

博士論文

増幅した遺伝子領域からの遺伝子発現と
細胞内動態に関する研究

平成 21 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科
生物機能開発学専攻

宇谷 公一

目次

略語一覧	VII
第1章 序論	
1.1 遺伝子増幅は、がんの悪性化の原因となる	1
1.2 DM の数が減少するとがん細胞は脱がん化、分化した	3
1.3 DM の細胞内動態と細胞外排出機構	4
1.4 IR と MAR を持つプラスミドは効率よく遺伝子増幅した	7
第2章 方法	
2.1 細胞培養、薬剤処理	10
2.2 細胞株の樹立	11
2.2.1 形質転換と選択法	12
リポフェクション法による形質導入	12
エレクトロポレーション法による形質導入	12
2.2.2 使用した細胞株の一覧と、その性質（プラスミド構造を含む）	13
2.3 FISH と蛍光抗体法	20
2.3.1 プローブの調製	20
ビオチン標識 DNA プローブの調製	21
プラスミド配列を検出するための DNA プローブの調製	21
ジゴキシゲニン (digoxigenin、DIG) 標識 RNA プローブの調製	21
2.3.2 固定法	23

メタノール酢酸（カルノア）固定法	23
PFA(paraformaldehyde)固定法	25
RNA FISH 用の細胞の固定	25
2.3.3 FISH 法	26
分裂期染色体標本を用いた DNA FISH 法	27
PFA で固定した細胞の DNA FISH 法	28
RNA FISH 法	28
DNA/RNA 同時 FISH 法	29
プローブの検出方法	29
2.3.3 間接蛍光抗体法	30
ラミン蛋白質の検出	31
γ H2AX の検出	31
HP1 α の検出	32
Tri-methyl 化された Histon H3K9 (H3K9Me3) の検出	32
NPC の検出	32
細胞周期を特定するための複製鎖標識法	32
新規転写産物の検出	33
2.4 顕微鏡操作と画像取得	35
2.5 タイムラプス解析	36
2.6 その他の方法	37
MACS selection system による発現細胞の分離方法	37
Quantitative PCR 法による遺伝子量の定量	38

Anova4 による分散分析	39
第3章 DM からの遺伝子発現	40
3.1 背景と目的	40
3.2 結果	40
3.2.1 DM で増幅している <i>c-myc</i> がん遺伝子からの転写産物が、微小核内で強く検出された	40
3.2.2 DM で増幅しているプラスミドからの転写産物が、DM を濃縮した微小核内で強く検出された	42
3.2.3 微小核内では <i>de novo</i> の転写が生じている	46
3.2.4 微小核内での転写は Lamin B に覆われることが必要である	48
3.2.5 微小核内で転写された RNA は細胞質へ移動する	49
3.2.6 Lamin B のない微小核では DM からの転写産物がない	52
3.2.7 DM とその転写産物の生細胞可視化技術による解析	52
3.2.8 Lamin B が局在していない微小核では、核局在化シグナルを持つ蛋白質が局在しない	55
3.2.9 核内に局在する DM は少し核内部へ入った領域で転写していた	57
3.3 考察	60
第4章 微小核に取り込まれた DM の排出機構	63

4.1	背景と目的	63
4.2	結果	65
4.2.1	微小核は、細胞分裂時に細胞質膜のブレッピングに取り込まれて排出された	65
4.2.2	間期核から出芽様構造を介して形成された微小核は、細胞質膜のブレッピングに取り込まれて排出された	67
4.2.3	カンプトテシン処理により出芽様構造形成が誘導された	70
4.2.4	短時間のカンプトテシン処理により Lamin B に覆われない小さな微小核形成が誘導された	70
4.2.5	細胞外へ排出された微小核は、まれに他の細胞へ取り込まれた	74
4.3	考察	74
5章	HSR からの遺伝子発現	78
5.1	背景と目的	78
5.2	結果	79
5.2.1	HSR からの転写は少数の特異点に限られていたが、核小体表面や核小体内部では HSR 全体から転写されていた	79
5.2.2	転写可能な領域は、HSR が複製された後に倍化した	81
5.2.3	HSR 内に見られる RNA 転写産物の点は、転写部位に一致する	83
5.2.4	HSR は核質で RNA pol II により転写されており、RNA pol I の転写に依存して核小体内部へ局在する	85

5.2.5	HSR は早期 S には核小体内部に、後期 S には核小体表面に局在する傾向がみられた	87
5.2.6	HSR ドメインには γ H2AX のシグナルが頻繁に検出され、それは転写特異点と一致する可能性がある	87
5.2.7	HSR の転写誘導による脱凝縮は可逆的である	90
5.2.8	HSR からの転写を誘導し HSR が脱凝縮すると、部分的に HP1 α や tri-methyl 化 H3K9 が解離する	93
5.2.9	HSR 内の誘導プロモーターの発現を誘導すると、シスに位置する非誘導性プロモーターからの転写も増加した	95
5.3	考察	97
第 6 章 本研究の意義と結語		102
参考文献		105

略語一覧 (アルファベット順)

ActD : actinomycin D
Anova : analysis of variance
BrdU : 5-Bromo-2-deoxyuridine
BrU : (-)-5-Bromouridine
BSR : Blastidine resistance
CldU : 5-Chloro-2-deoxyuridine
CFP : cyan fluorescence protein
CMV : cytomegalo virus
CPT : camptothecin
CSK : cytoskeleton
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DHFR : dihydrofolate reductase
DIG : digoxigenin
DM : double minutes
DMSO : dimethyl sulfoxide
DMEM : Dulbecco's modified minimum essential medium
DNA : deoxyribonucleic acid
Dox : doxycycline
DSB : double strand break
DTT ; Dithiothreitol
EDTA : ethylenediamine tetraacetic acid
EtBr: ethidium bromide
FCS : fetal calf serum
FISH : fluorescence *in situ* hybridization

FITC : flurescein isothiocyanate
H3K9Me3 : histon 3 Lysin 9 tri-methylation
HP1 α : heterochromatin protein 1 alpha
HR : homologous recombination
HSR : homogeneously staining region
HSV : herpes simplex virus
HU : hydroxyurea
IR : initiation reagon
LacO : lactose operator
LacR : lactose repressor
LNGFR : low-affinity nerve growth factor receptor
MAR : matrix attachment reagon
MCS : multiple cloning site
 μ N : micronuleus
NP-40 : Nonidet P40
NPC : nuclear pore complex
PBS(-) : phosphate-bufferd saline(Mg²⁺、Ca²⁺ free)
PCR : polymerase chain reaction
PFA : paraformaldehyde
PI : propidium iodide
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
RFB : replication fork barrier
RFP : red fluorescence protein
RNA : ribonucleic acid
rpm : roud per minute
SDS : sodium dodesyl sulfate
SSC : sodum citrate-sodium chloride

SV40 : simian virus 40

TRE : tetracycline responsible element

Tween : poloxyethylenesorbitan monolaurate

YFP : yellow fluorescence protein

第 1 章 序論

1.1 遺伝子増幅は、がんの悪性化の原因となる

遺伝子増幅はがん遺伝子が活性化される主要なメカニズムの一つである。がん遺伝子は細胞増殖を促進する働きをする一連の蛋白質をつくるが、正常な細胞の中ではその発現は巧妙に制御されている。しかし、遺伝子増幅などによりがん遺伝子が活性化されると、細胞の異常増殖を引き起こし、がん化を促進する。がん遺伝子の増幅は頻度の差こそあれあらゆる組織のヒトがんで見られ、その悪性形質に寄与している。たとえば、卵巣がんの *HER-2/neu*、乳がんの *c-myc*、*HER-2/neu*、神経芽細胞腫の *N-myc*、肺小細胞がんの *MDM2* などは、その悪性化とがん遺伝子の増幅がよく対応していることが知られている (Brison, 1993)。

増幅したがん遺伝子は分裂期染色体標本にみられる 2 種類の構造のいずれかに局在する。その一つは染色体外で対 (double) になった微小な (minute) 構造として観察される DM (double minutes) であり、もう一つは染色体内の HSR (homogeneously staining region、均一染色領域) である (Cowell, 1982b)。生体内でがん組織を構成するがん細胞では、主として DM が観察される。しかし、再発がんでは HSR の頻度が高まることが知られているし、がん細胞を *in vitro* で長期間培養すると、継代に伴って DM をもつ細胞は減少し、HSR をもつ細胞が増加することが多種類の細胞株で報告されている (Benner *et al.*, 1991) (Cowell, 1982a)。図 1 に、本研究で主に用いたヒト神経内分泌細胞由来の大腸がん

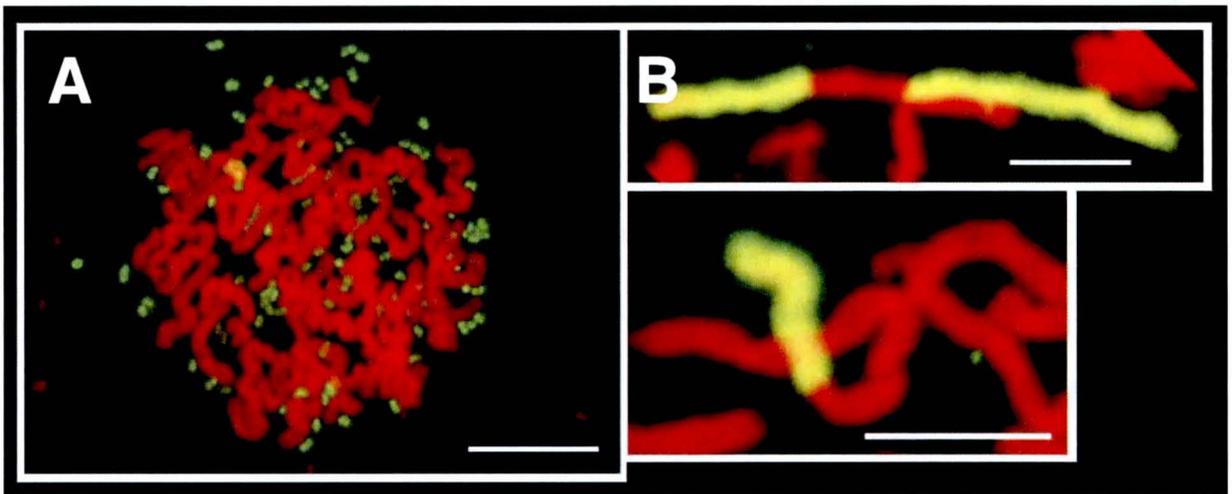


図1. 増幅した遺伝子は、DM かHSR に局在する。

ヒト大腸がん細胞COLO 320DM 株、及びCOLO 320HSR 株の分裂期染色体標本中に見られるDM (A)及びHSR (B)。増幅した遺伝子を精製微小核 probe (DM-painting probe) を用いたFISH 法により緑色の蛍光で検出し、DNA をPI で赤色に対比染色した。

細胞 COLO 320DM 株、および COLO 320HSR 株の分裂中期染色体標本を用い、FISH 法により増幅配列を緑色に検出した像を示す。この図では、緑色に検出された多数の DM、および、染色体上の巨大な HSR が観察される。

DM はセントロメアもテロメアも持たない自律複製する環状 DNA からなり、光学顕微鏡で検出される DM の大きさは一般的に数メガ塩基対程度である。DM はセントロメアをもたないが、分裂期染色体に付着することにより娘細胞に分配されるので、比較的安定に維持される(Levan and Levan, 1978) (Kanda *et al.*, 1998)。特筆すべきことに、Bovine papilloma virus (Lehman and Botchan, 1998)、Epstein Barr virus (Marechal *et al.*, 1999)、Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (Ballestas *et al.*, 1999) そして Simian virus 40 (Nath *et al.*, 1995) 等の多くの核内ウイルスプラスミドもまた分裂期染色体へ付着し娘細胞へ分配される。このような分配様式はヒッチハイク機構と呼ばれている。DM が形成される過程については不明な点が多いが、エピソーム仮説によれば、百～二百キロ塩基対程度の自律複製する小さな環状のエピソームが前駆体となり、その相互組み替えにより DM に成長することが提唱されている (Carroll *et al.*, 1988) (Von Hoff *et al.*, 1988) (Von Hoff *et al.*, 1990)。

1.2 DM の数が減少するとがん細胞は脱がん化、分化した

我々の研究室、およびソーク生物科学研究所の G. M. Wahl 博士らのグループは独立に、DM あるいはその上で増幅しているがん遺伝子の数が減少すると、がん細胞が脱がん化・分化することを見いだした (Shimizu *et al.*, 1994) (Eckhardt *et al.*, 1994)。このようながん遺伝子の数の減少は、低濃度の HU (hydroxyurea、

ヒドロキシ尿素) 処理により誘導される。COLO 320DM 細胞では、DM 上で増幅しているがん遺伝子 *c-myc* のコピー数が減少するに伴い、軟寒天上でのコロニー形成能の低下やヌードマウスにおける腫瘍形成能の消失が誘導された(Von Hoff *et al.*, 1992)。また、ヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 細胞を用いた研究では、このような増幅遺伝子の排出は通常の培養条件下でも頻度は低いながら自然に生じていること、その過程は HL-60 の分化誘導剤として古くから知られていた DMSO (dimethyl sulfoxide) の処理により促進されること、および、DM の数が減少した細胞は非可逆的に顆粒球に分化することが見いだされた (Shimizu *et al.*, 1994) (Eckhardt *et al.*, 1994)。これらのことは、DM ががん細胞の悪性化にとって必須なものであることをあらためて示すものである。それとともに、その排出を活性化させることは、DM をもつ多くのヒトがんの治療に役立てることができると考えられるようになった。

1.3 DM の細胞内動態と細胞外排出機構

低濃度の HU 処理に代表されるような細胞内の DM の数を減少させる条件では、DM が選択的に取り込まれた微小核が誘導されることが見いだされた (Shimizu *et al.*, 1994) (Eckhardt *et al.*, 1994) (Shimizu *et al.*, 1996)。そこで、細胞質内の微小核を精製してその中の DNA を調べると、DM が極めて高度に濃縮されていることが示された。そのため、微小核中の DNA から作製したプローブを用いて DM 上の塩基配列を特異的に検出することが可能になった(Shimizu *et al.*, 1996)。

微小核の存在そのものは 20 年以上前から知られ、がん細胞だけでなく正常細胞でも低頻度ながら観察される。一般的に、微小核には放射線照射等に

より生じた染色体断片や動原体に微小管が結合しなかった染色体が取り込まれることが知られている (Heddle *et al.*, 1983; Heddle *et al.*, 1991)

DM がどのようにして微小核に特異的にとりこまれるかという問題は、DM の特異な細胞内動態に原因があった(図 2)。すなわち、上記のように DM は分裂期に染色体に付着することにより娘細胞に分配される。このようにして分配された DM は、G1 期の核内で周辺部に位置する傾向が高い(Itoh and Shimizu, 1998)。核周辺部は代表的なヘテロクロマチン領域であるが、DM は低メチル化レベルにあり (Beland *et al.*, 1993)、G バンド陰性であることから、ユークロマチンとしての性質をもっているため、異常な局在である。そのような核周辺部の DM は、S 期に入ると早い時期に、核内部のユークロマチン領域へと一斉に移動する (Itoh and Shimizu, 1998)。一方、DM の多くは S 期の初期に複製されるため(Shimizu *et al.*, 2001)、核内での移動と DM 自身の複製は同時期であり、共役している可能性がある。重要なことに、まさにこの早期 S 期に低濃度の HU で処理すると、その後の分裂期に染色体から脱落する DM が増加した。そのような DM は、塊となって G1 期の細胞質に局在するようになるが、その一部は核ラミン蛋白質で覆われて微小核となるが、残りは覆われないで細胞質に存在し、S 期に起こる大規模なラミン蛋白質の合成と再編成の際にラミン蛋白質で覆われるようになることが示唆された(Tanaka and Shimizu, 2000)。何故 G1 期の細胞で、ラミンで覆われる微小核と覆われない微小核ができるのかは重要かつ未解決な問題である。最近、私が所属する研究室の見坂らは、早期 S に低濃度の HU で処理すると、核内の至る所に 2 本鎖切断が生じるが、その殆どは細胞が分裂期に至るまでに修復されるが、DM 上に生じた 2 本鎖切断は修復されずに塊となり、分裂期に染色

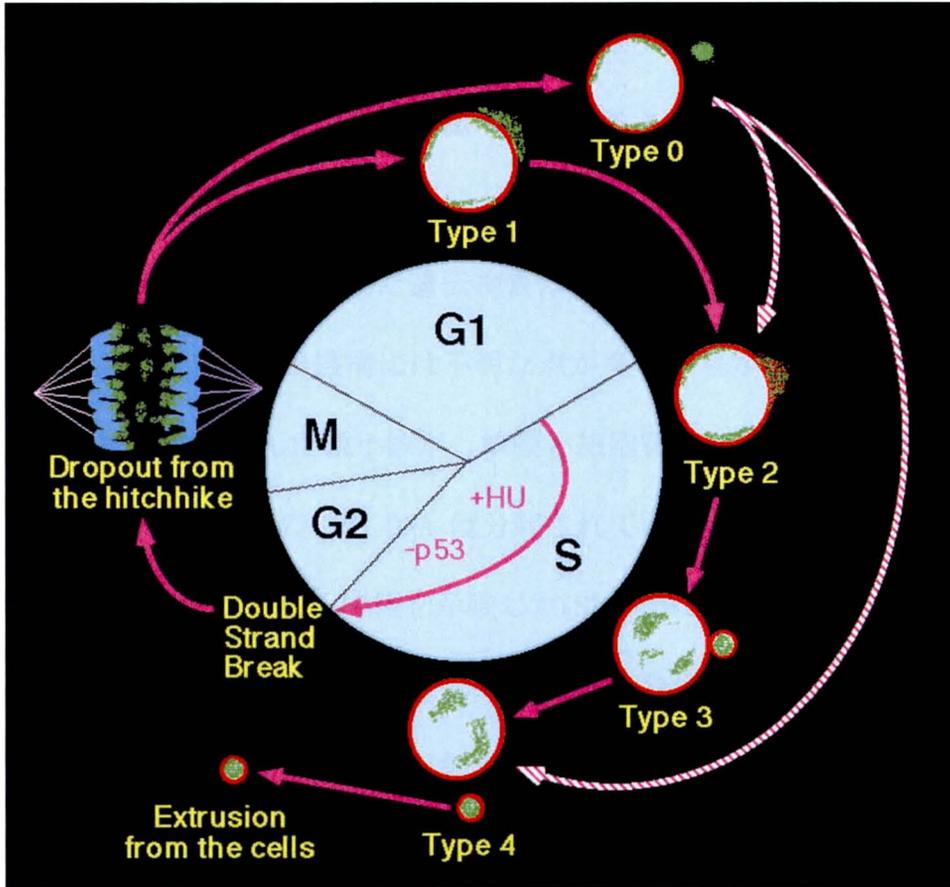


図2. DM の細胞内動態と細胞外排出機構についてのモデル

これまでの研究により示唆されたモデル

Type 0 : ラミンタンパク質が局在していないDMの塊が、細胞質に存在するもの

Type 1 : Type 0 と同様で、それが核の外側に付着しているもの

Type 2 : Type 1 と同様で、それにラミンタンパク質が弱く一様に分布しているもの

Type 3 : DM の塊の周囲が、正常な核ラミナに覆われているもの

Type 4 : Type 3 と同様で、それが核から離れているもの

体から離れて、G1 期の細胞質に取り残されることを見いだした(Shimizu *et al.*, 2007b)。このことは、染色体上の 2 本鎖切断と染色体外遺伝因子上の 2 本鎖切断では、修復のされ方が異なることを意味しており興味深い。G1 期にラミン蛋白質で覆われた微小核と覆われない微小核があることは、このような現象と何らかの関係があると思われる。

微小核に取り込まれた遺伝物質は、一般的に細胞内から消失することが知られているが、排出機構には不明な点が多い。私が所属する研究室では、DM を選択的に取り込んだ微小核が、核膜と細胞質膜に覆われた状態で細胞外に存在していること、その中の DNA は分解されていないことを見だし、微小核が直接細胞外に放出される機構を示唆した(Shimizu *et al.*, 2000)。しかし、Histone H2B と GFP (Green Fluorescence Protein) の融合蛋白質を発現させることによりクロマチンを生細胞で可視化したヒト HeLa 細胞を用いたタイムラプス実験から、多くの微小核は安定であり、中には一細胞周期にわたって細胞内に保持されるものがあつた (Shimizu; 未発表データ)。微小核が、いつ、どのような条件で細胞から放出されるかは今後の重要な課題である。

1.4 IR と MAR を持つプラスミドは効率よく遺伝子増幅した

以前、清水らは哺乳動物複製開始領域(Initiation Region ; IR)と核マトリックス結合領域(Matrix attachment Region ; MAR)を持つプラスミドは哺乳動物細胞内において極めて効率よく遺伝子増幅し、DM や HSR を形成することを見いだした(Shimizu *et al.*, 2003)。このような DM と HSR をプラスミド配列をプローブとした FISH 法により検出した例を図 3 に示す。この図に示したよう

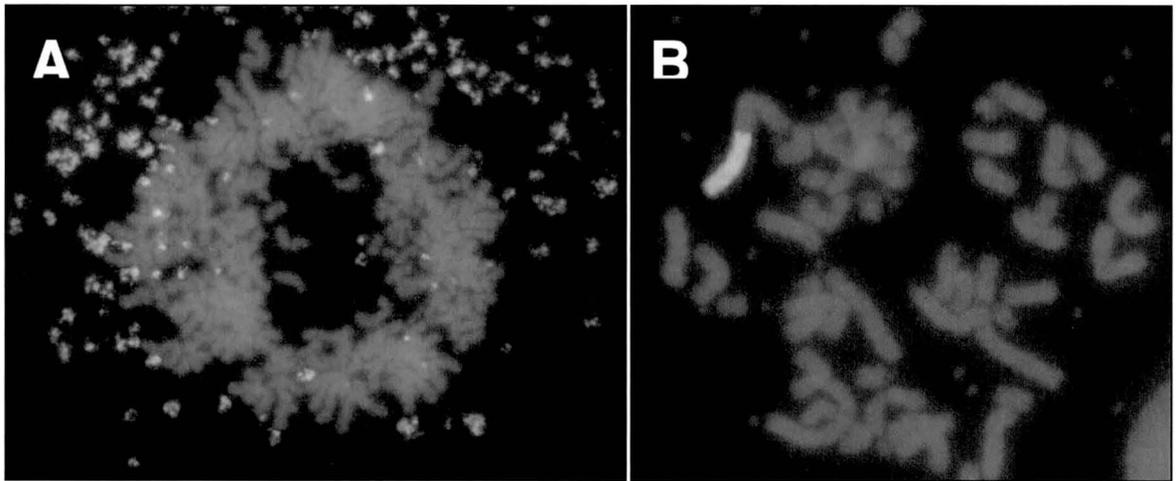


図3. 哺乳動物複製開始領域と核マトリックス結合領域をもつプラスミドは、がん細胞内で、既存のDMへ組み込まれたり、新規にHSRを形成したりする。

pSFVdhfr プラスミドをCOLO 320 DM 細胞に導入して得られた安定な形質転換体の分裂期染色体標本を示す。プラスミド配列を鋳型としたプローブを用いたFISH法により緑色に検出した。DNAはPIにより赤色に対比染色した。AはプラスミドがDMを形成したclone 12細胞株、BはHSRを形成したclone 22細胞株

にプラスミド配列からなる増幅構造は図 1 で示したようながん化過程で形成された DM や HSR と構造上区別がつかなかった。この IR/MAR プラスミドが DM あるいは HSR を形成している細胞をそれぞれクローン化した後、回収した全ゲノム DNA についてサザンブロット解析を行った。その結果、プラスミド配列は直列反復構造を形成していることが示唆された。また細胞当たりのコピー数は数千コピーにまで達していた。一方、これらのクローンについて、クロマチンファイバーを調製し、FISH 法による解析を行ったところ、プラスミド配列は DM 上では数十から数百コピー程度が、HSR では数千コピーが、それぞれ間断なく連続していることが示された。またこの IR/MAR プラスミドによる遺伝子増幅法は、任意のプラスミド配列をこの IR/MAR プラスミドとコトランスフェクションすると、2つのプラスミドが共に増幅し、DM や HSR を形成するというところを見いだした。この技術を応用することにより、Lactose operator (Lac O) 配列を DM や HSR で増幅させ、それを Lactose repressor-GFP 融合蛋白質の発現により可視化することが可能となった(Shimizu *et al.*, 2005b)。さらに、この方法で DM や HSR をシアン色で可視化し、そこからの誘導転写産物 RNA を黄色で可視化することも可能となった。これらの方法は、本研究で中核となる細胞株の樹立に使用した。その詳しい方法は第 2 章で記述する。

第 2 章 方法

2.1 細胞培養、薬剤処理

本研究で主に用いた細胞は、ヒト神経内分泌細胞由来の大腸がん細胞株 COLO 320DM、あるいは COLO 320HSR と、それに由来する細胞株である。これは、American Type Culture Collection から供与されたものを、D. D. Von Hoff (Univ of Texas, San Antonio, Texas) がさらにクローニングを行った細胞株である。COLO 320DM 細胞株では、がん遺伝子 *c-myc* が約 62 倍増幅しており、増幅遺伝子は分裂中期染色体標本中にみられ、平均して 43.6 ± 27.6 個の DM 上に位置している。一般的に個体内のがん細胞では増幅遺伝子は DM 上に位置するが、これを *in vitro* で長期間培養すると染色体上の HSR 領域に位置するようになる傾向が知られている。このような状態となったのが COLO 320HSR 細胞株である。

細胞培養には CO₂ インキュベーター (MCO-17AIC、SANYO) を用い、培養温度は 37°C、CO₂ 濃度は 5% に設定した。COLO 320DM 細胞、HSR 細胞の培養液には RPMI 1640 培地 (ニッスイ) を用い、規定通り溶解後、オートクレーブ滅菌 (120°C、15 分) を行った。その後、炭酸水素ナトリウム (ナカライテスク) を適量加え、L-グルタミン (片山化学) を RPMI には 0.03%、DMEM には 0.06%、FCS (Fetal Calf Serum) を 10% となるように加えて使用した。細胞濃度の計測には血球計算板を使用し、細胞濃度の算出は 400 個以上の細胞を計数することによって行った。継代は、浮遊細胞については細胞濃度が 2×10^6 cells/ml に達するまで行い、 3×10^5 cells/ml の濃度で植え継いだ。

次に本実験で使用した薬剤について説明する。まず、第4章のタイムラプス実験で用いた Hydroxyurea (Sigma) (以下 HU) は、リボヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドに変換する酵素であるリボヌクレオチド還元酵素を阻害して、DNA 複製を阻害する。本研究では HU を 0.1 M となるよう MQ-H₂O に溶解し、終濃度 100 μ M となるよう培養液に加えた。この濃度では DNA 合成は完全には阻害されずに S 期が緩やかに進行することが以前の研究から示唆されている(Shimizu *et al.*, 2007a)。

第3章と第4章で用いた Camptothecin (sigma) (以下 CPT) は DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤であり DNA 合成の盛んな細胞において 2 本鎖切断とアポトーシスを誘導する。本研究では CPT を 5 mg/ml となるよう DMSO に溶解し、終濃度 0.5~5 μ g/ml となるよう培養液に加えた。

第5章で用いた Actinomycin D (Calbiochem) (以下 ActD) は放線菌の一種である *Streptomyces parvulus* より産生される抗癌抗生物質である。高濃度で DNA と RNA の合成阻害に働き、低濃度では RNA 合成阻害がより顕著となるとされ、RNA 合成に特異的な阻害剤として広く研究に用いられている。1 μ g/ml より高濃度では、すべての RNA 合成が阻害されるが、100 ng/ml より低濃度ではリボゾーム RNA 合成の阻害を有意に引き起こすとされている。本研究では、RNA polymerase I、II、III による転写を阻害するためには ActD を終濃度 2 μ g/ml で、RNA polymerase I を特異的に阻害するためには、終濃度 0.05 μ g/ml となるよう培地に添加し 3 時間、37°C、CO₂ インキュベーターで培養した。

2.2 細胞株の樹立

2.2.1 形質転換と選択法

リポフェクション法による形質導入は COLO 320 細胞に対して以下の手順で行った。対数増殖期にある細胞 2×10^6 cells/ml を 24 well plate (住友ベークライト社製) に 0.25 ml 入れて CO₂ インキュベーター内に保存した。次に、Gene PORTERTM2 Transfection Reagent (フナコシ(株)社製) 1.75 μ l に対し、血清が入っていない RPMI1640 を 10.8 μ l 加えピペッティングにより混合した。次に、導入する DNA 0.5 μ g を DNA diluent B 12.5 μ l に溶解し数回ピペッティングした後、5 分間静置した。この溶液に先ほど希釈した GenePORTER2 Reagent を全量加え、数回ピペッティングして混合したあと 5 分間静置し、保存しておいた細胞に全量加えた。

トランスフェクションしてから 24 時間後に培養液を交換し、さらに 24 時間培養した。この細胞を 5 cm dish へ移し、5 μ g/ml ブラストサイジン、または 400 μ g/ml G418 を加え形質転換体を選択した。本実験で使用した細胞は全てモノクローン細胞である。モノクローンは以下の方法で得た。まずトランスフェクション後、薬剤選択によりコロニーを形成させた。細胞が 30~100 個程度のコロニーをクリーンベンチ内に顕微鏡を持ち込み顕微鏡下でピペッティング操作により選択した。このように選択した細胞は 96 well で培養し、次いで 24 well、6 well、5 cm dish へとスケールアップした。細胞がある程度安定化した頃合いを見計らって細胞を遠心し、上澄みを除いた後、タッピングにより完全にほぐし、セルバンカー 1 ml をピペッティングにより混合し -80°C のディープフリーザーに保存した。各細胞株の詳しい樹立方法は 2.2.2 で記述する。

エレクトロポレーション法による形質導入は細胞懸濁液に高電圧パ

ルスを通すことで細胞膜に小孔をあけ目的遺伝子を導入する方法である。MS2 System を用いて、RNA と DNA を生細胞で観察する目的のためには、自家蛍光のバックグラウンドが高いリポフェクション法は適さないため、この方法を用いた。細胞は対数増殖期の DM-CFP、もしくは HSR-CFP 細胞株を用いた。これらの細胞を、37°Cの新しい培養液に 500×10^4 cells/ml となるよう調整し、あらかじめ 10 μ l の MQ-H₂O に溶解しておいた pMS2-YFP (5 μ g) と pTet-ON (5 μ g)、もしくは pMS2-YFP (5 μ g) と pTet-Off (5 μ g) に先ほどの細胞溶液 400 μ l をよくピペティングで混合した。これをキュベットへ移し、200 mV、960 μ F という条件を用いて形質導入した。エレクトロポレーション後、新しい、37°Cの培養液を加え遠心し、上清を除き 37°Cの培養液を 3 ml 加え 500 μ l ずつ 24 well に移した。その後、導入したプラスミドを発現させるため 2.5 時間培養した。

2.2.2 使用した細胞株の一覧と、その性質（プラスミド構造を含む）

本研究で使用した細胞株はリポフェクション法により形質導入をおこなった。clone12、clone22 細胞株はそれぞれ DM、HSR を形成したクローンである。

これらの細胞は以前、新垣により IR/MAR プラスミドである pSFVdhfr (図 4A) を COLO 320DM 細胞に導入することによって得られたモノクローンである。

DM が生細胞で可視化された DM-GFP 株(図 5)は、以前清水により以下の方法で樹立された。まず COLO 320DM 株にレトロウイルスベクターを用いて pLacR-GFP (図 8A) を導入し安定に発現する細胞株を得た。序論で述べたように

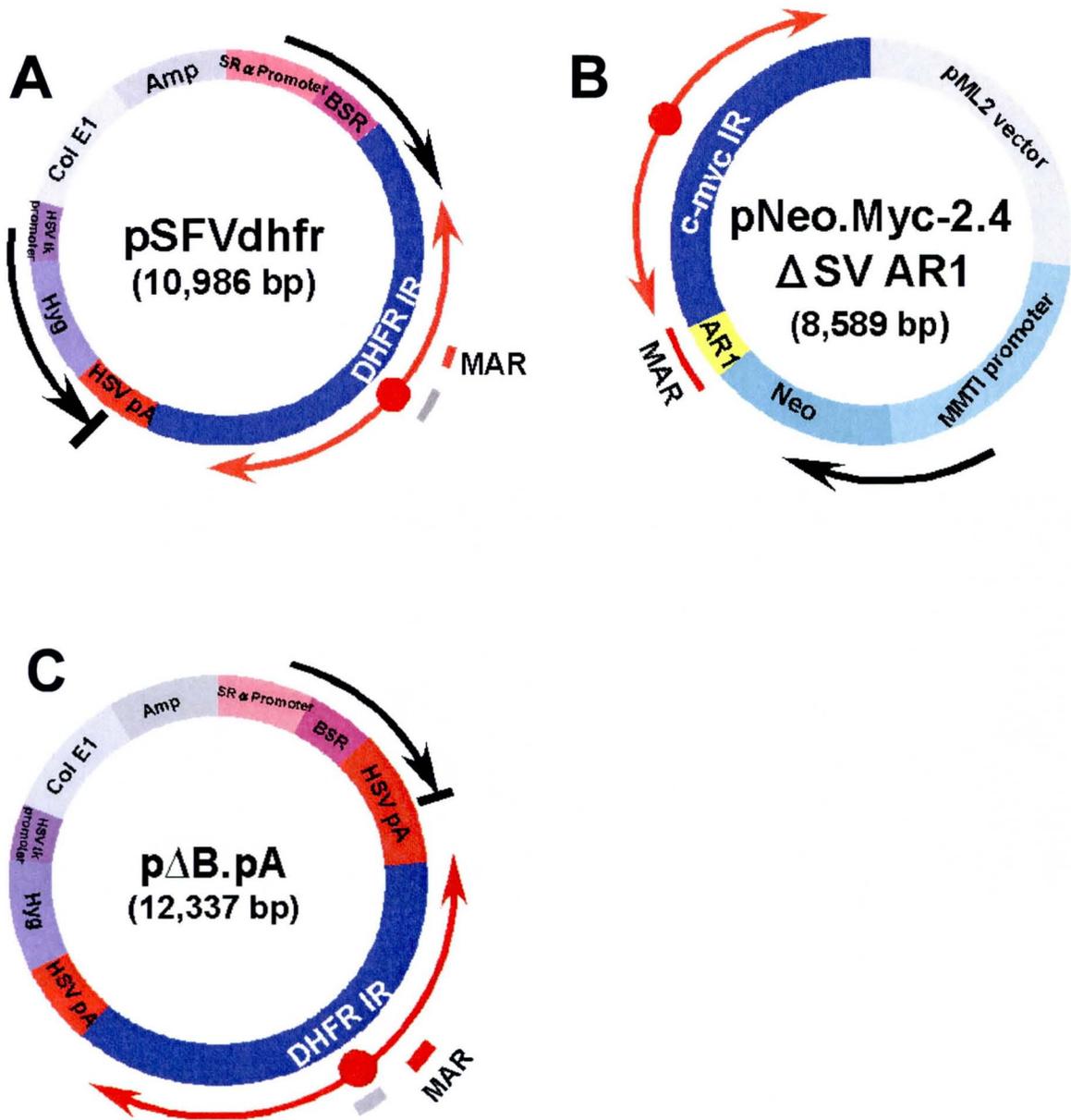


図4. 本研究で用いたIR/MAR プラスミド一覧

(A) pSFVdhfrのプラスミド構造の模式図。このプラスミドをCOLO 320DM 株へ導入しクローニングすることで図3に示したclone 12細胞株とclone 22細胞株を樹立した。またこのプラスミドと図5に示したpECMS2 β をLacR-CFP 株へ導入しクローニングすることで図27Bに示したHSR-CFP株を樹立した。

(B) pNeo.Myc-2.4 Δ SV AR1のプラスミド構造の模式図。このプラスミドをLacR-GFP 株へ導入しクローニングすることで図5に示したDM-GFP株を樹立した。

(C) p Δ B.HSV polyA のプラスミド構造の模式図。このプラスミドと図6に示したpECMS2 β をLacR-CFP 株へ導入しクローニングすることで図17に示したDM-CFP株を樹立した。

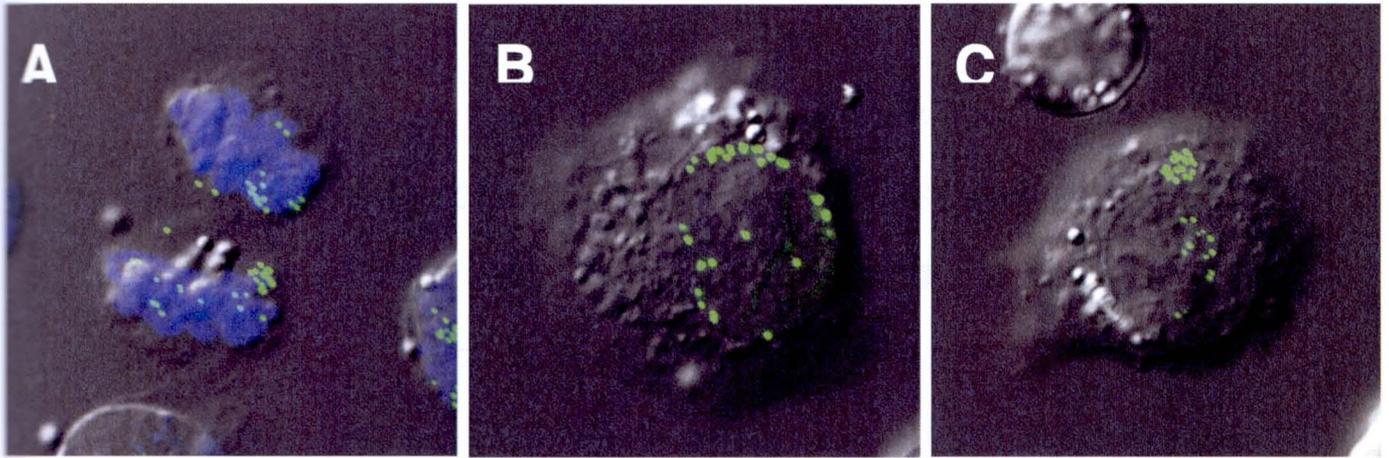


図5. 生細胞内で可視化されたDMは、固定細胞で得られた動態モデルを再現した。

図3で示した方法を用いてLacO 配列をDM 上で増幅させ、それをlacR-GFP の発現により可視化した。そのような細胞(DM-GFP細胞)をガラスボトムディッシュ上で培養し、AではPFAで固定後DAPI でDNA を青色に対比染色した。B とC は何もせずに生細胞で共焦点画像を得た。DM は緑色蛍光で鮮明に可視化され、それを微分干渉画像と重ね合わせたものを示す。(A)分裂期染色体に接着し娘細胞に分配されるDM。(B) G1期で核周辺部に局在するDM。(C)核内部に局在するDM と微小核に取り込まれたDM。

IR と MAR を持つプラスミドは哺乳動物細胞内で効率よく遺伝子増幅し、DM や HSR を形成する。またこのプラスミドと任意のプラスミドをコトランスフェクションすると共増幅する。そこで、LacR-GFP を発現した細胞株に、*c-myc* 遺伝子座の IR (2.4kb) と強い MAR 活性を持つ AR1 (377 bp) をもつ pNeo.Myc ΔSV AR1(図 4B) と 10.1kb の Lac0 repeat を持つ pSV2-dhfr8.32 (図 8B) をコトランスフェクションにより導入し、DM が LacR-GFP で可視化された DM-GFP 株を樹立した。

pECMS2β は S. M. Janicki から分与されたプラスミドである。彼女らはこのプラスミドを用いて生細胞内で RNA を可視化する MS2 system を樹立した。その MS2 system の概要を図 6 に示す。ファージの MS2 蛋白質は MS2 repeat が形成するヘアピンループを認識し結合する RNA 結合蛋白質である。この MS2 repeat 配列を TRE (Tetracycline Responsible element) 配列と CMV (cytomegaro virus) promoter の下流に組み込んだプラスミドが pECMS2β である。またこのプラスミドは Lac0 配列を持っており LacR-CFP を発現している細胞に導入することで、DNA を可視化することができる。この形質転換体に、MS2 結合蛋白質と YFP との融合蛋白質を発現させるプラスミド pMS2-YFP (図 7A) と rtTA を発現するプラスミド pTet-ON (図 7C)、または rTA を発現するプラスミド pTet-Off (図 7B) を導入し発現させた後、Doxycycline (以下 Dox) を加えると MS2 repeat をもつ RNA の転写が前者では誘導、後者では抑制される。この RNA は MS2-YFP 蛋白質と結合するため、YFP で可視化される。このため HSR-CFP、DM-CFP は LacR-CFP で可視化された DNA と、そこから転写された MS2-YFP で可視化された RNA を生細胞で同時に観察することが可能である。本研究で樹立した DM-CFP

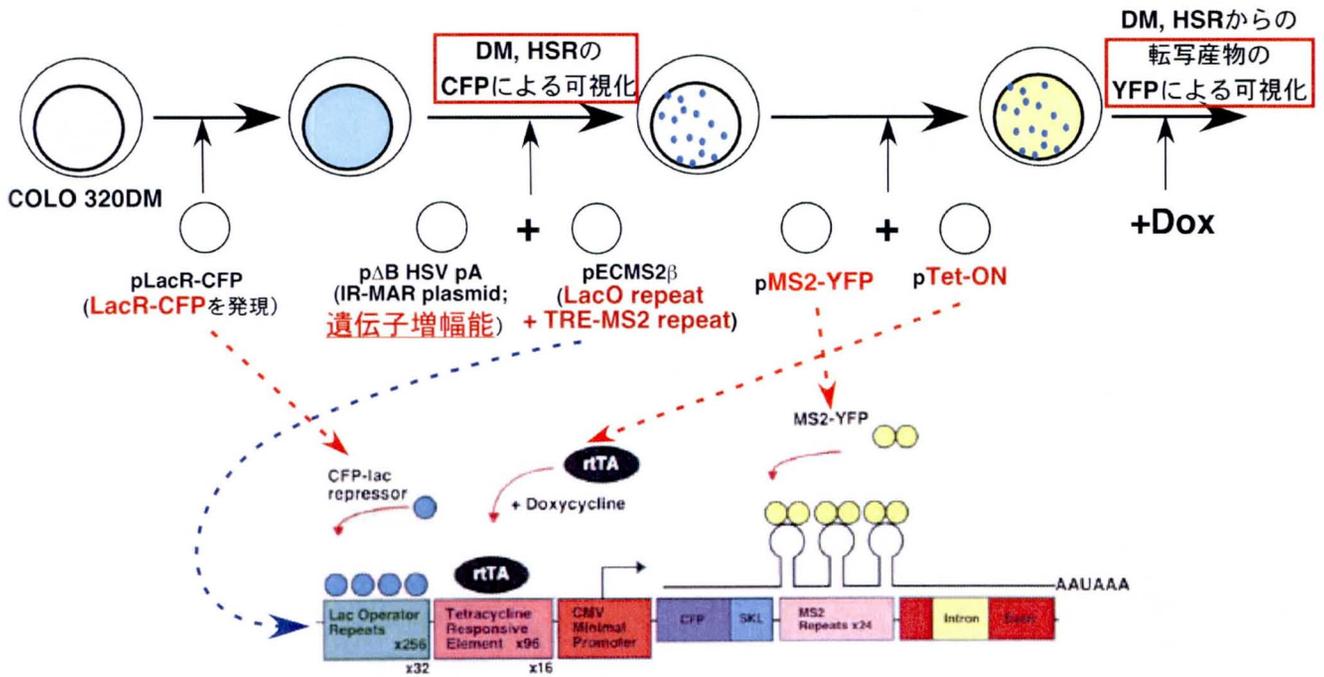


図6. DM DNA とその転写産物を、同時に生細胞で可視化するための方法

COLO 320 DM 細胞にpLacR-CFP をリポフェクション法により導入し、lacR-CFP を発現している安定な形質転換体を得た。この細胞にpΔB HSV poly A とpECMS2β をリポフェクション法により同時導入し、DM やHSR を形成した安定な形質転換体を得た。pΔB HSV poly A はIR とMAR をもつプラスミドである。pECMS2β (図下)は、rtTA 蛋白質とDoxycycline 存在下で3'側にMS2-repeat を持つRNA の転写が誘導される配列と、LacO repeat配列をもつプラスミドである。これら2つのプラスミドが共増幅してDMやHSRを形成した細胞では、DM やHSR が lacR-CFP で可視化される。この細胞にMS2-YFP とrtTA をエレクトロポレーションにより一過性に発現させ、Doxycycline によって転写を誘導すると、DM から転写されたRNA がMS2-repeat 配列 と MS2-YFP融合タンパク質と結合し黄色に可視化される。

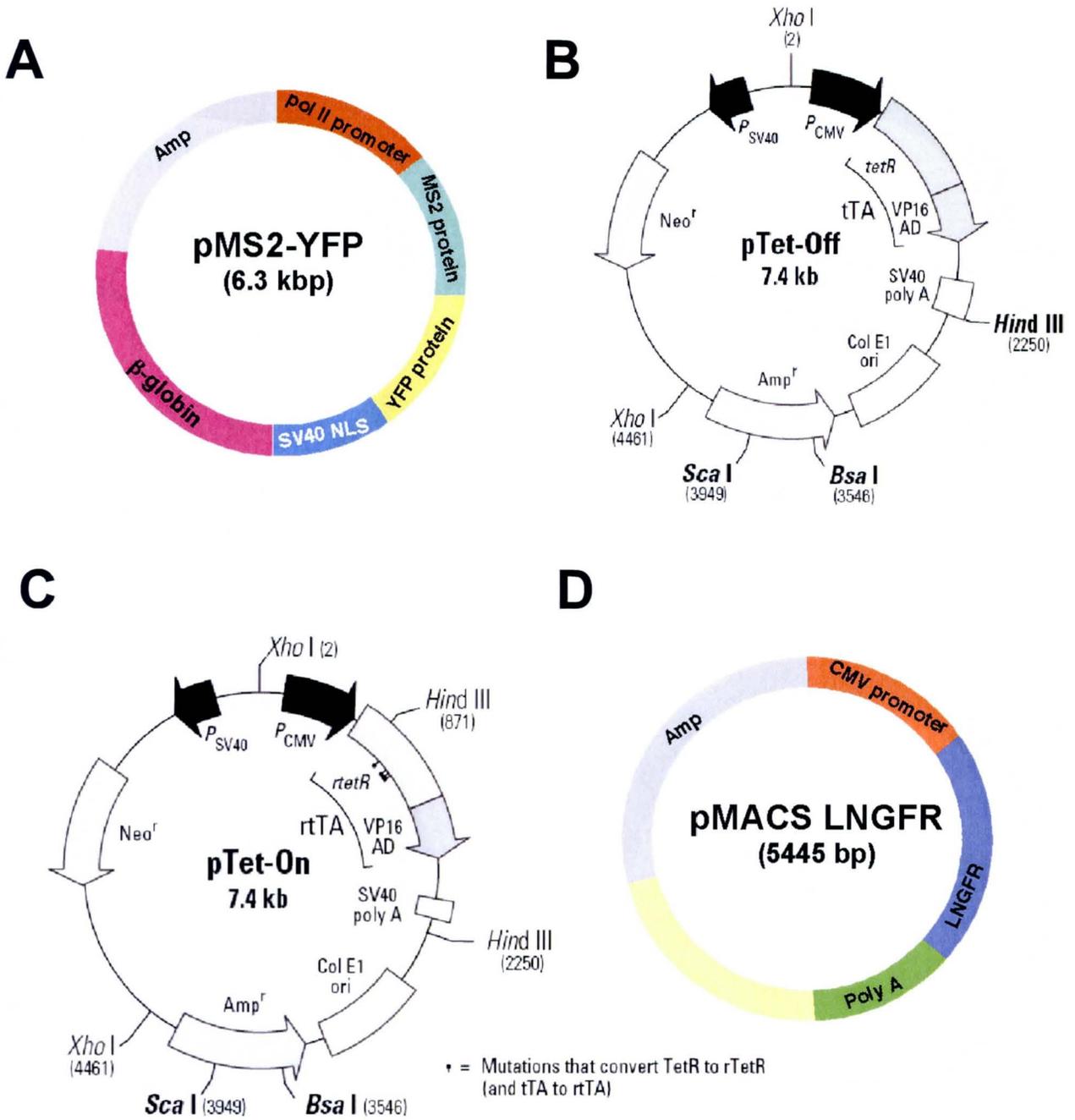


図7. 転写を誘導する際に用いたプラスミド一覧

プラスミド構造の模式図をしめす。(A) pMS2-YFP ; MS2-repeat RNAと結合するMS2-YFP融合タンパク質を発現するプラスミド。(B) pTet-Off ; Doxycycline 非存在下でTRE プロモーターからの転写を誘導するtTA タンパク質を発現するプラスミド。(C) pTet-On ; Doxycycline 存在下でTRE プロモーターからの転写を誘導するrtTA タンパク質を発現するプラスミド。(D) pMACS LNGFR ; pTet-Off と共に細胞へコトランスフェクションし、これらのプラスミドが発現した細胞を選択する際に用いた。

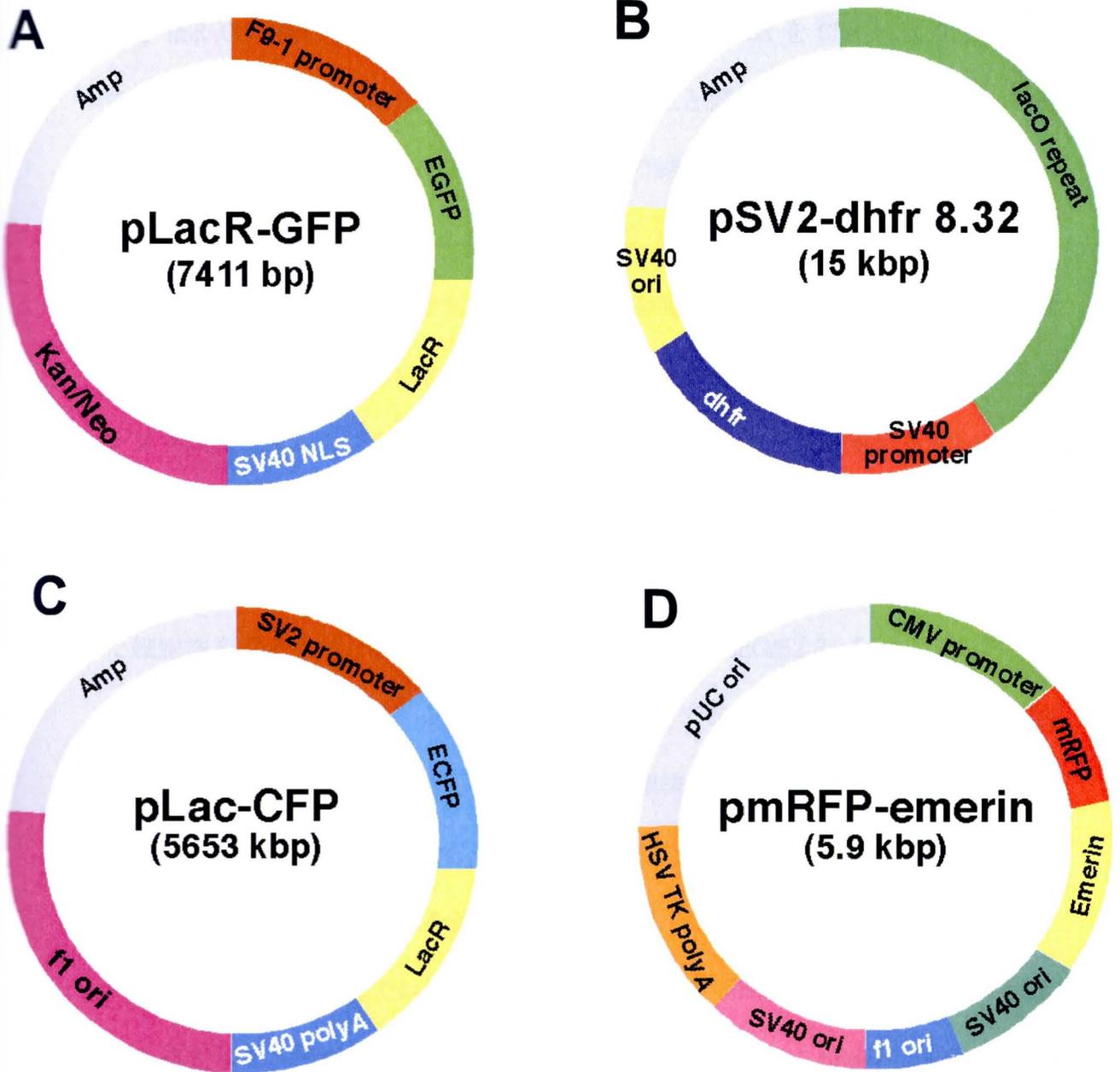


図8. その他のプラスミド一覧

プラスミド構造の模式図。(A) pLacR-GFP ; LacR とGFP の融合タンパク質を発現するプラスミド。(B) pSV2dhfr 8.32 ; 約10 kbp のLactose Operator 配列をもつプラスミド。(C) pLacR-CFP ; LacRとECFPの融合タンパク質を発現するプラスミド、(D) pmRFPのプラスミド ; Emerin とMonomeric RFP の融合タンパク質を発現するプラスミド。

株と HSR-CFP 株は、以下の方法で樹立した。DM や HSR を CFP により生細胞内で可視化するためには、上記の DM-GFP 株の樹立と同様に、DM や HSR で lacO 配列を増幅させ、それを lacR-CFP 融合蛋白質の結合により可視化した。すなわち、初めに COLO 320DM 細胞株に LacR-CFP (図 8C) を発現するプラスミドを導入し、G418 で薬剤選択することで常時 LacR-CFP を発現している安定な形質転換体を得た。この細胞株に IR/MAR プラスミドである pSFVdhfr と pECMS2 β をコトランスフェクションし、5 μ g/ml のブラストサイジンにより薬剤選択を行いコロニーを形成させた後、個別のコロニーをピペッティング操作により選択、培養することで HSR が CFP で可視化された形質転換体を得た。また DM が可視化された細胞株を得るため、p Δ B HSV polyA (図 4C) と pECMS2 β をコトランスフェクションにより導入し、5 μ g/ml のブラストサイジンにより薬剤選択を行い、HSR 株と同様にして DM が CFP で可視化された細胞株をクローニングした。これらの増幅構造が HSR および DM を形成していることは、分裂期染色体標本を調製して、それに対して FISH 法を適用することによって確認した。

一方、第 4 章では、生細胞で DM と核膜を同時に可視化するための細胞株を樹立した。まず LacR-GFP 株を発現した COLO 320DM に pEmerin-RFP (図 8D) を形質導入することで Emerin が安定に発現した細胞株を得た。この細胞株に pNeo. Myc. LacO を導入し DM が LacR-GFP で緑色に、核内膜局在タンパク質である emerin が RFP で赤色に可視化された DM-GFP/emerin RFP 株を得た。

2.3 FISH と蛍光抗体法

2.3.1 プローブの調製

DNA FISH 用のビオチン標識した DNA プローブの調製はバイオブ

ライム DNA ラベリングシステム (Invitrogen) を用い、以下のように行った。まず、鋳型となる *c-myc* cosmid DNA 300 ng が入った 1.5 ml チューブに蒸留水を加えて全量を 24 μ l とした。これに、2.5 x random prime solution を 20 μ l 加えて、99°C で 5 分間処理することにより DNA を変性させた後、直ちに氷中に移した。次に、5 μ l の 10 x Biotin-dNTP mixture (1 mM biotin-14-dCTP、1 mM dCTP、2 mM dATP、2 mM dGTP、2 mM dTTP)、および 1 μ l の concentrated large fragment of DNA polymerase I (Klenow fragment) をそれぞれ加え、37°C で 1 時間反応させた。Stop buffer を 5 μ l 加えて完全に反応を停止させた後、スピニングカラムに溶液を移し、遠心 (3,300 rpm、2 分) することによって未反応ヌクレオチドを除去し、標識されたプローブを回収した。次に、2.0%アガロースゲル (高電気浸透、ナカライ) 中で電気泳動をしてプローブの合成量を求めた。

プラスミド配列を検出するための DNA プローブの調製は以下のよ

うに行った。まず鋳型となる 1 μ g の pSFVdhfr を *Eco*RI 消化によって断片化し、3 分間煮沸し変性させた後、*c-myc* cosmid プローブ調製の場合と同様にビオチン標識プローブを作成した。

ジゴキシゲニン (digoxigenin、DIG) で標識した RNA プローブ

の調製は以下のように行った。まず、*c-myc* 遺伝子の第3エクソンを含む約 1,400 塩基対が組み込まれた pGEM4 *c-myc* プラスミド DNA を、*Hind* III により 1ヶ所で切断した。次に、エタノール沈澱し、TE に溶解させた。反応液 20 μ l 中に、1 X Reaction buffer (200 mM Tris-HCl (pH 7.9)、30 mM MgCl₂、10 mM spermidine、50 mM NaCl、プロメガ)、10 mM DTT (プロメガ)、1 X DIG RNA labeling mixture

(10 mM ATP、10 mM CTP、10 mM GTP、6.5 mM UTP、3.5 mM DIG-11-UTP、ロシユ)、2 μ l の linearised pGEM4-*c-myc* DNA、20 units RNase inhibitor (東洋紡)、20 units SP6 RNA ポリメラーゼ (プロメガ) を加え、37°C で 1 時間以上転写反応させた。反応終了後、0.5 M EDTA を終濃度 12.5 mM になるように加えて転写反応を停止させた。反応液 1 μ l に TE (pH 8.0) 4 μ l、色素液 1 μ l を加え、0.5 μ g/ml エチジウムブロマイドを含む 1.0% アガロースゲル (高電気浸透、ナカライ) 中で電気泳動した。泳動バッファーには、TBE 溶液 (50 mM Tris、49 mM Boric acid、1 mM EDTA) を用いた。電気泳動解析装置 FAS II (東洋紡) を使って写真を撮影し、転写産物の有無を確認した。反応液をエタノール沈澱後、TE に溶解させた。

pSFVdhfr の薬剤耐性遺伝子 *Blasticidine resistance* (以下 *BSR*) を BS908L [CTCGTTTACGTGAACCGTCA] と BS1303R [GAAATCAACTCCCTACACATA] のプライマーを用いて PCR で増幅した。この産物を pGEM-T Easy Vector Systems (プロメガ) を用いて pGEM-T Easy Vector に組み込んだ。すなわち、1x Ligation buffer、T4 DNA Ligase、50 ng pGEM-T Easy Vector の入った溶液に、Vector : PCR 産物のモル比が約 1 : 1 となるように、PCR 産物溶液を加え、さらに MQ-H₂O を加えて 10 μ l とし、ピペッティングで軽く混合した後、4°C で一晩反応させた。反応後、反応液のうち 1 μ l を、氷中で溶かしたコンピテントセル DH5 α (東洋紡) 42 μ l と混合して氷中で 30 分おいた後、42°C で 30 秒間ヒートショックを与えて再び氷中においた。それに 500 μ l の SOC buffer (20 mg/ml Peptone、5 mg/ml Yeast extract、40 mM NaCl、2.5 mM KCl) を加えて 37°C で 1 時間振盪培養した後に、寒天培地にプレーティングした。ここで用いた培地は、以下のよ

うにして作成した。1.5%アガロースを含んだ LB buffer (10 mg/ml Peptone、12.5 mg/ml Yeast extract、12.5 mg/ml NaCl、0.003 N NaOH) をオートクレーブし、約 50°Cまで放冷した後、アンピシリンを終濃度で 50 µg/ml になるように加えた。それを滅菌シャーレに分注してから一晩以上おき乾燥させた。はえてきたコロニーから 16 コロニーを選択し、2 ml の LB 培地に植菌して、37°Cで一晩震盪し増やした。これらからラピッドアイソレーション法でプラスミド DNA を単離し、目的配列が組み込まれていることを確認した。すなわち、ラピッドアイソレーションで得た制限酵素で消化する前の DNA を用いて配列の方向を PCR により確認した。プライマーは vector 側の pGEM-T-R と BSR 上流側の 908L もしくは下流側の 1303R を用いた。目的の配列が組み込まれていたコロニーから、QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を大量に精製した。このプラスミドを鋳型にして RNA プローブを作成した。すなわち、BSR 蛋白質をコードする Sense RNA を検出するための Antisense プローブを作成する際には、Sal I で切断し、逆に Antisense プローブを検出するための Sense プローブは Nco I により切断した。その後 c-myc RNA プローブを調製した方法と同様にそれぞれ SP6 polymerase (プロメガ)、T7 polymerase (プロメガ) による *in vitro* 転写反応を行った。

2.3.2 固定法

メタノール酢酸 (カルノア) 固定法は、酸性アルコールにより蛋白質を変性させて固定する方法で、G バンド染色、R バンド染色のほか、FISH 法による染色体解析など染色体の観察に一般的によく用いられる方法である。

まず、 $0.5\sim 1 \times 10^6$ cells/ml 程度の細胞培養液 5 ml を 15 ml 遠心チューブ（スミロン）に入れて遠心（TS ローター、1,200 rpm、5 分、室温、トミー精工 LC06-SSP 遠心機）して上清を 200 μ l 程度残して取り除き、穏やかなタッピングにより細胞を完全に懸濁した。次に、37°C に保温していた 75 mM KCl 溶液を 10 ml 加えた。この際、最初の 1 ml は 1 滴ずつ加えるごとにタッピングして徐々に加えた。これを 37°C で 10 分間保温した後、4°C のメタノール酢酸溶液（メタノール：酢酸=3：1）をパスツールピペットを用いて 3、4 滴加え、穏やかに混合した。その後直ちに遠心し、上清を 200 μ l 残して取り除いた。沈殿を穏やかなタッピングにより完全に懸濁した後、4°C のメタノール酢酸溶液を 10 ml 加えた。この際、上と同じように最初の 1 ml は 1 滴加えるごとに攪拌して徐々に加えるようにした。続いて、4°C で 20 分間静置した後、遠心により上清を除き、4°C のメタノール酢酸を 5 ml 加え 4°C で 20 分間静置した。再び遠心を行い、上清を除いた後、4°C のメタノール酢酸溶液 3 ml で懸濁して 4°C で 20 分間静置した。最後に、遠心／上清除去の後、1 ml のメタノール酢酸溶液に懸濁し、その溶液を -20°C で保存した。

スライドガラス上で標本を作成するためには、メタノール酢酸溶液で保存した細胞を高湿度の状態ですライドガラスに展開する必要がある。このため、スライドガラス（マツナミ・スーパーフロスト；松浪ガラス社製）の表面を水を含ませたキムワイプで軽くふくことによって、薄い水の層をつくった後、細胞懸濁液を 1、2 滴滴下した。細胞の保存期間が長かった場合、固定液が水分を含むようになるため、遠心によりメタノール酢酸溶液の交換を行った。スライドガラスを十分に乾燥させた後、1 週間以内に FISH 法に用いた。

PFA(paraformaldehyde)固定法は、パラフォルムアルデヒドを用いて蛋白質のアミノ基間を架橋することにより固定する方法で、細胞核の立体構造が比較的維持されるので、間期核内での特定の遺伝子の局在や構造を調べるのによく使われる。

PFA（電子顕微鏡用、ナカライテスク）は、5%PFA/PBS(-) (w/v)となるよう調整した後、水酸化ナトリウム溶液を数滴加え、加熱しながら溶解した。pHメーター（HM30V、TOA）でpH 7.4にあわせ、4℃で遮光保存した。

細胞の固定には、1スライド当たり 50×10^4 細胞程度を浮遊細胞回収装置（TOMY）を用いて、沈澱させ、上清を除きおだやかにタッピングした後、PBS(-)を加えて細胞を洗い、1200 rpm、5分間遠心し細胞を沈澱させた。タッピングにより細胞をほぐし、1スライド当たり 450 μ l の 1.75% PFA/PBS(-)を加え、混合し、室温で10分間固定した。この細胞を、poly-L-Lysine でコートされたスライドガラス（マツナミ）上にサイトスピン法で付着させ、乾燥させないように、PBS(-)で満たしたコプリンジャーに移し、5分以上、震盪し洗った。その後、0.5%NP-40 /PBS(-)をスライドに滴下し、室温で10分間細胞膜の可溶化を行い、PBS(-)で満たしたコプリンジャーに移し5分以上、震盪し洗った。HP1 α 、BrdU、CldU、 γ H2AX を検出する場合、上記の過程修了後、-20℃のメタノールが入ったコプリンジャーで3分間静置した。その後PBS(-)に置換した。保存する場合はこのまま4℃で保存した。

RNA FISH 用の細胞の固定を行うには、まず、 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml 程度の細胞培養液 2 ml を 15 ml 遠心チューブに入れて遠心（TS-7 ローター、1,200 rpm、5分、室温、トミー精工 LC06-SP 遠心機）した。上清を除去した後、穏や

かなタッピングにより完全に懸濁し、2 ml の PBS(-) を加えた。もう一度上の操作を繰り返し、2 ml の PBS(-) に溶解した。次に、浮遊細胞回収装置 (TOMY) を用いて、細胞を poly-L-Lysine でコートされたスライドガラス (マツナミ) 上にサイトスピン法で付着させた。このスライドガラスは陽電荷をもっており、負電荷を持つ細胞の接着を容易にさせる。浮遊細胞回収装置に加える溶液の量は 450 μ l とし、遠心の条件は 1,200 rpm で、スタートボタンを押してから完全に遠心が止まるまでの間隔を 80 秒とした。遠心の後、あらかじめ氷冷した CSK buffer を 90 μ l 滴下し、氷上で 10 分間処理した。CSK buffer (Cytoskeleton buffer; 100 mM NaCl, 300 mM Sucrose, 10 mM PIPES (pH 6.8), 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5% Triton X-100) は、使用直前に Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) を 1.2 mM、vanadyl adenosine を 2 mM になるように加えて調製した。次に、4% PFA/15 mM MgCl₂/PBS(-) を 80 μ l 滴下してすぐに液をふりおとし、再び同量滴下して湿箱内で室温、15 分静置して細胞を固定した。固定後、スライドガラスを PBS(-) の入ったコップリンジャー中で 5 分間洗い、つづいて 70% エタノール中で 5 分洗った。処理の終わったスライドガラスは、70% エタノール中に浸けて 4°C で保存した。

2.3.3 FISH 法

FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法は、ある塩基配列に特異的な DNA もしくは RNA プローブを、細胞内の DNA もしくは RNA にハイブリダイズさせた後、蛍光物質によりプローブを可視化させ、その存在部位を蛍光顕微鏡下で検出する実験技術である。この技術は、遺伝子マッピングや間期細

胞における染色体研究など幅広い分野で必須の手法となっている。2種類以上のプローブを異なる蛍光色で検出することにより、染色体（クロマチン、DNA ファイバー）上での配列順序や物理的距離を計測することもできる。

分裂期染色体標本を用いた DNA FISH 法の手順を以下に示す。まず

ハイブリダイゼーション溶液を調製した。すなわち、スライド 1 枚分のハイブリダイゼーション溶液の調製のためには、標識したプローブ 20 ng/ μ l に、10 mg/ml サケ精子 DNA（GIBCO BRL）を 0.6 μ l、1 μ g/ μ l ヒト Cot-1 DNA（GIBCO BRL）を 1.5 μ l 加えた。ヒト Cot 1 DNA はヒトゲノム中にみられる高度反復配列が濃縮された DNA であり、FISH プローブに含まれる *Alu 1* などの高度反復配列が染色体標本とハイブリダイズしないようにするために用いた。プローブはエタノール沈澱により精製した後、風乾しエタノールを除去した。その沈澱に MQ-H₂O 3 μ l を加え、完全に沈澱を溶解させた。その溶液に、60%ホルムアミド（片山化学）/12%デキストランサルフェートナトリウム（ナカライ）/2 x SSC 12 μ l を加えた後、よく懸濁し、ハイブリダイゼーション溶液を調製した。次に、75°Cで 5 分間処理して、プローブ DNA を変性させた後、すぐに氷冷した。最後に 42°Cで 30 分間処理して、プローブに含まれる高度反復配列とヒト Cot 1 DNA とのアニールリングを行った。

カルノア固定後乾燥させておいた分裂期染色体標本を 2xSSC に浸し 5 分間振とうした後、100 μ g/ml RNase A(Sigma)/2xSSC を適量スライドへのせ泡が入らないよう注意してカバーガラス（24 mm X 50 mm、マツナミ）を被せ湿箱へ入れ 37°C、30 分間インキュベートすることで RNA を消化した。その後カバーガラスを除き、スライドをコプリンジャーに入れた 2xSSC に浸し 5 分間浸透し

た。

次にスライドガラスを 70%、80%、90%、100% エタノール中で 3 分間ずつ振とうし脱水した。このスライドを 72°C にセットしたヒーターの上で乾燥させた。

最後にスライドの DNA を変性させるため、スライドを 72°C に調節した 70% ホルムアミド (ナカライテスク) /2xSSC に浸し 2 分間振とうした。次に素早く -20°C に冷やしておいた 100%、90%、80%、70% エタノール中で 3 分間ずつ振とうし多後、風乾した。完全に乾いたらハイブリダイゼーション溶液を 15 μ l 滴下しカバーガラスを被せハイブリパックに封入し 37°C で 1 日ハイブリダイゼーションを行った。

PFA で固定した細胞の DNA FISH 法 について説明する。ハイブリダイゼーション溶液は上記した分裂期染色体標本を用いた時と同様にして調製した。まず 4°C の 70% エタノール中で保存しておいたスライドを 2xSSC に浸し、5 分間置換しておく。このスライドガラスを 100 μ g/ml RNase A (Sigma) /2xSSC を適量スライドへのせ湿箱へ入れ 37°C、30 分間インキュベートすることで RNA を消化した。その後スライドをコプリンジャーに入れた 2xSSC に浸し 5 分間振とうした。

最後にハイブリダイゼーション溶液を、水分をよく切っておいたスライドへ滴下しカバーガラスを被せハイブリパックへ 2 重に密封する。このハイブリパックごと 75°C の恒温槽へ入れ 5 分間変性させた後 37°C で 1 日インキュベートした。

RNA FISH 法 の手順について以下に説明する。RNA は RNase による分

解を防ぐため、感熱滅菌できる器具は 180°C、3 時間の感熱滅菌を行うか、5%過酸化水素水につけておいた。また全ての手順でグローブを装着しスライドを手で触らないように気をつけた。RNA FISH 用に固定したスライドガラスを、PBS(-)を入れたコップリンジャー内で 5 分以上洗い、平衡化溶液 (50%ホルムアミド、2 x SSC) を 80 μ l 滴下して湿箱内で室温、15 分間おいた。湿箱からスライドガラスを取り出し、DNA FISH 法と同様に調節したハイブリダイゼーション溶液を 15 μ l 滴下し、カバーガラス (22 mm X 22 mm、マツナミ) を気泡が入らないように被せた。ハイブリバッグにスライドガラスを入れてポリシーラーで密封し DNA の変性を行わず、そのまま 37°Cで一晩保温してハイブリダイゼーションを行った。

DNA/RNA 同時 FISH 法について以下に説明する。まず上記した「RNA FISH 法」の手順に従い標的 RNA を検出した。そのシグナルを 3% PFA で 10 分、カルノア溶液中で 10 分間、室温で固定した後に、「PFA で固定した細胞の DNA FISH 法」の手順に従い標的 DNA を検出した。この方法により RNA のシグナルは DNA の変性を行っても残っているため RNA と DNA を同時に観察することができる。

プローブの検出方法はどの FISH 法でも共通である。以下にその手順を示す。ハイブリダイゼーションの後、細胞がはがれないようにカバーガラスを慎重にはがし、スライドガラスを 45°Cの 50%ホルムアミド/2x SSC が入ったコップリンジャーに浸した。スライドホルダーを上下させることによりハイブリダイズしていない、もしくは非特異的にハイブリダイズしているプローブを除去した。この操作を 3 回行った後、スライドホルダーを 45°Cの 2xSSC が入っ

たコップリンジャーに移し、同様な操作を 3 分間ずつ計 3 回行うことにより、ホルムアミドを除去した。その後、DIG は間接蛍光抗体法によりビオチンはアビジンとの特異的結合を利用した検出法によりプローブを検出した。その方法は次の項で説明する。

2.3.4 間接蛍光抗体法

間接蛍光抗体法は、抗原をその抗体を用いて検出する方法の一つで、抗原に直接結合する抗体（一次抗体）を蛍光色素で標識して検出する（直接蛍光抗体法）代わりに、一次抗体に結合する抗体（二次抗体）を蛍光物質で標識して検出する方法である。直接蛍光抗体法に比べて蛍光が増幅される、特異抗体ごとに標識する手間が省ける、という利点があり広く用いられている。

前の項で FISH 法のハイブリダイゼーション、非特異的プローブの除去を行う段階まで述べた。その後の手順についてこの項で説明する。まず、これらの処理を終えたスライドガラスに、ブロッキング溶液（3% Block ace (Dainippon Pharmaceuticals)、0.05% tween、2xSSC）を 60 μ l 滴下し、湿箱内で 37°C、30 分間保温することによりブロッキングを行った。ブロッキング後、DIG 標識プローブを用いた場合には、0.5 mg/ml anti-DIG mouse monoclonal antibody（ロシュ）/1% block ace/PBS(-)を 50 μ l 滴下し、湿箱内で 37°C、1 時間反応させた。反応後、PBS(-)、0.05% Tween（シグマ）/PBS(-)、PBS(-)の入ったコップリンジャー中でスライドホルダーをそれぞれ 5 分間ずつ上下に振とうすることによりスライドガラスを洗浄した。その後、蛍光標識した anti-mouse 抗体を 2 次抗体として用いて検出した。反応後、PBS(-)、0.05% Tween

(シグマ) /PBS(-)、PBS(-)の入ったコップリンジャー中でスライドホルダーをそれぞれ 5 分間ずつ上下に振とうすることによりスライドガラスを洗浄した。

ビオチン標識プローブを用いた場合には、同様にブロッキングを行った後、20 µg/ml Alexa594 標識ストレプトアビジン /1% block ace /PBS(-)を 50 µl 滴下し、湿箱内で 37°C、1 時間反応させた。反応後、PBS(-)、0.05% Tween (シグマ) /PBS(-)、PBS(-)の入ったコップリンジャー中でスライドホルダーをそれぞれ 5 分間ずつ上下に振とうすることによりスライドガラスを洗浄した。シグナルを増幅する場合は、洗浄後 5µg/ml ビオチン化ストレプトアビジン/1% block ace/PBS(-)を 50 µl 滴下し、湿箱内で 37°C、1 時間反応させた。反応後、PBS(-)、0.05% Tween (シグマ) /PBS(-)、PBS(-)の入ったコップリンジャー中でスライドホルダーをそれぞれ 5 分間ずつ上下に振とうすることによりスライドガラスを洗浄した。その後、再び 20 µg/ml Alexa594 標識ストレプトアビジン /1% block ace /PBS(-)を 50 µl 滴下し、湿箱内で 37°C、1 時間反応させた。反応後、PBS(-)、0.05% Tween (シグマ) /PBS(-)、PBS(-)の入ったコップリンジャー中でスライドホルダーをそれぞれ 5 分間ずつ上下に振とうすることによりスライドガラスを洗浄した。

ラミン蛋白質の検出は、一次抗体には goat anti-lamin B (C-20 ; Santa Cruz Biotechnology) を使用した。二次抗体には、一次抗体もしくは実験目的に応じて、Rhodamine-conjugated sheep IgG anti-mouse antibody (Boehringer、Texas Red-conjugated swine IgG anti-goat antibody (EY laboratories) を使用した。

γ H2AX の検出のためには、一次抗体に、mouse IgG anti-gH2AX

monoclonal antibody (UpState)、mouse IgG anti-HP1 α monoclonal antibody (UpState) を用い、2 次抗体には FITC-conjugated donkey IgG anti-mouse antibody (Rochland)、もしくは Texas Red-conjugated goat IgG anti-mouse antibody (Southern Biotechnology) を用いた。

HP1 α の検出は一次抗体に mouse IgG anti-HP1 α monoclonal antibody (UpState) を用い、2 次抗体には FITC-conjugated donkey IgG anti-mouse antibody (Rochland)、もしくは Texas Red-conjugated goat IgG anti-mouse antibody (Southern Biotechnology) を用いた。

Trimethyl 化された Histon H3K9 (H3K9Me3) の検出は一次抗体に rabbit IgG anti-H3K9Me3 polyclonal antibody (Abcam) を用い、2 次抗体には TexasRed-conjugated goat IgG anti-mouse antibody (vector) を用いた。

NPC の検出は一次抗体に mouse IgG anti-NPC monoclonal antibody (Covance) を用い、2 次抗体には FITC-conjugated donkey IgG anti-mouse antibody (Rochland)、もしくは Texas Red-conjugated goat IgG anti-mouse antibody (Southern Biotechnology) を用いた。

細胞周期を特定するための複製鎖標識法について説明する。複製鎖標識のためにはチミジン類似体である 10mM 5-Bromo-2-deoxyuridine (Aldrich)、または 10mM 5-Chloro-2-deoxyuridine (Biomedicals) を要事調製し終濃度 100 μ M となるよう培地に添加し 15 分間、37°C、CO₂ インキュベーターで培養した。その後、RNA FISH 法のための PFA 固定と同様に固定した後、ハイブリダイゼーション溶液を滴下しカバーガラスをのせ、ハイブリパックへ封入し、72°C で 5 分間 DNA の変性を行った。このスライドを PBS(-) でよく洗浄し、signal

enhancer (Molecular Probe) を 40 μ l 滴下し室箱内で 37°C、30 分間ブロッキングした。スライド上の液を除き、50 μ l mouse IgG anti-BrdU monoclonal antibody (Roche)/ 1% block ace / PBS(-) を滴下し 室箱内で 37 度、1 時間反応させた。PBS(-)、0.05% Tween / PBS(-)、PBS(-) によるスライドガラスの洗浄を行った後、50 μ l anti mouse Alexa 564 goat IgG/ 1% block ace /PBS(-) を滴下し 室箱内で 37°C、1 時間反応させた。PBS(-)、0.05% Tween/PBS(-)、PBS(-) によるスライドガラスの洗浄を行い、DAPI もしくは PI によって核の対比染色をおこなった。

次に熱変性による LacR-CFP 等の蛋白質変性を避けるため、非変性条件での BrdU の検出方法を樹立した。まず 1 次抗体反応に DNase incubation Buffer (5 - 6 μ g / ml anti BrdU mouse IgG(Roche)、30 mM Tris-HCl (ph 8.0)、0.3 mM MgCl、0.5 mM 2-mercaptoethanol、0.5 % BSA、1% Block Ace、6 unit / μ l RNase Free DNase(Takara)、1×PBS) を調製し、37°C、30 分間湿箱内でインキュベーションした。反応後、PBS(-)、0.05% Tween (シグマ) /PBS(-)、PBS(-) の入ったコップリンジャー中でスライドホルダーをそれぞれ 5 分間ずつ上下することによりスライドガラスを洗浄した。また CldU を用いて複製鎖を標識した場合は、一次抗体に rat IgG2a anti-BrdU antibody (OBT)を用い、二次抗体には Alexa 647-conjugated goat IgG anti-rat antibody を用いた。

また G2 期特定のためには、複製鎖標識後、新鮮培地に 2 時間リリースし、ヘテロクロマチンが複製された後期複製のパターンを示す細胞を G2 期とみなした。

新規転写産物の検出のためには(-)-5-Bromouridine (以下 BrU)を細

胞培養液へ添加すると RNA 合成鎖にウラシルの代わりとして取り込まれる。その他に、BrUTP をマイクロインジェクションで導入する方法、および、固定した細胞を用いて Run-on transcript により新規 RNA 鎖を標識する方法がある。しかし、BrUTP はリン酸基がついているため細胞膜を通過できず取り込まれない。またマイクロインジェクションは浮遊細胞である COLO 320DM 株には適応することができないため BrU を培養液中に加え取り込ませる方法を用いた。

BrU は要事調製で毎回調製した。電子天秤により 32.3mg の BrU をはかり、1 ml の PBS(-)に溶解させ、100 mM になるよう調製した。これを 2.5 mM となるよう対数増殖期の細胞を培養している培養液に加え 37°C で 5 分間標識した。

BrU を用いた作業は臭素が外れてしまうのをさけるため暗室で行った。50~100×10⁴ cells/ml の対数増殖期の細胞に終濃度 2.5mM になるように MQ-H₂O に溶解した 100 mM の BrU を加えて 5 分間、37 度で培養した。その後、遠心し PBS(-)で洗い遠心した。この固定法は RNA FISH 法のための固定法と同様、CSK Buffer で細胞質を除く方法を用いた。上記のように細胞を固定したスライドに signal enhancer (Molecular Probe) を 40 μl 滴下し室箱内で 37 度、30 分間ブロッキングした。スライド上の液を除き、50 μl mouse IgG anti-BrdU monoclonal antibody (Roche)/ 1% block ace / PBS(-) を滴下し 室箱内で 37°C、1 時間反応させた。PBS(-)、0.05% Tween / PBS(-)、PBS(-) によるスライドガラスの洗浄を行った後、50 μl anti mouse Alexa 564 goat IgG/ 1% block ace /PBS(-)を滴下し 室箱内で 37 度、1 時間反応させた。PBS(-)、0.05% Tween/PBS(-)、PBS(-) によるスライドガラスの洗浄を行った。

2.4 顕微鏡操作と画像取得

本研究では、以下の3機種 of 共焦点レーザー操作顕微鏡を用いた。すなわち、MRC 600 (BioRad)、LSM 510 pascal (Zeiss)、または Olympus FV10-ASW confocal system である。また、タイムラプス解析のためには、ECLIPSE TE2000-E (Nikon) を使用した。以下に、個別に詳述する。

MRC 600 ; 対物レンズを油浸系対物レンズ (100X、NeoFLUAR、NA 1.30) に合わせ、アルゴンイオンレーザー (water cooled Ar ion laser) を選択し、フィルターカセットには、UBHS を用いた。スキャンスピードを Fast 2 に設定し、焦点を合わせた後、明るさ、コントラスト、ピンホールの値、レーザー強度を最適化した。画像を取得する際には、スキャンスピードを Slow に設定し、カルマン平均を 5 回行った。試料を繰り返しスキャンして、その平均値を採用するカルマン平均を行うことにより、ノイズが軽減されたスムーズな画像を取得することができる。

LSM 510 pascal ; 対物レンズを油浸系対物レンズ (Zeiss, Apochromat, NA1.40, oil) にあわせ、落射蛍光による目視で焦点を合わせた後、Find ボタンにより適切な明るさに調節し、ピンホール径を $1\mu\text{m} \pm 0.5\mu\text{m}$ に調節した。画像は line scan mean 16 回、蛍光退色が強い場合は 8 回で取得した。画像の解析は LSM Image Browser (Zeiss) により行った。

Olympus FV10-ASW confocal system ; 油浸系対物レンズ (UPLSAPO NA 1.35 x60 oil) に合わせ、レーザー発振レベルを調節し、カルマン平均 2 回、 512×512 、光学ズームは 1~5 倍の条件で画像を取得した。画像の解析は FV10-ASW 1.7 viewer (Olympus) により行い、画像の調節等は photoshop (CS) を用いた。

ECLIPSE TE2000-E (Nikon) ; 対物レンズには x63 objective lens (Nikon Plan APO VC NA 1.40)、画像取得のためには CCD camera (DS, Nikon) と画像取得ソフト NIS element を使用した。

画像の解析は各顕微鏡専用のソフトを用いて Z-series 画像について行った。第 5 章の図 29、30 のシグナルの共局在を解析するためには、colocalization を選択し、Z-series 全ての画像について比較したい 2 種類のチャンネルを選択した。ここで 2 種類のシグナルの蛍光強度別分布が示される。ここで各チャンネルの蛍光強度が一定以上あるシグナルのみを絞り込んだ。この絞り込んだ画像を抽出したのが図の写真上パネルである。

2.5 タイムラプス解析

第 4 章のタイムラプス解析は ECLIPSE TE2000-E (Nikon) を用いた。以下にその手順を示す。まず培養装置 INU Series (TOKAI HIT) のセットアップを行った。コントローラー部の電源を入れ、ステージヒータ、トップヒータ、バスヒータをそれぞれ 37°C に、レンズヒータを 45°C (最大) にセットした。レンズヒータによりレンズ温度は 33.6°C になっていることを確認した。次に MQ-H₂O をチャンバーに 40~50ml 入れ、顕微鏡装置に装着した。Dish の上部に取り付ける重りを Dish が収まる位置に置きトップヒータを乗せて、水温が 37°C に安定するまで 30 分間以上静置した。

浮遊細胞である COLO 320DM 株から得られた形質転換体は接着力が弱い。そこで DM-GFP 株をコラーゲンコートした 35 mm γ -Irradiated Glass Bottom Dish (MatTec Co.) で 1 日培養し dish に細胞を接着させた。次に、クロマチン

を染色するため 1 mg/ml hoechst 33342 (Calbiochem) を終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ となるよう培養液に加え 37°C の CO₂ インキュベーターに入れ 30 分間培養した。その後、培養液のみをアスピレーターで除き、あらかじめ 37°C に温めておいた RPMI1640 を Dish の壁沿いからゆっくり加えた。この操作を 2 回行い、Hoechst 33342 を除いた。この細胞に 0.1 mM HU、もしくは 5 $\mu\text{g/ml}$ CPT を加え、培養装置へセットし、混合ガス 5% CO₂/95% Air を 250 ml/min で培養装置内に流した。レンズのピントがずれていくことを防止するためには Dish を培養装置にセットし、タイムラプス実験を開始する前に少なくとも 30 分間はインキュベートした。

タイムラプスの設定は次の方法で行った。光源にはプリセンタファイバ光源(Nikon)を用いた、この際、細胞にあたる光毒性を弱めるため光源からの励起光レベルを ND フィルターにより調節した。すなわち光源の ND を使用し 2 倍に弱め、また顕微鏡側の ND フィルターは 4 倍と 8 倍の ND フィルターを励起光路へ挿入した。一方 NIS element 解析ソフトにより画像解像度は 640×480 で 2×2 ビニング法を採用した。Hoechst 33342 は 500 ms、LacR-GFP の蛍光は 2 秒間、emerin-RFP は 4 秒間露光した。最後にタイムラプスの間隔を 30 分間に設定し、細胞の Z-series を取るための上下を決定した。本実験系では 9 枚の Z-series を 1.4 μm 間隔で取得した。またチャンバー内の水量を一定に保つため、24 時間に 1 回は MQ-H₂O を補充した。

2.5 その他の方法

MACS selection system による発現細胞の分離方法は以下の手順

で行った。pTet-Off を発現した細胞株だけを得るためには、pTet-Off と pMACS-LNGFR (Miltenyi Biotec) を 3:2 の割合でエレクトロポレーション法を用いて導入し、一過性に 2 日間発現させた。これらのプラスミド構造の模式図を図 7B、D に示した。この細胞を MACSelect System (Miltenyi Biotec) を用いて発現している細胞だけを選択した。簡単に記載すれば、LNGFR が発現し細胞膜に局在した細胞を anti-LNGFR-bead と反応させた後、磁石を近づけたカラムに流しトラップした。その後、磁石を外し、カラムから細胞を回収した。回収した細胞は新鮮培地を加え、遠心により上清を除き、ゆるやかにタッピングすることで細胞をほぐし、新鮮培地を加えさらに 1 日培養した。

Quantitative PCR 法による遺伝子量の定量; Total DNA および total RNA は TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.) により回収し、Qubit (Invitrogen) を用いてそれぞれの濃度を測定した。Total DNA は 1M HEPES を加え pH を 8.4 に調整し、1 ng を PCR に用いた。Total RNA は 1 μ g を逆転写に用いた。逆転写に用いた Primer は *BSR* 下流の 1303 bp からの 5-GAAATCAACTCCCTACACATA-3 と、 β -*Actin* 下流の 585 bp からの 5-AGGGCATACCCCTCGTAGAT-3 を特異的プライマーとして終濃度 0.25 μ M で用い、RevaTra Ace (TOYOBO) による逆転写反応を行って cDNA を得た。この cDNA を 10 倍希釈し、1 μ l を PCR に用いた。Quantitative PCR のためのプライマーは Roche ホームページ内の Universal Probelibrary により設計した。*BSR* 配列の検出のためには *BSR* 下流の 1280 bp から 5-CCACAAGGACTTACCACTTCG-3 と 1180 bp からの 5-TGCAGTTTCGAATGGACAAA-3 を、 β -*Actin* 配列の検出のためには、 β -*Actin* 下流 510 bp からの 5-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3 と 414 bp からの

5-CCAACCGCGAGAAGATGA-3 を使用した。Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) のプロトコールに従い、LightCycler (Roche) を用いて Quantitative PCR を行った。それぞれのサンプルは、 β -Actin 量で補正することで、 β -Actin 転写量あたりの BSR 転写量を算出した。

Anova4 による分散分析；第 5 章の図 31 では Anova4 による分散分析をおこなった。ある群中でそれぞれの項目について単純に t-test を繰り返すと有意な組み合わせが出る確立が増加してしまう。そこで Anova4 による分散分析では最初に要因によって分類される群が、異なる群であるか検定する。この群の中に有意差が認められた場合は Ryan' s-method 法による分散分析により多重比較を行って P value を計算した。

第 3 章 DM からの遺伝子発現

3.1 背景と目的

DM の数が減少すると細胞が脱がん化、分化する。このことは、DM からの遺伝子発現ががんの悪性形質獲得に重要な役割を担っていることをあらためて示している。上記したように、G1 の間に DM は核周辺部のヘテロクロマチン領域に局在し、DM 自身が複製される早期 S に核内部のユークロマチン領域へ移動する(Tanaka and Shimizu, 2000)。間期の核内でクロマチンはランダムに動いているが、細胞分化の進行に伴いヘテロクロマチン化が進むと、クロマチンの動きは減少していくと考えられている(Gasser, 2002)。以前、Locus Control Region (LCR) は赤血球へ分化する過程で、核の内部へ移行し、その結果シスに位置する β -globin のクラスターからの転写が活性化することを示唆している(Ragoczy *et al.*, 2006)。このようにクロマチンは細胞種、分化、転写活性に応じて異なる動態を示す。そこで、同じ遺伝情報をもつ DM が、転写活性が異なる場所で、いつ、どのように転写されているのか理解し、DM をもつがん細胞の悪性形質獲得の機構を解明することを目的とした。

3.2 結果

3.2.1 DM で増幅している *c-myc* がん遺伝子からの転写産物が、微小核内で強く検出された

c-myc 遺伝子が DM 上で増幅している COLO 320 DM 株 (図 1A) に対して、

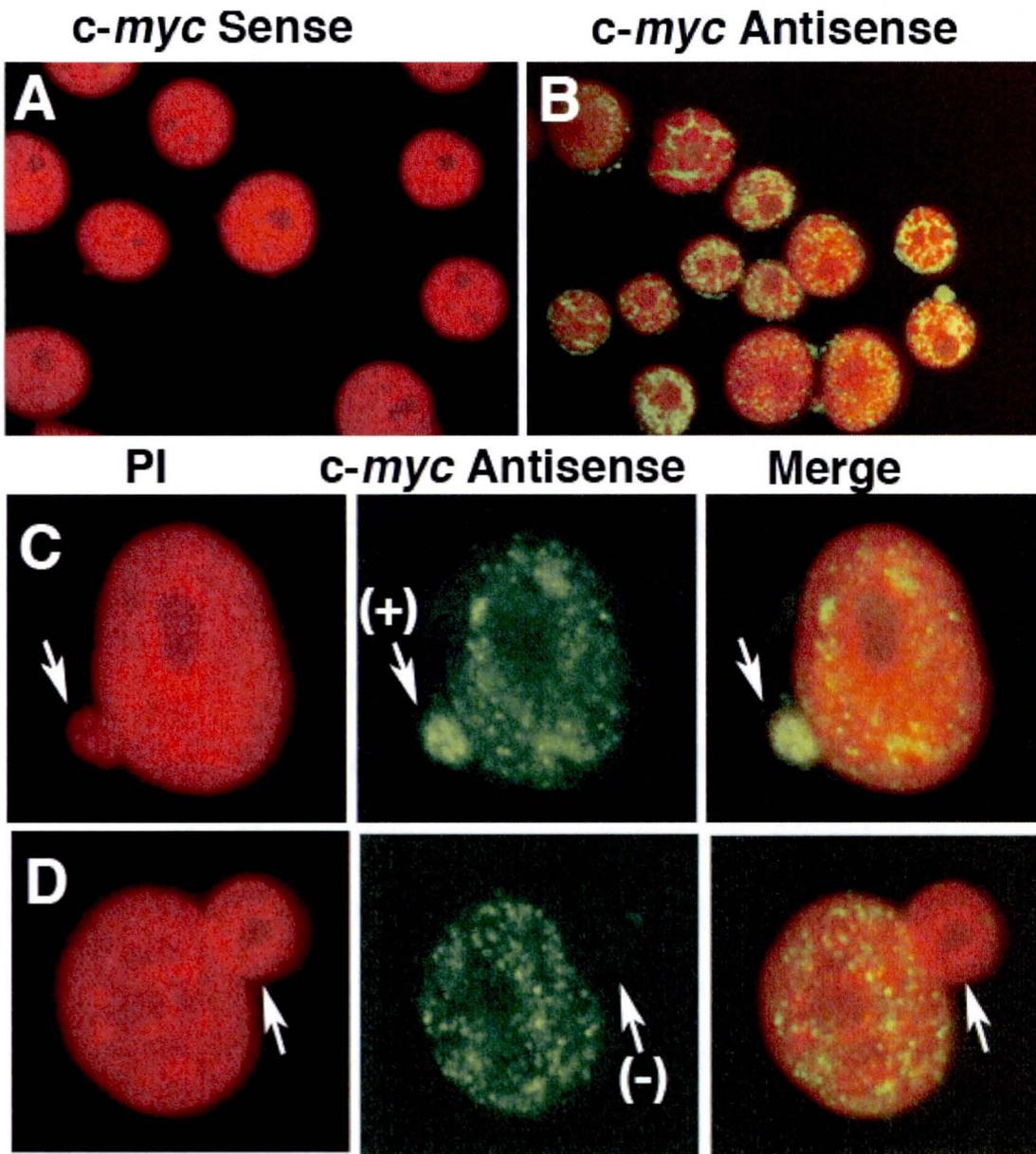


図9. 微小核内で、DMからの転写産物が、RNA FISHにより強く検出された。
(*c-myc* RNA の場合)。

(A) コントロールとして*c-myc* RNA exon3 sense probe を用いantisense 鎖を緑色に検出した。
(B) *c-myc* RNA exon 3 antisense probe を用いた RNA FISH により*c-myc* RNA を緑色蛍光で検出し、DNA をPI により赤色蛍光で検出した。(C) 矢印は*c-myc* RNA が強く検出された微小核。(D) 矢印は*c-myc* RNA が検出されない微小核。

c-myc sense RNA プローブを用いた RNA FISH 法により、DM からの転写産物である *c-myc* RNA を検出した(図 9B)。コントロールとして *c-myc* sense プローブを用いた RNA FISH を行うと、シグナルは全く検出されなかった(図 9A)。それに対し、*c-myc* antisense プローブを用いることで、*c-myc* RNA が検出された。この際、約 70%の微小核で強いシグナルが検出されたのに対し(図 9C、図 12A)、残り 30%の微小核では *c-myc* RNA は検出されなかった。

3.2.2 DM で増幅しているプラスミドからの転写産物が、DM を濃縮した微小核内で強く検出された

プラスミド配列が DM 上で増幅した clone 12 細胞株を用いて、プラスミド配列上の *Blasticidine resistance* (*BSR*) 遺伝子からの転写産物を、*BSR* antisense RNA プローブを用いた RNA FISH 法により *BSR* RNA を検出した(図 10B)。その結果、約 60%の微小核で強いシグナルが検出された(図 10C、図 12A)。一方、コントロールとして、同プローブによる RNA FISH を COLO 320DM 株について行うと一切シグナルが得られなかったことから、この方法の特異性が高いことが示された。(図 10A)。以上の結果から微小核の約 60~70%で DM からの転写産物が強く検出されるということが示唆された。

DM は微小核の中に選択的に取り込まれる。そこで、DM を取り込んだ微小核と、DM からの転写産物が検出される微小核との間の関係を検討した。そのために、RNA FISH 法で検出した *BSR* RNA のシグナル(緑色)を PFA 処理で固定し、DNA 2 本鎖を変性したのち、プラスミドプローブとハイブリダイズすることにより DM DNA を赤色で検出した。代表的な写真を図 11 に、その頻度を図 12B

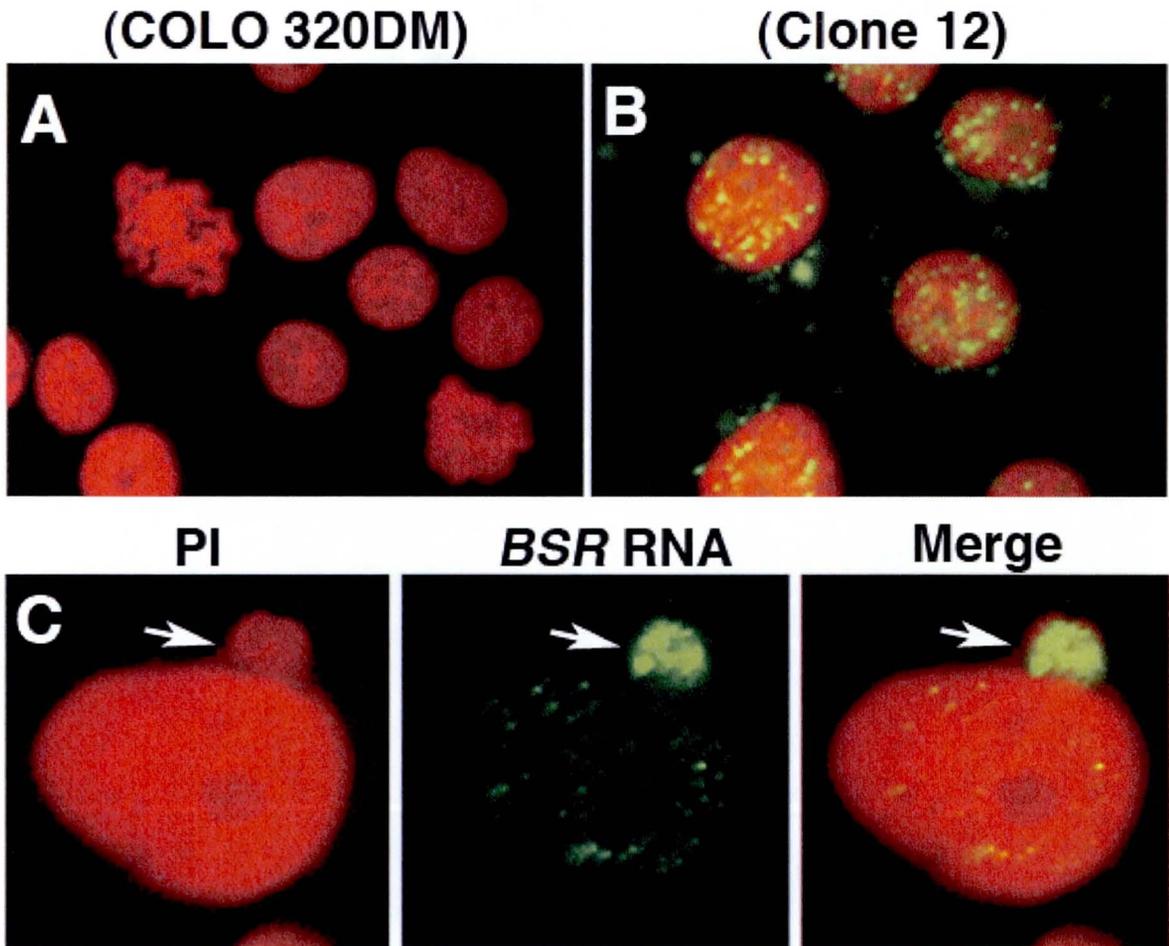


図10. 微小核内で、DMからの転写産物が、RNA FISHにより強く検出された。
 (*BSR RNA* の場合)。

(A) コントロールとして*BSR* 遺伝子を持たない親株のCOLO 320DM 株で*BSR* antisense RNA を用いてRNA FISH を行った。(B,C) clone 12 細胞株で*BSR* RNA antisense probe を用いた RNA FISH 法により*BSR* RNA を緑色蛍光で検出し、DNA をPI により赤色蛍光で検出した。(C) *BSR* DNA がDM 上で増幅したclone 12細胞株では、微小核内で*BSR* RNA が強く検出された。

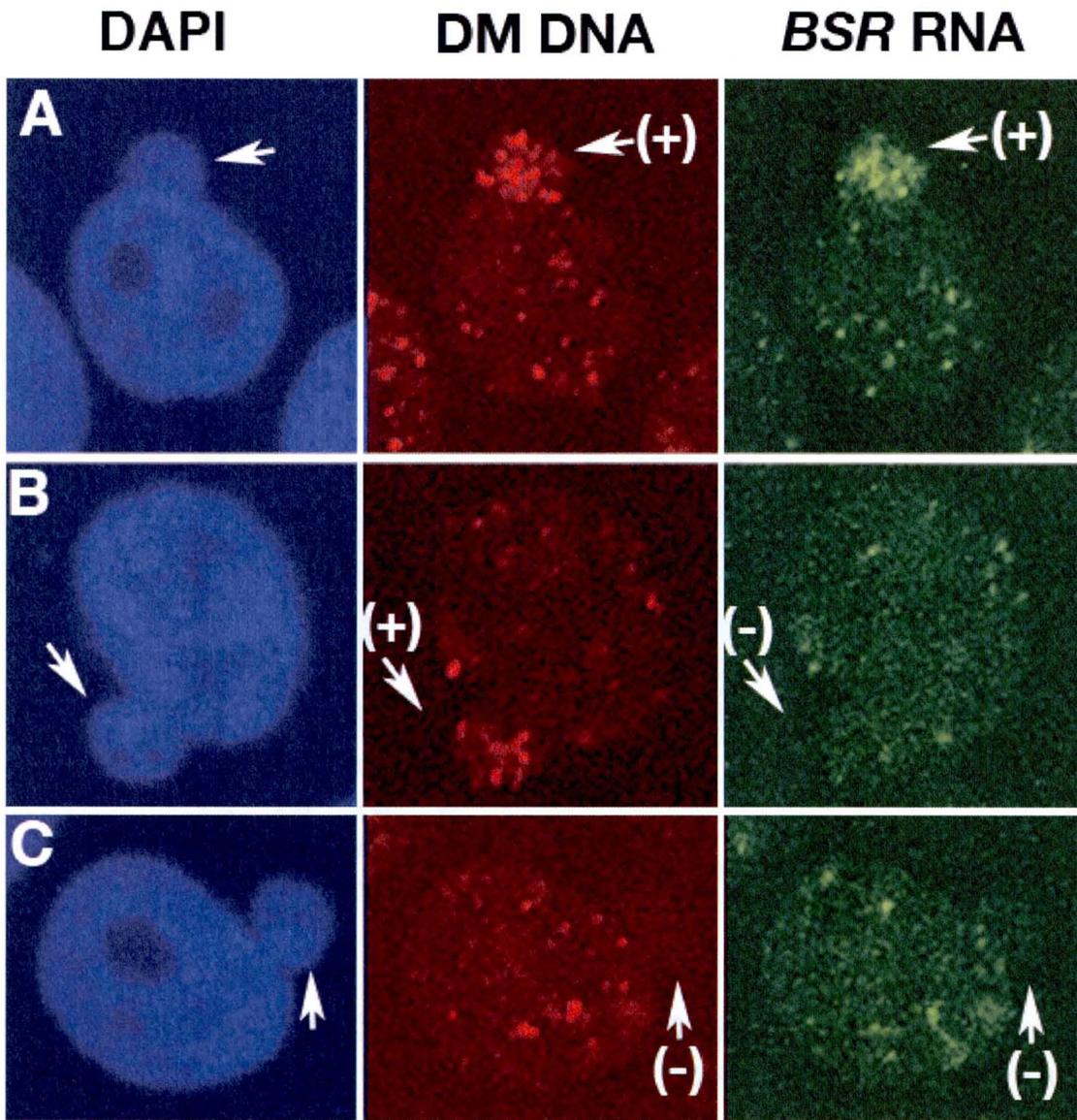


図11. DM を濃縮した微小核で、DMからの転写産物が強く検出された。

clone 12 細胞株を用いてRNA FISH 法によりBSR RNA を緑色に検出し、パラホルムアルデヒド(PFA) でシグナルをクロスリンクした。その後、DNA の変性を行い、プラスミドプローブを用いてDM DNA を赤色で検出した。(A) DM を濃縮し、転写産物が検出された微小核。(B) DM を濃縮しているが、転写産物が検出されない微小核。(C) DM も転写産物も検出されない微小核。

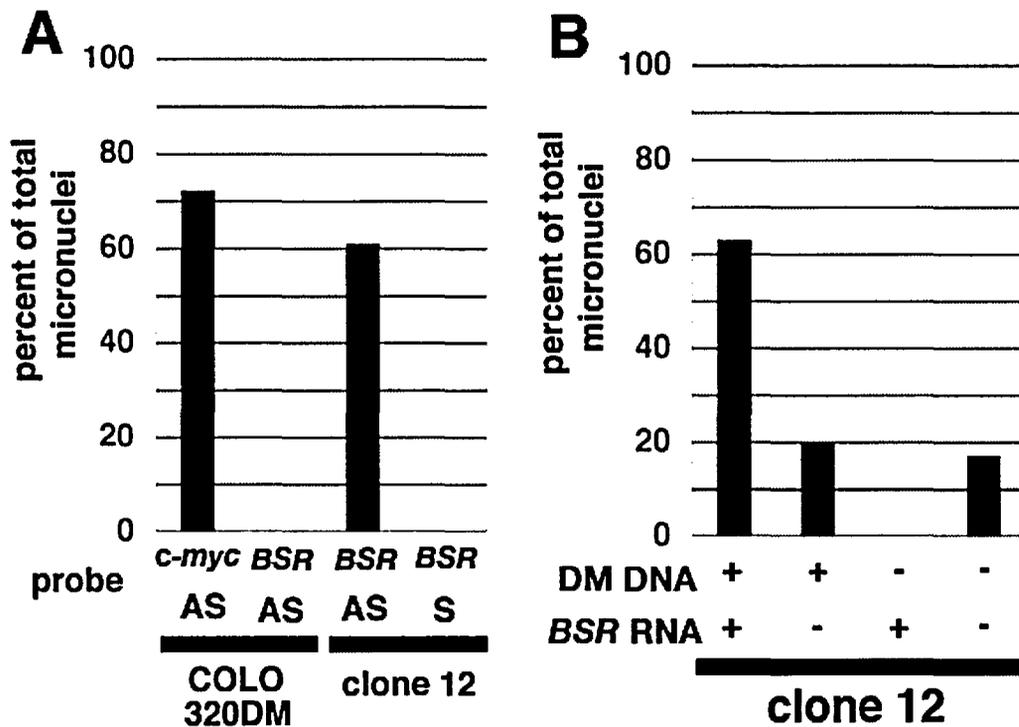


図12. 60~70%の微小核内で、DM からの転写産物が検出された

(A) 図9、と図10 実験において、それぞれ150 個以上の微小核についてDM からの転写産物が検出される頻度を求めた。(B) 図11 の実験において200 個以上の微小核についてDNA のシグナルとRNA のシグナルの有無を計測し、頻度を求めた。

に示す。その結果、DM を濃縮した微小核において、その約 80%で BSR RNA が検出された。そのシグナル強度は、少なくとも核内と同レベル以上であった。しかし、残り 20%については、DM の DNA が濃縮されているにもかかわらず、その転写産物は検出されなかった。一方、DM を濃縮していない微小核は、全微小核の約 20%存在していた。そのような微小核は、染色体断片や、紡垂糸が付着しなかった染色体を含むはずである。このような微小核では、予想通り、BSR RNA は全く検出されなかった。

3.2.3 微小核内では *de novo* の転写が生じている

3.2.1~2 で、DM を濃縮した微小核内に、その転写産物が強く検出されることを見いだした。このことは、微小核内で新規転写がおきていると考えることもできるが、核内の DM から転写された RNA が微小核特異的に蓄積した可能性も否定できない。そこで、BrU のパルス処理により新規に合成された RNA のみを標識し、それを特異抗体により検出した。この際、DM の DNA の検出には、DM を LacR-GFP により可視化した DM-GFP 細胞株を用いた。代表的な写真、および、それぞれの頻度を図 13 に示した。その結果、DM を濃縮した微小核の約 80%において BrU の取り込みが検出された。この値は、DM を濃縮した微小核の約 80%にその転写産物が検出されるという上記の結果とよく一致する。したがって、DM を濃縮した微小核の多くは核内と同程度以上の転写活性をもつことが示唆された。しかし、同様に DM を濃縮した微小核であっても、その約 20%は新規転写が検出されなかった。この点は、後の実験で検討した。一方、DM を持

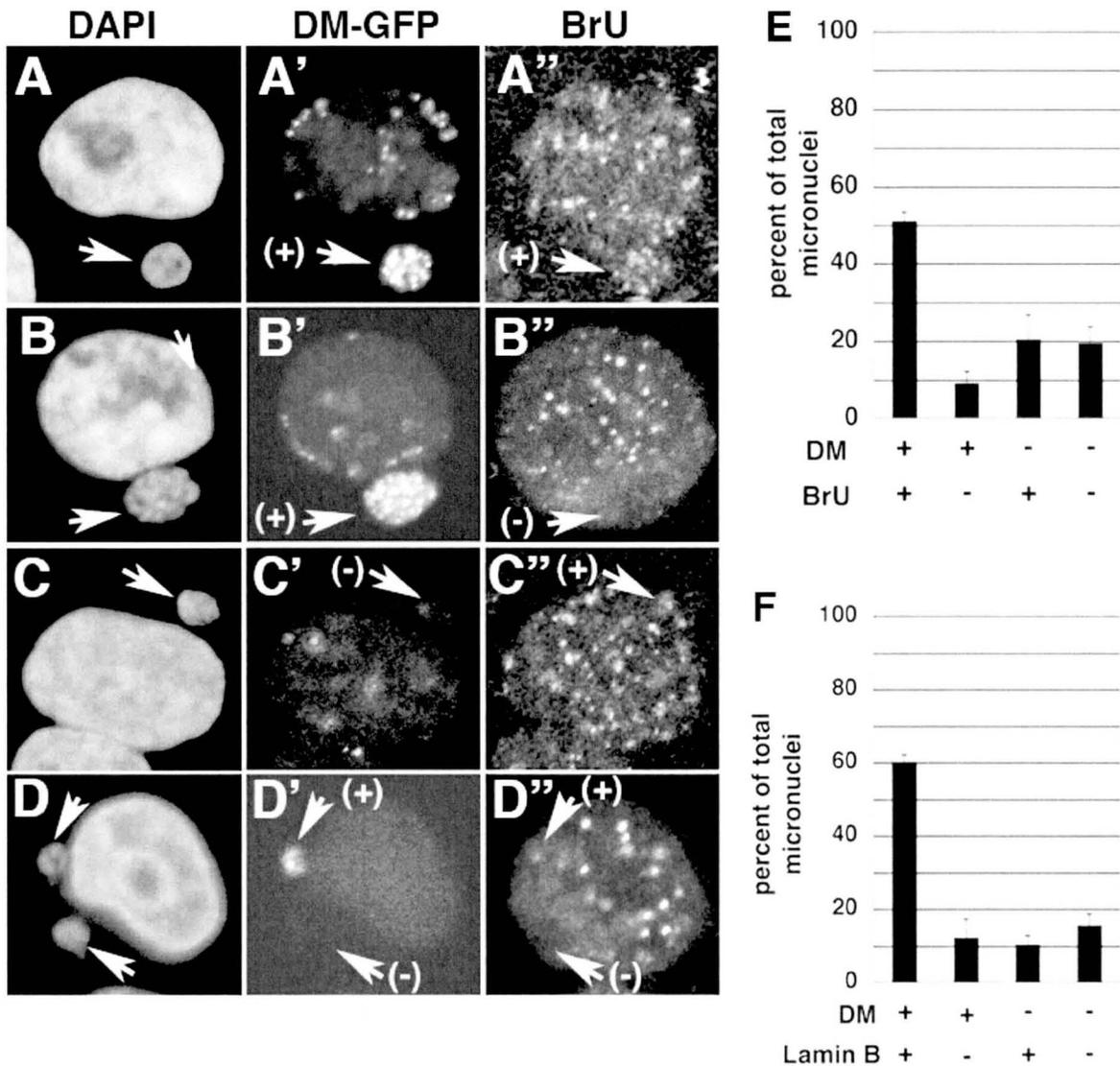


図13. DM からなる微小核の約85%で新規RNA 合成が検出されたのに対し、その他の微小核では有意に低頻度であった。

DM-GFP 細胞株を、BrU で5分間処理し *de novo* に合成されたRNA を標識した。細胞を固定した後、BrUを間接蛍光抗体により赤色で検出した。またlacR-GFP で可視化されたDMを緑色で検出した。(A) DM からなる微小核にはRNA 合成が検出されないもの、(B) RNA 合成が検出されたものがあった。一方(C) DM をもたない微小核にも、BrU 取り込みが検出されないもの、(D)検出されたものがあった。(E) DM のシグナルとBrU のシグナルの有無をそれぞれ100個以上の微小核について3回(300個以上)計測し頻度と標準偏差を求めた。

(F) DM-GFP 細胞株を用いて、微小核がlamin B に覆われる頻度を80個以上の微小核について3回(240個以上)計測し、頻度と標準偏差を求めた。微小核がLamin B に覆われる頻度は、転写活性型微小核の頻度と、よく相関していた。

たない微小核では、転写が生じている割合は約 50%であり、DM を濃縮した微小核に比べて有意に低かった。この意味は、現時点では明確ではないが、後に考察する。

3.2.4 微小核内での転写は Lamin B に覆われることが必要である

上記したように、DM を濃縮している微小核の約 20%と、DM を含まない微小核の約半数では転写が検出されなかった。一方、以前の当研究室での研究から、一部の微小核は Lamin B に覆われずに細胞質に存在することが示されていた(Tanaka and Shimizu, 2000)。そこで、対数増殖期の DM-GFP 細胞株を用い、DM と Lamin B を同時に検出して検討した。その結果、図 13F に示すように、DM を濃縮した微小核のうち約 85%が Lamin B に覆われており、15%が覆われていなかった。前者の値は先ほどの新規 RNA 合成の頻度、および、DM からの転写産物が検出される頻度と良く一致していた。

そこで Lamin B が微小核内での転写に関わっている可能性について、新規 RNA 合成と Lamin B を同時に検出することで検討した。その結果、図 14 に示すように、Lamin B に覆われていない微小核では転写は検出されなかった。ゆえに、微小核内での転写には Lamin B で覆われることが必要であることが示唆された。しかし、Lamin B に覆われていても、新規転写が見られない微小核も約 30%見られたため (図 14B)、Lamin B に覆われることは微小核内での転写にとって必要条件ではあっても十分条件ではないことが示された。

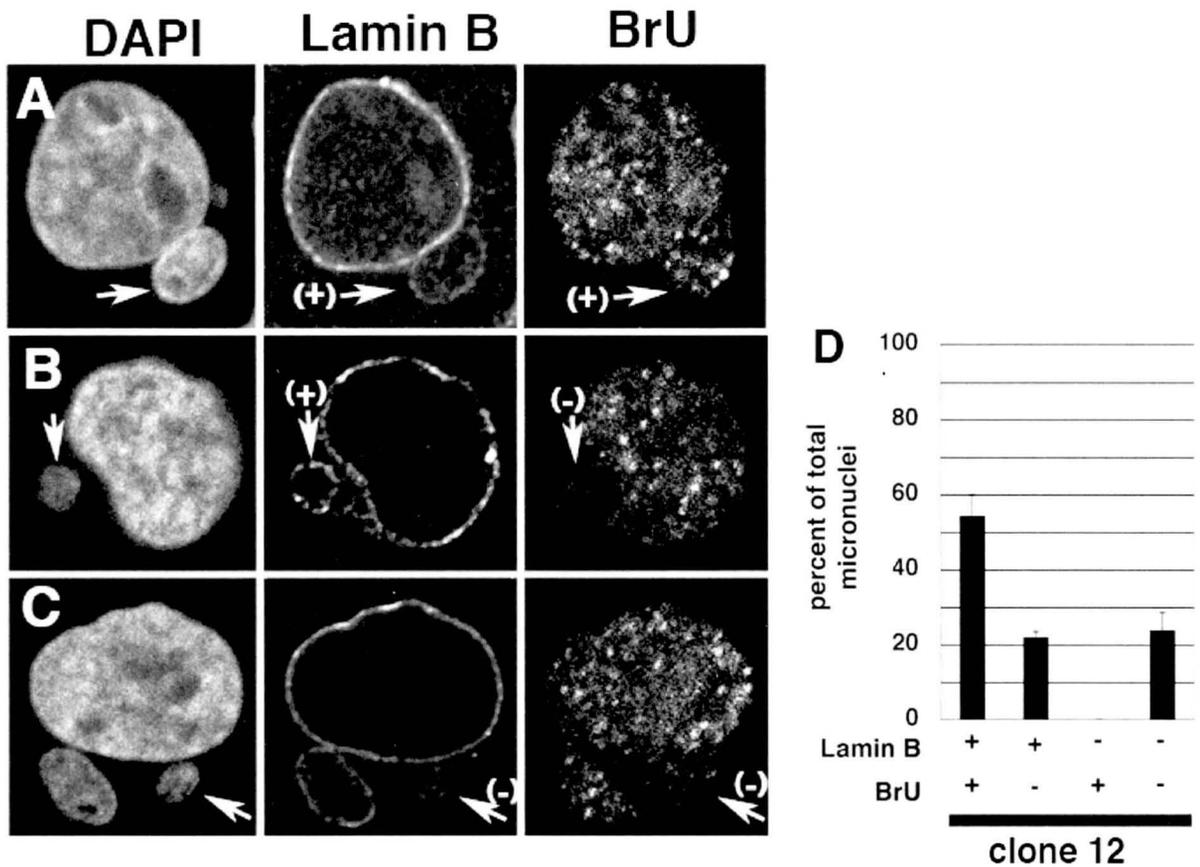


図14. Lamin B に覆われることは、微小核内での転写に、必要条件であるが十分条件ではない。

clone 12 細胞株についてLamin B を赤色に、*de novo* RNA 合成を緑色で 間接蛍光抗体法により検出した。DNA はDAPI により青色に対比染色した。(A) Lamin B があり、BrU が検出された微小核。(B) Lamin B があるがBrU が検出されない微小核。(C) lamin B も BrU も検出されない微小核。(E) Lamin B とBrU それぞれの有無を80個以上の微小核について3回(240個以上)計測し標準偏差を求めた。

3.2.5 微小核内で転写された RNA は細胞質へ移動する

以上のように約 8 割の微小核で増幅した遺伝子からの転写が活発に行われていることが示唆された。しかしそれらの転写産物が翻訳されるため細胞質へ輸送されるかどうかは定かではない。そこで、新規 RNA を標識した細胞を新鮮培地へリリースすることで、新規 RNA の動態を検討した。すなわち、BrU のパルス標識後すぐに (図 15A)、または 30 分間新鮮培地にリリースした後 (図 15B)、細胞を回収して固定し、BrU を特異抗体で検出した。前者では核質に点在する RNA が観察されるが、これは RNA polymerase II の転写を反映すると思われる。一方、後者では核質の BrU シグナルはほとんど見られなくなり、核小体のみ強くシグナルが見られるようになった。これは RNA polymerase II により合成された RNA は細胞質へ輸送されたこと、そして RNA polymerase I により核質で転写された 5S リボソーム RNA が核小体へ移行したことを反映していると考えられた。一方、図 15C では、BrU 標識後新鮮培地へリリースし、時間経過を追って固定した細胞について微小核内の BrU シグナルと Lamin B を同時に検出し、それぞれの有無について頻度を計測した。その結果 Lamin B に覆われた微小核では BrU シグナルを持つものが BrU 標識直後には 60% あったのが、それは新鮮培地中でのチェースにともない徐々に減少し、45 分後には 20% まで減少した。この際、Lamin B を持たない微小核はもともと転写が起きていないので変化はない。図 15D には、30 分チェースした細胞の例を示すが、核内の BrU シグナルは核小体に残るのみになっているのに対し、Lamin B で覆われた微小核内には BrU シグナルは消失している。以上のことから、微小核内で転写された RNA は、核内で転写された RNA と同様に、細胞質に移動することが示唆された。

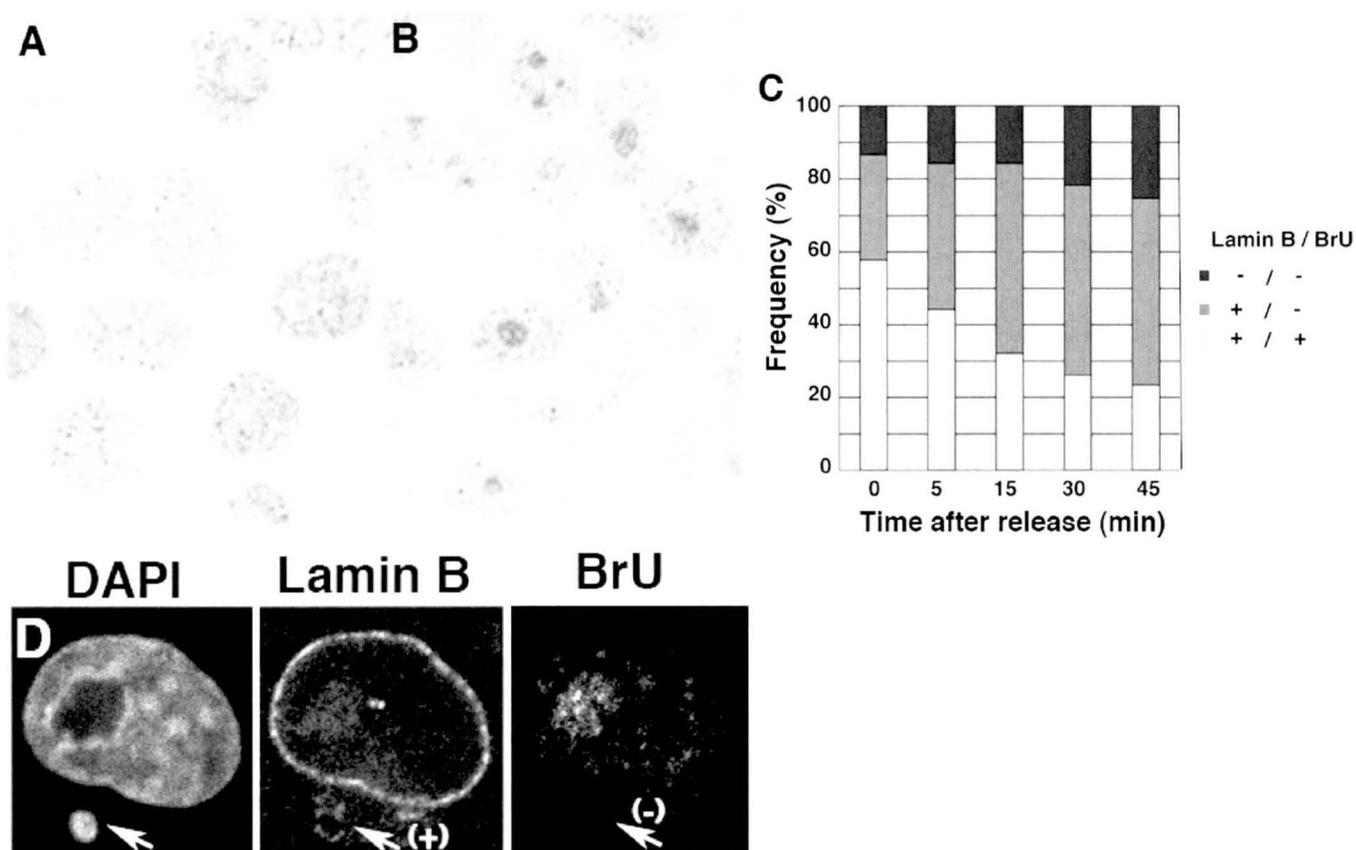


図15. 微小核で*de novo* に転写されたRNA は細胞質へ移行する。

対数増殖期のCOLO 320DM 細胞株について、BrU のpulse label を行い新鮮培地へリリースした。その後時間経過を追って細胞を固定し、BrU を間接蛍光抗体法により検出した。(A) BrU label 後すぐに固定した細胞。核質へ点在したシグナルが観察される。(B)新鮮培地リリース後30分に固定した細胞。新規転写産物は細胞質へ輸送されるか核小体へ移動した。(C) リリース後時間経過を追って固定した後、BrU とlamin B を同時に検出しそれぞれの局在について微小核を100個以上計測した。Lamin B が検出された微小核では徐々にBrUが検出されるものが少なくなってくる。これは微小核で新規に転写されたRNAが細胞質へ輸送されていることを示唆している。(D) 新鮮培地へ30分リリースしたときの写真を示す。DNA はDAPI で対比染色した。

3.2.6 Lamin B のない微小核では DM からの転写産物がない

3.2.4~5 で、Lamin B が局在しない微小核では新規 RNA 合成が起こらないことが示唆された。そこで COLO 320DM 株で *c-myc* RNA と Lamin B を、また、clone12 株で *BSR* RNA と Lamin B を同時に検出した(図 16)。その結果、Lamin B に覆われた微小核は RNA が検出されたが(図 16A, C)、Lamin B が局在していない微小核では転写産物は検出されなかった(図 16B, D)。Clone12 細胞についてその頻度を計測し、図 16E に示した。その結果、転写産物が RNA FISH により検出される微小核は Lamin B で覆われていることが必要であるが、Lamin B で覆われていても転写産物が検出されない微小核もあった。このことは、BrU により新規転写を検討した図 12 (3.2.4 節)の結果と定量的にもよく符合する。

3.2.7 DM とその転写産物の生細胞可視化技術による解析

DM と、そこからの転写産物を生細胞内で検出するために、図 6 に概略した方法で細胞株を樹立した。すなわち、IR/MAR 遺伝子増幅法を用いて pECMS2 β プラスミド配列を DM 上で増幅させた。このプラスミドは LacO repeat 配列を持ちそれが LacR-CFP 融合蛋白質と結合するため DM がシアン色に可視化される。さらにこのプラスミドは、TRE promoter の支配下に MS2 repeat 配列をもつ RNA が発現し、それが MS2-YFP の結合により可視化される。このような細胞から分裂期染色体標本を作成し、DNA FISH 法により IR/MAR プラスミド配列を赤色に、pECMS2 β プラスミド配列を緑色にそれぞれ検出し、それらが DM 上で増幅していることを確認した(図 17A)。また、そのような DM が微小核へ取り込まれることも確認した(図 17B)。このような細胞を DM-CFP 細胞と呼ぶ。

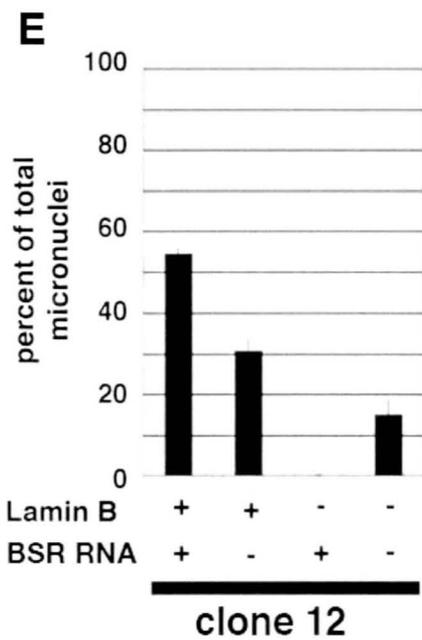
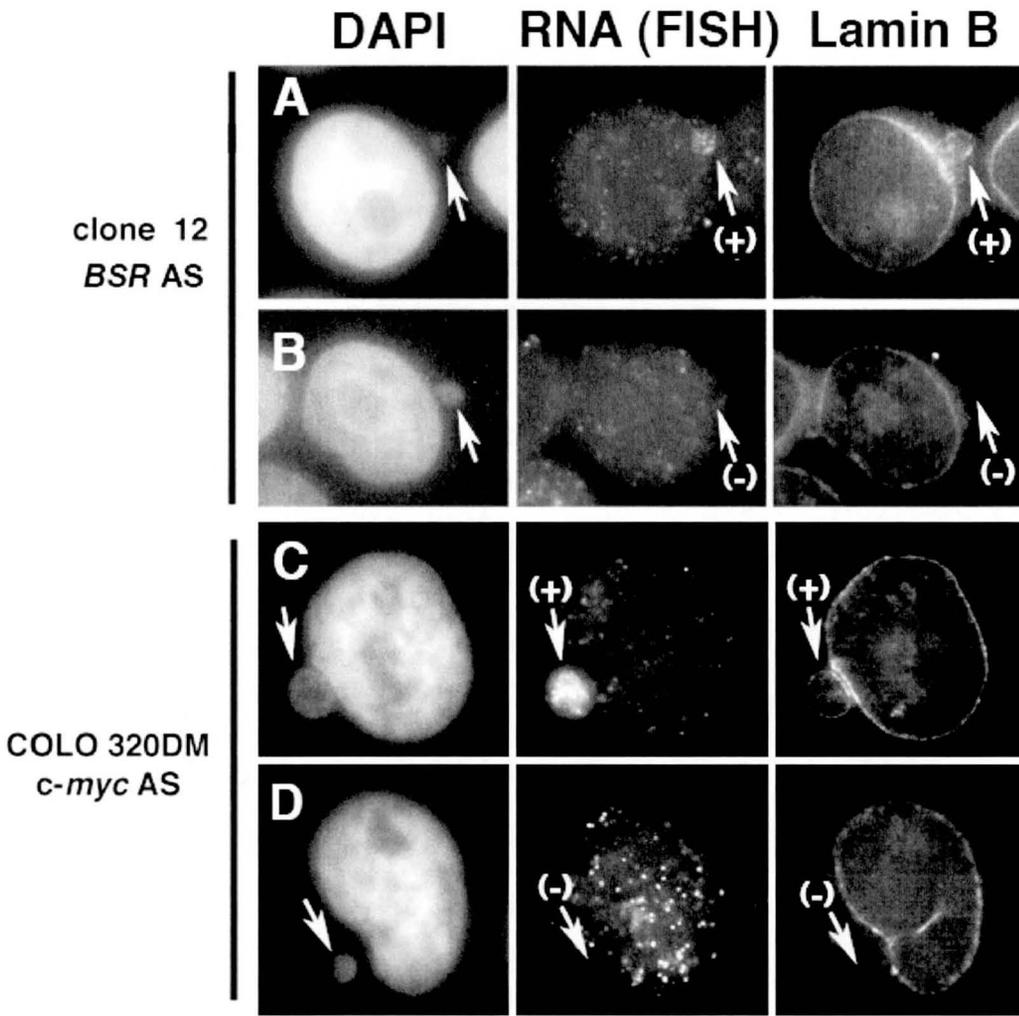


図16. *BSR* RNA または*c-myc* RNA が発現している微小核はLamin B に覆われている。

(A,B) clone12 細胞株を用いて *BSR* RNA を *BSR* antisense probe により、lamin B を間接蛍光抗体法により検出した。(C,D) COLO 320DM 細胞株を用いて *c-myc* exon3 antisense probe により検出した。DNA はDAPI で対比染色した。矢印は微小核を示す。(E) clone12 株でそれぞれのパターンごとに50個の微小核を3回計測し標準偏差を求めた。

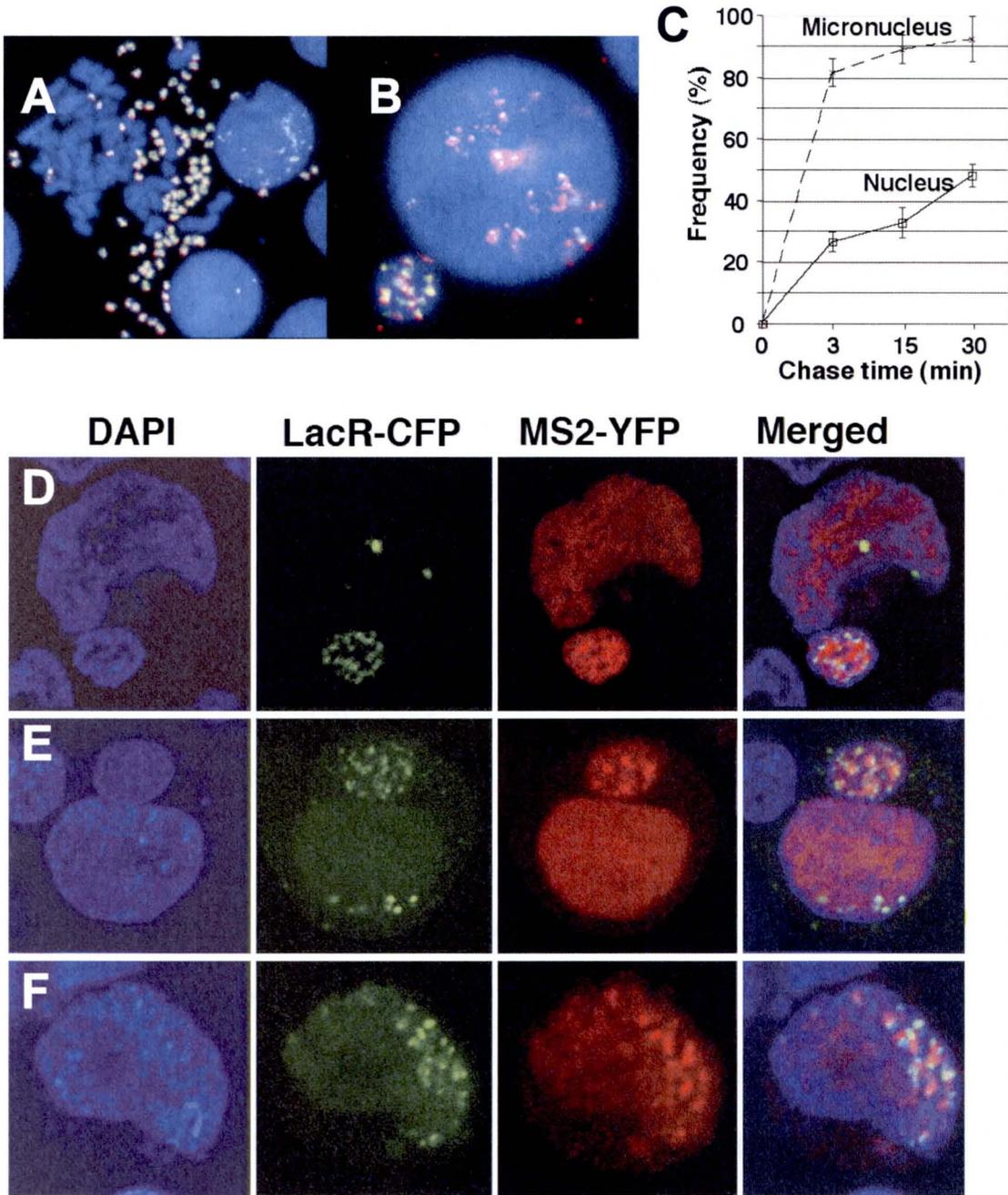


図17. DMからの転写誘導率は核内では誘導時間に比例して増加した。一方、微小核では誘導後すぐに転写が生じた。

図6の手順に従ってDM-CFP 細胞株を得た。(A,B) DM-CFP 株の分裂期染色体標本を作成し、pECMS2 β プラスミドDNA を鋳型にDIG label したプローブ、およびDHFR ori を鋳型にbiotin label したプローブを用い、DNA FISH 法によりそれぞれ緑色と赤色に検出した。その後DAPI で対比染色を行った。(B) 写真の左下に微小核へ濃縮されたDMがみられる。(C) 図6の手順でDM-CFP 株の転写をpTet-On により誘導した。転写誘導後、時間経過を追って細胞を固定し、微小核内と核内での発現の有無を50 個以上3 回計測した。(D,E) は微小核内で、(F) は核内で発現している代表的写真を示す。

対数増殖期の DM-CFP 細胞に MS2-YFP タンパク質と rtTA タンパク質を発現するプラスミドをエレクトロポレーション法で導入し、2.5 時間後に Dox を加えることにより TRE promoter からの転写を誘導すると、MS2-YFP が転写産物に結合し、RNA が可視化された。そのような細胞を固定して、転写の頻度を計測した。その結果、Dox による誘導 3 分後には、約 80% の微小核で DM からの転写産物が検出され、それは 30 分後には 100% 近くに達した。代表的な写真を図 17D-F に示した。微小核内には通常、数個から数十個の DM が観察される。しかし、MS2-YFP のシグナルはそのうちの数個の DM と重なるのみであった。このことは、高い転写活性を示す DM は微小核内の一部の DM であることを示唆している。一方、核内では転写誘導後 30 分たっても 50% 程度の DM でしか MS2-YFP シグナル と重ならなかった。このことは考察で議論する。

3.2.8 Lamin B が局在していない微小核では、核局在化シグナルを持つ蛋白質が局在しない

Lamin B の局在していない微小核で転写が見られないことは、転写に必要な蛋白質が正常に局在していないことが原因である可能性が大きい。すなわち、核局在化シグナルを持った核蛋白質が、正常なラミナ構造を持っていない微小核には局在しない可能性が高い。そこでこの点を検討するために、核局在化シグナルを持つ MS2-YFP 蛋白質を発現するプラスミドをエレクトロポレーション法で導入し、2.5 時間後に固定して Lamin B 蛋白質を蛍光抗体法で検出し、検討した。その代表的な写真を図 18 に示す。その結果、MS2-YFP 蛋白質は、Lamin B が局在している微小核には局在するが、Lamin B のない微小核に

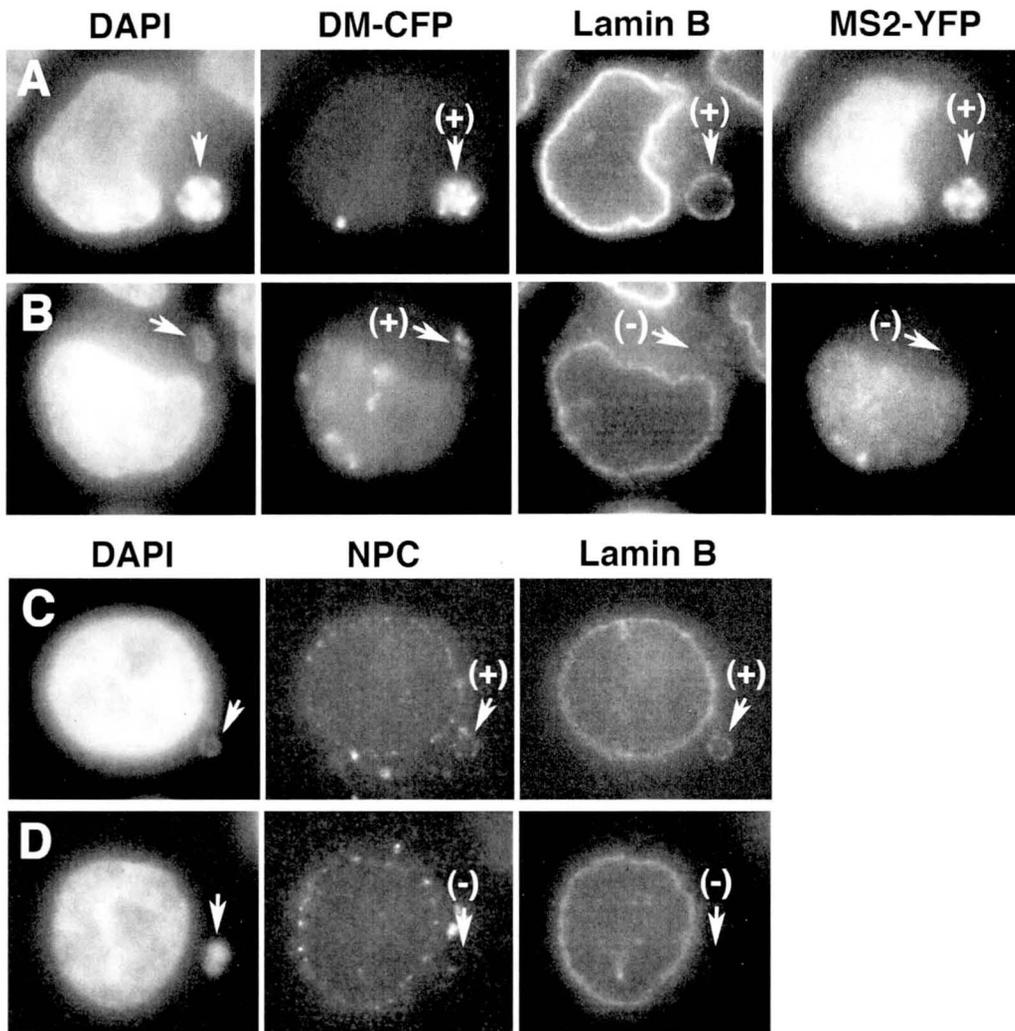


図18. Lamin B に覆われていない微小核はNuclear Pore Complex も局在しておらず、核局在シグナルを持つMS2-YFP タンパク質が局在しなかった。

(A,B) 図6の手順に従ってDM-CPP 細胞株にMS2-YFP 蛋白質を発現させた。 Nuclear Localization signal (NLS) をもつMS2-YFP 蛋白質はNuclear Pore Complex (NPC) を介して核に輸送される。この細胞をPFA 固定し、Lamin B に対する間接蛍光抗体法により検出した。(A) Lamin B に覆われた微小核はMS2-YFP が局在し、転写も誘導されている。(B) lamin B が ない微小核ではMS2-YFP の取り込み自体が見られない。左から順に、DAPI、Lamin B、MS2-YFP、lacR-CFP (C) Lamin B とNPC を間接蛍光抗体法により同時に検出した。(C) Lamin B に覆われNPC の局在もある微小核。(D) Lamin B もNPC も局在していない微小核。以上のことからLamin B の局在しない微小核はNPCも局在しないため、細胞質と微小核間での輸送が行われていないことが示唆された。

は局在しないことが示された (図 18A, B)。すなわち、Lamin B 蛋白質が正常に局在していない微小核には、核移行シグナルを持つ蛋白質が局在できないことが示唆された。

Lamin B の局在がない微小核は細胞質-核輸送ができない可能性を検討するために、特異的抗体により Nuclear Pore Complex (NPC) と Lamin B を同時に検出した。その結果 Lamin B のない微小核では NPC の局在も見られなかった (図 17C, D)。このことから Lamin B のない微小核は NPC が局在しないため、核-細胞質間の輸送が行われず、核として不完全な状態であることが示唆された。このような微小核については後に議論する。

3.2.9 核内に局在する DM は少し核内部へ入った領域で転写していた

核内の様々な場所に局在する DM からの転写を検討した。そのために、DM 上の *BSR* 遺伝子からの転写産物を RNA FISH 法により非変性条件下で検出し、RNA のシグナルを PFA 処理でクロスリンクした後、DNA を変性して DNA FISH 法を行うことにより、RNA と DNA を同時に検出した。その結果の代表例を図 19 に示した。図中に見られるように、RNA と DNA の局在が一致することは稀であった。転写後の RNA は拡散によって核内の ICD (Inter-Chromatin Domain) と呼ばれるクロマチン密度の低い場所へ蓄積していた。このことは図 17D~F の結果と良く一致していた。

さらに、核内の位置と発現との関係を検討するために、共焦点顕微鏡により核内の DM と *BSR* RNA のシグナルが一致する場所について詳細な検討を行った。すなわち、RNA/DNA 同時 FISH を行った後、Z 軸方向への連続断層像を取

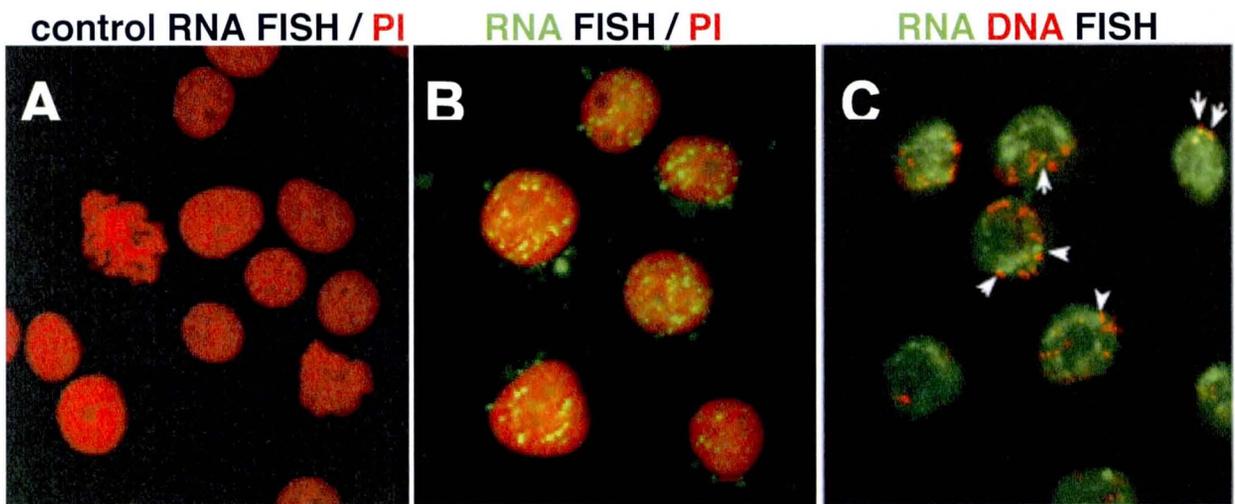
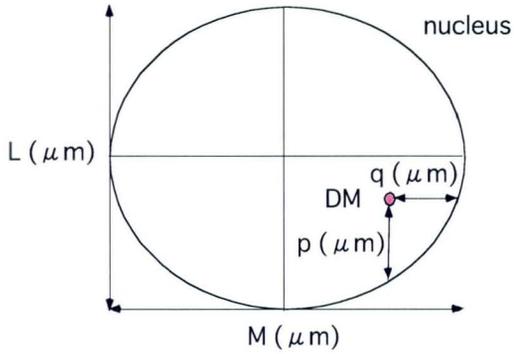


図19. 核内のDMからの転写産物は核質に拡散しており、DMとRNA が重なることは稀であったため、転写部位を特定することは困難であった。

(A) COLO 320DM 細胞株についてBSR RNA を検出したコントロール。(B) BSR antisense probe を用いたRNA FISH 法によりBSR RNA を緑色に検出し、DNA をPI で赤色に対比染色した。(C) B と同様にBSR RNA を緑色に検出した後、シグナルをクロスリンクし、プラスミドプローブを用いたDNA FISH 法によりDM DNA を赤色に検出した。矢印はDM DNA とBSR RNA が重なった部位を示す。矢頭はDM とBSR RNA が重ならなかった部位を示す。

A 共焦点顕微鏡でstackを取得し、
直径が最長のZ seriesとその上下の写真を使う



p を $L/2$ に対する相対値に変換しy座標にプロット
q を $M/2$ に対する相対値に変換しx座標にプロット

B

	直径 (μm)	BS RNA (+)	DM (個)
cell-1	12.12	1	12
cell-2	15.60	2	22
cell-3	10.60	7	11
cell-4	13.34	0	26
cell-5	11.05	9	13
cell-6	13.00	1	36
cell-7	10.80	3	5
cell-8	11.08	2	28
cell-9	13.73	2	43
cell-10	13.38	1	7
平均	12.47	2.8	20.3

C 203 DMs in 10 cells

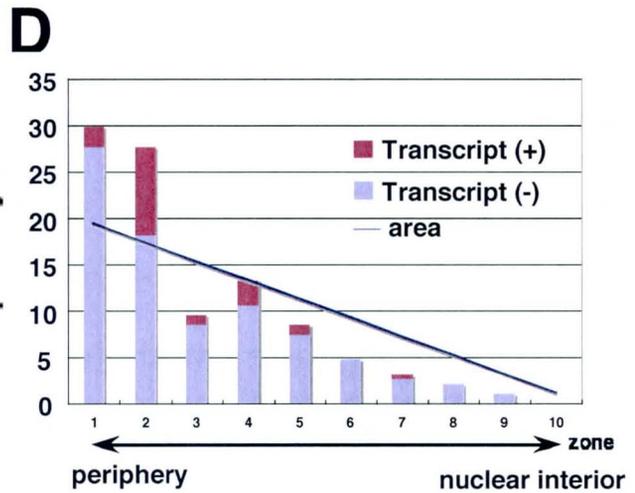
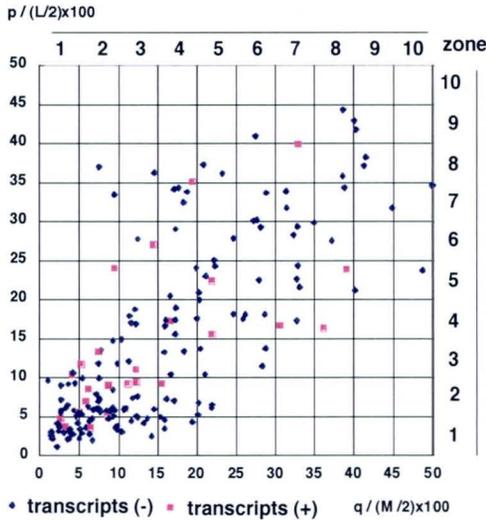


図20. 核内のDM は、最周辺部よりも0.6~1.2 μm 内部で、転写が最も活発であった。

clone12 株を用いてRNA /DNA 同時FISH 法でBSR RNA とDM DNA を検出した。共焦点顕微鏡によりz-series を取得し (A)に図示した方法でDM の核内での位置を相対的に数値化した。(B) は用いた細胞核の最長直径、RNA とDNA が共局在したDMの数、および全DM の数、を示した。(C) B で対象とした10ヶの細胞の計203個のDM について、(A) の方法で核内の位置を決定し、それをプロットした。(D) C でプロットしたDM を核周辺部から核内部へ至る10の領域に分けグラフ化した。斜めの直線は、各領域面積の理論値を示す。

得し、最も直径が長くなる断層像について、DM の位置を核周辺部から中心に至る10の領域に分類し、どの領域で転写産物と重なっているかを検討した(図20A)。具体的には、10個の細胞の203個のDM について、核の直径、DM の数、およびBSR RNA と重なったDM の数を決定した(図20B)。それらについて、核周辺部からの距離により分割した10の領域に、転写産物の有無でプロットした(図20C)。これらを各領域で計測すると、Zone2 に相当する核周辺部から0.6~1.2 μm 内部へ入ったDM が転写産物と重なる割合が高いことが示唆された(図20D)。

3.3 考察

本研究では、微小核に取り込まれたDM から転写が生じていること、および、Lamin B に覆われることが微小核内での転写に必要不可欠であることを3種類の方法により示した(Utani *et al.*, 2007)。1つはFISH 法によるDM からの転写産物を検出する方法、2つめは*de novo* RNA を検出する方法であり、そして3つめは生細胞でDM とその転写産物を可視化する方法である。また、微小核内で*de novo* に合成されたRNA は核内と同様、細胞質へ輸送されるであろうことを示した。しかし、Lamin B に覆われていない微小核ではNPC が局在せず、核局在化シグナルを持つ蛋白質が局在しないために、その中で転写が生じなかった。すなわち、DM が濃縮した微小核はLamin B に覆われている場合でのみDM からの転写が起きることから、微小核内での転写はLamin B に依存して生じることが示唆された。このことはlamin B の無い微小核はNPC と核局在蛋白質の局在がみられないという結果とつじつまがあっていた。一方、以前私が所属する研究室では、G1期にはlamin B で覆われていない微小核が多数存在し、それが、S

期での lamin B の新規合成と再編成により lamin B に覆われるようになることを示唆した。このことと、今回の微小核内での遺伝子発現が lamin B に依存するという発見をあわせると、微小核内での遺伝子発現は S 期以降の細胞で高まると思われる。背景欄で記したように、*c-myc* 等の DM で増幅しているがん遺伝子はがん細胞の形質に深刻な影響を与えている。一方、*c-myc* がん遺伝子からの転写は正常細胞では細胞周期を通じて変化しないことが報告されている (Thompson *et al.*, 1985)。それに対し、COLO 320 細胞のようながん細胞では、*c-myc* 遺伝子が増幅した結果、*c-myc* タンパク質産物が過剰に生産され、その悪性転換に関与する。さらに本研究の結果、DM 上で増幅した *c-myc* がん遺伝子からの遺伝子発現が、正常細胞とは異なり、特定の細胞周期に高まることが示唆された。このことは癌の悪性化に重要な影響を及ぼす可能性がある。

DM を濃縮した微小核は染色体断片を含む微小核と比べ、Lamin B に覆われる割合が高く、そのため転写が生じる割合が高いことが示唆された。このような違いが生じる原因の解明は今後の課題である。しかしながら、この結果は DM を濃縮した微小核からの転写は、染色体断片からなる微小核よりも細胞形質により大きな影響を与える可能性があることを示唆している。

本研究ではゲノム由来の自律複製する環状分子である DM に関して、その細胞内局在が遺伝子発現に与える影響に関して検討した。このような細胞内局在は、セントロメアを持たない DM が、分裂期に独特な分配様式で娘細胞に分配される結果として生じる。一方、背景欄で記したように、多くのウイルス性核内プラスミドも、分裂期染色体に付着することにより同様に分配される。したがって、このようなウイルス性核内プラスミドも DM と同様に微小核に取り込

まれる可能性がある。そのため、本研究で得られた結果は、このような染色体外遺伝因子にも適用できる可能性がある。

第4章 微小核に取り込まれたDMの 排出機構

4.1 背景と目的

微小核に取り込まれた遺伝物質は、一般的に細胞内から消失することが知られている。たとえば、哺乳動物細胞では高齢期女性に見られるターナー症候群では不活性化 X 染色体等が高頻度に微小核に取り込まれ、消失することが知られている(Tucker *et al.*, 1996) (Hando *et al.*, 1997)。また人工的な遺伝子導入に用いた DNA の多くも細胞から消失すると考えられている。しかし、重要な遺伝情報が細胞から失われるという事実にもかかわらず、どのように消失するか、その機構は全く不明である。以前、私が所属する研究室では、DM を選択的に取り込んだ微小核が、核膜と細胞質膜に覆われた状態で細胞外に存在していること、その中の DNA は分解されていないことを見だし、微小核が細胞質膜のブレッピングにより細胞外に放出される機構が存在することを示唆した(Shimizu *et al.*, 2000)。しかし、微小核内容物がどのように排出されるのか、その機構の解明には、生きている細胞の中で特定の遺伝物質を長時間追跡する、ということが必要であり、さらにそのような追跡は時間・空間的に高い解像度で行う必要があるため、高度な実験技術と装置が必要とされる。

以前、私が所属する研究室の亀崎は、間期核内にマイクロインジェクション法を用いて様々な DNA を導入し、その細胞内動態を長時間にわたって観察した(Shimizu *et al.*, 2005a)。その結果、核内に導入した蛍光標識した DNA 分子

は鎖長が長いほど核内の動きは少ないこと、長い DNA は核内で拡散することなく逆に凝集することが示唆された。これは核内の DNA 結合タンパク質が速やかに DNA 分子を凝集させる機構があることを示唆していた。さらに、凝集した DNA は分裂期経過後には細胞質側で観察された。これは DM が微小核を形成する機構と類似している。また驚いたことに、核内で凝集した DNA 分子は、核内部から細胞質へ直接移動する場合は観察された。このような出芽様構造を介した微小核形成機構は以前から示唆されていたが、その過程を捕らえたのはこれが最初である。その後、核から細胞質へ移動した DNA 分子は細胞質膜近くで動きまわるうちに細胞から消失した。ゆえに、細胞は導入した遺伝子を選択的に排出する機構を備えていることを示唆していた。しかしこのような DNA 分子は非常に検出が困難であること、蛍光標識することの影響を除くことができないこと等の問題点が残されていた。一方清水らは以前、核内の DM が間期核の出芽様構造を介して細胞質に移動し、DM を濃縮した微小核を形成することを固定細胞を用いた FISH 法で示唆した(Shimizu *et al.*, 1998)。さらに、Haaf らは、DNA 傷害に伴い、修復蛋白質である Rad51 が結合したクロマチンが間期核から細胞質へ移動することを、やはり固定細胞を用いて示唆した(Haaf *et al.*, 1999)。これら報告はいずれも、異常クロマチンが間期核から細胞質に移動して廃棄の対象となること示唆している。しかし、いずれも明確な根拠にまで達しておらず、その過程を明確にするには、時・空間的に高い解像度で生細胞観察することしか方法はなかった。一方最近、私の所属する研究室では生細胞で DM を可視化した細胞を樹立することができた。さらに、時・空間的に高い解像度でタイムラプス実験を行える最新の顕微鏡システムが導入されたことで、DM の挙動を生細胞で

追跡することが可能となった。

そこで本研究では、1) DM を濃縮した微小核の内容物がどのように排出されるかという問題、および、2) 核内の DM が間期に細胞質に移動して排出される可能性、の 2 点について、生細胞タイムラプス観察を中心として検討することにより、解明することを目的とした。

4.2 結果

4.2.1 微小核は、細胞分裂時に細胞質膜のブレッピングに取り込まれて排出された

DM が GFP の蛍光で可視化された DM-GFP 細胞株を用い、100 μ M のヒドロキシ尿素存在下で48時間～72時間の長時間生細胞タイムラプス解析を行った。ヒドロキシ尿素は複製阻害剤であり、それを低濃度で処理すると DM の数が減少することが報告されている。その結果、DM を濃縮した微小核は有糸分裂後の細胞質分裂が始まる時期に、細胞質膜のブレッピングへ取り込まれ、細胞外へと排出される場合があることを見いだした。(図 21)。このようなタイムラプス解析を 253 個の細胞について行い、微小核が消失する頻度をパターン別に分類した(図 23A1, A2)。解析した細胞のうち分裂期に入った細胞は 60 個あり、その際に 23 個の微小核が新規に形成された。そのうち 8 個(34.8%)は分裂期からその直後に細胞質膜のブレッピングへ取り込まれ細胞から消失した。一方、タイムラプス開始時に既に微小核が形成されていた細胞は 61 個あり、そのうち 5 個(8.3%)が分裂期からその直後に細胞から消失した。また間期核から消失した微小核は 16 個(26.2%)であった。このうち 7 個は微小核が消失する瞬間と前後

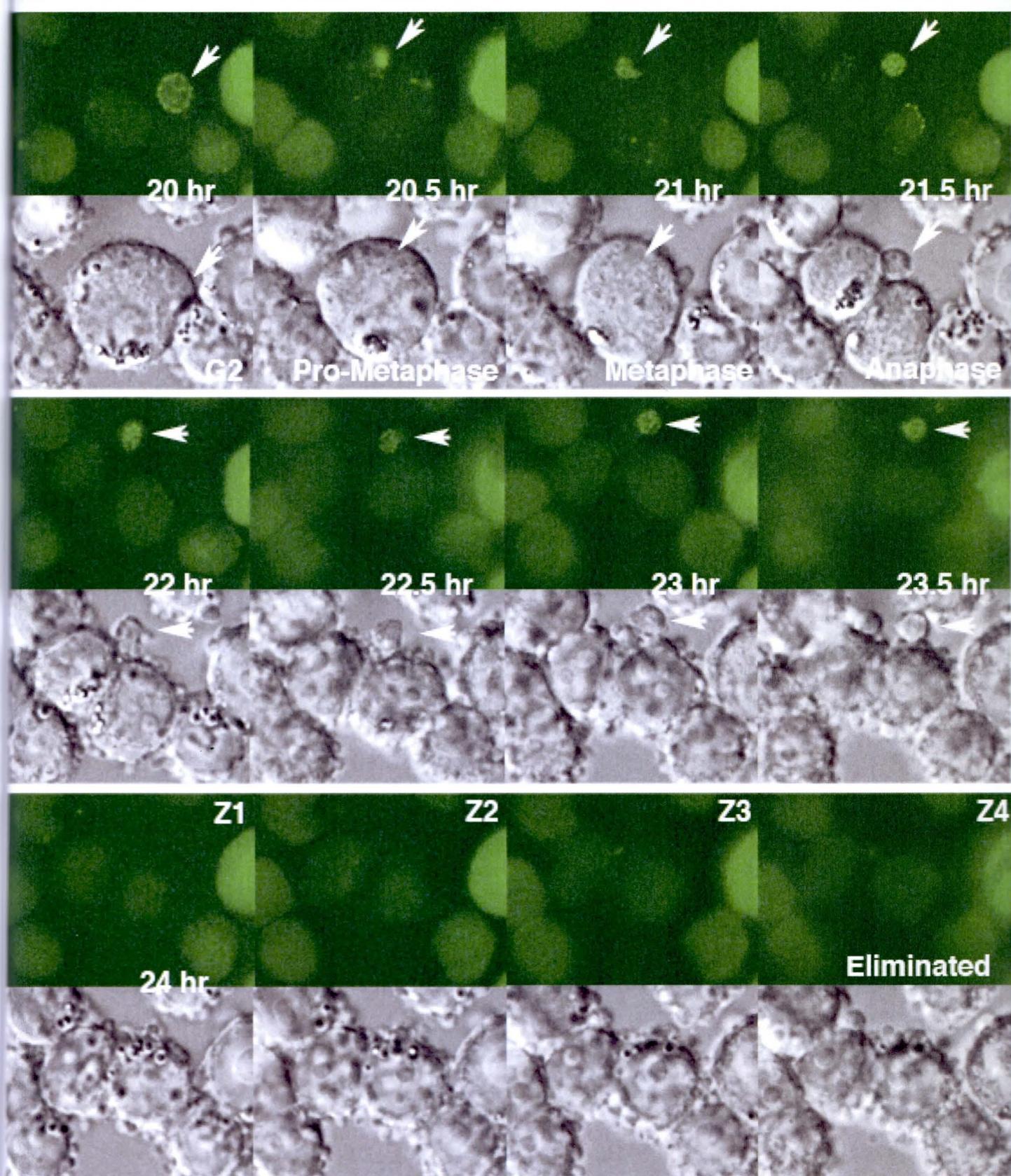


図21. 微小核は分裂後期から早期G1 の間にブレップに取り込まれ、細胞から消失する場合があります。DM-GFP 株に0.1mM HUを加え30分間隔で72時間のタイムラプスを行った。この図では分裂期に入る直前から微小核が消失するまでを示した。元々、この細胞では微小核をもっており、分裂期には形態を保ったまま核と融合することなく独立している。しかし、細胞質分裂が始まると、微小核は収縮管が形成される近くでブレップに取り込まれ、その後blebと共に細胞から消失した。下の図はZ seriesを4枚並べて微小核が消失したことを示した。(実際は9枚のZ seriesで確認)

で細胞質膜のブレッピングが生じていた。残り 9 個はタイムラプスの Interval (待ち時間) の間に消失していた。また Apoptosis が生じる率は 8.3% であったが、ブレッピングは 179 回生じ、それは短いもので数分、長いものでは 72 時間継続する場合があった。このことから、顕微鏡のタイムラプスによる光毒性はほとんどないと考えられる。

4.2.2 間期核から出芽様構造を介して形成された微小核は、細胞質膜のブレッピングに取り込まれて排出された

4.2.1 のように分裂期に微小核が排出される場合だけでなく、間期の細胞でも微小核が形成され、それが排出される場合があった(図 23B)。間期の間に微小核が形成されることは、253 個の細胞を追跡したうちで 7 回生じ、そのうち 4 個の微小核が細胞から消失した。その代表例を図 22 に示した。この写真は DM-GFP 株に HU を終濃度 0.1 mM となるように培養液に添加後、すぐにタイムラプスを開始し、32.5~33.5 時間後の細胞である。LacR-GFP の蛍光と微分干渉像につき、各時間で z 軸上の位置を 1.2 μm ずつ移動させて撮影した一連の画像を示す。LacR-GFP は点状で DM に局在している他、クロマチン全体に広がっている。上のパネル(32.5 時間)とそれ以前の細胞には微小核は認められないが、中段パネル(33 時間)では LacR-GFP と小さな DM が核外につきだし、微小核が形成されている。そのような微小核は、下のパネル(33.5 時間)では消失している。興味深いことに、上のパネルで細胞質がブレッピングを開始しており、中段のパネルで見られる微小核はそこへ取り込まれている。さらにそのようなブレッピングと細胞との間はいくびれていたことから、それがちぎれて細胞外に放

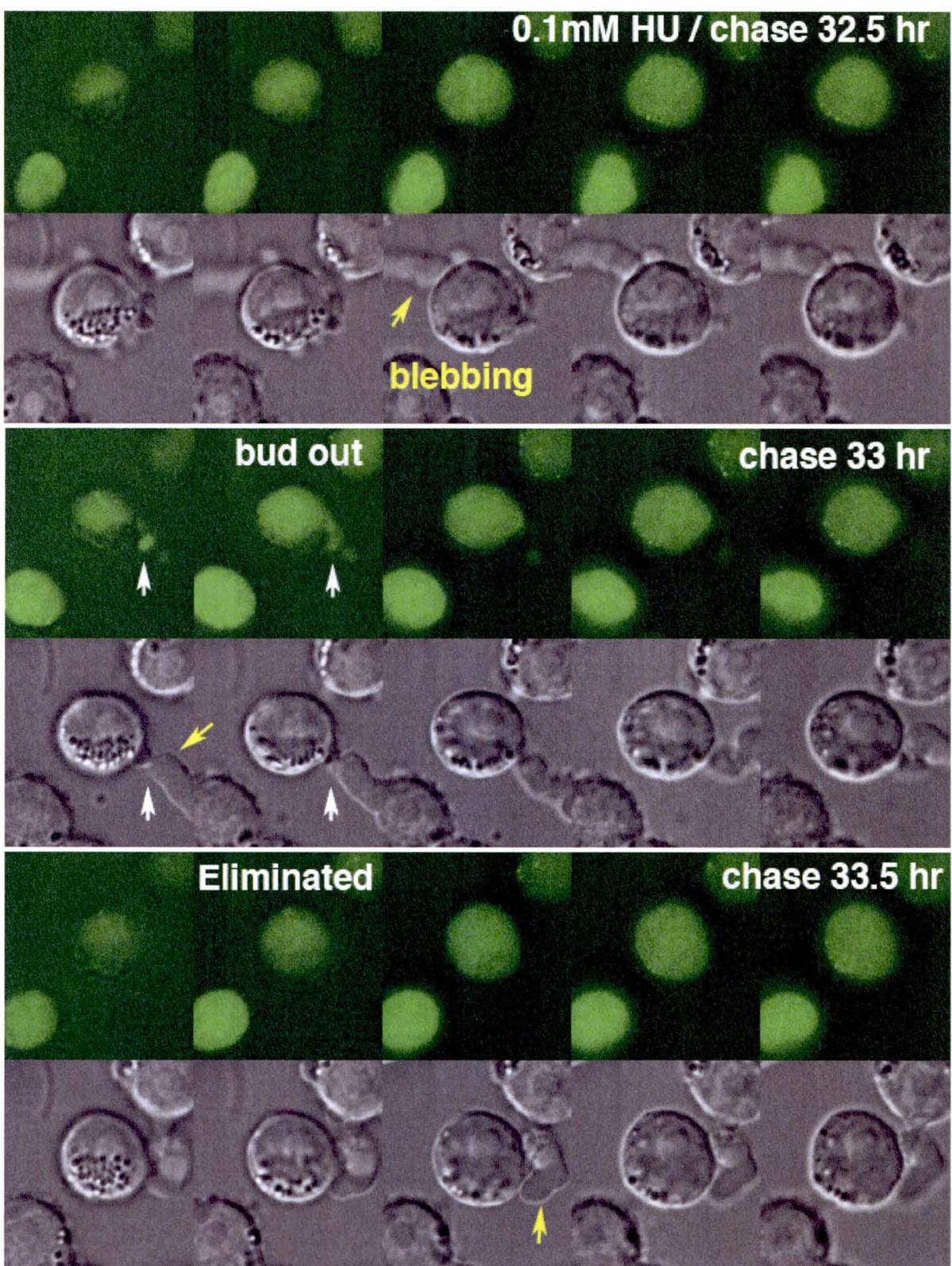


図22. 核出芽様構造により微小核が形成され、短時間の内に細胞から消失する。
 DM-GFP 株に0.1mM HU を加え、30 分間隔で72 時間のタイムラプスを行った。写真は上から HU 添加後、32.5 時間経過したときの Z-series で細胞質膜が激しくブレッピングしている(黄色矢印)。中段は33時間後の Z-series で細胞質膜が激しくブレッピングしており(黄色矢印)、そこに核が出芽様構造を形成し微小核が生じた(白色矢印)。下段ではブレッピングは生じているが、どの Z-series にも微小核は見あたらないこと、その後40時間のタイムラプス中に再び微小核が現れることはなかったことから細胞から消失したと考えられた。

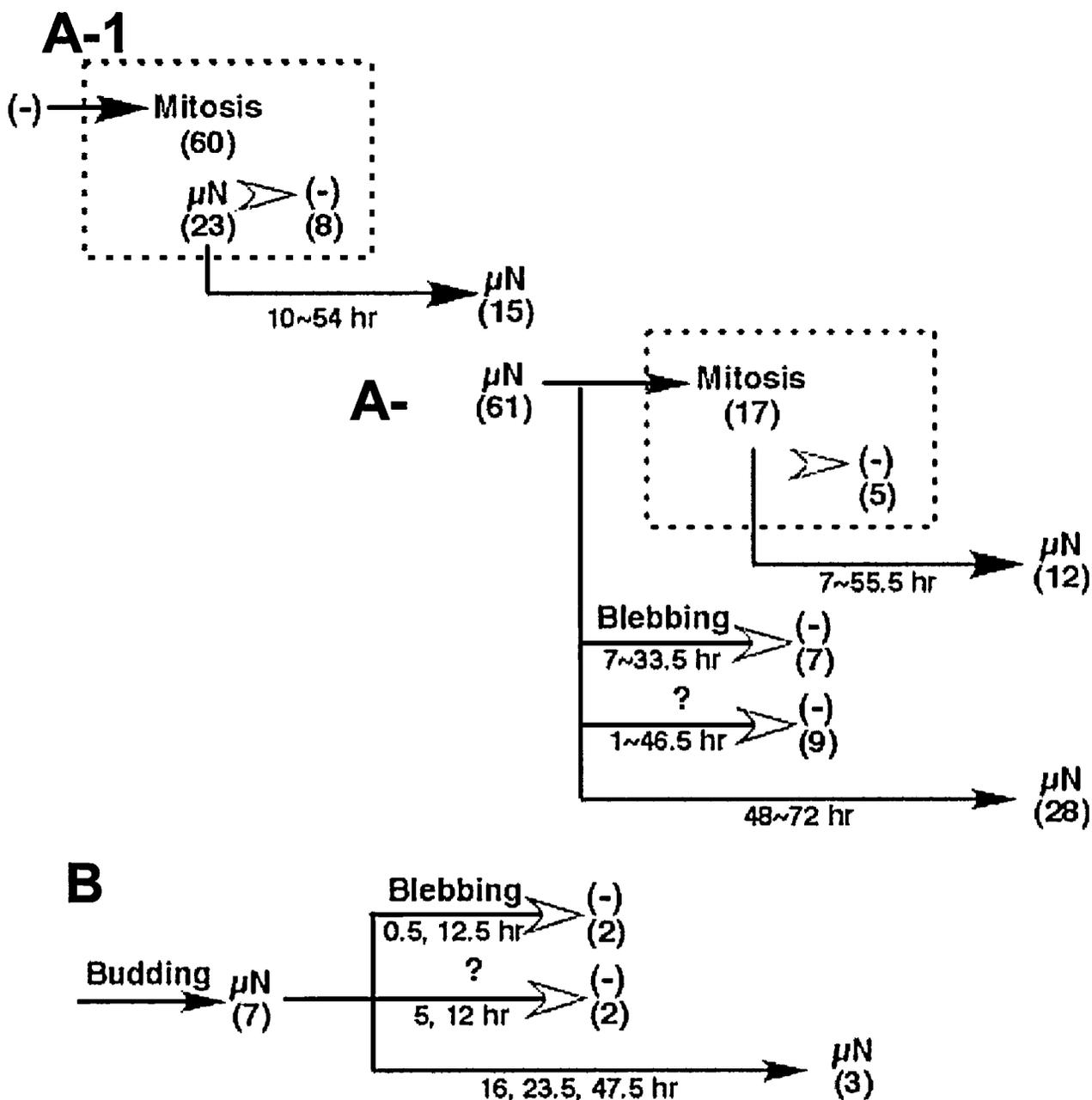


図23. 微小核消失は分裂後か間期核からの出芽様構造を介して、ブレッピングにとりこまれるときに生じる。

DM-GFP 株に0.1 mM HU を加え、30 分間隔でタイムラプスを48~78 時間行った。(A-1) 分裂期後に微小核が新規に形成された細胞のチャート。(A-2) タイムラプス開始前から微小核を持っていた細胞についてのチャート (B) 図22 のように間期核からbuddingにより微小核を生じた細胞のチャート。()内は細胞数。矢印の下に各イベント発生までの時間、またはブレッピングが継続した時間を示した。

出されたことが示唆された。

4.2.3 カンプトテシン処理により出芽様構造形成が誘導された

HU 以外の 2 本鎖切断誘導剤の影響を検討した。HU は複製鎖伸張を阻害し、複製装置の崩壊を引き起こすことで 2 本鎖切断を誘導する。一方、カンプトテシンは転写、複製等で生じるトポロジを解消するためのトポイソメラーゼ I の阻害剤であり、間期のいつでも 2 本鎖切断を誘導する。実際、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CPT で処理した細胞のほとんどが 2 本鎖切断の指標である γH2AX のシグナルが強く検出された (Date not shown)。実験では微小核の核内膜構成タンパク質 Emerin と RFP の融合蛋白質を安定に発現させ、DM を LacR-GFP で可視化した細胞株を用い、核を hoechst 33342 染色した細胞を用いた。この細胞株に 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう CPT を細胞培養液に添加し、10 分間隔で 8~24 時間のタイムラプスを行った。その結果、CPT 添加後、すぐに間期核から出芽様構造を介して微小核が形成され、消失する瞬間を捕らえることに成功した (図 24)。この場合も HU で処理したときと同様に細胞質膜のブレッキングが生じていた。

4.2.4 短時間のカンプトテシン処理により Lamin B に覆われない小さな微小核形成が誘導された

CPT による短時間での微小核形成について詳細な検討を行うため以下の実験を行った。すなわち COLO 320DM 株、または DM-GFP 株に CPT を各種濃度で加え、3 時間培養した後に固定し、微小核形成頻度を計測した。その結果、CPT 処理した COLO 320DM 細胞では、微小核形成頻度が有意に増加した。このことは

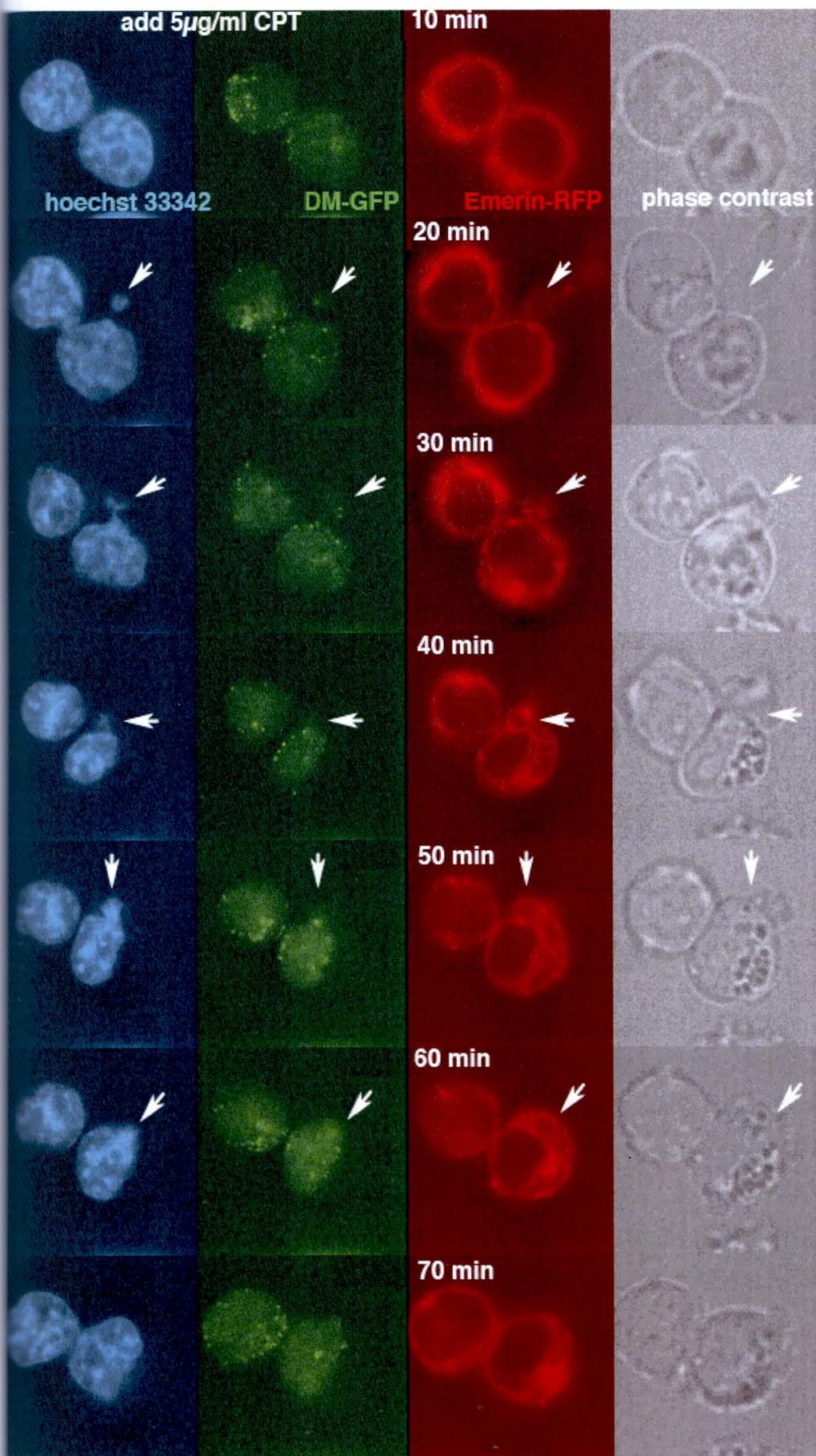


図24 二本鎖切断誘導剤であるカンプトテシンは間期核からの出芽様構造を介する微小核形成を誘導し、それはすぐに排出された。

核内膜構成タンパク質 Emerin とRFP との融合蛋白質を発現させたDM-GFP株に5 µg/ml CPT を加え、10分間隔でタイムラプスを行った。クロマチンはhoechst 33342 により染色した。添加後、10分経過したときの細胞で微小核はない。しかし20分後には細胞質膜が激しくブレッキングし、DM を含む微小核が取り込まれている。この微小核は Emerin-RFP に覆われていた。その後ブレッキングは次第に収まったが、70分以降から8時間後までのタイムラプス中に微小核は見られないことから、細胞から消失したと考えられた。

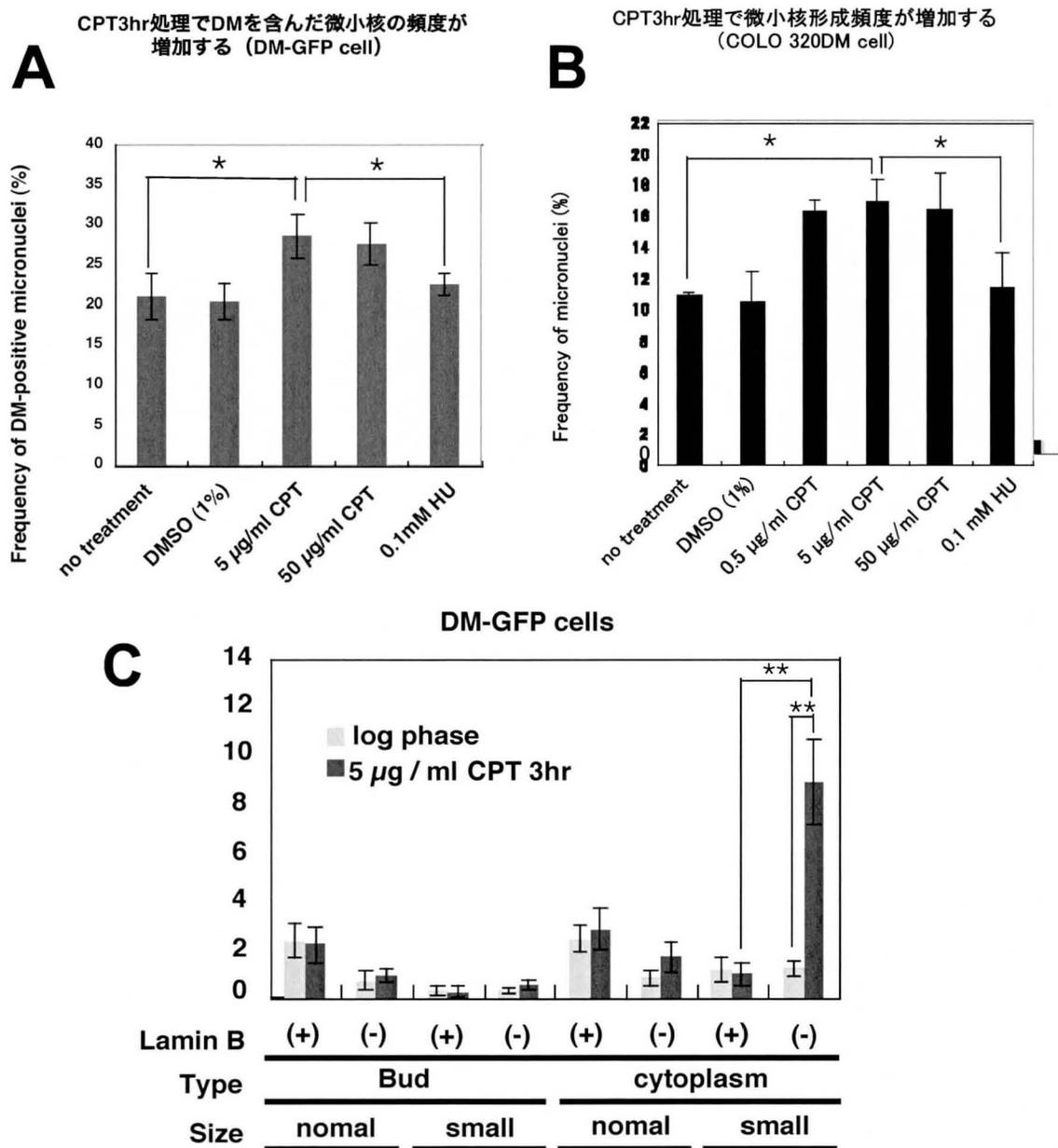
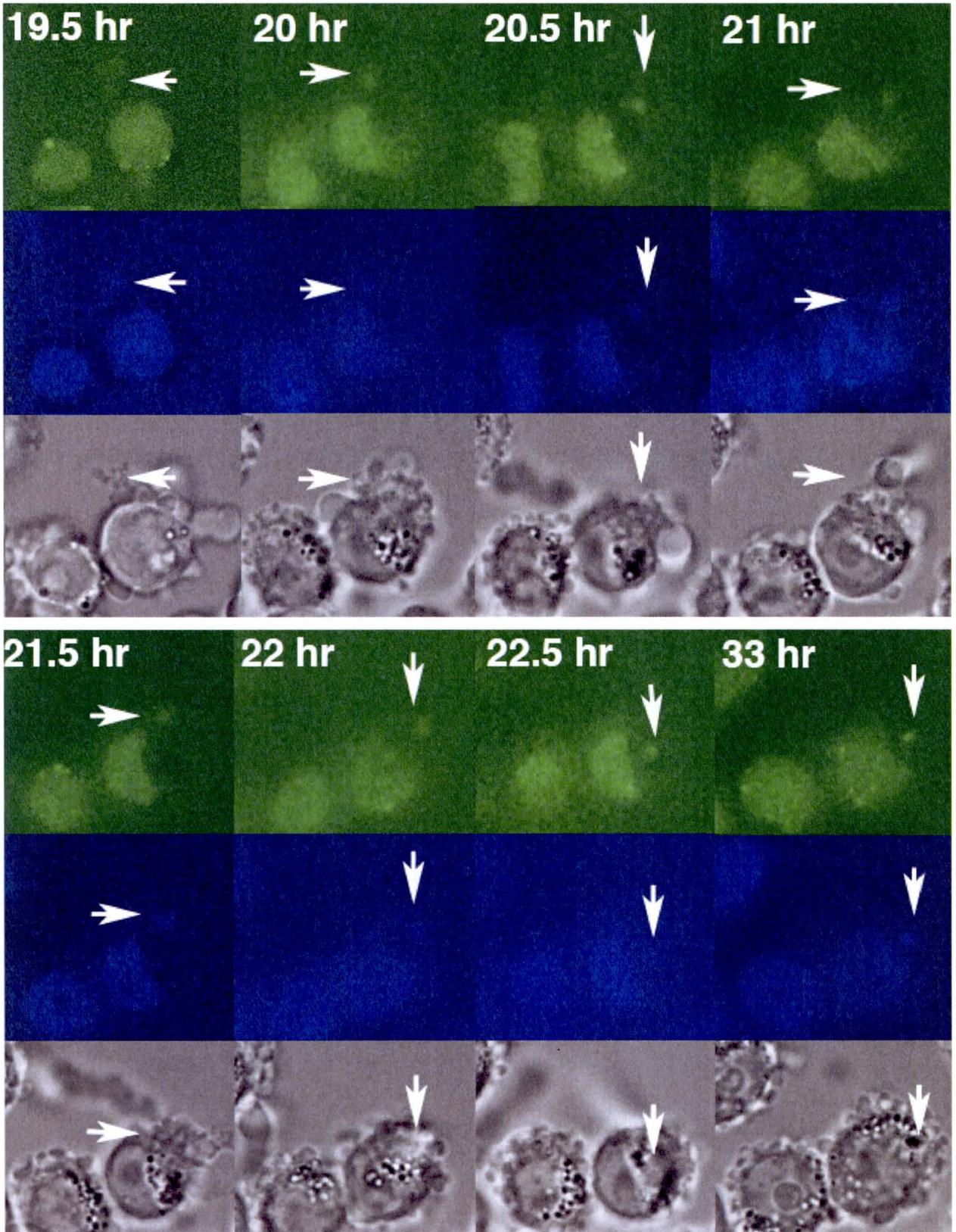


図25 2本鎖切断誘導剤であるカンプトテシン処理により短時間の内に微小核形成を誘導した。(A) DM-GFP 株を各薬剤で3時間処理し、微小核形成頻度を細胞500個以上、微小核100個以上、3回計測し標準誤差を求めた。(B) COLO 320DM 株を各薬剤で3時間処理し微小核形成頻度を細胞500個以上、微小核50個以上、3回計測し標準誤差を求めた。(C) COLO 320DM 株を5 µg/ml CPT で3時間処理し、PFA 固定後Lamin B を間接蛍光抗体法により検出した。Lamin B の有無、大きさ、タイプにより分類し計測した。微小核50個以上、細胞500個以上、5回計測し標準偏差を求めた。その結果、5 µg/ml CPT 処理により、細胞質で小さな微小核形成頻度が増加することが示唆された。(** P<0.01, * P<0.05)



のことは、DM-GFP 株を用いて DM をもつ微小核について検討した場合でも同様であり、同程度に増加した (図 25A, B)。この場合の微小核は DM を 1 個から 2 個程度しか持たない小さな微小核であったため、Lamin B を染色した上で、微小核の大きさ、形態について分類し計測した。その結果、Lamin B を持たない小さな微小核の形成頻度が増加していることが示唆された (図 25C)。

4.2.5 細胞外へ排出された微小核は、まれに他の細胞へ取り込まれた

以上の研究により、DM は微小核形成を介して、分裂期や間期に細胞外へ排出されることが示唆された。一方、以前の研究は、このように細胞外に放出された微小核が、細胞質膜と核ラミナで覆われ、その中の DNA が少なくとも激しい分解を受けていないことを示唆していた。このことは、細胞質膜の融合により、細胞外の微小核内容物が他の細胞に伝わる可能性を示唆している。この点に関し、本研究の中で、DM-GFP 細胞株のタイムラプス解析により、1 つだけが細胞外から細胞内へクロマチンが取り込まれる様子を示唆するムービーを得た (図 26)。これはごく希ながら細胞間で遺伝子が伝搬されることを示唆している。しかしこの観察結果だけでは決定的な証拠とならないため、より確実な証拠を集めることは今後の課題である。

4.3 考察

微小核は少なくとも 2 つのパターンで細胞外へ排出されることが示唆された。1 つは分裂期の細胞質分裂が起きる最後の段階で、細胞質膜のブレッキングが活発化し、その中に取り込まれることにより細胞から排出される場合

であり、もう1つは間期に細胞質膜が激しくブレッピングし微小核が取り込まれ排出される場合である。どちらの場合も、細胞質膜がブレッピングする点で共通している。細胞質分裂が起きる際、midbody で収縮管が形成されて細胞質膜がくびれる。その後、細胞質膜を切り取る蛋白質群により引きちぎられる (Carlton and Martin-Serrano, 2007)。興味深いことに HIV-1 ウイルスが細胞外へ放出される際にもこの細胞質膜をくびれさせ引きちぎるための蛋白質を利用していることが最近報告された (Carlton and Martin-Serrano, 2007)。DM が排出される際にもブレッピングがくびれる過程が含まれており、これらの蛋白質が関与している可能性が考えられる。

ブレッピングは一般的に分裂期に起きることが知られているが、Apoptosis の際にも起きることが報告されている。しかし最近の研究で、Apoptosis 時に起きるがそれ自体は Apoptosis に必要ではなく、Apoptosis 後に起きる食作用のため、ブレッピングにより細胞質膜を切り離すことや、細胞質膜が反転し細胞質内膜に局在するフォスファチジルセリンが露出し、それに対する免疫細胞を呼び寄せることに役立っているという報告がある (Lane *et al.*, 2005)。しかし本研究でタイムラプス中に Apoptosis が生じる率は、ブレッピングが発生する率と比べて非常に低かった。このことから、ブレッピングが生じることと Apoptosis は関係していないと考えられる。

これまで DM は分裂期染色体から脱落し、細胞質へ取り残されることで形成されると考えてきた。このことはタイムラプス観察により確認することができた。一方、以前の研究から核の出芽様構造から微小核ができるのではないかという可能性も示唆されている (Shimizu *et al.*, 2000)。本研究のタイムラプス

観察により間期核から、核が出芽し微小核を形成する場合を捕らえることができた。この過程は非常に短時間で形成され、ブレッピング発生時に生じ、微小核はその中に取り込まれることで短時間の内に消失しやすいことが示唆された。これは短時間の CPT 処理を行った際にも観察された。一方、3 時間の CPT 処理を行った固定細胞で微小核形成頻度を計測すると、DM を 1~2 個含む小さな微小核が多数形成されていること、それらは Lamin B に覆われていないことが示唆された。以前、ガンマ線照射により 2 本鎖切断が生じると核から Rad51 のシグナルをもつファイバー上の DNA が這い出るという報告がされた(Haaf *et al.*, 1999)。本研究で見られた小さな微小核も同様の機構で形成されたとすれば、異常クロマチンを間期核から細胞質へ移行する機構が存在するかもしれない。この核出芽様構造についてはまだ未解明な点が多く、今後の課題である。

最後に、細胞外から細胞質へ微小核が取り込まれる場合を 1 例だけとらえることができた。COLO 320DM 細胞では *c-myc* がん遺伝子が増幅しているが、これはトリの腫瘍で発見されたウイルス *v-myc* のホモログとして発見され、広汎なヒト腫瘍の悪性化に関与していることがよく知られている。もしこのような悪性遺伝子を含む微小核が排出され、それが細胞間で転移するようなことがあるならば、癌組織内で癌細胞が遺伝的に多様化してゆくことを説明できるようになるかも知れない。さらに、動物細胞で遺伝物質が細胞外に無傷で放出されることはウイルスの場合以外には知られておらず、放出された遺伝物質が他の細胞に伝播する過程はある種のウイルスに驚くほど酷似している。微小核の中に DM のような染色体外遺伝因子が取り込まれ、それが細胞外に放出されて第 3 の細胞に伝播する過程は、エンベロープウイルスの起源と関係する可能性が考

えられる。

5 章 HSR からの遺伝子発現

5.1 背景と目的

IR/MAR 遺伝子増幅法により形成された HSR は、既知のプラスミド配列からなる均質で長大なクロマチンであり、高度にヘテロクロマチン化されている。すなわち、S 期の最後で複製され(Shimizu and Shingaki, 2004)、転写レベルは極めて低く(Hashizume and Shimizu, 2007)、DAPI で染色するとクロマチンは高度に凝縮していた(図 31)。さらに本研究では代表的なクロマチンマーカーである HP1 α やヒストン H3K9Me3 が局在することを示す。このように長大で均質な HSR はヘテロクロマチンの基礎細胞生物学的な理解に有利である。例えば、以前の研究ではこのような長大なクロマチンの利点を活用して、核内で長大なクロマチンがどのように折り畳まれて複製されるかについて、初めてとなるモデルを得ることができた。すなわち、長さ 100 メガ塩基対にも及ぶ長大で均質な HSR は、後期 S の核内で巨大な coiled-coil 構造を形成し、外側から内側へ向けて複製されるというモデルである(Shimizu and Shingaki, 2004)。また、HSR を形成した細胞について、HSR 内での転写を誘導するとともに DNA メチル化を 5-azacytidine により阻害すると、巨大な HSR が壊れて比較的小さな HSR や DM に変換されることが見いだされた。すなわち、増幅構造の相互変換に関する理解を深めることができた(Hashizume and Shimizu, 2007)。

最近、ヘテロクロマチンからの RNA polymerase II による転写がゲノム安定性に必要不可欠であるという逆説的な機構が、酵母や(Chen *et al.*, 2008)

(Kloc *et al.*, 2008)、哺乳動物細胞で(Lu and Gilbert, 2007)報告され、注目を集めている。そのようなヘテロクロマチンからの転写産物は RNAi 機構を活性化し、その配列のサイレンシングを引き起こす(Fukagawa *et al.*, 2004) (Ho *et al.*, 2008)。しかし哺乳動物細胞を用いてヘテロクロマチンからの転写を *in situ* で解析した例はまだ少なく、その時空間的な転写制御はほとんど分かっていない。

そこで本研究では IR/MAR 遺伝子増幅法で形成された長大で均質な人工 HSR をヘテロクロマチンの良好なモデルとして位置づけ、その中での転写について解析することにより、ヘテロクロマチンからの遺伝子発現について理解することを目的とした。

5.2 結果

5.2.1 HSR からの転写は少数の特異点に限られていたが、核小体表面や核小体内部では HSR 全体から転写されていた

HSR からの転写を解析するためには 2 種類の細胞株を用いた。1 つは pSFVdhfr プラスミドが増幅し1つの大きな HSR を形成した clone 22 株であり、もう一つは pSFVdhfr と pECMS2 β が共増幅して2つの大きな HSR と1つの小さな HSR を形成した HSR-CFP 株である。それぞれの分裂期染色体標本について、DNA FISH によりプラスミド配列の局在を解析した際の写真を図 27A, B に示す。

まず clone 22 細胞を用いて *BSR* 遺伝子からの転写産物を RNA FISH 法を用いて検出し、共焦点顕微鏡により画像を取得して解析した。その結果、多くの HSR の核内ドメインでは、ごく限られた領域で点状に *BSR* RNA のシグナルが検出された(図 27C-1~C-3)。一方、一部の HSR は、核小体表面で広がってい

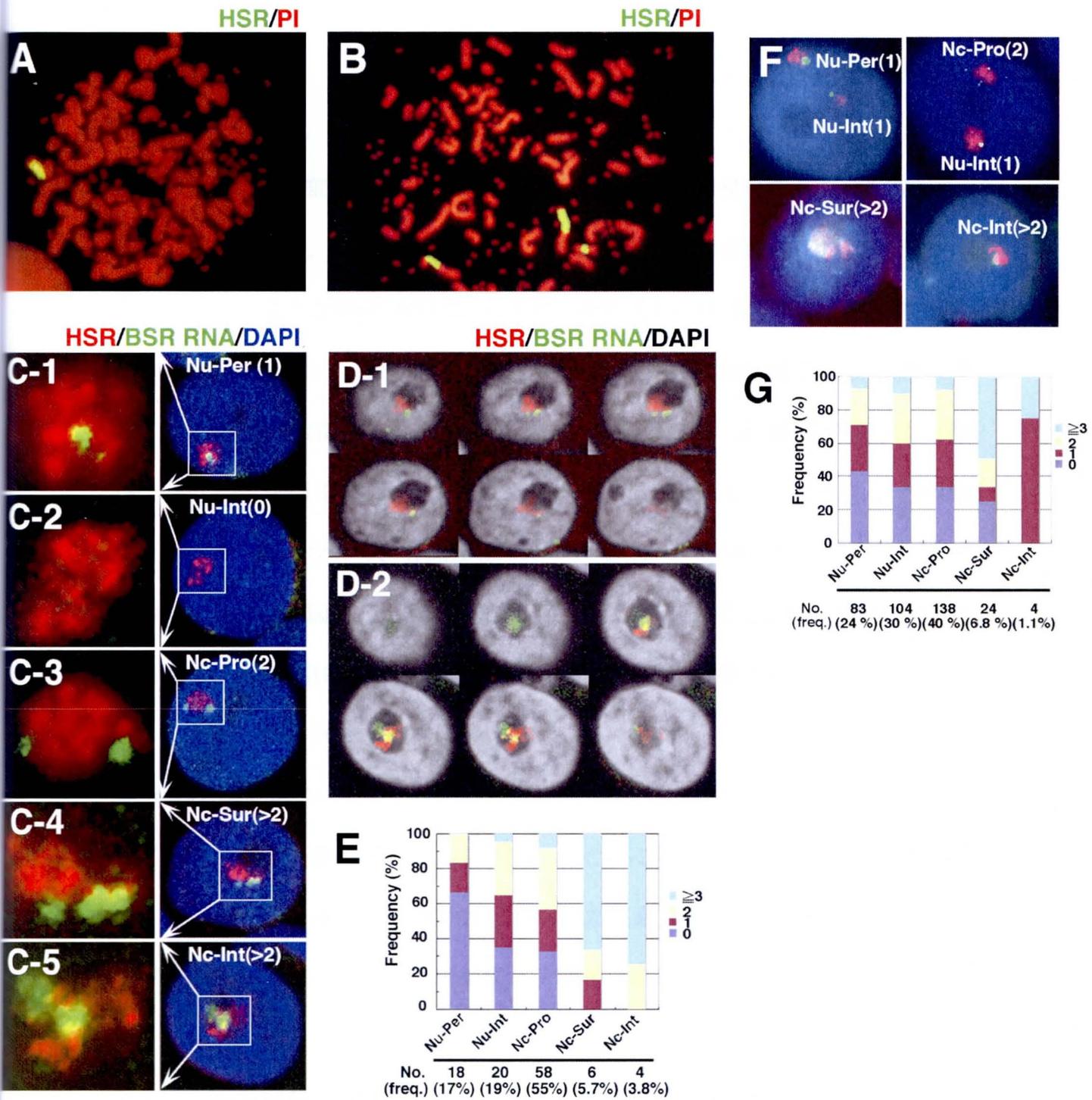


図27. ほとんどのHSRは1~2点で転写されているが、核小体表面、核小体内部で脱凝集して全体から転写される場合がある。

A) IR/MAR プラスミドがHSR上で増幅したclone22株、あるいは(B) IR/MAR プラスミドとpECMS2 β がHSR上で増幅したHSR-CFP株の分裂期染色体標本を用いてDNA FISH法によりプラスミド配列を緑色に検出し、PIで対比染色を行った。(C) clone22株を用いてRNA FISH法によりBSRR RNAを緑色に検出し、PFA固定後DNA FISH法によりHSRを赤色に検出した。DAPIで対比染色を行った。写真は共焦点顕微鏡により連続断層像を取得した。(C-1) HSRは核周辺部に局在しており転写は1点からのみ (C-2) 核内部で転写無し、(C-3) 核小体近傍で転写は2点から (C-4) 核小体表面で全体からの転写 (C-5)核小体内部で全体からの転写が見られる。(D-1) C-4の連続断層像 (D-2) C-5の連続断層像 (E)転写と局在のパターンごとに頻度を計測した。(F) HSR-CFP株を用いて(C)と同様にRNA DNA同時FISHを行った。(G) Eと同様に頻度を計測した。

るものや核小体内部へ入り込んでいる場合があることを見いだした(図 27C-4~C-5)。このことは、共焦点連続断層像の解析により確認された(図 27D-1~2)。さらに、このような局在場所にいる場合、HSR 全体から転写産物が強く検出されることを見いだした(図 27C-4、C-5)。そこで、HSR の局在場所を① 核膜に接している核質周辺部(Nu-Per)、② 核質内部(Nu-Int)、③ 核質の核小体近傍(Nc-Per)、④ 核小体表面(Nc-Sur)、⑤ 核小体内部(Nc-Int)に分類し、その発現を解析した。すなわち、各局在場所について HSR に付随した RNA 点状シグナルの数を計測して図 27E にまとめた。その結果、核小体表面と核小体内部に HSR が局在する場合、HSR は活発に転写されていることが示唆された。

次に HSR-CFP 細胞株についても同様の検討を行った。その結果、この細胞株の HSR についても、RNA 転写産物は検出されないか、少数の小さな点として検出される場合がほとんどであった。それに対し、核小体表面とその内部では HSR 全体から強く転写産物が検出された(図 27F、G)。したがって、複数の細胞株の HSR について同様な結果が示唆された。

5.2.2 転写可能な領域は、HSR が複製された後に倍化した

上記の結果は、巨大な HSR では転写可能な領域が限られており、転写の特異点が存在することを示唆している。そこでこの転写特異点の数が細胞周期により変化するかどうかを解析した。そのために、CldU により複製鎖を標識することにより細胞周期を特定し、RNA /DNA FISH 法で HSR と転写産物を同時に検出することにより解析を行った。その結果、G1 期から S 後期までの間は、転写特異点の数が変化しないことが示唆された(図 28A-E)。一方、G2 期の細胞

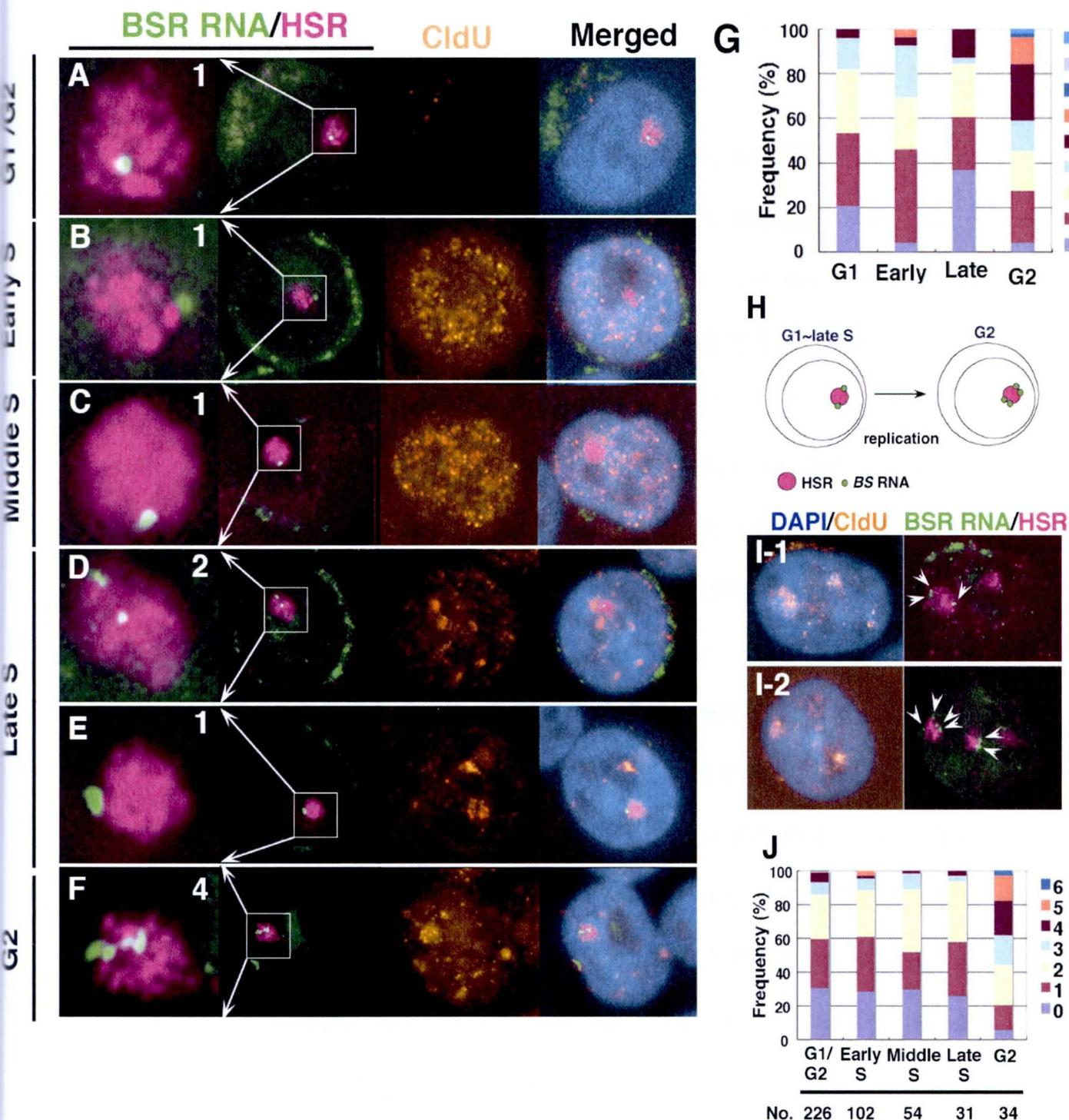


図28. 転写可能領域はHSR が複製された後に倍加した。

(A-E) 対数増殖期のclone12 株を用いてCldU で複製鎖を短時間標識し、RNA / DNA 同時FISH 法でBSR RNA とHSR を検出した。(F) CldU 処理後、新鮮培地へ2時間リリースし、HSR が複製された細胞をG2 期の細胞と見なした。(G) 細胞周期ごとに転写可能領域の数を計測し、グラフ化した。G1、Early S、Late Sでは 3~4点での発現は10~20%であるが、G2期には3-4点の転写が約30%のHSR で生じる。(H) 複製後転写可能領域は倍加するというモデル。(I-1) 矢頭はHSR-CFP のG2期での3点からの発現。(I-2) 左のHSR は4点から、右のHSR は2点からの転写が生じている。(J) Gと同様に頻度を計測した。

は以下のようにして特定した。すなわち、CldU 標識後 2 時間新鮮培地へリリースし、HSR に CldU が取り込まれている後期複製パターン of 細胞を G2 期とした。これは HSR が S 期の最後に複製されることが示唆されているからである。この方法で G2 期と判別した細胞のおよそ 8 割で HSR から転写された RNA の点の数はほぼ倍増していた。HSR は S 期の最後に複製されることから、HSR が複製されると転写特異点の数が倍増することが示唆された (図 28F, G)。HSR-CFP 株についても同様の検討を行った結果、同様な結果が得られた (図 28I, J)。以上の結果から、転写の特異点の数は、複製により倍増することが示唆された (図 28H)。

5.2.3 HSR 内に見られる RNA 転写産物の点は、転写部位に一致する

HSR 内に見られる RNA 転写産物の点は、その場で新規に合成された RNA を反映する可能性が高いが、不活性化 X 染色体の Xist RNA のように転写産物とその領域に蓄積したものである可能性も否定できない。そこでこの点を検討するために、HSR-CFP 株を用いて *de novo* に合成された RNA を BrU 標識法により検出した。その結果、BrU でパルス標識された RNA のシグナルは核小体と核質に多数検出された。そのような新規に転写された RNA のシグナルと、HSR の CFP シグナルが共局在する場所を検出し、図 29A-C の上パネルに示した。また、その頻度を図 29D にまとめた。その結果、HSR と共局在するシグナルは、核質に位置する HSR ではごく限られた点のみであったのに対し、核小体内部や核小体表面に局在する HSR からは多くの点で検出された。以上の結果は、5.2.1 や 5.2.2 節で点状に検出された RNA に関する結果と良く一致した。このことから、RNA 転写産物の点は確かに新規に合成された RNA であり、転写部位を反

Log phase

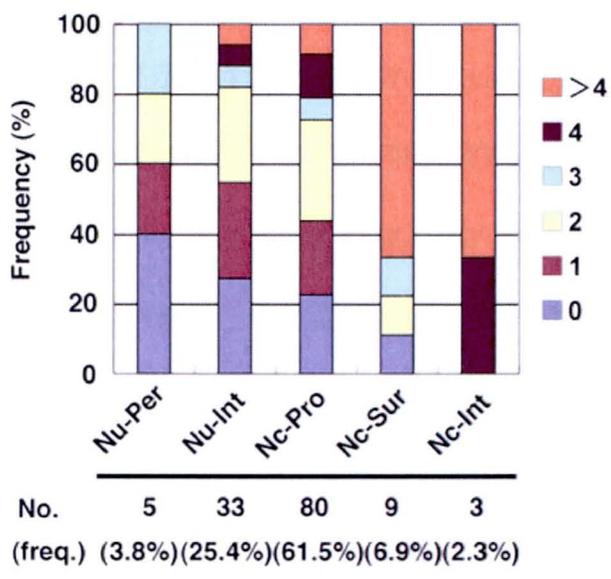
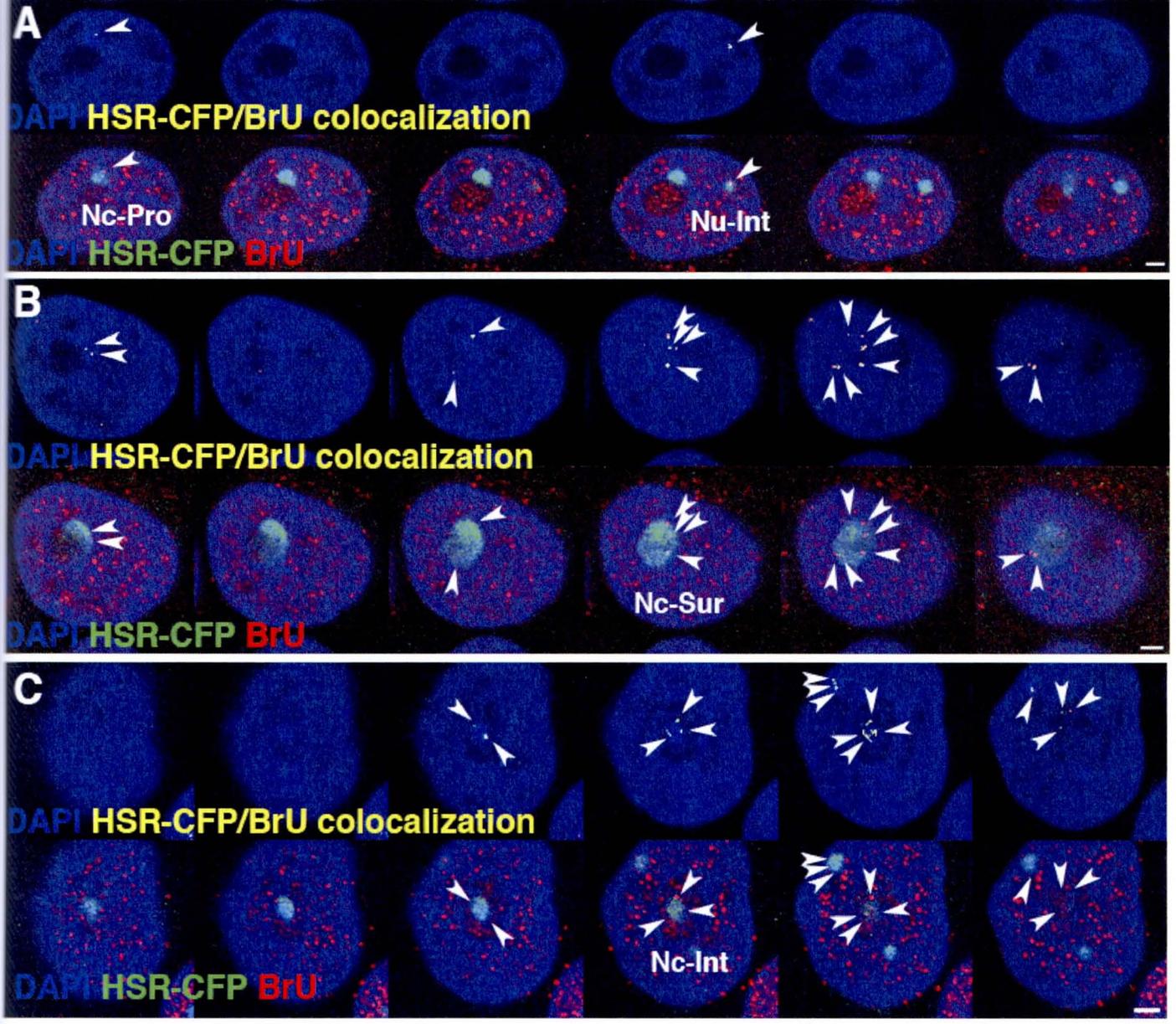


図29. HSR の転写特異点は新規に転写されたものであり、蓄積したものではない。

(A-C) 対数増殖期のHSR-CFP 株を用いて新規転写産物のBrU 標識を行った。BrU は間接蛍光抗体法により赤色に検出した。HSR はLacR-CFP で可視化されている。上のパネルは緑色と赤色が共局在する場所のみを抽出して表示した。Bar, 2 μ m (A) 核小体近傍、核内部に局在するHSRは矢頭で示した点で転写されている。(B) 核小体表面で(C) 核小体内部で多数の点で転写されている。(D) 共局在する点の頻度を計測した。

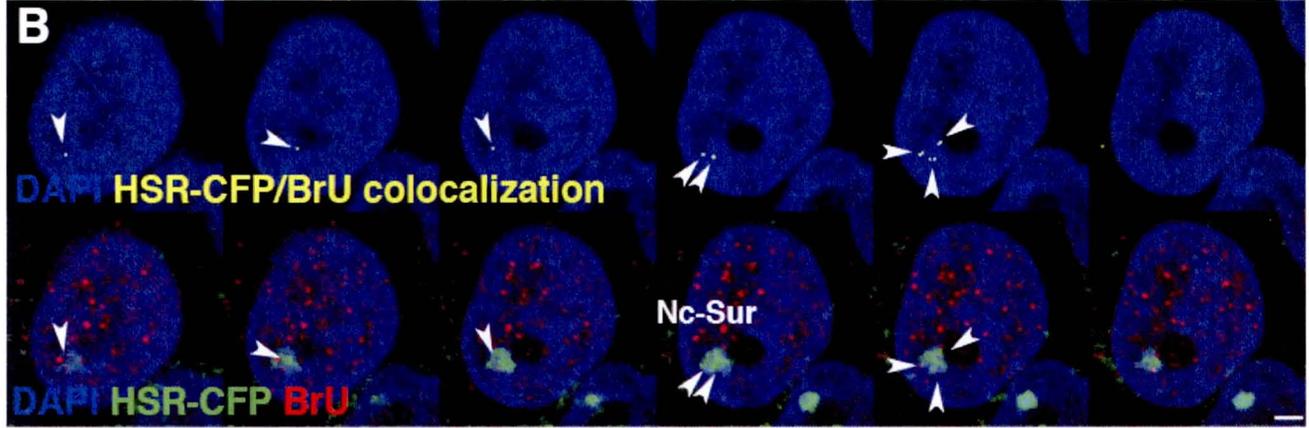
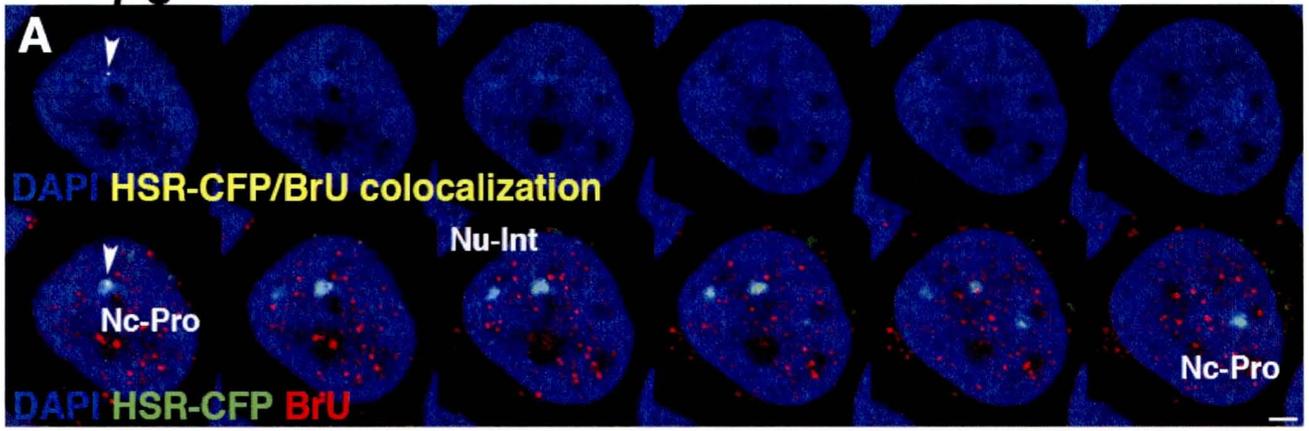
映することが示唆された。

5.2.4 HSR は核質で RNA pol II により転写されており、RNA pol I の転写に依存して核小体内部へ局在する

上記の研究により HSR の転写は、核質では限られた特異点のみで進行していること、および、核小体表面や核小体内部に位置すると転写が活発となることが示唆された。そこで、HSR がどのような RNA polymerase により転写されているかを知るとともに、転写阻害によりその局在がどのように影響を受けるかを検討した。そのために ActD を 0.05 $\mu\text{g/ml}$ となるよう細胞培養液に加え 3 時間処理することにより RNA polymerase I を特異的に阻害した。このとき核小体から BrU のシグナルは消失したことから RNA polymerase I が完全に阻害されたことが示唆された。この条件で HSR には BrU のシグナルが 0~2 点検出された (図 30A, D)。さらに、核小体表面に位置する HSR ではより多数の点で検出された (図 30B, D)。このことは、核質や核小体表面での転写は、この濃度の ActD では阻害されない RNA polymerase II/III により進行していることが示唆された。一方、0.05 $\mu\text{g/ml}$ ActD 処理により核小体内部での BrU シグナルは消失するが、同時に核小体内部に位置する HSR もなくなった (図 30D)。このことは、HSR が核小体内部に位置するには RNA polymerase I の転写が生じていることが必要であることが示唆された。

次に、RNA polymerase I~III の全てを阻害するために、HSR-CFP 株を 2 $\mu\text{g/ml}$ の ActD で 3 時間処理した。その結果、HSR の核小体表面への局在もみられなくなった (図 30C, D)。このことから HSR が核小体表面で脱凝縮して広

0.05 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Act D



2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ActD

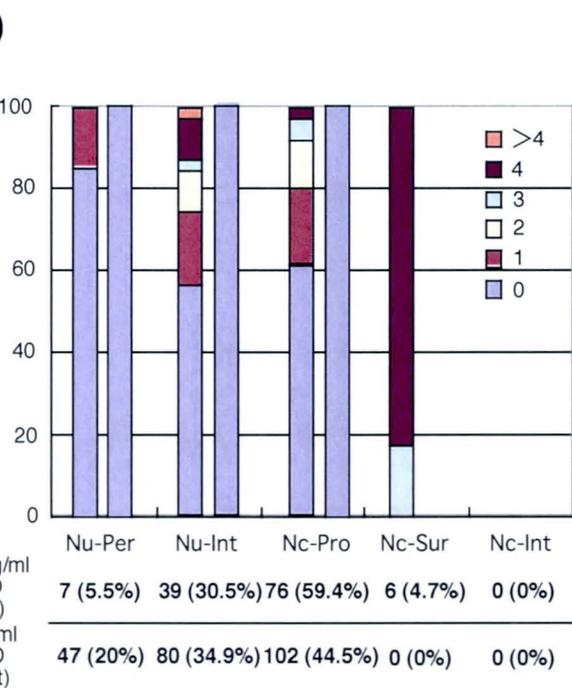
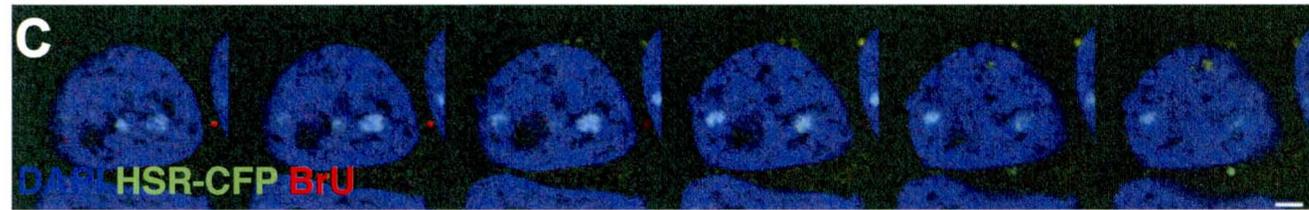


図30. HSRからの転写可能領域はRNA pol II によって転写されているが、核小体内部での転写にはRNA pol Iの転写が活性である必要がある。

(A,B) 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または(C) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のActD 処理を3時間行ったHSR-CFP 株を用いて新規転写産物のBrU 標識を15分を行った。(A,B) ではRNA pol I のみが阻害され、(C) では全ての転写が阻害される。BrU は間接蛍光抗体法により赤色に検出した。HSR はLacR-CFP で可視化されている。上のパネルは緑色と赤色が共局在する場所のみを抽出して表示した。(A) 核小体近傍に局在するHSR は矢頭で示した点で転写されている。(B) 核小体表面で多数の点で転写されている。(C) 転写は完全に阻害されている。Bar, 2 μm (D) 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ActDで処理した場合と、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ActD で処理した場合のHSRの局在と転写特異点の数を計測しそれぞれ左、右のバーに示した。

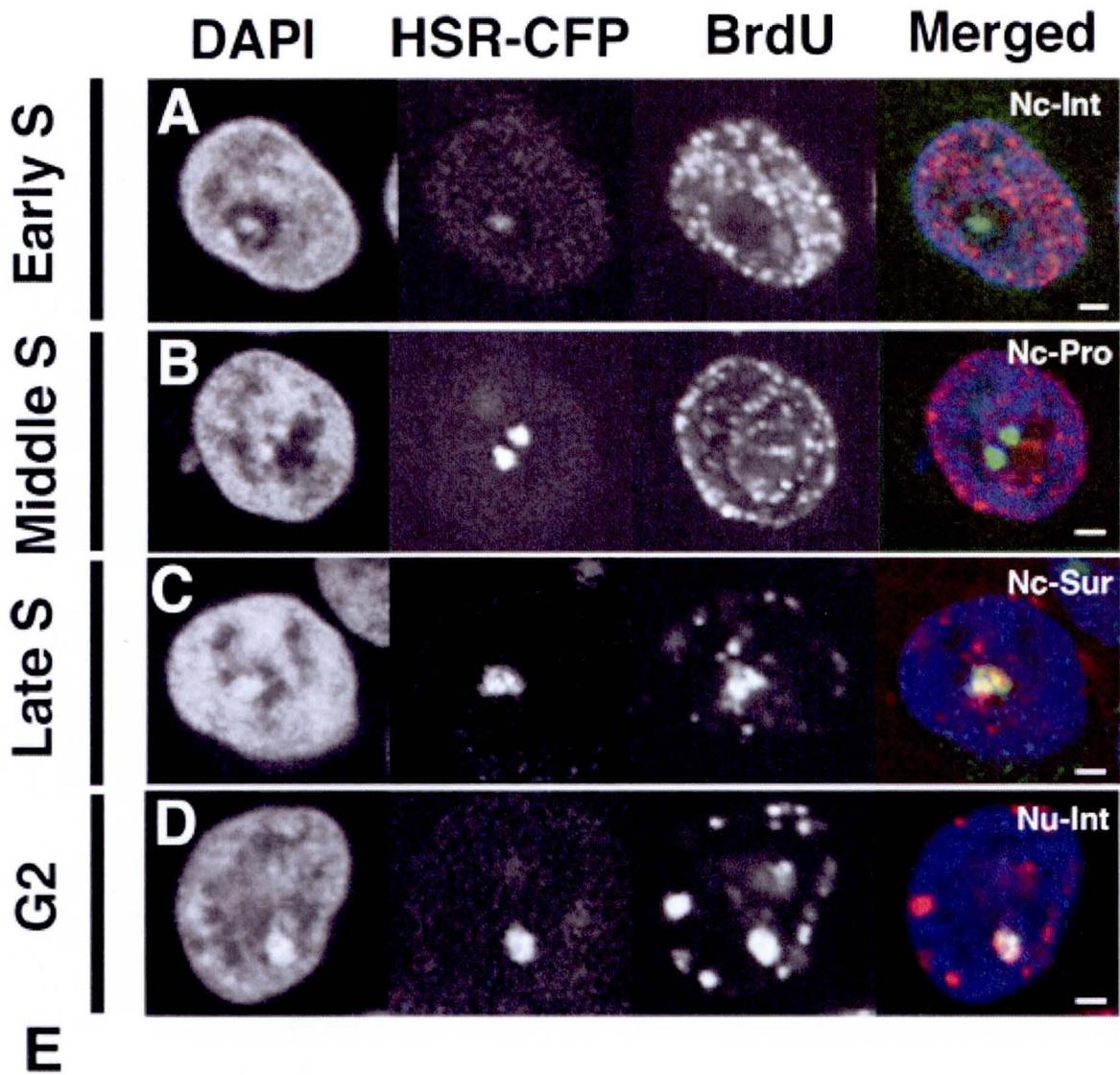
汎に転写されるようになるのには、RNA polymerase II の転写が必要であることが示唆された。

5.2.5 HSR は早期 S には核小体内部に、後期 S には核小体表面に局在する傾向がみられた

HSR の核内局在が細胞周期によって変化するか否かについて、複製鎖を CldU で標識する方法により検討した。この際、LacR-CFP のシグナルを残すため熱変性を行わず、DNase による変性法を用いて CldU を検出した。また G2 期の細胞を特定するためには図 28 (5.2.2 節) と同様の方法を用いた。それぞれの細胞周期での代表的写真を図 31A-D に示す。また、細胞周期ごとに HSR の局在場所を計測して図 31E に示す。その結果、核小体表面や内部に局在する HSR は、ほぼ全ての細胞周期で検出された。しかし、その頻度に偏りが見られた。すなわち、核小体内部に局在する場合は早期 S に、一方、核小体表面に局在する場合は後期 S に偏っていた。このような偏りは大きなものではなかったが、Anova4 による分散分析を行った結果、どちらも有意であった。(P<0.05)。

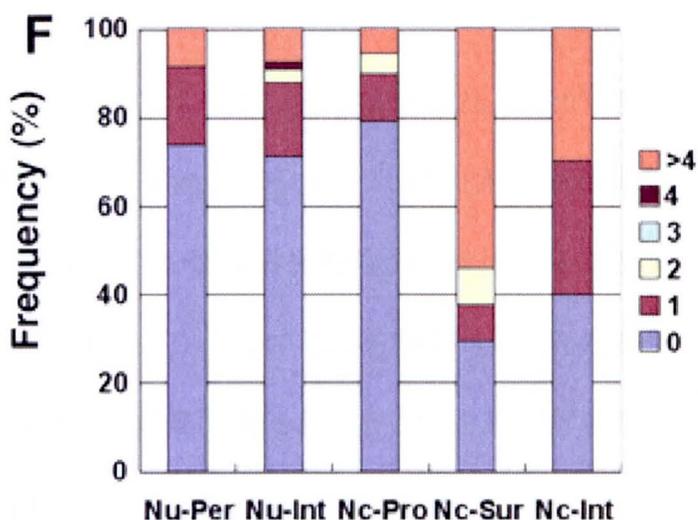
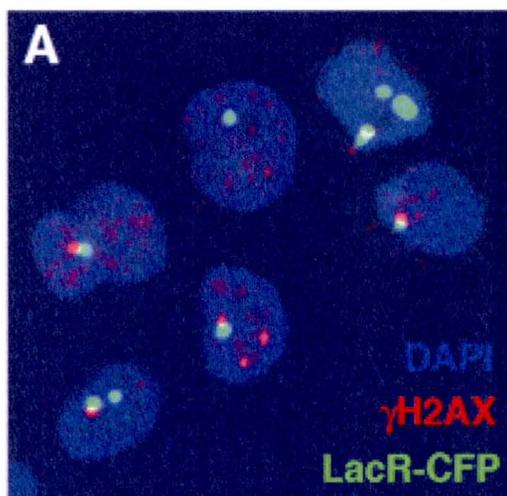
5.2.6 HSR ドメインには γ H2AX のシグナルが頻繁に検出され、それは転写特異点と一致する可能性がある

ヘテロクロマチンからの転写はヒートショックやストレスが原因となり生じるという報告がある(Valgardsdottir *et al.*, 2008)。その際に DNA ダメージが生じることが示唆されている(Kaneko *et al.*, 2005)。一方、DNA ダメージを受けたクロマチン部位では、その周辺 2 メガ塩基対程度にわたってヒストン H2AX

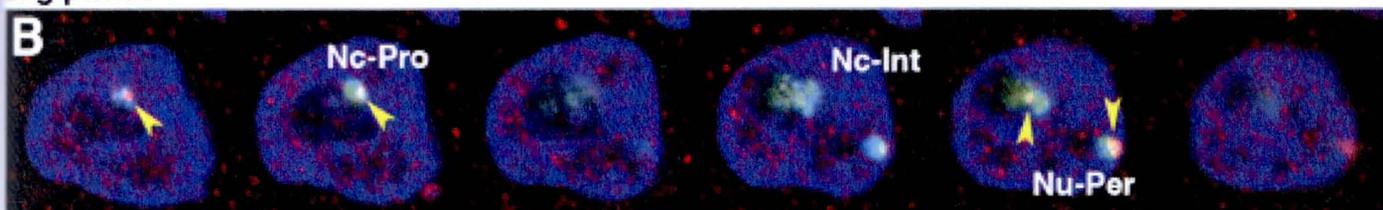


	Number of		Frequency (%)				Late S / Nc-Sur	Early S / Nc-Int
	HSR	Nu-Per	Nu-Int	Nc-Pro	Nc-Sur	Nc-Int	<i>P</i> value	<i>P</i> value
G1/G2	664	15.0	21.4	55.9	4.3	3.3	*** 0.0040294	*** 0.0035462
Early S	390	8.6	18.3	59.8	0.8	12.5	*** 0.0005774	-
Middle S	274	9.1	23.8	59.1	2.9	5.1	*** 0.0017605	*** 0.0110416
Late S	168	5.5	21.8	56.7	13.6	2.3	-	*** 0.0019782
G2	167	2.3	29.5	57.7	8.6	1.9	0.06106	*** 0.0015364

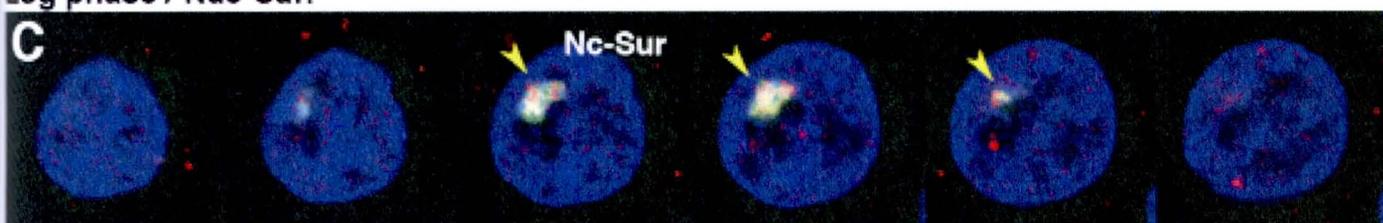
図31. HSR は早期S には核小体内部に、後期S には核小体表面に局在する傾向がみられた。
 (A-C) 対数増殖期のHSR-CFP 株を用いて複製鎖を短時間標識した。BrdU は間接蛍光抗体法により赤色に検出した。HSR はLacR-CFP で可視化されている。(A) 早期S に核小体内部へ局在するHSR、(B) 中期S に核小体近傍へ局在するHSR、(C) 後期S に核小体表面へ局在するHSR。(D) G2 期に核内部へ局在するHSR を示す。Bar, 2 μ m (E) それぞれの細胞周期ごとに局在場所を計測した。Anova4 による分散分析の結果、早期S での核小体内部への局在、後期S での核小体表面への局在が有意に高まっていることが示唆された。(*** $P < 0.05$)



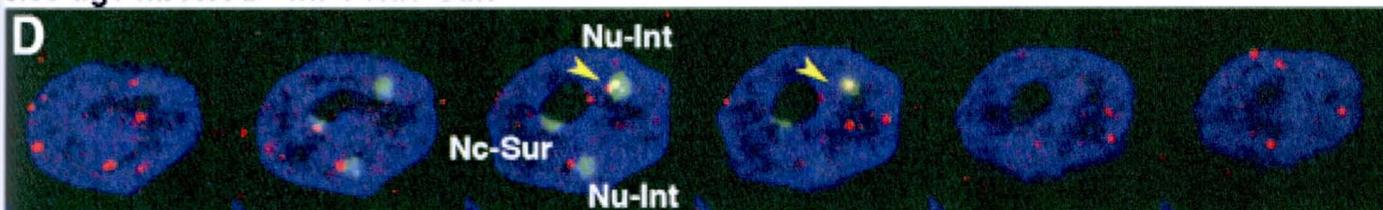
Log phase



Log phase / Nuc-Sur.



0.05 ug / ml Act D 4hr / Nuc-Sur.



2 ug / ml Act D 4hr / Nuc-Pro.

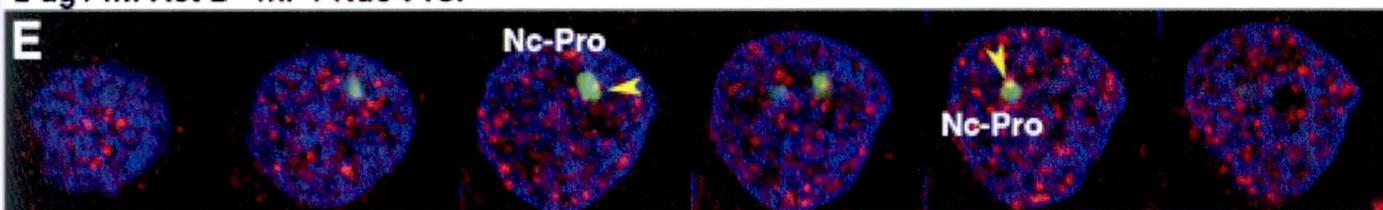


図32. HSR は2本鎖切断が頻繁に生じており、転写可能領域のパターンと酷似していた。(A-C) 対数増殖期のHSR-CFP 株 (D) 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のActD 処理を4時間行ったHSR-CFP 株、(E) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のActD 処理を4時間行ったHSR-CFP 株を固定し、2本鎖切断の指標である γH2AX を間接蛍光抗体法により検出した。(F) HSR の局在場所ごとに γH2AX と重なる点の数を計測した。

の N 末端テールがリン酸化されることが知られている。H2AX は H2A の 20% を占めるサブタイプであり、リン酸化 H2AX を γ H2AX と呼び、リン酸化特異抗体で検出することが可能である。そこで、 γ H2AX を間接蛍光抗体法で検出することにより、HSR ドメインにどのように DNA 傷害が生じているかを検討した。その結果、対数増殖期の細胞の HSR にも γ H2AX が頻繁に検出されることを見いだした (図 32A)。さらに、この HSR 上の γ H2AX のシグナルは転写特異点のパターンと類似しており、核小体内部、核小体表面では多数のシグナルが観察されたのに対し、核質に局在している HSR では、そのほとんどで 1 点のみが検出された (図 32B-C、F)。一方、2 μ g/ml ActD を加え転写を完全に阻害した場合にも γ H2AX のシグナルは残っていた (図 32E)。このことから、 γ H2AX のシグナルは転写とは無関係に生じている可能性が示唆された。この点は今後の研究課題である。

5. 2. 7 HSR の転写誘導による脱凝縮は可逆的である

HSR-CFP 株は方法の欄で解説したように、pECMS2 β プラスミドが IR/MAR プラスミドと共増幅している。pECMS2 β プラスミドは LacO 配列を持つために LacR-CFP 配列が結合し、そのために HSR がシアン色に可視化されている。さらにこのプラスミドには TRE promoter があり、それは pTet-ON プラスミドから発現した rtTA 蛋白質と Dox により誘導されて下流の配列を mRNA に転写する。そのような RNA は MS2 配列を持つために MS2-YFP 融合蛋白質が結合することにより黄色に可視化される。そこで、対数増殖期の HSR-CFP 株に pTet-On と pMS2-YFP プラスミド DNA を電ポレーション法により導入し、2.5 時間後に Dox を加えて HSR からの転写を誘導した。その結果、確かに CFP で可視化

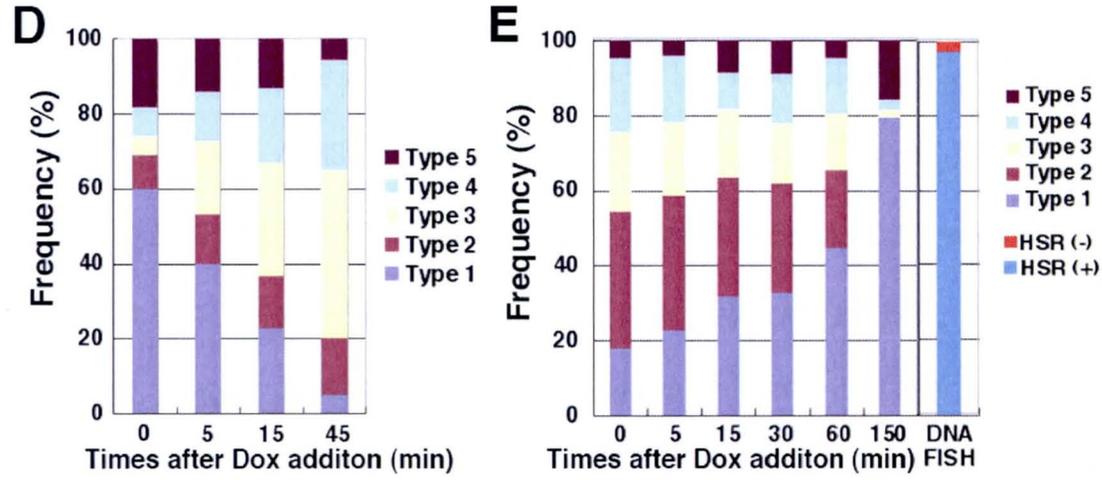
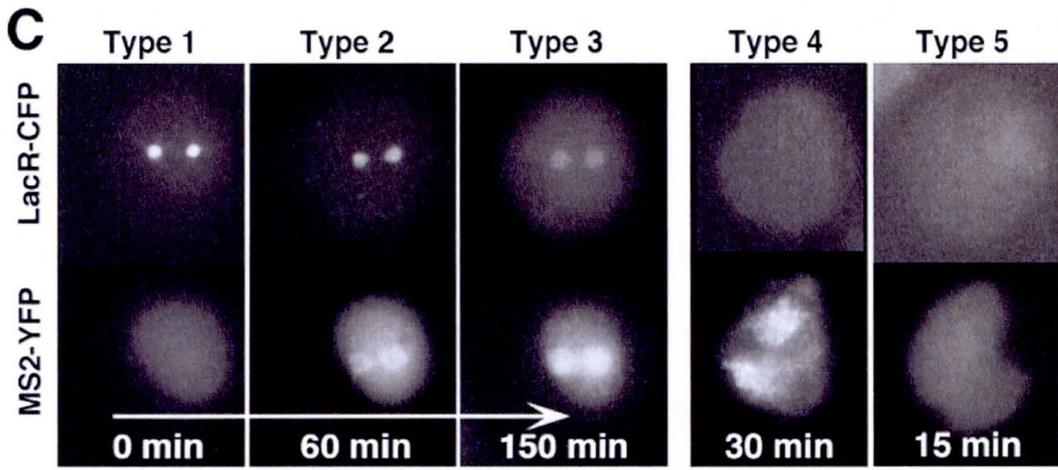
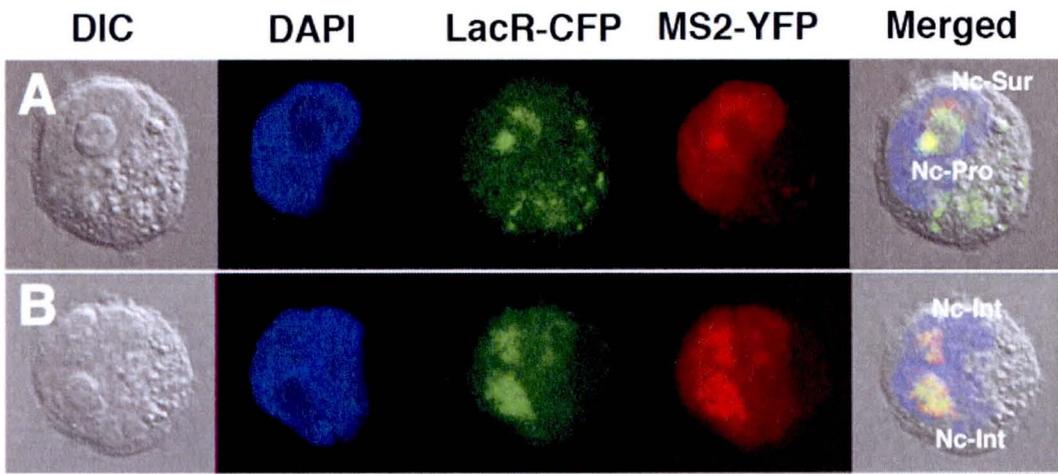


図33. HSR からの転写を誘導すると脱凝集し全体から転写産物が現れる。その後転写を抑制すると凝集した構造へ戻った。

(A, B) 対数増殖期のHSR-CFP 株で転写を誘導すると、クロマチンが脱凝集した。(C) 転写を誘導し時間経過を追って観察すると徐々に脱凝集しType 1-3へと変化した。Type 4 は転写産物が出現しているにもかかわらず、HSR が見えなくなっている細胞、Type 5 は転写産物もHSR も見られない細胞(D) Tet-On による転写誘導により時間経過を追って固定しタイプ別に計測した。(E) Tet-Off により2.5時間転写を誘導し、その後Dox 添加により転写抑制を行い、時間経過を追って固定しタイプ別に計測した。このときDNA FISH を行い97%の細胞がHSR を持つことを確認した。

された HSR から YFP で可視化された RNA が出現することが生細胞で検出できた。この方法は、HSR の局在場所によらず適用できた。すなわち、核小体の表面や内部での転写も検出可能であった (図 33A, B)。そこで、転写誘導に生じる可視化された RNA と HSR の形態について、時間経過を追って観察し、検討した。その結果、転写誘導を行う前には、LacR-CFP により可視化された HSR は凝縮して観察されたのに対し (図 33C-Type 1)、培地中に Dox を加えて転写誘導すると凝縮した HSR の表面から転写産物が出現した (図 33C-Type 2)。続けて観察すると、徐々にクロマチンが緩み、HSR 全体から転写産物が検出されるようになった (図 33C-Type 3)。また一部の HSR では、LacR-CFP で検出されていない HSR から広汎に MS2-YFP のシグナルが検出されている場合 (図 33C-Type 4) もあった。さらに、LacR-CFP でも MS2-YFP でも検出できない Type 5 もあった。そこで転写誘導後、時間経過を追って固定し、それぞれの Type 別に計測した (図 33D)。その結果、凝縮した HSR は時間経過に伴って、Type 1 から Type 4 の順番で変化することが示唆された。転写が見かけ上 HSR 全体から生じているように見えることは HSR からの *BSR* の転写 (図 27、25) とは対照的である。Type 4 の細胞は HSR が極度に脱凝縮したために、LacR-CFP のシグナルが希釈されて背景の中で見えなくなったと考えられる。この考えは Type 4 の細胞では MS2-YFP のシグナルが核内に広がっていることから示唆された。一方、DNA FISH 法により HSR を検出した場合、HSR-CFP 株で HSR を持たない細胞は 3.2% しかないことが明らかになった (図 33E 右)。この頻度は Type 5 の頻度よりも低いため、Type 5 は HSR を持たない細胞であるという説明は単純には当てはまらない。転写の停止に伴って、Type 4 の HSR は Type 5 の状態になるのかもしれない。

次に、pTet-Off をエレクトロポレーションにより導入し、2.5 時間インキュベートした細胞について検討した。そのような細胞では、Dox を加える前に TRE promoter が誘導されるため、HSR は 2.5 時間後の観察開始時には脱凝縮していた。このような細胞の培養液に、Dox を加えて転写を停止させると、Type 2、3 の頻度が減少し、Type 1 の頻度が増加した。このことは、クロマチンは徐々にもとの凝縮した構造へ戻ったことを示唆していた(図 33E)。以上の、pTet-On と pTet-Off を用いた実験から、転写誘導によるクロマチンの脱凝縮と凝縮は可逆的な過程であることを示唆している。

5.2.8 HSR からの転写を誘導し HSR が脱凝縮すると、部分的に HP1 α や tri-methyl 化 H3K9 が解離する

上記のように、この研究でもちいた HSR は典型的なヘテロクロマチンとしての性質を備えている。そのため一般的に構成的ヘテロクロマチンに結合する HP1 α が HSR ドメインに局在していたことは不思議ではない(図 34A)。一方、HP1 α は分裂期の細胞では HSR に検出されなかった。このことは HP1 α は分裂期にはヘテロクロマチンから外れるという報告と一致していた。(Fischle *et al.*, 2005) (Terada, 2006)。一方、前節で HSR は転写誘導により可逆的に脱凝縮することを示した。しかし転写誘導後、脱凝縮した HSR にはまだ HP1 α が検出された(図 34B)。そのようなシグナルは写真の下 HSR では全体に、上の HSR では部分的に重なっていた。一方、別のヘテロクロマチンマーカーである H3K9Me3 を検出して検討したところ、それは予想通り転写誘導を行っていない HSR に強く検出された(図 34C, D)。それに対し、Dox により転写を誘導すると RNA が出

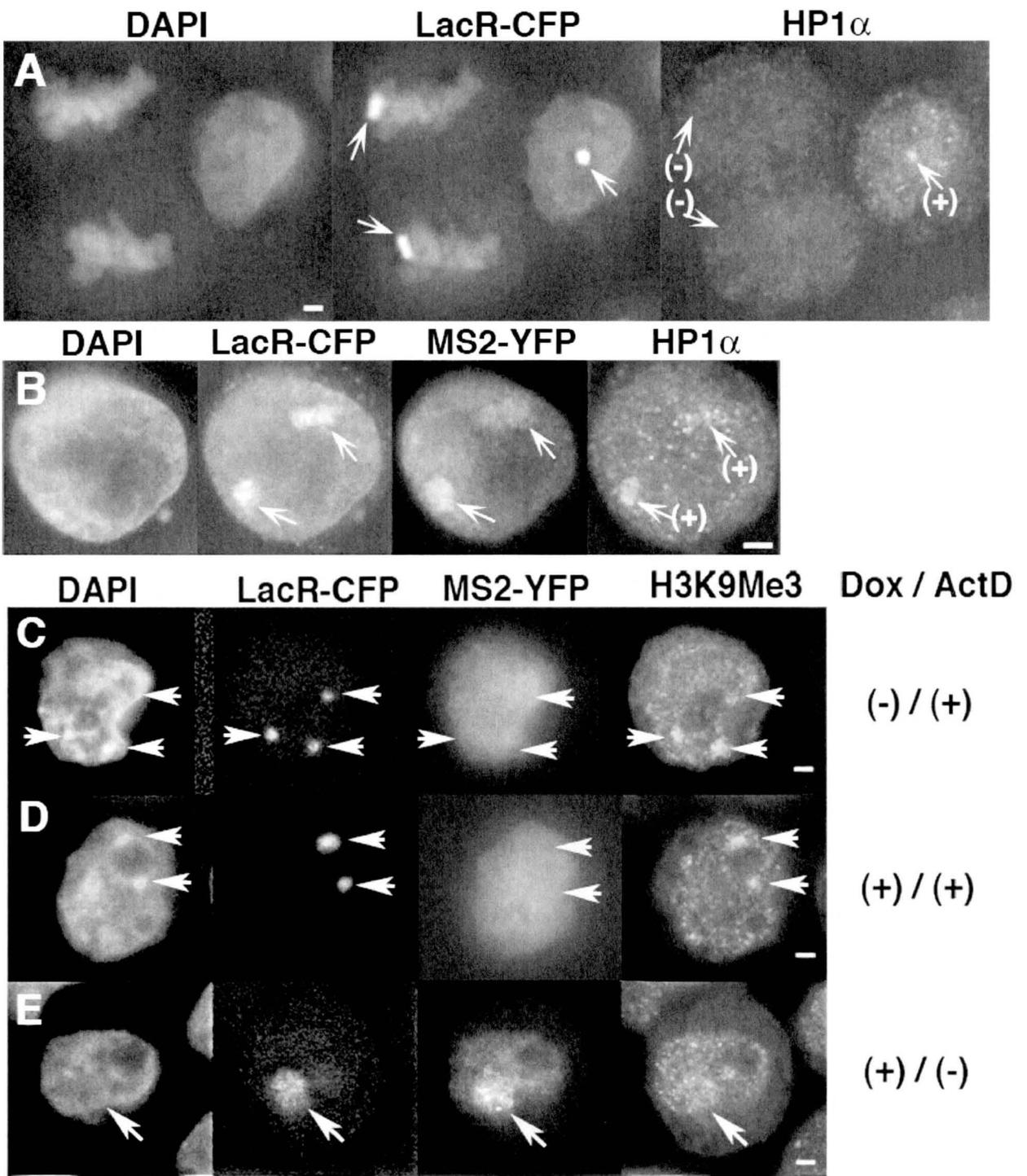


図 34. HSR からの転写を誘導し HSR が脱凝集すると HP1 α 、tri-methyl 化ヒストン H3K9 が部分的に解離する。

(A) 対数増殖期の HSR-CFP 株を用いて HP1 α を間接蛍光抗体法により検出した。HP1 α は分裂期ではクロマチンから解離するため見られない。間期核では HSR と共局在している。(B) HSR からの転写を誘導すると HSR が脱凝集し部分的に HP1 α が解離していた。(C-E) Dox を添加し 30 分間転写を誘導し。間接蛍光抗体法により、tri-methyl 化 H3K9 を検出した。HP1 α と同様、H3K9Me3 は部分的に解離していた。一方、2 μ g/ml ActD を加え転写を阻害した場合は凝集したままで tri-methyl 化 H3K9 は残っていた。

現するが、この際 H3K9Me3 は脱凝縮した HSR に依然として結合していることを見いだした (図 34E)。興味深いことには、HSR 中に分散した H3K9Me3 は均一ではなく部分的であった。これはヘテロクロマチンの性質が部分的に失われ、その部分が転写されるようになるという可能性を示唆していた。このことは後に議論する。

5.2.9 HSR 内の誘導プロモーターの発現を誘導すると、シスに位置する非誘導性プロモーターからの転写も増加した

次に、誘導プロモーターの発現誘導により HSR が脱凝縮することが、HSR 上の非誘導性 SR α プロモーターからの *BSR* 遺伝子の転写に及ぼす影響について検討した。すなわち、HSR-CFP 株に pTet-Off をトランスフェクションし、Dox なしで 3 日間培養することにより TRE プロモーターからの転写を活性化した。その後、HSR DNA と *BSR* RNA を同時に検出した。*BSR* RNA は FISH 法でしか検出できず、その条件では LacR-CFP のシグナルが消えてしまうため、HSR DNA は FISH 法により検出した。その結果、多くの HSR 上にたくさんの *BSR* RNA が検出された (図 35A, B)。これは図 27、25 の結果とは対照的であった。このことは、誘導プロモーターにより HSR ドメインを脱凝縮すると、同じ HSR 内にある非誘導性プロモーターの活性も高くなることを示唆している。この点を、より定量的に評価するために、エレクトロポレーションにより形質転換された細胞を MACS 細胞分離システムを用いて分離した。この細胞から DNA と RNA を回収し、real-time PCR 量を計測した。その結果図 35C のように TRE プロモーターからの転写誘導を行った細胞では転写誘導を行わなかった細胞と比べて *BSR*

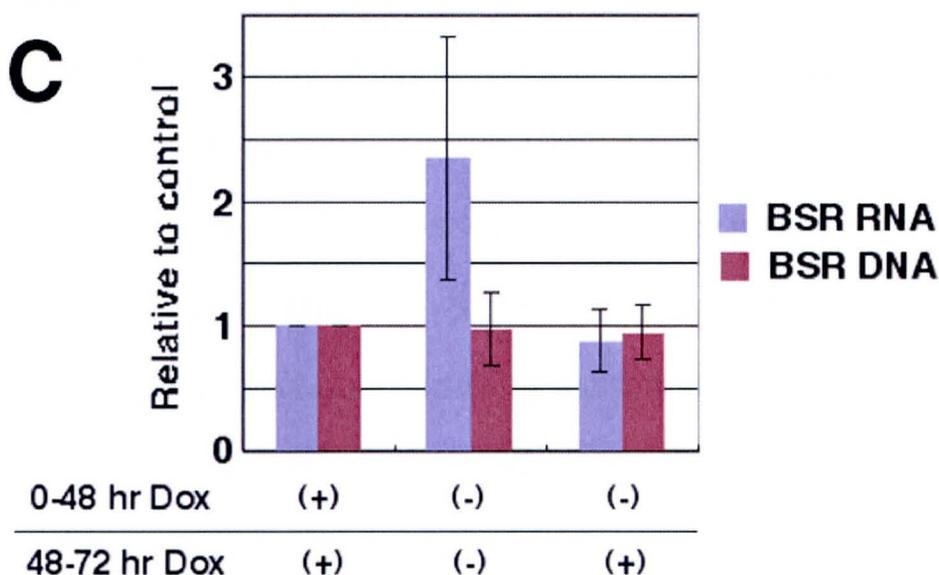
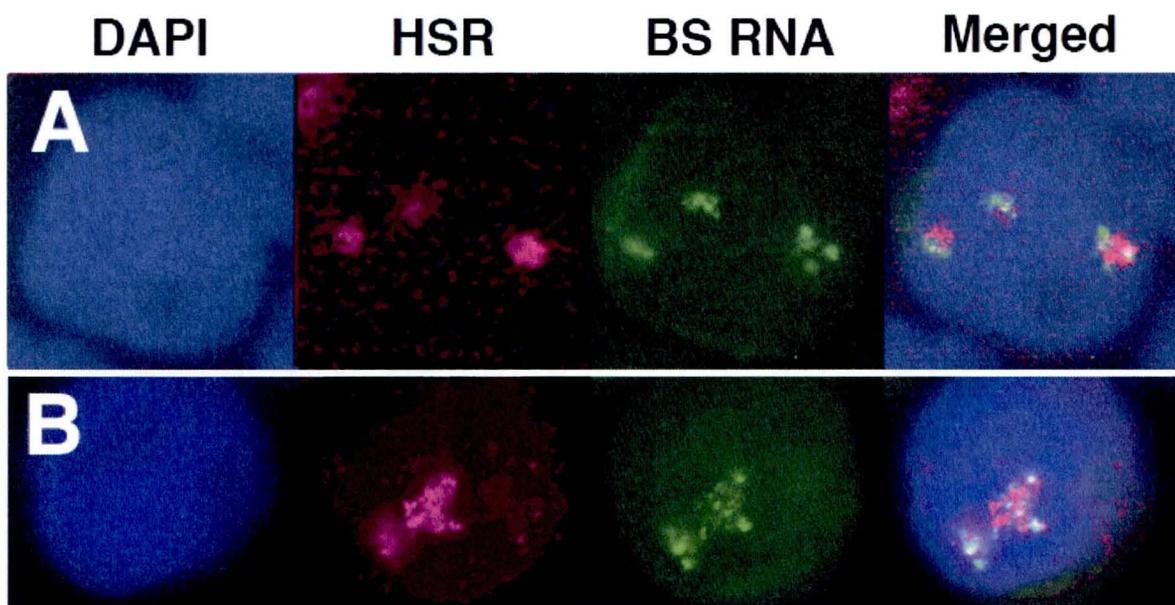


図35. HSRからの転写を誘導しHSR が脱凝集すると、シスの恒常発現プロモータからの転写が増加した。

対数増殖期のHSR-CFP 株を用いてHSR からの転写を誘導し、その後RNA DNA 同時FISH 法によりBSR RNA とHSR を検出した。(A,B)転写産物は点状にHSR の様々な部位で検出された。(C) Tet-Off による転写抑制を3日間行ったもの、3日間転写を誘導し続けた細胞、2日間誘導した後、転写を阻害した細胞からDNAとRNAを回収し、 β -actin を内部標準としたReal-time PCR 法により転写産物量、DNAコピー数を計測した。2日目にMACS colume による一過性発現細胞を選択した。選択率は70-80%であった。同じ実験を3回行い、標準偏差を求めた。

RNA 量が 2 倍以上に増加していた。以上のことから TRE からの転写誘導によって HSR が脱凝縮した結果、シスに位置する非誘導性 SR α プロモーターからの転写が活性化されることが示唆された。このことは、凝縮した HSR ドメイン内の BSR 遺伝子は、転写に必要な蛋白質がアクセスできるようになったため、転写活性化したと考えられる。

5.3 考察

本研究ではプラスミド配列からなる長大で均質な人工 HSR を用いることで、ヘテロクロマチンからの転写に関するいくつかの発見が得られた。初めに、非誘導性 SR α プロモーターからの転写は HSR ドメインの foci として検出される 2 ヶ程度の点でのみ活性化していることが示唆された (図 27, 25)。そして、この foci では RNA polymerase II により新規に転写されていることを示した (図 30)。本研究では試験的に BSR RNA の転写について検討した。しかしその RNA は別の配列から転写された RNA であるかもしれない。なぜならば、最近、ヘテロクロマチン化されたサテライト DNA 配列は複数の転写開始サイトから転写されることが報告されたためである (Lu and Gilbert, 2007)。さらにそれは、我々がこの HSR を用いて以前に報告したことと関連するかも知れない。すなわち、IR/MAR プラスミドから HSR が形成される過程は、プラスミドにコードされたプロモーターに依存しない転写に影響される、という結果である (Hashizume and Shimizu, 2007)。序論に示したように、ヘテロクロマチンからの RNA polymerase II による転写がそのサイレンシング維持に必要であることが次々と報告されている。しかし、*in situ* でのヘテロクロマチン化された導入配列からの RNA の

検出はこれまで行われていない。それは本研究で使用した IR/MAR プラスミドが効率よく遺伝子増幅を誘導し、巨大な増幅構造を形成することができるためである。もし短い配列からの *in situ* 検出では DNA と RNA が重なるだけという結果になってしまう。Lu らは (Lu and Gilbert, 2007) RNA FISH 法により pericentric satellite repeat からの転写産物を検出したとき RNA のシグナルは点状に pericentric ヘテロクロマチンの表面に検出されることを示した。これは本研究の結果と一致している。それゆえ本研究で観察した特異点からの転写はヘテロクロマチン一般に見られる現象と考えられる。本研究では均一なプラスミド配列から構成された HSR を用いた(Shimizu *et al.*, 2003)。つまり転写特異点は遺伝的なものではなく、ある種のエピジェネティックな機構により決定されたものであるはずである。さらに転写特異点は細胞周期を通じて変化せず、複製後にも維持されていることが示唆された。このことは、転写特異点はヘテロクロマチンと染色体碗との間をつなぐ領域ではないかと考えられた。

一方、HSR が核小体表面、核小体内部へ局在する場合 HSR 全体から転写が生じていた。一般的に核小体周辺部はよく知られたヘテロクロマチン領域であり、多くの構成的ヘテロクロマチン、機能的ヘテロクロマチンが局在している。最近、女性の体細胞における不活性化 X 染色体は中期 S から後期 S にかけて周期的に核小体に近接することが報告された(Zhang *et al.*, 2007)。さらに本研究とは異なる方法で形成した導入遺伝子からなる小さな HSR は S 期に核小体に近接することが以前報告されている(Li *et al.*, 1998)。これらの報告と同様、本研究で用いた HSR も、後期 S の間に核小体表面へ局在することが示唆された。以前の報告によれば “perinucleolar component (PNC)” では RNA polymerase

II または III により転写され、PNC は RNA 代謝に関与していることが示唆されている(Huang *et al.*, 1998)。このことは RNA polymerase II/III による転写が核小体表面に局在するために必要であるという本研究での結果と一致する。上記したように多くの研究で RNA polymerase II による転写がヘテロクロマチン維持に必要であると報告されている。これらのことは核小体表面での転写はヘテロクロマチン維持に関与している可能性を示唆している。また以前から繰り返し Satellite DNA が核小体内部へ局在することが報告されているが、その現象の意義は未だ解明されていない(Rae and Franke, 1972) (Jacob *et al.*, 1974) (Demirtas *et al.*, 2000)。本研究で HSR は早期 S に核小体内部へ入り込んでいること、その転写には RNA polymerase I が必要であることを示した。この核小体内部への局在は細胞周期、および RNA polymerase が異なることから、核小体表面へ局在する場合とは異なる生理的意味を持つと考えられる。この局在による転写活性化の意義を明らかにすることは今後の重要な研究課題である。

最近、ホルモンによって転写が誘導される際にプロモーター領域でトポイソメラーゼ II により一過性に 2 本鎖切断が生じることが転写に必要である報告された(Ju *et al.*, 2006)。また 2 本鎖切断が生じた領域に HP1 β が結合しクロマチンが再構成されるという報告がある(Ayoub *et al.*, 2008)。一方、放射線照射により 2 本鎖切断が生じる領域はほとんどがユークロマチンであること(Cowell *et al.*, 2007)、そして 2 本鎖切断が生じた領域では転写が抑制されることが報告された(Solovjeva *et al.*, 2007)。これらのことから 2 本鎖切断が生じることとヘテロクロマチン化は密接に関係していることが推察される。本研究ではその因果関係を明らかにすることはできなかったが、HSR 上に DNA 2 本鎖切断の指標である

γ H2AX が転写と酷似したパターンで検出された (図 33)。このことは、おそらく HSR 等のヘテロクロマチンからの転写調節を解明する鍵となるはずである。

一方、HSR からの転写を誘導性プロモーターにより活性化すると HSR は緩み、転写産物は HSR 全体から出現した。これは転写誘導によりリクルートされる転写因子である VP16 の acidic activation domain (AAC) が標的配列 (TRE) に結合することで脱凝縮するという以前の報告をよく再現していた (Tumbar *et al.*, 1999)。以前、彼らは pTet-On が発現する rtTA (tet-Repressor と VP16 AAC との融合タンパク質) は標的のクロマチンを緩めることを示した (Tsukamoto *et al.*, 2000) (Janicki *et al.*, 2004)。本研究ではさらにこのプロセスが可逆的であることを示した。一方で、上記の研究では誘導により HP1 α は標的クロマチンから解離することを示したが (Janicki *et al.*, 2004)、我々の HSR では部分的にしか解離しないという点で矛盾が生じた。この矛盾はおそらく、本研究で用いた HSR は彼らの用いた HSR と比べ、はるかに巨大であることが原因であると考えられた。彼らは pECMS2 β が 200 コピーからなる HSR を用いているのに対し (Janicki *et al.*, 2004)、本研究で用いた HSR-CFP 株では数千コピーに増幅している。また HP1 α 、H3K9Me シグナルは HSR に部分的に残っていることを示した (図 35C~E)。それゆえ、HP1 α と H3K9Me3 は脱凝縮した後の巨大な HSR ドメインにまだ残っていることが示唆された。そしてそのような HSR の内部で転写が複数の foci で活性化し、その foci では以前示唆されたようにヘテロクロマチンの性質が除かれたと考えられる。このアイデアは本研究の図 35 とつじつまが合う。すなわち TRE プロモーターからの転写誘導により脱凝縮すると、HSR ドメインの非誘導性 SR α プロモーターからの遺伝子発現は増加した。そして重要なことに、その転写産物は

HSR 上に多くの点状シグナルとして検出される。一方で MS2-YFP シグナルは HSR ドメインに均一に出現する。これは上記のアイデアに反する。しかしこの検出方法はバックグラウンドが高く、部分的なシグナルがのっぺりとしたシグナルとして検出されるのかもしれない。ともかく、転写活性により HSR は緩み、大きく開いた HSR の多くの点で転写が生じた。なぜこのような特異点が生じるのかはこのトピックにおいて今後の重要な問題である。

第 6 章 本研究の意義と結語

本研究の第 3 章では、発癌過程で形成された DM と既知のプラスミド配列からなる DM の双方を対象として、微小核に取り込まれた DM が、そこで転写され、その転写産物が細胞質へ輸送されて、細胞形質に影響を与えることができることを示した。このことは、癌細胞内の DM でがん遺伝子や薬剤耐性遺伝子が遺伝子増幅している場合、そのようながんの悪性形質の獲得に重大な意味を持つ。さらに、そのような微小核内での遺伝子発現は、核内での発現に比べて活発であることが示唆され、また、ラミンで覆われることが必須であることが示された。このことは、癌細胞の形質に重大な影響を持つ遺伝子が微小核に取り込まれることで、その発現がさらに異常になる可能性を示唆している。特に、ラミンで覆われた微小核に発現が限られるという発見は、微小核がラミンに覆われる細胞周期上の位置は S 期であるため、核内に局在する場合とは異なる細胞周期で発現されるようになる可能性を示唆しているので重要である。従来までの研究では微小核に取り込まれた遺伝子からの発現は全く注目されなかったが、本研究により、そのような遺伝子発現が癌細胞の形質決定に重大な影響を及ぼし得ることが示唆された。今後、微小核が構造的に多様であることの理解を深め、そのこととの関連のもとで、微小核からの遺伝子発現が癌形質に与える影響を検討していく必要がある。

本研究の第 4 章では、微小核の細胞内動態と細胞外排出の機構を明らかにするために、DM を可視化した生細胞を用いたタイムラプス解析を中心とし

た研究を行った。その結果、DM が濃縮された微小核が細胞外へ放出される瞬間を捕らえることができた。そのタイミングは分裂期の細胞質分裂から早期 G1 の間と、間期核から突如排出されることが示唆された。

一方、DM が間期核から出芽様構造を介した微小核形成に至り、その一部は細胞外へ排出されることを明らかにした。これは以前に示唆されていた異常クロマチンを間期核から直接排除する機構によるものと考えられるがまだ不明な点が残されており、その解明は今後の課題である。

いずれの場合も微小核は細胞質膜のブレッピングに取り込まれ、その後ブレップがくびれ、細胞質に包まれた微小核が細胞外へ排出されるという点で共通していることを見いだした。細胞質膜切断に働くタンパク質は細胞質分裂時やエキソサイトーシスによる小胞の分泌時、そしてウイルスが細胞外へ放出される時に共通して利用されている。本研究で見いだしたブレッピングも同様のタンパク質により切断される可能性が高い。そのため、それらのタンパク質の局在と微小核の取り込まれたブレップの切断について解析する必要がある。

本研究により、ゲノム由来の遺伝物質が細胞外に放出される、という重大な生命現象が見いだされた。すなわち、動物細胞から遺伝物質が細胞外に放出される、ということは、ウイルスの場合以外に知られていない。このようなことが生きて増殖している細胞で生じうる、ということをはっきりとタイムラプス実験で示した例は今までにない。このような研究成果は、DM やマイクロインジェクション等で人為的に導入した DNA、ウイルスやトランスポゾン由来の DNA、あるいは染色体断片、といった「異常クロマチンを細胞外に排出する機構」が存在することを示唆している。この機構が、正常細胞でも機能しているかど

うかは不明であるが、少なくともある種の癌細胞では機能していることを本研究で示した。したがって、癌細胞から DM を濃縮した微小核が細胞外に放出され、それが周辺の細胞と細胞膜融合をすることにより、DM が細胞間で伝播する可能性が生じた。このことが実際に生じていることは、本研究内でも例数は少ないが示唆した。癌組織内で癌細胞集団が多様化していくことが知られているが、それはこのような微小核放出を介した染色体外遺伝物質の細胞間伝播で説明できるかも知れない。さらに、そのような染色体外遺伝因子の細胞間水平伝播は、ウイルス、それも細胞質膜を被った DNA ゲノムのウイルス（例えばヘルペス属ウイルス）とよく似ている。したがって、そのようなウイルスが進化の過程でどのように出現してきたか、ということと関係する可能性がある。

本研究の第 5 章では、ヘテロクロマチンからの転写について、独自のモデル実験系を用いて解析した。すなわち、既知のプラスミド配列からなる巨大な人工 HSR はヘテロクロマチン化されており、このような目的の研究に理想的な実験系を提供した。そのような研究により、主として以下の成果が得られた。① HSR 内の RNA pol II による転写は、限られた特異点のみで生じていることを見いだした。② HSR は核小体の表面やその内部に局在する場合があることを見だし、そのような場所では活発にその全体から転写されることを見いだした。また、核小体の表面やその内部への局在は、それぞれ、RNA pol II/ III あるいは RNA pol I の活性に依存しており、特定の細胞周期で頻繁に観察された。③ 転写誘導によるヘテロクロマチン脱凝縮は可逆的であり、多数の転写部位が出現するようになって、誘導していない遺伝子も転写されるようになること、等を見いだした。以上のように、本研究の成果は、多くの新発見を含んで

いる。ヘテロクロマチンの形成と維持は、細胞にとって必須である。最近、ヘテロクロマチンからの RNA pol II による転写がヘテロクロマチンの形成と維持に必要である、という報告が世界の多数の研究室からなされ、大きな注目を集めている。本研究から得られた新知見は、そのような重要な研究の流れに貢献できると考えられる。

参考文献

- Ayoub, N., Jeyasekharan, A.D., Bernal, J.A., and Venkitaraman, A.R. (2008). HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* 453, 682-686.
- Ballestas, M.E., Chatis, P.A., and Kaye, K.M. (1999). Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 284, 641-644.
- Beland, J.L., Longo, J.A., and Hahn, P.J. (1993). CpG island mapping of a mouse double-minute chromosome. *Molecular and cellular biology* 13, 4459-4464.
- Benner, S.E., Wahl, G.M., and Von Hoff, D.D. (1991). Double minute chromosomes and homogeneously staining regions in tumors taken directly from patients versus in human tumor cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 2, 11-25.
- Brison, O. (1993). Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1155, 25-41.
- Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316, 1908-1912.
- Carroll, S.M., DeRose, M.L., Gaudray, P., Moore, C.M., Needham, V., Von Hoff, D., and Wahl, G.M. (1988). Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. *Molecular and cellular biology* 8, 1525-1533.
- Chen, E.S., Zhang, K., Nicolas, E., Cam, H.P., Zofall, M., and Grewal, S.I. (2008). Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature*

451, 734-737.

Cowell, I.G., Sunter, N.J., Singh, P.B., Austin, C.A., Durkacz, B.W., and Tilby, M.J. (2007). gammaH2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PLoS ONE* 2, e1057.

Cowell, J.K. (1982a). Appearance of double minute chromosomes in somatic cell hybridisation experiments involving the HAT selection system. *Cell Biol Int Rep* 6, 393-399.

Cowell, J.K. (1982b). Double minutes and homogenously staining regions: gene amplification in mammalian cells. *Ann. Rev. Gen.* 16, 21-59.

Demirtas, H., Candemir, Z., Cucer, N., Imamoglu, N., Donmez, H., and Bokesoy, I. (2000). Essay on the nucleoli survey by the alpha- and beta-satellite DNA probes of the acrocentric chromosomes in mitogen-stimulated human lymphocytes. *Annales de genetique* 43, 61-68.

Eckhardt, S.G., Dai, A., Davidson, K.K., Forseth, B.J., Wahl, G.M., and Von Hoff, D.D. (1994). Induction of differentiation in HL60 cells by the reduction of extrachromosomally amplified c-myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6674-6678.

Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116-1122.

Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T., and Oshimura, M. (2004). Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nature cell biology* 11, 11.

Gasser, S.M. (2002). Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science* 296, 1412-1416.

Haaf, T., Raderschall, E., Reddy, G., Ward, D.C., Radding, C.M., and Golub, E.I. (1999). Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei. *J Cell Biol* 144, 11-20.

Hando, J.C., Tucker, J.D., Davenport, M., Tepperberg, J., and Nath, J. (1997). X chromosome inactivation and micronuclei in normal and Turner individuals. *Hum Genet* 100, 624-628.

Hashizume, T., and Shimizu, N. (2007). Dissection of mammalian replicators by a novel plasmid stability assay. *Journal of cellular biochemistry* 101, 552-565.

Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P., and MacGregor, J.T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen* *18*, 277-291.

Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W., and Salamone, M.F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation research* *123*, 61-118.

Ho, C.Y., Murnane, J.P., Yeung, A.K., Ng, H.K., and Lo, A.W. (2008). Telomeres acquire distinct heterochromatin characteristics during siRNA-induced RNA interference in mouse cells. *Curr Biol* *18*, 183-187.

Huang, S., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., and Spector, D.L. (1998). The perinucleolar compartment and transcription. *J Cell Biol* *143*, 35-47.

Itoh, N., and Shimizu, N. (1998). DNA replication-dependent intranuclear relocation of double minute chromatin. *J Cell Sci* *111*, 3275-3285.

Jacob, J., Gillies, K., Macleod, D., and Jones, K.W. (1974). Molecular hybridization of mouse satellite DNA-complementary RNA in ultrathin sections prepared for electron microscopy. *J Cell Sci* *14*, 253-261.

Janicki, S.M., Tsukamoto, T., Salghetti, S.E., Tansey, W.P., Sachidanandam, R., Prasanth, K.V., Ried, T., Shav-Tal, Y., Bertrand, E., Singer, R.H., and Spector, D.L. (2004). From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell* *116*, 683-698.

Ju, B.G., Lunyak, V.V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2006). A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* *312*, 1798-1802.

Kanda, T., Sullivan, K.F., and Wahl, G.M. (1998). Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol* *8*, 377-385.

Kaneko, H., Igarashi, K., Kataoka, K., and Miura, M. (2005). Heat shock induces phosphorylation of histone H2AX in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* *328*, 1101-1106.

Kloc, A., Zaratiegui, M., Nora, E., and Martienssen, R. (2008). RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication. *Curr Biol* *18*, 490-495.

Lane, J.D., Allan, V.J., and Woodman, P.G. (2005). Active relocation of chromatin and

endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. *J Cell Sci* 118, 4059-4071.

Lehman, C.W., and Botchan, M.R. (1998). Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci Usa* 95, 4338-4343.

Levan, A., and Levan, G. (1978). Have double minutes functioning centromeres? *Hereditas* 88, 81-92.

Li, G., Sudlow, G., and Belmont, A.S. (1998). Interphase cell cycle dynamics of a late-replicating, heterochromatic homogeneously staining region: Precise choreography of condensation/decondensation and nuclear positioning. *J Cell Biol* 140, 975-989.

Lu, J., and Gilbert, D.M. (2007). Proliferation-dependent and cell cycle regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin. *J Cell Biol* 179, 411-421.

Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M., and Nicolas, J.C. (1999). Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol* 73, 4385-4392.

Nath, J., Tucker, J.D., and Hando, J.C. (1995). Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men. *Chromosoma* 103, 725-731.

Rae, M.M., and Franke, W.W. (1972). The interphase distribution of satellite DNA-containing heterochromatin in mouse nuclei. *Chromosoma* 39, 443-456.

Ragoczy, T., Bender, M.A., Telling, A., Byron, R., and Groudine, M. (2006). The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes & development* 20, 1447-1457.

Shimizu, N., Hanada, N., Utani, K., and Sekiguchi, N. (2007a). Interconversion of intra- and extra-chromosomal sites of gene amplification by modulation of gene expression and DNA methylation. *Journal of cellular biochemistry* 102, 515-529.

Shimizu, N., Hashizume, T., Shingaki, K., and Kawamoto, J.K. (2003). Amplification of plasmids containing a mammalian replication initiation region is mediated by controllable conflict between replication and transcription. *Cancer research* 63, 5281-5290.

Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., and Wahl, G. (1998). Selective Entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S-phase. *Journal of Cell Biology* 140, 1307-1320.

- Shimizu, N., Kamezaki, F., and Shigematsu, S. (2005a). Tracking of microinjected DNA in live cells reveals the intracellular behavior and elimination of extrachromosomal genetic material. *Nucleic acids research* *33*, 6296-6307.
- Shimizu, N., Kanda, T., and Wahl, G.M. (1996). Selective capture of acentric fragments by micronuclei provides a rapid method for purifying extrachromosomally amplified DNA. *Nat Genet* *12*, 65-71.
- Shimizu, N., Misaka, N., and Utani, K. (2007b). Nonselective DNA damage induced by a replication inhibitor results in the selective elimination of extrachromosomal double minutes from human cancer cells. *Genes, chromosomes & cancer* *46*, 865-874.
- Shimizu, N., Nakamura, H., Kadota, T., Kitajima, K., Oda, T., Hirano, T., and Utiyama, H. (1994). Loss of amplified c-myc genes in the spontaneously differentiated HL-60 cells. *Cancer research* *54*, 3561-3567.
- Shimizu, N., Ochi, T., and Itonaga, K. (2001). Replication timing of amplified genetic regions relates to intranuclear localization but not to genetic activity or G/R band. *Exp Cell Res* *268*, 201-210.
- Shimizu, N., Shimura, T., and Tanaka, T. (2000). Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei *Mutation research* *448*, 81-90.
- Shimizu, N., and Shingaki, K. (2004). Macroscopic folding and replication of the homogeneously staining region in late S phase leads to the appearance of replication bands in mitotic chromosomes. *J Cell Sci* *117*, 5303-5312. Epub 2004 Sep 5328.
- Shimizu, N., Shingaki, K., Kaneko-Sasaguri, Y., Hashizume, T., and Kanda, T. (2005b). When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res* *302*, 233-243.
- Solovjeva, L.V., Svetlova, M.P., Chagin, V.O., and Tomilin, N.V. (2007). Inhibition of transcription at radiation-induced nuclear foci of phosphorylated histone H2AX in mammalian cells. *Chromosome Res* *15*, 787-797.
- Tanaka, T., and Shimizu, N. (2000). Induced detachment of acentric chromatin from mitotic chromosomes leads to their cytoplasmic localization at G1 and the micronucleation by lamin reorganization at S phase. *J Cell Sci* *113*, 697-707.
- Terada, Y. (2006). Aurora-B/AIM-1 regulates the dynamic behavior of HP1alpha at the G2-M transition. *Molecular biology of the cell* *17*, 3232-3241.
- Thompson, C.B., Challoner, P.B., Neiman, P.E., and Groudine, M. (1985). Levels of

c-myc oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle. *Nature* 314, 363-366.

Tsukamoto, T., Hashiguchi, N., Janicki, S.M., Tumber, T., Belmont, A.S., and Spector, D.L. (2000). Visualization of gene activity in living cells. *Nature cell biology* 2, 871-878.

Tucker, J.D., Nath, J., and Hando, J.C. (1996). Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes. *Hum Genet* 97, 471-475.

Tumber, T., Sudlow, G., and Belmont, A.S. (1999). Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J Cell Biol* 145, 1341-1354.

Utani, K., Kawamoto, J.K., and Shimizu, N. (2007). Micronuclei bearing acentric extrachromosomal chromatin are transcriptionally competent and may perturb the cancer cell phenotype. *Mol Cancer Res* 5, 695-704.

Valgardsdottir, R., Chiodi, I., Giordano, M., Rossi, A., Bazzini, S., Ghigna, C., Riva, S., and Biamonti, G. (2008). Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells. *Nucleic acids research* 36, 423-434.

Von Hoff, D., Needham-VanDevanter, D., Yucel, J., Windle, B., and Wahl, G. (1988). Amplified human MYC oncogenes localized to replicating submicroscopic circular DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4804-4808.

Von Hoff, D.D., Forseth, B., Clare, C.N., Hansen, K.L., and VanDevanter, D. (1990). Double minutes arise from circular extrachromosomal DNA intermediates which integrate into chromosomal sites in human HL-60 leukemia cells. *J Clin Invest* 85, 1887-1895.

Von Hoff, D.D., McGill, J.R., Forseth, B.J., Davidson, K.K., Bradley, T.P., Van Devanter, D.R., and Wahl, G.M. (1992). Elimination of extrachromosomally amplified MYC genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8165-8169.

Zhang, L.F., Huynh, K.D., and Lee, J.T. (2007). Perinucleolar targeting of the inactive X during S phase: evidence for a role in the maintenance of silencing. *Cell* 129, 693-706.

謝辞

本研究は、2004年から2009年までの5年間、生物圏科学研究科生物資源科学清水研究室にて行ったものです。研究に際して多数の方々に御指導、御協力をいただきました。紙面上にて大変恐縮ですが、御礼申し上げます。

清水典明先生には研究の指導全般について、また、論文の読み方から作成法、さらに細部にわたって種々の実験指導や心構えなどあらゆる面で御指導いただきまして、心から感謝しております。

学位論文の作成・審議の際、古澤 修一先生、水田 啓子先生には貴重なご意見と、温かい励ましの御言葉を賜りましたこと大変感謝しております。

pECMS2 β を供与していただきました米国コールドスプリングハーバー研究所の Janicki 博士、pmRFP-Emerin を供与していただきました未来情報技術研究所の原口徳子博士、pNeo.Myc2.4 を供与していただきました米国ライト州立大学の Michael Leffak 博士、pSFV dhfr を供与していただきました米国ソーク研究所の John Kolman 博士と Geoffrey M. Wahl 博士に御礼申し上げます。

同じ実験棟の小南 思郎先生、山崎 岳先生、および宗綱栄二さんをはじめとする小南、山崎研究室の方々との交流は研究面でも良い刺激となりました。また、上領 達之先生、河原 明先生、彦坂 暁先生、手島 圭三先生、平野 哲男先生、斉藤 祐美子先生を初めとする化学系、生物系諸先生及び各研究室のみなさまに篤く御礼申し上げます。

行動科学講座事務室の方々にも、快適な研究環境を整えて下さいましたことを心より感謝致します。

当研究室の、原田清佑さん、内田将文さん、河野由香さん、高浪徹也さん、岡本敦志さん、桑原文乃さんには、研究生活、私生活ともに大変お世話になりました。また、当研究室の卒業生である、河本淳子さん、新垣健太さん、橋詰俊彦さん、亀崎史恵さん、笹栗由紀子さん、花田直之さん、野田恵一郎さん、見坂直美さん、関口直樹さんにも大変お世話になりました。

最後になりましたが、ここまで私を支えてくれた友人、先輩、そして家族に深く感謝します。