

軟X線顕微鏡による染色体の観察

Imaging of chromosomes at nano-meter scale resolution using soft X-ray microscopy

¹山本章嗣, ²宇野優衣, ²藤井宏樹, ³大東琢治, ⁴竹本邦子, ²難波秀利, ⁴木原 裕
A. Yamamoto¹, Y. Uno², H. Fujii², T. Ohigashi³, K. Takemoto⁴, H. Namba² and H. Kihara⁴

¹長浜バイオ大学, ²立命館大学, ³立命館大学総合理工学研究機構, ⁴関西医科大学
¹Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, ²Ritsumeikan University,
³Ritsumeikan University Research Organization of Science and Engineering, ⁴Kansai Medical University

今回、クロマチン凝縮過程を解析することを目的として、細胞分裂前期の NIH3T3 細胞を X 線顕微鏡で観察した。その結果、細胞分裂前期の核内に約 500nm の太さの染色体を確認できた。

To observe the condensation process, we examined chromosomes at the prophase of mouse fibroblast cell line NIH3T3 under a soft X-ray microscope. Chromosomes in the nucleus are clearly observed by X-ray microscope. Minimum thickness of the chromosomes is ~500 nm. It is difficult to observe chromosomes less than 500 nm in thickness under the soft X-ray microscope.

背景と研究目的: 我々は、染色体の凝縮・分配の過程を、X 線顕微鏡を用い、50 nm の分解能で描き出すことを目的としている。

平成 18 年度および 20 年度のナノテクノロジー総合支援プロジェクトの支援を受け、マウス胎児繊維芽細胞由来の株化培養細胞である NIH3T3 細胞の染色体の微細構造を軟 X 線顕微鏡で観察してきた。

平成 18 年度には、染色体が形成される分裂前中期の細胞において、太さ 750 nm の染色体と、染色体よりさらに細かいクロマチン繊維凝集体と考えられる太さ 150 nm から 500 nm の繊維状の構造を確認した[1]。

平成 20 年には、度染色体のコントラスト増強を目指し、アンモニア銀反応(Ammoniacal Silver Reaction, ASR) [2]を用いた染色体の銀染色でも、前中期の細胞において、太さ 700 nm の染色体を明確に確認することができた。しかし、クロマチンに対応する 500nm 以下の繊維構造を確認することはできなかった[1]。

銀染色では、グルタルアルデヒドを用いた

強い固定を行うことによって染色体構造の保存性が高めていることから、無染色の染色体の観察で確認された 150 nm から 500 nm の繊維状の構造は、凝集途中のクロマチンではなく、試料調整中に染色体が解れ出現したクロマチンという可能性もでてきた。

今回、クロマチン凝縮過程を解析することを目的として、細胞分裂前期の NIH3T3 細胞を X 線顕微鏡で観察した。

実験: NIH3T3 細胞(マウス線維芽細胞由来株化細胞)を、DMEM 培地を用い、37℃、CO₂濃度 5% で培養した。X 線顕微鏡用試料セルのポリイミド薄膜上で NIH3T3 細胞を 1 日培養した。細胞を 2% パラフォルムアルデヒドを含む固定液で 10 分固定した後、0.1 M リン酸緩衝液 pH7.4(PB)で洗浄した。0.1% Triton X-100 で 30 分間処理をした後、光学顕微鏡で染色体を観察するため酢酸オルセイン染色を行った。オルセイン染料は軽元素からなっており、X 線観察ではコントラスト増強効果はない。試料を風乾した後、光学顕微鏡で有糸分

裂細胞期の前期の細胞を選び、X線顕微鏡で観察を行った。比較のため、前中期の細胞の観察も行った。X線顕微鏡による観察は、立命館大学SRセンター軟X線顕微鏡ビームライン(BL12)で行った。観察波長は、2.3nmを用いた。

結果および考察： Fig.1 に、前中期の NIH3T3 細胞の光学顕微鏡写真(a)と X線顕微鏡写真(b)を示す。光学顕微鏡で確認できる全ての染色体を X線顕微鏡でも確認できる。今回も、染色体 700 nm 以下のクロマチン凝集体と思われる構造が確認できた。

Fig.2 に、前期の NIH3T3 細胞の光学顕微鏡写真(a)と X線顕微鏡写真(b)を示す。細胞中に核がはっきりと確認でき、核内に染色体が見られる。核の中には、細い染色体もみられ、その厚みは最小のもので約 500nm であった。500nm 以下の染色体を確認することは困難であった。

今後の課題： 核内のクロマチン凝集体を X線吸収像で捉えることができたが、500nm 以下の凝集中の染色体を確認することは困難であった。光軸方向にクロマチン凝集体が重なり合っているのが原因と考えられる。この問題を解決するため試料調整法の検討を行う必要がある。また、クロマチンのコントラストも上げるため、細胞内のタンパク質を減らすことが有効であることから、この方法も検討したい。ただし、この時の染色質(体)の構造変化の影響についても調べる必要があるので、電子顕微鏡観察なども利用していく予定である。

参考文献

1. Yamamoto A, Takemoto K, Komura I, Namba H, Kihara H, Imaging of Chromosomes at Nanometer-Scale Resolution Using Soft X-Ray Microscope at Ritsumeikan University SR Center Journal of Physics: Conference Series 186 (2009) 012098
2. O. R. Vidal, T. Aya and A. A. Sandberg, Stain Technol. **46** (1971) 89

キーワード

軟 X線顕微鏡, NIH3T3 細胞, 染色体, クロマチン, 細胞分裂前期

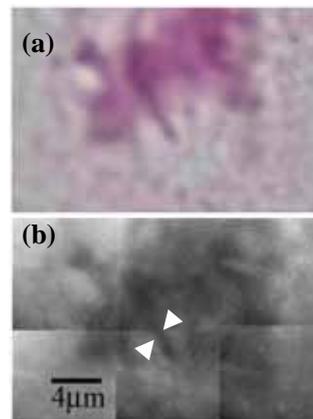


Fig.1 Light and X-ray microscopic images of a NIH3T3 cell in prometaphase.

(a) Light microscopic image and (b) X-ray microscopic image at 2.3 nm. Exposure time was 60 s. An arrowhead indicates chromosome of 490 nm in thickness.

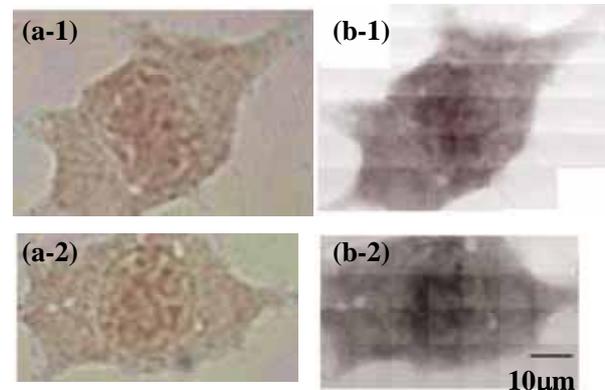


Fig.2 Light and X-ray microscopic images of a NIH3T3 cell in proaphase. (a) Light microscopic image and (b) X-ray microscopic image at 2.3 nm. Exposure time was 100 s.