

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24651224

研究課題名（和文） クロモソームを選択的に釣り出す

研究課題名（英文） Capturing of identical chromosome

研究代表者

樽井 寛 (TARUI HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・LSA システム構築ユニット・上級研究員

研究者番号：90342815

研究成果の概要（和文）：

本研究は特定のクロモソームを高い精度で単離する手法を開発することを目的として行った。M 期で停止させた細胞から微弱な超音波により細胞膜を破壊することで、損傷がなく、かつ十分にほぐれた状態のクロモソームの調製に成功し、最適条件を確立した。特定のクロモソームの選別については第9番染色体をターゲットとし、独自の単離選別環境を設計・作製した。並行して qPCR を用いてクロモソームの精製度を数値化するし評価する系を構築した。研究期間は終了したが、ひきつづき単離実験を行っている。

研究成果の概要（英文）：

This project is aimed to develop a method for collecting identical chromosome with high purity. By weak sonication, intact and loosed chromosome could be obtained from cells arrested on metaphase. Next, chromosome isolation strategy was designed and constructed for targeted 9<sup>th</sup> chromosome. At the same time, quality control strategy based on qPCR was also prepared. The term planned has been passed, however the experiment is continuously performed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：ゲノム クロモソーム 選別

## 1. 研究開始当初の背景

現在、遺伝子疾患の原因の探索としてエキソン領域における数塩基レベルの変異をタ

ーゲットとした探索が精力的に行われている。一方、遺伝子疾患にはエキソン領域以外の塩基置換や数十 bp 以上から数万塩基の比

較的大きな欠失や挿入が疾患原因であるケースも多く見受けられる。これらはカリオタイプングや CGH microarray などにより見いだされるケースが多いが、これらの変異により影響を受ける遺伝子構造もしくは発現量の推測のためには、全ゲノム解析を行うほかはないのが現状である。このように解析すべきクロモソームが限定されているケースで全ゲノム解析をせざるをえない状況は解析費および解析基盤の浪費であり、これらの染色体変異について、異常の見られたクロモソームに限定しゲノムシーケンス技術の確立は急務である。一方、学術的にみても染色体の高い頻度での構造変化や進化の過程でのリアレンジメントが起こっていることが示されつつある。染色体の構造変化については CHO 細胞の 22 種の染色体中 13 種もの染色体が Z-クロモソームへ断片化していることが塩基配列レベルで示されるなど (Xu 2011) 特に培養細胞におけるクロモソーム構造の不安定さと、柔軟さが浮き彫りにされつつある。一方我々の解析でもヘビ属間での染色体リアレンジメントが高頻度で起こっていることを示し、生物進化との高い相関が見いだせている (Matsubara 2006)。このようにドラスティックな構造変化が起こりながらもクロマチンの動態を適切に制御し、生命が維持されていることは大変興味深い。今後特定のクロモソーム単位の解析が可能になれば、クロモソーム疾患同定とあわせ、クロモソームサイエンスのひとつの基盤になるであろう。

## 2. 研究の目的

本研究では、単一種類のクロモソームのみを次世代シーケンサーを用いてシーケンス解析することを最終的な目標とし、そのためのクロモソームの抽出、精製、選択的濃縮の手法の確立を研究の目的とした。まず核内の

全クロモソームをすべて安定な状態に取り出したのち、他の細胞質成分、細胞膜、核と分離させ、クロモソーム画分のみを最適な条件の水溶液内に抽出する。この抽出物から他のクロモソームをのぞき、特定のクロモソーム種類のみを安定な状態を保ったまま濃縮する。この単離した特定のクロモソームはその後のクロモソーム全長シーケンスに供することができるよう、次世代シーケンサーを用いたショットガンシーケンス用のライブラリ作製に適したサイズと状態になるよう、クロモソームの前処理の技術の開発をあわせて行うこととした。これらクロモソームの安定な単離の手法の確立、クロモソームの選別法、そして次世代シーケンサーに供するためのライブラリ作製法の標準化を目指すとともに、目的とするクロモソームの精製度を評価するための評価系の構築を目指した。

## 3. 研究の方法

前出の論文事例にもあるように、培養細胞株として樹立された培養細胞ではクロモソームの構造変化が高い頻度で起こることを考慮し、継代数 10 世代以下の初代培養細胞を実験材料として用いることとした。具体的には、ヒト由来 Fibroblast cell を用いた。

細胞から安定な染色体を分離する方法として、微弱な超音波を用いて細胞膜を破壊し、その後遊離したクロモソームを回収する方法を採用した。具体的には、対数増殖期の細胞に対してコルセミドを用いて M 期で細胞周期を停止させたのち、細胞懸濁液に微細な超音波を照射し、細胞膜を分解した。その後、遠心分離法により遊離したクロモソームと核、細胞残渣を分離し、安定かつ不純物の含まないクロモソーム懸濁液を得た。これらの各操作および最適な溶液の選択については、クロモソームを Propidium Iodide で染色し

た後、顕微鏡によりクロモソームおよび供雑物の存在の有無を確認することにより、最適な条件を検討した。一方単離選別された染色体の品質評価に関しては、pPCR法を採用し、選別するクロモソームに対応した93サイトのプライマーとそれ以外のクロモソームに対するプライマーによる定量値をもとに、精製度を数値化して表す系を構築した。

#### 4. 研究成果

対数増殖期のヒト由来初代培養細胞Fibroblast細胞に作用させるコルセミドの添加時期および作用期間を検討した結果、M期で停止した細胞を約50%の割合で含む細胞集団を安定して得ることが可能となった。この細胞集団に対して最適な細胞懸濁液中で微弱な超音波により細胞膜を破壊し、損傷がなく、かつ十分にほぐれた状態のクロモソームの調製に成功した(図1)。この段階については細胞懸濁液の組成、細胞懸濁液への浸潤時間、細胞膜破壊の手法の選択と超音波の照射強度と照射時間の最適化を行った。

特定のクロモソームの選別については第9番染色体をターゲットとし、独自の単離選別環境を設計・作製した。この単離条件につい

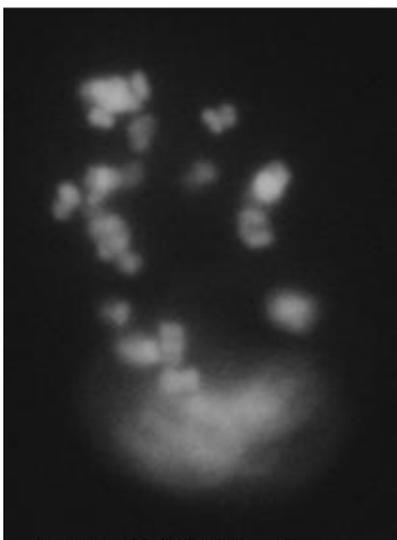


図1. 選択的濃縮前のクロモソーム

ては改善の余地があり、ひきつづき条件の検討を行う予定である。

並行して qPCR を用いてクロモソームの精製度を数値化するし評価する系を構築した。具体的には、目的の9番クロモソームに等間隔に設計したプライマーおよび9番以外のクロモソームに対して設計したプライマー計93種を用いて qPCR を行うことによって9番クロモソームの濃縮度を数値化して評価する系を構築した。研究期間は終了したが、ひきつづき単離実験を行っている。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樽井 寛 (TARUI HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・LSA システム構

築ユニット・上級研究員

研究者番号：90342815

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし