)。次に、BrdU の存在下で複製を一回進め、ワトソン鎖とクリック鎖が EdU と BrdU で標識した状況をつくる。そして次の



複製をいずれも含まない培地で行うことにより、別々の誘導体を取り込んだ姉妹染色分体を作る (“Single-labeled”)。こうして調整した細胞を固定し、BrdU を特異抗体により、EdU は特異的結合蛍光体 (Click-iT; Click Chemistry) により、緑色と赤色蛍光により標識する (前頁の図)。

(2) 三次元構築画像からの重複領域の抽出と、その体積比を算出する。高倍率で色収差補正のある顕微鏡画像 (x, y 軸の画像情報に加えて、染色体を 0.2  $\mu\text{m}$  間隔で z 軸のセクションニング) を取得する。このとき、共焦点レーザー顕微鏡またはデコンボリューション処理により、可及的に z 軸方向の S/N 比の高い画像にする。voxel (三次元空間での体積要素) 信号強度のデータをもとに、同じ輝度値の表面を計算で求めて三次元モデルを構築する (=surface rendering 法、図)。



得られた三次元構築画像について、緑蛍光と赤蛍光が重複した voxel を抽出、染色体全体に対する体積比 (% overlap volume) を算出する。実験系が確立したら、Imaris ソフトウェアにおいてマクロを用いたプログラムを組むことを試み、一連の計算処理の自動化を進める。

(3) 姉妹染色分体結合の検出のためのダイナミック・レンジを設定する。全染色体において、理論的に信号が完全重複する場合と全くしない場合を解析して、この方法で定量的に測定しうる範囲を検討する。「完全重複」は Dual labeled の % overlap volume を調べる。

一方でコヒーシンの保護因子 Sgo1 の不活性化によって姉妹染色分体の結合が完全に消失することが分かっているので、これを調べることで「完全不重複」について検討する。こうして本測定系の最大値と最小値を決めることでダイナミック・レンジを設定し、その上で以下の観察を進める。

(4) 分裂期進行に伴う姉妹染色分体結合の解除過程を定量する。M期の前期、前中期、中期、後期を解析、染色体における重なり合わない体積の割合 (% Non-overlaps; Non-OLs) を求めることにより、姉妹染色分体間結合の解離動態を明らかにする。前期を特に詳細に調べるために、サイクリン B の核内流入の前後に分けて解析する。次いで、姉妹染色分体の結合を形成しているコヒーシンとカテネーションの関連性を検討し、M期の進行に相俟って、これらの 2 要素の解除機構を調べる手掛かりを得る。そのために、a) カテネーション解除を不活性化時の染色体上のコヒーシンの変化と %Non-OLs を検討する、b) コヒーシンを除去したときと過剰局在したときの %Non-OLs を比較検討する。

(5) クロマチン構造変換に関連する酵素群の機能阻害を行い、結合解消機構の手掛かりを得る。姉妹染色分体の結合を解消する分子機構に迫るために、クロマチンの構造変換に関連することが知られる酵素群を不活性化して、結合解除動態を検討する。まずは DNA カテネーションを解除するトポイソメラーゼ (Topo II $\alpha$ ) を不活性化してその関与を明らかにする。次いで、DNA の複製直後から働くことが知られているようなヘリケース (BLM 複合体など) を不活性化して、間期に生じた「未解構造」の残存に起因する結合解除不全の程度を観察する。

さらに、Condensin II の機能が前期での染色体凝縮に必須であるという先行研究を踏まえ (Hirota et al., 2004)、Condensin II のはたらきも姉妹染色分体間の解離に関与する可能性を検討する。また、M期に進入した細胞で染色体凝縮を誘導するためには Cdk1 による CAP-D3 (Condensin II の構成分子) のリン

酸化が重要な反応であることを見出した (Abe et al., 2011)。これに基づいて、このリン酸化反応と姉妹染色分体間の解離との関係を解析する。

#### <引用文献>

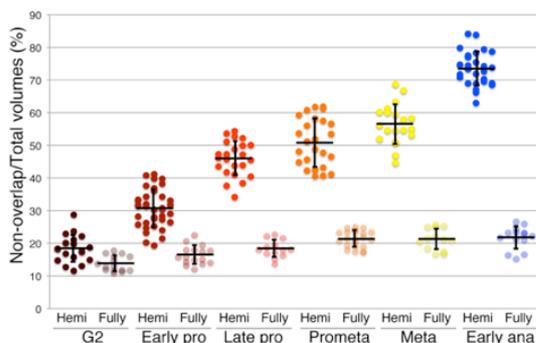
Hirota T, Gerlich D, Koch B, Ellenberg J, Peters JM. (2004) Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J Cell Sci.* 117: 6435-6445.

Abe S, Nagasaka K, Hirayama Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Aoyagi Y, Obuse C, Hirota T. (2011) The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* 25: 863-874.

## 4. 研究成果

(1) 二種類の核酸誘導体を用いて姉妹染色分体を分染する実験を確立した。姉妹染色分体の三次元画像解析データから、それらが重なり合わない領域(Non-OLs)を抽出して全体の染色体の体積における Non-OLs の割合を算出し、その値を分離の程度を示す指標とすることで姉妹染色分体の分離を定量的に解析する方法論を確立した。

(2) 姉妹染色分体の分離は、Prophase からすでに検出され、核膜崩壊以前に分離の70%以上は完了することがわかった (図)。つまり姉妹染色分体の分離の大部分はProphaseにおいて完了することが示された。



(3) Wapl をノックダウンすると、部分的に分離が抑制された。換言すると、Cohesin の解離を阻害しても分離はある程度進行するこ

とが分かった。一方で、Topo II $\alpha$  の機能を M 期進入時に阻害すると、顕著に分離が抑制された。このとき Cohesin の解離には影響がなかったことから、Topo II $\alpha$  の阻害によって引き起こされる分離異常は、Cohesin の解離異常によるものではないと考えられた。つまり、Topo II $\alpha$  による DNA カテネーションの解消が、姉妹染色分体の分離に重要であることが明らかになった。

(4) Condensin II の特異的なサブユニットである CAP-D3 をノックダウンすると、Prophase と Prometaphase における分離が顕著に抑制された。また、染色体凝縮に必要な Condensin II の分裂期特異的リン酸化修飾が、姉妹染色分体の分離に必要であることが分かった。このことから分裂期特異的な Condensin II の機能が姉妹染色分体の凝縮と分離の両過程を同時に促進することが示唆された。

(5) 姉妹染色分体の「解離」と染色体の「凝縮」という一見相異なる営みが、実は共通の因子のはたらきによって進むことが分かり “分けながら凝縮していく” という染色体をつくる仕組みを、分子レベルでも明らかになった。

以上の知見をまとめ学術雑誌に発表した (主な発表論文リストの ① Nagasaka et al., (2016) Sister chromatid resolution is an intrinsic part of chromosome organization in prophase. *Nat Cell Biol.* 18: 692-699)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Nagasaka, K., Hossain, JM., Roberti, JM., Ellenberg, J., and Hirota, T. (2016) Sister chromatid resolution is an intrinsic part of chromosome organization in prophase. *Nat Cell Biol.* 18: 692-699. doi: 10.1038/ncb3353.
- ② Abe, Y., and Hirota, T. (2016) System-level deficiencies in Aurora B control in cancers. *Cell Cycle.* In-press. doi: 10.1080/15384101.2016.1185850

- ③ Abe, Y., Sako, K., Takagaki, K., Hirayama, Y., Uchida, KSK., Herman, J., DeLuca, JG., and Hirota, T. (2016) HP1-assisted Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors. *Dev. Cell.* 36: 487-497. doi: 10.1016/j.devcel.2016.02.008
- ④ Takahashi, M., Tanaka, K., Wakai, T., and Hirota, T. (2016) Phosphoproteomic analysis of human mitotic chromosomes identified a chromokinesin KIF4A. *Biomed Res.* 37: 161-165. doi: 10.2220/biomedres.37.161.
- ⑤ Nagasaka, K. and Hirota, T. (2015) Clarifying the role of condensins in shaping chromosomes. *News and Views. Nat Cell Biol.* 17: 711-713 doi: 10.1038/ncb3183
- ⑥ Minamino, M., Ishibashi, M., Nakato, R., Akiyama, K., Tanaka, H., Kato, Y., Negishi, L., Hirota, T., Sutani, T., Bando, M., and Shirahige, K. (2015) Escol acetylates cohesin via a mechanism different from that of Escol2. *Curr. Biol.* 25: 1694-706. doi: 10.1016/j.cub.2015.05.017.
- ⑦ 小西 惇、松高 愛、広田 亨 (2015) 染色体不安定性の成因. *細胞* 47 (5): 5-8.
- ⑧ Gallego-Paez, LM., Tanaka, H., Bando, M., Takahashi, M., Nozaki, N., Nakato, R., Shirahige, K., and Hirota, T. (2014) Smc5/6-mediated replication progression contributes to chromosome assembly in human cells. *Mol. Biol. Cell.* 25 (2): 302-317. doi: 10.1091/mbc.E13-01-0020.
- ⑨ 高橋元子、進藤軌久、広田 亨 (2014) ライブ・セル・イメージング解析を用いた細胞分裂研究法：バイオセンサーによる酵素活性の時空間的解析. *実験講座. Surgery Frontier*, 21 (2): 205-209.

〔学会発表〕 (計 13 件)

- ① Toru Hirota “A system level deficiency of the chromosomal passenger complex in cancer cells” The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA) Nagoya, 2015.10.08
- ② Toru Hirota “An origin of chromosome missegregation in mitosis” The 27th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul (Korea), 2015.09.21-23
- ③ 広田 亨 「がん細胞における染色体制御システムの破綻：明かされつつある染色体不安定性の分子背景」新学術領域・が

ん研究分野の特性等を踏まえた支援活動・公開シンポジウム, 東京, 2015.09.09

- ④ 広田 亨 「がんと染色体」第 70 回日本臨床細胞学会細胞検査士教育セミナー, 神戸, 2015.09.06
- ⑤ 広田 亨 「がんと染色体」第 69 回日本臨床細胞学会細胞検査士教育セミナー, 東京, 2015.08.30
- ⑥ Toru Hirota “Dynamic deformation of kinetochores controls mitotic progression” The 4th Dynamic Kinetochores Workshop, Copenhagen (Denmark) 2015.05.18-22.
- ⑦ 広田 亨 “HP1-assisted Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors” 国際高等研究所研究プロジェクト「クロマチンデコーディング」研究会, 京阪奈市, 2015.03.20
- ⑧ Toru Hirota “Control of chromosome structure outside mitosis” 2014 Asia GenomeCheck Conference, Suwon (Korea) 2014.03.07.
- ⑨ Toru Hirota “An origin of chromosome missegregation in mitosis” The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, 2014.11.27.
- ⑩ Toru Hirota “A molecular lesion of chromosome missegregation in mitosis” The 73rd Japanese Cancer Association, Annual Meeting, Yokohama, 2014.09.26.
- ⑪ 広田 亨 「ライブ・セル・イメージングがもたらすがん研究の新展開」第 11 回日本病理学会カンファレンス, 神戸市, 2014.08

〔図書〕 (計 1 件)

Uchida, KSK, and Hirota, T. (2016) Spindle assembly checkpoint: its control and aberration. *DNA Replication, Recombination and Repair - Molecular Mechanisms and Pathology.* Hanaoka and Sugawara ed. pp 429-447. Springer

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: HP1 の機能に着目した抗がん剤のスクリーニング方法及び評価系  
 発明者: 広田 亨、阿部 優介  
 権利者: 同上  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2016-035505

出願年月日：平成28年2月26日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：細胞観察用蛍光プローブ及びこれを使用する方法

発明者：広田 亨、進藤軌久、熊田和貴

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2014-010635

取得年月日：平成26年1月26日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページによる成果の発信

① がん研究所実験病理部・広田研究室  
<http://www.jfcr.or.jp/tci/exppathol/>

② がん研究会がん研究所  
<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/index.html>

アウトリーチ活動

① 第70回細胞検査士教育セミナー  
「がんと染色体」平成27年9月6日

② 東京都立日比谷高校・細胞生物学講義  
「染色体動態の制御とその破綻」  
平成27年7月23日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

広田 亨 (Hirota, Toru)

公益財団法人がん研究会

がん研究所・実験病理部・部長

研究者番号：50421368