

# FIB/SEM を用いた染色体内部構造の高解像度イメージング

高田 英昭\*

## High resolution imaging of inner chromosome structure using FIB/SEM

Hideaki Takata\*

Attempts to elucidate chromosome structure have long remained elusive. Electron microscopy is useful for chromosome structure research because of its high resolution and magnification. To reveal the chromosome interior, concurrently, Focused ion beam/Scanning electron microscopy (FIB/SEM) has been developed, allowing investigation and direct analysis of chromosome interiors. In this study, we investigated the chromosome interior by FIB/SEM using human chromosomes. As a result, cavities were visualized in the chromosomes prepared by critical point drying (CPD). Furthermore, we find small dot-like structures within the chromosomes in conjunction with ionic liquid technique and platinum blue staining. The average diameter distribution of the structures suggested that they are nucleosomes. Thus, we demonstrated that FIB/SEM is a promising tool to observe inner chromosome structure at high resolution.

### 1. はじめに

人体の設計図であるヒトゲノム DNA は全長 2 m にも及ぶが、細胞が分裂する際には DNA は 46 本の長さがわずか数  $\mu\text{m}$  の染色体へと折り畳まれる。染色体の数や構造の変化は細胞の生存、細胞のガン化、さらには個体における種々の変異と直接的に関係しているため、20 世紀を通じてその内部構造の解析が国内外の研究者により活発に行われてきた。その結果、直径 2 nm のヒトゲノム DNA は、まず塩基性タンパク質のヒストンに巻かれ、直径 11 nm のヌクレオソームとよばれる構造体になることが明らかとなった (図 1)。さらに、ヌクレオソームは様々な非ヒストン蛋白質と結合してクロマチン繊維となる。しかしながら、どのようにしてヌクレオソームが染色体へと折り畳まれるのかについては、現在に至るも未だ明らかになっていない<sup>1)</sup>。そこで本研究では、集束イオンビーム/走査型電子顕微鏡(FIB/SEM)トモグラフィーなどの融合ナノテクノロジーを用いて、これまでには無い全く新しいアプローチで染色体内部構造を決定することを試みた。

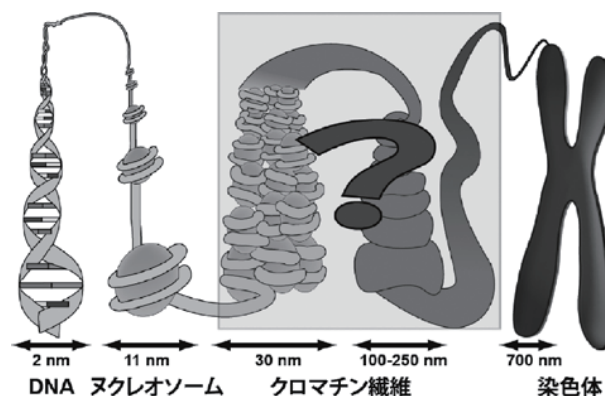


図 1. DNA が染色体へと凝縮する際の構造モデル

### 2. 実験方法

分裂期に同調したヒト子宮頸癌由来細胞 (HeLa S3 細胞) から、染色体を安定化する働きがあるポリアミンを用いて染色体を単離した<sup>2)</sup>。単離した染色体をアルミ基盤の上に貼り付け、XBE2 buffer (10 mM HEPES, pH 7.7, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM KCl, 5 mM EGTA) 中で 2.5% グルタルアルデヒドと 0.2% タンニン酸により固定した。次に、①臨界点乾燥、②イオン液体という 2 つの異なる手法を用いて、固定後の染色体から電子顕微鏡観察のサンプルを調製した。①は、2% 四酸化オスミウム固定後、エタノールによる脱水と酢酸 3-メチルブチル処理を行った染色体を臨界点乾燥し、さらに四酸化オスミウムでコーティングすることで作製した。②は、染色体をイオン液体である 0.5% 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BMI-BF<sub>4</sub>) で処理し、プラチナブルーを用いて DNA を染色した。イオン液体は真空中でも蒸発せず、液中で試料の導電性を高めて電子顕微鏡による観察を可能とする。調製した染色体サンプルを FIB/SEM を用いて観察した。

2014年3月11日 受理

\* 豊田理研スカラー (大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻)

本顕微鏡は加速した  $Ga^+$  を試料に照射することで切断し、その断面の構造を SEM により観察するというもので、ナノオーダーで試料の内部構造を決定することが可能である。FIB/SEM により取得した染色体の内部構造の画像は、画像解析ソフト Image J を用いて解析した。

### 3. 結果と考察

臨界点乾燥を行ったヒト染色体の内部構造を FIB/SEM により観察した画像を図 2 に示す。染色体の内部には大小さまざまな大きさの空洞が存在していることが分かる。このスペースは、高密度の DNA とタンパク質からなる染色体において、クロマチンが自由に動くことを可能とし、染色体内へのクロマチンの凝縮因子や構造制御因子等の接近を促進しているものと考えられる。一方で、イオン液体で処理した染色体を FIB/SEM で観察した場合、図 3 に示すように染色体内の空洞は観察されなかった。臨界点乾燥を行う場合、エタノールによる脱水処理や試料の導電性を高めるために四酸化オスmiumによるコーティング処理が必要であるが、イオン液体処理を行うサンプルではこれらの処理を必要としない。イオン液体処理後のサンプルでは、染色体内の水分がイオン液体に置き換わり染色体内の空洞がイオン液体で満たされるため、臨界点乾燥で観察される空洞が見られないと考えられる。

イオン液体で処理した染色体は、試料を乾燥させないため、より生体内の環境に近い状態の染色体構造を保持していると考えられる<sup>3)</sup>。そこで、イオン液体処理を行った染色体内部のクロマチン構造を詳細に観察するために、DNA に結合する特性を持つプラチナブルーを用いて DNA 染色を行うことでクロマチンのコントラストを高め、

FIB/SEM により染色体を観察した。図 3 (右) は染色体断面の 2 次電子像であるが、多数の粒子状の構造 (白点) が検出されている。複数の染色体断面像を比較した結果、この粒子は染色体断面にランダムに分布していることから、アルミ基盤のスパッタリングや  $Ga^+$  照射によるダメージに由来するアーティファクトではないと考えられる。粒子構造の直径は 4-22 nm の間に分布しており、特に 5-12 nm の大きさを示すものが多い。ヌクレオソームは直径 11 nm、高さ 6 nm の円柱状の構造体であることを考えると、この粒子構造は主に染色体内のヌクレオソーム構造を反映していると考えられる。

### 4. 今後の展望

本研究により、FIB/SEM が染色体の内部構造の観察に有効な手法であることが示された。特に、イオン液体とプラチナブルー染色を組み合わせることで、従来行われてきた臨界点乾燥を用いて調製した染色体よりも生体内環境に近い状態のクロマチン構造を高コントラストで検出できると期待できる。今後は、本手法で検出された染色体内の微細な構造体を金粒子を用いた免疫電子顕微鏡法等により特定することを試みる。さらに、メタロチオネイン融合ヒストンを発現させ鉄イオン取り込んだ染色体を用いて、FIB/SEM により染色体 1 本の全長にわたる断面像を取得することで、染色体内の個々のヌクレオソームの位置を 3 次元空間にマッピングし、その分布から染色体内部のクロマチン構造を決定することを目指す。

### REFERENCES

- (1) Maeshima et al., Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 75, 439-444 (2010)
- (2) Uchiyama et al., J. Biol. Chem. 280, 16994-17004. (2005)
- (3) Dwiranti et al., Microsc. Res. Tech. 75, 1113-1118 (2012)

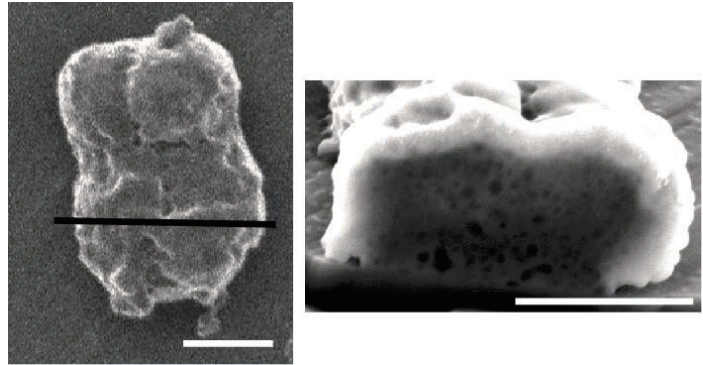


図 2. 臨界点乾燥により調製した染色体の全体像 (左) と断面像 (右) (黒線は断面の位置、スケールバーは 1  $\mu$ m を示す。)

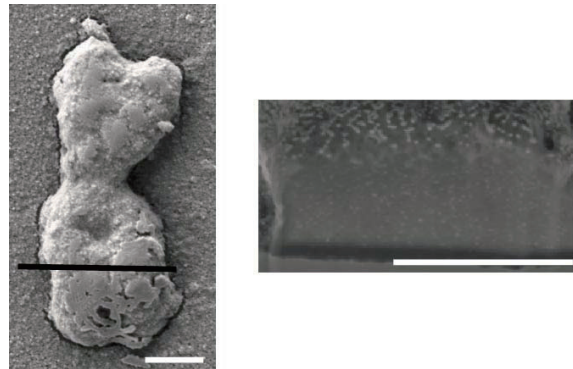


図 3. イオン液体により調製した染色体の全体像 (左) と断面像 (右) (黒線は断面の位置、スケールバーは 1  $\mu$ m を示す。)