

図17

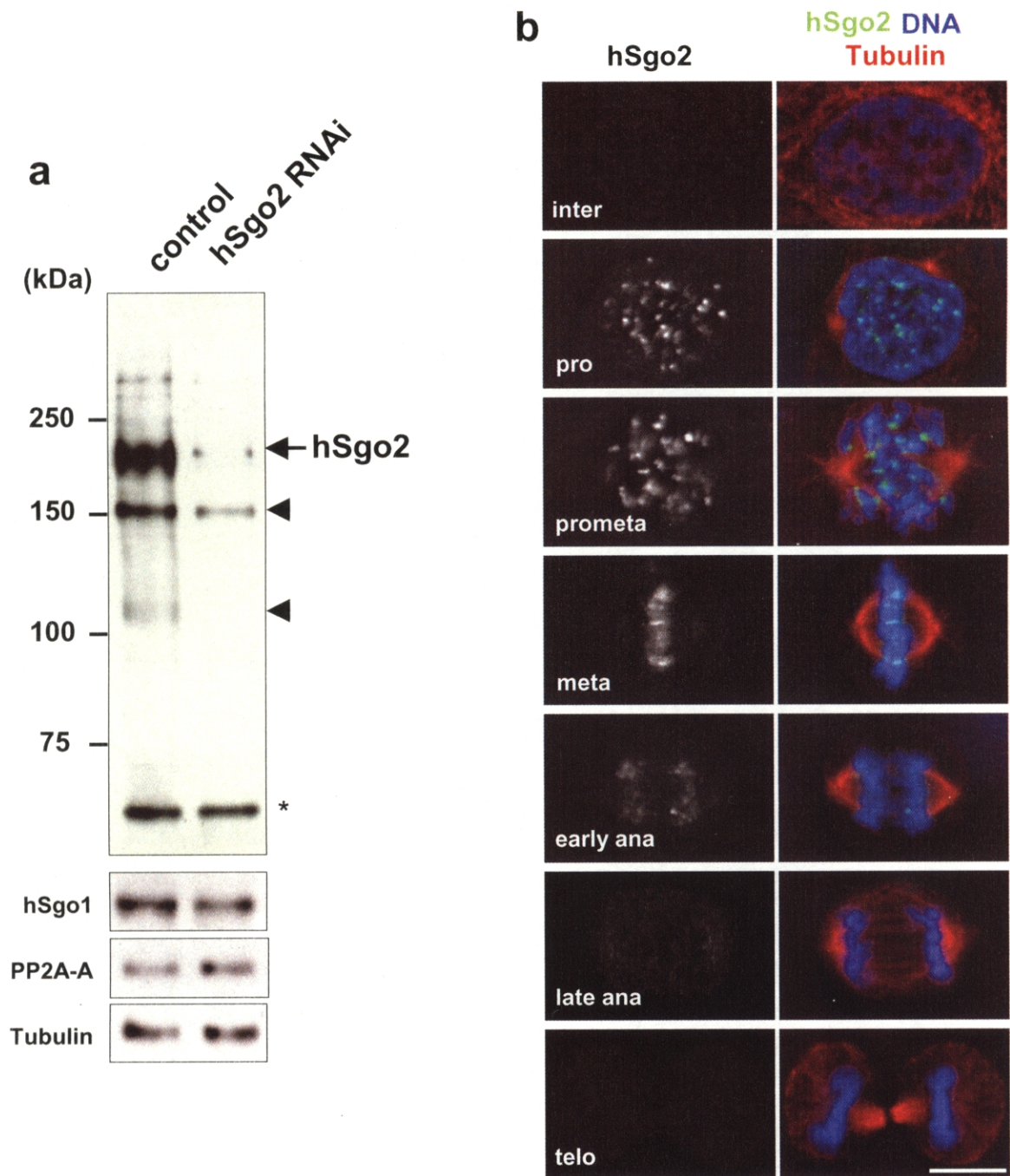


図17: hSgo2は体細胞分裂の分裂期においてドット状に局在する

a) HeLa細胞に対しhSgo2のRNAiを行い、2日後に分裂期の細胞を回収し、抗Sgo2抗体を用いてウエスタン解析を行った。矢印で示した190kDaのバンドが全長のhSgo2に対応すると考えられる。矢頭で示したバンドはhSgo2の分解産物かもしれない。アステリスクで示したバンドはクロスリアクトによるものであると考えられる。また、同じサンプルについて抗hSgo1、抗PP2A-A、抗チューブリン抗体でそれぞれを検出した。

b) HeLa細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、抗hSgo2抗体(緑)、抗チューブリン抗体(赤)、Hoechst33342 (青)で染色した。hSgo2は分裂期の前期から中期までドット状のシグナルを示し、後期の間消失していた。scale bar = 10μm

図18

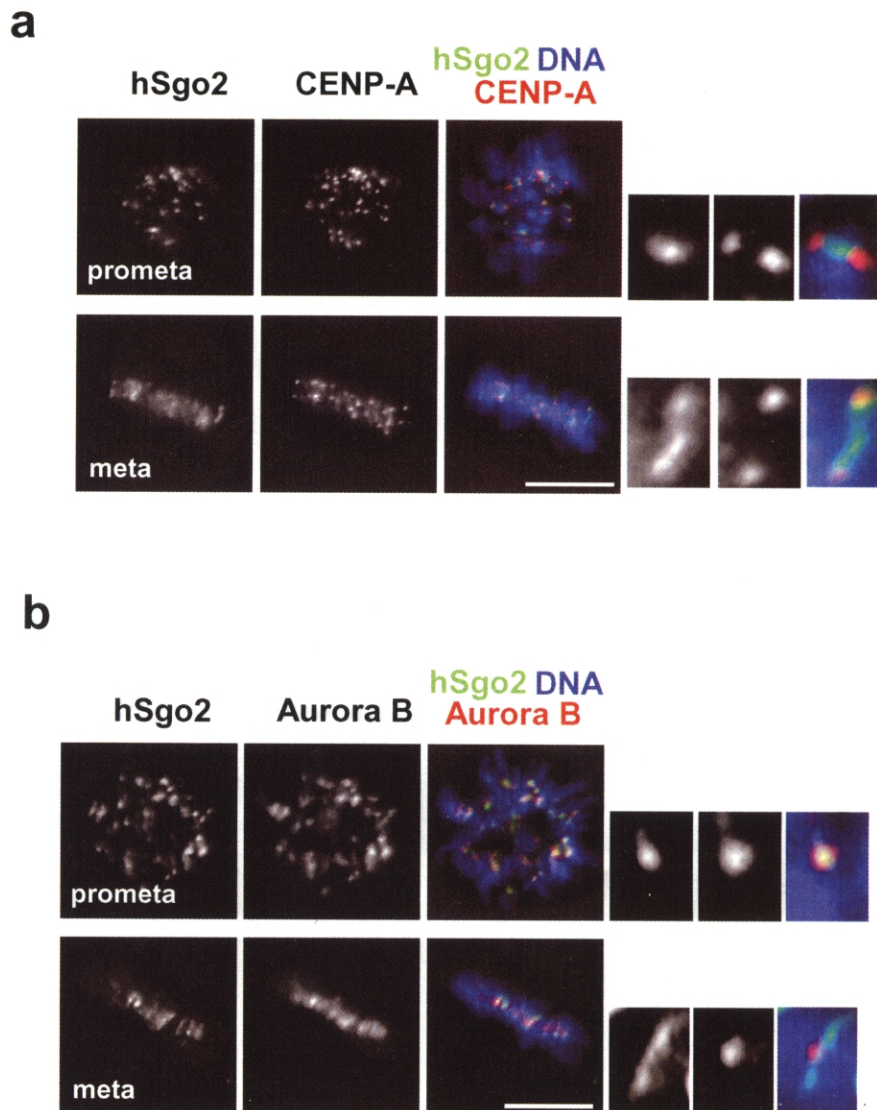


図18: hSgo2は体細胞分裂の分裂期においてセントロメアに局在する

a) HeLa細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、hSgo2(緑)と動原体タンパク質CENP-A(赤)を免疫染色した。hSgo2は2つのCENP-Aシグナルに挟まれるように局在していたが、中期においてはhSgo2はCENP-Aの近傍までその局在を広げていた。

b) hSgo2(緑)とインナーセントロメアタンパク質Aurora B(赤)を免疫染色した。前中期においてhSgo2とAurora Bの局在は一致していたが、中期にはhSgo2はその局在をAurora Bの外側にも広げていた。scale bar = 10 μ m

図19

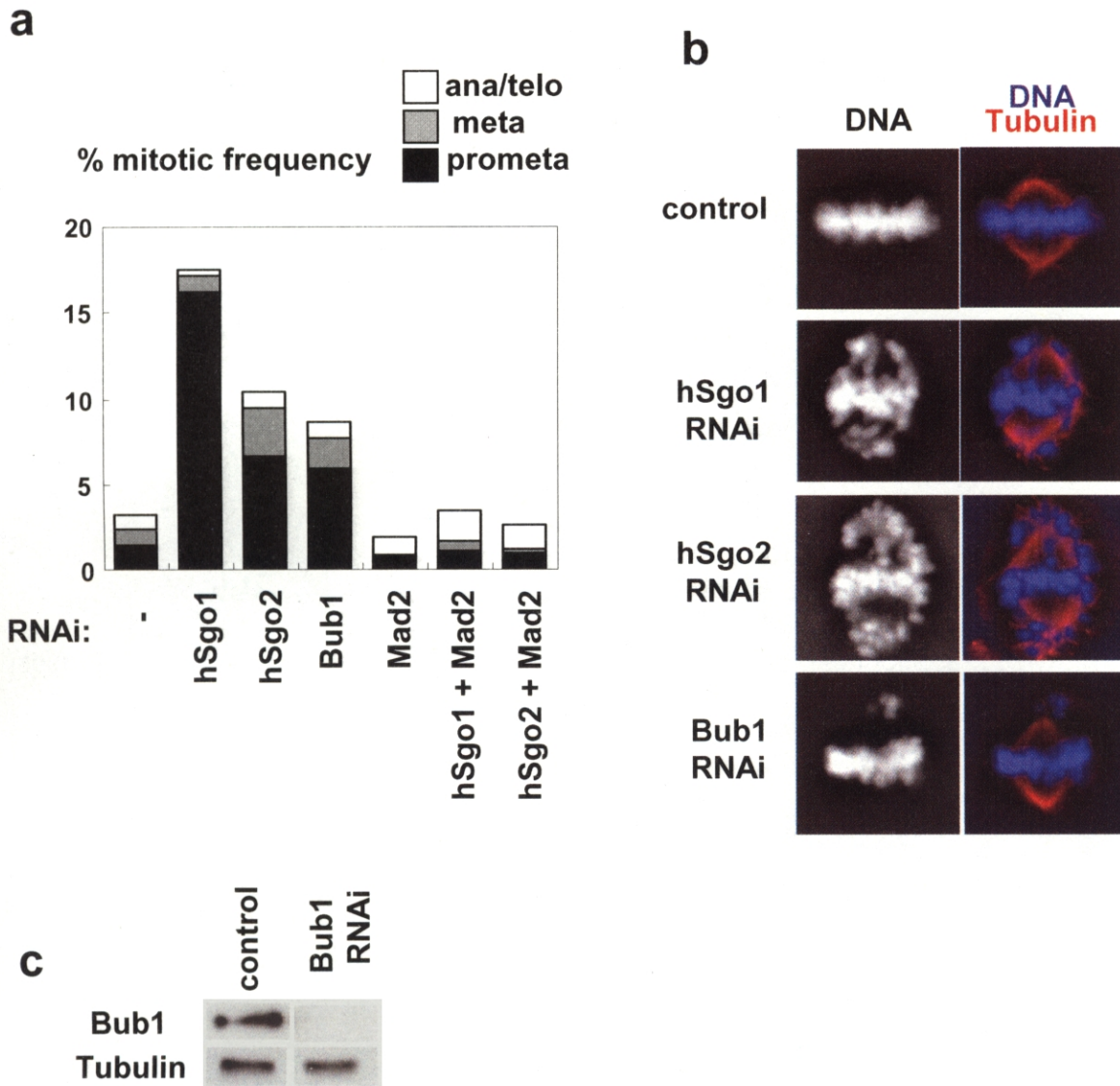


図19: hSgo1およびhSgo2のRNAiはスピンドルチェックポイント依存的な分裂期停止を引き起こす
a) HeLa細胞において、図に示された遺伝子産物についてRNAiを行い、2日後にHoechst33342でDNAを染色することにより分裂期にある細胞を数えた(n>500)。hSgo1、hSgo2およびBub1のRNAiを行うと、分裂前中期の細胞が蓄積し、それらはMad2のRNAiにより解消された。
b) RNAiを行って2日後に細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、チューブリン(赤)とDNA(青)を染色した。hSgo1、hSgo2およびBub1 RNAiでは染色体がスピンドルの赤道面に整列できない細胞が頻繁に観察された。
c) RNAiを行って2日後に細胞を回収し、抗Bub1抗体を用いてウエスタン解析を行った。コントロールとして抗チューブリン抗体を用いた。

図20

哺乳動物における体細胞分裂

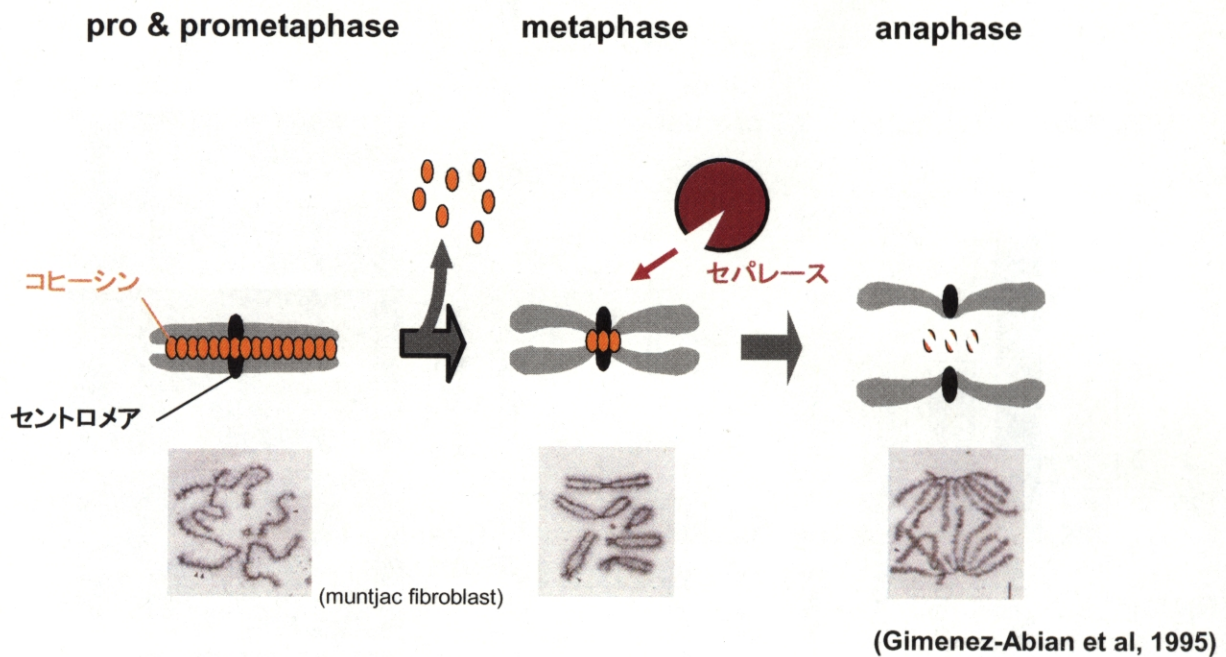


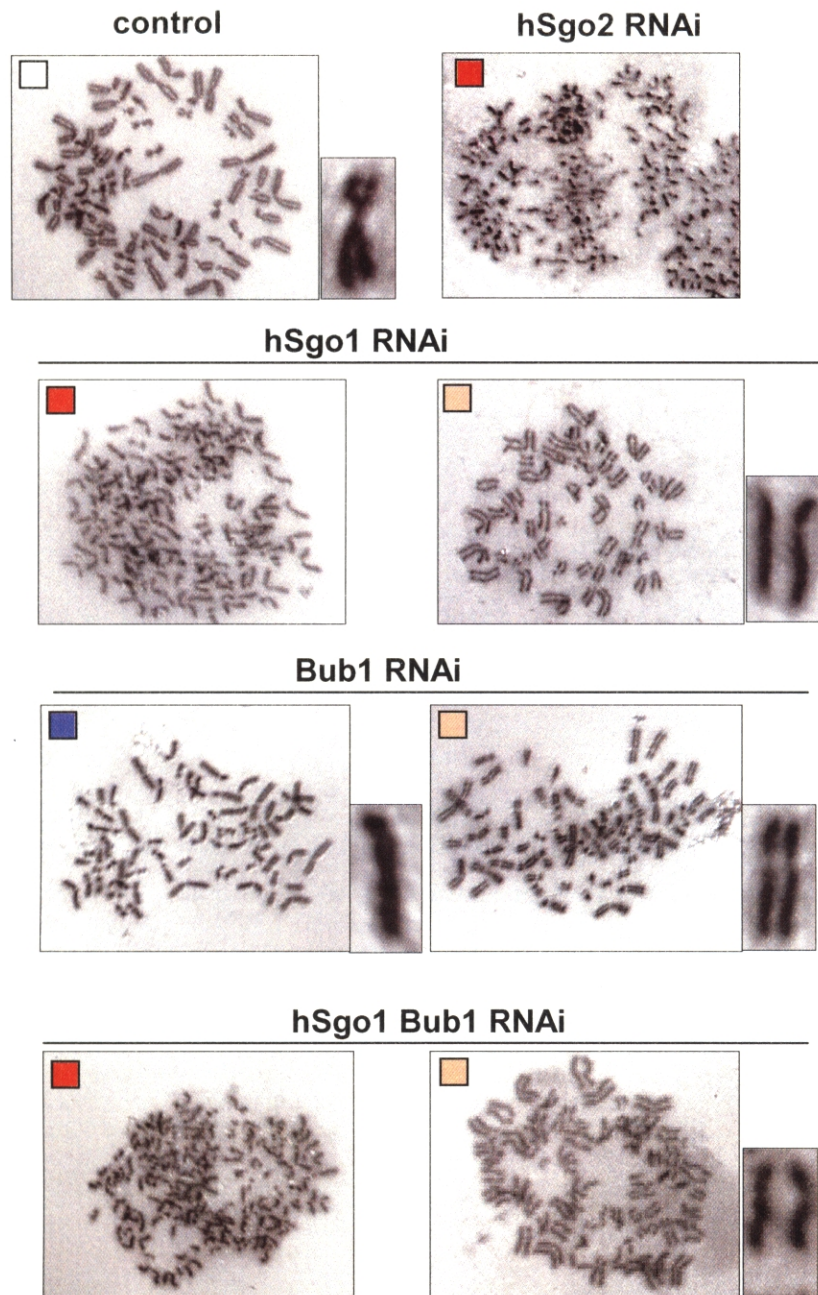
図20: 哺乳動物の体細胞分裂における分裂期では前期から前中期にかけて姉妹セントロメア間の接着が保護される

哺乳動物の体細胞分裂では、分裂前期から前中期にかけてほとんどのコヒーシン複合体を染色体腕部から解離する。しかし、セントロメアのコヒーシン複合体は解離せずに姉妹セントロメア間の接着を中期まで維持する。後期にはセパレーズがセントロメアに残ったコヒーシン複合体を切断して姉妹染色分体を分離する。下に、muntjac fibroblastの例を示す。

図21: hSgo1およびhSgo2のRNAiは姉妹染色分体の早期分離を引き起こす(図は前頁)

RNAiを行って2日後に分裂期の細胞をmitotic shake-offにより回収し、染色体をスプレッドしてギムザ染色を行った。コントロールではほとんどの細胞で姉妹セントロメア間の接着が維持されて「X」字型の染色体像が観察されたのに対し、hSgo1 RNAiを行った細胞では高い頻度で姉妹染色分体がばらばらに分離したもの(赤、70%)やセントロメアの接着を失って離れかけのもの(ピンク、22%)が見られた。hSgo2 RNAiを行った細胞では、41%の細胞で姉妹染色分体がばらばらに離れていた。Bub1 RNAiでは染色体全長にわたって接着がタイトなもの(青、39%)とセントロメアにおける接着が失われたもの(28%)が見られた。(n>100)

図21



- normal
- sisters separated
- centromeric cohesion lost, sisters still associated
- tight cohesion all along chromosomes

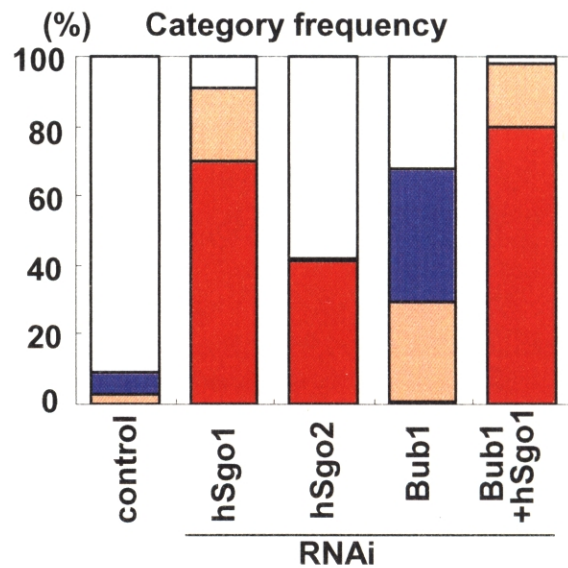


図21: hSgo1およびhSgo2のRNAiは姉妹染色分体の早期分離を引き起こす (説明は前頁)

図22

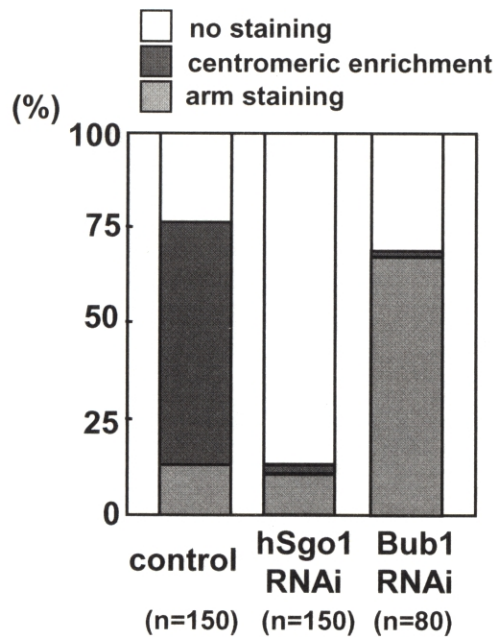
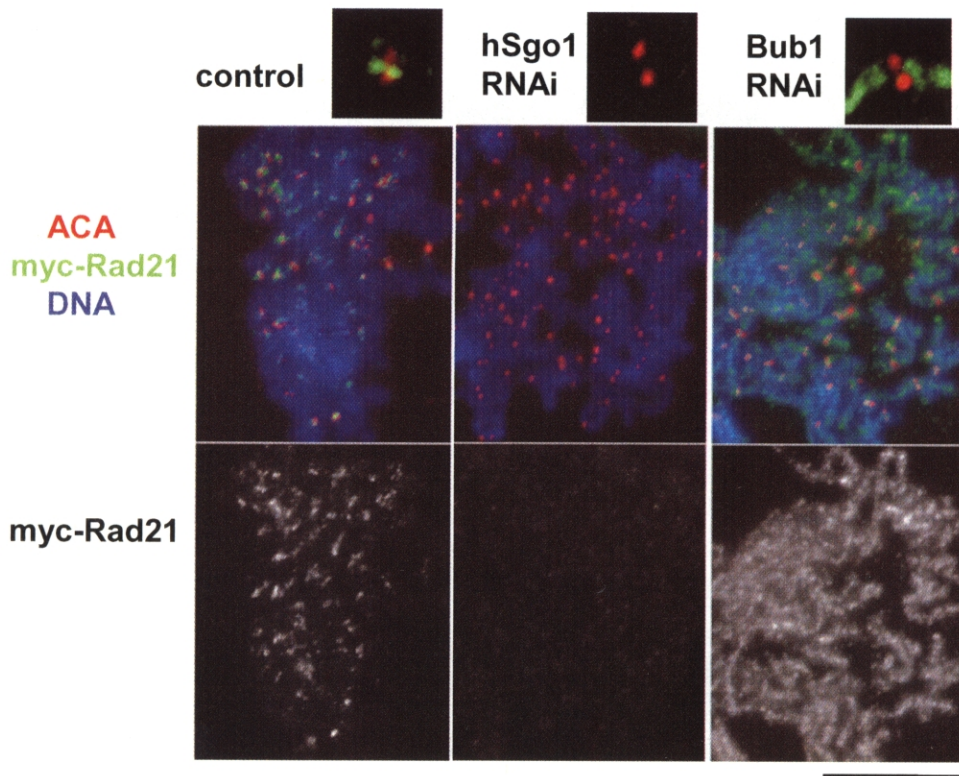


図22: hSgo1は体細胞分裂の分裂前期から前中期においてRad21コヒーシ複合体の保護に必要である myc-Rad21を発現誘導可能なHeLa細胞を用い、Doxycyclinの添加により発現を誘導した後、RNAiを行って2日後に細胞を回収した。細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、抗myc抗体(緑)、動原体を染めるACA抗体(赤)により免疫染色を行った。Hoechst33342でDNAを染めた(青)。コントロールではmyc-Rad21がセントロメアで局在を残していたのに対し、hSgo1 RNAiを行った細胞ではmyc-Rad21が失われ、Bub1 RNAiを行った細胞では染色体全長にわたってmyc-Rad21が残存していた。定量化したグラフを右に示す。コントロールでno stainingの細胞は、myc-Rad21の発現誘導がされなかったものであると考えられる。scale bar = 10 μ m

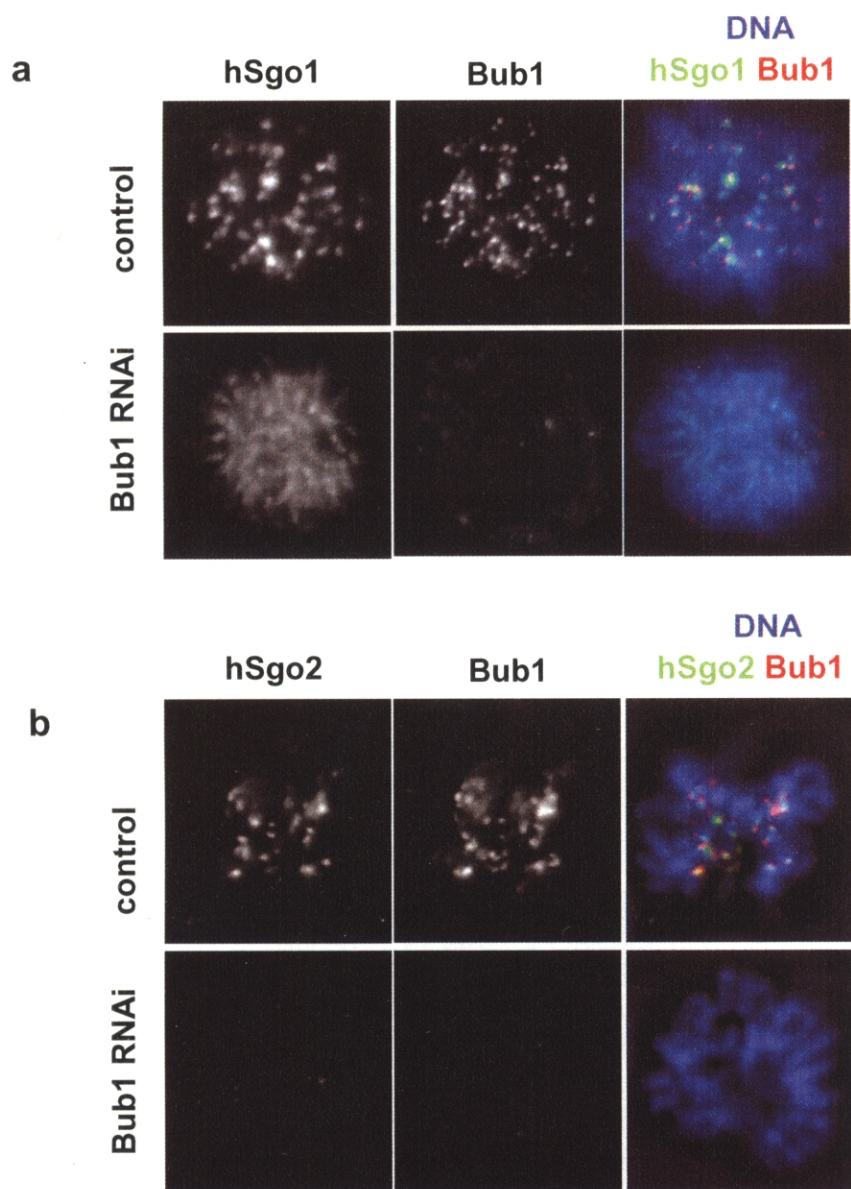


図23: Bub1はhSgo1とhSgo2のセントロメア特異的な局在に必要である

a) RNAiを行って2日後に細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、抗hSgo1抗体(緑)、抗Bub1抗体(赤)により免疫染色を行った。同時にHoechst33342でDNAを染めた(青)。コントロールではhSgo1はセントロメアに特異的に局在していたが、Bub1 RNAiでは染色体全長に渡って弱く局在していた。

b) a)と同様に抗hSgo2抗体(緑)を用いて免疫染色を行った。コントロールではhSgo2はセントロメアに局在しているのに対し、Bub1 RNAiではそれが失われていた。

図24

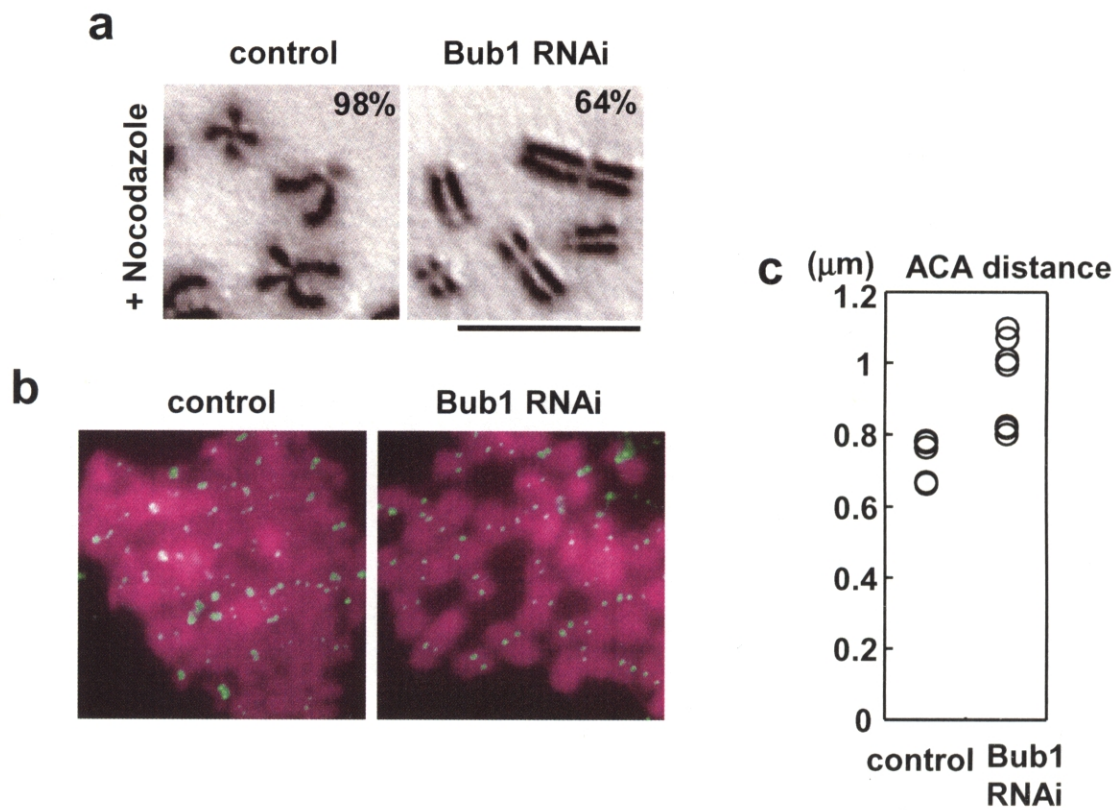


図24: Bub1 RNAiによりセントロメア特異的な接着の保護が失われる

a) RNAiを行って2日後に分裂期の細胞を回収し、330nMノコダゾールを含む培地で培養することにより細胞周期を分裂前中期に4時間停止させた。その後、染色体をスプレッドしてギムザ染色を行った。コントロールではほとんどの細胞でセントロメアでは接着が維持され、腕部では解除されてX字型になっていた。これに対し、Bub1 RNAiでは64%の細胞で、セントロメアの接着が失われ、一方で腕部の接着が解除されずに残っていた。(n>100)

b) a)と同様に細胞を分裂前中期に4時間停止させたあと、染色体をスプレッドし、姉妹動原体を染めるためACA抗体(緑)を用いて免疫染色を行った。同時にHoechst33342でDNAを染めた(紫)。Bub1 RNAiではコントロールよりも姉妹動原体間の距離が離れているように観察された。

c) b)について姉妹動原体間の距離を測定した。一つのプロットは、一つの細胞内における姉妹動原体間の距離の平均値である。