

ファイバー-FISH と複製フォークの検出

三重大学大学院生物資源学研究所
分子細胞生物学研究室
奥村克純、齋藤辰朗、杉村和人

はじめに

いわゆる遺伝子の染色体マッピング法として 1980 年代終わり頃に登場した FISH は、標本作製法を含め様々な改良がなされてきた。SKY などヒトやマウスの全染色体を染め分け、転座などをマルチカラーで一挙に判定できる手法から、質の高い個別染色体ペインティングプローブを用いたゲノムの核内配置のダイナミクスを解析する手法、ゲノムを核から引き出して DNA ファイバー上で高解像度に解析できる手法、また転写物やそのプロセッシングを検出する手法、さらにはこれらをタンパク質の免疫染色と組み合わせる手法に至るまで多様に技術開発・改良が進んできた。Live cell imaging 技術が進展する中、FISH は一見時代遅れと考えてしまう研究者もいるかもしれないが、工夫次第で核ダイナミクス解析の極めて有効なツールとして利用できる。今や基本的な FISH は誰もが知るところとなり、他の分子生物学の手法と同様に生命科学研究の基本ツールのように見えるが、職人芸的なところもあって現実にはプロトコール通りにやっても必ずしもうまくいかないことも事実である。本稿では、筆者のグループで行っている FISH を用いる核ダイナミクス解析のうち、特に DNA ファイバーを用いる方法を中心に、総説等では述べられない技術的なポイントや留意点を解析例とともに紹介する。その他、増幅系を用いる高感度 FISH についても言及する。

DNA ファイバー-FISH と複製フォークの可視化

細胞を市販の特殊被覆していないスライドガラスに滴下し、風乾後 SDS 入りの溶解液に浸して細胞を溶かしスライドガラスを傾ける。核内 DNA は溶解液の流れに乗って展開され、はだかの二重らせんとしてスライドガラスに張りつく。あとは変性させて二重らせんを開き通常の FISH をやれば、染色体上ではクリアな

点状の蛍光シグナルとして検出されたプローブでもサイズに応じたライン状蛍光シグナルとして検出される。これで数兆百 kb から 1Mb ぐらいまでのゲノム領域が解析できる。一見容易であるが、実際は変性等の操作時に DNA ファイバーが細かく寸断され、ライン状といってもドットの連なりで、時にはその間隔も広く解析の妨げになる(図 1a)。これは以下に述べるファイバー上のシグナル検出で常に問題となるポイントである。熱、酸よりもアルカリ変性がライン状の質の高い蛍光シグナルを得るのによいとされるがケースバイケースで、目的に応じた条件検討を行う必要がある。

一方、複製フォークを DNA ファイバー上に可視化する試みは 1960 年代のファイバーオートラジオグラフィ(RI 標識チミジンを hot ラベル、warm チェイスの二段階で複製標識)に始まる。その後、1980 年代後半に BrdU を取り込ませ、複製フォークの進行方向はわからないもののファイバー上に複製部位を蛍光検出する方法が報告された。さらに CldU、IdU を染め分ける抗 BrdU 抗体の開発で複製フォークの進行方向も判定できるようになり、RI では検出に数ヶ月も要したのが数時間に短縮された。しかしハロゲン化ヌクレオシドによる方法の問題点は、修飾塩基の検出に DNA の変性が必要で、検出されるシグナルはやはりファイバー-FISH と同様にドットの連なりとなってしまう(図 1b)。また、培地に加えるヌクレオシドの濃度に依存して S 期の進行が遅くなることにも留意すべきである。

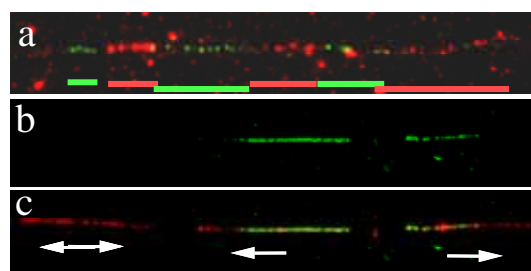


図 1 DNA ファイバー-FISH と複製フォークの検出 (a) ヒトゲノム上のコスミドクローンの検出。イメージ中のバーは各クローンの配置と検出される色の模式図。(b,c) ハロゲン化ヌクレオシドによる複製ラベルのチャンピオンデータ。細胞を BrdU、IdU で 10 分間隔で連続的に複製ラベル後 DNA ファイバーを調製し緑と赤で検出した。(b)は最初の 10 分標識のみ、(c)は両方検出。2色ラベルすることで矢印の方向に複製フォークが進と推定される。通常は(a)のような寸断シグナルとなることが多い。

留意点はあるものの DNA ファイバー上で複製部位と特定のゲノムクローンの FISH をマルチカラーで併用して検出すれば、ファイバーオートラジオグラフィーではできなかった特定部位の複製フォークや複製起点の解析が理論的には可能である。しかし、ここでさらに留意しておくべきことは、解析したいゲノム領域の細胞当たりのコピー数である。ファイバー-FISH でゲノムの構造解析をする場合はスライドガラスに塗布する細胞数を多くすればさほど困難ではなく、むしろ容易に見つけることができるが、一本のファイバーで 1Mb のゲノム領域を解析できるとしても 1 コピーの領域ならヒトゲノムでは 1/3000Mb の確率で、しかもその部位が複製中となるとさらに確率は下がり、顕微鏡下に見つけ出すのは至難の業であることが想像できよう。それでも同調系でうまくすればいくつか見つけることができるが、増幅遺伝子系や、例えば図 2c に示すようにマウスメジャーサテライト領域など反復配列をターゲットにすれば十分解析に耐える。

細胞の複製標識法としては BrdU などのハロゲン化ヌクレオシドやビオチン等修飾ヌクレオチド、蛍光標識ヌクレオチドが用いられるが、後者は検出に DNA の変性を必要とせず、ファイバー上に寸断のない高質の蛍光シグナルが得られる。しかし、ヌクレオチドは培地に加えただけでは一般的に細胞内に取り込まれず、その利用はマイクロインジェクションや膜透過性をよくした細胞、ツメガエル等の *in vitro* の系に限られる。ではビオチン等修飾ヌクレオチドを用いればとなるが、大きな修飾基がついているヌクレオチドが細胞膜を透過するのか、透過しても細胞内ヌクレオチドに変換されるのかなど考慮すべき点があり、現状ではうまくいっていない。筆者らは、微細なガラスビーズで細胞をスクラッチして隙間から修飾ヌクレオチドを細胞内に入れるビーズローディングや、細胞を一時的に低張状態にしてヌクレオチドを移入するハイポトニックシフトを用いている。特に後者では、ほぼすべての細胞に移入でき、ヌクレオチド濃度も均一に近く、さらに浮遊系の細胞にも用いることができ使いやすい。この方法を用いて複製標識後 DNA ファイバー標本を作製し、複製フォークを検出した結果、驚くべきことに図 2a に示すような流れ星様の蛍光を観察し、二段階の複製標識を使わずとも単色蛍光ラベルで複製フォークの進行方向を判定出来ることがわかった。これは核内に入

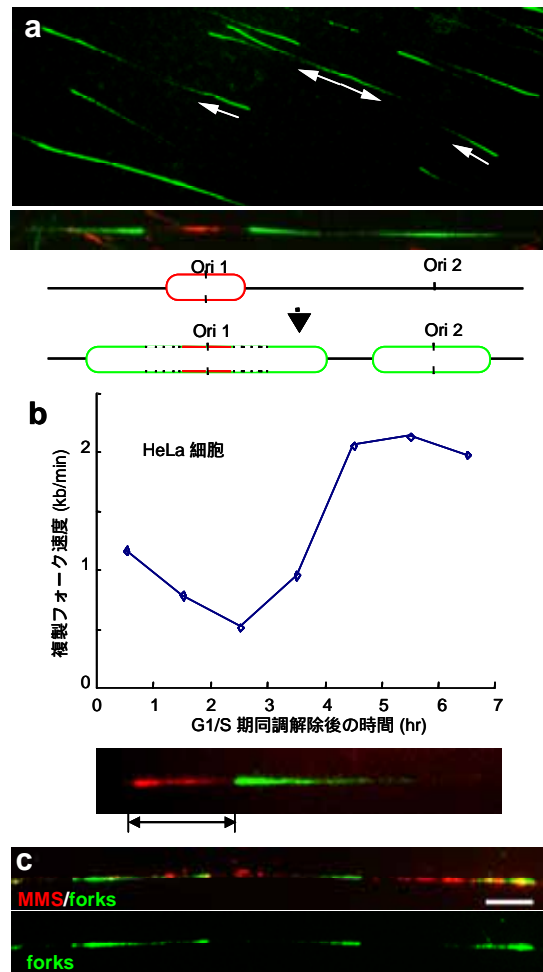


図2 修飾ヌクレオチドによって複製標識された DNA ファイバー上の複製フォークの検出

(a) マウス線維芽細胞 m5S を Biotin-dUTP (2 色の場合 Digoxigenin-dUTP を併用) で複製標識後 DNA ファイバーを調製し、蛍光検出した顕微鏡像。矢印は複製フォークの進行方向を示す。下のイメージは 2 色標識で図は複製起点 ori の存在と複製ラベルの進行過程の推定。

(b) S 期の進行に伴う複製速度。m5S 細胞を G1/S に同調し、リリース後各時間に 2 色で複製ラベルして検出した。下のイメージに示すように 2 色目ラベルまでに要した時間当たりの複製進行距離(矢印間)で算出。

(c) FISH と複製フォークの併用。マウスメジャーサテライト(MMS)を DNA ファイバー上に FISH 検出(赤)し、そのファイバー上の複製フォークを上記の方法で検出(緑)した。下は複製ラベルのみのイメージ。

った修飾ヌクレオチドが複製の進行に伴って消費されるか、拡散あるいは代謝され複製鎖に取り込まれる確率が下がるためと考えられるが、深く追求していない。いずれにしろ DNA ファイバー上に高質の蛍光シグナルが検出でき、二種のヌクレオチドを使い、またそれらの濃度を変えて使うことで複製起点の高解像度の解析やフォークのスピードを見ることができ(図 2b)。

少なくともS期チェックポイントは作動しないことは確認しているが、修飾基の大きいヌクレオチドを用いている点で本来の複製過程を反映しているのか、移入時に内在性のヌクレオチドプール等、核内環境が大きく変わらないかなど常に認識しておくべき留意点があるが、この方法には核内複製 foci の検出が非変性で行え、タンパク質の免疫染色と併用する場合なども含め、数多くのメリットがある。

上述の修飾ヌクレオチドによる複製標識と FISH を併用して特定のゲノム領域のフォークの進行をみる場合、FISH 検出にはやはり DNA 変性が必要となり、結果として寸断された蛍光シグナルとなってしまふ。しかし条件を選べば、FISH との併用は十分可能で、これによって特定ゲノム領域上の複製フォークの進行の様子を捉えることができた(図 2c)。

細胞から DNA を引き出すファイバーで問題となるさらなるポイントは、DNA 鎖伸展の均一性とファイバーの重なりである。顕微鏡の一視野内では伸展率はある程度均一であるが視野を変えて比較してもシグナルの長短関係は必ずしも一致しない。また、またスライドガラスに塗布する細胞数が多い場合や、少なくとも核から DNA が束になって引き出されるので、特に複製フォークと FISH を組み合わせる際には同一 DNA ファイバー上のシグナルを見ているかどうか注意を要する。これらをおある程度解決する手法として登場したのが分子コーミングである。

分子コーミング

分子コーミング[Dynamic Molecular Combing (DMC) 後に命名]の最初の報告は、Aaron Bensimon による 1994 年の Science に遡るが、定量的 DNA ファイバーマッピング(QDFM)と称した FISH によるヒトゲノムの高解像度解析への応用で有名になった。FISH についてもいくつかポイントがあるが、この方法の特に重要なポイントは、DNA を張りつける顕微鏡用カバーガラスのコーティング方法と DNA 溶液の調製法、さらに DNA 分子の引き延ばし方にある。DMC 開発者 Bensimon は QDFM の発表での扱われ方などが原因したと思われるが、当時は方法論についての情報提供や共同研究に極めて慎重かつ懐疑的であったことを記憶している。FISH を用いた応用例が彼らの手によって 1997 年の Science に掲載され、その後 DMC の開発者として認

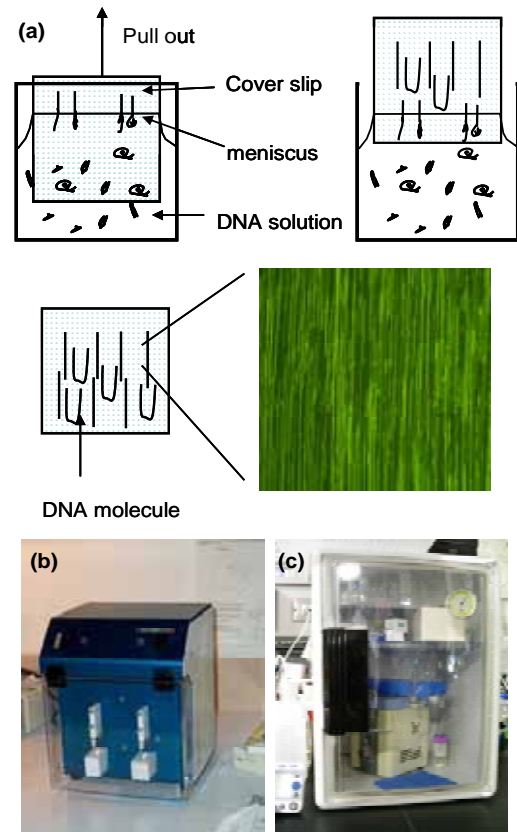


図3 分子コーミングの原理とコーミング装置
(a) コーティングしたカバーガラスを DNA 溶液に浸し、一定の速度で引き上げる。DNA 分子はメニスカスの移動にしたがい直鎖状に張りつく。下図右は張りついた DNA 分子の YOYO 染色蛍光顕微鏡像。
(b,c) コーミング装置。(b)はパストツール研製(写真は Bensimon 提供)。(c)はと都度コントロール下にペリスタポンプとガラスシリンジで引き上げ速度を調節する当研究室の装置。

知されてからは、我々の質問等に対しても実に親切である。しかも親日派であるので DMC をやりたい人はぜひ連絡を取っていただきたい。

さて DMC とは、溶液中に DNA 分子を浮遊させ、溶液にカバーガラスを浸して一定の速度で引き上げ、DNA 分子を櫛状に均一な伸びで張りつけるというものである(図 3a)。溶液中の DNA 分子の一部が、溶液から出てくる疎水的にコーティングしたガラス面にまっすぐつき、引き上げる際に溶液とガラス面にできる移動するメニスカスにかかる力を利用してガラス上に DNA 分子が張りつくらしいが、コーティング剤、DNA 溶液の pH 等、引き上げ速度は詳細に検討されている。DNA を張りつけるコーミング装置は Bensimon が開発し Pasteur 研究所から販売された(図 3b)。これについて

ずいぶん以前に問い合わせもしたが品切れで、いつ製造されるかわからない状況が続いているようである。一方で我々は藤山ら(現在国立情報学研究所)の方法を参考に図 3c のような装置を組み立てて湿度コントロール下に使用している。

コーティング法については Bensimon は酸素やアルゴンガスの出入りを電磁弁でコントロールでき、UV照射やシラン注入も可能なガラス容器を自作し、その中でシランをカバーガラスに蒸着させるコーティングガラス作製装置を組み立てている。張りつけに比べコーティングの成否は極めて微妙で、Bensimon 自身、装置の設置場所を移動するだけでも適切なコーティングを施す調整に一ヶ月ぐらいいはかかると言っている。このような理由で世界の研究者の多くはコーミング装置を購入し Bensimon からコーミング用カバーガラスの供給を受け、DNA 溶液のみ調製して張りつけている(これではコートしたガラスの供給に限られるため、思ふような実験が組めない”ばやく”ことになる)。こうなるとコーティングは誰もできないということになってしまうが、当然いくつかの研究室では独自の方法をもっている。要はガラス面をいかにほどよく疎水的にするかであり、筆者らも種々検討した。おもしろいことに文献から自動車のフロントガラス用のシラン系撥水剤で代用できることがわかり、中でも Rain-X が DNA の張りつきが最もよかった。ただ FISH や BrdU 検出など目的によって使い勝手があり、現在特に FISH 用には手間などを考え、某社に特注のアミノプロピルシラ

ンでコートしたカバーガラスを用いている(当研究室出身の香田(現在環境科学技術研究所)が藤山研で確立)。

分子コーミングを用いた研究報告は徐々に出てきているが、複製と FISH を別々に検出する場合には大きな問題はないであろう(図 4)。しかし、両者を併用し 3-4 色蛍光で検出するのはこれまで述べてきたいいくつかの問題点もかぶってくるので困難である。特定ゲノム領域上での複製解析例は、ゲノム量の小さい酵母や遺伝子増幅系がほとんどである。我々は Bensimon からコートしたガラスを送ってもらい DNA の張りつき具合や蛍光検出について比較検討したが、はずかしながらそれを使っても納得できる結果を得ていないのが現状である。Bensimon といえども低倍率の対物レンズを使用して解像度を下げ、さらにイメージプロセスしてライン状シグナルとしたり、FISH 検出で幾重にも増幅するなどして何とかすすめているのが実情と思われる。

高感度 FISH など

本稿では DNA ファイバー-FISH を中心に紹介してきたが、核ダイナミクスの解析に利用できそうなさらにいくつかの技術について簡単に紹介する。

核マトリックスは、細胞を界面活性剤処理し、さらに DNase、高塩処理してタンパクや DNA を抽出し残された画分と定義され、核の内部構造と強く相互作用しない核内成分は除かれる。DNA についてみれば 8-9 割程度除かれ、DAPI ではほとんど染まらず核マトリ

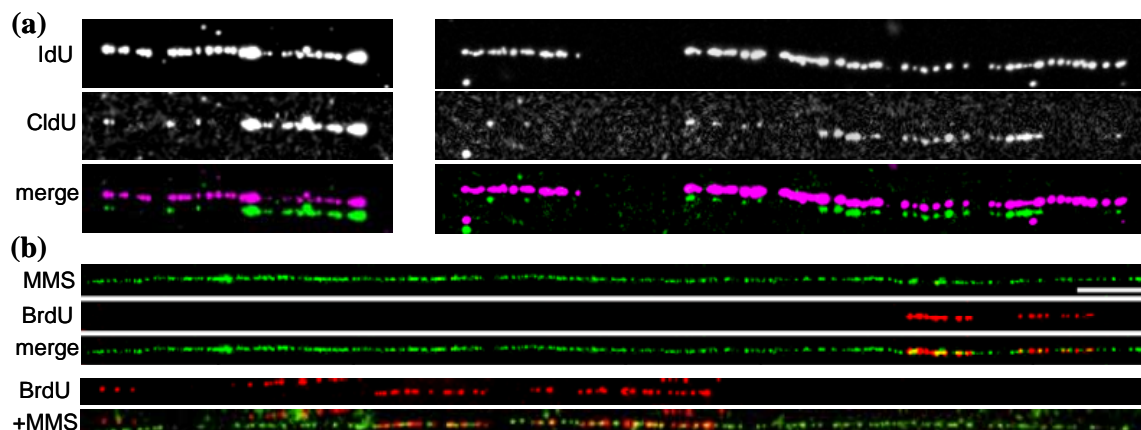


図 4 分子コーミングで張りつけたゲノム上での複製フォークと FISH 検出

(a)ヒト白血病細胞 HL60 ゲノムを IdU で 20、さらに CldU で 20 分連続ラベルし、マゼンタ、緑で検出。Merge イメージでは見やすいように CldU イメージを下方にずらしてある。(b)マウスゲノム DNA を分子コーミング法で伸展、固定し、major satellite sequence(MMS)の FISH と MMS 上における複製領域(BrdU)をそれぞれ緑と赤で蛍光検出した。bar:50kb

ックスの可視化にはラミンなどの構成成分を免疫蛍光染色で検出している。この核マトリックス標本に対してコスミドや BAC クローンを探プローブとして通常の FISH をしてもまず検出できない。一方、クロマチン DNA には 5-200kb 程度の頻度で核マトリックス結合領域 MAR (Matrix Attachment Region) が存在し、また転写や複製は核マトリックスを介して行われることが示されているので、特に転写している遺伝子領域の少なくとも一部は核マトリックスに含まれるはずである。このわずかな DNA を検出するのに TSA (Tyramide Signal Amplification Biotin system, ヒストン脱アセチル化阻害剤トリコスタチン A と混同しない) を用いることができる。TSA の原理は、ビオチン化チラミドを Peroxidase (HRP)、過酸化水素でラジカル化して検出したいプローブ付近に結合させビオチン量を増やしてシグナルを増幅するというもので、FISH でビオチン化 DNA プローブのハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン-HRP を結合させ、続いてビオチン化チラミド、過酸化水素を加えて HRP 近傍にあるチラミドのみラジカル化して付近のタンパク等に結合させる、これを蛍光標識ストレプトアビジンで検出する。この方法によれば、数百ベース程度の長さの DNA でも検出でき、複数カラーにも対応できキットとなっている。留意点は、洗浄等でバックグラウンドを低くする努力をすることで、古くなったキットの使用でうまく行かないという原因が最も多い。TSA は開発当初から核内転写部位の検出にも利用され、我々はそれほど検討したわけではないが、種々の高感度蛍光検出法として有効であろう。

最後に

今回は DNA ファイバー上の複製フォークや FISH 検出を中心にポイントと留意点を紹介した。ここでは紹

介しなかったが他にも、転写中あるいは直後の RNA やそのプロセッシングを観察できる RNA/DNA FISH、テロメアの鎖特異的に検出する CO-FISH や ReDFISH、RNA、DNA、タンパクを同時検出する系などは核ダイナミクスの解析に今後も有効な手段であることは変わりないであろう。また、DNA ファイバーではなくクロマチンファイバー上でタンパク間相互作用やヒストン修飾、さらには DNA FISH との併用を試みてもおもしろい。一方、浸透性のよいプローブとして使えるペプチド核酸(PNA)の合成も注文できるようになり、さらに次世代の核酸として LNA(locked NA)が注目を浴びている。これについては次の機会に検討結果を示したい。原理的に退色しない微粒子による蛍光 Quantum dot など、プローブ側、蛍光試薬側の開発改良も進んで、今後さらに一般化して選択肢が増えることになるう。

さて、当研究室には時々技術習得目的の訪問者がある。持ち帰られて、やってみたがうまく行かないと聞くことがある。実はうまく行っているのであるが顕微鏡が整備されていないために見えていないのである。ランプ交換やフィルター類のチェックなど顕微鏡の整備が最も重要であることを最後に強調しておきたい。

参考文献

- (1) 奥村克純 目で見る複製・転写のダイナミクス 化学と生物, 41(9), 511-517 (2003)
- (2) 杉村和人、齋藤辰朗、奥村克純 DNA ファイバー-FISH、核内 RNA/DNA の三次元 FISH クロマチン・染色体実験プロトコール (押村光雄、平岡泰、編) 実験医学別冊 羊土社 (2004)
- (3) 奥村克純 核内クロマチン構造と複製・転写のダイナミクス 生化学, 77(3), 191-199 (2005)