

きむらえいじ

氏名	木村英二
学位	博士(医学)
学位記番号	新大院博(医)第10号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Scanning Near Field Optical/Atomic Force Microscopy of Bromodeoxyuridine-Incorporated Human Chromosomes (ブロモデオキシウリジンを取り込ませたヒト染色体の近 接場光学・原子間力顕微鏡による観察)
論文審査委員	主査 教授 車田正男 副査 教授 牛木辰男 副査 教授 内藤 眞

博士論文の要旨

【目的】 細胞分裂時に、個々の染色体内で娘染色分体間の交叉（分体交叉）が生じうるとは、古くから知られている。この現象を可視化するために、細胞に放射性同位元素を取り込ませる方法や、ブロモデオキシウリジン（BrdU）を取り込ませ蛍光免疫染色する方法により、娘染色分体の分染（色分け）が試みられてきた。しかし、これらの方法は主に光学顕微鏡を用いたものであるため、染色体の微細構造解析には適さなかった。そこで本研究では、従来の蛍光免疫染色法を改良して各娘染色分体を明瞭に染め分けることができるようにし、これを近接場光学・原子間力顕微鏡（SNOM/AFM）で観察するという手法を検討した。これにより、高解像度で染色体の蛍光像と表面形状像を同時解析できる方法の開発をめざした。

【材料と方法】 ヒト末梢血よりリンパ球を単離し、チミジンの類似化合物である BrdU を含む培養液中で 72 時間培養すると、その間に DNA 合成が 2 回生じ、BrdU の取り込み量の異なる娘染色分体で構成された染色体が得られる。この染色体の展開標本を、15% ホルマリンで固定し、2 または 4N 塩酸、または 0.07N 水酸化ナトリウムによる前処理を行った後に、抗 BrdU 抗体を用いて蛍光免疫染色を施した。標本は蛍光顕微鏡で観察後、SNOM/AFM で解析した。SNOM/AFM は原子間力顕微鏡（AFM）に近接場光顕微鏡（SNOM）を組み合わせたもので、先端に開口部をもつ探針にレーザー光を射し込みながら探針を走査する。この時、探針の先端部には近接場が生じているので、表面形状像と共に蛍光像を同時に得ることができる。

【結果】 まず塩酸およびアルカリの前処理の効果を蛍光顕微鏡で調べた。4N 塩酸や 0.07N 水酸化ナトリウムで処理した標本は、染色性や構造の保持に問題があり、詳しい観察には適さなかった。一方、2N 塩酸水溶液で処理した標本では、BrdU の取り込み量

の差により染色体内の各娘染色分体を明瞭に色分けすることができた。その結果、染色体内の分体交叉を可視化することができた。この 2N 塩酸処理標本を SNOM/AFM で観察することで、この染色体の表面形状像と蛍光像を同時に得ることができた。蛍光像では、蛍光染色部位が染色分体の軸に沿って一様に存在せず、数か所で蛍光強度の強い部位がみとめられた。表面形状像と比較すると、蛍光強度は染色体の表面高低差とは必ずしも一致しないことがわかった。さらに、蛍光像に表面形状像を重ね合わせることで、染色体の高次構造と分体交叉の生じた部位の関係を正確に比較し解析することが可能となった。

[考察] 本研究では SNOM/AFM を用いて BrdU を投与した染色体の観察を試み、分体交叉をおこした染色体の表面立体形状と蛍光像を同時観察することに始めて成功した。またこの手法により、表面形状と蛍光像を高分解能で詳しく解析することが可能となった。

BrdU はチミジンのかわりに DNA に取り込まれる。このことは BrdU の取り込み量が DNA 量そのものを反映するのではなく、染色体の各部位のアデニン・チミン量が蛍光強度として表されることを示唆する。本研究で用いた SNOM/AFM 像で、染色分体上の蛍光強度が表面形状と必ずしも一致しなかったのは、この現象を反映するものと考えられるし、SNOM/AFM の感度の良さを示すものである。また本研究では、分体交叉を明瞭に可視化し、その部位の構造の解析も可能にした。過去の文献では、BrdU の取り込みの差により各染色分体の表面形状に差をみとめるという報告があるが、今回の標本ではそのような差をみとめなかった。今後、この方法により分体交叉をおこす部位と染色体の立体構造との関連を詳しく解析できる可能性が示された。

審査結果の要旨

分裂中期の染色体は、並行する 1 対の染色分体で構成される。この娘染色分体の一方を染色（分染）する方法として、分裂細胞の DNA にプロモデオキシウリジン（BrdU）を取り込ませ、その抗体で蛍光免疫染色する手法が知られている。本研究では、この分染した染色体を走査型近接場光学・原子間力顕微鏡 (SNOM/AFM) という新規の顕微鏡で解析した。

ヒト末梢血リンパ球を、BrdU 添加培養液中で培養し、その染色体展開標本を抗 BrdU 抗体で蛍光免疫染色した。この標本の染色性を蛍光顕微鏡で確認後、SNOM/AFM 観察を行った。これにより、染色体の表面立体形状と BrdU 蛍光像を同時に取得することができ、分染した染色体の蛍光部位を表面形状と結びつけて解析することが可能となった。また個々の染色体内で生じる娘染色分体間の交叉部位を可視化できた。

以上、本研究は SNOM/AFM により生体組織の形態情報と蛍光情報を同時取得する手法を開発し、分染した染色体の構造機能解析に初めて応用した。近接場光学像は、通常の光学顕微鏡像よりはるかに高い解像力を持つことが知られている。本研究は、SNOM/AFM による染色体構造解析の有用性を示すとともに、この顕微鏡の生物応用への重要性を示すもので、この点で学位論文としての価値を認める。