

論文

染色体微細構造上における特定遺伝子可視化

金城康人*¹⁾ 小山元子*¹⁾ 宮崎則幸*¹⁾ 七里元晴*²⁾ 吉野智之*³⁾ 大谷敏郎*²⁾

Visualization of Specific Genes in the Fine Structures of Chromosomes

Yasuhito KINJO, Motoko KOYAMA, Noriyuki MIYAZAKI,
Motoharu SHICHIRI, Tomoyuki YOSHINO and Toshio OHTANI

Abstract As a milestone to investigate the relationship between gene expression and the local fine structures of a chromosome or chromatin in a nucleus where the genes are located, nano FISH technique that utilizes a scanning near-field optical/atomic force microscope (SNOM/AFM) was applied to human chromosomes hybridized with fluorophore-labeled *p53* gene probe following moderate decondensation of the chromosomes. Signals from the probe and fine structures of the chromosomes were imaged simultaneously using SNOM/AFM. The data suggest that the technique may applicable to the research field regarding the relationship between fine structures of chromosome/chromatin and gene expression including the study on the mechanisms of malignant transformation of cells.

Keywords Gene expression, Chromosome, Chromatin, Fine structure, p53, Nano FISH, SNOM/AFM

1. はじめに

ヒトを含む高等生物の遺伝子の本体である DNA は、タンパク質と共に高度に折りたたまれて繊維（クロマチン）を形成し、この繊維が細胞の分裂期に最も凝縮したものが染色体である。非分裂期の核内では、この繊維が弛緩している部分（真性クロマチン）と密に凝縮している部分（ヘテロクロマチン）とが不均一に分布する。この不均一性は、そこに存在する遺伝子発現（活性）の有無もしくはその程度に影響し、一般的に高凝縮部分の遺伝子は発現しにくいとされる。ところでわれわれの体には多数のがん関連遺伝子（促進・抑制のいずれも）の存在が知られ、それらの発現のバランスは細胞の正常・がん化を決める重要な因子である。例えば細胞の自爆（アポトーシス）を誘導する遺伝子でもあるがん抑制遺伝子 *p53* は、すべてのヒトのがんのほぼ半数で変異（不活性化）していることが知られている¹⁾。その分子機構については近年かなりよく調べられてきている²⁾が、そのような変異をもたらすと思われる構造的背景についてはまだよくわかっていない。がん化に向かいつつある細胞において、そのような遺伝子が染色体または核内でどのような位置に存在し、またその部分の局所構造には何らかの特異性があるのかを知ることは、発がんのメカニズムを知る上でも重要である。そのための第一歩と

して、着目する遺伝子の染色体上における位置を特定し、その周辺の微細構造を可視化できるかどうかについて検討した。

2. 実験方法

2.1 細胞

10%ウシ胎児血清添加 RPMI1640 培地中に生育するヒトリンパ球由来 RPMI788 細胞の対数増殖期 ($3-5 \times 10^5$ 細胞/ml) に、 $0.05 \mu\text{g/ml}$ のコルセミド（和光純薬）添加 2 時間後のものを染色体試料調製に用いた。

2.2 凝縮制御染色体試料作製法

2.2.1 低張処理法

コルセミド処理後の細胞に以下の 5 種いずれかの処理を施した。また低張処理後の試料はすべて、定法に従って、カルノア液（メタノール:酢酸=3:1）による固定を行った。

- ① 75mM-KCl, 37°C, 20 分
- ② ①の処理—カルノア固定後、さらに 37°C, 100%温酢酸処理 10 分
- ③ 75→50→25→0mM (各 5 分) -KCl 連続処理
- ④ Ohnuki の方法³⁾ (用いる低張液は各 55mM の KCl, NaNO₃, CH₃COONa を 4:2:1 の比率で混合したもの) による処理
- ⑤ Ohnuki 法による処理後、界面展開法^{4, 5)} (図 1) を適用

*¹⁾ 放射線応用技術グループ *²⁾ (独) 食品総合研究所
*³⁾ 県立広島大学

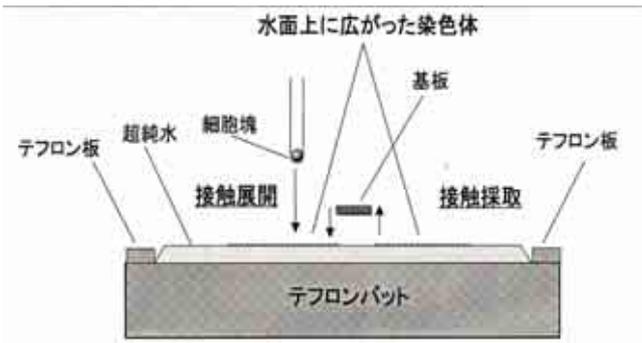


図1. 界面展開法

2.2.2 未成熟染色体凝縮法 (PCC 法) ^{6, 7)}

対数増殖期の細胞に、コルセミドの代わりに 500 nM のオカダ酸 (Okadaic acid ; 和光純薬) を添加 1 時間後、75mM-KCl による低張処理または界面展開法を適用した。

なお、低張処理、PCC 法処理いずれの試料についても、処理後カルノア液による固定を行った。

2.3 蛍光標識 p53 遺伝子プローブの染色体への交雑 (FISH 法)

通常の光顕観察用にコルセミド処理後低張処理を施した染色体試料、または PCC 法による処理後、界面展開法により調製した染色体試料をカルノア固定後、これにスペクトラム・オレンジで蛍光標識した p53 遺伝子プローブ (VYSIS) を、同プローブの販売元から提供されたテキスト⁸⁾ の手順に従って染色体上に交雑した。16 時間の交雑後、DAPI による対比染色を施した標本を G 励起 TRITC-Cy3 狭帯域用フィルター (励起波長 545nm, 蛍光波長 625nm) を装着した蛍光顕微鏡 (Zeiss Axiophot2) により観察した。

2.4 走査型近接場光学 / 原子間力顕微鏡 (SNOM/AFM) による FISH 処理染色体の観察

図2は、SNOM/AFM による試料観察の概念図⁹⁾である。装置はセイコーインスツルメンツ社の SNOAM, またプローブステーションは同社の SPI3800 を用いた。すなわち、まず先端に可視光の波長より短い直径 (100nm 程度) の開口部を持つ光ファイバープローブ (MORITEX 社) 内にレーザーを通しつつ、これで試料のある範囲を走査する。光ファイバープローブの中を通過してきたレーザーがこの開口部に到達すると、開口部の外側に、その到達距離が 100nm 程度の光 (近接場光) がにじみ出る。この近接場光が試料中の蛍光物質 (この場合はそれで標識した p53 プローブ) を照射 (励起) し、これにより生じた蛍光がシグナルとして対物レンズを経由して光検出器で検出される。次に同じ視野を通常の原子間力顕微鏡 (AFM) のプローブで走査し、得られた同一視野の蛍光像と試料の凹凸像とをコンピ

ュータ上で重ねてモニター上に出力すると、目的とする遺伝子の位置情報とその位置の構造情報とが一体のものとして画像化される、というものである。

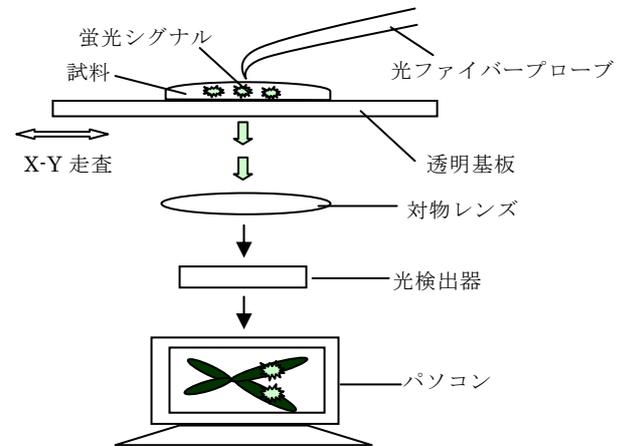


図2. SNOM/AFM の概念図 (参考文献9による)

3. 結果と考察

3.1 凝縮制御法の検討

3.1.1 各種低張処理による染色体の画像

図3aは各種低張処理 (具体的には各画像内に記載) 後の染色体を AFM で観察した像、また図3bは、aの低張処理のうちの1つ (Ohnuki 法) に界面展開法を組み合わせたケースである。a ではいずれも脱凝縮が十分でないか、または染色体の辺縁部分に偏るといった傾向が見られた。これに対し、低張処理に界面展開法を施したケース (図3b) では、染色体によっては、特に下の拡大像にみるように、凝縮部分の特長をよく残しつつ、全体として適度に脱凝縮していると思われる像が観察された。しかしそれがすべての染色体で生じているわけではないことを示するのが上の光顕像で、まったく脱凝縮していない染色体が、1 個の細胞に由来する染色体の間に不均一に共存していることがわかる。

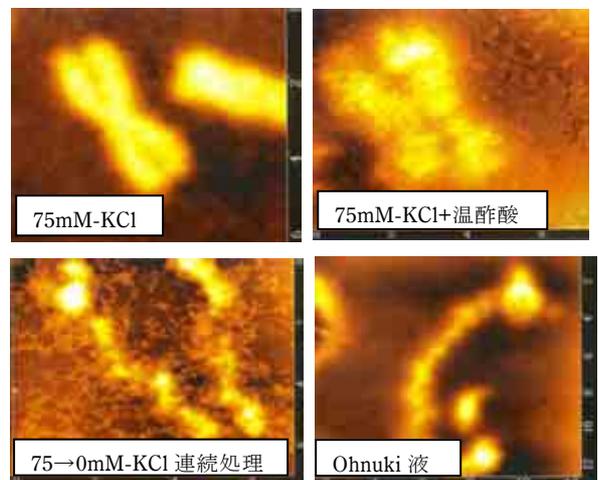


図3a. 各種低張処理による染色体の脱凝縮程度の差

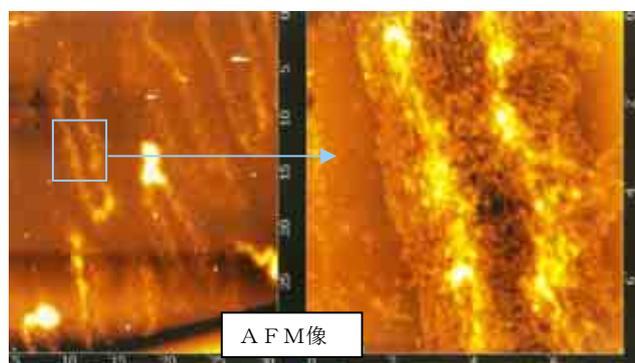


図3b. 低張処理 (Ohnuki 法) に界面展開法を組み合わせた場合の染色体像

3.1.2 PCC 処理染色体の画像

図4は、PCC 処理後界面展開法により調製した染色体の光顕像および AFM 像である。上の2葉の光顕像は、細胞周期の異なる時期由来の染色体であり、M 期 (分裂期) 以外の時期由来の染色体については脱凝縮というよりむしろ、原理的には“向”凝縮過程の像といえる。この2葉の他にも多様な凝縮程度の像が観察されたが、この場合界面展開処理後であっても、1 個の細胞に由来する染色体の間では、個別の凝縮程度の差異は低張処理の場合ほど顕著ではなかった。下は G1 期由来 PCC 染色体 1 本の AFM 観察例である。恐らくは、G1 期の初期、すなわち M 期にまだかなり近い凝縮度の高い時期に PCC が誘導されたものと推測されるが、染色体の長軸に沿った繊維の凝縮程度の不均一性が顕著である。

以上の結果から、現時点では PCC を誘導後界面展開した染色体試料が多様な凝縮度の染色体像を得る上で最も適切な方法と判断され、今回の SNOM/AFM 観察用の試料として、この方法による試料を用いることとした。

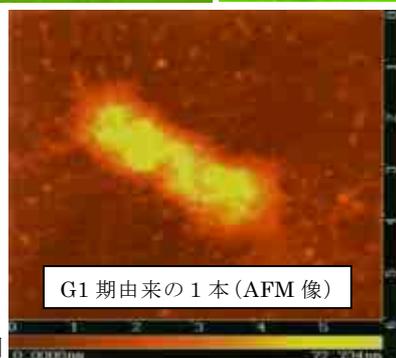
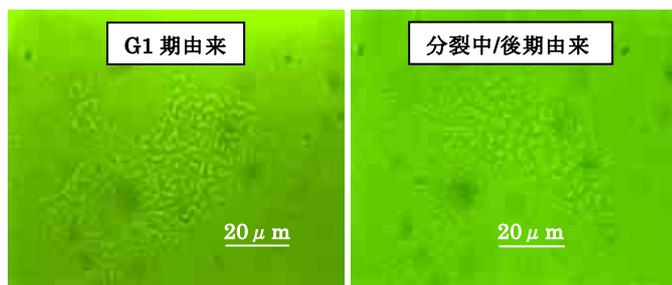


図4

3.2 p53 プローブを交雑した染色体の FISH または ナノ FISH 像

図5は、用いた試料への FISH の可否を確認するために予備的に行った、通常の光顕用調製 (75mM-KCl 低張処理 - カルノア固定) を施した試料に p53 プローブを交雑した蛍光顕微鏡像である。プローブの存在位置が輝点として識別される。通常は2本の相同染色体 (ヒトでは17番染色体の短腕末端) にみられるが、本実験で用いた細胞 (RPMI1788) では株化されたものの常として染色体数が増加し、この画像でも少なくとも4箇所 (矢印) に、同遺伝子の存在を示す輝点が認められる。

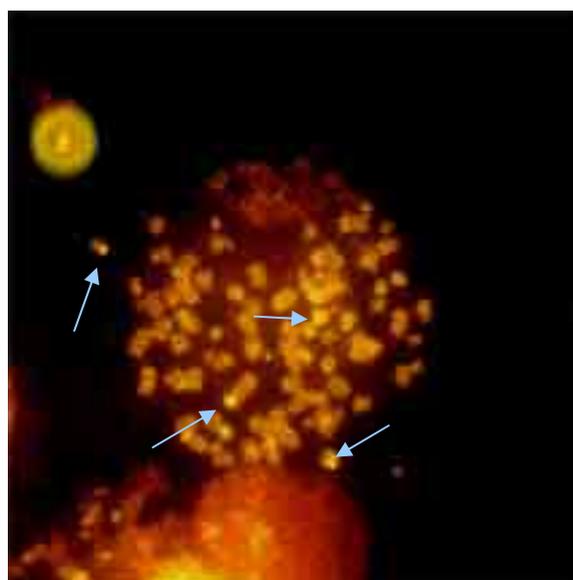


図5. P53 プローブを交雑した染色体の FISH 像

図6は PCC-界面展開後の試料にプローブの交雑を行い、SNOM/AFM で観察したナノ FISH (ナノレベルの FISH) 像である。下の像は上の像の p53 遺伝子のシグナ

ル部分(矢印)を拡大したものである。これらの像から、遺伝子の染色体上における存在位置と、その周辺の繊維微細構造とが同時に画像化されていることが明瞭にわかる。

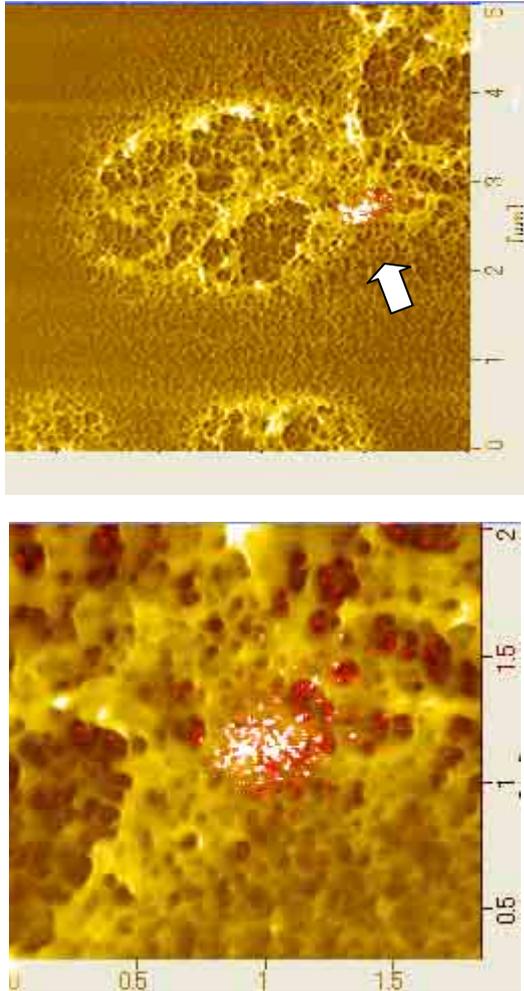


図6. SNOM/AFMで観察したPCC-界面展開染色体微細構造内のp53遺伝子シグナル(スケールはμm)

しかしながらその構造には、FISHの手順を踏まずに調製した試料で得られた従来の像に比べ、基板からの部分的な試料の剥離を含めたかなり大規模な変形がみられた。恐らくはFISHの手順の中に含まれる、プローブおよび染色体の加熱(73°C, 10分)に起因するものではないかと思われるが、この点については、構造に影響を与えない範囲でFISHが可能な温度や時間条件を追求することをはじめ、その軽減策を含めたより詳細な検討が必要であろう。

本研究で試みた技術を、上記問題点を解決した上で非分裂期の細胞核にも適用し、さらに正常細胞およびがん化を含めた染色体の不安定化した細胞との間における、がん関連遺伝子の位置と周辺構造の変動に関する画像情報を蓄積することが今後の課題と考える。

4. まとめ

生体にとって重要な遺伝子の発現と、染色体上における

その存在位置および周辺の微細構造との関係を知るための第一歩として、がん抑制遺伝子p53プローブのヒト染色体上へのナノFISHを試みた。そのために必要な、適度に凝縮を解いた染色体試料を得るために試みた試料作製法のうち、未成熟染色体凝縮(PCC)法と界面展開法とを組み合わせた方法が適切であることがわかった。この試料にp53プローブを交雑して近接場光学/原子間力顕微鏡(SNOM/AFM)で観察したところ、同遺伝子の存在位置と、その周辺の微細構造とが同時に可視化されることが確認された。ただしFISHの手順に含まれる、熱処理によると思われる試料変形の問題が、解決を要する技術的課題として残った。

参考文献

- 1) S. P. Hussain and C. C. Harris: Cancer Res. 58: 4023-4037 (1998).
- 2) 石岡千加史: 加齢研誌 56(1), 1-34 (2004).
- 3) Y. Ohnuki: Nature206, 916-917 (1965).
- 4) J. Gall: Science 139, 120-121 (1963).
- 5) M. Watanabe and N. Tanaka: Jpn. J. Genet. 47, 1-18 (1972).
- 6) P. N. Rao et al.: J. Cell. Physiol. 91, 131-142 (1977).
- 7) R. Kanda et al.: Int. J. Radiat. Biol. 75, 441-446 (1999).
- 8) フジサワ医療関連事業部技術センター: フジサワ FISH 実技講習会操作マニュアル(2000).
- 9) T. Ohtani et al.: Arch. Histol. Cytol. 65(5), 425-434 (2002).

(原稿受付 平成17年8月31日)