

博士論文

ヒトコンデンシンによる染色体構造の
構築と制御メカニズムの解明

東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻

平成 25 年度博士課程入学

氏 名 坂田 豊典

指導教員名 白髭 克彦

目次

本論文の要旨	3
略語一覧	7
第一章 序論	8
第一節 細胞分裂	
第二節 細胞分裂における染色体凝縮の重要性	
第三節 コンデンシンと染色体凝縮	
第四節 コンデンシンによる染色体凝縮モデル	
第五節 コンデンシンの結合制御と分子活性	
第六節 本研究の目的と研究のアプローチ	
第二章 結果	13
第一節 コンデンシン I のクロマチン免疫沈降の最適化	
第二節 コンデンシン I の分裂期染色体上での結合領域の網羅的解析	
第三節 コンデンシン I による分裂期転写抑制とその染色体凝縮への影響の解析	
第四節 ヒト rDNA 領域におけるコンデンシン I の結合解析	
第五節 コンデンシン I の分裂期染色体への結合メカニズムの解析	
第六節 コンデンシン II と DNA トポイソメラーゼ II α の分裂期染色体上での結合領域の網羅的解析	
第七節 コンデンシン I、II と DNA トポイソメラーゼ II α の相互関係の解析	
第三章 結論と考察	24
図、表	32
第四章 材料と方法	59
参考文献	67
謝辞	81

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 25 年度博士課程進学
氏 名 坂田 豊典
指導教員名 白髭 克彦

論文題目

ヒトコンデンシンによる染色体構造の構築と制御メカニズムの解明

1. 序論

細菌からは乳類に至るまで、あらゆる生物は細胞から構成されており、生物の生存にとって細胞分裂は必須のプロセスである。細胞分裂においては次世代の細胞に遺伝情報を正確に伝えることが最も重要であり、そのためには DNA 複製から細胞分裂にかけて染色体の構造が正しく制御されている必要がある。複製された姉妹染色分体は分裂期にそれぞれ個別化されて高度に折り畳まれるが、この過程は染色体凝縮と呼ばれており、相同な姉妹染色分体を最終的に娘細胞へ正確に分配するために重要である。最近では染色体分配の異常が細胞のがん化を促進することが明らかとなってきており、染色体凝縮メカニズムの解明は生命現象の理解だけでなく、がんのようなヒトの病気の原因究明にもつながると期待される。

分裂期染色体凝縮において中心的に機能する因子としては、コンデンシンと呼ばれるタンパク質複合体がよく知られている。ヒトを始めとするほとんどの真核生物において 2 種類の複合体、コンデンシン I と II が存在し、これらは共通のコアサブユニットの SMC2-SMC4 ヘテロダイマーとそれぞれに特異的な 3 つのサブユニットから構成されている。これまでに、どちらの複合体も正常な分裂期染色体構造の構築に必須であることが知られている。しかしながら、コンデンシン I と II が実際に分裂期染色体上でどのように機能することで、正確な染色体凝縮がなされるのかという点については多くの疑問が残されている。顕微鏡観察によりコンデンシン I、II の染色体全域での大まかな局在は知られているものの、これらの複合体がゲノム上で局在する領域の詳細が不明であることがその理由の一つとして挙げられる。

本研究ではコンデンシン I と II の分裂期ヒト染色体における局在を詳細に解析するため、Chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing (ChIP-seq) 法を用いて、これらの複合体の結合領域を塩基配列レベルで同定することを試みた。ChIP-seq 法は対

象のタンパク質に対する抗体を用いて、そのタンパク質とそれに結合する DNA 配列を合わせて精製し（クロマチン免疫沈降）、得られた DNA を次世代シーケンサーで配列決定する手法である。この方法によって、コンデンシン I と II が分裂期染色体上で間期に転写活性の高い遺伝子領域に特に強く結合することを明らかにした。さらに、コンデンシン I の遺伝子領域への結合が正常な染色体凝縮の促進に重要であることが示唆された。

2. コンデンシン I は転写活性の高い遺伝子の転写開始点近傍に結合する

コンデンシン I の結合領域を網羅的に明らかにするため、ノコダゾールで分裂期に同調したヒトの HeLa 細胞を用いて、コンデンシン I (NCAPG サブユニット) の ChIP-seq 解析を行った。その結果、これまでの顕微鏡観察による報告と一致して、ChIP-seq 解析でもコンデンシン I は染色体全域で局在がみられた。次に、より高解像度で解析を行ったところ、約 8 千箇所の統計的に有意なコンデンシン I の結合領域が同定された。遺伝子領域との比較解析から、これらの結合領域の 70% がタンパク質をコードする遺伝子の転写開始点 (TSS) 近傍に位置していることが明らかとなった。また、コンデンシン I の遺伝子の TSS での結合量とそれらの遺伝子の間期における転写活性には正の相関がみられた。さらに、コンデンシン I は間期に転写活性の高い tRNA 遺伝子の近傍に結合することも明らかとなった。

3. コンデンシン I は RNA ポリメラーゼ 2、3 の分裂期染色体からの解離を促進する

ほ乳類の細胞において、分裂期における転写は強く抑制されていることが知られている。実際、ChIP-seq 解析で分裂期の RNA ポリメラーゼ 2、3 (RNAP2, 3) の染色体への結合はほとんどみられなかった。そこで、間期に転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に分裂期になって結合するコンデンシン I が、分裂期の転写抑制機構に関与しているかを検証した。コンデンシン I (NCAPG サブユニット) を siRNA でノックダウンした細胞において、分裂期の RNAP2、3 の結合を ChIP-seq / quantitative (q) PCR で解析した結果、これらの RNA ポリメラーゼの結合の顕著な増加がみられた。一方で、reverse transcription (RT) -qPCR 解析などから、このとき結合の増加がみられた RNAP2 は転写伸長の活性を有していないことが示唆された。これらの結果から、コンデンシン I は TSS 近傍において RNAP2、3 の分裂期染色体からの解離を促進することが示された。一方で、分裂期における転写阻害剤処理でコンデンシン I の結合に変化がみられなかったことから、コンデンシン I の TSS 近傍への結合は RNA ポリメラーゼ自体には依存しないことが考えられた。

4. コンデンシン I は分裂期染色体上で単鎖 DNA に結合する

転写において鋳型となる DNA は二重鎖から単鎖 DNA に開裂することが必要である。また、

コンデンシン I のコアサブユニットは *in vitro* で二重鎖より単鎖 DNA に高いアフィニティーをもつことから、コンデンシン I は単鎖 DNA 構造を標的として TSS 近傍に結合している可能性が考えられた。そこで、コンデンシン I の ChIP により得られた DNA を免疫沈降用のビーズ上で、単鎖 DNA を特異的に消化するヌクレアーゼ P1 で処理し、精製した DNA を qPCR で定量した。その結果、ヌクレアーゼ P1 処理でコンデンシン I の ChIP シグナルが顕著に減少したことから、コンデンシン I の結合領域には単鎖 DNA 構造が含まれることが明らかとなった。さらに、DNA 配列の解析から、TSS 近傍のコンデンシン I 結合領域の 94% で、その 1 キロベース以内に CpG island (CGI) が存在していることが示された。最近、このような TSS 近傍の CGI 領域では単鎖 DNA と DNA-RNA ハイブリッドによる R-loop 構造が多く形成されることが報告されている。そこで、次に R-loop 構造が分裂期染色体凝縮へ及ぼす影響を解析した。RNA の輸送などに関わるタンパク質、THOC1 の欠損により細胞内での R-loop 構造の増加が報告されていることから、siRNA で THOC1 をノックダウンした細胞で分裂期染色体を観察した。その結果、THOC1 をノックダウンした細胞ではコンデンシン I のノックダウンでみられるような染色体が肥大化した異常な表現型が多くみられた。この結果から、R-loop 或いは単鎖 DNA 構造は正常な染色体凝縮を妨げることが示唆された。

これまでに、*in vitro* の解析において、コンデンシン I コアサブユニットが相補的な単鎖 DNA 同士を二重鎖 DNA に巻き戻す活性が知られている。この分子活性と本研究での解析結果を合わせて考えると、コンデンシン I は転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に生じた R-loop や単鎖 DNA 構造を二重鎖 DNA に戻して解消しているのではないかと推測された。

5. コンデンシン I、II とトポイソメラーゼ II α の分裂期染色体上における相互関係

分裂期の HeLa 細胞において、コンデンシン I と同様に、コンデンシン II (NCAPH2 サブユニット) の ChIP-seq 解析を行ったところ、約 6 千箇所の結合領域が同定され、その 89% が遺伝子の TSS 近傍に位置することが明らかとなった。また、コンデンシン II の遺伝子の TSS での結合量とそれらの遺伝子の間期における転写活性にも正の相関がみられた。そこで、コンデンシン I と II の結合領域について比較解析を行ったところ、コンデンシン II の結合領域の 68% がコンデンシン I と一致した。また、コンデンシン II (NCAPD3 サブユニット) をノックダウンした細胞では、特に II の結合領域において、I の結合の顕著な増加がみられた。一方で、コンデンシン I (NCAPG サブユニット) のノックダウンでは II の結合にあまり変化はみられなかった。

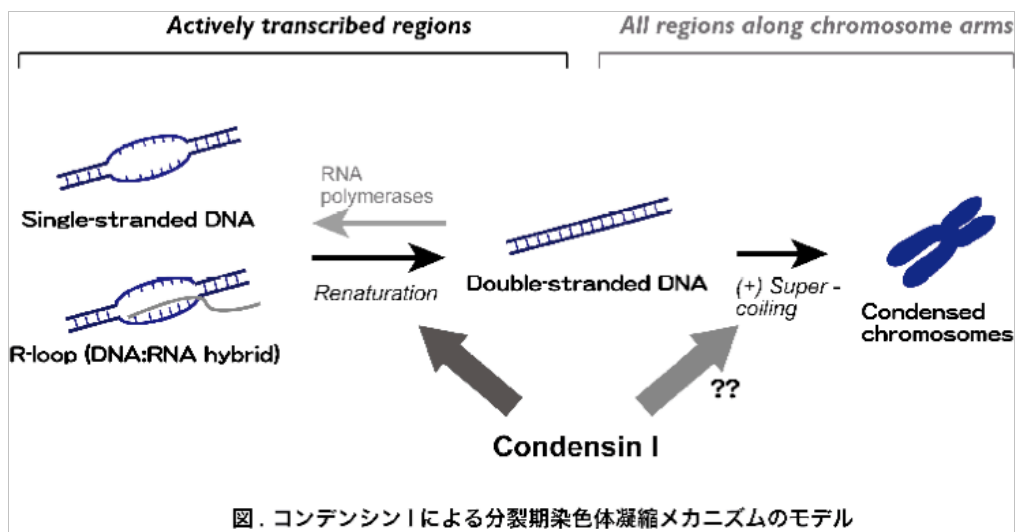
コンデンシン複合体と同様に、ヒトの細胞においてトポイソメラーゼ II α (TOP2A) も正常な分裂期染色体形成に必須であることが知られていることから、TOP2A についても ChIP-seq 解析を行った。その結果、約 2 万 8 千箇所の TOP2A の結合領域が同定され、コンデンシン I と II の結合領域は TOP2A とよくオーバーラップすることが明らかとなった。また、TOP2A をノ

ックダウンした細胞において、コンデンシン I の TSS 近傍における結合が増加する一方で、II の結合にはあまり変化がみられないことが ChIP-qPCR 解析により明らかとなった。

以上の結果から、コンデンシン I と II は同じように転写活性の高い遺伝子領域に結合していても、その染色体への結合の制御や凝縮における役割は異なっていることが示唆された。今後、コンデンシン I と II の機能の違いや TOP2A との関係性についてさらに解析していく必要がある。

6. 総括

本研究により、コンデンシン I がこれまでに知られていたような染色体全域への局在に加えて、転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍へ特に強く結合しており、その結合領域には単鎖 DNA 構造が含まれることが明らかとなった。また、R-loop 或いは単鎖 DNA 構造は正常な分裂期染色体凝縮を妨げることが示唆された。以上の結果から、コンデンシン I は分裂期染色体全域でゲノム DNA を折り畳むことと並行して、転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に生じた R-loop や単鎖 DNA 構造を二重鎖 DNA に戻して解消することで、染色体凝縮を促進していると考えられた(図)。



発表論文

Sutani T*, Sakata T*, Nakato R, Masuda K, Ishibashi M, Yamashita D, Suzuki Y, Hirano T, Bando M, Shirahige K.

“ Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation. ”

Nature Communications. 2015. (*These authors contributed equally to this work.)

略語一覽

CDK	cyclin-dependent kinase
ChIP	chromatin immunoprecipitation
ChIP-qPCR	ChIP followed by quantitative PCR
ChIP-seq	ChIP followed by high-throughput sequencing
CGI	CpG island
IgG	immunoglobulin G
PCR	polymerase chain reaction
rDNA	ribosomal DNA
RNAP	RNA polymerase
siRNA	small interfering RNA
SMC	structural maintenance of chromosomes
tRNA	transfer RNA
TBP	TATA-binding protein
TSS	transcription start site
TTF2	transcription termination factor 2
TTS	transcription termination site

第一章 序論

第一節 細胞分裂と分裂期における染色体凝縮の重要性

細菌からほ乳類に至るまで、あらゆる生物は細胞から構成されており、生物の生存にとって細胞分裂は必須のプロセスである。細胞の遺伝情報の本体はゲノム DNA とタンパク質から構成される染色体であり、細胞分裂においては次世代の細胞に遺伝情報を正確に伝えることが最も重要である。そのためには、各染色体が忠実に複製され、正確に娘細胞に分配される必要がある。一個の細胞は、決まった順序で起こるひと続きの過程によってその中身を倍加し、二分して増えるが、この倍加と分裂の循環は細胞周期と呼ばれている。細胞周期は大きく四つの段階に分けられ、細胞の分裂が起こる分裂 (M) 期、染色体 DNA の複製が行われる S 期、分裂後と S 期の間の G1 期、S 期と分裂前の間の G2 期で成り立っている。真核細胞の通常の細胞分裂期では有糸分裂と呼ばれる核の分裂と、細胞質分裂と呼ばれる細胞が分かれる二つの過程がある。有糸分裂は前期、前中期、中期、後期、終期の 5 段階に分けられ、このとき染色体は高度に凝縮する。前期では、複製された染色体が細胞骨格の再編成に合わせて凝縮する。前中期では核膜が崩壊し、染色体はくびれて特殊な構造をとったキネトコアにより紡錘体微小管に接着し、活発に動き始める。中期では染色体が紡錘体の赤道面に整列し、後期に紡錘体の両極へと分離していく。終期の際に娘染色体は紡錘体極に到達して脱凝縮し、新たな核膜が形成される。終期の終わりに細胞質分裂も完了し、分裂期は終了する。

細胞分裂期における染色体の高度な凝縮の過程は染色体凝縮と呼ばれ、複製された姉妹染色分体を非常に限られた細胞空間の中で、正確かつ短時間に分配することを可能にしている。分裂期におけるこのような染色体構造制御は遺伝情報を娘細胞に正確に継承し、次の細胞周期を速やかに進行する上で必須である。一方で、分裂期染色体の高次構造については多くが不明であり、染色体凝縮の定義は必ずしも明確でない。原理的には、分裂期染色体凝縮は三つのプロセスに分けられる (Hirano, 2004)。まず一つ目は、染色体間の絡まりが解消され、それぞれの染色体が個々に分けられる過程である。二つ目は、それぞれの染色体が小さく折り畳まれて組織化され、棒状の染色体構造が形成される過程である。三つ目は、一つの染色体において姉妹染色分体間の絡まりが解消され、個別化される過程である。これらのプロセスが並行的かつ協調的に進行することで、最終的に娘細胞への正確な分配を保證するための染色体構造が構築されると考えられる。

分裂期染色体凝縮の制御機構の破綻は、赤道面から紡錘体極への分離が遅れたラゲング染色体や紡錘体の両極間に染色体がまたがった染色体ブリッジの分配異常を最終的に引き起こす (Hirano, 2012; Hudson et al., 2009)。最近では染色体分配異常によって、

細胞のがん化が促進されることが明らかとなりつつある (Duijf and Benezra, 2013)。この要因としては染色体分配異常により生じた、染色体数が変化した娘細胞における、がん遺伝子のコピー数の増加やがん抑制遺伝子のコピー数の減少などが考えられている。また、ラギング染色体は小核と呼ばれる異常な核構造が形成される原因となる。最近、この小核が大規模な染色体再編成の原因となることが報告されており (Zhang et al., 2015)、このようなゲノム DNA の変異はやはりがん化を促進すると考えられている (Stephens et al., 2011)。従って、染色体凝縮メカニズムの解明は生命現象の理解だけでなく、がんのようなヒトの病気の原因究明にもつながると期待される。

第二節 染色体凝縮とコンデンシン複合体

分裂期における染色体の動態は一世紀以上前から知られていたものの、染色体は非常に巨大で研究し難い構造体であったことから、その動態制御に機能する分子は長らく不明であった。比較的最近になって、この過程で中心的に機能するタンパク質複合体として、コンデンシンが見出された (Hirano and Mitchison, 1994; Hirano et al., 1997; Saitoh et al., 1994; Saka et al., 1994)。現在では 2 種類のコンデンシン複合体、コンデンシン I と II が知られている。small interfering RNA (siRNA) を用いた RNA 干渉によるノックダウン実験から、ヒト細胞ではどちらも正常な分裂期染色体形成に必須であることが知られている (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2003)。コンデンシン I と II には SMC2、SMC4 の共通のヘテロダイマーのコアサブユニットがあり、それらに加えてそれぞれに特異的な 3 つのサブユニット (コンデンシン I が CAP-H、CAP-D2、CAP-G、コンデンシン II が CAP-H2、CAP-D3、CAP-G2) で構成されている (図 1)。SMC2 と SMC4 は、Structural maintenance of chromosomes (SMC) タンパク質ファミリーに属している ATP アーゼである (Hirano, 2006; Nasmyth and Haering, 2005)。真核生物の SMC タンパク質ファミリーは SMC1 から 6 が存在し、これらは 2 つの反並行の coiled-coil 領域が折り畳まれることで N 末端と C 末端が相互作用し、Head 領域と Hinge 領域が形成される。さらに、2 種類の SMC タンパク質同士が Hinge 領域で相互作用することにより V 字構造のヘテロダイマーを形成し、それらに他のサブユニットが相互作用することで複合体を形成する。SMC タンパク質の構造には共通性があるものの、コヒーシン複合体 (SMC1、SMC3) は姉妹染色分体間接着と転写制御、SMC5/SMC6 複合体は DNA の組み換えや修復にそれぞれ関与しており、その染色体上での機能は多様である。コンデンシン I の CAP-H とコンデンシン II の CAP-H2 は kleisin タンパク質ファミリーに属しており (Nasmyth and Haering, 2005; Schleiffer et al., 2003)、N 末端と C 末端でそれぞれ SMC2、SMC4 の Head 領域と相互作用する

ことでリング状の構造を形成する。これら CAP-H、CAP-H2 のそれぞれに残りのサブユニットが結合する (図 1)。コンデンシン I における CAP-D2 と CAP-G、コンデンシン II における CAP-D3 と CAP-G2 には HEAT repeats と呼ばれる反復配列が存在し、これらの構造はタンパク質間の相互作用に関係すると考えられている (Neuwald and Hirano, 2000)。コンデンシン複合体の分子活性の中心は SMC サブユニットのヘテロダイマーであり、その活性を残りのサブユニットが制御していると現在は考えられている。しかしながら、これらのサブユニットのそれぞれが二つのコンデンシン複合体の活性や染色体への結合にどのように関与するのかは、未だ不明な点が多い。

ヒトを始めとするほとんどの真核生物において、コンデンシン I と II の両方が存在することが知られている (Hirano, 2012)。一方で、酵母などの一部の真核生物にはコンデンシン I のみが存在し、単にコンデンシンとも呼ばれる。このことから、真核生物の共通の先祖はコンデンシン I と II の両方をもっており、酵母などの一部の生物種において進化の過程でコンデンシン II が失われたと考えられている。また、原核生物にもコンデンシンに似たタンパク質複合体が存在する。

第三節 コンデンシンによる分裂期染色体構造の構築のモデル

細胞周期におけるコンデンシン I と II の挙動は異なっており、コンデンシン II が間期から核内に存在し、細胞分裂前期の早い段階から染色体凝縮を行うのに対し、コンデンシン I は基本的に細胞質に局在し、分裂前中期の核膜崩壊後から染色体に結合する (図 2a)。分裂期姉妹染色分体において、コンデンシン I と II はともにセントロメア領域と腕部の軸に沿って局在が観察されるが、その軸上では互いに排他的な局在がみられる (Ono et al., 2003)。また、分裂期のヒト細胞におけるライブイメージング解析から、コンデンシン I の染色体への結合は II と比較してよりダイナミックであることが示唆されている (Gerlich et al., 2006)。

コンデンシン I と II による分裂期染色体の構造形成メカニズムはいくつかの可能性が考えられているが、コンデンシン II から I への順序立った結合制御が重要であるとする、二段階の分裂期染色体凝縮モデルが現在のところ主流となっている (Green et al., 2012; Hirano, 2005; Marko, 2008)(図 2b)。このモデルでは、間期から核内に存在するコンデンシン II が、細胞分裂前期に入ると、第一段階の染色体凝縮を開始する。第二段階の凝縮は、細胞分裂前中期に核膜崩壊によって細胞質に局在していたコンデンシン I が染色体に結合することで進行し、最終的にコンデンシン I と II の協調的な作用によって分裂中期の染色体構造の構築が完了すると考えられている。この二段階の分裂期染色体凝縮モデルはいくつかの報告によって支持されている。まず、カエルの卵抽

出液を用いた染色体再構成系による解析において、細胞内と同様にコンデンシン II は I に先立って染色体に結合して凝縮を開始する (Shintomi and Hirano, 2011)。また、コンデンシン I と II を欠損した時の染色体の表現型はそれぞれ異なっており、コンデンシン I の欠損では太く肥大化した染色体が形成される一方で、コンデンシン II の欠損では長く細い染色体になる (Green et al., 2012; Lai et al., 2011; Ono et al., 2003; Shintomi and Hirano, 2011)。さらに、コンデンシン I と II の同時欠損では染色体の構造の形成自体が起こらない。これらの知見から、コンデンシン II が染色体の軸に沿った方向、コンデンシン I が軸に垂直の方向から、それぞれ染色体の折り畳みを促進すると考えられている (図 2b)。しかしながら、どういったメカニズムでコンデンシン I と II の間でこのような染色体形成の違いが生じるのかは不明である。

これまでに知られているコンデンシン I の最も典型的な分子機能は、トポイソメラーゼ I の存在下で ATP 依存的に、環状二重鎖 DNA に正の超らせんを導入する活性である (Kimura and Hirano, 1997; Kimura et al., 2001)。この活性によって、コンデンシン I は染色体の二重鎖 DNA に正の超らせんのループ構造を形成しながら折り畳んでいくことで、染色体凝縮を促進しているのではないかと考えられている (図 3a) (Swedlow and Hirano, 2003)。一方で、コンデンシン II が同様の活性を有するかどうかは不明であり、コンデンシン II の分子機能についてはほとんど未知である。また、コンデンシンと同じ SMC ファミリータンパク質複合体であるコヒーシンは、そのリング状構造によって姉妹染色分体 DNA 同士を抱えるようにしてそれらの接着に機能すると考えられている (Hirano, 2006; Nasmyth and Haering, 2005)。このことから、似た複合体構造をもつコンデンシンによる DNA ループ構造形成のモデルも提唱されている (図 3b) (Cuylen and Haering, 2011; Thadani et al., 2012)。

第四節 コンデンシンの分裂期染色体上での局在とその制御

コンデンシン複合体は染色体全域で結合がみられる。特に顕微鏡観察では、キネトコア領域において比較的強い局在がみられ、コンデンシン II はインナーキネトコア領域に、コンデンシン I は染色分体の軸よりの領域にそれぞれ局在が観察される (Lipp et al., 2007; Ono et al., 2004; Shintomi and Hirano, 2011)。この局在は分裂酵母でも保存されており、コンデンシン (ヒト細胞でのコンデンシン I) の局在にはキネトコアタンパク質 Pcs1-Mde4 複合体が必要であることが知られている (Tada et al., 2011)。また、ヒト細胞におけるコンデンシン II と分裂酵母のコンデンシンのキネトコア領域への局在は、キネトコアタンパク質 Mis6/CENP-I によって制御されている (Nakazawa et al., 2008)。この領域において、コンデンシン I は分裂中期でのシスターキネトコア

の協調的な動きを制御していることが示唆されている (Gerlich et al., 2006; Oliveira et al., 2005)。コンデンシン II は、カエルの卵抽出液を用いた *in vitro* の実験系により、セントロメアを構成するヒストン H3 バリエント、CENP-A のローディング及び CENP-A ヌクレオソームの維持に必要であることが示されている (Bernad et al., 2011)。このように、コンデンシン I、II はキネトコア領域に局在し、その機能制御に深く関係していると考えられる。

酵母においてはコンデンシンが rDNA 領域に局在することが以前から知られており、この領域における染色体凝縮及び分配を促進することが知られている (Freeman et al., 2000; Nakazawa et al., 2008)。この局在には、出芽酵母では DNA 複製の進行を阻害するタンパク質 Fob1 とその相互作用因子である Tof2、Csm1、Lrs4 (Johzuka and Horiuchi, 2009; Johzuka et al., 2006)、分裂酵母では RNA ポリメラーゼ 1 のラージサブユニット Nucl1 とそのリクルーターである Acr1 が機能していることが報告されている (Nakazawa et al., 2008)。また、出芽酵母では、コンデンシンが rDNA のコピー数の維持とこの領域における DNA ダメージの修復にも寄与することが報告されている (Freeman et al., 2000; Ide et al., 2010)。一方で、このような酵母におけるコンデンシンの rDNA 領域での局在や機能が、ヒト細胞でも保存されているかどうかは現在のところ不明である。

上記の領域に加えて、第三節で述べたように、顕微鏡観察においてコンデンシン複合体は染色体腕部領域でも特徴的な局在を示す。この局在制御には、分裂期特異的なキナーゼによるコンデンシンのサブユニットのリン酸化修飾が知られている。コンデンシン I と II のそれぞれに特異的なサブユニットは Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) によってリン酸化される (Abe et al., 2011; Kimura et al., 1998)。また、Aurora B によるリン酸化がコンデンシン I の染色体への結合を促進することも知られている (Lipp et al., 2007)。最近、この Aurora B によるコンデンシン I の CAP-H サブユニットのリン酸化が、ヒストン H2A 及びヒストンバリエント H2A.Z へのコンデンシン I の結合を促進することが報告された (Tada et al., 2011)。一方で、コンデンシン II の分裂期染色体への結合は Polo-like kinase 1 (Plk1) によるリン酸化でも促進されることが報告されている (Abe et al., 2011)。このような分裂期特異的なキナーゼによる制御は知られているものの、コンデンシン複合体の染色体腕部領域における局在制御は未だ不明な点が多い。

第五節 コンデンシンの染色体における結合領域の網羅的解析

染色体に結合するタンパク質の機能解析を行う上で、そのゲノム上での結合領域を網

羅的に同定することは非常に有効である。そのような手法としては、最初に Chromatin immunoprecipitation (ChIP) -chip 法が開発された (Blat and Kleckner, 1999; Ren et al., 2000)。ChIP-chip 法は目的のタンパク質の抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、得られた DNA を DNA マイクロアレイにハイブリダイズすることで、結合領域をゲノムワイドに同定する手法である。SMC タンパク質複合体の一つである コヒーシンの ChIP-chip 解析では、コヒーシンがインシュレータ構成因子 CCCTC-binding factor (CTCF) と共局在し、これらが協調的に転写制御に機能することが明らかとなった (Parelho et al., 2008; Rubio et al., 2008; Stedman et al., 2008; Wendt et al., 2008)。近年では、次世代シーケンサーの発展により、大規模に DNA 配列を決定できるようになったことで、ChIP で得られた DNA を直に配列決定する ChIP followed by high-throughput sequencing (ChIP-seq) 法が開発された (Park, 2009)。この手法により、ChIP-chip より高解像度でより網羅的な結合プロファイルを得ることができるようになった。実際、コヒーシンの ChIP-seq 解析から、CTCF 結合領域とは別に、コヒーシンは遺伝子のエンハンサーとプロモーター領域において転写メディエーターと共局在していることが新たな知見として得られている (Kagey et al., 2010; Schmidt et al., 2010)。さらに、高次構造解析と合わせて、コヒーシンはインシュレータ機能とは別に、遺伝子のエンハンサーとプロモーター領域の相互作用を促進することで転写制御に機能している可能性が示された。

これまでに、コンデンシン複合体についても ChIP-chip による網羅的な結合領域解析が酵母において行われており、コンデンシンが tRNA 遺伝子及び rDNA 領域へ局在することが報告されている (D'Ambrosio et al., 2008; Wang et al., 2005)。しかしながら、ヒトのような高等真核生物において、コンデンシン I 及び II の分裂期染色体における網羅的な結合領域の解析は行われていない。

第六節 本研究の目的と研究のアプローチ

上述のように、種々の生物種において、コンデンシン I と II に関してこれまでに様々な研究がなされており、これらの複合体が正常な分裂期染色体の構造を構築する上で中心的な役割を果たしていることは明白である。しかしながら、コンデンシン I と II が実際に分裂期染色体上でどのように機能することで、正確な染色体凝縮がなされるのかという点については未だ多くが不明である。コンデンシン I と II の結合領域を網羅的に解析することで、このような分裂期染色体の凝縮メカニズムについての重要な知見を得ることが期待できる。

本研究では、コンデンシン複合体の詳細な結合領域の同定とその結合領域における機能の解明を目的とした。まず、ChIP-seq 法を用いて、コンデンシン I の分裂期ヒト染色体における結合領域を網羅的に同定した。次に、得られた結合領域でのコンデンシン I の機能や結合制御メカニズムについて解析した。同様に、コンデンシン II についても ChIP-seq 解析を行い、結合領域を同定した。さらに、得られた結合領域についてコンデンシン I と II で比較解析等を行い、これらの複合体による染色体凝縮メカニズムの解明を試みた。

第二章 結果

第一節 コンデンシン I のクロマチン免疫沈降の最適化

修士課程の研究において、コンデンシン I の分裂期染色体における結合領域を網羅的に同定するため、コンデンシン I (NCAPG サブユニット) の ChIP-seq 解析を行った。細胞はノコダゾールで分裂前中期に同調したヒト培養細胞株の HeLa 細胞を用い、細胞周期の同調性はフローサイトメトリー解析で確認した (図 4a)。得られたコンデンシン I の ChIP-seq データの可視化には本研究室で開発された ChIP-seq 解析ツール、DROMPA を用い (Nakato et al., 2013)、input DNA と比較して統計的に有意に濃縮している領域を結合領域として抽出した。その結果、3709 箇所のコンデンシン I 結合領域が同定され (図 4b, 結合プロファイル)、これらの結合領域の 80% が遺伝子の転写開始点 (Transcription start site, TSS) から上流と下流 5 キロベース (kb) 以内に位置していることが明らかとなった (図 4c)。さらに、NCAPG サブユニットの siRNA によってコンデンシン I をノックダウンした細胞で (図 4d)、ChIP シグナルが減少することがコンデンシン I の ChIP-quantitative PCR (qPCR) により確認された (図 4e)。また、コンデンシン I が主に細胞質に局在する G1 期では分裂期と比較してコンデンシン I の ChIP シグナルは顕著に低かった。これらの結果から、同定された結合領域が実際のコンデンシン I の結合に由来することが示された。この修士課程での研究においては、一般的なホルムアルデヒド処理による細胞固定と、Micrococcal nuclease (MNase) 処理とソニケーションを組み合わせた方法によりクロマチン断片化を行う、本研究室の標準的な ChIP-seq プロトコルを用いて実験を行った。しかしながら、類似のタンパク質構造をもつコヒーシンの ChIP-seq データと比較すると、コンデンシン I の総結合領域数は少なく、シグナル/ノイズ比も低かった。ChIP-seq 法は図 5a に示したように種々の行程から成り立っており、コンデンシン I に合わせて実験を最適化す

ることで、より高解像度に多くの結合領域を同定できると予想された。顕微鏡を用いたライブイメージング解析から、コンデンシン I のクロマチンへの結合はコンデンシン II と比較してよりダイナミックであることが示唆されている (Gerlich et al., 2006)。また、このようなダイナミックな結合様式をもつタンパク質の ChIP 解析を行う場合、標的タンパク質によっては固定反応時間を長くすることで ChIP 効率が上昇することが報告されている (Poorey et al., 2013)。一方で、過度の固定処理はクロマチンの断片化や可溶化、さらに抗原抗体反応を妨げることによって、最終的に ChIP 効率を低下させる方向に働く可能性もある。また、ChIP においてクロマチンの断片化には、ソニケーションが一般に用いられているが、上述のように MNase 処理によって断片化を行う手法も知られている。この手法はソニケーションよりも効率よく、ヌクレオソーム単位までクロマチンを断片化することができ、最終的に高解像度の ChIP-seq データが得られることもある (Kidder et al., 2011)。そこで、本研究ではシグナル/ノイズ比をより高め、真に近いコンデンシン I の結合領域を同定するために、コンデンシン I の ChIP において細胞固定法及びクロマチンの断片化の方法について検討を行った (図 5a)。

まず、クロマチンの断片化法の条件について検討した。HeLa 細胞をノコダゾール処理によって細胞分裂前中期に同調して回収し、ホルムアルデヒドで固定処理した。この固定細胞から単離したクロマチン分画を 6 回のソニケーション処理により DNA サイズ 300-700 bp 程度まで切断し、クロマチンの断片化を行った。また、これとは別に、単離したクロマチン分画をこれまでと同様に MNase 処理することで、主にモノ、ジヌクレオソームのサイズ (150-500 bp 程度) までクロマチンを断片化し、さらに 3 回のソニケーション処理を行った。両者のサンプルを用いて、コンデンシン I の結合を ChIP-qPCR で解析した (図 5b)。その結果、MNase 処理に比べて、ソニケーション処理のみでクロマチンを断片化したサンプルでは ChIP シグナルが低下していた。一方で、同時に行ったヒストン H3 の 9 番目のリジンのトリメチル化修飾 (H3K9me3) に対する抗体を用いた ChIP では、断片化処理の違いによる ChIP シグナルの変化はほとんど見られなかった (図 5c)。これらの結果から、コンデンシン I の ChIP では MNase 処理によるクロマチンの断片化法が、より安定にクロマチンへの結合を捉えられることが明らかとなった。ソニケーション処理でのクロマチン断片化の効率は、ソニケーションの強度と時間に依存にする。特に、コンデンシン I のような複合体を形成してクロマチンに結合する因子の ChIP においては、長時間のソニケーション処理によってタンパク質-タンパク質、あるいはタンパク質-DNA の相互作用が物理的に破壊され、ChIP 効率が低下してしまうのかもしれない。

タンパク質複合体を形成してクロマチンに結合する因子の ChIP においては、ホルム

アルデヒドによるタンパク質-DNA のクロスリンク反応に先立って、タンパク質-タンパク質のクロスリンク試薬で処理することで (二段階固定)、ChIP 効率が上昇する場合があることが知られている (Kurdistani, 2003; Nowak et al., 2005; Zhang et al., 2012)。そこで、次にこの二段階固定の検討を行った。分裂期に同調した細胞をタンパク質-タンパク質のクロスリンク試薬、Ethylene glycol bis(succinimidyl succinate) (EGS) によって処理した後、さらにホルムアルデヒドを添加し、二段階の固定処理を行った。また、コントロールとして、一般的なホルムアルデヒド処理のみで固定したサンプルの調製も行った。これらのサンプルを用いて、コンデンシン I の結合を ChIP-qPCR で解析した (図 5d)。その結果、二段階固定処理を行ったサンプルでは約 2 倍程度の ChIP シグナルの増加がみられた。一方で、コンデンシン I のノックダウンを行ったサンプルでは、固定処理による ChIP シグナルの増加は見られなかった。このことから、二段階固定処理でのコンデンシン I の ChIP シグナルの増加は単純なバックグラウンドの増加ではないと考えられた。そこで、二段階固定処理を行ったサンプルを用いてコンデンシン I の ChIP-seq 解析を行い、ホルムアルデヒド処理のみの ChIP-seq データと比較解析した。その結果、二段階固定処理を行ったサンプルにおいては、コンデンシン I の結合領域及び TSS での顕著な ChIP シグナルの増加に加えて (図 5e, f)、結合領域の数も大きく増加していた (図 5g)。コンデンシン I はタンパク質複合体を形成し、かつダイナミックにクロマチンに結合することから、EGS とホルムアルデヒドによる二段階固定はその結合をより安定化することで、ChIP 効率を向上させていると考えられる。

以上の検討結果から、MNase とソニケーション処理を組み合わせた手法によるクロマチンの断片化と、EGS とホルムアルデヒドによる二段階固定を用いることで、コンデンシン I の ChIP 効率がより高められ、シグナル/ノイズ比が上昇することが明らかとなった。これらの検討により、コンデンシン I の ChIP-seq プロトコールの最適化に成功した (Sakata et al., Methods Mol Biol., 投稿準備中)。

第二節 コンデンシン I の分裂期染色体上での結合領域の網羅的解析

第一節で最適化したコンデンシン I の ChIP-seq によって得られたデータを用いて、コンデンシン I のゲノムワイドな結合について再解析を行った。まず、染色体全域におけるコンデンシン I の局在を解析した。100 kb 毎に input DNA と比較してコンデンシン I の局在が見られる領域を解析したところ、顕微鏡観察での報告と一致して (Ono et al., 2004)、コンデンシン I は染色体全域、特にセントロメア近傍に強い局在がみられた (図 6a, 1 番染色体)。次に、より高解像度での局在を解析するために、500 bp 毎に

input DNA と比較して統計的に有意に濃縮している領域を抽出すると、7825 箇所がコンデンシン I の結合領域として同定された (図 6b, c, 結合プロファイル)。これらの結合領域と遺伝子領域との位置関係について比較解析したところ、70%がタンパク質をコードする遺伝子の TSS から上流と下流 5 kb 以内の領域に位置していた (図 7a, b)。さらに、遺伝子の転写活性との関係を調べるため、非同調の細胞における RNA-seq データを用いて遺伝子を発現量の高いものから低いものまで4つのグループに分類し、各遺伝子グループの TSS 近傍におけるコンデンシン I の結合プロファイルを解析した (図 7c)。その結果、遺伝子の TSS へのコンデンシン I の結合量と間期の転写活性には強い正の相関がみられた。ヒトの細胞において、主にタンパク質をコードする遺伝子の転写を行う RNA polymerase 2 (RNAP2) は promoter proximal pausing 機構により TSS 近傍に特に強く局在している (Adelman and Lis, 2012)。実際、非同調の細胞における RNAP2 の ChIP-seq 解析から、RNAP2 の結合領域は TSS 近傍に集中しており、分裂期におけるコンデンシン I の結合領域とよく一致していた (図 6b, 7d, コンデンシン I の結合領域の 82%)。さらに、タンパク質をコードする遺伝子に加えて、コンデンシン I は全体の 26%の tRNA 遺伝子 (全 tRNA 遺伝子 625 箇所のうち 164 箇所) の近傍に結合していた (図 6c)。この tRNA 遺伝子近傍の結合領域が実際のコンデンシン I に由来することは、コントロール及びコンデンシン I ノックダウン細胞を用いたコンデンシン I の ChIP-qPCR 解析によって確かめた (図 7e)。また、非同調の細胞における RNA polymerase 3 (RNAP3) の ChIP-seq データを用いた解析から、コンデンシン I が結合している全ての tRNA 遺伝子は間期において RNAP3 が結合していることが示された (図 7f, g)。

以上の結果から、間期に転写活性の高い、タンパク質をコードする遺伝子の TSS 及び tRNA 遺伝子の近傍に、コンデンシン I は細胞分裂前中期において特に強く結合していることが明らかとなった。

第三節 コンデンシン I による分裂期転写抑制とその染色体凝縮への影響の解析

ほ乳類の細胞において、分裂期の転写は強く抑制されていることが知られている。分裂期の進行と共に、RNAP2、RNAP3 及び基本転写因子のクロマチンからの解離が促進されて転写活性が抑制されるため、新規の RNA 合成は阻害される (Fairley et al., 2003; Gottesfeld and Forbes, 1997; Parsons and Spencer, 1997)。そこで、間期に転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に結合するコンデンシン I が、分裂期における転写抑制機構と関連しているかを検証した。最初に、細胞分裂前中期の細胞における RNAP2 の

ChIP-seq 解析を行ったが、非同調の細胞と比較してほとんど結合は見られず、これまでの報告と一致して、分裂期において RNAP2 は染色体から解離することが確かめられた (図 6b, 8a)。一方、興味深いことに、コンデンシン I をノックダウンした細胞では、RNAP2 の結合量と結合領域数の顕著な増加が見られ、さらにその増加した結合領域の約 70% はコンデンシン I の結合領域と一致した (図 6b, 8a, b)。RNAP2 の ChIP-qPCR でも同様に解析したところ、コンデンシン I のノックダウンにより約 1.5 から 2 倍の RNAP2 の結合量の増加が見られた (図 8c)。また、siRNA のオフターゲットによる影響を考慮して、これまでと異なる配列の NCAPG siRNA オリゴを用いたノックダウンでも、同じ傾向の結果が得られた (図 8d)。さらに、このコンデンシン I のノックダウンによる RNAP2 の結合の増加が RNAP2 特異的であるかを検証するため、分裂期において染色体腕部への結合がみられないコヒーシン (RAD21 サブユニット) で ChIP-qPCR 解析を行った。その結果、コンデンシン I のノックダウンでコヒーシンの結合の増加はほとんどみられなかった (図 8e)。続いて、コンデンシン I の RNAP3 に対する影響を同様に解析した。その結果、コンデンシン I をノックダウンした細胞において、RNAP2 と同様に、RNAP3 の結合量及び結合領域数の増加が見られ、その増加した RNAP3 が結合する tRNA 遺伝子の約 70% はコンデンシン I が結合する tRNA 遺伝子と一致していた (図 6c, 8f-h)。以上の結果から、コンデンシン I は分裂期において、RNAP2 と 3 の染色体からの解離を促進することが示唆された。

次に、コンデンシン I のノックダウンによって、上述のように結合がみられた RNAP2 が、転写伸長活性を有しているかどうかを検証した。この RNAP2 の結合の増加が、TSS に加えて遺伝子中央の領域及び転写終結点 (Transcription termination site, TTS) においてもみられるか、ChIP-qPCR で検証した。その結果、結合の増加がみられたのは TSS のみであった (図 9a, 上段)。また、TSS に結合した RNAP2 が転写伸長反応へ移行するには、RNAP2 に含まれるラージサブユニット RPB1 の C-terminal domain (CTD) リピートの 2 番目のセリンのリン酸化が必要であることが知られている。実際、このリン酸化型の RNAP2 (RNAP2 pS2) は TSS よりも遺伝子内部から TTS にかけて多く局在していることが知られている (Adelman and Lis, 2012)。そこで、このリン酸化を認識する抗体を用いて ChIP-qPCR 解析を行ったところ、RNAP2 pS2 は TSS 近傍に局在しており、転写伸長している RNAP2 に特徴的な遺伝子内部や TTS での局在は見られなかった (図 9a, 下段)。コンデンシン I のノックダウンで RNAP2 による転写伸長が増加していないことを更に確認するため、コンデンシン I をノックダウンした細胞において、分裂期と分裂直後の G1 初期における新規 RNA 合成を Reverse transcription (RT)-qPCR 解析で検証した。新規に合成された RNA はエクソンとイン

トロン境界を含む領域を増幅するプライマーペアを用いて、RNA スプライシング前の未成熟な RNA 由来の配列を検出することで定量した。その結果、RNAP2 の ChIP-qPCR 解析の結果に一致して、コンデンシン I をノックダウンした分裂期の細胞において、コントロール細胞と比較して新規 RNA 合成の増加はみられなかった (図 9b)。以上の結果から、分裂期染色体においてコンデンシン I のノックダウンにより増加した遺伝子の TSS への RNAP2 の結合は、転写伸長を伴わないことが示唆された。クロマチン上で転写伸長が進行するためには RNAP2 の転写開始点への結合及びリン酸化による活性化だけでなく、多くの転写伸長因子が必要であり、これらの因子はコンデンシン I の存在とは関係なく分裂期において不活化されているのかもしれない。また、Transcription termination factor 2 (TTF2) は分裂期の転写抑制に機能することが知られている因子の一つである (Jiang et al., 2004)。この TTF2 のノックダウンでも BRD2 遺伝子の TSS 近傍で RNAP2 の結合の増加がみられた (図 9a)。さらに、この因子に加えてコンデンシン I をノックダウンした細胞においては、それぞれを単独でノックダウンした場合と比較して、より RNAP2 の結合が増加していた。少なくとも一部の遺伝子について、コンデンシン I と TTF2 は相乗的に RNAP2 を分裂期染色体から排除しているのかもしれない。

これまでの結果から、コンデンシン I のノックダウンにより、RNAP2 の分裂期染色体への結合が増加することが明らかとなった。一方で、この結合の増加がコンデンシン I の RNAP2 を積極的に染色体から排除する活性が抑制された結果であるのか、もしくは正常な染色体凝縮進行の阻害に伴って副次的に RNAP2 の染色体からの解離が抑制されたのかは不明である。この点を明らかにするため、分裂期に同調した細胞に熱ショックの刺激を与え、コンデンシン I が結合する熱ショック応答遺伝子への RNAP2 の結合を ChIP-qPCR により検証した (図 9c)。その結果、分裂期の細胞に熱ショック刺激を与えても RNAP2 の熱ショック応答遺伝子への結合の増加はみられなかった。一方で、コンデンシン I をノックダウンした分裂期の細胞においては、熱ショック刺激に応じて遺伝子の TSS への RNAP2 の結合の増加がみられた。この結果から、コンデンシン I は積極的に RNAP2 を分裂期染色体から排除する機能を有していることが示唆された。

次に、RNAP2 の分裂期染色体への結合が染色体凝縮へ影響するかどうかを検証した。コンデンシン I をノックダウンした細胞の分裂期染色体は通常と比較して肥大化する異常の表現型を示す (Ono et al., 2003) (図 9d)。そこで、この表現型に対し、転写阻害剤 1,10-phenanthroline または Triptolide による処理を行い、コンデンシン I のノックダウン細胞において RNAP2 の染色体への結合を阻害したときの影響を観察した (図 9d)。1,10-phenanthroline は Zn イオンをキレートすることで RNAP2 の DNA への結

合を抑制し、Triptolide は cyclin-dependent kinase 7 (CDK7) 依存的に RNAP2 の分解を促進することでそれぞれ転写を阻害する (Wang et al., 2011)。染色体像の観察の結果、転写阻害剤処理の有無に関わらず、コンデンシン I ノックダウンによる染色体肥大化の表現型が観察された。この結果から、染色体上における RNAP2 の存在自体は染色体凝縮の進行に影響しないことが示唆された。

第四節 ヒト rDNA 領域におけるコンデンシン I の結合解析

これまでに、酵母においてコンデンシン I は rDNA 領域に局在することがゲノムワイドな解析により知られていることから (D'Ambrosio et al., 2008; Wang et al., 2005)、ヒト細胞でもこの領域における局在解析を行った。ヒトの rDNA 領域は高度な繰り返し配列であるため、一般的な ChIP-seq 解析に用いられるヒトリファレンスゲノムには配列情報が含まれていない。従って、ここまで行ってきたような通常の ChIP-seq 解析法ではコンデンシン I のヒト rDNA 領域への結合を検証できない。そこで、Zentner らが考案したヒト rDNA 領域での ChIP-seq 解析パイプライン (Zentner et al., 2011) にならい、今回取得したコンデンシン I ChIP-seq データを用いて rDNA 領域における解析を行った (図 10a)。まず、1 単位分のヒト rDNA 繰り返し配列をヒトリファレンスゲノムに加え、そのヒトリファレンスゲノム (ここでは human reference rDNA plus genome と呼ぶ) に特異的にマッピングされるリードのみを用いて解析を行った。この ChIP-seq プロファイルにおいて、コンデンシン I は rDNA 領域全域に渡って局在が見られ、特にプロモーター領域において若干多く局在していた (図 10b)。この rDNA 領域への局在が実際にコンデンシン I に由来することを、コンデンシン I をノックダウンした細胞において、コンデンシン I の ChIP-qPCR を行い、ChIP シグナルの減少を以て確かめた (図 10c, 左)。また、同様に非同調と分裂期の細胞における RNA polymerase 1 (RNAP1, PAF53 サブユニット) の局在を ChIP-seq により解析した (図 10b)。その結果、非同調の細胞において RNAP1 は rDNA のプロモーター及びコード領域に結合がみられた。一方で、分裂期においては RNAP1 の結合は間期と比較して大幅に減少しており、その結合はコンデンシン I のノックダウン細胞でほとんど変化はみられなかった。RNAP1 の ChIP-qPCR 解析でも同様の傾向を示した (図 10c, 右)。

以上の結果から、酵母と同様に、ヒト細胞においてもコンデンシン I は rDNA 領域に結合することが明らかとなった。分裂期において RNAP1 の rDNA 領域への結合は抑制されていた一方で、コンデンシン I のノックダウンによる RNAP1 の結合量の変化はみられなかった。

第五節 コンデンシン I の分裂期染色体への結合メカニズムの解析

コンデンシン I の ChIP-seq 解析から、コンデンシン I は間期に転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に結合していることが明らかとなった。分裂期は転写が強く抑制されているが、分裂期進入直後に未だ遺伝子領域に存在する RNAP2 と RNAP3 自体を標的としてコンデンシン I が染色体に結合してくる可能性も考えられた。そこで、分裂期の細胞を転写阻害剤 Triptolide または SNS-032 (CDKs を阻害することで RNAP2 の活性化を妨げる) で処理し、コンデンシン I の結合を ChIP-qPCR により解析した。その結果、転写阻害剤処理によるコンデンシン I の結合の減少はみられなかった (図 11a)。基本転写因子の一つである TATA-binding protein (TBP) はすべての RNA ポリメラーゼによる転写誘導に必要であることに加えて (Vannini and Cramer, 2012)、分裂期においてコンデンシン I と相互作用するという報告がある (Xing et al., 2008)。そこで、TBP を siRNA でノックダウンした分裂期の細胞において、コンデンシン I の ChIP-qPCR 解析を行った (図 11b)。その結果、TBP のノックダウンでコンデンシン I の結合にはほとんど変化がみられなかった。以上の結果から、コンデンシン I の遺伝子の TSS 近傍への結合は RNAP2 や TBP などの転写装置そのものには依存しないことが示唆された。コンデンシン I は転写に伴う何らかのクロマチン構造を結合の標的としている可能性が考えられた。

コンデンシン複合体のコアサブユニットである SMC2-SMC4 ヘテロダイマーは二重鎖 DNA より単鎖 DNA に高いアフィニティーを持ち、相補的な単鎖 DNA 同士での二重鎖 DNA の形成を促進する活性があることが知られている (Sakai et al., 2003; Sutani and Yanagida, 1997)。また、転写において鋳型となる DNA は二重鎖から単鎖 DNA に開裂することが必要であり、コンデンシン I はこのような単鎖 DNA 構造を標的として染色体に結合していることが考えられた。そこで、コンデンシン I が TSS 近傍で単鎖 DNA に結合しているかを検証した。コンデンシン I の ChIP により得られた DNA を免疫沈降用のビーズ上で、単鎖 DNA 及び RNA を特異的に消化するヌクレアーゼ P1 で処理し、精製した DNA を qPCR で解析した (図 11c)。その結果、ヌクレアーゼ P1 で処理したサンプルではコンデンシン I の ChIP シグナルが顕著に減少したことから、コンデンシン I で ChIP された DNA には単鎖 DNA が含まれることが明らかとなった。このことから、遺伝子の TSS 近傍に生じた単鎖 DNA 構造を標的としてコンデンシン I が結合することが示唆された。

近年、CpG island (CGI) が近くに存在する遺伝子の TSS 直近の下流領域で、長く安定な DNA-RNA ハイブリットを含む R-loop 構造が形成されることが報告されている (Ginno et al., 2012)。この R-loop 構造は新規に合成されたグアニンリッチな RNA が鋳

型となったシトシンリッチな DNA とリアニールリングすることで形成され、鋳型でないグアニンリッチな DNA は単鎖構造となる。そこで、今回得られた遺伝子の TSS 近傍のコンデンシン I 結合領域について DNA 配列の解析を行ったところ、これらの実に 94%において、その 1kb 以内の領域に CGI が存在することが明らかとなった (図 11d)。CGI が近傍に存在するコンデンシン I 結合領域は、CGI が近傍に存在しない結合領域と比べて 9.6 倍の高頻度でみられた。分裂期においても R-loop 構造が維持されているかは不明であるが、この構造に伴って生じた単鎖 DNA 構造は分裂期でも自然には解消されず残留し、この単鎖 DNA にコンデンシン I が結合することも考えられる。続いて、R-loop またはそれに由来する単鎖 DNA 構造の染色体凝縮への影響を検証した。転写や RNA 輸送制御に関わるタンパク質である THOC1 を欠損させた細胞では、R-loop 構造が染色体上で蓄積することが知られている (Castellano-Pozo et al., 2013; Domínguez-Sánchez et al., 2011)。そこで、THOC1 を siRNA によってノックダウンし、分裂期染色体の表現型を観察した (図 11e)。THOC1 のノックダウン効率は、RT-qPCR により確認した。その結果、THOC1 をノックダウンした細胞においては全体の 46%で肥大化した異常な染色体が観察され、その割合はコンデンシン I をノックダウンした細胞とほぼ同程度であった。また、コンデンシン I と THOC1 の両方をノックダウンした細胞においては異常な表現型がみられる割合が 83%まで増加した。この結果から、R-loop またはそれに由来する単鎖 DNA 構造が存在すると、染色体凝縮の妨げとなることが示唆された。

第六節 コンデンシン II と DNA トポイソメラーゼ II α の分裂期染色体上での結合領域の網羅的解析

多くの真核生物ではコンデンシン I に加えて、コンデンシン II も正常な分裂期染色体凝縮に必須である (Hirano, 2012; Hudson et al., 2009; Thadani et al., 2012)。また、コンデンシン複合体に加えて、DNA トポイソメラーゼ II も分裂期染色体凝縮において重要な役割を果たしていることが知られている (Baxter and Aragón, 2012; Moser and Swedlow, 2011)。ヒト細胞において DNA トポイソメラーゼ II は α (TOP2A) と β (TOP2B) のふたつのサブタイプが存在し、分裂期においてはほとんど TOP2A のみが染色体上に局在している (Christensen et al., 2002; Meyer et al., 1997)。しかしながら、コンデンシン II と TOP2A が実際に分裂期染色体上でどのように機能することで染色体凝縮に寄与しているのか、また、コンデンシン I を含め、これらの相互関係はどのようなものであるのかについては未知な点が多い。そこで、コンデンシン I と同様に、分裂期の HeLa 細胞を用いてコンデンシン II (NCAPH2 サブユニット) と TOP2A の

ChIP-seq 解析を行った。最初に、染色体全域における局在を解析したところ、コンデンシン II は染色体全域に渡って局在がみられたものの、セントロメア近傍においてはコンデンシン I ほど多くの局在はみられなかった (図 12a, 2 番染色体)。セントロメア のより中心付近の領域は高度な繰り返し配列であるためにヒトリファレンスゲノムには含まれておらず、今回の ChIP-seq 解析ではこのような領域における局在は捉えられない。コンデンシン II がインナーキネトコア領域へ局在することがこれまでに観察されていることから (Ono et al., 2004)、コンデンシン II は今回の ChIP-seq 解析で捉えられていないセントロメアの中心付近の領域にコンデンシン I より限局している可能性が考えられる。一方で、TOP2A の ChIP-seq 解析では、セントロメア周辺の強い局在に加えて、染色体腕部領域への局在もみられた。この局在はこれまでの顕微鏡観察による報告と一致している (Christensen et al., 2002; Taagepera et al., 1993)。次に、より高解像度で統計的に有意な結合領域を抽出したところ、ゲノム全体でコンデンシン II は 5982 箇所、TOP2A は 27806 箇所がそれぞれ同定された (図 12b, 結合プロファイル)。これらの結合領域を遺伝子領域と比較したところ、コンデンシン I と同様に、コンデンシン II の結合領域の 89% が遺伝子の TSS から上流と下流 5 kb 以内に集中していた (図 12c)。TOP2A の結合領域も約半数は遺伝子の TSS 近傍の領域に局在し、それ以外の領域では主に遺伝子内部や下流の領域に局在がみられた (図 12d)。また、コンデンシン II と TOP2A の遺伝子の TSS への結合は、コンデンシン I と同様に、間期の細胞の転写活性と正の相関がみられた (図 12e)。そこで、次にこれらの結合領域とコンデンシン I 結合領域について比較解析を行った (図 12f)。コンデンシン I 結合領域におけるコンデンシン II、TOP2A 結合領域との重なる割合はそれぞれ 46% と 75% であった。また、コンデンシン II の結合領域の実に 93% が TOP2A の結合領域と重なった。これらの ChIP-seq 解析で得られた結合領域が実際のコンデンシン II と TOP2A に由来するかどうかを、これらをそれぞれノックダウンした細胞を用いた ChIP-qPCR 解析で検証した。その結果、コンデンシン II と TOP2A をノックダウンした細胞において、それぞれ ChIP シグナルの減少が確認できた (図 13a, b)。

コンデンシン II の ChIP で得られた DNA についても、コンデンシン I での解析と同様に、単鎖 DNA 特異的なヌクレアーゼ P1 で処理したところ、コンデンシン I ほどではないものの qPCR により ChIP シグナルの若干の低下がみられた (図 14)。

以上の結果から、コンデンシン I に加え、コンデンシン II と TOP2A も分裂期染色体において、間期に転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に結合し、その一部の結合領域はコンデンシン I、II と TOP2A でオーバーラップすることが示唆された。

第七節 コンデンシン I、II と DNA トポイソメラーゼ II α の相互関係の解析

コンデンシン I、II と TOP2A の遺伝子の TSS 近傍への結合が互いにどのように関係しているのかを検証するため、これらの因子のどれか一つを欠損させて、残りの因子の結合の変化を解析した。siRNA によりコンデンシン II をノックダウンした分裂期の細胞においてコンデンシン I の ChIP-seq を行ったところ、興味深いことに、コンデンシン I の結合量及び、統計的に有意な結合領域数の顕著な増加がみられた (図 12b, 15a)。反対に、コンデンシン I をノックダウンした細胞でのコンデンシン II の ChIP-seq 解析において、コンデンシン II の結合量及び結合領域数の変化はみられなかった (図 12b)。その一方で、コントロールとノックダウンで同定された結合領域は約半数で重ならず、両者の間で結合領域の位置は変化していた (図 15b)。そこで、それぞれで得られたコンデンシン II の結合領域において、コンデンシン II の結合プロファイルをそれぞれの ChIP-seq データについて解析したところ、どちらの領域においてもあまり変化はみられなかった (図 15c)。従って、コンデンシン I のノックダウンにより新たに同定されたコンデンシン II の結合領域は、コントロールにおいてもある程度コンデンシン II が結合しており、ノックダウン処理により結合量が若干増加したことで統計的に有意な結合として判定された結果であると考えられる。これらの解析から、コンデンシン I のノックダウンにより、コンデンシン II の結合プロファイルは大きく変化していないことが示唆された。次に、コンデンシン I と II の結合変化をさらに詳細に明らかにするため、今回の解析で得られたコンデンシン I、II の結合領域を、(i) コンデンシン I のみの結合領域、(ii) コンデンシン I と II が重なる結合領域、(iii) コンデンシン II のみの結合領域の三つに分類し、それぞれの領域における結合プロファイルを解析した (図 15d)。コンデンシン II をノックダウンした細胞において、コンデンシン I は (i) から (iii) の全ての領域において結合量が増加していた。特にコンデンシン II の結合する (ii) と (iii) の領域では結合の増加の割合が大きかった。一方で、コンデンシン I をノックダウンした細胞では、どの領域においてもコンデンシン II の結合にほとんど変化はみられなかった。以上の解析と同様の結果がコンデンシン I と II の ChIP-qPCR 解析でも得られた (図 15e, f)。次に、TOP2A の siRNA で処理した分裂期の細胞においてコンデンシン I と II の ChIP-qPCR 解析を行った (図 15g)。その結果、コンデンシン I は検証した 4 つのサイトの全てで結合の増加がみられた一方で、コンデンシン II の結合はほとんど変化がなかった。これらの解析と並行して、ウェスタンブロッティングによりコンデンシン I のクロマチン分画における結合の解析を行ったところ、コンデンシン II 及び TOP2A ノックダウン細胞において、コンデンシン I のタンパク量に変化はみられなかった (図 13a, b, 下のウェスタンブロッティング)。これらの結果から、

ChIPにおけるコンデンシン I の結合の増加は染色体全体で結合量が増加したのではなく、主に染色体上での局在の変化によるものであることが示唆された。コンデンシン I はコンデンシン II や TOP2A のノックダウンにより遺伝子の TSS 近傍に生じた染色体の異常な構造を認識し、それを解消するために結合が局所的に増加するのかもしれない。

次に、コンデンシン I と II をノックダウンした分裂期の細胞において ChIP-qPCR により TOP2A の結合の解析を行った (図 15h)。コンデンシン II と TOP2A は結合領域がよくオーバーラップすることから、コンデンシン II が局在する TOP2A の結合領域に着目した。その結果、コンデンシン I と II の両方が局在する領域ではコンデンシン I 単独及びコンデンシン I と II の両方をノックダウンした細胞において TOP2A の結合の顕著な減少がみられた。また、コンデンシン II のみが局在する領域ではコンデンシン I と II の両方をノックダウンした細胞において TOP2A の結合が減少した。これらの結果から、コンデンシン I と II の両方が局在する結合領域では TOP2A は主にコンデンシン I 依存的に結合することが示された。一方で、コンデンシン II のみが局在する領域ではコンデンシン I と II の両方をノックダウンした細胞でのみ TOP2A の結合の減少がみられたことから、これらの領域においては I と II のどちらかに依存して結合することが示唆された。コンデンシン II のノックダウンのみでは TOP2A の結合の減少はみられなかったが、上述の解析によりコンデンシン II のノックダウンではコンデンシン I の結合が増加することが明らかとなっている。この点を考慮すると、コンデンシン II をノックダウンした場合は増加したコンデンシン I が減少したコンデンシン II の代わりに TOP2A のリクルートに機能しているのかもしれない。

第三章 結論と考察

第一節 コンデンシン複合体の遺伝子の TSS 近傍における局在

本研究の ChIP-seq 解析により、細胞分裂前中期のヒト染色体において、コンデンシン I が遺伝子の TSS 近傍に強く局在することを明らかにした。また、tRNA 遺伝子と rDNA 領域におけるコンデンシン I の局在も示した。この結果に一致して、酵母では ChIP-chip 解析により、コンデンシン (ヒト細胞におけるコンデンシン I) の tRNA 遺伝子と rDNA 領域における局在がこれまでに報告されている (D'Ambrosio et al., 2008; Wang et al., 2005)。また、本研究室の須谷博士により行われた分裂酵母の ChIP-seq 解析から、タンパク質をコードする遺伝子の特に転写終結点近傍にコンデンシンが転写依存的に結合することが明らかとなっている (Sutani et al., 2015)。分裂酵母ではヒト細胞ほど分裂期の転写は抑制されておらず、ChIP-seq とその他の解析から、コンデンシンが転写によって生じた単鎖 DNA 構造を標的として分裂期染色体に結合することが強く示唆されている。一方で、ヒトの細胞では分裂期の転写が強く抑制されているが、コンデンシン I は間期に転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に結合することと、それらの結合領域に単鎖 DNA 構造が含まれることを本研究において明らかにした。コンデンシン I の間期に転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍における強い局在は、ニワトリ由来の DT40 細胞を用いた分裂期のコンデンシン I の ChIP-seq 解析においても報告されている (Kim et al., 2013)。また、コンデンシン I は TSS 近傍の CGI とよく共局在することが本研究から示された。最近になって、このような領域では長く安定な DNA-RNA ハイブリットの R-loop 構造が形成されることが報告されている (Ginno et al., 2012)。以上のことから、分裂期直前の転写によって生じた単鎖 DNA または R-loop 構造が分裂期に入っても自然に解消されず残存しており、このような構造を標的としてコンデンシン I が染色体へ結合していると考えられる。

これまでの報告から、コンデンシン I の染色体への結合制御は生物種やゲノム領域毎に異なると考えられる。出芽酵母における tRNA 遺伝子へのコンデンシンのリクルートには、コヒーシンローダーである Scc2/4 と転写因子 TFIIB/C が機能している (D'Ambrosio et al., 2008; Haeusler et al., 2008)。分裂酵母では、転写に伴うトポロジカルストレスに依存して、コンデンシンが tRNA 遺伝子に結合することが示唆されている (Legros et al., 2014)。rDNA 領域においては、出芽酵母では cdc14 フォスファターゼによる RNAP1 の転写抑制によってコンデンシンの結合が促進される一方で (Clemente-Blanco et al., 2009; Wang et al., 2006)、分裂酵母では RNAP1 のラージサブユニット及びそのローダーが局在に必要である (Nakazawa et al., 2008)。セントロ

メア領域では、キネトコアタンパク質によってコンデンシンの局在が制御されている (Nakazawa et al., 2008; Tada et al., 2011)。本研究では、RNAP2、3 による転写によって生じた特殊な DNA 構造を標的として、コンデンシン I が染色体に結合することが示唆された。一方で、最近になって、僅か六種類のタンパク質因子、コアヒストン、三つのヒストンシャペロン (Nucleoplasmin, Nap1, FACT)、トポイソメラーゼ II、そしてコンデンシン I によって *in vitro* の実験系では分裂期染色体が再構成できることが報告された (Shintomi et al., 2015)。これらの報告から総合的に考えると、現在までのところ、コンデンシン I が染色体へ結合する上で何が実際に重要なのかについてはよくわからない点が多い。コンデンシン I の分裂期染色体への結合メカニズムは非常に多様で複雑であり、*in vivo* と *in vitro* の両方の実験系で今後もさらなる解析が必要であると思われる。

本研究では、コンデンシン I と同様に、コンデンシン II も遺伝子の TSS 近傍に強く局在することを示した。これまでに、非同調のマウス ES 細胞及び線虫の発生期胚 (多くが非同調の細胞) におけるコンデンシン II の ChIP-seq 解析から、コンデンシン II が転写活性の高い遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域に結合することが報告されていた (Downen et al., 2013; Kranz et al., 2013)。一方で、分裂期染色体におけるコンデンシン II の局在の詳細は不明であったが、分裂期におけるコンデンシン II の結合量も間期の転写量と正に相関していることが本研究により示された。間期と分裂期におけるコンデンシン II の動態及び機能の関連はまだ不明な点が多いが、間期と分裂期の間でコンデンシン II は共通の領域に結合しているのか等について今後解析していく必要がある。

本研究により、コンデンシン I と II の結合領域は一部オーバーラップすることが明らかとなった。この結果は顕微鏡観察における、コンデンシン I と II が姉妹染色分体の軸上に比較的重複せずに局在しているという報告と異なる (Maeshima and Laemmli, 2003; Ono et al., 2003)。これらの解析結果の差は以下の理由から生じていると考えている。まず、ChIP-seq 解析により同定された結合領域は他の領域よりも強い局在のみられる統計的に有意な領域として抽出しているが、これはそれ以外の領域に標的タンパク質が結合していないことを示しているわけではない。実際、本研究におけるコンデンシン I と II の ChIP-qPCR 解析において、統計的に有意な結合領域以外にもこれらの複合体がある程度の量は結合していることが示されている (図 4e, 13a, NS のサイト)。また、ChIP-seq 解析と顕微鏡解析ではその解像度は大きく異なっており、ChIP-seq の通常の解析で抽出される結合領域は数百から数千ベースのサイズであるのに対して、顕微鏡解析はより大局的である。従って、低解像度の ChIP-seq プロファイ

ルの方が顕微鏡解析でみられる結果とより相似であることが期待される。実際、[図 6a, 12a](#) のような大きなスケールで局在プロファイルの解析を行うと、コンデンシン I と II で比較的違った局在パターンを示し、I についてはセントロメア近傍の局在なども見える。さらに、分裂期染色体は高度に折りたたまれて高次構造を形成している一方で、ChIP-seq プロファイルは DNA 塩基配列上での局在を表しており、それらが染色体上でどのように相互作用して高次構造を形成しているかは不明である。このような高次構造を DNA 塩基配列レベルで明らかにするためには、Hi-C や Chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing (ChIA-PET) のような手法を用いて、今後分裂期染色体を解析していく必要がある (Dekker et al., 2013)。

顕微鏡解析における染色体上の因子の詳細な局在は、現在のところ、分裂期染色体をスプレッドして観察する方法が一般的である。しかしながら、ここで観察される局在が、実際の細胞内での局在と必ずしも同一である保証はない。顕微鏡解析においても、今後より生理条件に近い染色体の構造を超解像顕微鏡のような手法で解析することが必要である。今後これらの問題を解決することによって、ChIP-seq と顕微鏡の両解析の間で統一的な見解が得られると思われる。

第二節 コンデンシン I による分裂期の RNA ポリメラーゼの排除

本研究において、コンデンシン I は分裂期において RNAP2、3 の排除に機能することが示唆された。高等真核生物細胞での分裂期における転写の抑制メカニズムとしては、分裂期特異的に活性化するキナーゼのリン酸化修飾を介した転写因子や RNA ポリメラーゼの染色体からの乖離の促進や転写終結因子 TTF2 が機能することがこれまでに報告されている (Fairley et al., 2003; Gottesfeld and Forbes, 1997; Jiang et al., 2004; Parsons and Spencer, 1997)。コンデンシン I が積極的に RNAP2 を染色体から排除する機能を有するかは不明であるが、本研究においてコンデンシン I をノックダウンした細胞に熱ショック刺激を加えたところ、熱ショック応答遺伝子への RNAP2 の結合が誘導された。この結果から、コンデンシン I は RNAP2 の遺伝子への新たなローディングを抑制することが示唆された。通常 of 分裂期細胞においても、間期に転写活性の高い遺伝子のプロモーターは転写を誘導する活性を弱く残しており、コンデンシン I はこのような領域への RNAP2 のローディングを抑制しているのかもしれない。また、コンデンシン I は *in vitro* において DNA に正の超らせんを導入する活性と相補的な単鎖 DNA 同士 of 二重鎖形成を促進する活性が知られている。コンデンシン I はこれらの活性を細胞内で発揮して、TSS 近傍における DNA 構造を変化させることで RNA ポリメラーゼの結合を抑制しているのかもしれない。

RNAP2、3 と異なって、コンデンシン I ノックダウンで分裂期の RNAP1 の結合量の増加はみられなかった。今回の解析は rDNA 繰り返し領域を 1 単位分の配列で解析しているため、転写活性の高い rDNA 領域と不活性な領域を区別できていない。従って、コンデンシン I のノックダウンによって仮に転写活性の高い rDNA 領域で RNAP1 の結合が変化していたとしても、転写が不活性な領域と一緒に平均化されてしまうことでその変化が捉え難くなっている可能性がある。また、RNAP1 の染色体上での動態はサブユニットによって報告が異なっており、分裂期でも染色体への結合が維持されているものとそうでないものがある (Gottesfeld and Forbes, 1997; Hernandez-Verdun, 2011; Voit et al., 2015)。従って、今回解析で用いたもの以外の他のサブユニットでもコンデンシン I のノックダウンによる結合の変化を解析してみる必要がある。

分裂期に転写が抑制されている一方で、分裂期直後に細胞はすぐに転写を再活性化する必要があるので、トリの DT40 細胞において、コンデンシン I をノックアウトすると G1 初期の遺伝子発現上昇の遅延がみられることが報告されていることから、コンデンシン I は分裂直後の遺伝子の再活性化にも関与していることが示唆されている (Kim et al., 2013)。本研究において、コンデンシン I のノックダウンで転写伸長を行わない不完全な RNAP2 の増加がみられたが (図 9a, b)、このような RNA ポリメラーゼは分裂後の転写を阻害する可能性が考えられる。分裂期において一度これらの RNA ポリメラーゼが排除されることが、分裂後の迅速な転写の再活性化には必要なかもしれない。また、分裂直後の選択的な転写の再活性化には、分裂期における一部のヒストンのアセチル化修飾や転写因子の結合の維持が重要であることが知られている (Blobel et al., 2009; Kadauke et al., 2012; Young et al., 2007; Zhao et al., 2011)。コンデンシン I もこれらの制御に関わる可能性があり、今後さらなる解析が必要である。

第三節 単鎖 DNA と R-loop 構造の染色体凝縮への影響

本研究において、分裂期における R-loop または単鎖 DNA 構造の蓄積は染色体凝縮を妨げることが示唆された。コンデンシン I の単鎖 DNA への結合と、単鎖 DNA 同士を二重鎖に巻き戻す活性を考慮すると、コンデンシン I は R-loop や単鎖 DNA 構造を解消することで染色体凝縮を促進していると考えられる (図 16)。

本研究と並行して行われた分裂酵母における解析では、コンデンシンの変異株の示す染色体凝縮欠損が転写抑制により相補されることが明らかとなった (Sutani et al., 2015)。また、染色体分配異常が観察された細胞では単鎖 DNA に結合するタンパク質である RPA の結合が増加していた。さらに、単鎖 DNA に結合しにくい RPA 変異はコンデンシンの変異による染色体凝縮異常の表現型を回復することが報告されている

(Akai et al., 2011)。以上のことから、コンデンシン I の機能は分裂酵母とヒトの間で保存されており、どちらも染色体凝縮を妨げる単鎖 DNA のような構造に結合し、その構造を解消することで凝縮を促進していると考えられた。

コンデンシン I による単鎖 DNA 構造の解消の仮説は、序論で述べたコンデンシン複合体による超らせん構造の導入を介した染色体凝縮モデルに組み込める。超らせんの導入による二重鎖 DNA の折り畳みの前に、単鎖 DNA 構造が解消される必要があるとすると、単鎖 DNA 構造が染色体凝縮を妨げることとコンデンシン I がこの構造を生じる転写活性の高い領域によく結合することの辻褄が合う (図 16)。本研究におけるコンデンシン I の ChIP-seq / qPCR 解析では統計的に有意の顕著な結合領域以外にも、コンデンシン I が染色体全体にある程度の割合で弱く結合していることが示唆されている (図 4e, NS のサイト)。これらの全体的な弱い結合がコンデンシン I によるグローバルな染色体 DNA の折り畳みを表しているのかもしれない。最近ではスパイクインゲノムを標準化に用いることで、より定量的に標的タンパク質の結合を解析できる ChIP-seq の手法が考案されている (Hu et al., 2015; Orlando et al., 2014)。これらの手法を用いることで、このような弱い結合もより定量的且つ網羅的に検証できると思われる。

第四節 コンデンシン I、II と TOP2A の分裂期染色体上での連携

本研究では、コンデンシン I、II と同様に、ヒト細胞で分裂期染色体凝縮に重要な役割を果たす TOP2A の ChIP-seq 解析を行い、そのゲノムワイドな結合領域を明らかにした。コンデンシン I、II の ChIP-seq データとの比較解析の結果、これら三者の結合領域は TSS 近傍において一部オーバーラップしていた。また、これらの結合領域の少なくとも数カ所で、TOP2A の結合はコンデンシン I または II に依存していたことから、コンデンシン複合体と TOP2A の連携が示唆された。

顕微鏡観察による解析により、コンデンシン I、II に共通のコアサブユニットである SMC2 または SMC4 の欠損で TOP2A の異常な局在がみられることがこれまでに報告されている (Coelho, 2003; Hudson et al., 2003; Samejima et al., 2012)。本研究では遺伝子の TSS 近傍のより詳細な領域におけるコンデンシン複合体と TOP2A の相互関係をヒト細胞において明らかにした。分子活性に着目すると、DNA トポイソメラーゼ II は二重鎖 DNA を同時に切断し、その間を別の二重鎖 DNA が通過する反応を触媒することで、絡み合った二重鎖 DNA 同士を解くデカテネーション活性を有している (Chen et al., 2013; Wang, 2002)。この活性が DNA トポイソメラーゼ II が染色体凝縮を促進する上で重要な役割を果たしていると考えられている。最近になって、トポイソメラーゼ II を欠損した出芽酵母において、コンデンシン依存的に環状 DNA に正の超

らせんの蓄積がみられることが報告されている (Baxter et al., 2011)。同時に、*in vitro* の実験において超らせんをもつ絡み合った DNA 同士は超らせんのない DNA と比較して、トポイソメラーゼ II によってデカテネーションされやすいことが示された。以上の結果はコンデンシンによる絡み合った DNA への正の超らせんの導入が、これらの DNA のデカテネーションを促進することを示唆している。本研究による解析から、TSS 近傍においてコンデンシン I または II によって単鎖 DNA が二重鎖に巻き戻されてから、DNA の正の超らせん構造が導入されると思われる。次いで、生じた DNA 構造を認識して TOP2A がリクルートされることで DNA のデカテネーションが促進されている可能性が考えられる。非同調のマウス ES 細胞において TOP2A はプロモーター領域に結合し、転写制御に関わることが報告されている (Thakurela et al., 2013)。コンデンシン II が同様にプロモーター領域に結合することから (Downen et al., 2013)、間期においてもコンデンシン II は TOP2A の染色体へのリクルートに寄与しているのかもしれない。

第五節 染色体凝縮におけるコンデンシン I と II の役割の違い

本研究において、コンデンシン II と TOP2A をノックダウンにより、コンデンシン I の結合の増加がみられた。コンデンシン II や TOP2A は、分裂期においてコンデンシン I よりも先に染色体に結合して凝縮に機能することから、両因子の欠損によって単鎖や絡み合った DNA 構造が解消されずに蓄積することで、コンデンシン I の結合が促進されているのかもしれない。こういった染色体凝縮を妨げるような DNA 構造を標的としてコンデンシン I は染色体に結合し、それらの解消を促進することで染色体凝縮に寄与していることが考えられる。一方で、本研究の解析では、コンデンシン I や TOP2A のノックダウンでコンデンシン II の局在に変化はみられなかった。このことから、コンデンシン II の分裂期染色体への結合は、コンデンシン I と異なり、単鎖や絡み合った DNA のような構造を主な標的としない可能性がある。これまでに、コンデンシン II のクロマチンへの結合の標的として、ヒストン H4 の 20 番目のリジンのモノメチル化修飾が知られている (Liu et al., 2010)。また、コンデンシン II は一度染色体に結合すると安定に結合したままである傾向がコンデンシン I より強いことが報告されている (Gerlich et al., 2006)。これらのことから、コンデンシン II は、I に先立って分裂期染色体の特定の領域に結合し、第一段階の染色体 DNA の折り畳みを行うと思われる (図 17)。次いで、コンデンシン I が核膜崩壊後に異常な DNA 構造を主な標的として結合し、それらの解消を促進しつつ、より細かく染色体 DNA の折り畳みを進めることで第二段階の凝縮反応に寄与しているのではないかと推測される。このようなコンデンシン

I と II による二段階の凝縮メカニズムにより、正確な分裂期染色体構造の構築が遂行されることが考えられた。

コンデンシン II は細胞周期を通して核内に局在し、間期においても染色体上で機能していると思われる。今回の実験系では siRNA によってコンデンシン II サブユニットをノックダウンしているため、間期においてもコンデンシン II の発現が減少している。従って、間期のコンデンシン II の機能低下が分裂期にも影響を与えている可能性を否定できない。コンデンシン II のような細胞周期を通じて機能している因子について、分裂期特異的に機能を解析する場合、コンディショナル且つ速やかに遺伝子をノックアウトする実験系が必要であると思われる。最近では、薬剤処理によって最短 30 分程度で標的タンパク質を分解する auxin-inducible degron (AID) システムが考案されている (Nishimura et al., 2009)。このシステムでは数百アミノ酸の AID タグを融合した標的タンパク質をオーキシン依存的に分解できる。そこで、近年盛んに用いられている clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /Cas9 によるゲノム編集技術等を用いて AID タグを内在性のコンデンシン II サブユニットに融合することで、コンディショナルに短時間でコンデンシン II を欠損させることができる。このような解析によって、分裂期または間期特異的にコンデンシン II の機能を明らかにできると考えられる。

第六節 総括と今後の展望

本研究により、コンデンシン I が転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に結合し、その結合領域には単鎖 DNA 構造が含まれることが明らかとなった。さらに、単鎖 DNA を伴う R-loop 構造は染色体凝縮を妨げることが示唆された。また、コンデンシン II も転写活性の高い遺伝子の TSS 近傍に結合しており、一部の領域でコンデンシン I とオーバーラップしていた。コンデンシン II や TOP2A を欠損した細胞でコンデンシン I の結合は増加していたが、一方でコンデンシン II の結合はコンデンシン I や TOP2A 欠損であまり変化していなかった。従って、同じように転写活性の高い遺伝子領域に結合していても、コンデンシン I と II の染色体凝縮における役割は異なっていると考えられる。さらに、TOP2A もコンデンシン I、II と共に TSS 近傍で共局在していることが示された。TOP2A の局在はこれらの複合体に依存しており、染色体凝縮における 3 者の連携が示唆された。

現在のところ、コンデンシン I が染色体凝縮を妨げるような DNA 構造を標的として染色体に結合し、それらの解消を促進している一方で、コンデンシン II はある程度決まった領域に一定の割合で結合することで、分裂期染色体構造の構築における足場のよ

うに機能しているのではないかと予想している。コンデンシン I や II の欠損で単鎖 DNA や R-loop などの異常な構造が分裂期染色体上で増加しているかどうかについて今後検証していく必要がある。また、コンデンシン II の結合標的としてはヒストン修飾が考えられることから、このことについて ChIP-seq 等で詳細に解析していきたい。さらに、TOP2A は遺伝子内部や遺伝子以外の領域に局在がみられたが、これらの領域にはどのような特徴があるのかより詳しく解析する必要がある。

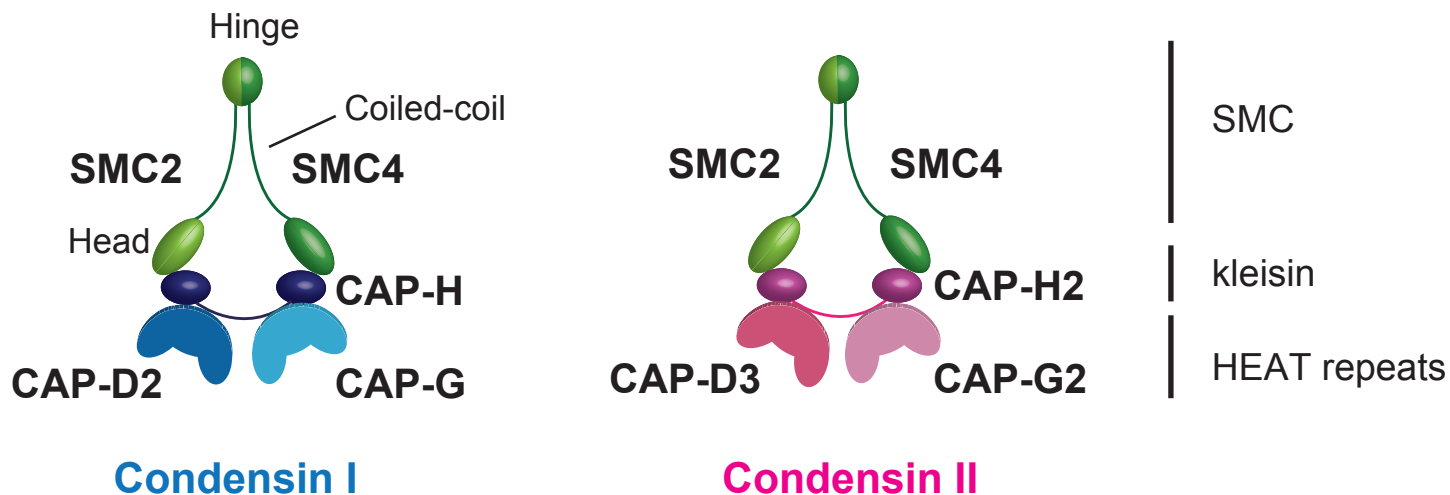


図 1 | コンデンシン I と II の分子構造 コンデンシン I、II の分子構造を模式的に示した。コンデンシン I と II は共通のコアサブユニットとして SMC2 と SMC4 をもつ。SMC タンパク質は 2 つの反平行の coiled-coil 領域が折り畳まれることで N 末端と C 末端が相互作用し、Head 領域と Hinge 領域が形成される。SMC2 と SMC4 は Hinge 領域で相互作用し、V 字構造のヘテロダイマーを形成している。kleisin ファミリーに属する CAP-H と CAP-H2 は N 末端と C 末端でそれぞれ SMC2、SMC4 の Head 領域と相互作用することでリング状構造を形成する。コンデンシン I における CAP-D2、CAP-G とコンデンシン II における CAP-D3、CAP-G2 は HEAT repeats ドメインをもつ。

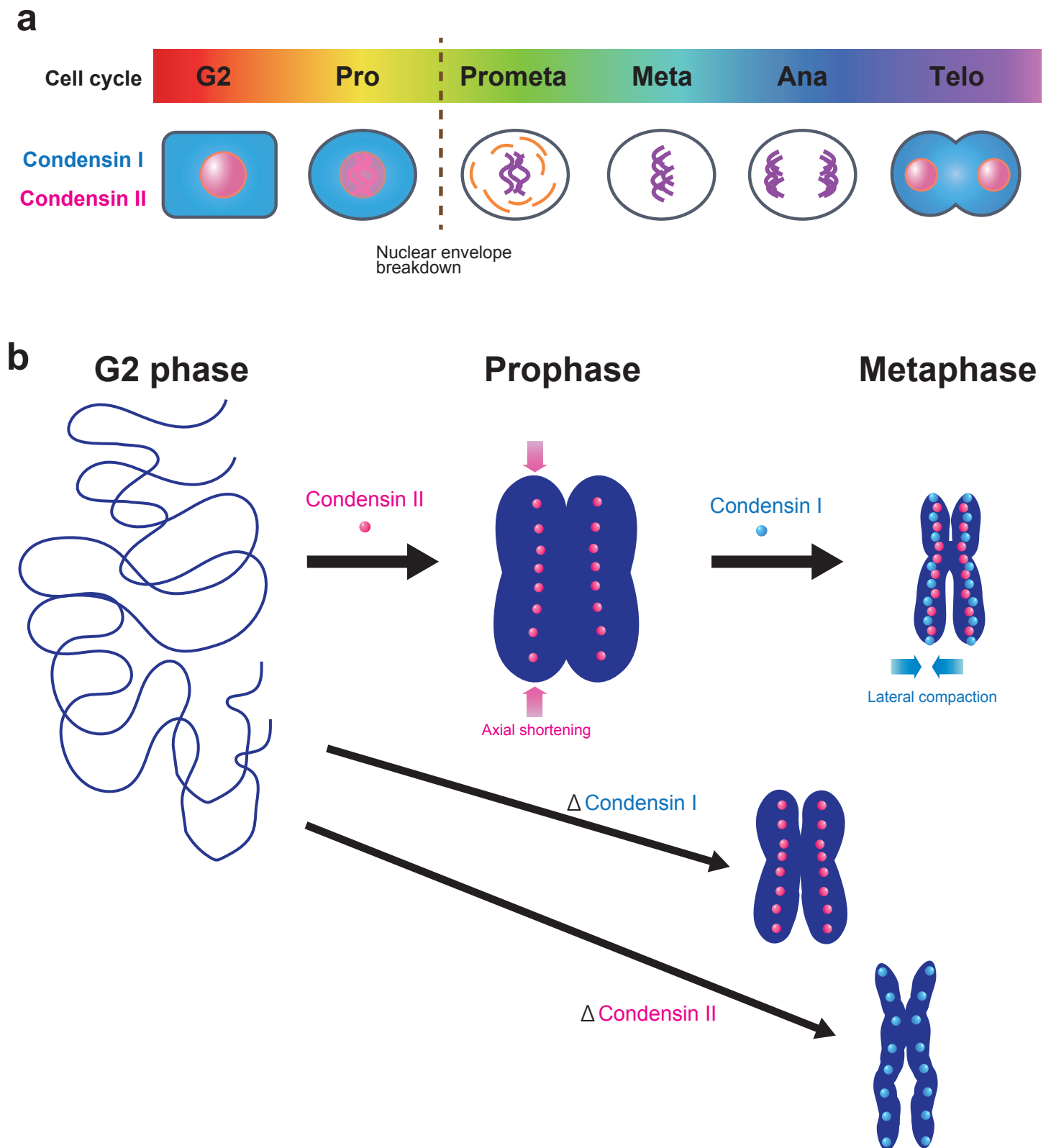


図 2 | コンデンシン I と II の細胞周期における局在と二段階の染色体凝縮モデル (a) G2 期と分裂期におけるコンデンシン I と II の動態。青色がコンデンシン I、桃色がコンデンシン II を示している。コンデンシン II は細胞周期を通じて核内に存在し、分裂前期から染色体に強く結合する。コンデンシン I は間期において細胞質に存在し、分裂前中期の核膜崩壊 (Nuclear envelope breakdown) 後に染色体に結合する。コンデンシン I を青色、II を桃色で模式的に示した。(b) 間期から核内に存在するコンデンシン II は細胞分裂前期において、初期段階の染色体凝縮を行う。次いで、細胞分裂前中期の核膜崩壊によって、細胞質に局在していたコンデンシン I が染色体に結合可能となる。コンデンシン I と II が協調的に染色体を高度に折り畳むことで、分裂中期までに染色体構造の構築が完了する。顕微鏡観察ではコンデンシン I と II は姉妹染色分体の軸上に局在しており、その軸上では排他的な局在がみられる。染色体凝縮の過程において、コンデンシン II が軸に沿った方向、コンデンシン I が軸と垂直方向の染色体の折り畳みをそれぞれ促進すると考えられている。下の染色体はコンデンシン I と II をそれぞれ欠損した場合の異常な表現型を模式的に示している。コンデンシン I の欠損では太く肥大化した染色体が形成される一方で、コンデンシン II の欠損では長く細い染色体になる。

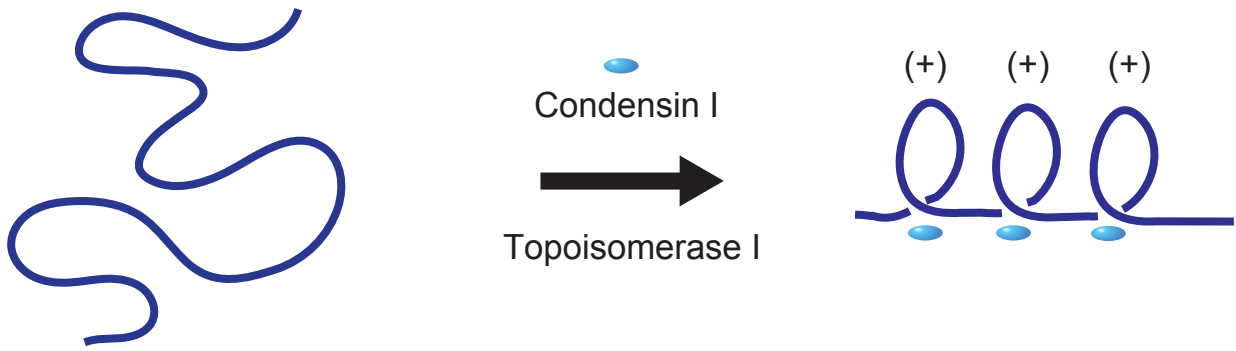
a**b**

図3 | コンデンシンの機能の分子メカニズムモデル (a) コンデンシン I による正の超らせんループ構造の導入。In vitro においてコンデンシン I はトポイソメラーゼ I 存在下で環状 DNA に正の超らせんを導入することから、同様にクロマチン上に正の超らせんループ構造を形成することで染色体 DNA を折り畳んでいると考えられている。(b) コンデンシンのリング状構造に由来するクロマチンループモデル。コンデンシンは SMC2、SMC4 ヘテロダイマーと kleisin ファミリータンパク質の相互作用によってリング状の分子構造を形成する。このリング状構造によって二本の染色体 DNA を抱えることでループを形成すると考えられている。

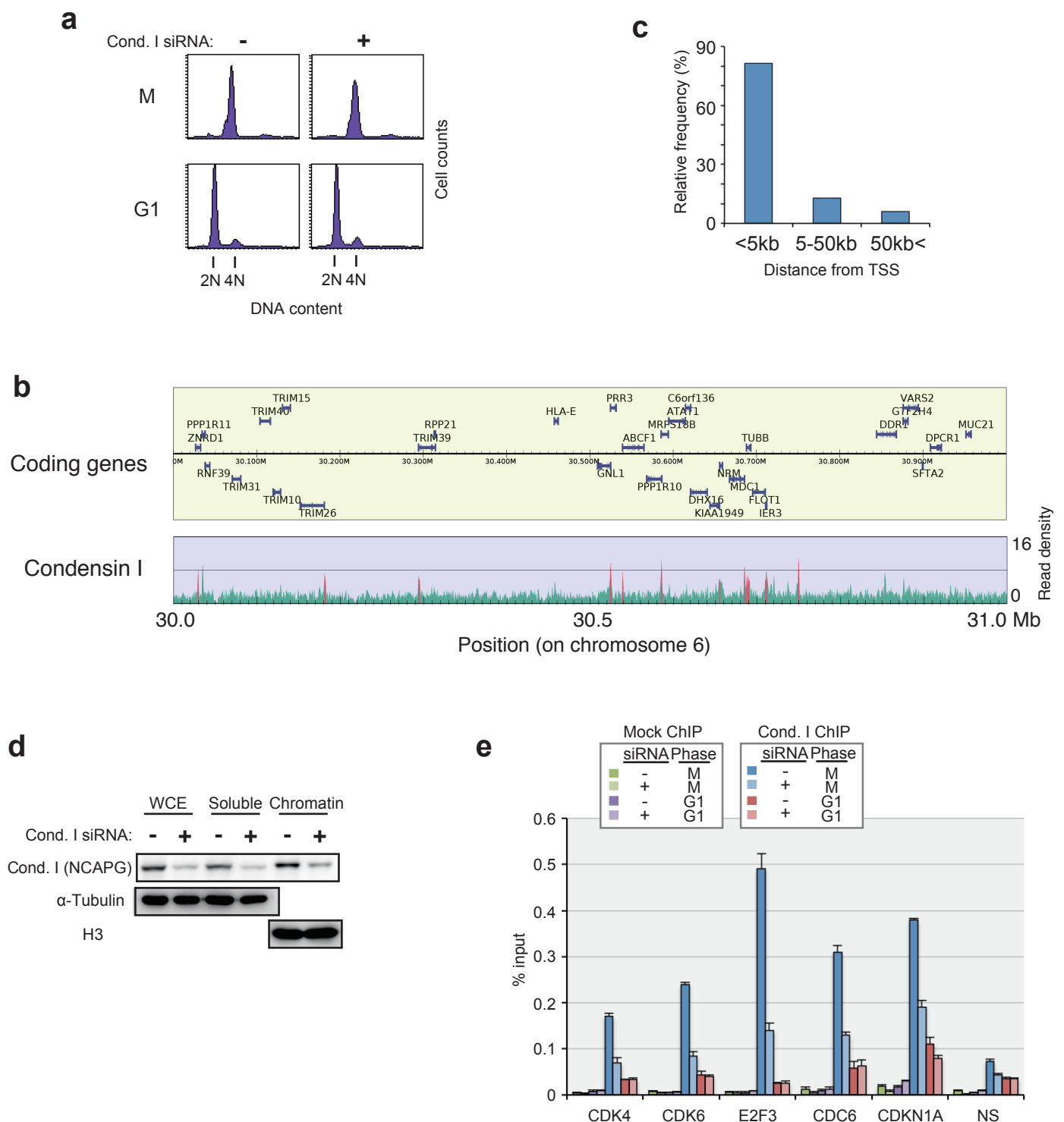


図 4 | ChIP-seq を用いたコンデンシン I 結合領域の網羅的解析 (a) フローサイトメトリーによる細胞周期同調の解析。M, ノコダゾールにより細胞分裂前中期に同調した HeLa 細胞。G1, ノコダゾールからのリリースにより G1 期に同調した細胞。Cond. I siRNA, コンデンシン I サブユニット NCAPG の siRNA オリゴなし (-) またはあり (+) で細胞同調前にトランスフェクション処理を行ったサンプル。x 軸はゲノム DNA 含量、y 軸は細胞数を表している。(b) 分裂期の HeLa 細胞におけるコンデンシン I の ChIP-seq プロファイル。上段の図は RefSeq 遺伝子の位置を示している。下段の図は分裂前中期のコンデンシン I (NCAPG サブユニット) の ChIP-seq プロファイルである。赤色の領域は統計的に有意な結合領域を表している。y 軸は標準化したリード数を示している。プロファイルの可視化及び統計的に有意な結合領域の抽出は ChIP-seq 解析ツール、DROMPA で行った。(c) コンデンシン I の統計的に有意な結合領域の遺伝子の転写開始点 (TSS) からの距離とその割合。(d) 細胞分裂前中期に同調した細胞におけるコンデンシン I のタンパク量のウェスタンブロットによる解析。Cond. I siRNA, (a) と同様。WCE, Whole cell extracts。Soluble, 可溶性分画。Chromatin, 不溶性のクロマチン分画。 α -Tubulin とヒストン H3 はそれぞれ可溶性分画、クロマチン分画におけるローディングコントロール。(e) コントロールの免疫グロブリン G (IgG) とコンデンシン I の ChIP-qPCR。Mock ChIP, 非特異的なラビット IgG での ChIP。Cond. I ChIP, コンデンシン I の NCAPG サブユニットの抗体での ChIP。siRNA, NCAPG siRNA オリゴなし (-) またはあり (+) でトランスフェクション処理を行ったサンプル。Phase, M, ノコダゾールにより細胞分裂前中期に同調した細胞。G1, ノコダゾールからのリリースにより G1 期に同調した細胞。各 qPCR のサイトはコンデンシン I の統計的に有意な結合領域であり、名前は近傍の遺伝子名である。NS はコンデンシン I の統計的に有意な結合がみられない領域である。エラーバーは標準偏差を表す (n=3, qPCR の technical replicates)。

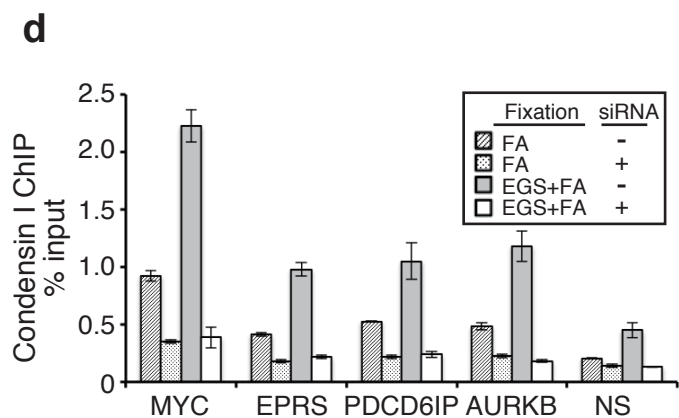
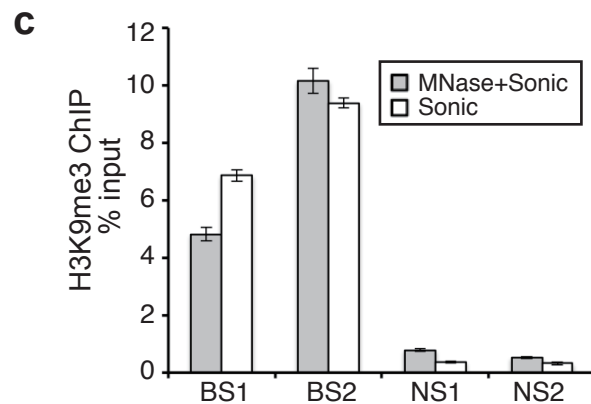
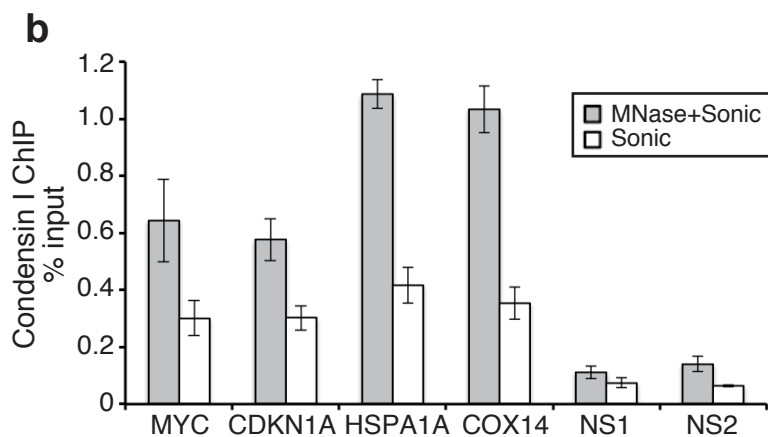
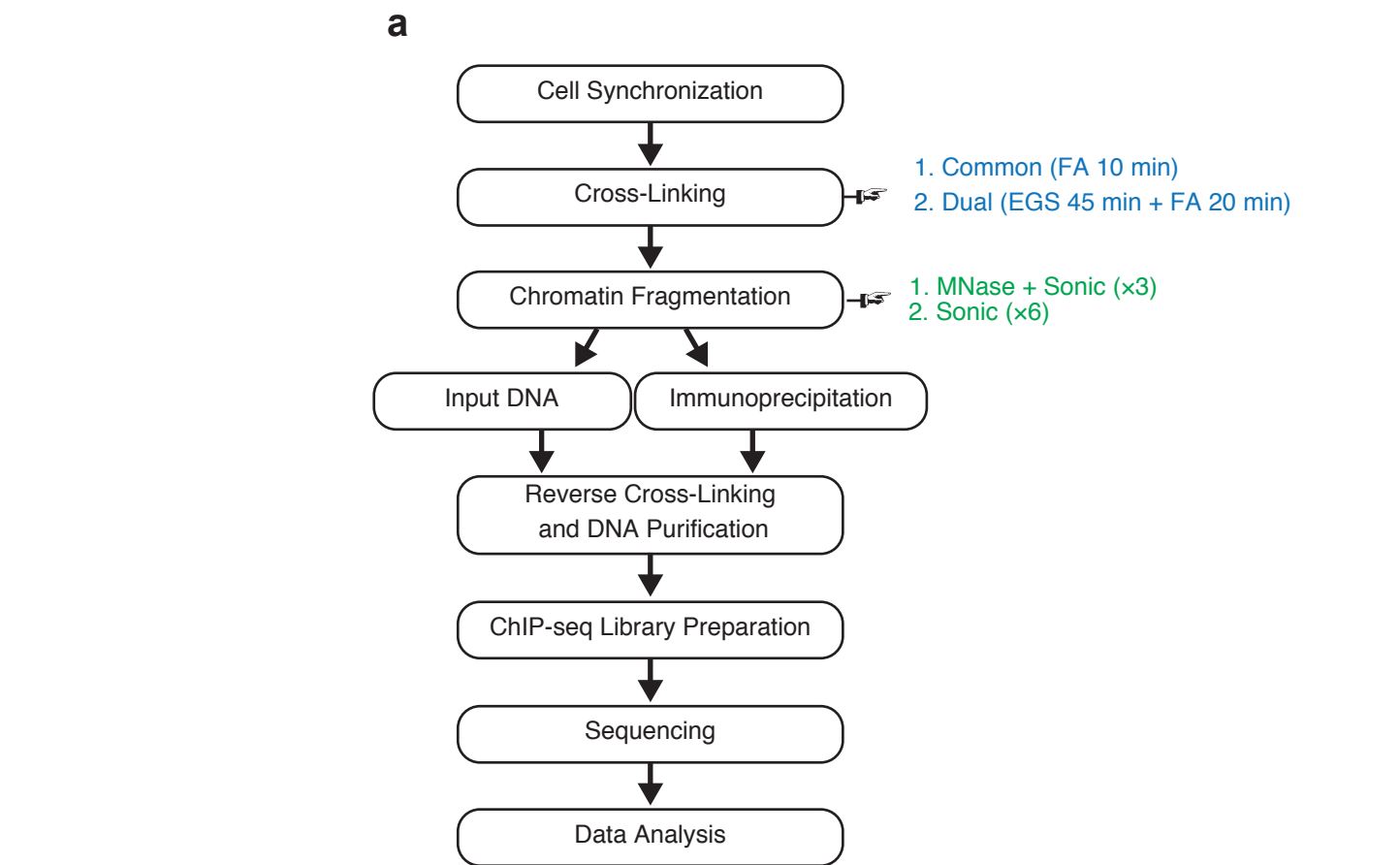


図 5 | 二段階固定と MNase を用いたクロマチン断片化によるコンデンシン I ChIP-seq の最適化 (a) ChIP-seq の概略図。細胞固定とクロマチン断片化における検討項目をそれぞれ青字と緑字で示している。(b, c) ChIP-qPCR による二つのクロマチン断片化の手法の比較。分裂前中期に同調した細胞を用いて、(b) コンデンシン I (NCAPG サブユニットと (c) H3K9me3 の ChIP-qPCR を行った。

MNase+Sonic, クロマチン画分を MNase 処理で断片化後に 3 回のソニケーション処理をしたサンプル。Sonic, 6 回のソニケーション処理をしたサンプル。(d) ChIP-qPCR による二つの細胞固定方法の比較。Fixation, それぞれのサンプルにおける固定条件を示している。FA はホルムアルデヒドのみで、EGS+FA は EGS に次いでホルムアルデヒドを加えてそれぞれ固定したサンプル。siRNA, NCAPG siRNA オリゴなし (-) またはあり (+) で細胞同調前にトランスフェクション処理を行ったサンプルを示す。(b) と (d) の各 qPCR のサイトはコンデンシン I の統計的に有意な結合領域であり、名前は近傍の遺伝子名である。(b) の NS1、NS2 と (d) の NS はコンデンシン I の統計的に有意な結合がみられない領域である。(c) の BS1、BS2 は H3K9me3 が統計的に有意に存在する領域、NS1、NS2 は統計的に有意には存在していない領域である。(b から d) のエラーバーは標準偏差を表す (n=3, qPCR の technical replicates)。

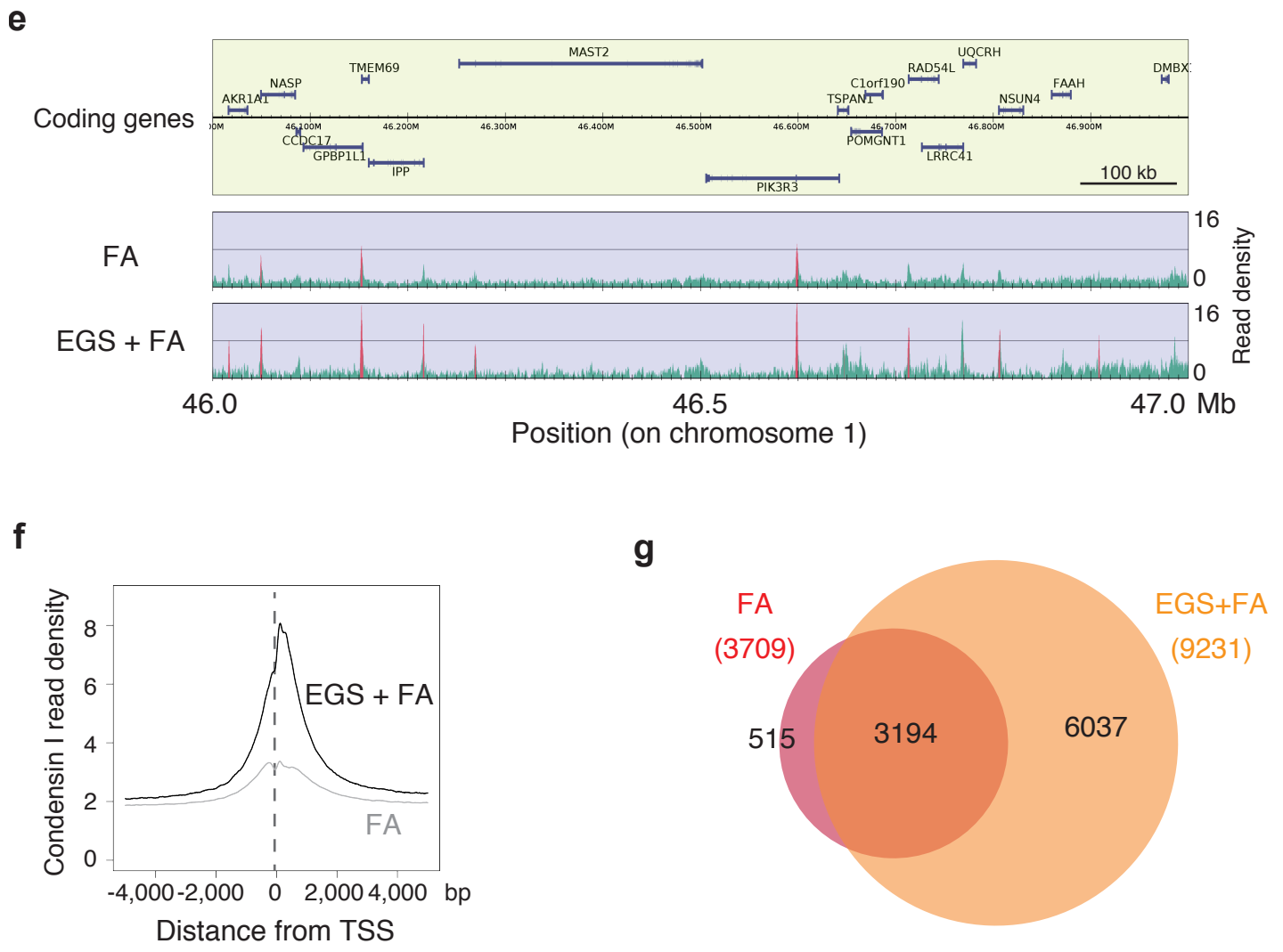


図5 | 続き (e) 分裂期の HeLa 細胞におけるコンデンシン I の ChIP-seq プロファイル。上段の図は RefSeq 遺伝子の位置を示している。中段及び下段の図はそれぞれの固定条件でサンプル調製を行ったコンデンシン I の ChIP-seq プロファイルである。赤色の領域は統計的に有意な結合領域を表している。y 軸は標準化したリード数を示している。**(f)** 遺伝子の転写開始点 (TSS) 周辺での各固定条件におけるコンデンシン I の平均化した ChIP-seq プロファイル。**(g)** 各固定条件での ChIP-seq データから抽出された統計的に有意な結合領域数とその重なりを示すベン図。括弧内の数字は総結合領域数である。抽出された結合領域が 1 ベース以上オーバーラップする場合を重なる結合領域と判定した。

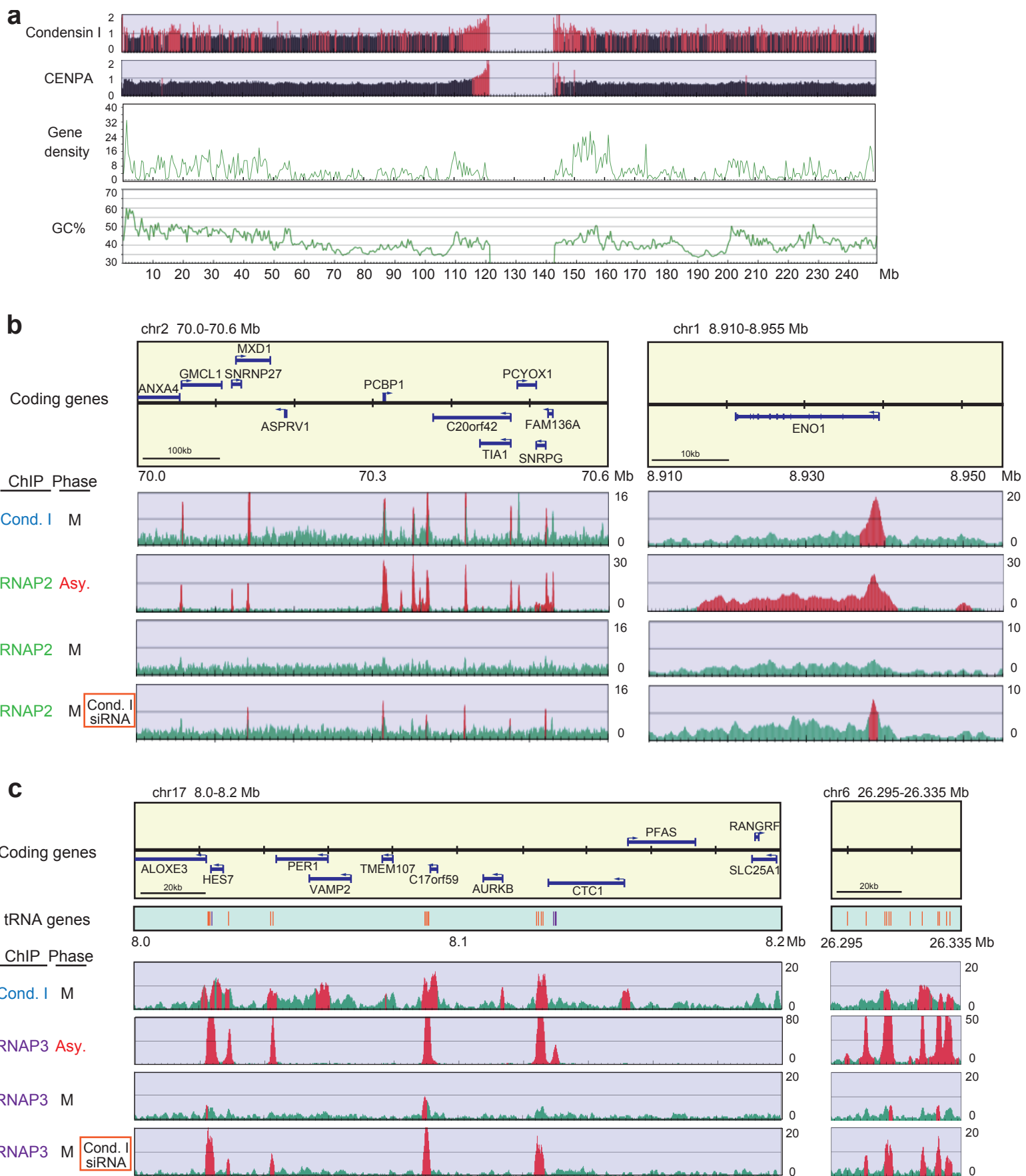


図 6 | コンデンシン I と RNAP2、3 の ChIP-seq 解析 (a) コンデンシン I (NCAPG サブユニット) と GFP タグを付加したセントロメア特異的なヒストン H3 バリエーション、CENPA の ChIP-seq に基づく 1 番染色体全体での局在。y 軸は 100 kb 毎の ChIP / input DNA シグナル比を表しており、1 より大きい領域を赤い色で示している。Gene density は 500 kb 毎に存在する遺伝子数、GC% は配列中の GC 含量である。130 Mb 付近の何もない領域は、配列決定されておらず、今回用いたヒトリファレンスゲノム hg19 には含まれていないセントロメア領域。(b, c) コンデンシン I (NCAPG サブユニット)、RNAP2 (RPB1 の C-terminal domain (CTD) リピート) 及び RNAP3 (RPC32 サブユニット) の ChIP-seq プロファイル。上段の図はタンパク質をコードする遺伝子の位置を示している。(c) の二段目は tRNA 遺伝子を示している (タンパク質をコードする遺伝子の内部に位置するものが紫色、外側に位置するものが橙色)。下の四段は各 ChIP-seq プロファイル。M, ノコダゾールにより細胞分裂前中期に同調した細胞。Asy. 非同調の細胞。Cond. I siRNA, siRNA 処理によりコンデンシン I の NCAPG サブユニットをノックダウンした細胞。赤色の領域は統計的に有意な結合領域を表している。y 軸は標準化したリード数を示している。

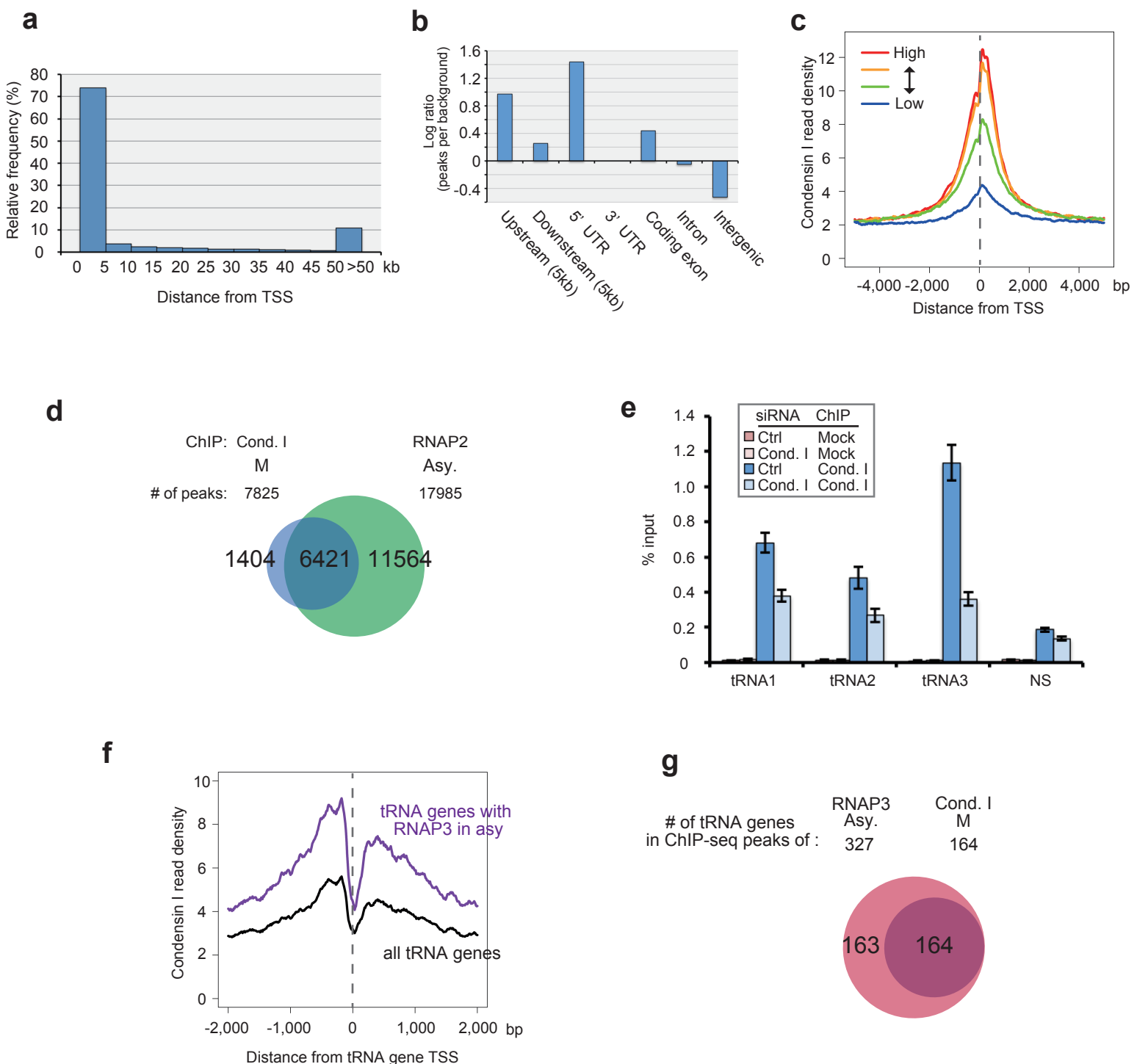


図 7 | コンデンシン I は RNAP2 と RNAP3 によって転写される活性の高い遺伝子の TSS に結合する
(a) コンデンシン I の統計的に有意な結合領域の遺伝子の転写開始点 (TSS) からの距離とその割合。**(b)** コンデンシン I 結合領域と遺伝子領域との局在の比較。y 軸は各領域におけるコンデンシン I 結合領域の局在のバックグラウンドに対する比率を log10 スケールで表している。**(c)** 遺伝子の TSS 周辺での平均化したコンデンシン I の ChIP-seq プロファイル。非同調の細胞における RNA-seq データを基に遺伝子を発現量によって 4 つのグループにランク分けし (High から Low)、各遺伝子グループの TSS におけるコンデンシン I の ChIP-seq プロファイルを平均化して示した。y 軸は平均化したリード数。**(d)** 各 ChIP-seq データから抽出された統計的に有意な結合領域数とその重なりを示すベン図。ChIP, RNAP2 またはコンデンシン I (Cond. I) の ChIP。M, ノコダゾールにより細胞分裂前中期に同調した細胞。Asy. 非同調の細胞。抽出された結合領域が 1 ベース以上オーバーラップする場合を重なる結合領域と判定した。**(e)** tRNA 遺伝子領域におけるコンデンシン I の ChIP-qPCR。siRNA, NCAPG siRNA オリゴなし (Ctrl) またはあり (Cond. I) でトランスフェクション処理を行い、細胞分裂前中期に同調したサンプル。Mock ChIP, 非特異的なラビット IgG での ChIP。Cond. I ChIP, コンデンシン I の NCAPG サブユニットの抗体での ChIP。各 qPCR のサイトは tRNA 遺伝子付近でのコンデンシン I の統計的に有意な結合領域であり、NS はコンデンシン I の統計的に有意な結合がみられない領域である。エラーバーは標準偏差を表す (n=3, qPCR の technical replicates)。**(f)** tRNA 遺伝子周辺での平均化したコンデンシン I の ChIP-seq プロファイル。全ての tRNA 遺伝子、または非同調の細胞において RNAP3 が結合している (RNAP3 ChIP-seq で同定された結合領域とオーバーラップする) tRNA 遺伝子において平均化したプロファイルをそれぞれ黒色と紫色で示した。**(g)** 非同調の細胞における RNAP3 の結合領域または分裂期のコンデンシン I 結合領域とオーバーラップする tRNA 遺伝子とその一致の割合を示すベン図。結合領域と tRNA 遺伝子とのオーバーラップは 1 ベース以上とした。

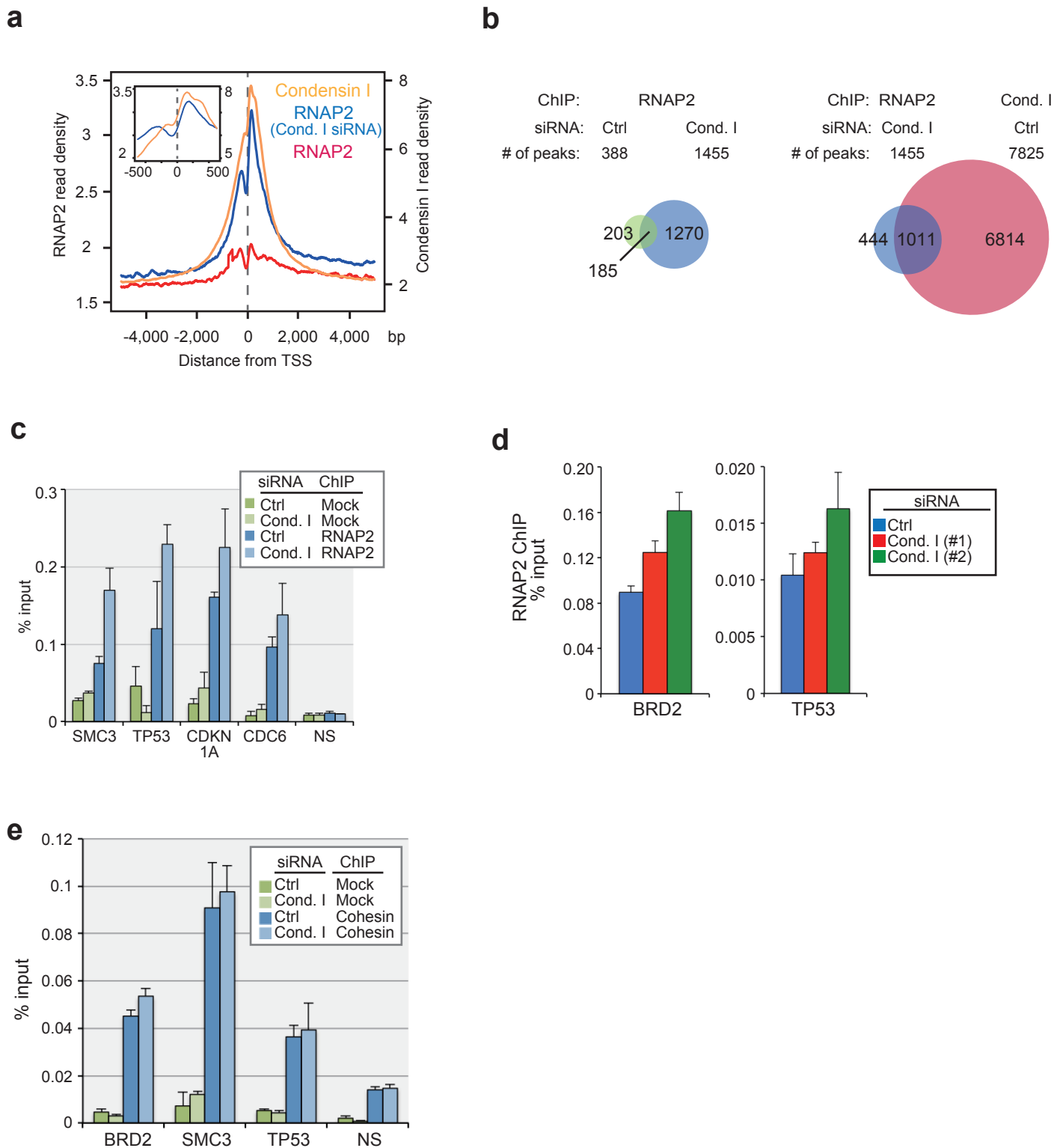


図 8 | コンデンシン I は分裂期において遺伝子の TSS から RNAP2 及び RNAP3 を排除する (a) 分裂期の細胞における遺伝子の転写開始点 (TSS) 周辺での RNAP2 とコンデンシン I (NCAPG サブユニット) の ChIP-seq プロファイル。RNAP2 (Cond. I siRNA) はコンデンシン I の NCAPG サブユニットをノックダウンした細胞における RNAP2 のプロファイルである。y 軸は平均したリード数を示している。左上の挿入図は TSS から ± 500 ベースにおけるコンデンシン I と RNAP2 (Cond. I siRNA) のプロファイル。(b) 各 ChIP-seq データから抽出された統計的に有意な結合領域数とその重なりを示すベン図。ChIP, RNAP2 またはコンデンシン I (Cond. I) の ChIP。siRNA, NCAPG siRNA オリゴなし (Ctrl)、またはあり (Cond. I) でトランスフェクション処理を行い、細胞分裂前中期に同調したサンプル。抽出された結合領域が 1 ベース以上オーバーラップする場合を重なる結合領域と判定した。(c-e) 分裂期細胞での ChIP-qPCR。siRNA, (b) と同様。(d) では他の解析で用いている NCAPG siRNA オリゴ (#1) に加えて、異なる配列の NCAPG siRNA オリゴ (#2) も使用した。Mock, 非特異的なラビット IgG での ChIP。RNAP2 (RPB1 の CTD リピート) の抗体での ChIP。Cohesin, コヒーシン (RAD21 サブユニット) の抗体での ChIP。各 qPCR のサイトはコンデンシン I の統計的に有意な結合領域であり、名前は近傍の遺伝子名である。NS はコンデンシン I の統計的に有意な結合がみられない領域である。 続く。

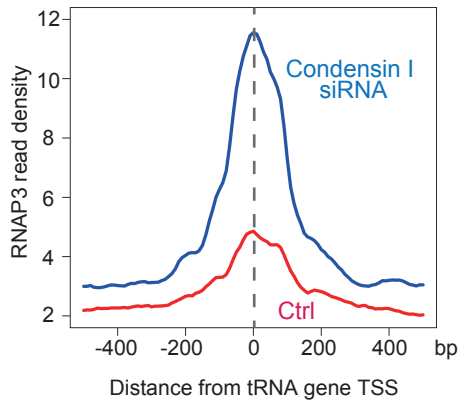
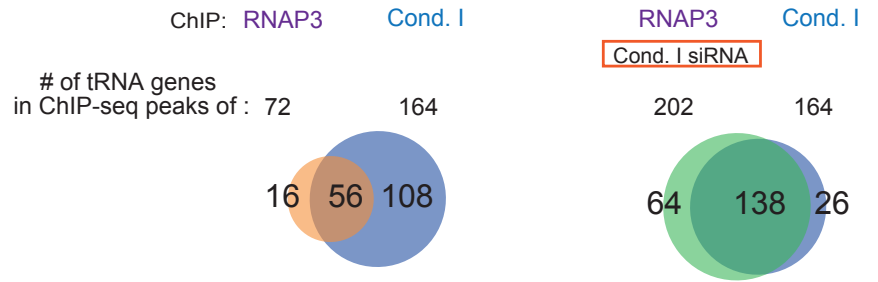
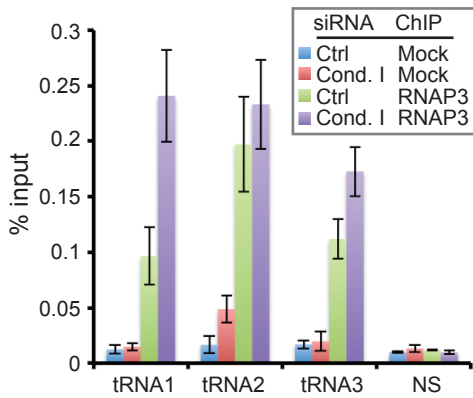
f**g****h**

図 8 | 続き (f) 分裂期の細胞における tRNA 遺伝子の TSS 周辺での RNAP3 の平均化した ChIP-seq プロファイル。Condensin I siRNA, コンデンシン I の NCAPG サブユニットの siRNA 処理をした細胞。Ctrl, siRNA 処理していないコントロールの細胞。y 軸は平均化したリード数。**(g)** 分裂期細胞における RNAP3 またはコンデンシン I 結合領域とオーバーラップする tRNA 遺伝子とその一致の割合を示すベン図。Cond. I siRNA, siRNA 処理によりコンデンシン I の NCAPG サブユニットをノックダウンした細胞。結合領域と tRNA 遺伝子とのオーバーラップは 1 ベース以上とした。**(h)** (c) と同様に行った ChIP-qPCR。RNAP3 の ChIP は RPC32 サブユニットの抗体を用いた。各 qPCR のサイトは tRNA 遺伝子付近でのコンデンシン I の統計的に有意な結合領域であり、NS はコンデンシン I の統計的に有意な結合がみられない領域である。本図内のエラーバーは標準偏差を表す (n=3, qPCR の technical replicates)。

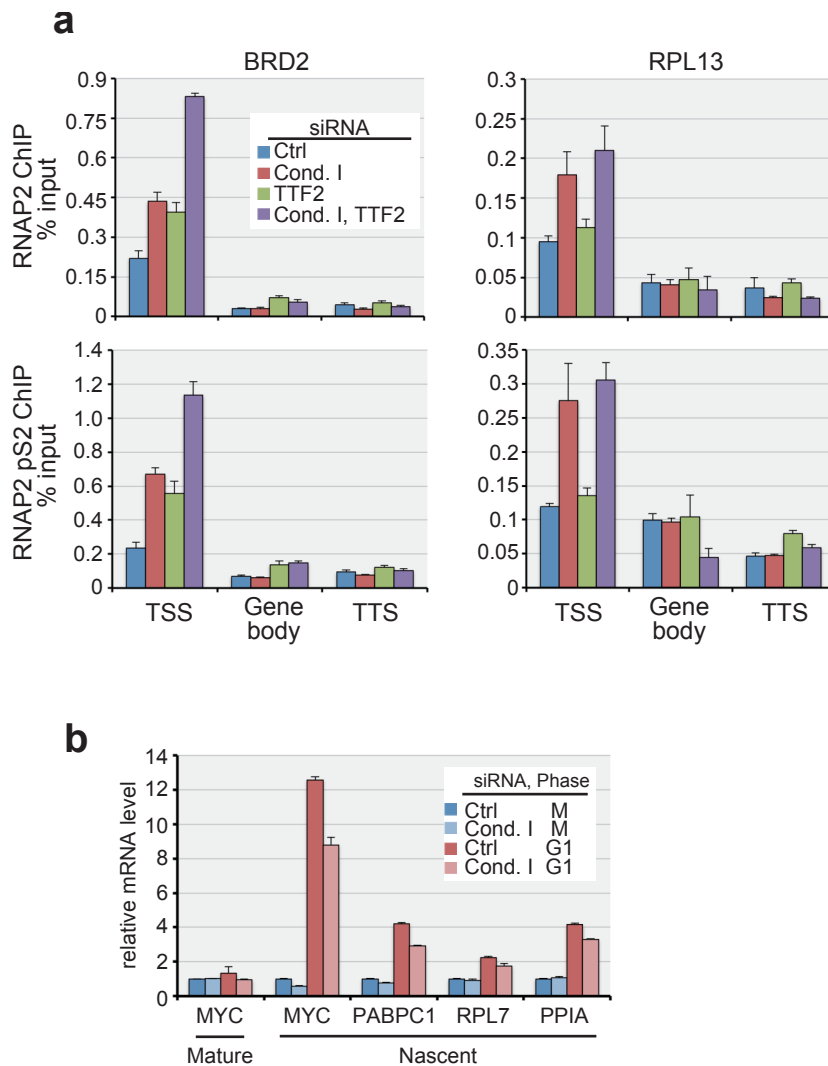


図 9 | 分裂期 RNAP2 の活性と染色体凝縮への影響 (a) 分裂期の細胞における RNAP2 の ChIP-qPCR。上段が RNAP2 (RPB1 の CTD リピート)、下段が活性化型 RNAP2 (RNAP2 pS2, RPB1 の CTD リピートの 2 番目のセリンのリン酸化) の抗体を用いた ChIP。コンデンシン I の NCAPG サブユニット (Cond. I) か TTF2、その両方の siRNA で処理、または処理なし (Ctrl) の細胞を用いた。二つの遺伝子 (BRD2 と RPL13) の転写開始点 (TSS)、転写終結点 (TTS) 及び遺伝子の中央 (Gene body) に位置するプライマーペアを用いて qPCR を行った。**(b)** コンデンシン I が結合する遺伝子における RT-qPCR。Mature はスプライシングされた RNA、Nascent はスプライシングされる前の RNA を検出するプライマーペアを示す。コンデンシン I の NCAPG サブユニット (Cond. I) の siRNA で処理、または処理なし (Ctrl) の細胞を用いた。M, ノコダゾールにより細胞分裂前中期に同調した細胞。G1, ノコダゾールからのリリースにより G1 期に同調した細胞。y 軸は Ctrl の分裂前中期の細胞を 1 としたときの相対的な RNA 量。 続く。

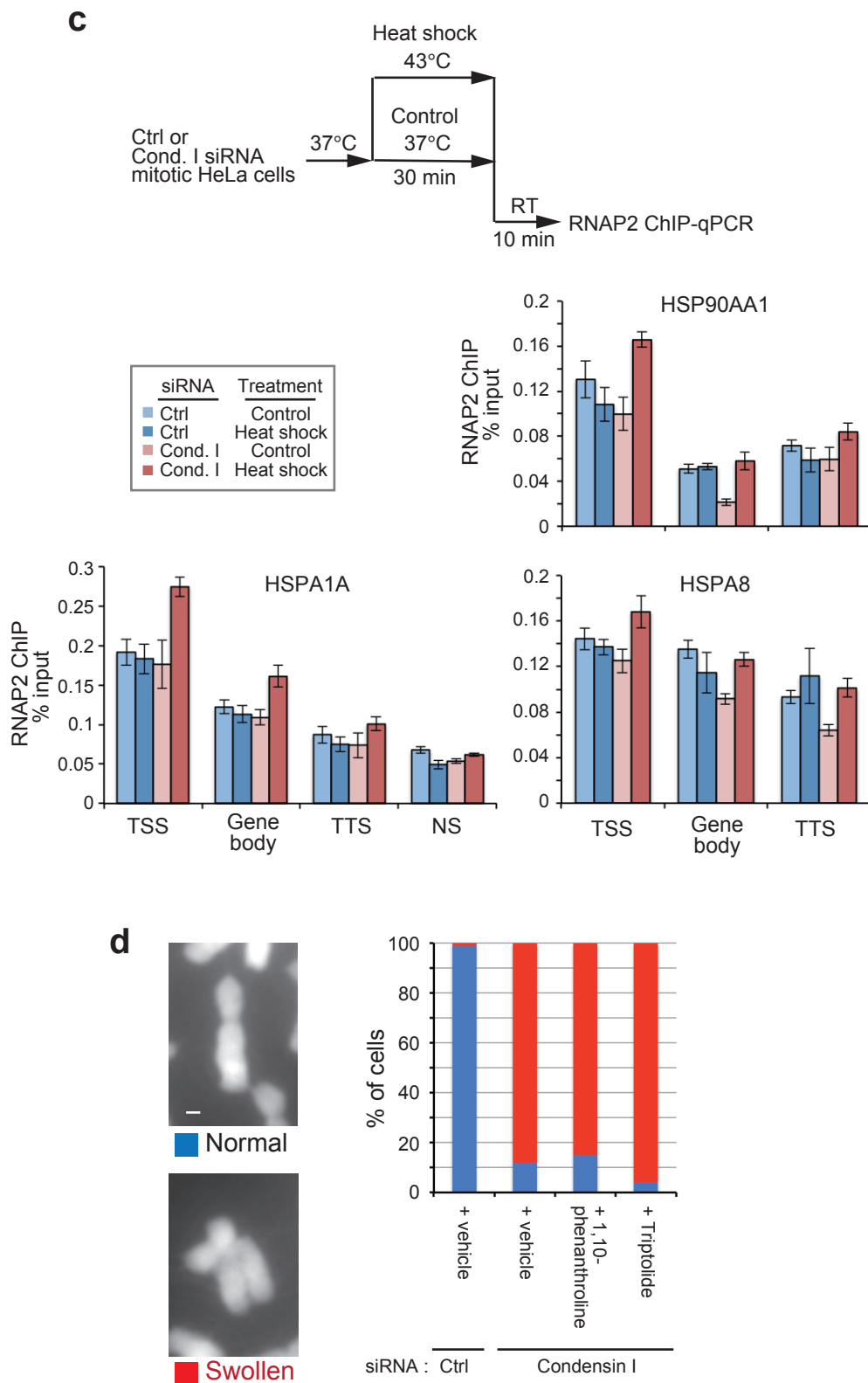


図9 | 続き (c) 熱ショック処理した分裂期の細胞におけるRNAP2のChIP-qPCR。上部の図は実験の流れを示している。コンデンシンIのNCAPGサブユニットのsiRNA処理でした細胞(Cond. I siRNA)またはsiRNA未処理の細胞(Ctrl)をノコダゾールによって分裂期に同調した後、シェイクオフによって回収した。これらの細胞を43°C(Heat shock)または37°C(Control)で30分、続いて常温(RT)で10分インキュベートし、RNAP2のChIPを行った。qPCRにはコンデンシンIの結合する熱ショックタンパク質遺伝子HSP90AA1、HSPA1A、HSPA8のTSS、TTS及びGene bodyに位置するプライマーペアを用いた。(d) 転写阻害剤処理した細胞のMetaphasespread。コンデンシンIのNCAPGサブユニットsiRNA処理でした細胞(Condensin I)またはsiRNA未処理の細胞(Ctrl)をCdk1阻害剤RO3306によるG2/Mでの同調からリリースと同時に、ノコダゾールを添加して1時間培養した。さらにDMSO(Vehicle)、転写阻害剤1,10-phenanthroline(120 ng/mL)、Triptolide(1 μM)の何れかを添加して2時間培養し、シェイクオフによって回収してMetaphasespreadを行った。左の4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)によるDNA染色像にみられるような、通常(Normal)と比較して肥大化した染色体の表現型異常(Swollen)のみられる細胞の割合を解析した。転写阻害剤1,10-phenanthrolineとTriptolideはいずれもRNAP2の染色体からの解離を促進する。各サンプルにつき100個以上の細胞を観察した。スケールバーは1 μm。本図内のエラーバーは標準偏差を表す(n=3, qPCRのtechnical replicates)。

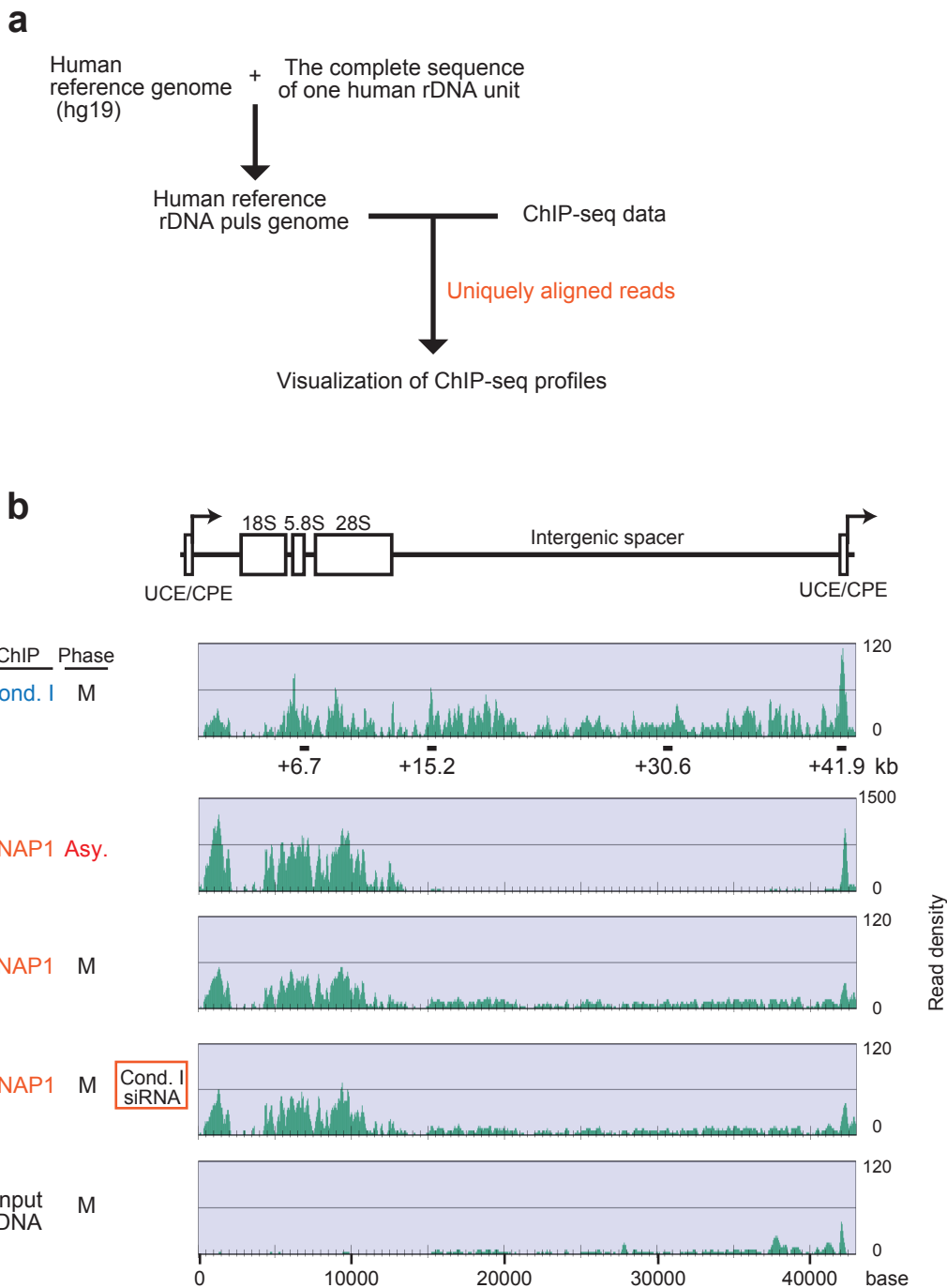


図 10 | ヒト rDNA 領域におけるコンデンシン I の結合プロファイル (a) ヒト rDNA 領域におけるコンデンシン I の ChIP-seq データ解析の流れ。ヒトリファレンスゲノム配列に 1 単位のヒト rDNA 繰り返し配列を加えて、特殊なヒトリファレンスゲノムを作成した (human reference rDNA plus genome)。このヒトリファレンスゲノムに ChIP-seq データをマッピングし、解析を行った。(b) コンデンシン I (Cond. I, NCAPG サブユニット)、RNAP1 (PAF53 サブユニット) 及び input DNA の ChIP-seq プロファイル。上の図はヒト rDNA 配列を模式的に示している。UCE, upstream control element。CPE, core promoter element。0 から 13.3 kb にコード領域が位置しており、残りはノンコードの遺伝子間領域となっている。下は各 ChIP-seq プロファイル。M, ノコダゾールにより細胞分裂前中期に同調した細胞。Asy. 非同調の細胞。Cond. I siRNA, siRNA 処理によりコンデンシン I の NCAPG サブユニットをノックダウンした細胞。y 軸は標準化したリード数を示しており、非同調の RNAP1 のみスケールが異なる。コンデンシン I プロファイルの下の黒色の四角は (c) で用いたプライマーペアの位置を模式的に表している。 続く。

C

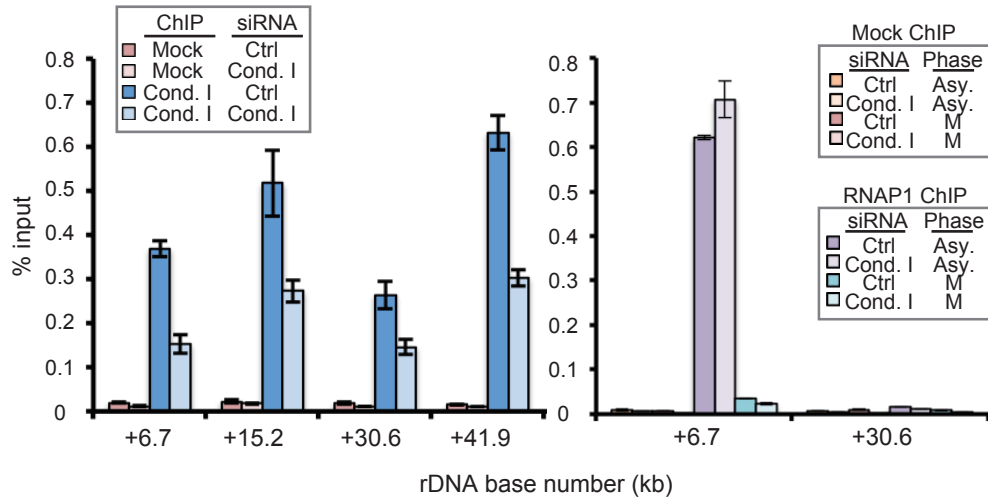


図 10 | 続き (c) rDNA 領域における ChIP-qPCR。Mock ChIP, 非特異的なラビット IgG の ChIP。Cond. I ChIP, コンデンシン I の NCAPG サブユニットの ChIP。RNAP1 ChIP, RNAP1 の PAF53 サブユニットの ChIP。コンデンシン I の NCAPG サブユニットの siRNA で処理した細胞 (Cond. I siRNA) または siRNA 未処理の細胞 (Ctrl) を、非同調 (Asy.) またはノコダゾールによって分裂期に同調 (M) して用いた。コンデンシン I の ChIP は分裂期に同調した細胞で行った。qPCR は (b) で示した領域に位置するプライマーペアを用いた。エラーバーは標準偏差を表す (n=3, qPCR の technical replicates)。

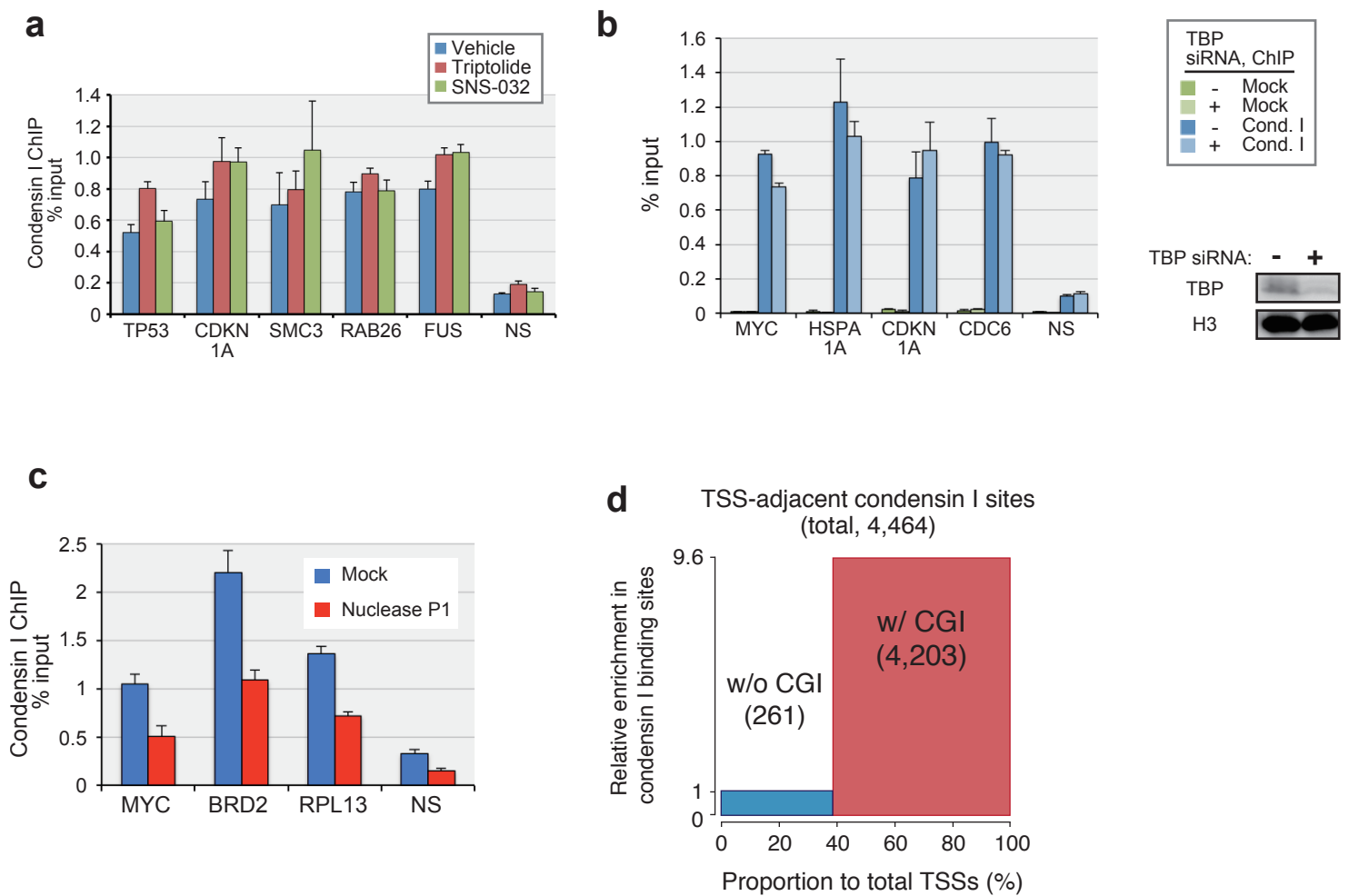


図 11 | コンデンシン I の単鎖 DNA への結合と R-loop の染色体凝縮への影響 (a) 転写阻害剤処理した分裂期の細胞におけるコンデンシン I (NCAPG サブユニット) の ChIP-qPCR。細胞をノコダゾールにより分裂前中期に同調した後、DMSO (Vehicle)、RNAP2 の転写阻害剤 Triptolide (1 μ M)、SNS-032 (200nM) の何れかでさらに 3.5 時間処理してからシェイクオフで細胞を回収し、コンデンシン I の ChIP-qPCR を行った。(b) TBP をノックダウンした分裂期の細胞における ChIP-qPCR。TBP siRNA 有り (+) または無し (-) でトランスフェクション処理を行った細胞を分裂前中期に同調し、ChIP-qPCR を行った。Mock ChIP, 非特異的なラビット IgG の ChIP。Cond. I ChIP, コンデンシン I の NCAPG サブユニットの ChIP。右下のウェスタンブロッティングは上記の細胞の Whole cell lysate を用いて行った。ヒストン H3 はローディングコントロール。(c) コンデンシン I ChIP DNA を単鎖 DNA 特異的なヌクレアーゼ P1 で処理しての qPCR。コンデンシン I の ChIP によって得られた DNA をビーズ上でヌクレアーゼ P1 処理し、溶出、精製して qPCR 解析を行った。Mock はヌクレアーゼ無しで同様の処理を行ったサンプル。(a から c) の各 qPCR のサイトはコンデンシン I の統計的に有意な結合領域であり、名前は近傍の遺伝子名である。NS はコンデンシン I の統計的に有意な結合がみられない領域である。エラーバーは標準偏差を表す (n=3, qPCR の technical replicates)。(d) 遺伝子の TSS 近傍のコンデンシン I 結合領域と CGI の比較。遺伝子の転写開始点の上流と下流 5kb 以内に存在するコンデンシン I 結合領域のうち、CGI から 1 kb 以内に存在するものを赤色、それ以外を青色で示した。括弧内の数字はそれぞれの条件でのコンデンシン I 結合領域数。横軸は遺伝子全体における CGI 近傍の TSS の割合。縦軸は CGI 近傍に存在しないコンデンシン I 結合領域を 1 としたときの、CGI 近傍に存在するコンデンシン I 結合領域の、遺伝子全体における CGI 近傍の TSS の割合を考慮した上でのエンリッチメント。 続く。

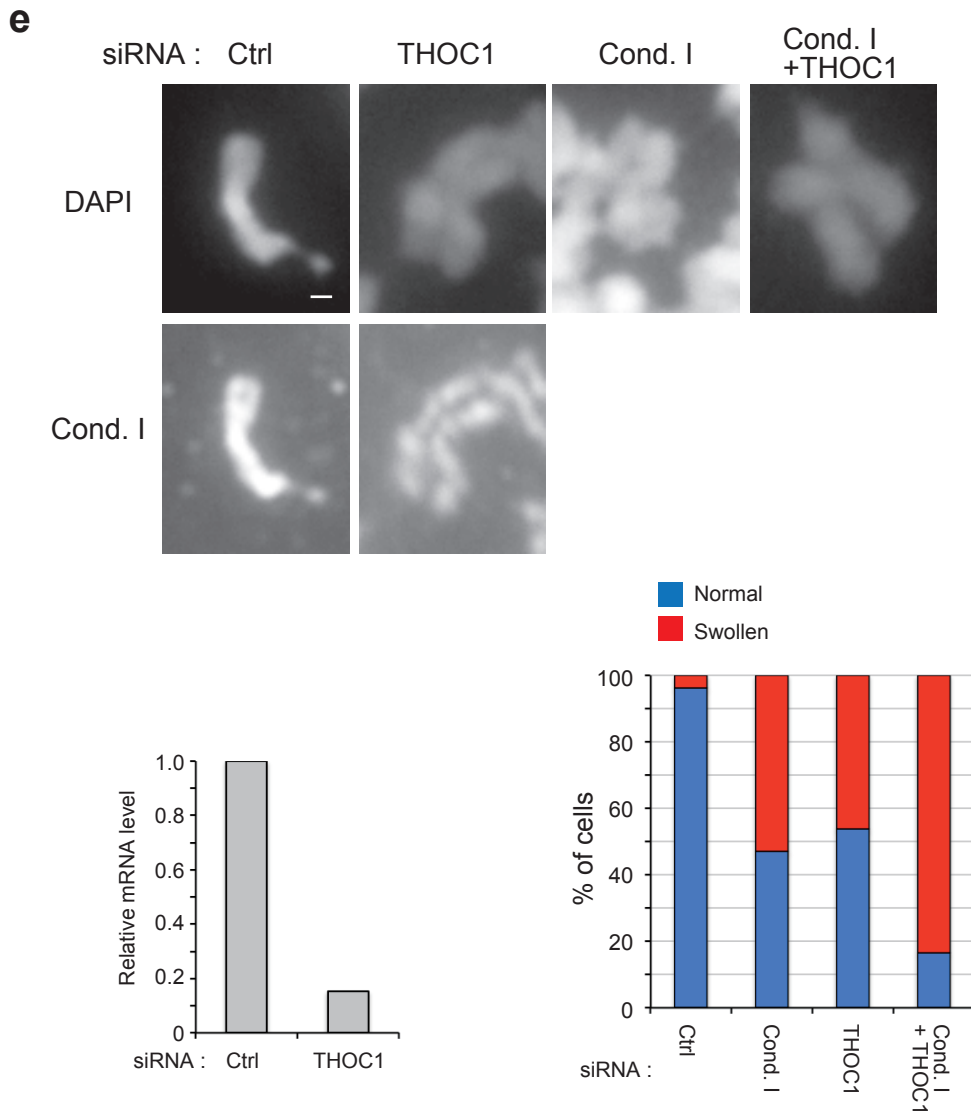


図 11 | 続き (e) コンデンシン I と THOC1 をノックダウンした細胞の Metaphasespread。コンデンシン I の NCAPG サブユニット (Cond. I) か THOC1、その両方の siRNA で処理または siRNA 未処理の細胞 (Ctrl) で Metaphasespread を行った。Ctrl と THOC1 ノックダウンの細胞は NCAPG サブユニットの抗体で免疫染色を行った。染色体 DNA は DAPI 染色した。スケールバーは 1 μ m。左下は Ctrl と THOC1 siRNA 処理した細胞での THOC1 の RT-qPCR。y 軸は Ctrl の細胞を 1 としたときの相対的な RNA 量。右下は通常 (Normal) と比較して肥大化した染色体の表現型異常 (Swollen) のみられる細胞の割合。各サンプルにつき 100 個以上の細胞を観察した。

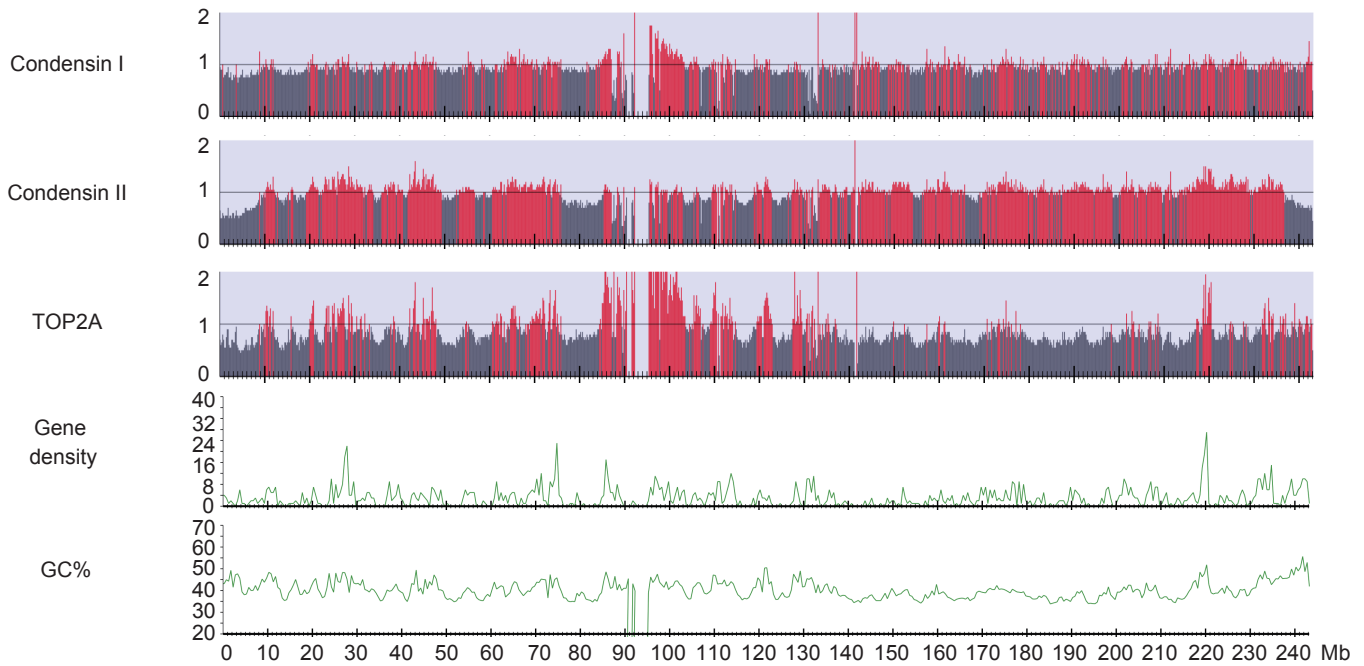
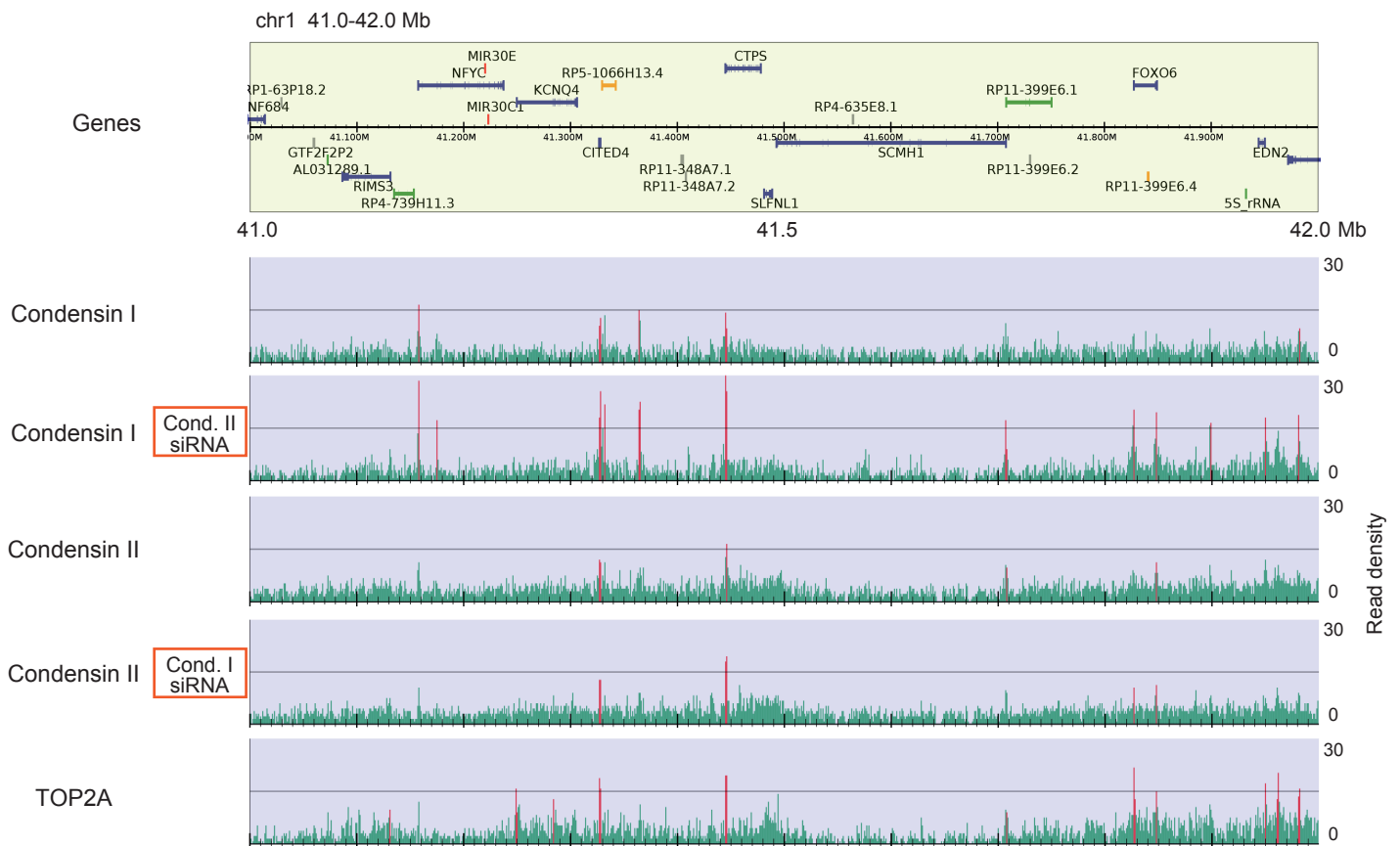
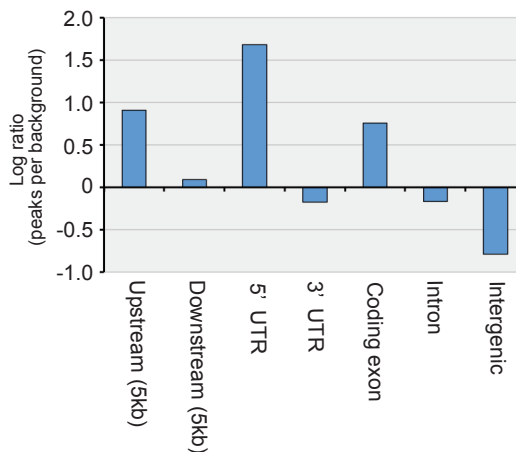
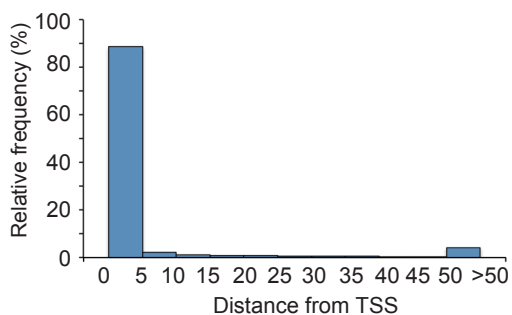
a**b**

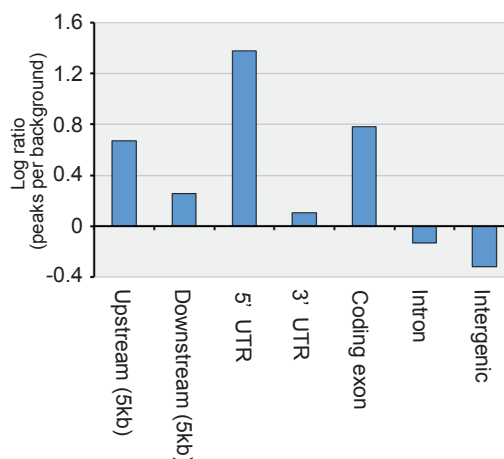
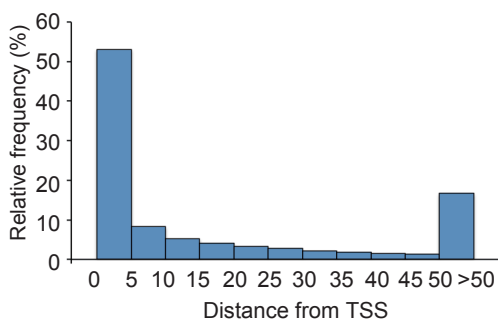
図 12 | 分裂期におけるコンデンシン II と TOP2A の ChIP-seq 解析 (a) コンデンシン I (NCAPG サブユニット)、コンデンシン II (NCAPH2 サブユニット)、TOP2A の ChIP-seq に基づく 2 番染色体全体での局在。y 軸は 100 kb 毎の ChIP / input DNA シグナル比を表しており、1 より大きい領域を赤い色で示している。Gene density は 500 kb 毎に存在する遺伝子数、GC% は配列中の GC 含量である。95 Mb 付近の何もない領域は、配列決定されておらず、今回用いたヒトリファレンスゲノム hg19 には含まれていないセントロメア領域。**(b)** 分裂期の細胞におけるコンデンシン I、コンデンシン II、TOP2A の ChIP-seq プロファイル。上段の図は RefSeq 遺伝子の位置を示している。下の五段は各 ChIP-seq プロファイル。Cond. I, Cond. II siRNA, siRNA 処理によりコンデンシン I の NCAPG サブユニット、コンデンシン II の NCAPD3 サブユニットをそれぞれノックダウンした細胞。赤色の領域は統計的に有意な結合領域を表している。y 軸は標準化したリード数を示している。 続く。

c

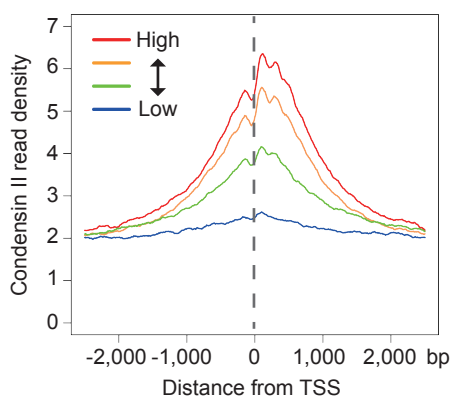
Condensin II ChIP-seq

**d**

TOP2A ChIP-seq

**e**

Condensin II ChIP-seq



TOP2A ChIP-seq

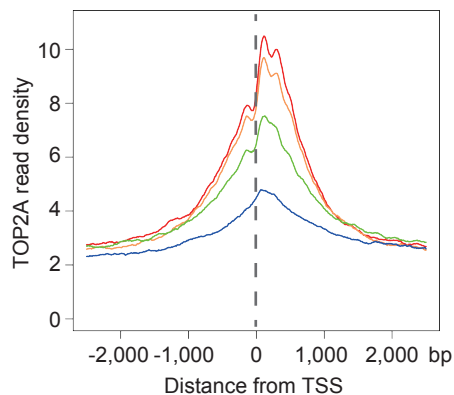
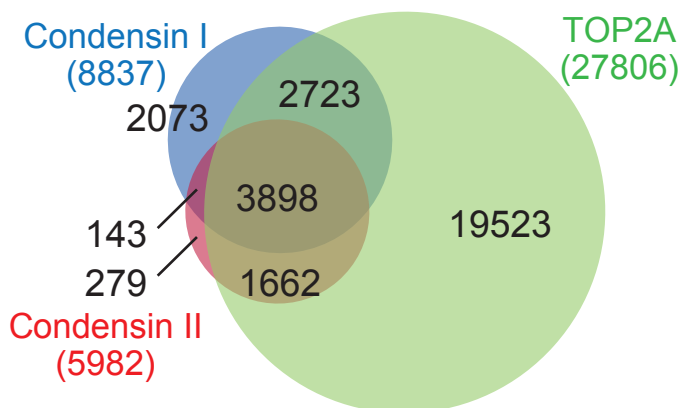
**f**

図 12 | 続き (c) 左, コンデンシン II の統計的に有意な結合領域の遺伝子の転写開始点 (TSS) からの距離とその割合。右, コンデンシン II 結合領域と遺伝子領域との局在の比較。y 軸は各領域におけるコンデンシン II 結合領域の局在のバックグラウンドに対する比率を log10 スケールで表している。(d) TOP2A の統計的に有意な結合領域についてそれぞれ (c) と同様の解析を行った。(e) 遺伝子の TSS 周辺での平均化したコンデンシン II と TOP2A の ChIP-seq プロファイル。非同調の細胞における RNA-seq データを基に遺伝子を発現量によって 4 つのグループにランク分けし (High から Low)、各遺伝子グループの TSS における ChIP-seq プロファイルを平均化して示した。y 軸は平均化したリード数。(f) 各 ChIP-seq データから抽出された統計的に有意な結合領域数とその重なりを示すベン図。括弧内の数字は総結合領域数である。抽出された結合領域が 1 ベース以上オーバーラップする場合を重なる結合領域と判定した。

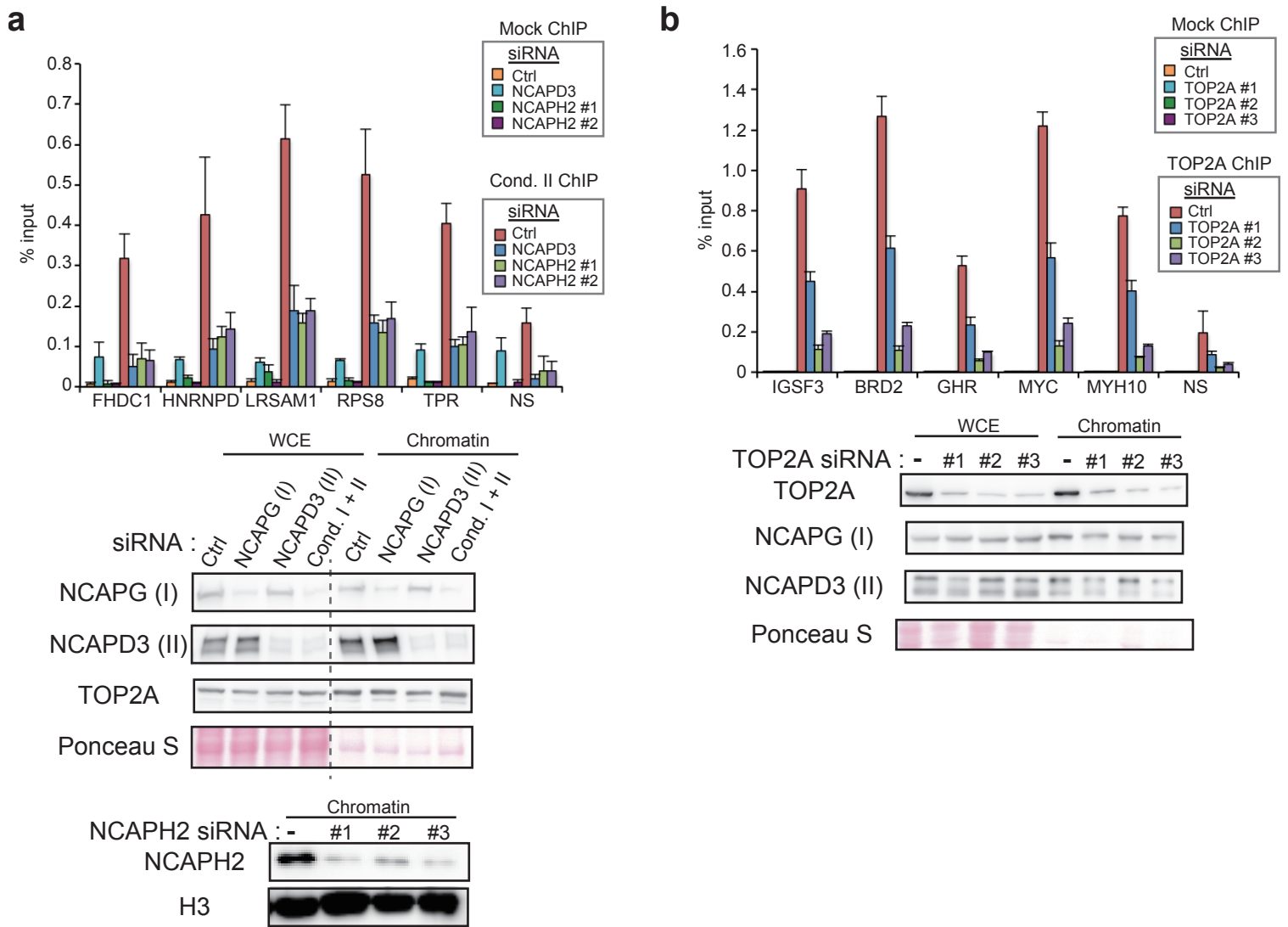


図 13 | 分裂期におけるコンデンシン II と TOP2A の ChIP-qPCR 及びウェスタンブロッティング解析 (a, b) コントロール IgG、コンデンシン II と TOP2A の ChIP-qPCR とウェスタンブロッティング。Mock ChIP, 非特異的なラビット IgG での ChIP。Cond. II ChIP, コンデンシン II の NCAPH2 サブユニットの抗体での ChIP。TOP2A ChIP, TOP2A の抗体での ChIP。siRNA, コンデンシン I サブユニット NCAPG、コンデンシン II サブユニット NCAPD3、NCAPH2 #1-3 (それぞれ標的配列が異なる)、NCAPG と NCAPD3 の両方 (Cond. I+II)、TOP2A #1-3 siRNA または siRNA オリゴなし (Ctrl, -) でトランスフェクション処理を行ったサンプル。(a, b) の各 qPCR のサイトはそれぞれコンデンシン II と TOP2A の統計的に有意な結合領域であり、名前は近傍の遺伝子名である。NS はコンデンシン II と TOP2A の統計的に有意な結合がみられない領域である。WCE, Whole cell extracts。Chromatin, 不溶性のクロマチン分画。Ponceau S 染色とヒストン H3 はローディングコントロール。本図内のエラーバーは標準偏差を表す (n=3, qPCR の technical replicates)。

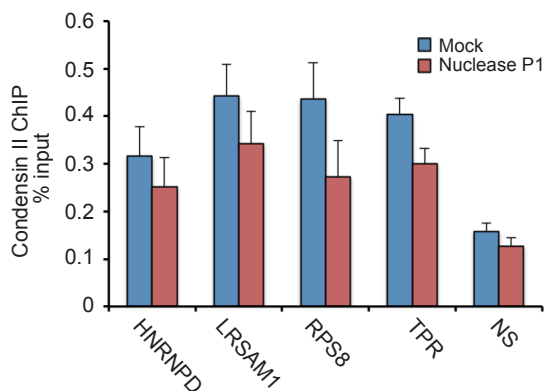


図 14 | コンデンシン II の単鎖 DNA への結合の解析 コンデンシン II ChIP DNA の単鎖 DNA 特異的なヌクレアーゼ P1 処理での qPCR。コンデンシン II (NCAPH2 サブユニット) の ChIP によって得られた DNA をビーズ上でヌクレアーゼ P1 処理し、溶出、精製して qPCR 解析を行った。Mock はヌクレアーゼ無しで同様の処理を行ったサンプル。各 qPCR のサイトはコンデンシン II の統計的に有意な結合領域であり、名前は近傍の遺伝子名である。NS はコンデンシン II の統計的に有意な結合がみられない領域である。エラーバーは標準偏差を表す (n=3, qPCR の technical replicates)。

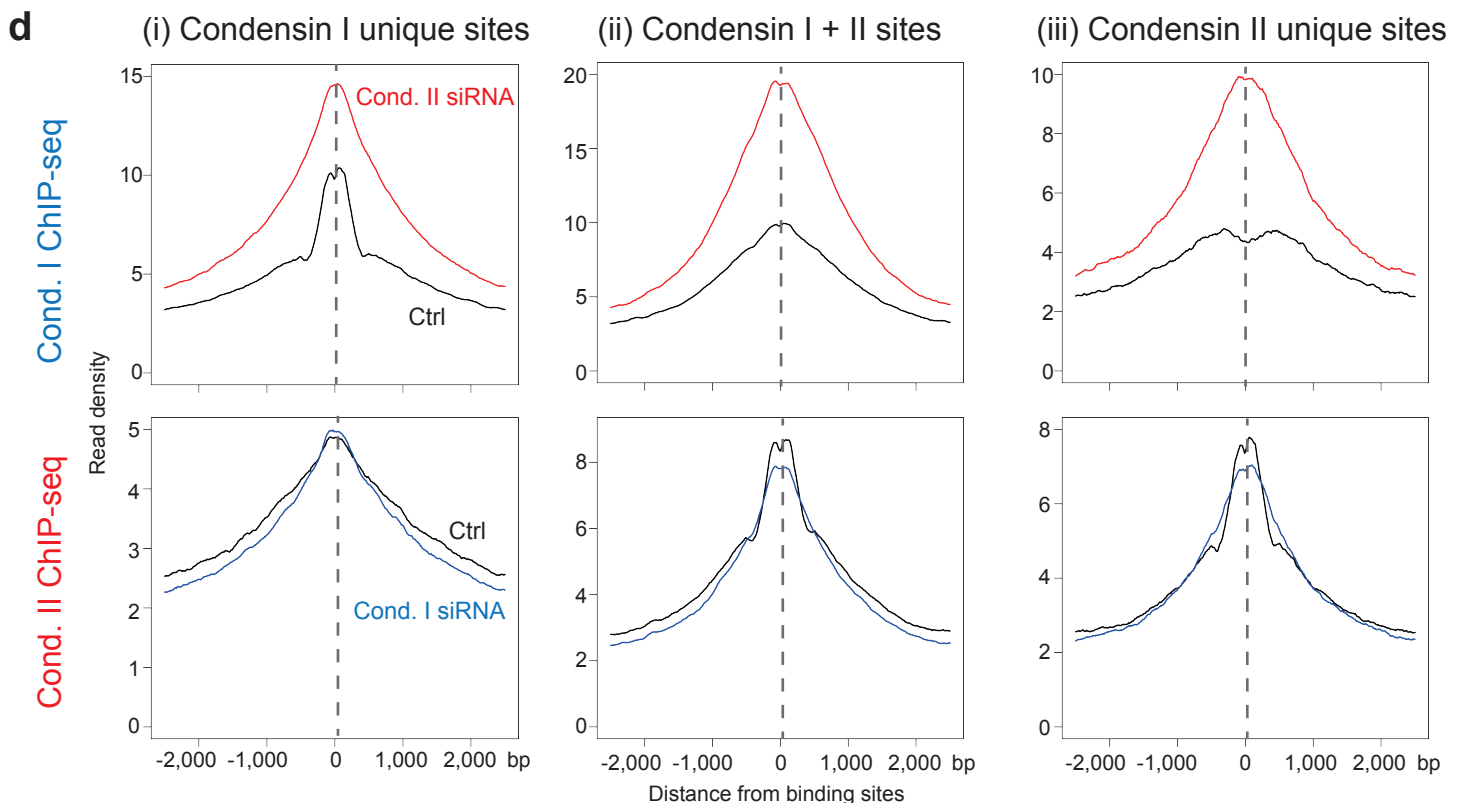
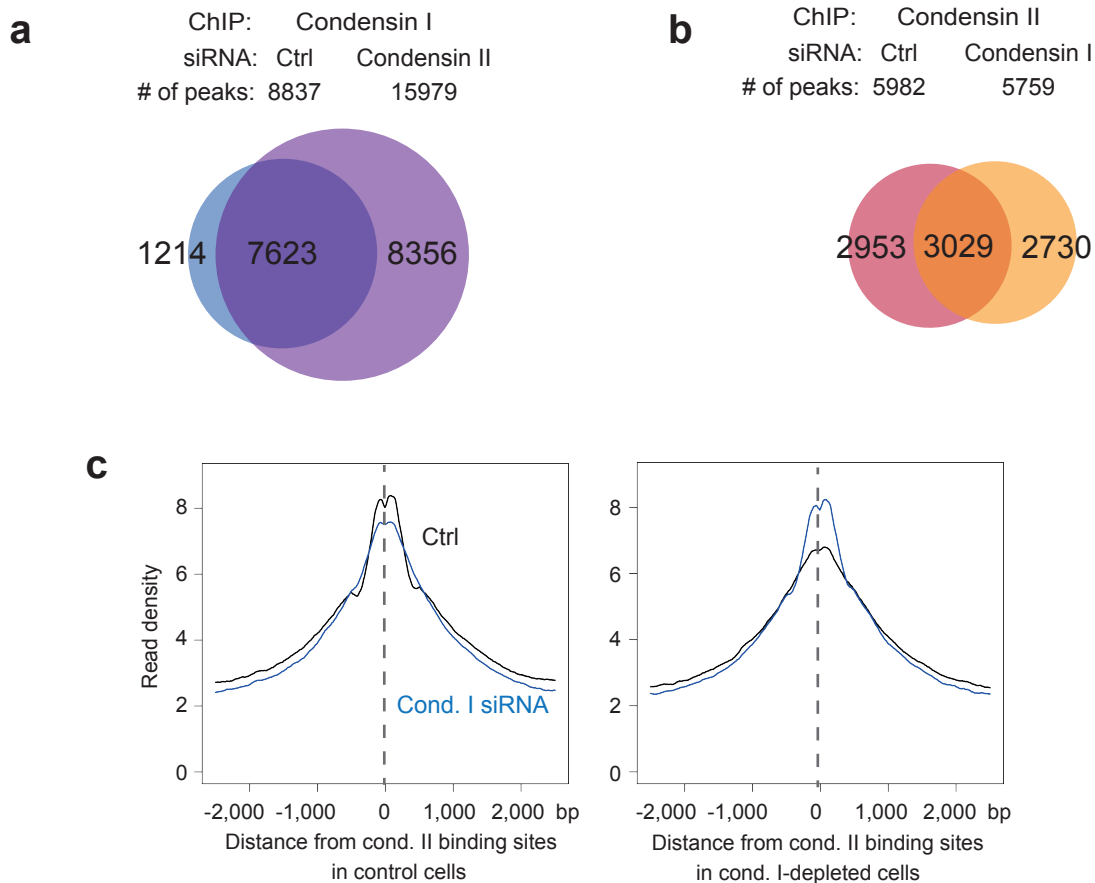
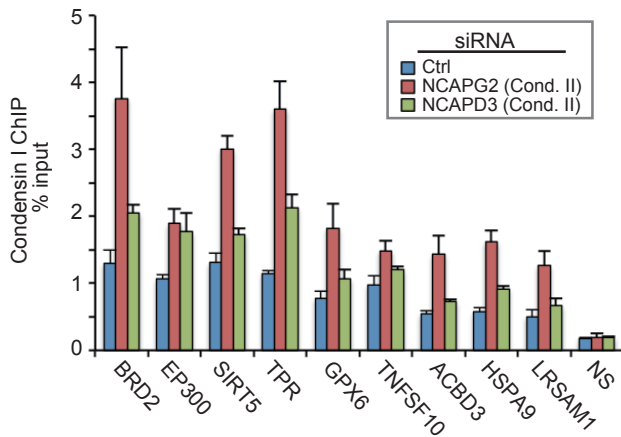
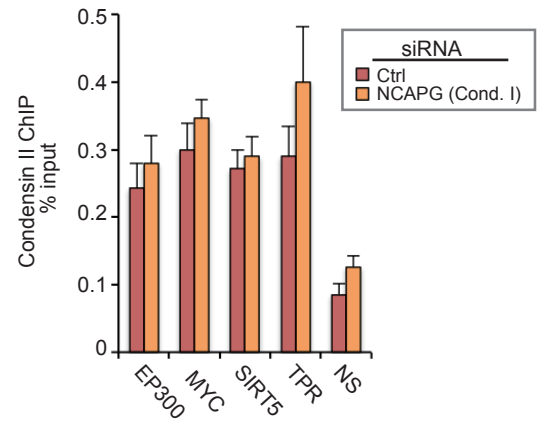


図 15 | コンデンシン I、II と TOP2A の相互関係の解析 (a, b) 各 ChIP-seq データから抽出された統計的に有意な結合領域数とその重なりを示すベン図。ChIP, コンデンシン I (NCAPG サブユニット) または II (NCAPH2 サブユニット) の ChIP。siRNA, コンデンシン I (NCAPG サブユニット), II (NCAPD3 サブユニット) siRNA または siRNA なし (Ctrl) でトランスフェクション処理を行い、細胞分裂前中期に同調したサンプル。抽出された結合領域が 1 ベース以上オーバーラップする場合を重なる結合領域と判定した。(c) 分裂期のコントロール (左) または コンデンシン I (NCAPG サブユニット) ノックダウン (右) 細胞におけるコンデンシン II 結合領域で平均化したコンデンシン II の ChIP-seq プロファイル。コンデンシン I (NCAPG サブユニット) の siRNA あり (Cond. I siRNA) または無し (Ctrl) でトランスフェクション処理を行い、細胞分裂前中期に同調したサンプル。y 軸は平均したリード数を示している。(d) 各結合領域で平均化したコンデンシン I (上段) と II (下段) の ChIP-seq プロファイル。(i) Condensin I unique sites, 分裂期のコントロールの細胞におけるコンデンシン I 結合領域でコンデンシン II 結合領域と重ならない領域。(ii) Condensin I + II sites, コンデンシン II 結合領域でコンデンシン I 結合領域と重なる領域。(iii) Condensin II unique sites, コンデンシン II 結合領域でコンデンシン I 結合領域と重ならない領域。Cond. I (NCAPG)、II (NCAPD3) siRNA または siRNA オリゴなし (Ctrl) でトランスフェクション処理を行ったサンプル。y 軸は平均したリード数を示している。 続く。

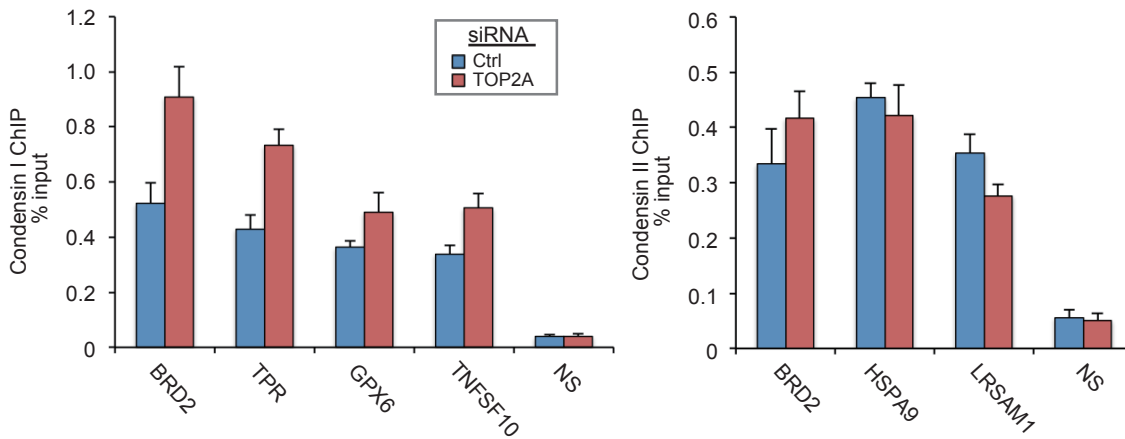
e



f



g



h

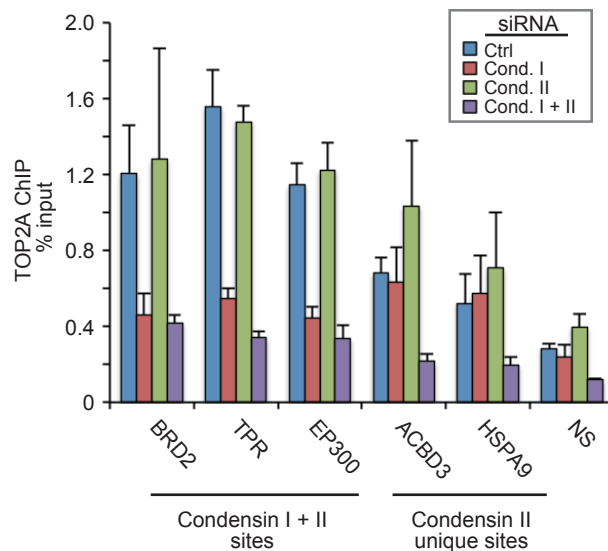


図 15 | 続き (e-g) 分裂期の細胞におけるコンデンシン I またはコンデンシン II の ChIP-qPCR。siRNA, コンデンシン I サブユニット NCAPG、コンデンシン II サブユニット NCAPD3、NCAPG2、TOP2A (#2) siRNA または siRNA オリゴなし (Ctrl) でトランスフェクション処理を行ったサンプル。各 qPCR のサイトはそれぞれコンデンシン I または II の統計的に有意な結合領域であり、名前は近傍の遺伝子名である。NS はコンデンシン I と II の統計的に有意な結合がみられない領域である。**(h)** 分裂期の細胞における TOP2A の ChIP-qPCR。siRNA, コンデンシン I サブユニット NCAPG (Cond. I)、コンデンシン II サブユニット NCAPD3 (Cond. II)、その両方の siRNA または siRNA オリゴなし (Ctrl) でトランスフェクション処理を行ったサンプル。Condensin I + II sites, コンデンシン I と II 両方の統計的に有意な結合領域であり、名前は近傍の遺伝子名である。Condensin II unique sites, コンデンシン II の統計的に有意な結合領域であり、コンデンシン I の統計的に有意な結合がみられない領域。Condensin I + II sites と Condensin II unique sites のどちらにも TOP2A の統計的に有意な結合領域がオーバーラップしている。NS は TOP2A の統計的に有意な結合がみられない領域である。本図内のエラーバーは標準偏差を表す (n=3, qPCR の technical replicates)。

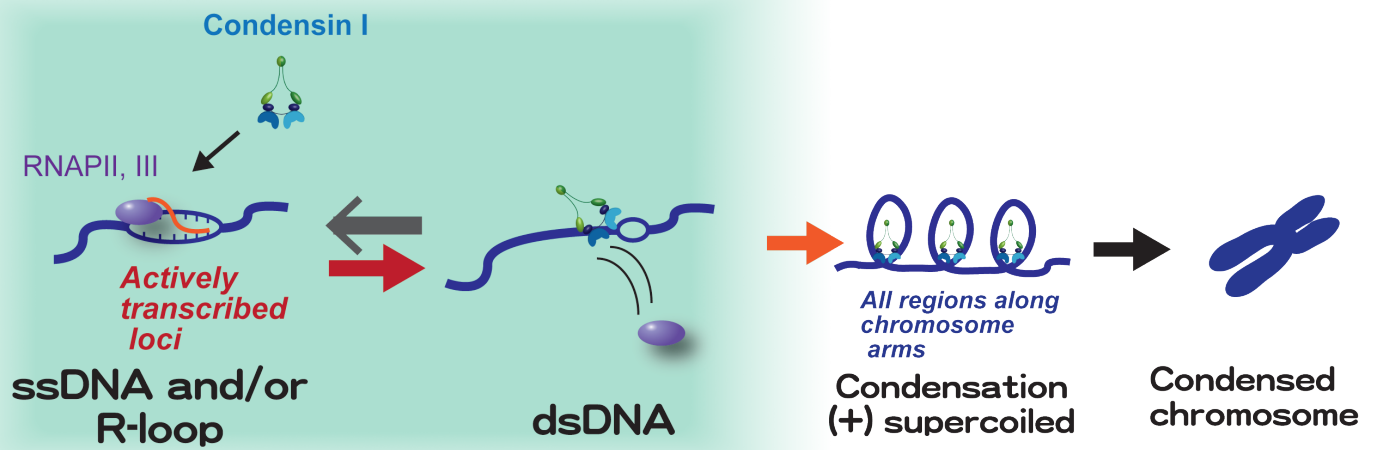


図 16 | コンデンシン I による分裂期染色体凝縮メカニズムのモデル 転写活性の高い遺伝子領域において、コンデンシン I は RNA ポリメラーゼ (RNAPII, III) を排除しつつ、転写によって生じた単鎖 DNA (ssDNA) または DNA:RNA ハイブリッドの R-loop 構造を二重鎖 (dsDNA) に巻き戻す。二重鎖 DNA への巻き戻しはコンデンシン I が染色体 DNA に正の超らせん (+) supercoiled) を導入するために必要であり、この正の超らせんの導入は染色体全域で起こる。DNA の正の超らせん構造は染色体の折り畳みと個別化を促進し、正確な分裂期染色体構造の構築に寄与する。

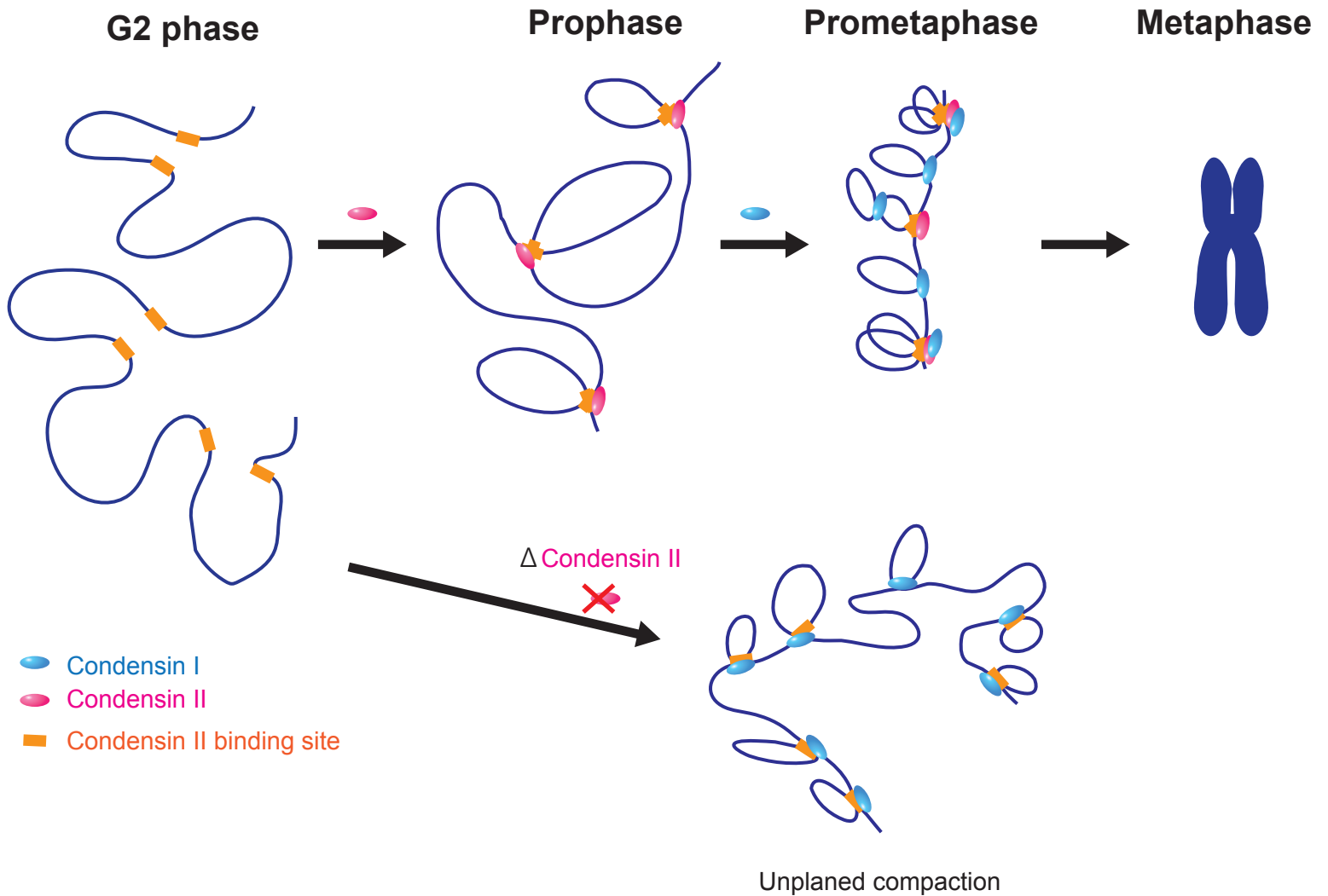


図17 | コンデンシンIとIIによる二段階の分裂期染色体凝縮メカニズムのモデル コンデンシンIを青色、IIを桃色、IIの結合領域を橙色で模式的に示した。コンデンシンIIは細胞分裂前期において、決まった領域に結合して初期段階の染色体DNAの折り畳みを行う。細胞分裂前中期の核膜崩壊後にコンデンシンIが結合し、より細かく染色体DNAを折り畳む。このときコンデンシンIは単鎖や絡み合ったDNA構造に優先的に結合してこれらの構造の解消を促進する。最終的に、コンデンシンIとIIの協調的な染色体DNAの折り畳みによって染色体構造の構築が中期までに完了する。下の図はコンデンシンIIを欠損した場合を模式的に示している。コンデンシンIIの欠損では、間期の染色体の状態からいきなりコンデンシンIによる細やかな染色体DNAの折り畳みが進行する。この場合、効果的に染色体DNAを折り畳むことができず、効率よく染色体の大きさを減少させていくことができない。

表1. ChIP-seqデータの統計

Sample description	Platform	Mapping tool (param)	Reference	Total number of reads	Number and percentage (in parentheses) of mapped reads
ChIP-seq					
GFP-CENPA, asy	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	244,363,679	161,017,587 (65.89%)
GFP-CENPA, asy, input	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	263,349,826	222,571,991 (84.52%)
NCAPG, M, (図4, 5, FA)	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	220,049,580	95,705,915 (43.49%)
NCAPG, M, (図4, 5, FA), input*	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	213,329,370	170,144,879 (79.76%)
NCAPG, M, (図5, EGS+FA, 6-8, 10, 11)	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	36,278,217	27,290,427 (75.23%)
NCAPG, M, (図5, EGS+FA, 6-8, 10, 11), input	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	41,537,233	32,240,060 (77.62%)
NCAPG, M, (図12, 13, 15)	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19	42,879,452	32,208,697 (75.11%)
NCAPG, M, (NCAPD3 siRNA)	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19	41,365,862	30,205,401 (73.02%)
NCAPG, M, (NCAPD3 siRNA), input	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19	44,962,497	34,952,403 (77.74%)
NCAPH2, M	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19	65,243,891	51,903,048 (79.55%)
NCAPH2, M, (NCAPG siRNA)	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19	72,668,365	58,107,076 (79.96%)
NCAPH2, M, (NCAPG siRNA), input**	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	62,539,714	47,908,147 (76.60%)
RNAP1, asy	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19 + rDNA	43,139,258	32,881,579 (76.22%)
RNAP1, M	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19 + rDNA	47,143,269	36,254,264 (76.90%)
RNAP1, M, (NCAPG siRNA)	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19 + rDNA	45,766,550	35,288,253 (77.10%)
RNAP2, M	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	52,942,295	40,393,344 (76.30%)
RNAP2, M, (NCAPG siRNA)	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	53,570,759	41,164,206 (76.84%)
RNAP2, asy	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19	41,268,302	33,090,794 (80.18%)
RNAP2, asy, input***	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19	138,806,083	108,543,661 (78.20%)
RNAP3, M	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	46,524,340	35,694,248 (76.72%)
RNAP3, M, (NCAPG siRNA)	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	33,643,225	25,975,867 (77.21%)
RNAP3, asy	HiSeq 2000	Bowtie 0.12.5 (-n3 -m1)	UCSC hg19	43,026,370	33,356,022 (77.52%)
TOP2A, M	HiSeq 2000	Bowtie 1.0.0 (-n3 -m1)	UCSC hg19	39,070,098	28,798,647 (73.71%)

asy, 非同調の細胞, M, 分裂前中期の細胞。

* "NCAPH2, M", "RNAP2, M", "RNAP3, M", "TOP2A, M" のinputとしても使用した。

** "RNAP2, M, (NCAPG siRNA)", "RNAP3, M, (NCAPG siRNA)" のinputとしても使用した。

*** "RNAP3, asy" のinputとしても使用した。

表2. プライマーペア一覧

Target site	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	Chromosome position (hg19)
ChIP-qPCR			
ACBD3	AGTCGCTCTGCGTTCCAGCAC	AGGTCAGCAGGAAGTCGATACG	chr1:226,374,348-226,374,440
CDC6	AGGCGAAAGGCTCTGTGACTAC	CCACAAGCCCCTGAACAAAAC	chr17:38,444,057-38,444,199
CDKN1A / NS2 (図5c)	GCTGCGTTTACAGGTTTTC	CTGTACTTGTAAATCCCCTCTCC	chr6:36,646,689-36,646,838
CDK4	TGTGACCAGCTGCCAAAGAG	AGTCGAAGCACCTCCTGTCC	chr12:58,146,124-58,146,238
CDK6	TTTACGAAGCCTCCATCGCTAC	TTCTCGGAGGAACCAGGAAG	chr7:92,463,095-92,463,174
EP300	AAGAAACAACAGCCGCCATC	TCCCGCAGTTAGCACTCAGC	chr22:41,487,771-41,487,882
E2F3	CTCTTGTCCAGCCAATCAAG	CCGCTACCTCCTTACTTCAGTCC	chr6:20,401,849-20,401,985
FHDC1	GGCACTTGCAGGTTCCAGAAG	GCAGGAGACGGAGATAGCTG	chr4:153,857,084-153,857,181
FUS	TGGCCTCAAACGGTAGGTAAG	GGTCCCCTGAAAACGAAAAG	chr16:31,191,537-31,191,627
GHR	TTATATATAGCCCGAGGGGATGC	ACACGTACACTCATTCCAGGACACAC	chr5:42,424,909-42,424,999
GPX6	GACCAGTGGAAACGTGATGG	GGGATGGAGAAAGCGTGAG	chr6:28,510,502-28,510,642
HNRNPD	CTCCGACATAGTCTAGTGTCTCC	ATTACTTTGCTGCTAGTTTTCGGTTC	chr4:83,294,823-83,294,906
HSPA9	ATTCGGGAAGGTCCTCCAGTTC	GCCTCGTACTCCTCCATTATCC	chr5:137,910,902-137,911,033
IGSF3	GCCCGGCAAGTTAATCAGG	GAGGAAGGACGAGCTTCTGTG	chr1:117,210,572-117,210,700
LRSAM1	GGAGGGGATAACGTACCAGACC	GCTCCCTCTGCACAGACACTAAC	chr9:130,212,994-130,213,122
MYC / NS1 (図5c)	TATTATAACCGCTCTCCAAG	CGGTGGGATGTTAGTGTAGATAGG	chr8:128,747,686-128,747,808
MYH10	CTCTTACGCCCTCATAGGC	GCTGTCCATCTACGCACGAG	chr17:8,534,305-8,534,385
RAB26	GGAAATCACAGAAAACACAGAAAC	TGTGCAATCAAAAGGCCAAG	chr16:2,203,983-2,204,097
RPS8	GTGAATCTTTGCGGTTTCTCTTTC	AGTAGGCTGTGAAGCAGGATGG	chr1:45,241,229-45,241,348
SIRT5	CCTCTAGGAGAAAGCCTGGAAG	TCCAACCCCGTTTCCATC	chr6:13,574,899-13,575,044
SMC3	CAGACCTGAACCTGACTCCTCCTAC	CCCTCAGCCAACAAAATGG	chr10:112,327,360-112,327,465
TNFSF10	TTCATAGGCTCCAGCTTTTCCAC	ACTGTTTCTGACTCATTTCCCTCAC	chr3:172,280,635-172,280,717
TPR	ACGGGGTAGAAGCGGAGAAAG	ACCGAGCGAGGTGATAGAGG	chr1:186,344,196-186,344,275
TP53	GGTGGCTCTAGACTTTTGAGAAGC	GCGGATTACTTGCCCTTACTTG	chr17:7,590,789-7,590,934
NS (図4e)	GATGGAGACGCAACACTGC	GCTCACACACCTACGCTTCC	chr13:37,005,836-37,005,923
NS (図5d, 7e, 8ceh, 11ab, 13b)	ATCTTCCACATATGCCTGTGATTTG	TTCTTTCTTACCAGTCTCCGTGTG	chr12:7,942,273-7,942,372
NS (図13a, 14, 15f)	GGAAAGGGCTTGGTAGGTTT	CTGCCTGCTCCTTTTGTCT	chr2:151,346,940-151,347,041
H3K9me3 BS1 / NS1 (図5b)	TTCTGGATGCCTGAAGTAACCTG	CCTGGTCTCCAAGGGATAGAAC	chr9:121,948,640-121,948,756
H3K9me3 BS2 / NS2 (図5b)	AATGGATATGGGAAATCACTCCTG	AAAGCTCTGGCACTTTGATTATGG	chr19:37,210,113-37,210,198
BRD2 (TSS)	TCTAGAACGAGCTGGAGGATTCTG	AGCGGATGGAGGTGGATTG	chr6:32,940,002-32,940,086
BRD2 (Gene body)	GAGGCAAGGGTCTTAAGTAAAGTGG	CAAGATGGCTGTAGGTGTAGGG	chr6:32,944,274-32,944,395
BRD2 (TTS)	TTACTGCAGTGAGAAAAGGCAATAG	AAACACAGCAAAAGCCTACTGG	chr6:32,949,171-32,949,250
HSPA1A (TSS)	AAGGCTTCCAGAGCGCAAC	GCTGGAACCGGAACACTGG	chr6:31,783,386-31,783,491
HSPA1A (Gene body) *	AGAACAAGCGAGCCGTGAG	GTCGATGCCCTCAAACAGG	chr6:31,784,297-31,784,409, 31,796,491-31,796,603
HSPA1A (TTS)	TACCATTTGAGGAGGTGGATTAGG	ACAAAGAAGTGAAGCAGCAAAGAG	chr6:31,797,632-31,797,768
HSPA8 (TSS)	CTGCCCTTACAAGACCCAATC	CGGTGAGTGCGTTATCGTG	chr11:122,932,954-122,933,056
HSPA8 (Gene body)	CAGACATCCAAGGAAGGTGTTG	GGTGACTCGCTGTGATGAGTG	chr11:122,930,048-122,930,136
HSPA8 (TTS)	CACCCAGCCCTTGTAACTCAAG	GGTGGGAGAAGTAGGCTTAGGTG	chr11:122,928,081-122,928,160
HSP90AA1 (TSS)	GCTAAGTGACCCGACAGGAC	AAGGTTCCGGAGGCTTCTG	chr14:102,553,327-102,553,463
HSP90AA1 (Gene body)	GAGGCCAATTGGAAAATAATGG	ACTGAACTGGCGGAAGATAAAGAG	chr14:102,550,093-102,550,195
HSP90AA1 (TTS)	GCCAGGATGGCTTAAAGTAGATTTG	TTCTCTTAGTGTCCACGTTGTTTTG	chr14:102,547,030-102,547,156
RPL13 (TSS)	GCGACGTCAGTTCTCCTTTC	GCAATGCACCTCTGGGATGATAG	chr16:89,626,987-89,627,078
RPL13 (Gene body)	GTTAATGTAGCATCTTGGACTTTGG	AAGAAGCCCATTGAAGGAAGG	chr16:89,630,168-89,630,270
RPL13 (TTS)	GTAGTTTCGACCCTGGAAGACG	CAAATGAAACTACGCCCTGGATG	chr16:89,633,101-89,633,181
RT-qPCR			
MYC	CCTGGTGCTCCATGAGGAGA	CTCCAGCAGAAGGTGATCCAGA	
THOC1	CCTGAAGTAATCCTGAAGTGACCAG	CGAAATGGGAGACGAGGAAG	
β-Actin	TGGCACCCAGCACAAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGAATAGAAGCA	

* ゲノム上の二箇所を増幅するプライマーペア。増幅される配列は完全に一致する。

第四章 材料と方法

細胞培養と同調

HeLa 細胞 (ヒト子宮頸部がん細胞)をプラスチックディッシュ上に播種し、37°C、CO₂濃度 5%の条件で培養した。培養液は高グルコース DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Wako) に 10% Fetal bovine serum (Biosera) 、ペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液 (Wako)、さらに 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4)を加えて使用した。過増殖しないうちに TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) で細胞をディッシュからはがして希釈して播き直し、細胞の継代を行った。

細胞分裂前中期での同調にはダブルチミジンブロック法とノコダゾール (Calbiochem) を用いた。細胞を 2 mM チミジンを添加した培養液中で 14-16 時間培養した後、PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76mM KH₂PO₄、オートクレーブ滅菌) で洗浄し、通常の培養液で 8 時間培養した。チミジンを添加して 14-16 時間培養し、一度 PBS で洗浄して再び通常の培養液で 7 時間培養した。さらに、50 ng/mL ノコダゾールを添加して 4 時間培養後、なるべく分裂期の細胞のみを解析するため、シェイクオフして上清の細胞のみを回収した。また、RNAP2、3 の ChIP 及び Metaphasespread (図 9d) ではより同調を高めるため、二回目のチミジンリリースから 7 時間後に CDK1 阻害剤である RO3306 (Calbiochem)を終濃度 8 μM で添加して、2 時間培養し、G2/M 期に細胞を同調した。さらに、PBS で洗浄後に 2 時間ノコダゾールを添加した培養液で培養し、シェイクオフで回収した。G1 期での細胞同調はノコダゾールによって分裂期で停止した細胞をシェイクオフで回収し、PBS で洗浄後に 2 時間通常の培養液で培養してから回収した。

使用した HeLa 細胞株はがん研究会がん研究所の広田亨博士から分与された。GFP タグ付き CENPA を発現する HeLa 細胞株についてはすでに報告されている (Kunitoku et al., 2003)。

フローサイトメトリー解析

細胞を回収後、PBS で洗浄して-20°Cで冷やした 70% Ethanol に懸濁し、-20°Cで一晩以上インキュベートして固定処理を行った。固定した細胞を PBS で洗浄し、50 μg/mL, propidium iodide / 0.1 mg/mL RNase (Roche) / PBS に懸濁して、室温で 30 分間インキュベートした。これらの細胞について、FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。サンプルあたり 20000 個の細胞を解析した。

RNA 干渉

siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて、添付のプロトコールに従って行った。siRNA は終濃度 50nM で使用した。細胞同調する場合、一回目のチミジン添加の 8 時間前にトランスフェクションを行った。非同調の場合はトランスフェクションから 60 時間で細胞を回収した。使用した siRNA のセンス鎖の配列を以下に示す。

NCAPD3: 5' - AAACGUAGGACUGUAAUUCAGGAGC - 3'

NCAPG: 5' - AAUAAGACGAGAAAGAAUCCUGCUG - 3'

NCAPG (図 8d, #2): 5' - UAAAUAGUCUGCAUAUACUACAGGC - 3'

NCAPG2: 5' - UUUGCAUGAUUCCAAGACUCCGCUG - 3'

NCAPH2 (#1): 5' - ACUCCCGGACUAACGUGGAUCUCAA - 3'

NCAPH2 (#2): 5' - CAGCCAAUGGAAGUUUCCGUGUGCA - 3'

TBP: 5' - GGGAGCUGUGAUGUGAAGUUUCCUA - 3'

THOC1: 5' - CCCUCUGUCUGAGAAAUCAGGUCUU - 3'

TOP2A (#1): 5' - GAGAUGUCACUAAUGAUGACCAUUA - 3'

TOP2A (#2): 5' - GCUCAGCUCUUUGGCUCGAUUGUUA - 3'

TOP2A (#3): 5' - CAACCUUCAACUAUCUUCUUGAUUAU - 3'

TTF2 (Jiang et al., 2004): 5' - GGGAGCUGUGAUGUGAAGUUUCCUA - 3'

抗体と試薬

使用した抗体を以下に示す。

ChIP; GFP ポリクローナル抗体 (TP401, Torrey Pines Biolabs)、H3K9me3 モノクローナル抗体 (05-1250, Merck Millipore)、NCAPH2 ポリクローナル抗体 (A302-276A, Bethyl)、RNAP1 PAF53 サブユニットポリクローナル抗体 (ab88623, Abcam)、RNAP2 CTD リピートモノクローナル抗体 (8WG16 クローン、ab817, Abcam)、RNAP3 RPC32 モノクローナル抗体 (sc-21754, Santa Cruz Biotechnology)、非特異的ラビット免疫グロブリン G (IgG, 2797, Cell Signaling)、Rad21 ポリクローナル抗体についてはすでに報告されている (Deardorff et al., 2012)、RNAP2 CTD repeat の 2 番目のセリンのリン酸化修飾を認識するモノクローナル抗体は大阪大学大学院生命機能研究科の木村宏博士により作出、分与された (Stasevich et al., 2014)。

ウェスタンブロットティング; NCAPH2 ポリクローナル抗体についてはすでに報告されている (Abe et al., 2011)。α-Tubulin モノクローナル抗体 (B-5-1-2 クローン, Sigma)、

ヒストン H3 ポリクローナル抗体 (ab1791, Abcam)、TBP モノクローナル抗体 (MAb-TBPCSH-100, diagenode)、NCAPD3 ポリクローナル抗体 (A300-604A, Bethyl)、NCAPG ポリクローナル抗体 (A300-602A, Bethyl)。

ChIP、ウェスタンブロットティング; TOP2A ポリクローナル抗体 (ab74715, Abcam)。

ChIP、ウェスタンブロットティング、免疫染色; NCAPG ポリクローナル抗体についてはすでに報告されている (Nakajima et al., 2007)。

ウェスタンブロットティングにおける抗体の希釈率を以下に示す。

1:1000; α -Tubulin 抗体、ヒストン H3 抗体、NCAPD3 抗体、TOP2A 抗体、NCAPH2 抗体、NCAPG 抗体。

1:2000; TBP 抗体。

免疫染色における NCAPG 抗体の希釈率は 1:1000 で行った。

ウェスタンブロットティングの二次抗体は Horseradish peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 及び Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research) を 1:5000 の希釈率で使用した。

免疫染色の二次抗体は Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 568 conjugate (Thermo Fisher Scientific) を 1:400 の希釈率で使用した。

転写阻害剤として 1,10-phenanthroline (Sigma)、Triptolide (Enzo Life Sciences)、SNS-032 (Selleck Chemicals) を用いた (Chen et al., 2009; Wang et al., 2011)。

クロマチン免疫沈降 (ChIP)

ChIP の方法はこれまで報告されている (Deardorff et al., 2012)。 $\sim 1 \times 10^7$ の細胞を培養液に終濃度 1% になるように 37% ホルムアルデヒド溶液を加えて室温で 10 分間インキュベートし、固定処理を行った。次に 2.5 M glycine / PBS を終濃度 125 mM で加えてさらに 5 分間インキュベートし、クロスリンク反応を停止させた。固定した細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、1 mL の LB0 バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) に懸濁して溶解し、4°C において $2,000 \times g$ で 3 分間遠心してクロマチン画分を回収した。この段階において液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。クロマチン画分を 1 mL の MNB1 バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.1% NP-40, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM PMSF, $1 \times$ cComplete™ EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)) で懸濁し、10 分間氷上でインキュベートした。その後、4°C において $2,000 \times g$ で 3 分間遠心し、ペレットを 100 μL の MNB2 バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM

PMSF, 5mM CaCl₂) で懸濁後、0.5 μL (1,000 gel units) の MNase (New England Biolabs) を加え、37°Cで 15 分間インキュベートし、クロマチンを断片化した。さらに、反応液を氷上に移し、5 μL の 0.5M EDTA を加えて反応を停止させた。300 μL の LB3 バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-Deoxycholate, 0.1% SDS, 1× cOmplete™ protease inhibitor cocktail (Roche))を加え、4°Cにおいて 2,000 ×g で 1 分間遠心した。Branson Sonifier 250D (Branson) を使用してソニケーション (振幅を最大の 17%で 12 秒間を 3 回、1 回毎に 4°Cにおいて 10,000 ×g で 1 分間遠心してスピンドウン)を行った。次に 4°Cにおいて 19,000 ×g で 30 分間遠心し、上清に 500 μL の LB3 バッファーを加えて断片化クロマチン溶液とした。このクロマチン溶液 400 μL に抗体ビーズを加えて一晩 4°Cで転倒混和した。また、20 μL クロマチン溶液に 80 μL の溶出バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS) を加えて「input DNA」とした。抗体ビーズは以下のよう に調製した。50 μL の磁気ビーズ (Dynabeads Protein A または Dynabeads anti-Mouse IgG, Thermo Fisher Scientific) を 5 mg/mL bovine serum albumin / PBS (BSA/PBS)で 2 回洗浄し、500 μL の BSA/PBS に懸濁した。懸濁液に 2.5 μg の抗体を加え、4°Cで 3 時間以上転倒混和した。この抗体ビーズを BSA/PBS で 2 回、LB3 バッファーで 1 回洗浄して ChIP に使用した。クロマチン溶液と反応後、抗体ビーズを RIPA 洗浄バッファー (50 mM HEPES-KOH pH 7.4, 0.5 M LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholate)で 5 回、TE50 バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA)で 1 回洗浄した後、100 μL の溶出バッファーに懸濁した。その後、65°Cで 20 分間インキュベートし、抗体ビーズを室温において 10,000 ×g で 1 分間遠心してスピンドウンした。上清 (ChIP サンプル)と input DNA を 65°Cで 6 時間から一晩インキュベートし、脱クロスリンク反応を行った。その後、2 μL の 50 mg/mL RNase (Roche)を加え、37°Cで 1 時間インキュベートした。さらに 2 μL の 50 mg/mL Proteinase K (Merck Millipore)を加え、50°Cで 2 時間から一晩インキュベートした。さらに、QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いてキット添付のプロトコールに従って DNA 精製し、input 及び ChIP DNA とした。

ソニケーションによってクロマチン断片化を行う場合、以下の方法で行った (図 5b, c)。固定後の細胞を 1 mL の LB1 バッファー (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% NP-40, 0.25% Triton-X 100, 1 mM PMSF, 10 mM DTT) に懸濁して溶解し、4°Cにおいて 2,000 ×g で 3 分間遠心してクロマチン画分を回収した。クロマチン画分を 1 mL の LB2 バッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mM PMSF) で懸濁し、10 分間氷上でイン

キュベートした。次に、4°Cにおいて2,000 ×g で3分間遠心した。その後、1 mL のLB3バッファに懸濁し、10分間氷上でインキュベートして、4°Cにおいて2,000 ×g で3分間遠心した。さらに、400 μL のLB3バッファを加えて、4°Cにおいて2,000 ×g で1分間遠心した。Branson Sonifier 250D を使用してソニケーション（振幅を最大の17%で12秒間を6回、1回毎に4°Cにおいて10,000 ×g で1分間遠心してスピンドウン）を行い、クロマチンを断片化及び可溶化した。

コンデンシン I (NCAPG サブユニット) の ChIP-seq は二段階固定処理した細胞で行った (図 5 から 11)。回収した細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、1.5 mM Ethylene glycol bis(succinimidyl succinate) (EGS) / PBS に懸濁し、室温で 45 分間転倒混和して一段階目の固定を行った。さらに、終濃度 1%になるように 37% ホルムアルデヒド溶液を加えて室温で 20 分間転倒混和し、二段階目の固定処理を行った。次に 2.5 M glycine / PBS を終濃度 200 mM で加えてさらに 10 分間転倒混和し、クロスリンク反応を停止させた。

ChIP-seq 法

ChIP 及び input DNA は添付のプロトコールに従って Covaris S2 Focused-ultrasonicator (Covaris) で約 150-200 bp の長さに断片化した (Duty Cycle, 10%; Intensity, 5; Cycles per Burst, 100; Duration, 300 sec)。ChIP-seq library DNA の調製は NEBNext® ChIP-seq Library Prep Master Mix Set for Illumina (New England Biolabs) で添付のプロトコールに従って行った。調製した ChIP-seq library DNA を HiSeq® 2000 massively parallel DNA sequencing platform (Illumina) によって single-end で 65 bp をシーケンスして配列決定した。

得られた配列は Bowtie (Langmead et al., 2009) を用いてマッピングした。各リードの最初の 28 塩基について、ミスマッチを最大 3 塩基まで許容し (-n3 option)、ゲノム上で特異的に (一箇所だけに) マッピングされるリード (-m1 option) をヒトリファレンスゲノム (UCSC hg19) 上にマップした。ChIP-seq データの統計は表 1 に示した。

ChIP-seq プロファイルの可視化及び統計的に有意な結合領域の同定は本研究室で開発された ChIP-seq 解析ツール、DROMPA を用いた (Nakato et al., 2013)。図 4 から 11 までの解析は DROMPA (バージョン 1) で行った。ChIP-seq のマッピングデータにおいて、PCR バイアスに由来するリード (5'側の配列が同じリード同士) をフィルターし、各染色体において read per million normalization 法 (ゲノムサイズに応じて一定のリード数にする方法) で標準化した。リード数は 100 Mb 毎に 10⁶ リードとした。さらに、ゲノム上の 10-bp 毎にマッピングされるリード数を算出し、wiggle ファイルを

作成した。このファイルを ChIP-seq プロファイルの可視化や統計的に有意な結合領域の抽出に用いた。結合領域の同定では 500 bp 毎のリード数について以下の閾値を用いた。(i) 片側ウィルコクソンの順位和検定において input と ChIP の間の p-value が 10^{-4} 以下。(ii) ChIP/input が 3 以上。(iii) その領域における ChIP リード数 / 全体での平均の ChIP リード数が 3 以上。(iv) その領域における input リード数 / 全体での平均の input リード数が 10 以下。(v) その領域における ChIP リード数が 6 以上。コンデンシン I (NCAPG) の結合領域抽出においては False discovery rate を下げるため、(v) の閾値を 7 以上とした (図 6 以降)。

rDNA 領域における ChIP-seq 解析では rDNA 繰り返し配列にマップされるリードを可視化するため、PCR バイアスのフィルターは行わず、ゲノム全体で read per million normalization 法で標準化した。

図 12 以降の解析は DROMPA (バージョン 2.5.3) で行った。ChIP-seq のマッピングデータにおいて、PCR バイアスをフィルターし、ゲノム全体で read per million normalization 法で標準化した。さらに、10-bp または 100-bp 毎にリード数を算出し、wiggle ファイルを作成した。このファイルを ChIP-seq プロファイルの可視化や統計的に有意な結合領域の抽出に用いた (TSS や結合領域における平均のプロファイルの可視化は 10-bp、それ以外は 100-bp)。結合領域の同定では 100 bp 毎のリード数について以下の閾値を用いた。(i) 二項検定においてその領域における ChIP リード数と全体での平均の ChIP リード数の間の p-value が 0.01 以下。(ii) 二項検定において input と ChIP の間の p-value が 0.01 以下。(iii) Benjamini-Hochberg 法において q-value が 0.05 以下。

遺伝子の解析には RefSeq 遺伝子を用いた。遺伝子の発現量と結合の相関の解析には非同調の HeLa 細胞の RNA-seq データ (Gene Expression Omnibus の GMS765402) を用いた。ChIP-seq データの遺伝子領域との比較には解析ツール CEAS (cis-regulatory element annotation system) を用いた (Shin et al., 2009)。CGI のデータは UCSC Genome Bioinformatics サイトのものを用いた。

Quantitative PCR

ChIP DNA 及び cDNA の qPCR 解析は real-time PCR systems 7500 または StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific) と KAPA Fast qPCR kit (KAPA Biosystems) を用いて添付のプロトコールに従って行った。同じサンプルで三回繰り返し計測を行い、標準偏差を算出した。使用したプライマーペアは表 2 に示した。rDNA 領域と tRNA 遺伝子付近のプライマーペアはこれまでに報告されている (Oler et al.,

2010; Zentner et al., 2011)。

ChIP DNA のヌクレアーゼ P1 処理

上述の ChIP の方法で ChIP DNA を精製し、抗体ビーズからの溶出を行う前にビーズ上で ChIP DNA に以下のようにヌクレアーゼ P1 処理した。100 μ L の反応バッファー (40 mM MES-Na pH 6.0, 400 mM NaCl, 1 mM Zn(OAc)₂, 0.2 \times cOmplete™ EDTA-free protease inhibitor cocktail, 50 μ g/mL BSA) に 10 ユニットのヌクレアーゼ P1 (Wako) を加えて 42°C で 20 分間インキュベートした。反応後、抗体ビーズを TE50 バッファーで 1 回洗浄して、ChIP と同様の方法で溶出からの操作を行った。

RNA 抽出と RT-qPCR

~1 \times 10⁶ の細胞を 1 mL の Trizol (Thermo Fisher Scientific) で回収し、Nuclrospin RNA kit (Macherey-Nagel) を用いて添付のプロトコールに従って RNA の抽出および精製を行った。得られた RNA の cDNA への逆転写は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo) を用いて添付のプロトコールに従って行った。cDNA は qPCR によって解析した。インターナルコントロールには β -actin 遺伝子を用いた。新規に合成された RNA を定量するためのプライマーペアはこれまでに報告されているものを用いた (Blobel et al., 2009)。

タンパク質解析

タンパク質抽出とウェスタンブロットティングの方法はこれまでに報告されている (Deardorff et al., 2012)。~5 \times 10⁶ の細胞を氷冷 PBS で洗浄し、クロマチン分画バッファー (20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 10mM KCl, 10% Glycerol, 340 mM sucrose, 1.5 mM MgCl₂, 0.25% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 \times cOmplete™ protease inhibitor cocktail, 1 \times PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche)) を加え、氷上で 10 分間インキュベートした。一部を Whole cell extract (WCE) として回収した後、4°C において 1,500 \times g で 5 分間遠心し、上清を可溶性画分とした。沈殿を再びクロマチン分画バッファーに懸濁してクロマチン画分とした。WCE とクロマチン画分については 26G の針でシアリングして DNA を剪断した。

分画した各溶液に SDS sample バッファー (終濃度 25 mM Tris-HCl (pH6.8), 50 mM DTT, 3% SDS, 0.1% Bromophenol blue, 10% glycerol) を加えて 95°C で 5 分間処理して泳動サンプルとした。これらを用いて SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) を行い、タンパク質を分子量毎に分離した。分離したタンパク質は Mini

trans-blot cell (Bio-RAD) を用いて、70V の定電圧で 2 時間または 30V で 10 時間の処理で転写バッファー (192 mM Glycine, 25mM Tris, 15% Methanol) を用いてニトロセルロースメンブレン (Amersham Protran Premium 0.2 μ m NC, GE Healthcare Life science) に転写した。転写後のメンブレンを Ponceau S 溶液 (0.05% Ponceau S, 1% Acetic acid) で染色してスキャンした。さらに、ブロッキングバッファー (PBS/0.1% Tween-20 (PBS-T) / 3% non-fat milk) に浸して、室温で 2 時間または 4°C で 12 時間振盪した。このメンブレンを Can Get Signal® (TOYOBO) または MaxBlot Solution 1 (MBL Life science) で適宜希釈した一次抗体と室温で 1 時間または 4°C で 12 時間インキュベートした。さらに、PBS-T で 3 回洗浄後、ブロッキングバッファーで希釈した二次抗体と室温で 45 分間インキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄後、Luminata Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore) で化学発光検出し、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life science) で解析した。

免疫染色

免疫染色の方法についてはこれまでに報告されている (Abe et al., 2011)。分裂期に同調した細胞をシェイクオフで回収し、低張バッファー (PBS : Milli-Q 水 = 2 : 3) に懸濁し、37°C で 5 分間インキュベートした。以下の処理は全て室温で行った。この細胞 ($\sim 1 \times 10^4$) を 1,800 rpm で 5 分間、Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific) で遠心し、スライドガラスにスプレッドした。この細胞を 0.1% Triton X-100 / PBS で 2 分間、次いで PBS で 3 分間インキュベートした。さらに、2% パラホルムアルデヒド / 137 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.4) で 20 分間固定処理を行った。PBS で 1 回洗浄後、0.5% Triton X-100 / PBS で 5 分間、次いで 0.05% Triton X-100 / PBS で 5 分間インキュベートした。さらに、5% goat serum / 0.05% Triton X-100 / PBS で 1 時間インキュベートした。その後、1% goat serum / 0.05% Triton X-100 / PBS で適宜希釈した一次抗体によって 4°C で一晩インキュベートした。次の日、以下の処理を全て室温で行った。0.05% Triton X-100 / PBS で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返した。次に、1% goat serum / 0.05% Triton X-100 / PBS で適宜希釈した二次抗体によって 45 分間インキュベートした。0.05% Triton X-100 / PBS で 5 分間の洗浄を 2 回繰り返した。さらに 0.5 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) / 0.05% Triton X-100 / PBS で 5 分間インキュベートした。PBS、Milli-Q 水の順に洗浄後、ProLong® Gold antifade reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてマウントし、蛍光顕微鏡 (Olympus BX-51 + DP-30 デジタルカメラ) で解析した。

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 Dev.* *25*, 863–874.

Adelman, K., and Lis, J.T. (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 720–731.

Akai, Y., Kurokawa, Y., Nakazawa, N., Tonami-Murakami, Y., Suzuki, Y., Yoshimura, S.H., Iwasaki, H., Shiroya, Y., Nakamura, T., Shibata, E., et al. (2011). Opposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing. *Open Biol.* *1*, 110023–110023.

Baxter, J., and Aragón, L. (2012). A model for chromosome condensation based on the interplay between condensin and topoisomerase II. *Trends Genet.* *28*, 110–117.

Baxter, J., Sen, N., Martínez, V.L., De Carandini, M.E.M., Schvartzman, J.B., Diffley, J.F.X., and Aragón, L. (2011). Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science* *331*, 1328–1332.

Bernad, R., Sánchez, P., Rivera, T., Rodríguez-Corsino, M., Boyarchuk, E., Vassias, I., Ray-Gallet, D., Arnaoutov, A., Dasso, M., Almouzni, G., et al. (2011). *Xenopus* HJURP and condensin II are required for CENP-A assembly. *J. Cell Biol.* *192*, 569–582.

Blat, Y., and Kleckner, N. (1999). Cohesins bind to preferential sites along yeast chromosome III, with differential regulation along arms versus the centric region. *Cell* *98*, 249–259.

Blobel, G. a., Kadauke, S., Wang, E., Lau, A.W., Zuber, J., Chou, M.M., and Vakoc, C.R. (2009). A Reconfigured Pattern of MLL Occupancy within Mitotic Chromatin Promotes Rapid Transcriptional Reactivation Following Mitotic Exit. *Mol. Cell* *36*, 970–983.

Castellano-Pozo, M., Santos-Pereira, J., Rondón, A., Barroso, S., Andújar, E., Pérez-Alegre, M., García-Muse, T., and Aguilera, A. (2013). R loops are linked to histone H3 S10 phosphorylation and chromatin condensation. *Mol. Cell* *52*, 583–590.

Chen, R., Wierda, W.G., Chubb, S., Hawtin, R.E., Fox, J. a., Keating, M.J., Gandhi, V., and Plunkett, W. (2009). Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *113*, 4637–4645.

Chen, S.H., Chan, N.-L., and Hsieh, T. (2013). New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* *82*, 139–170.

Christensen, M.O., Larsen, M.K., Barthelmes, H.U., Hock, R., Andersen, C.L., Kjeldsen, E., Knudsen, B.R., Westergaard, O., Boege, F., and Mielke, C. (2002). Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J. Cell Biol.* *157*, 31–44.

Clemente-Blanco, A., Mayán-Santos, M., Schneider, D. a, Machín, F., Jarmuz, A., Tschochner, H., Aragón, L., and Arago, L. (2009). Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature* *458*, 219–222.

Coelho, P. a. (2003). Condensin-dependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. *J. Cell Sci.* *116*, 4763–4776.

Cuylen, S., and Haering, C.H. (2011). Deciphering condensin action during chromosome segregation. *Trends Cell Biol.* *21*, 552–559.

D'Ambrosio, C., Schmidt, C.K., Katou, Y., Kelly, G., Itoh, T., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2008). Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes Dev.* *22*, 2215–2227.

Deardorff, M.A., Bando, M., Nakato, R., Watrin, E., Itoh, T., Minamino, M., Saitoh, K., Komata, M., Katou, Y., Clark, D., et al. (2012). HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature* *489*, 313–317.

Dekker, J., Marti-Renom, M. a, and Mirny, L. a (2013). Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 390–403.

Domínguez-Sánchez, M.S., Barroso, S., Gómez-González, B., Luna, R., and Aguilera, A. (2011). Genome instability and transcription elongation impairment in human cells depleted of THO/TREX. *PLoS Genet.* *7*, 19–22.

Downen, J.M., Bilodeau, S., Orlando, D. a., Hübner, M.R., Abraham, B.J., Spector, D.L., and Young, R. a. (2013). Multiple structural maintenance of chromosome complexes at transcriptional regulatory elements. *Stem Cell Reports* *1*, 371–378.

Duijf, P.H.G., and Benezra, R. (2013). The cancer biology of whole-chromosome instability. *Oncogene* *32*, 4727–4736.

Fairley, J. a, Scott, P.H., and White, R.J. (2003). TFIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis in vivo. *EMBO J.* *22*, 5841–5850.

Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., and Strunnikov, A. (2000). The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *J. Cell Biol.* *149*, 811–824.

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. *Curr. Biol.* *16*, 333–344.

Ginno, P. a., Lott, P.L., Christensen, H.C., Korf, I., and Chédin, F. (2012). R-Loop Formation Is a Distinctive Characteristic of Unmethylated Human CpG Island Promoters. *Mol. Cell* *45*, 814–825.

Gottesfeld, J.M., and Forbes, D.J. (1997). Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 197–202.

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. *J. Cell Sci.* *125*, 1591–1604.

Haeusler, R. a, Pratt-Hyatt, M., Good, P.D., Gipson, T. a, and Engelke, D.R. (2008). Clustering of yeast tRNA genes is mediated by specific association of condensin with tRNA gene transcription complexes. *Genes Dev.* *22*, 2204–2214.

Hernandez-Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus* *2*, 189–194.

Hirano, T. (2004). Chromosome shaping by two condensins. *Cell Cycle* *3*, 26–28.

Hirano, T. (2005). Condensins: Organizing and segregating the genome. *Curr. Biol.* *15*, 265–275.

Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 311–322.

Hirano, T. (2012). Condensins: Universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes Dev.* *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.

Hirano, T., Kobayashi, R., and Hirano, M. (1997). Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell* *89*, 511–521.

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

Hu, B., Petela, N., Kurze, A., Chan, K.-L., Chapard, C., and Nasmyth, K. (2015). Biological chromodynamics: a general method for measuring protein occupancy across the genome by calibrating ChIP-seq. *Nucleic Acids Res.* *43*, gkv670.

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. *Dev. Cell* *5*, 323–336.

Hudson, D.F., Marshall, K.M., and Earnshaw, W.C. (2009). Condensin: Architect of mitotic chromosomes. *Chromosome Res.* *17*, 131–144.

Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., and Kobayashi, T. (2010). Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* *327*, 693–696.

Jiang, Y., Liu, M., Spencer, C. a., and Price, D.H. (2004). Involvement of transcription termination factor 2 in mitotic repression of transcription elongation. *Mol. Cell* *14*, 375–385.

Johzuka, K., and Horiuchi, T. (2009). The cis Element and Factors Required for Condensin Recruitment to Chromosomes. *Mol. Cell* *34*, 26–35.

Johzuka, K., Terasawa, M., Ogawa, H., Ogawa, T., and Horiuchi, T. (2006). Condensin loaded onto the replication fork barrier site in the rRNA gene repeats during S phase in a FOB1-dependent fashion to prevent contraction of a long repetitive array in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2226–2236.

Kadauke, S., Udugama, M.I., Pawlicki, J.M., Achtman, J.C., Jain, D.P., Cheng, Y., Hardison, R.C., and Blobel, G. a. (2012). Tissue-specific mitotic bookmarking by hematopoietic transcription factor GATA1. *Cell* *150*, 725–737.

Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. a, van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., et al. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* *467*, 430–435.

Kidder, B.L., Hu, G., and Zhao, K. (2011). ChIP-Seq: technical considerations for obtaining high-quality data. *Nat. Immunol.* *12*, 918–922.

Kim, J.H., Zhang, T., Wong, N.C., Davidson, N., Maksimovic, J., Oshlack, A., Earnshaw, W.C., Kalitsis, P., and Hudson, D.F. (2013). Condensin I associates with structural and gene regulatory regions in vertebrate chromosomes. *Nat. Commun.* *4*, 2537.

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.

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., Cuvier, O., and Hirano, T. (2001). Chromosome Condensation by a Human Condensin Complex in *Xenopus* Egg Extracts. *J. Biol. Chem.* *276*, 5417–5420.

- Kranz, A.-L., Jiao, C.-Y., Winterkorn, L., Albritton, S., Kramer, M., and Ercan, S. (2013). Genome-wide analysis of condensin binding in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* *14*, R112.
- Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H., and Hirota, T. (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev. Cell* *5*, 853–864.
- Kurdistani, S. (2003). In vivo protein–protein and protein–DNA crosslinking for genomewide binding microarray. *Methods* *31*, 90–95.
- Lai, S.-K., Wong, C.-H., Lee, Y.-P., and Li, H.-Y. (2011). Caspase-3-mediated degradation of condensin Cap-H regulates mitotic cell death. *Cell Death Differ.* *18*, 996–1004.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* *10*, R25.
- Legros, P., Malapert, A., Niinuma, S., Bernard, P., and Vanoosthuyse, V. (2014). RNA Processing Factors Swd2.2 and Sen1 Antagonize RNA Pol III-Dependent Transcription and the Localization of Condensin at Pol III Genes. *PLoS Genet.* *10*, e1004794.
- Lipp, J.J., Hirota, T., Poser, I., and Peters, J.-M. (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J. Cell Sci.* *120*, 1245–1255.
- Liu, W., Tanasa, B., Tyurina, O. V., Zhou, T.Y., Gassmann, R., Liu, W.T., Ohgi, K. a., Benner, C., Garcia-Bassets, I., Aggarwal, A.K., et al. (2010). PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* *466*, 508–512.

- Maeshima, K., and Laemmli, U.K. (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev. Cell* *4*, 467–480.
- Marko, J.F. (2008). Micromechanical studies of mitotic chromosomes. *Chromosom. Res.* *16*, 469–497.
- Meyer, K.N., Kjeldsen, E., Straub, T., Knudsen, B.R., Hickson, I.D., Kikuchi, A., Kreipe, H., and Boege, F. (1997). Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J. Cell Biol.* *136*, 775–788.
- Moser, S.C., and Swedlow, J.R. (2011). How to be a mitotic chromosome. *Chromosom. Res.* *19*, 307–319.
- Nakajima, M., Kumada, K., Hatakeyama, K., Noda, T., Peters, J.-M., and Hirota, T. (2007). The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase. *J. Cell Sci.* *120*, 4188–4196.
- Nakato, R., Itoh, T., and Shirahige, K. (2013). DROMPA: Easy-to-handle peak calling and visualization software for the computational analysis and validation of ChIP-seq data. *Genes to Cells* *18*, 589–601.
- Nakazawa, N., Nakamura, T., Kokubu, A., Ebe, M., Nagao, K., and Yanagida, M. (2008). Dissection of the essential steps for condensin accumulation at kinetochores and rDNAs during fission yeast mitosis. *J. Cell Biol.* *180*, 1115–1131.
- Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 595–648.
- Neuwald, a F., and Hirano, T. (2000). HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res.* *10*, 1445–1452.

Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T., and Kanemaki, M. (2009). An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat. Methods* *6*, 917–922.

Nowak, D., Tian, B., and Brasier, A. (2005). Two-step cross-linking method for identification of NF- κ B gene network by chromatin immunoprecipitation. *Biotechniques* *39*, 715–725.

Oler, A.J., Alla, R.K., Roberts, D.N., Wong, A., Hollenhorst, P.C., Chandler, K.J., Cassidy, P. a, Nelson, C. a, Hagedorn, C.H., Graves, B.J., et al. (2010). Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 620–628.

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.

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., 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. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3296–3308.

Orlando, D.A., Chen, M.W., Brown, V.E., Solanki, S., Choi, Y.J., Olson, E.R., Fritz, C.C., Bradner, J.E., and Guenther, M.G. (2014). Quantitative ChIP-Seq Normalization Reveals Global Modulation of the Epigenome. *Cell Rep.* *9*, 1163–1170.

Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., et al. (2008). Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell* *132*, 422–433.

- Park, P.J. (2009). ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 669–680.
- Parsons, G.G., and Spencer, C. a (1997). Mitotic repression of RNA polymerase II transcription is accompanied by release of transcription elongation complexes. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 5791–5802.
- Poorey, K., Viswanathan, R., Carver, M.N., Karpova, T.S., Cirimotich, S.M., McNally, J.G., Bekiranov, S., and Auble, D.T. (2013). Measuring Chromatin Interaction Dynamics on the Second Time Scale at Single-Copy Genes. *Science (80-.)*. *342*, 369–372.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., et al. (2000). Genome-Wide Location and Function of DNA Binding Proteins. *Science (80-.)*. *290*, 2306–2309.
- Rubio, E.D., Reiss, D.J., Welch, P.L., Disteche, C.M., Filippova, G.N., Baliga, N.S., Aebersold, R., Ranish, J. a, and Krumm, A. (2008). CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8309–8314.
- Saitoh, N., Goldberg, I.G., Wood, E.R., and Earnshaw, W.C. (1994). ScII: An abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J. Cell Biol.* *127*, 303–318.
- Saka, Y., Sutani, T., Yamashita, Y., Saitoh, S., Takeuchi, M., Nakaseko, Y., and Yanagida, M. (1994). Fission yeast cut3 and cut14, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis. *EMBO J.* *13*, 4938–4952.
- Sakai, A., Hizume, K., Sutani, T., Takeyasu, K., and Yanagida, M. (2003). Condensin but not cohesin SMC heterodimer induces DNA reannealing through protein-protein assembly. *EMBO J* *22*, 2764–2775.

Samejima, K., Samejima, I., Vagnarelli, P., Ogawa, H., Vargiu, G., Kelly, D. a., Alves, F.D.L., Kerr, A., Green, L.C., Hudson, D.F., et al. (2012). Mitotic chromosomes are compacted laterally by KIF4 and condensin and axially by topoisomerase II?? *J. Cell Biol.* *199*, 755–770.

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. *Mol. Cell* *11*, 571–575.

Schmidt, D., Schwalie, P.C., Ross-Innes, C.S., Hurtado, A., Brown, G.D., Carroll, J.S., Flicek, P., and Odom, D.T. (2010). A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome Res.* *20*, 578–588.

Shin, H., Liu, T., Manrai, A.K., and Liu, S.X. (2009). CEAS: Cis-regulatory element annotation system. *Bioinformatics* *25*, 2605–2606.

Shintomi, K., and Hirano, T. (2011). The relative ratio of condensin I to II determines chromosome shapes. *Genes Dev.* *25*, 1464–1469.

Shintomi, K., Takahashi, T.S., and Hirano, T. (2015). Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors. *Nat. Cell Biol.* *17*.

Stasevich, T.J., Hayashi-Takanaka, Y., Sato, Y., Maehara, K., Ohkawa, Y., Sakata-Sogawa, K., Tokunaga, M., Nagase, T., Nozaki, N., McNally, J.G., et al. (2014). Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Nature* *516*, 272–275.

Stedman, W., Kang, H., Lin, S., Kissil, J.L., Bartolomei, M.S., and Lieberman, P.M. (2008). Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19/Igf2 insulators. *EMBO J.* *27*, 654–666.

Stephens, P.J., Greenman, C.D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G.R., Mudie, L.J., Pleasance, E.D., Lau, K.W., Beare, D., Stebbings, L. a., et al. (2011). Massive

Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* *144*, 27–40.

Sutani, T., and Yanagida, M. (1997). DNA renaturation activity of the SMC complex implicated in chromosome condensation. *Nature* *388*, 798–801.

Sutani, T., Sakata, T., Nakato, R., Masuda, K., Ishibashi, M., Yamashita, D., Suzuki, Y., Hirano, T., Bando, M., and Shirahige, K. (2015). Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation. *Nat. Commun.* *6*, 7815.

Swedlow, J.R., and Hirano, T. (2003). The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol. Cell* *11*, 557–569.

Taagepera, S., Rao, P.N., Drake, F.H., and Gorbsky, G.J. (1993). DNA topoisomerase II alpha is the major chromosome protein recognized by the mitotic phosphoprotein antibody MPM-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 8407–8411.

Tada, K., Susumu, H., Sakuno, T., and Watanabe, Y. (2011). Condensin association with histone H2A shapes mitotic chromosomes. *Nature* *474*, 477–483.

Thadani, R., Uhlmann, F., and Heeger, S. (2012). Condensin, Chromatin Crossbarring and Chromosome Condensation. *Curr. Biol.* *22*, R1012–R1021.

Thakurela, S., Garding, A., Jung, J., Schübeler, D., Burger, L., and Tiwari, V.K. (2013). Gene regulation and priming by topoisomerase II α in embryonic stem cells. *Nat. Commun.* *4*, 2478.

Vannini, A., and Cramer, P. (2012). Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol. Cell* *45*, 439–446.

Voit, R., Seiler, J., and Grummt, I. (2015). Cooperative Action of Cdk1/cyclin B and SIRT1 Is Required for Mitotic Repression of rRNA Synthesis. *PLOS Genet.* *11*, e1005246.

Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 430–440.

Wang, B.-D., Eyre, D., Basrai, M., Lichten, M., and Strunnikov, A. (2005). Condensin binding at distinct and specific chromosomal sites in the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 7216–7225.

Wang, B.D., Butylin, P., and Strunnikov, A. (2006). Condensin function in mitotic nucleolar segregation is regulated by rDNA transcription. *Cell Cycle* *5*, 2260–2267.

Wang, Y., Lu, J., He, L., and Yu, Q. (2011). Triptolide (TPL) inhibits global transcription by inducing proteasome-dependent degradation of RNA polymerase II (Pol II). *PLoS One* *6*, e23993.

Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiro, T., et al. (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* *451*, 796–801.

Xing, H., Vanderford, N.L., and Sarge, K.D. (2008). The TBP-PP2A mitotic complex bookmarks genes by preventing condensin action. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1318–1323.

Young, D.W., Hassan, M.Q., Pratap, J., Galindo, M., Zaidi, S.K., Lee, S., Yang, X., Xie, R., Javed, A., Underwood, J.M., et al. (2007). Mitotic occupancy and lineage-specific transcriptional control of rRNA genes by Runx2. *Nature* *445*, 442–446.

Zentner, G.E., Saiakhova, A., Manaenkov, P., Adams, M.D., and Scacheri, P.C. (2011). Integrative genomic analysis of human ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* *39*, 4949–4960.

Zhang, C.-Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J.M., Jackson, E.K., Liu, S., Meyerson, M., and Pellman, D. (2015). Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* *522*, 179–184.

Zhang, J., Poh, H.M., Peh, S.Q., Sia, Y.Y., Li, G., Mulawadi, F.H., Goh, Y., Fullwood, M.J., Sung, W.-K., Ruan, X., et al. (2012). ChIA-PET analysis of transcriptional chromatin interactions. *Methods* *58*, 289–299.

Zhao, R., Nakamura, T., Fu, Y., Lazar, Z., and Spector, D.L. (2011). Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1295–1304.

謝辞

本研究の機会と終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学分子細胞生物学研究所、白髭克彦教授に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始懇親なる御指導をいただきました坂東優篤博士に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、文章や図表作成について御指導をいただきました須谷尚史博士に心より感謝申し上げます。

本研究において、多大なる御指導いただきました中戸隆一郎博士、加藤由起博士に厚く感謝申し上げます。また、ChIP-seq 解析において多大なるご協力をしていただきました中川恵子氏に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始活発な議論を交わしてくださいました白髭研究室の皆様

最後に、このような環境と暖かい励まし、応援を下さいました父、母、兄をはじめ、親戚の皆様に心より感謝いたします。

平成 27 年 12 月 15 日

東京大学大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻 博士課程

坂田 豊典