

平成21年 4月 27日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590331
 研究課題名（和文） クロマチンリモデリング因子 ATRX の異常に関連した染色体テリトリーの核内配置解析
 研究課題名（英文） Study of the effect on the chromosomal territory in the nucleus by the mutated chromatin remodeling protein, ATRX
 研究代表者
 和田 敬仁 (WADA TAKAHITO)
 信州大学・医学部・准教授
 研究者番号：70359727

研究成果の概要： 転写因子の一つであるクロマチンリモデリング蛋白は、DNA メチル化、ヒストン蛋白の修飾などと関連し、エピジェネティックなメカニズムを介して、標的となる遺伝子の発現を調節している。今回の研究は、ATR-X 症候群の原因遺伝子 *ATRX* がコードする ATRX 蛋白の機能喪失により、他の複数の遺伝子発現調節の破綻を起こすメカニズムを明らかにするために、3D-FISH 法を用いて、核内における染色体テリトリーと遺伝子発現を解析する実験系を確立するとともに、その問題点を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

ヒト一個体は60兆個、200種類の細胞からなり、その遺伝情報は同一であり、30億塩基対からなるDNAによりコードされている。近年、個体の発生あるいは細胞の分化・増殖において、「DNA塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現の変化」(エピジェネティクス)の重要性が明らかになり、その破綻は、生殖細胞系列においては精神遅滞に、体細胞においては悪性腫瘍に関連している。エピジェネティクスはDNAメチル化、ヒストンテールの修飾(メチル化、アセチル化、リン酸化)、クロマチンリモデリングからなる。

ATR-X症候群は、その責任遺伝子 *ATRX* がX染色体に局在するX連鎖精神遅滞症候群の一つであり、男性の患者で重度の精神遅滞、特異な顔貌、 α サラセミア、外性器異常、骨格異常、行動異常といった多彩な症状を特徴とする。ATRX蛋白はクロマチンリモデリング複合体SWI/SNFファミリーに属し、新規DNAメチル基転移酵素DNMT3a/bと共通の構造をもち、 α グロビン遺伝子を含む複数の遺伝子発現調節に関わっていると考えられている。しかし、ATRX遺伝子変異によるATRX蛋白の機能喪失により、ATR-X症候群が発症する病態は解明されていない。

2. 研究の目的

ATR-X 症候群における病態解明には、その多彩な症状の原因となっている、ATRX 蛋白によって発現調節を受けている α グロビン遺伝子以外の複数の標的遺伝子を明らかにすることが必要である。

最近、染色体の核内における空間的配置（染色体テリトリー）が、遺伝子発現や核高次構造に関連することが示されてきている。本研究において、「クロマチンリモデリング因子 ATRX の機能喪失が染色体テリトリーに影響を与え、複数の遺伝子発現調節の破綻の原因となっている」という仮説を立て、3D-FISH 法を用いて、核内における染色体テリトリーと遺伝子発現を解析する実験系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

<細胞処理> 研究目的に凍結保存していた、遺伝子変異が確認され染色体異常を伴わない ATR-X 症候群患者 2 名と正常コントロール 1 名の B リンパ芽球様細胞株 (LCL) を再培養し、3D 解析用標本作成の必要量 (5 スライド用に 2×10^7 cells) まで増やした。ポリ-L-リジン を塗布したカバーガラス (20x60mm) に各 2×10^6 個の細胞を塗布・静置・洗浄・パラホルムアルデヒド固定後、液体窒素による凍結融解処理・ペプシン処理・固定後処理を施した。

<プローブ> 本研究の対象染色体領域として、Xq、15q、16p を選択した。Xq は ATRX 遺伝子が局在するため、15q は刷り込み領域が存在し ATRX 蛋白の影響を受けることが予想されたため、16p は ATRX 蛋白より発現調節を受けることが唯一明らかになっている α グロビン遺伝子が局在しているためである。対象にした染色体領域について Xq と 15q、Xq と 16p の 2 種類の組み合わせで各 Partial chromosome painting (PCP) プローブ DNA を必要量準備し、組み合わせる 2 種類のプローブをそれぞれ異なる色調で検出するため、一方の PCP プローブをビオチン-16-dUTP、もう一方の PCP プローブをジゴキシゲニン-11-dUTP にて標識した。

<FISH 法> 各検出系のプローブミックスを、3D 解析用に処理した ATR-X 症候群患者と正常コントロール標本にそれぞれハイブリダイズ後、ビオチン標識プローブは Avidin-FITC ~Goat anti-avidin-Bio~Avidin-FITC にて緑色に、ジゴキシゲニン標識プローブは Rabbit anti-Dig~Goat anti-rabbit-Cy3 にて赤色の蛍光シグナルに検出できるよう処理を施し、TO-PRO-3 にて核染色後、観察用に

マウントした。

<共焦点レーザースキャン顕微鏡観察・3D 画像取得> LSM510 META (Carl Zeiss 社) を用い、蛍光波長 3 チャンネル (488/543/633 nm) によるトリプルスキャンモード、Z 軸スキャン間隔: $0.2 \mu\text{m}$ 等の設定によりそれぞれの標本を観察、選択した細胞核の 3D 画像を取り込んだ。

<画像解析> LSM5 Image Browse ソフト (Carl Zeiss 社) および細胞核計測ソフト (田辺秀之, KGT 社) にて 3D 画像処理を行い、各細胞核ごとに対象の染色体について相対間距離の実測値の計測を試みた。

* 田辺秀之: 核内染色体の三次元 FISH. 実験医学別冊 基礎から先端までのクロマチン・染色体実験プロトコール. p.148-158, 2004. 編: 押村光雄、平岡泰. 東京、羊土社

4. 研究成果

2 名の ATR-X 症候群患者および 1 名の正常コントロール LCL から作成した各標本で、それぞれに PCP 15q (赤色) と PCP Xq (緑色)、あるいは PCP 16p (赤色) と PCP Xq (緑色) のプローブの組み合わせでシグナルを検出すべく 3D FISH 法を実施し、それぞれの 3D 画像を得た。

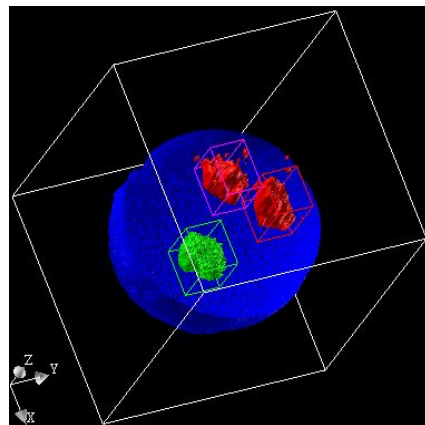


図 1. PCP Xq (緑) / PCP 16p (赤) プローブを用いた ATR-X 症候群患者の細胞核 3D FISH 画像例

それぞれに検出された染色体のシグナルを、細胞核計測ソフトにて、シグナル間の中心間距離 (Center)、シグナル領域間の距離 (Territory)、核膜までの最短距離 (Nuclear Membrane) を計測し、表 1 のような実測値を得たが、それぞれの項目において、2 名の患者と正常コントロールの間で、有意な差は認めなかった。

表1. Xq/16p, Xq/15q プローブを用いた 3D FISH 法による対象染色体間の細胞核内距離実測値 (一部)

Xq/15q (μm)									
標本#	Center			Territory			Nuclear Membrane		
	R1-R2	R1-G1	R2-G1	R1-R2	R1-G1	R2-G1	R1	R2	G1
Cr	4.80	6.30	5.89	*	3.72	2.82	0.18	0.20	0.18
Cr	2.80	4.33	2.72	0.90	2.16	0.48	1.14	0.42	0.53
Cr	3.28	4.99	3.94	0.00	3.15	1.69	0.00	0.00	0.00
Cr	6.01	6.28	2.80	2.98	2.44	0.00	0.00	0.00	0.00
Cr	3.39	5.26	2.15	1.65	3.61	0.44	0.00	0.00	0.00
Cr	6.18	5.97	5.38	0.34	4.06	1.87	0.00	0.00	0.00
P1	5.91	6.48	4.78	1.94	3.38	1.04	0.01	0.55	0.01
P1	3.59	6.84	4.38	1.23	4.54	0.00	1.23	0.01	0.00
P1	6.71	6.54	5.44	3.06	2.87	*	0.00	0.17	0.18
P1	4.91	10.24	6.26	0.55	6.72	1.85	0.03	1.55	0.50
P1	9.61	7.76	6.88	4.56	3.53	3.71	0.17	0.01	0.20
P1	5.53	8.39	8.01	2.66	3.64	0.00	1.33	0.19	0.00
P1	*	6.03	*	3.19	0.04	1.45	0.45	0.60	2.50
P1	7.12	8.42	4.82	0.74	2.90	0.00	0.12	0.00	0.42
P1	3.29	5.14	2.87	0.00	*	0.42	0.07	0.09	0.31
P1	5.93	6.57	1.66	2.48	2.03	0.00	0.98	0.10	0.01
P1	3.33	5.46	5.42	0.64	0.00	1.02	*	0.00	*
P2	6.84	8.66	6.49	2.86	6.07	4.62	0.31	0.00	4.12
P2	4.50	6.77	4.49	*	2.85	2.25	0.52	0.10	0.17
P2	3.26	4.88	2.28	0.85	2.65	0.46	1.80	1.57	0.50
P2	4.07	7.23	4.49	0.35	3.40	1.00	0.71	0.45	0.00
P2	2.96	6.23	4.28	0.86	3.93	2.16	0.00	1.84	0.30

Xq/16p (μm)									
標本#	Center			Territory			Nuclear Membrane		
	R1-R2	R1-G1	R2-G1	R1-R2	R1-G1	R2-G1	R1	R2	G1
Cr	5.74	7.54	4.41	3.47	5.15	1.22	0.00	0.38	0.00
Cr	5.00	6.34	2.40	3.22	5.05	0.67	0.00	1.09	0.00
Cr	5.39	7.96	5.71	2.77	6.34	3.18	0.00	0.12	0.00
Cr	3.85	4.51	3.16	1.36	2.55	0.01	0.59	0.00	0.06
Cr	3.87	7.54	4.49	1.15	5.53	1.85	0.00	0.00	0.00
P1	3.82	9.26	6.71	0.08	7.13	3.84	1.33	2.59	0.20
P1	10.92	5.96	5.17	5.73	2.64	0.23	0.00	0.59	3.00
P1	7.41	7.96	5.04	3.87	3.53	2.34	1.60	0.15	0.43
P1	3.30	6.39	5.29	0.56	3.71	2.78	2.25	1.53	0.70
P1	8.23	9.94	2.14	5.86	7.38	0.49	1.08	0.63	0.32
P1	5.77	11.26	6.85	2.07	7.70	4.14	0.87	3.42	1.09
P2	7.04	4.91	4.10	2.79	0.00	0.94	0.15	5.19	1.37
P2	9.67	7.03	5.45	3.84	3.79	0.98	0.91	2.09	1.86
P2	12.09	11.28	5.37	5.20	5.88	1.80	1.22	2.08	0.41
P2	*	10.87	*	0.62	3.16	10.49	2.35	1.74	0.56
P2	4.56	9.83	6.09	0.29	6.71	3.45	0.38	2.03	0.29

注) Cr: 正常核型コントロール, P1: ATR-X 症候群患者 1, P2: ATR-X 症候群患者 2.
R: PCP 16p プローブ/PCP 15q プローブで検出された染色体の赤色シグナル領域, G: PCP Xq プローブで検出された染色体の緑色シグナル領域.
*: 計測不可.

今回の研究において、3D FISH 解析でのデータ計測における様々な課題が明らかとなった。主な課題の1つめは、顕微鏡下に観察される細胞の大きさが様々であること、2つめは細胞核のほとんどが楕円体を呈し、その程度が細胞核によって大きく異なる (図2) 点であった。

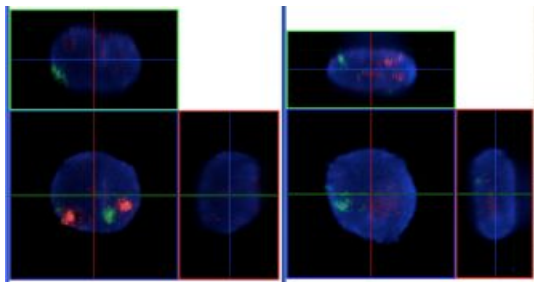


図2. 顕微鏡下に 3D 画像を取り込んだ異なる細胞核の X/Y/Z 軸の画像

そこで、各細胞核の X/Y/Z 軸の径 (μm) を実測し、体積 (4/3 π abc * abc は X/Y/Z 軸方向の径の半分の長さ) と楕円体の程度 (Z/[(X+Y)/2]) を計算した (表2)。

表2. 細胞核の大きさの実測値、体積、楕円体の程度

標本#	細胞核 X軸 (μm)	細胞核 Y軸 (μm)	細胞核 Z軸 (μm)	細胞核 体積 (μm³)	楕円体の程度 Z/[(X+Y)/2]
a	12.11	12.11	8.00	613.98	0.66
a	10.80	13.25	8.00	599.11	0.67
a	11.83	11.48	7.80	554.37	0.67
a	12.11	11.77	8.40	626.58	0.70
a	12.11	12.28	7.80	607.04	0.64
a	11.48	12.85	8.00	617.61	0.66
a	11.14	11.71	8.40	573.46	0.74
a	11.67	9.68	7.60	449.30	0.71
b	12.00	11.48	10.40	749.78	0.89
b	11.80	13.08	11.40	920.82	0.92
b	12.63	12.11	11.80	944.51	0.95
b	12.68	12.68	10.80	908.74	0.85
c	13.14	14.11	11.40	1106.13	0.84
c	12.97	13.88	9.20	866.75	0.69
c	13.71	13.31	9.00	859.48	0.67
c	17.37	15.77	9.60	1376.20	0.58
d	16.11	17.02	9.20	1320.14	0.56
d	14.17	13.60	9.00	907.67	0.65
d	13.48	13.30	9.40	881.96	0.70
d	16.45	14.74	12.00	1522.73	0.77
e	12.23	11.94	9.80	748.92	0.81
e	14.57	13.37	8.80	897.12	0.63
e	15.08	17.20	9.20	1248.81	0.57
e	13.20	12.40	9.20	788.06	0.72
e	16.80	18.50	9.00	1463.87	0.51
			平均	886.13	0.71

計測した 25 の細胞核の体積の平均は 886 μm³ であったが、個々の細胞核では 449~1523 μm³ と大きな差を示した。また、楕円体の程度の平均は 0.71 であり、同一標本では近似の値をとる傾向を示したが、個々の細胞核では 0.51~0.95 と大きな差を示した。

細胞核の大きさは、細胞周期を反映していると考えられる。また、楕円体の程度は、本来の生体内ではほぼ球形に近い核が標本作成の過程で「押しつぶされて」楕円形を呈したのか、あるいは、核周期と共に核の形はダイナミックに変化し楕円形を呈しているのか検討すべき問題である。

本研究の目標は、核内の染色体位置 (核内テリトリー) や遺伝子発現状態と核内配置の計測である。特に後者の測定においては、異なる大きさ・形態の細胞核で核膜あるいは核の中心と想定される場所からの実測値 (絶対値) の比較が妥当であるかは検証する必要がある。これには、各細胞の細胞周期をそろえるための処理を加える、観察する細胞数を増やす、といった解決方法があるが、一つ一つの細胞の取り込みに時間が掛かる点とそれ

によるシグナルの褪色が問題となる。

本研究において、3D-FISH法を用いた染色体テリトリ計測のための基本的な手技は確立した。細胞処理から画像解析の結果を得るまでに非常に複雑な手技と時間を要する本研究手法においては、手技の熟練と基礎データの蓄積の重要性が改めて示された。

今後の課題として、本研究の目的とするデータを得るためには、安定した標本作製の技術を習得し、細胞周期との相関についてもふまえた、さらなる解析が必要である。

本研究は、エピジェネティクスにおける遺伝子発現のメカニズムを3D-FISH法を用いた核内における染色体や遺伝子の絶対的あるいは相対的位置との関連を介して解析するものであり、エピジェネティクスの破綻が原因となっているATR-X症候群以外の疾患群（Rettt症候群、ICF症候群、Angelman症候群、Prader-Willi症候群、Sotos症候群など）の病態解明にも応用出来ることが期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

①Gibbons RJ, Wada T, et al. Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. Hum Mut 29:796-802, 2008, 査読有

〔学会発表〕（計1件）

①涌井敬子、河村理恵、和田敬仁、田辺秀之、福嶋義光. 3D-FISH解析における細胞核内染色体間距離の計測について. 定量生物学の会第1回キャラバン 遺伝研、2009. 3. 13、静岡

〔図書〕（計1件）

①Gibbons RJ, Wada T. ATRX and X-linked α -Thalassemia Mental Retardation Syndrome. Epstein CJ, et al. (ed.) Inborn Errors of Development, Oxford University Press, New York, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 敬仁 (WADA TAKAHITO)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：70359727

(2) 研究分担者

福嶋 義光 (FUKUSHIMA YOSHIMITSU)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：70273084

涌井 敬子 (WAKUI KEIKO)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：50324249

田辺 秀之 (TANABE HIDEYUKI)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・教授

研究者番号：50261178

(3) 連携研究者

なし