

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16472

研究課題名(和文)細胞分裂に伴う核膜と染色体の微細構造変化の電子顕微鏡技法を用いた三次元的解析

研究課題名(英文) Three-dimensional analysis of ultrastructural changes of nuclear membranes and chromosomes during cell division using electron microscopy

研究代表者

早津 学 (Hayastu, Manabu)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40468898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞分裂中に生じる核膜、染色質、染色体の微細構造変化を三次元的に明らかにすることを目的とする。最初に核膜を裏打ちする蛋白質のラミンに赤色蛍光蛋白質が発現するHeLa細胞を作製した。次に、共焦点レーザー顕微鏡による観察とArray tomography法による三次元的解析で、体細胞分裂中期の細胞では、ラミンが存在しないことを明らかにした。また、TEMによる観察で細胞の赤道面に集まる染色体の周りには核膜に微細構造学的に類似している断片化した膜構造が存在することを明らかにした。これによって一般的に消失するとされる細胞分裂中期において核膜は完全に消失せず、残存している可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、一般的には消失すると考えられている細胞分裂中期において核膜が断片化した膜として染色体周囲に存在している可能性を示すことができた。これまで細胞分裂前中期から後期においては存在していないと考えられていたことによりほとんど研究が行われてこなかったが、これらの細胞分裂期においても核膜の構造や機能の解析が必要であることを示す。今後、細胞分裂の全段階に渡る核膜の構造変化や機能が明らかにされることにより、核膜が関連する疾患の断定的な原因の究明、がん細胞の異常増殖の制御機構の解明へとつながる研究の足掛かりとなることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate three-dimensionally clarify the ultrastructural changes of the nuclear envelope, chromatin and chromosome that occur during cell division, HeLa cells were generated that express red fluorescent protein in lamins, an inner nuclear envelope-associated protein. Moreover, these cells were observed by using a confocal laser scanning microscope and the three-dimensional analysed using array tomography methods. As a result, it revealed that lamin were not exist in these cells during metaphase of cell division. Furthermore, it was shown that there is a fragmented membrane structure structurally similar to the nuclear envelope around the chromosomes gathered on the equatorial plane. These results were shown the possibility that the nuclear envelope did not completely disappear during metaphase of cell division in which is generally considered to disappear, and that it may remain.

研究分野：電子顕微鏡学、顕微解剖学

キーワード：細胞分裂 電子顕微鏡 三次元再構築

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は生物にとって極めて重要な現象であり、これまでに多くの研究が行なわれている。しかし、細胞分裂に伴う核を含む細胞内小器官の構造変化について、微細構造学的に、かつ三次元的に説明した報告はない。研究代表者はこれまでにムラサキツユクサ *Tradescantia ohiensis* の花粉母細胞や、哺乳類動物としては最も染色体数が少ないインドホエジカ *Muntingia muntingia* の胸腺由来培養細胞 (Mm2T 細胞) を材料として G2/M 期の細胞の染色質や染色体の観察を透過電子顕微鏡 (TEM) で行なってきた。また、連続する超薄切片を走査電子顕微鏡 (SEM) で観察、取得した反射電子 (Back Scatter electron; BSE) 像をもとに三次元再構築像の解析を行う Array tomography 法で三次元的解析も行なってきた。しかし、分裂開始から核膜の崩壊、消失過程、細胞の核内の染色質がどのように凝集を始め、染色体を形成するののかについての詳細は微細構造学的にまだ明らかにできていない。また、核膜については崩壊後、再形成のために完全には消失しない可能性が示唆されているがやはり明らかにされてはいない。これらの点について詳細を明らかにしたいと考え、本研究の着手に至った。本研究はこれまで用いていたムラサキツユクサ花粉母細胞では、試料調整に時期の制限が解消されることがあったため、Mm2T 細胞を材料とするとしていた。しかし、Mm2T 細胞は染色体数が少なく、染色体の微細構造の解析には適していたが、細胞分裂の周期が長く、分裂期の細胞を効率よく観察することにおいては不向きな材料であることが明らかとなった。そこで様々な研究にて使用されており、細胞の分裂周期も速い HeLa 細胞を材料として用いて研究を進めることとした。

2. 研究の目的

体細胞分裂中に生じる核膜、染色質および染色体の微細構造変化について電子顕微鏡を主な研究ツールとして三次元的に解析し、特に核膜が消失すると考えられている細胞分裂前期から後期における核膜の局在について微細構造学的に再検討し、その詳細を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Nocodazole を用いた培養細胞分裂周期同調のための最適濃度と時間の検討

微小管重合阻害剤である Nocodazole は、細胞の分裂周期を G2/M 期に同調させることが知られている。実験当初に使用していた Mm2T 細胞においては Nocodazole の最適な濃度と処理時間の詳細は不明であったため、Nocodazole を用いた細胞同調のための条件検討を行なった。さらに Mm2T 細胞において決定した Nocodazole の濃度と時間が、HeLa 細胞においても最適な条件であるかを確認した。

(2) ラミン-RFP を発現する HeLa 細胞の作製および共焦点レーザー顕微鏡による観察

ラミンは核膜を裏打ちする蛋白質として知られているため、蛍光顕微鏡によるライブセルイメージングにより、ラミンの局在を明らかにすることを試みた。そのためにまず、遺伝子導入を行い、ラミンに赤色蛍光蛋白質 (RFP) を発現する HeLa 細胞を作製し、細胞分裂に伴って生じるラミンの局在変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) SEM-Array tomography 法による染色体の微細構造解析ならびに細胞分裂期の同定

(2) の共焦点レーザー顕微鏡による観察では、細胞の形状やラミンの局在によって G0/G1 期の細胞と G2/M 期の細胞を区別していた。しかし、G2/M 期の細胞の正確な分裂期については不明であった。そこで共焦点レーザー顕微鏡で観察した細胞を固定、脱水し、樹脂包埋ブロックを作製し、ブロックから連続する超薄切片を作製し、SEM で観察、BSE 像を取得し、三次元再構築した染色体の解析を行なった。また、超薄切片の一部は、TEM で観察し、細胞内の微細構造観察を行った。TEM による観察については G0/G1 期の細胞と微細構造を比較した。

4. 研究成果

(1) Nocodazole を用いた培養細胞分裂周期同調のための最適濃度と時間の検討

0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{g/mL}$ の Nocodazole を含む培養液で、Mm2T 細胞を培養し、24 時間後に血球計算盤にて生細胞数を計測した。その結果、G0/G1 期の細胞と G2/M 期の細胞の割合はどの濃度でも大きくは変わらなかったが、Nocodazole を含まない培養液で培養した細胞に比べ、0.2 $\mu\text{g/mL}$ Nocodazole を含む培養液で培養した細胞では、生細胞数が半分程度に減少することがわかった (図 1)。また、Nocodazole 濃度の上昇に伴い、生細胞はさらに減少することがわかった。以上の結果より、できる限り Nocodazole 濃度は低い方が良く考えられた

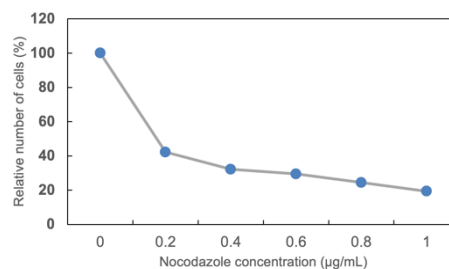


図 1. HeLa 細胞に及ぼす Nocodazole 濃度の影響。

め、最適濃度を $0.2 \mu\text{g/mL}$ とした。Nocodazole 処理時間は、0、6、12、24 時間で検討を行った。時間の経過とともに G2/M 期の同調する細胞数は増加していたが、生細胞数は、減少していた。さらに 12、24 時間処理したものでは光学顕微鏡でも確認できるほど変形した細胞が観察されたため、処理時間については 6 時間とした。細胞は TEM にて観察を行い、細胞内の形態についても正常であることを確認した。さらに Mm2T 細胞において最適である上記の条件が、HeLa 細胞においても同様であるかの検証を行なった。その結果、濃度は $0.2 \mu\text{g/mL}$ で十分に同調効果が得られることがわかった。処理時間についても 6 時間で十分であったが、1 時間でもかなりの細胞が G0/G1 期に同調されることがわかった。

(2) ラミン-RFP を発現する HeLa 細胞の作製および共焦点レーザー顕微鏡による観察

図 2 には、ラミン-RFP を発現する HeLa 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果を示した。明視野観察では、横に広がる G0/G1 期の細胞が確認された (図 2a)。細胞内の核を明瞭に確認することはできないが、蛍光観察では、ラミンの局在を示す蛍光が核の縁を取り囲むように観察され、核が存在を示していた (図 2c)。一方、G2/M 期の細胞の明視野観察では、細胞の形が球形であり、細胞自体に高さがあるため、やや立体的な細胞として観察された (図 2b)。蛍光観察では、細胞内に何も観察されず、G2/M 期の HeLa 細胞にはラミンが存在しないことが示された (図 2d)。これは様々な研究で明らかにされている結果と一致しているが、これらの観察の結果は、前述しているようにラミンの局在を明らかにするものであり、核膜そのものの局在を示す結果ではない。そこで核膜自体が蛍光で観察できるようにする必要があると考え、現在、研究代表者は核膜とラミンに異なる蛍光を発現する細胞の作製に着手し、細胞分裂に伴う核膜とラミンの局在変化の比較観察を始めている。

(3) SEM-Array tomography 法による染色体の微細構造解析ならびに細胞分裂期の同定

SEM 観察で得られた HeLa 細胞の BSE 像では、細胞の中央付近に染色体が高電子密度の構造として観察された (図 3a)。連続切片中に観察される染色体を三次元構築ソフトにて位置を合わせ重ねることによって作製した三次元再構築像では、多数の染色体が細胞の中央に集まっていることを明らかにした (図 3b)。さらに染色体の集合の仕方、細胞内での位置から、観察した細胞が分裂中期の細胞であることがわかった。

TEM による観察では、BSE 像で明らかにできなかった詳細な細胞内の微細構造について観察を行なった。M0/G1 期にある細胞では、細胞のほぼ中央に核が観察され、核の周辺にはミトコンドリアや小胞体などが多く観察された (図 4a)。一方、G2/M 期の細胞では BSE 像と同様細胞の中央付近に染色体が観察された (図 4b)。染色体の周辺には細胞内小器官が少ない領域が存在し、さらにその外側には小胞体などの膜構造がよく観察された。これら膜を拡大して観察した結果、G2/M 期の染色体に最も近い膜構造は表面が滑らかであり、核膜に類似した扁平な袋状の膜構造であることがわかった (図 4c、d)。一方、これらの核膜に似た膜のさらに外側に位置する膜はリボソームが付着した小胞体であることがわかった。これらの結果から一般的には消失すると考えられている細胞分裂中期では断片化した核膜が染色体周囲に存在している可能性を示すことができた。しかし、断片化した膜が核膜であることを証明するためには更なる研究が必要である。

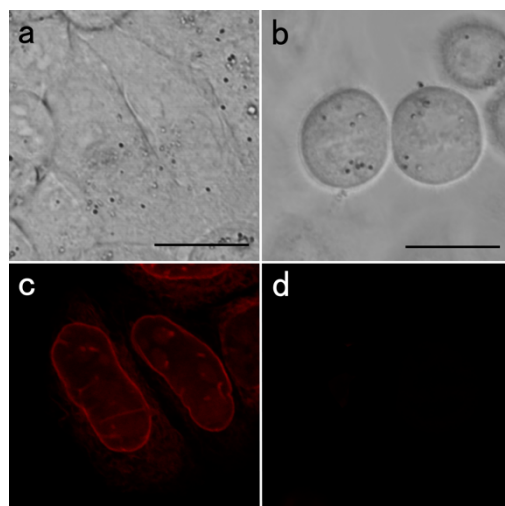


図 2. ラミン-RFP を発現する HeLa 細胞の明視野像(上段)と蛍光像(下段). Scale bar: $20 \mu\text{m}$.

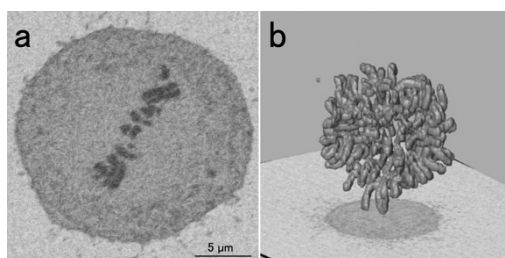


図 3. 樹脂包埋した HeLa 細胞の超薄切片を SEM で観察、取得した BSE 像(a)と a 図を含む連続切片から作成した染色体の三次元再構築像(b).

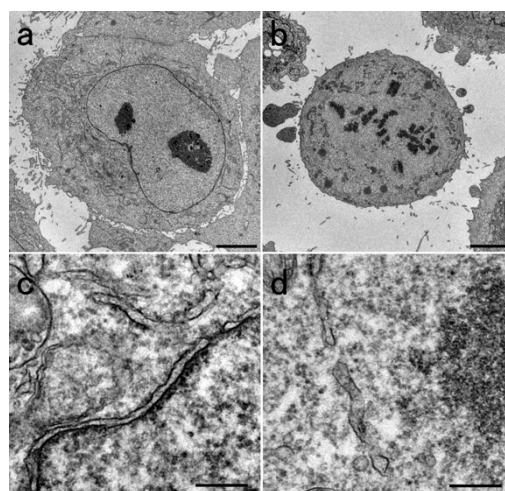


図 4. G0/G1 期(a)と分裂中期(b)の HeLa 細胞の TEM 像. a 図の核膜と小胞体の拡大像(c). b 図の染色体とその近傍に観察される膜構造の拡大像(d). Scale bar: $5 \mu\text{m}$ (a, b), $0.2 \mu\text{m}$ (c, d).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 早津学, 奥山健太郎, 信藤知子, 岡野栄之, 芝田晋介	4. 巻 56
2. 論文標題 Application for Structural Analysis of Large Sample by Using Multibeam SEM and CLEM	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 124, 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11410/kenbikyo.56.3_124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水谷祐輔, 早津学, 牛木辰男
2. 発表標題 走査イオン電導顕微鏡法を用いたラット組織切片の微細構造解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早津学, 水谷祐輔, 牛木辰男
2. 発表標題 細胞分裂に伴う核膜および染色体の微細構造変化の電子顕微鏡解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早津学, 水谷祐輔, 三上剛和
2. 発表標題 細胞分裂に伴う核膜の動態に関する構造学的解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石裕人、早津学、芝田晋介
2. 発表標題 連続切片SEM法によるマウス臍細胞群の三次元的微細構造解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第77回学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関