

染色体テリトリー・タンパク質・核内小分子群の同一細胞内での可視化系の開発

研究代表者名・所属： 田辺秀之 総合研究大学院大学 先端科学研究科

研究期間：平成17年度～20年度

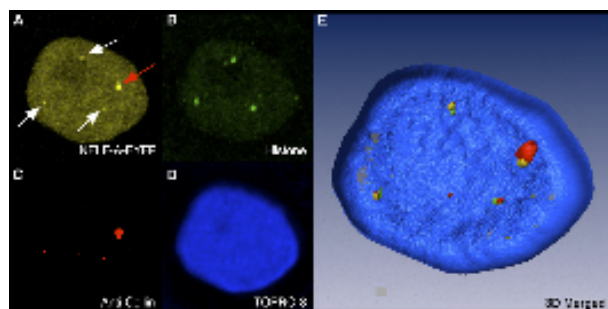
交付決定額：平成17年度	300万円
平成18年度	280万円
平成19年度	440万円
平成20年度	440万円

研究成果：

本研究課題では、3D-FISH法による染色体テリトリー（CT）、クロマチン、DNA領域の3次元核内配置解析を通じて、それぞれの階層における空間配置の基本的性状を把握するとともに、核タンパク質や核内小分子を観察対象として、それらとクロマチンやDNA領域との間で、どのような相互作用が生じているかを視覚的に明らかにすることを目的として研究を進めた。まずCTと核タンパク質の同一核内における同時可視化系の確立を目指した。諸条件を検討し、以下の2通りの手法を確立した。

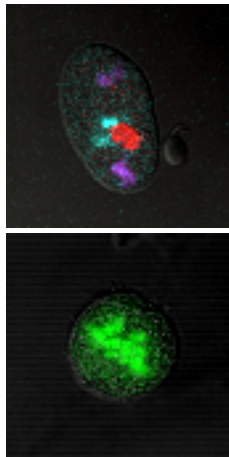
1) 完全同時可視化法：通常の3D-FISH法の蛍光検出時にDNAプローブとタンパク質の免疫蛍光染色（IF）を同時に行う手法。ビオチン標識抗体とCy3標識抗体が塩酸処理と熱変性処理に比較的強い耐性を示す抗体であることを利用して、CTとHistone H2B、LBR、Ki-67などとの同時可視化法を確立した。

2) マージ方式同時可視化法：核タンパク質の大部分は3D-FISH法の必須なステップである塩酸処理と熱変性処理により蛍光シグナルを消失してしまう。本法は、予め細胞固定後にタンパク質のIFを行って3次元画像（A）を取得し、その後、塩酸処理と熱変性処理を行い、3D-FISH法を実施してCTの蛍光検出後に再び3次元画像（B）を取得し、（A）と（B）をマージする手法である。画像（B）取得時に、スライド上の同一細胞核を見つけなければならないが、予め画像（A）取得時に低倍率視野での記録をとること、xyz-positionの記録をとること、ステージ上の目盛を0.1mm単位に刻むことにより、マージ（reposition）を容易にすることが可能となり、本法（3D-FISH-IF 組合せ法）を確立した。この手法を応用して、NELF body（NB; Negative Elongation Factor）、Cajal body（CB）、Histone 遺伝子DNA領域（Histone; 6p21.3）のHeLa細胞核における同一核内可視化実験を行った（Narita et al., 2007；下図参照）。



NELF body (NB; Negative Elongation Factor: yellow)、Cajal body (CB; Anti-Coilin: red)、ヒストン遺伝子DNA領域 (Histone; 6p21.3: green) のHeLa細胞での同一核内可視化の成功例。NB/CBの結合頻度はG1期で高いが、Histone DNAが転写されるS期ではNB/CBの結合頻度が下がり、NB/Histの結合頻度が上がることから、NBはCBの制御下でHistone mRNAの成熟に寄与しているものと考えられた (Narita et al., 2007より)。

さらにCTと核タンパク質のみならず、RNAを重ねた同一核内での多重蛍光可視化系の開発を試みた。これは3D-FISH-IF 組合せ法にRNA-FISH法を組み合わせることで可能となった。具体例として、IFによりFibrillarin (核小体に局在) を検出後、3D-RNA-FISH



により5S rRNA、3D-DNA-FISHによりCT13qおよびCT21qを検出して同一細胞核での同時可視化系プロトコールを確立した。核小体周辺部にrDNA領域を介してCTが配置されている状態が確認できた（左図：5S rRNA: red、CT13q: purple、CT21q: skyblue、細胞核：TIG-1-20）。一方、RNA分子群の局在の全体像を把握するために、sytoRNA select染色を併用していく過程で、分裂期細胞では染色体自身と染色体を覆い囲む領域にRNAの局在が集中していることを見出した。様々な細胞種においても同領域が観察されたことから、染色体を覆い囲むこの領域を「分裂期染色体包括領域：mitotic chromosome coating sphere (MiCCS)」と命名した（左図：sytoRNA select: green、細胞核：TIG-1-20）。MiCCSに含まれるRNA分子群に関してはマイクロアレイによる詳細な解析を実施中である。本研究を通して、核内染色体、タンパク質、RNA分子群の同一核内における各種可視化系プロトコールを確立することができ、本手法を応用し、CTおよび核内小分子群のダイナミクスと本態について、引き続き明らかにしていきたい。また3D-FISH法を主軸として領域内の班員の方たちと多くの共同研究を進めさせていただいた点が最大の成果であり、論文として発表準備を進めている。

英文原著：

1. Amano, T., Sagai, T., Tanabe, H., Mizushina, Y., Nakazawa, H. and *Shiroishi, T. Chromosomal dynamics at the *Shh* locus: Lim bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Developmental Cell*, 16: 47-57 (2009)
2. Oikawa, K., Yoshida, K., Takanashi, M., Tanabe, H., Kiyuna, T., Ogura, M., Saito, A., Umezawa, A. and *Kuroda, M. Dioxin interferes in chromosomal positioning through the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374: 361-364 (2008)
3. Nishida, C., Ishijima, J., Kosaka, A., Tanabe, H., Habermann, FA., Darren K. Griffin, DK. and *Matsuda, Y. Characterization of chromosome structures of *Falconinae* (*Falconidae*, *Falconiformes*, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. *Chromosome Research*, 16: 171-181 (2008)
4. Narita, T., Yung, TMC., Yamamoto, J., Tsuboi, Y., Tanabe, H., Tanaka, K., Yamaguchi, Y. and *Handa, H. NELF interacts with CBC and participates in 3' end processing of replication-dependent histone mRNAs. *Molecular Cell*, 26 : 349-365 (2007)
5. *Sekii, M., Nakagawa, T., Seki, T., Kato, G., Tada, S., Takahashi, Y., Yoshimura, A., Kobayashi, T., Aoki, A., Otsuki, M., Habermann, FA., Tanabe, H., Ishii, Y. and Enomoto, T. Bloom helicase and DNA topoisomerase III alpha are involved in the dissolution of sister chromatids. *Mol. Cell Biol.*, 26: 6299-6307 (2006)
6. *Tanabe, H., Küpper, K., Ishida, T., Neusser, M. and Mizusawa, H. Inter- and intra-specific gene-density correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. *Cytogenet. Genome Research*, 108: 255-261 (2005)

英文総説：

1. *Tanabe, H. Dynamics of chromosome territories: Chromosome kissing for gene regulation and genomic evolution. *Chromosome Science*, 11 (Suppl): 28-29 (2008)
2. *Tanabe, H. Chromosome structure from micro- to macro-scopic views and its dynamics. *Chromosome Science*, 10: 102 (2007)
3. *Ishida, S., Tanabe, H., Shinozaki, Y., Koyano, S., Kagechika, H., Shudo, K., Ozawa, S., Sawada, J., Ohno, Y. and Inoue, K. How DNA microarray technology contributes to the retinoid evaluations. *Vitamin A: New Research* (Loessing, I.T., Ed), Nova Science Publishers, Inc., pp.71-92 (2007)
4. *Tanabe, H. Technical note. "Radial distribution of interphase chromosome territories in the human lymphocyte nucleus is highly correlated with their gene densities." *Cytologia*, 70: i-ii (2005)

和文総説：

1. 田辺秀之、II. 実践編 1章 (2) FISH法、「実験がうまくいく蛍光・発光試薬の選び方と使い方」(三輪佳宏：編)、羊土社、55-65 (2007)
2. 田辺秀之、Part III ワークショップ 1. 染色体動態とエピジェネティクス 1-4 染色体テリトリーの3次元核内配置解析、「生物の科学 遺伝」別冊 No.21 (小原嘉明：編)、裳華房、171-175 (2007)

国際学会、国際シンポジウム招待講演：

1. Tanabe, H. Dynamics of chromosome territories: Chromosome kissing for gene regulation and genomic evolution. 3rd Asian Chromosome Colloquium: December 1-3, 2008, Osaka, Japan
2. Tanabe, H. Radial positioning of chromosome territories: Development of peripheral and interior pooled DNA probes for detecting the disordered nuclear architecture and environment. 8th International Symposium on Chromosome Aberrations: October 4-6, 2007, Awaji, Hyogo, Japan

その他特記事項：

シンポジウムの企画

- (1) Symposium 2 "3D Nuclear Architecture: Chromosome Territories and Nuclear Dynamics" 3rd Asian Chromosome Colloquium: December 1-3, 2008, Osaka, Japan
- (2) 第58回染色体学会・第17回染色体コロキウム 合同年会(年会長を務める)、シンポジウム「ゲノムと染色体・クロマチン研究の過去・現在・未来」、ワークショップ「目で見える染色体のヒミツ—ゲノム動態研究の最前線—」、神奈川、葉山(総合研究大学院大学・葉山キャンパス)、2007年11月26-28日
- (3) Symposium 2 "Primate Cytogenetics and Genomic Evolution from 3D Nuclear Analyses" 8th International Symposium on Chromosome Aberrations: October 4-6, 2007, Awaji, Hyogo, Japan