



本実験では、複製された DNA や転写された RNA を個々の細胞で可視化して細胞核の機能と細胞周期の制御を理解すること、及び、染色体標本の作成により染色体の構造、多様性、分配機構について理解することを目的とする。

## 実習の流れ

### 第一回 実習説明

複製された DNA 複製の検出と観察

### 第二回 染色体標本の作成と観察

### 第三回 転写された RNA の検出と観察

### 第四回 パルスチェイス実験

本実習では、個人で実験を行うが、4名（または5名）でグループを作り、試薬と実験結果を共有する。各自が全実習を通じて1種類の細胞を解析するが、1つグループ内では4種類の異なる細胞を解析することになる。

本実習で用いる細胞：

HeLa（ヒト子宮頸がん由来上皮細胞）

hTERT-RPE1（テロメラーゼで不死化されたヒト網膜色素上皮細胞）

MC12（マウス胚性がん腫細胞）

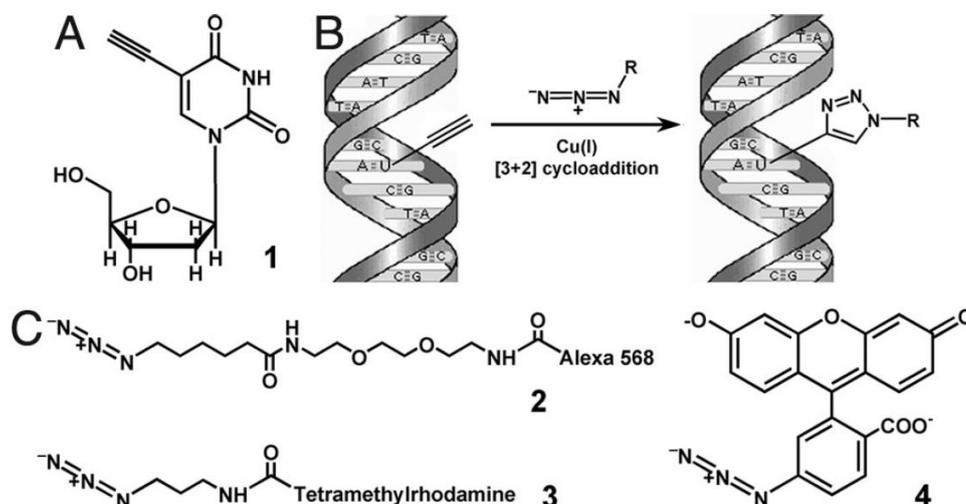
DM（インドホエジカ繊維芽細胞）

## I. 複製された DNA の検出と観察

細胞が増殖するためには、遺伝子である DNA の複製と分配が必要である。DNA の複製は、二重鎖がほどかれて、それぞれの鎖に相補的なヌクレオチドが付加されることで起こる（半保存的複製）。従って、細胞内で新しく合成された DNA を検出するには、DNA ポリメラーゼの基質であるヌクレオチドを標識すればよい。この目的には、古典的には  $^3\text{H}$  や  $^{14}\text{C}$  などの放射性同位体で標識されたチミジンが用いられてきた (Taylor et al, Proc Natl Acad Sci USA, 43, 122-128, 1957)。培地中に  $^3\text{H}$ チミジンを添加すると、細胞に取り込まれ、チミジンキナーゼによりリン酸化されて  $^3\text{H}$  (デオキシ) チミジン三リン酸 [dTTP; (deoxy) thymidine triphosphate] となり、DNA ポリメラーゼの基質として用いられる。細胞の固定や DNA の調製後、DNA に取り込まれなかった  $^3\text{H}$ dTTP は洗浄により取り除くことで、複製により DNA に取り込まれた  $^3\text{H}$ を検出することができる。

1980 年代には、放射性チミジンの代わりに、チミジンの類似体である 5-ブロモデオキシウリジン [BrdU; 5-bromodeoxyuridine] が用いられることが多くなった (Gratzner, Science, 218, 474-475, 1982)。DNA に取り込まれた BrdU は、抗 BrdU 抗体により検出することができる。但し、抗 BrdU 抗体は二本鎖 DNA 中の BrdU を認識できないため、DNA を変性させ一本鎖にする必要がある。1990 年代には、蛍光標識された dTTP 誘導体を細胞に直接導入することで、生きた細胞においても複製した DNA を検出することが可能になった (Manders et al, J Cell Biol, 144. 813-822, 1999)

さらに最近、アルキン ( $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ) とアジド ( $-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$ ) の反応 (いわゆる Click chemistry) を用いた簡便な方法が DNA 複製の解析にも用いられるようになった (図; Salic and Mitchison, Proc Natl Acad Sci USA, 105, 2415-2420)。チミジン類似体である 5-エチニルデオキシウリジン (EdU; 5-ethynyldeoxyuridine) を培地中に添加し、DNA に取り込まれた EdU のアルキンをアジド化蛍光分子と反応させることで、複製した DNA を検出できる。本実験では、EdU を培地に添加し、細胞を固定後、アジド化蛍光分子と反応させて、EdU の添加中に複製した DNA を検出する。



## 材料と試薬

- 培養細胞: ガラスボトムディッシュで培養。培地は 0.5 mL の Dulbecco's Modified Eagle's Medium に 10% 牛胎児血清と抗生物質 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシン、100 U/mL ペニシリン) を加えたもの。
- 10 mM EdU
- 4%ホルムアルデヒド溶液: ホルムアルデヒドが 4%の濃度で 250 mM Hepes-NaOH, (pH 7.4) に溶けたもの。隣接したアミノ基を主に架橋させる (林陽子ら、クロマチン免疫沈降法、「エピジェネティクス実験プロトコール (牛島俊和、眞貝洋一、編)」、羊土社、2008)。
- PBS (phosphate-buffered saline: 生理食塩水): 0.2 g/L KCl, 8 g/L NaCl, 0.2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.15 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 1% Triton X-100: 非イオン性界面活性剤である Triton X-100 (ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルの一種) を PBS に希釈したもの。膜の脂質が溶け込むため、細胞膜や核膜を透過性に行わないと Alexa Fluor 488-azide が細胞に入らない)。また、ホルムアルデヒドで架橋されなかった分子が抽出される。
- Alexa Fluor 488-azide を含む反応液: Alexa Fluor 488-azide、緩衝液 (Tris-HCl, pH 8.5)、還元剤 (ascorbic acid)、硫酸銅 (4 mM  $\text{CuSO}_4$ ) を含む。ここでは、

Life Technology 社のキットに含まれるシステムを用いる。

<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp10338.pdf>

- 100 ng/mL ヘキスト溶液 : DNA と結合して UV 励起により蛍光を発する色素である Hoechst33342 (10 mg/mL) を PBS に希釈したもの。

## 手順

- 1 0.5 mL の培地で細胞が培養されたガラスボトムディッシュを 2 枚用いる。  
1 枚のディッシュに 10 mM EdU を 5  $\mu$ L 加える (終濃度 100  $\mu$ M)。  
もう 1 枚には、何も加えない。
- 2 炭酸ガスインキュベーターで 2 時間培養する (37°C、5% CO<sub>2</sub>)。
- 3 培地を取り除き、4% ホルムアルデヒドを加えて 5 分間室温で放置し、細胞を固定する。
- 4 4%ホルムアルデヒドを取り除き、2 mL PBS で 3 回ディッシュを洗浄する。
- 5 PBS を取り除き、2 mL 1% Triton X-100 を添加して 20 分間室温で放置する。
- 6 この間に、Alexa Fluor 488-azide を含む反応液を作製する。

4名分	1 mL (各 200 $\mu$ L+ 予備 200 $\mu$ L)
1X Click-it reaction buffer	860 $\mu$ L
100 mM CuSO <sub>4</sub>	40 $\mu$ L
Alexa Fluor 488 azide	12 $\mu$ L
Reaction buffer additive	100 $\mu$ L
計	~1 mL

- 7 Triton X-100 を取り除き、2 mL PBS で 3 回ディッシュを洗浄する。
- 8 Alexa488-azide を含む反応液 100  $\mu$ L をディッシュ中央部のカバーガラス部分に添加し、30 分間室温で放置する。
- 9 この間にヘキスト溶液を作製する。

4名分	20 mL (各 4 mL+ 予備 4 mL)
10 mg/ml Hoechst33342	0.2 $\mu$ L
PBS	20 mL
計	~20 mL

10 2 mL PBS で 3 回ディッシュを洗浄する。

11 2 mL のヘキスト溶液をディッシュに加えて 20 分室温で放置。

12 2 mL PBS で 3 回ディッシュを洗浄し、2 mL PBS が存在する状態で保管（帰宅時には、冷蔵庫で保存）。

13 蛍光顕微鏡で観察する。

DNA に取り込まれた EdU が緑色の蛍光で観察できる。EdU を培地に添加したディッシュと添加していないコントロールのディッシュを比較する。

① EdU を取り込んだ細胞の割合

② EdU の蛍光パターン

を計測、記録すること。

## II. 染色体標品の作成と観察

高等真核生物の細胞が分裂するとき、核膜が崩壊して凝縮した染色体が出現する。生細胞では、個々の染色体を区別するのは困難であるが、細胞を低張液で処理してから染色体標本を調製することで、染色体の形状や数を解析することが可能となる(Tjio and Levan, Hereditas, 42, 1-6, 1956)。その際、微小管の脱重合を阻害するコルセミドやコルヒチンなどの処理により染色体分配を阻害することで、分裂前中期の細胞の割合を増やし、かつ、コンパクトに凝縮した染色体を調製することができる。ゲノム解析が発達した現在においても、染色体異常の検査などに用いられるなど、染色体標本の作製は重要な手法となっている。

### 材料と試薬

- 培養細胞：10 cm ディッシュで以下のいずれかの細胞を培養。培地は 10 mL の Dulbecco's Modified Eagle's Medium に 10%牛胎児血清と抗生物質(100 µg/mL ストレプトマイシン、100 U/mL ペニシリン) を加えたもの。
- コルセミド溶液 (10 µg/mL)
- PBS (phosphate-buffered saline : 生理食塩水) : 0.2 g/L KCl, 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.15 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.25% トリプシン - 1 mM EDTA 溶液 (in PBS) : 細胞の剥離用。蛋白質分解酵素であるトリプシンは細胞表面で細胞間接着またはディッシュとの接着に働く蛋白質を分解する。EDTA は、一部の接着蛋白質が機能するために必要な Ca<sup>2+</sup>をキレートする。
- 0.075 M KCl : 低張液
- メタノール-酢酸 固定液 : メタノールと酢酸を 3:1 で混合したもの
- 15 mL 遠沈管
- スライドガラス

## 手順

- 1 10 cm ディッシュで培養している細胞の培地 (10 mL) に 10  $\mu$ L のコルセミド溶液を加える (終濃度 10 nM)。
- 2 コルセミドの存在下で、1 時間培養する。
- 3 この間に低張液と固定液を調製する

### ① 0.075 M KCl 溶液

4 名分 50 mL (各 10 mL+予備 10 mL)

KCl 0.28 g

H<sub>2</sub>O 50 mL

---

計 50 mL

### ② メタノール-酢酸 固定液

4 名分 (各 25 mL+予備 20 mL)

メタノール 90 mL

酢酸 30 mL

---

計 120 mL

- 4 ディッシュから培地を回収し、15 mL 遠沈管に移す。このとき、剥がれやすい細胞はできるだけ回収する。
- 5 10 mL の PBS をディッシュに加えて洗浄する。
- 6 1 mL のトリプシン-EDTA 溶液をディッシュに加えて全体にいきわたらせる。
- 7 トリプシン-EDTA 溶液を取り除く。
- 8 室温で数分間放置し、細胞がディッシュから剥がれるのを待つ (分裂期の細胞は剥がれやすいため、全ての細胞が剥がれるのを待つ必要はない)。
- 9 15 mL 遠沈管に移しておいた培地を用いて、ディッシュから剥がれた細胞をけんだくし、15 mL 遠沈管に細胞を移す。
- 10 15 mL 遠沈管を遠心 (1,200 rpm、3 分、室温) して、細胞を集める。
- 11 デカンテーションで培地を捨て、遠沈管の底に残った液に細胞を穏やかにけんだくする。
- 12 10 mL の低張液を加えて、蓋を閉めて上下を逆さにして穏やかに混ぜる。
- 13 20 分間室温に放置して、細胞の体積の増加と染色体間の分離を促す。

- 14 100  $\mu$ L の固定液を加えて、上下を逆さにして穏やかに混ぜる。
- 15 遠心 (1,200 rpm、3 分、室温) して、細胞を集める。
- 16 デカンテーションで上清を捨て、遠沈管の底に残った液に細胞を穏やかにけんだくする。
- 17 10 mL の固定液を加えて、上下を逆さにして穏やかに混ぜる。
- 18 遠心 (1,200 rpm、3 分、室温) して、細胞を集める。
- 19 デカンテーションで上清を捨て、遠沈管の底に残った液に細胞を穏やかにけんだくする。
- 20 10 mL の固定液を加えて、上下を逆さにして穏やかに混ぜる。
- 21 10~20 分室温で放置後、遠心 (1,200 rpm、3 分、室温) して、細胞を集める。
- 22 この間に、机の上に水で濡らしたペーパータオル (またはキムワイブ) を用意し、その上にスライドガラスを載せる。
- 23 デカンテーションで上清を捨て、遠沈管の底に残った液に細胞を穏やかにけんだくする。
- 24 0.2~1 mL の固定液を加えて、穏やかに混ぜる。
- 25 スライドガラスの上に、細胞を 1 滴滴下する。
- 26 数分間放置し、乾燥させる (帰宅時には、室温保存)。
- 27 位相差顕微鏡で観察する。
  - ① 染色体の数
  - ② 染色体の形状を計測、記録すること。

### III. 転写された RNA の検出と観察

遺伝子発現の出発点である RNA の転写は、細胞核の最も重要な機能の一つである。細胞中で転写された RNA の検出は、複製された DNA と同様に放射性同位体で標識されたウリジン、あるいは、5-ブロモウリジン (BrU; 5-bromouridine) や 5-フロロウリジン (FU; 5-fluoruridine) などのウリジン類似体と特異抗体を用いて行われてきた。最近では、5-エチニルウリジン (EU; 5-ethynyluridine) を用いた検出も行われている。

本実験では、EU を培地に添加し、細胞を固定後、アジド化蛍光分子と反応させて、EU の添加中に転写された RNA を検出する。

#### 材料と試薬

- 100 mM EU
- 他は、実験 I の DNA 複製の検出に用いられるものと同様。

#### 手順

- 1 0.5 mL の培地で細胞が培養されたガラスボトムディッシュを 2 枚用いる。  
1 枚のディッシュに 100 mM EU を 5  $\mu$ L 加える (終濃度 1 mM)。  
もう 1 枚には、何も加えない。
- 2 以降は、I の DNA の検出と同様に行う。

## IV. パルスーチェイス実験

パルスーチェイス実験とは、細胞を一定期間標識してから洗浄し、さらに培養を継続する実験である。今回は、細胞を EdU または EU で 2 時間標識 (パルス) した後、それらを含まない培地で 1 日培養 (チェイス) した後に固定し、標識された DNA や RNA を検出する。この実験により、複製した DNA や転写された RNA が 1 日後にどのような状態となるのかを調べることができる。ただし、同じ細胞での挙動を調べるためには、生細胞を用いたタイムラプス解析が必要となる。

### 材料と試薬

実験 I、III と同様。

### 手順

～第三回～

- 1 0.5 mL の培地で細胞が培養されたガラスボトムディッシュを 3 枚用いる。  
1 枚ディッシュに 10 mM EdU を 5  $\mu$ L 加える (終濃度 100  $\mu$ M)。  
別のディッシュに 100 mM EU を 5  $\mu$ L 加える (終濃度 1 mM)。  
もう 1 枚には、何も加えない。
- 2 2 時間後に、2 mL の培地で 3 回洗浄し、新しい培地 (2 mL) を加えて炭酸ガスインキュベーターに戻して培養を続ける。

～第四回～

- 3 次の日に、細胞を取り出して固定し、膜の透過処理と蛍光染色を行う (I の DNA 検出の手順 3 以降)。
- 4 Alexa Fluor 488 を含む反応液

4 名分 1.5 mL (各 300  $\mu$ L + 予備 300  $\mu$ L)

1X Click-it reaction buffer 1290  $\mu$ L

100 mM CuSO<sub>4</sub> 60  $\mu$ L

Alexa Fluor 488 azide 18  $\mu$ L

Reaction buffer additive 150  $\mu$ L

---

計 ~1.5 mL

## レポート作製

以下のポイントを指針にしてレポートをまとめること。

・「**目的と背景**」: 実験の目的と背景を簡潔に記述する。テキストの丸写しではなく、独自に調べたことも含めて、自分の言葉で書くこと。

・「**材料と方法**」: 実際に行ったことを過去形で記述すること。

・「**結果**」: 以下の点を盛り込み、実験の結果を過去形で記述すること。

実験 I EdU 陽性細胞の割合、EdU の局在

実験 II 染色体の本数 (各細胞毎の数、平均)、染色体の形状

実験 III EU 陽性細胞の割合、EU の局在

実験 IV EdU 陽性細胞の割合と局在、EU 陽性細胞の割合と局在

・「**考察**」: 考察のポイントを以下に挙げる。それら以外にも実験結果や文献調査などを元にした独自の考察を期待する。自分の結果だけではなく、グループで他の細胞に関して解析した結果と比較して考察すること。

実験 I EdU 陽性細胞の割合から考えられること。細胞による EdU の局在の違いから考えられること。

実験 II 染色体の本数や染色体の形状から、自分が解析した細胞が何であると考えられるか。

実験 III EU 陽性細胞の割合や特徴から考えられること。EU の局在から考えられること

実験 IV 実験 I、III との違いから考えられること。

全体 自分が解析した細胞の遺伝子発現、DNA 複製、細胞周期、染色体構造などに関する特徴についてまとめる。

・「**文献**」: 参考文献 (論文、書籍、インターネットサイト) などを正しく記載すること。

・「**感想**」: 実習全体に関する感想、コメントなどを自由に記述。

\* 最終日から 1 週間後の 13 時 20 分までに、B2 棟 938 室の木村または秀島まで提出すること。