

1. 背景

染色体の状態から遺伝子や発現制御の仕組みを読み取る研究が盛んに行われている。しかしながら染色体は DNA が高度に折りたたまれた構造であり、そのままでは観察できない情報が多く残されている。そこで凝縮体である染色体をクロマチンファイバー (DNA とヒストンの複合体) へと展開する事で今まで解明されていない遺伝子の位置情報やヒストン修飾の有無などのエピゲノム情報を観察することができる。

当研究室では分裂酵母から得た染色体を周囲の塩濃度の変更と流れを利用して伸長した実績がある。しかしながら、細胞質が多くより複雑で、染色体の本数も多く一本の DNA 長も長い動物細胞から染色体を取り出し、流れを用いて伸長をしたことは無い。また、断片化したクロマチンファイバーを伸長して解析した手法は数多くあるが、一本の染色体を丸々クロマチンファイバー状にする研究はまだ手がつけられていない。

そこで本研究は動物細胞から染色体を単離し、オンチップで伸ばす事を目的とした。また、分化済みの MEF 細胞と未分化のマウス ES 細胞とで伸長度合いの違いが観察できるかもしれないと期待し、両方の細胞を用いて実験を行った。

2. 染色体の単離実験と確認

まずは、細胞を試験管の中で染色体を取り出す方法を試みた。バーストさせて染色体を取り出し、 Mg^{2+} を含む溶液で染色体を安定化させたうえで細胞を注射器でバラバラにする方法である。この方法で取り出した染色体を顕微鏡下で伸長した。その結果、MEF 細胞から染色体の取り出し及び回収ができたのに対し、ES 細胞からの染色体取り出しに関してはプロトコルの改変を試みても、凝集した染色体が断片化や複数の染色体で凝集した物が得られ、染色体単体の取り出し・伸長とその比較には至らなかった。

3. オンチップでの染色体取り出しと伸長

そこで、オンチップで観察しながら細胞から染色体を取り出し、伸長まで行うことで、確実に染色体と区別できる物を取り出して伸長する事にし、そのためのデバイスを作製した。(図 1) このデバイスを用いた結果、顕微鏡下でその場観察を行いながら MEF 細胞から染色体の取り出しを行う事が出来、取り出した個々の染色体を観

察する事ができた。(図 2 左) けて、周囲の塩濃度変更と制御された流れを用いて伸長まで行う事が出来た。(図 2 右) 解けるようすがリアルタイムで観察する場が整ったので、続けて ES 細胞でもオンチップでの染色体の取り出しと伸長を行う事にした。しかしながら、MEF 細胞と同じ条件で染色体を取り出す事が出来なかった。塩濃度の変更を行っても蛍光が膨潤せず、ES 細胞の場合は細胞膜以外に細胞骨格が染色体の細胞外への流失を防いでいる可能性が考察された。

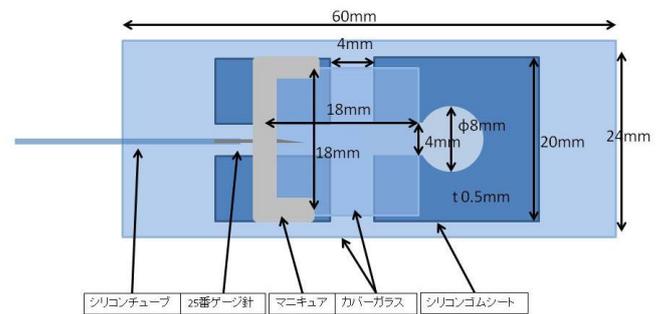


図 1 デバイス概要図

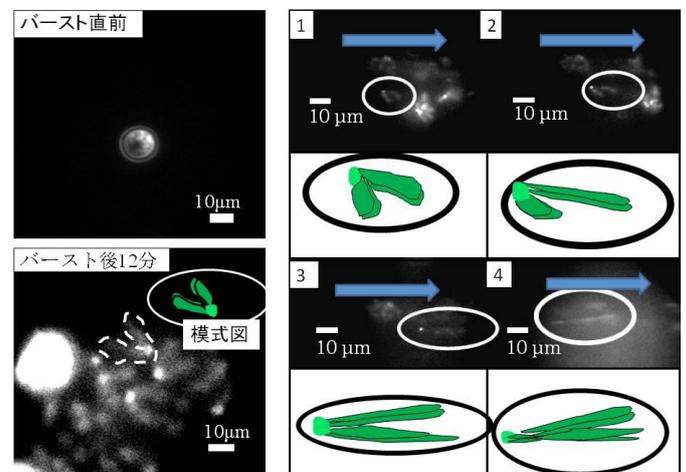


図 2 染色体の取り出し (左) とクロマチンファイバーへの展開 (右 (下は白円内模式図)) の様子

4. 結論

結論として、MEF 細胞からは染色体の取り出しに成功し、またその場観察を行いながらオンチップ上でその伸長を行う事が出来た。今後の展望として、ES 細胞染色体の取り出しを行ったうえでの解け方の違いの観察や、当研究室で研究されているマイクロ流路内での染色体の伸長をする予定である。