



研究技術紹介

顕微蛍光測光装置, 並びにブロモデオキシウリジン及びその抗体を用いた海藻類の細胞周期の解析方法

本村泰三¹・菱沼 佑²・有賀博文¹

¹北海道大学理学部附属海藻研究施設 051-0003 室蘭市母恋南町 1-13

²山形大学理学部生物学科 990-8560 山形市小白川町 1-4-12

Taizo Motomura¹, Tasuku Hishinuma² and Hirofumi Aruga¹ 1998: Cell cycle analysis in algal cells using techniques of microspectrofluorometry and anti-BrdU antibody. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 46:11-16.

Basic methods on cell cycle analysis in algal cells using techniques of microspectrofluorometry and anti-BrdU antibody are described. Omitting non-specific staining of DNA fluorochromes and autofluorescence of chlorophyll in chloroplasts is an essential step in microspectrofluorometry. Comparison using control cells is necessary in this method. For detection of incorporated BrdU in nuclei using anti-BrdU antibody, DNA must be denatured using hydrochloric acid or deoxyribonuclease I.

Key Index Words: algal cells, BrdU, cell cycle, microspectrofluorometry

¹ Institute of Algological Research, Hokkaido University, Muroran 051-0003 Japan

² Department of Biology, Faculty of Science, Yamagata University, Yamagata 990-8560 Japan

はじめに

藻類は陸上植物と異なり, それぞれの分類群において多様で複雑な生活環を持つことが培養法の進展と共に明らかになってきた。生活環において減数分裂と受精がどこで行われるかは, 生活環を理解する上できわめて重要なことである。ところが, 藻類では染色体が小さく, 正確にその数を明らかにすることが難しい種類が多い。さらに多くの紅藻類において染色体の倍数化が藻体の生長と共に特殊な細胞群において行われていることが知られている。また, 褐藻類では微小な匍匐体から直立体が発生する際に, 体細胞複相化により染色体が倍加したり, 単子嚢母細胞において減数分裂を伴わずに遊走子が形成される場合も知られている。そのため, 藻類学において染色体の単相・複相の問題を含めて広く細胞周期を理解することは重要なことである。

一般に細胞周期はM期(核分裂期), G₁期, S期(DNA合成期), G₂期に分けることができ, それぞれのステージで代謝系が大きく変わることが知られている。核分

裂期においては染色体が観察できるようになるために, 通常の顕微鏡観察により核分裂期の核は容易に認識できるが, それ以外のステージ, すなわちG₁期, S期, G₂期の核を通常の光学顕微鏡で判定することは困難である。これら中間核における細胞周期の時期を判定する方法として, いくつかの手段が考えられるが, 大きく3つの方法が考えられる。まず第1にDNAに対する特異的な蛍光色素を用い核を染色し, その蛍光強度を計ることにより時期を特定する方法がある。第2にS期核においてチミジンの代わりに5-bromodeoxyuridine(BrdU)を取り込ませ, その後に抗BrdU抗体を用いて検出する方法がある。そして最後に細胞周期の特定の時期に発現する細胞周期依存性のタンパク質に対する抗体を使用し検出する方法がある(例えば, S期核において特異的に発現するタンパク質PCNA(proliferating cell nuclear antigen)に対する抗体を使用し検出する方法)。最後の方法は藻類を材料にして最近いくつか報告があるが, 使用する抗体がすべての種類のPCNAに対して特異性があるとは限らず, ま

まだまだ普通に使用できる方法とは言いがたい。そこで、一般には細胞周期の解析には蛍光色素を用いての顕微蛍光測光、もしくはBrdUを用いた検出が一般的である。本稿では、まず始めに、顕微蛍光測光を行う際の諸注意についての述べ、その後にはBrdU-抗BrdU抗体を用いてのS期核の検出方法について具体的に報告する。

1 顕微蛍光測光による細胞周期の解析

顕微蛍光測光は細胞や組織を固定した後にDNAに特異的に結合する蛍光色素を用いて核を染色し、顕微定量測光装置等(オリンパス社やカールツァイス社など)を装着した落射蛍光顕微鏡を用いて核内DNAの蛍光量を測定して細胞周期の時期を明らかにするものである。植物、特に海藻類を材料にする場合多くの問題がある。例えば、ヒバマタ(*Fucus*)は古くから受精、発生、極性発現のモデルとして扱われてきた材料であるが未だに受精から接合子の核分裂にいたるまでの細胞周期の時間は明らかにされていない。実際に顕微蛍光測光によって卵核、精核、そして接合子の核分裂中期の核内DNA量を計測してみると、理論的には1:1:4となるはずであるのが、何度行ってもこのようにはならなかった。理由としては、1)卵核と精核におけるクロマチンの凝縮度の違い、2)発生に伴う細胞壁の肥厚、そして3)発生に伴う細胞内容物の変化などが考えられる。以下、それぞれの作業における諸注意について述べる。

1-1 固定

通常、固定はエタノール:酢酸(3:1)、もしくは海水や浸透圧調整を行った適当な緩衝液に溶かした低濃度(0.5-1%)のグルタルアルデヒドのどちらで行っても良いが、顕微定量測光の場合にはエタノール:酢酸(3:1)の方が良い結果が得られる場合が多い。エタノール:酢酸(3:1)で数時間あるいは一晩低温(冷蔵庫の中)で行い、使用するまで組織は70%エタノールに入れ、4℃で保存しておく。落射蛍光顕微鏡に装着した顕微蛍光測光装置を用いて核内DNAを計測する場合、葉緑体のクロロフィルの自家蛍光が障害となる。核の上に葉緑体が無い試料ならば何ら問題は無いが、核と葉緑体が重なるように混在している場合にはエタノール:酢酸(3:1)で固定した後に、-20℃に冷やしたメタノールに30分程度浸して完全にクロロフィルを除き、その後70%冷エタノールで保存し、試料とするのが良い。しかし、このような処理をしても対象とする核の上に葉緑体など

の細胞内構造物がある場合にはデーターにばらつきが生じる。植物細胞の場合には顕微測光によりDNA量を計測するうえで細胞壁と葉緑体が必ずネックになる。

1-2 染色

エタノール:酢酸(3:1)で固定したサンプルは流水もしくは染色時に使用する緩衝液で洗う。対象とする材料が数ミリの大きさがあり、堅いサンプルの場合には、流水で洗った後に、1MのLiCl溶液に数分浸す事により柔らかくなる。その後、サンプルはスライドガラスとポリ-L-リジンをコートしたカバーガラスの間にはさみ、細胞が一層になるように押しつぶす。大部分の細胞はポリ-L-リジンをコートしたカバーガラスの方に付着している。そして、カバーガラスを小型シャーレ中で適切な緩衝液で数回洗浄した後に蛍光色素で染色する。

DNAに特異的に結合する蛍光色素は、Molecular Probes社などから容易に購入できる(例えば、Ethidium bromide(EB), Propidium iodide(PI), 4'-6-diamido-2-phenylindole (DAPI), Hoechst33258, Mithramycin, Picogreen, YOYO-1など)。これらの蛍光色素がDNAのどの部位に結合するかは、ある程度判明しており、DAPI, Hoechst33258はdouble-stranded DNAのA-T塩基対に、Mithramycinはdouble-stranded DNAのG-C塩基対に結合すると考えられる。またEB, PIはDNA全体の分子構造に対して認識しているものと考えられている。Picogreen, YOYO-1は2重鎖のDNAを特異的に染色する。

顕微定量測光にはDAPI(stock sol.: 200-500 μ g/mL H₂O, 冷蔵保存)もしくはMithramycin(stock sol.: 1mg/mL H₂O, 冷蔵保存)を用いるのが一般的である(Goff and Coleman 1990)。緩衝液は、DAPI染色の場合にはMcIlvaineのbuffer(pH4.2)、Mithramycin染色の場合にはMcIlvaineのbuffer(pH7.0+15mM MgCl₂)を用いる。染色濃度はDAPIの場合は0.5-1.0 μ g/mL in McIlvaine buffer(pH4.2)、Mithramycinの場合には50-100 μ g/mL in McIlvaine buffer(pH7.0+15mM MgCl₂、Mithramycinの場合にはMgCl₂を入れていることに注意。MgCl₂が入っていないと染色できない)で冷蔵庫の中で30分から2時間程度染色する。染色後、カバーガラスの回りを透明マニキュアで封じて観察する。

DAPIは蛍光輝度も高く、退色も比較的小さいので良い蛍光色素であるが、残念ながら材料によっては細胞壁が非特異的に強く染色され、核の観察が難しい場合がある。このような場合、処理液や染色液に5mMの

CaCl₂を添加することにより非特異的蛍光が減少することもある。これに対して、MithramycinはDAPIに比べれば非特異的な染色が少ない。ただし、退色が早いので注意が必要である。退色がひどい時には使用する対物レンズの倍率を一段下げる。DAPI染色はU筋起で青白く、Mithramycin染色はB筋起で黄色に光るが、顕微蛍光測光を行う場合適切なバリアーフィルターを装着する(Mithramycin染色の場合はFITC専用のフィルターで代用できる)。

同じように固定・染色を行ってもスライドガラスがちがうと結果が異なる場合があり、また同一スライド上でも場所によって(中央と端の部分)、値が若干異なることもある。このため常にコントロールをとることは重要である。特に対象材料の核分裂中期核、核分裂終期の娘核、さらにはアフィディコリン処理を行いG₁期で止めた核などをコントロールとし常に比較検討をしながら進めていくことを強く勧める。

2 ブロモデオキシウリジン(BrdU)、抗BrdU抗体を用いたDNA合成期核の検出

S期(DNA合成期)を認識する方法として古くから用いられてきたのは、トリチウムラベルしたチミジンを外から細胞に与え、取り込んだ核をオートラジオグラフィで見つけるという手段である。しかしこの方法は、1)アイソトープを用いること、2)判定までに時間がかかること、3)分解能が低いことなどの幾つかの問題点がある。トリチウムラベルしたチミジンの代わりに、チミジンの類似体であるブロモデオキシウリジン(BrdU: Bromodeoxyuridine)を取り込ませ、それを抗BrdU抗体を用いて検出する方法がある。この方法は分解能も高く、その日のうちに結果を出すことができ、そしてなによりもアイソトープを用いないために特別な施設を必要としないメリットがある。BrdUはチミジンの類似体であり、DNA合成期にはチミジンと同様に核に特異的に取り込まれる。抗BrdUモノクローナル抗体はすでにいくつかの会社から市販されており、前回述べた免疫組織化学的方法により容易に検出することが可能である。以下、主に緑藻類、特に筆者らが材料にしている多核緑藻のマガタマモ、ハネモ、モツレグサを材料に経験的な観点から、BrdUによるS期核の検出方法について述べる。固定等の基本操作は、前回の細胞骨格の免疫組織学的方法と同じであり、このため重複する部分については説明を省略するので、前回の方法を適宜参照していただきたい。

2-1 細胞へのBrdUの取り込み

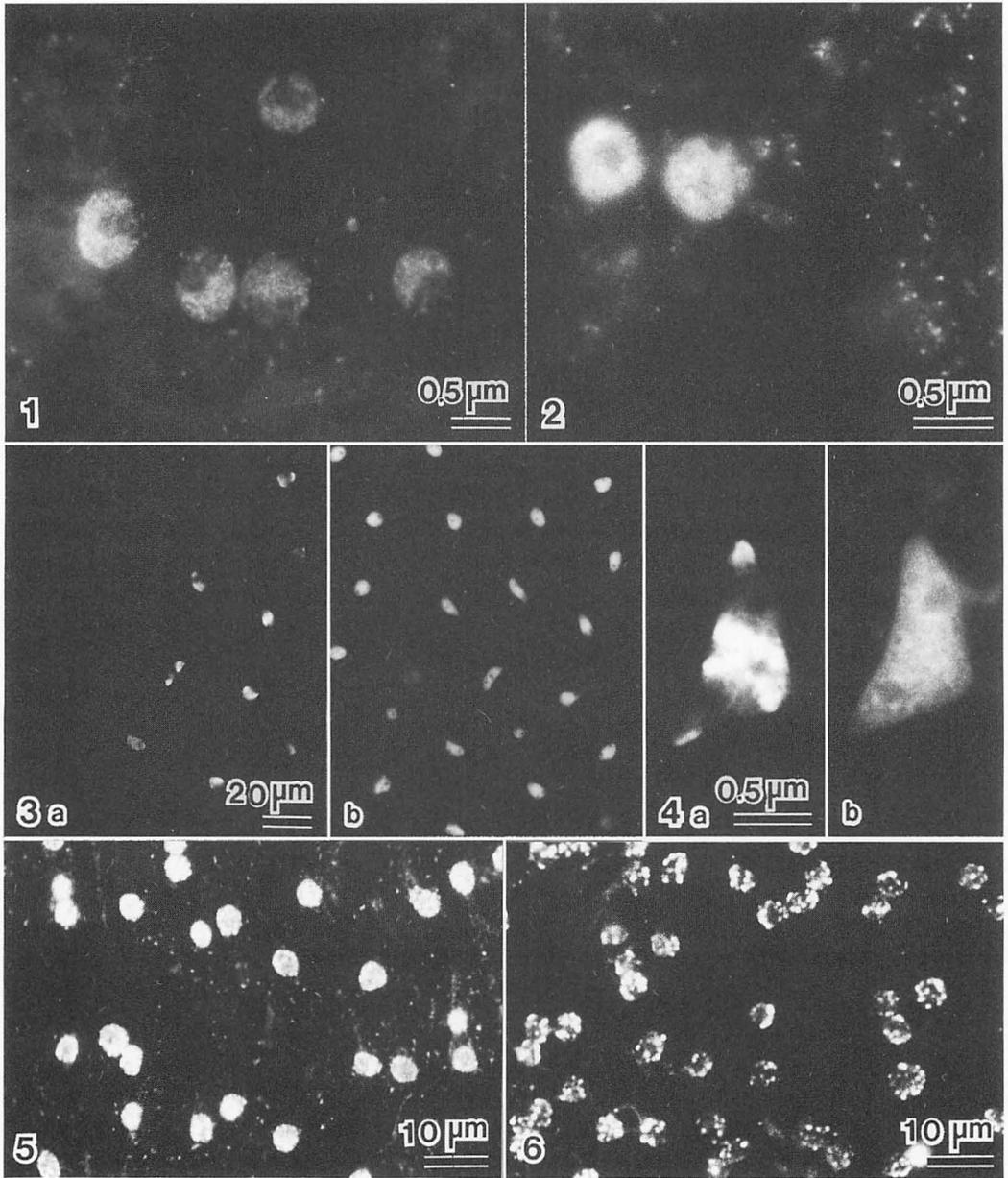
マガタマモ、ハネモ、モツレグサを200μMのBrdUを含むPES培地中で一定時間培養しBrdUを取り込ませる。藻体へのBrdUの処理時間は30分以上の取り込みで検出が可能であり、それ以下ではほとんど検出が困難である。また、今回用いたBrdUの濃度は、動物細胞、高等植物の場合と比べ10倍ほど高い濃度である。この濃度は高ければよいというわけではなく、高すぎて逆に検出されにくくなる場合もあるので材料によって培地に添加する濃度を検討する必要がある。またBrdUが検出されない場合、BrdUが植物細胞内に取り込まれていないことも考えられるので、この点も考慮する必要がある(褐藻類では現在のところBrdUの取り込みがうまく行かない。チミジンの代謝経路の違いによるのではないかと考えられる)。

動物細胞ではチミジンの生合成阻害剤である5-Fluorodeoxyuridine (FdU)をBrdUの1/10の濃度で同時に添加しBrdUの取り込みを良くする場合があるが、FdUは多核緑藻では顕著な働きが見られず、それよりはBrdU自体の濃度を上げた方が効果が高い。なお、BrdUは10mMの濃度で純水に溶かし、エッペンドルフチューブに小分けした後に、-20℃で保存しておくとう便利である。BrdUには変異原性があるので取り扱いに注意する。

2-2 細胞の固定

BrdUを取り込ませた細胞の固定、さらには抗体処理・蛍光顕微鏡の観察は基本的には前報の細胞骨格の観察法と同様である。固定は3%のパラホルムアルデヒドと0.2-0.5%グルタルアルデヒドを含むPES培地、あるいはNaClで浸透圧調整したPHEM Bufferで0.5-1時間固定する。しかし、材料によっては固定法によってBrdUの検出度に違いが見られるので個々の材料で検討する必要がある。モツレグサの場合、メタノール固定(100%メタノール、室温で30分)の方がパラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドよりも良い結果を得ることができた。これは化学固定と有機溶媒固定による固定能の違いによるためと考えられる。強く固定するとそれに伴い後にのべる2本鎖DNAの変性に要する時間は異なる。

固定後、PBSで数回洗い、5% Triton X-100 in PBSで室温1-2時間程度処理し、できる限りクロロフィルを取り除く。



- 1, 2. ハネモ。200 μ MのBrdUで5時間ラベル。2ではBrdUを取り込んだ葉緑体DNAがドット状に検出されている。
3. マガタマモ。200 μ MのBrdUで1時間パルスラベル。a. 抗BrdU抗体で検出されたBrdUを取り込んだ核。b. 20 μ g/mLのPIで染色。
4. マガタマモ。200 μ MのBrdUで30分間パルスラベル。30分間パルスラベルでも十分に検出が可能である。なお、核内においてBrdUを取り込む部位はS期の時期によって変化する。a. 抗BrdU抗体で検出されたBrdUを取り込んだ核。b. 20 μ g/mLのPIで染色。
- 5, 6. モツレグサ。100%メタノールで固定後、2NのHClでDNAを変性させた。5は33時間、6は4時間200 μ MのBrdUで核をラベルした。オルガネラDNAもドット状に検出されている。

2-3 DNAの変性

BrdUは2本鎖DNAの中に取り込まれるが、これを抗BrdU抗体を用いて認識するには、DNA中のBrdU分子を抗体が認識できる様に2本鎖DNAを変性させなければならない。その方法は大きく2通りある。<I>強酸あるいは強アルカリを用いて2本鎖DNAを1本鎖DNAに変性させる(経験的にアルカリ溶液は酸性溶液よりも細胞構造に対するダメージが大きいので、酸性溶液を用いることを勧める)。<II> Mg_2^+ 存在下でDNase I処理を行い、2本鎖DNAにrandom nickをいれる。<II>の方法はマイルドな方法であるために、他の抗体、例えば抗チューブリン抗体との併用が可能である。

<I>の方法を用いる場合には、4NのHClで室温10分間処理する。<II>の方法の場合には10U DNaseI/mL (50mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 0.8% NaCl, pH7.6)の条件下で室温30分間処理する。最初に実験する場合には<I>の方法から始めたほうが無難である。塩酸処理の時間は短すぎてもBrdUが検出されないが、長すぎても塩酸で細胞自体が分解、褐色化してBrdUの検出ができなくなるので注意する必要がある。

いずれの場合も処理後念入りにPBSで洗浄を行い、1mg/mLの $NaBH_4$ で還元処理を施した後、PBSでさらに洗浄する。

2-4 ブロッキング

十分洗浄したサンプルはを0.1%BSA含むPBS溶液中(PBS-BSA)、もしくはブロッキング液(2.5%スキムミルク、5%正常ヤギ血清、0.1% NaN_3 in PBS)中で30℃、0.5-1時間ブロッキングを行う。

2-5 抗BrdU抗体処理

PBSで1/5程度に希釈した抗BrdUモノクローナル抗体(日本ベクトン・ディキンソン社)で35℃、0.5-1時間インキュベートする。その後、PBSもしくはPBS-BSA溶液で3回以上溶液を交換しながら、十分に洗浄する。

ところで、抗BrdUモノクローナル抗体は細胞増殖検出キットとして各社から売り出されているが、すでにDNase Iや制限酵素を含むものもあるので使用に際し注意を要する。

2-6 二次抗体処理

PBSもしくはPBS-BSAで1/50または1/100に希釈した蛍光標識二次抗体、FITC標識一抗マウスIgG(ヤギ)またはrhodamine B標識一抗マウスIgG(ヤギ)で、35℃、30分間インキュベートし、PBSもしくはPBS-BSA溶

液で洗浄する。理由は明確では無いが、経験的に2本鎖DNAの変性において塩酸処理を行った場合はFITC標識二次抗体、DNase I処理を行った場合はrhodamine標識二次抗体で好結果が得られる。BrdUを取り込んだ核と取り込んでいない核の比較を容易にするため、核はDAPI溶液、EB溶液、あるいはPI溶液(蛍光標識二次抗体とは異なる励起光に対応する染色液を選択する)で染色する。4N HClで1本鎖DNAに変性させた場合には当然DAPIでは強く核は染色できない。そこでEBもしくはPI溶液(50 μ g/mL in PBS)で室温10分間染色する。DNase I処理した場合にはDAPI溶液(0.5 μ g/mL in PBS)で室温10分間染色する。

2-7 プレバレーションおよび観察

PBSで数回洗った後に、退色防止剤として0.2% p-phenylenediamineを含むMowiol 4-88 mounting mediumもしくはグリセリン溶液で封入し、落射蛍光顕微鏡で観察する。DAPI染色はU励起で、そしてローダミン、EB、PI染色はG励起で、FITC染色はB励起で観察する。

BrdUを取り込んだ核は強く標識二次抗体で染色される。この時、BrdUの処理時間またS期の前、中、後期によっても染色性は異なるはずである。またハネモやモツレグサでは葉緑体DNAもドット染色される。なお、固定、DNA変性処理など本来の抗体のエピトープ構造に変化を与える可能性のある操作が含まれるので、必ずコントロール実験(例えばBrdUを取り込ませていない細胞やBrdUを取り込ませたが一次抗体処理をしない等)を行い、検出されたのが本当に取り込まれたBrdUであることを確認する必要がある。

参考文献

- Goff, L. J. and Coleman, A. W. 1990. DNA: Microspectrofluorometric studies. In "Biology of the red algae" (Eds. Cole, K. M. and Sheath, R. G.), Cambridge University Press, pp. 43-71.
- Gratzner, H. G. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection DNA replication. *Science* 218:474-5.
- Gratzner, H. G., Leif, R. C., Ingram, D. J. and Castro, A. 1975. The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp. Cell Res.* 95:88-94.
- Gunning, B. E. and Sammut, M. 1990. Rearrangements of

- microtubules involved in establishing cell division planes start immediately after DNA synthesis and are completed just before mitosis. *The plant Cell* 2:1273-82.
- Levi, M., Sparvoli, E., Sgorbati, S. and Chiatante, D. 1987. Rapid immunofluorescent determination of cells in the S phase in pea root meristems: an alternative to autoradiography. *Physiol. Plantarum* 71:68-72.
- Motomura, T. 1996. Cell cycle analysis in a multinucleate green alga, *Boergesenia forbesii* (Siphonocladales, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 44:11-7.
- 鈴木健史 1992 組織細胞内におけるオルガネラ DNA 合成部位の検出法—テクノビット—BrdU抗体蛍光抗体染色法— *植物細胞工学* 4:416-417
- Wang, H., Cutler, A. J., Saleem, M. and Fowke, L. C. 1989. Immunocytochemical detection of DNA synthesis in plant cells. *J. Plant Physiol.* 135:15-20.