



Title	Quantitative visualization of stable isotope-labeled chromosome using isotope nanoscope [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	永田, 康祐
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第14366号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81965
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kosuke_Nagata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理 学） 氏 名 永田 康祐

学 位 論 文 題 名

Quantitative visualization of stable isotope-labeled chromosome using isotope nanoscope
(同位体ナノスコープによる安定同位体標識された染色体の定量的な可視化)

染色体は細胞が分裂する際に遺伝情報を娘細胞へ伝達するための細胞小器官であり、分裂期の細胞内では、2つの姉妹染色分体（長さ数 μm 、幅約 700 nm）が接着した X 字型の構造を持つ。DNA と染色体タンパク質（主にヒストン）の複合体であり、DNA 損傷に対する反応や染色体の変異を調べるために放射性同位体や核酸のアナログを用いて可視化されてきた。一方で、放射性同位体を使用した手法では、空間分解能が低いことや放射性物質の使用できる施設が限られていること、時間の経過によって放射能が減衰することなどの制限が存在する。また、核酸のアナログを使用した手法では、マーカの結合による分子サイズの変化や DNA の校正機構によるアナログ分子の除去が発生することが知られている。どちらの標識も DNA に取り込まれた場合に変異源として機能し、細胞の突然変異を引き起こすため、複数の細胞周期を経過するような長期間の実験には適さない。外的要因のない状態で染色体内の標識の動態を追跡するためには、変異原性のない標識を使用する必要がある。そこで、安定同位体をトレーサーとして細胞小器官内の動態を追跡・可視化する手法を開発した。安定同位体は、放射線に起因する安全性の問題が存在せず、試料中の標識同位体の減少が起こらない。さらに、標識前の物質と構造が変わらないため、標識の変異原性を考慮せずに実験を行うことが可能である。ただし、細胞小器官レベルで安定同位体標識の分布を可視化するために、ナノメートルオーダーの空間分解能をもつ質量分析装置を用いた。本論文では、細胞小器官である染色体における、安定同位体標識の詳細な分布と量を解析する手法を開発し、分析装置の開発及びその性能評価と実際の染色体を分析した際の定量性の評価を行なった。

本研究で使⽤した同位体ナノスコープは、フェムト秒レーザーによる中性スパッタ粒子のポストイオン化をすることで高感度な二次イオン質量分析装置である。そして、より高い空間分解能を達成するために収差補正装置による一次イオンビームの色収差と球面収差の補正を行った。同位体ナノスコープによる一次イオン電流値と空間分解能の関係を評価するために、二次電子像とイオンイメージの両方を使用し、それぞれの一次イオン電流において収差補正を行った際の一次イオンビームの特性について検討した。二次電子像の空間分解能から、収差補正を行うことで一次イオンビームがより収束し、ビームのイオン電流密度が上昇することを確認した。また、イオンイメージの空間分解能は一次イオン電流値の減少に従って直線的に向上し、加速電圧 20 kV、一次イオン電流 3 pA の一次イオンビームによって 20 nm を達成した。以上から、同位体ナノスコープによって、従来に比べ、低い加速

電圧かつ高いイオン電流密度のビームによる高空間分解能イオンイメージングが可能となった。

確立したイオンイメージング法を用いて、安定同位体で標識した染色体から取得したイオンイメージの定量性の評価を行った。染色体を構成する DNA は細胞分裂の前に完全に複製されるが、その複製様式は半保存的複製と呼ばれる。半保存的複製では、解離した DNA 二重鎖をテンプレートにすることで 2 本の新規鎖が合成される。本研究では、炭素の安定同位体 (^{13}C) で段階的に標識された染色体の炭素同位体存在度 [$^{13}\text{C}/(^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}) = C_r$] 画像から標識量を定量し、その変化が DNA の半保存的複製と一致するかを調べた。ヒト培養細胞を、安定同位体標識グルコース ($\text{U-}^{13}\text{C}_6\text{-Glucose}$) を含む培地中で 1 週間培養した後、培地を天然の同位体組成をもつ培地へ交換し、2 細胞周期培養した。その後、安定同位体標識直後の細胞と培地交換から 2 細胞周期目の細胞を回収し、染色体試料を作製した。その後、標識直後の染色体と 2 細胞周期目の染色体の炭素同位体イメージングを行い、炭素同位体存在度の分布を基に DNA の複製に伴う標識量の変動を解析した。標識直後の染色体は様な炭素同位体存在度の分布を示し、ピーク A [$C_r = 0.230 \pm 0.011(1\sigma)$] が得られた。ピーク A の値は安定同位体標識培地の化学組成から計算された同位体存在度 0.238 と標準偏差内で一致する。また、2 細胞周期目の染色体からは ^{13}C -rich 部位と ^{13}C -poor 部位が観察され、それぞれピーク B₁ [$C_r = 0.094 \pm 0.010(1\sigma)$] とピーク B₂ [$C_r = 0.059 \pm 0.010(1\sigma)$] が得られた。DNA の半保存的複製モデルに従う場合、3 つのピークは等間隔に分布するはずであるが、ピーク B₁ はピーク A と B₂ の中間に位置していない。これは培地交換後に合成されたヒストンが ^{13}C に富んだ DNA 鎖と同時に分析されることによって染色体全体としての同位体存在度が低下したことを示唆している。そこで、染色体に含まれるヒストンの影響を考慮し、DNA のみの同位体存在度を計算した。同じ時期に細胞中で合成された物質は同じ炭素同位体存在度をもつと考えられるため、ピーク A を構成する DNA とヒストンの炭素同位体存在度は 0.230、ピーク B₂ を構成する DNA とヒストン、およびピーク B₁ を構成するヒストンの炭素同位体存在度は 0.059 であると考えられる。染色体あたりの DNA とヒストンがもつ炭素原子数比はそれぞれの組成から計算すると、0.41 : 0.59 なので、ピーク B₁ を構成する DNA の炭素同位体存在度は 0.144 と見積もることができる。これはピーク A と B₂ の中間値とほぼ一致するため、DNA の半保存的複製が再現されていると考えられる。以上から、同位体ナノスコープが細胞分裂に伴う安定同位体標識量の変化を定量的に可視化できることが示された。

本研究は、高い電流密度のイオンビームによる安定同位体の分布の高空間分解能かつ定量的なイメージング法を確立した。そして、染色体の炭素同位体イメージングを行い、細胞分裂に伴う標識量の変化や姉妹染色分体間の相互交換のような細胞小器官の微細な動態を可視化することで、安定同位体が細胞小器官に対するトレーサーとして有用であることを示した。さらに、細胞小器官内に発生した標識量の変化を、放射性同位体やアナログを生体へ取り込ませずに追跡する新手法を確立した。