

SSP 染色体の Computerized Map による クロマチン活性部位の解析

奈良県立医科大学第2解剖学教室

長野 晃子, 間瀬 佳栄, 山本 浩司

COMPUTERIZED CHROMOSOME MAP : CYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF DNaseI-GOLD BINDING SITES ON SURFACE SPREAD POLYTENE (SSP) CHROMOSOME

KOUKO NAGANO, YOSHIE MASE and HIROSHI YAMAMOTO

The 2nd Department of Anatomy, Nara Medical University

Received May 29, 1989

Summary : Surface-spread polytene (SSP) chromosomes of salivary glands from late third-instar larvae were used for the construction of an electron microscopic (EM) photo map of the entire genome of *D. melanogaster Oregon Q₂*. The SSP chromosomes were spread by surface tension, according to the method of the Kalisch group, show more additional bands and interbands than the squashed chromosomes. Recent advances in the molecular mapping of *Drosophila* DNA have raised the necessity for the fine chromosome map. In this investigation we drew the computerized SSP EM map by using our original computer program, and localized DNaseI-gold binding sites on SSP 3L chromosome. The subdivision 68C and 71C, including glue protein genes, were markedly bound with DNaseI-gold, and the most of DNaseI-gold were found peculiarly to the approximately 30 nm chromatin fiber. This suggested that the DNaseI-gold binding fibers retain the loosened solenoid structure, which is different three-dimensionally from the conventional solenoid type.

Index Terms

surface spread polytene (SSP) chromosome, computerized map, DNaseI-gold, glue protein gene, solenoid structure

緒 言

真核生物特有の遺伝子の形態であるクロマチンはコアヒストンを含んだヌクレオソームと呼ばれる基本構造により DNA を packing している。そして更に 30 nm fiber のソレノイド構造をとって凝集し、ヒストンや DNA 結合蛋白と結合して 3 次元構造へと発展する。様々な蛋白質をコードする DNA 配列もクロマチン構造中において初めて機能すると考えられており、活性遺伝子と対応して多様型をとるクロマチン構造の解明は遺伝子発現機

構を知るうえで重要となる。クロマチンの高次構造に関して、従来、双翅目の唾腺細胞核の多糸染色体が細胞遺伝学の材料として頻繁に用いられてきた。多糸染色体は DNA の複製物が分離せずに平行に並んだもので、このために染色体の相同部分が規則的に並列し多数の縞模様を呈する。これを、band-interband pattern と呼び、このバンドの配列は種に特異であり今までに染色体地図が整備されてきた。このバンド地図は遺伝子地図 (gene map) と対応しており、電顕レベルでのより詳細な染色体地図の作製が *Drosophila* DNA の細胞学的な map-

ping など、近來の細胞遺伝学の進歩の中で要求されている。

そこで我々は、Kalisch らの方法に準じて surface-spread polytene (SSP) 法¹¹⁻⁹⁾による *D. melanogaster* の電顕的染色体地図を作製し、更に、バンドパターンをモデル化するコンピュータ・プログラムの開発によってバンド構造のより詳細で明確な computerized EM map を作製した。

又、形態的な解析ばかりでなく近年 *in situ* hybrid 法⁷⁻⁹⁾などにより gene mapping の電顕的解析がなされている。これらのテクニックには通常の押しつぶし標本や超薄切片法による多糸染色体が多く用いられている。今回我々は多糸染色体上の活性クロマチン部位を電顕的に解析する為に、SSP 法で多糸染色体を広げ、grid 上で DNaseI-Gold 複合体と反応させる方法を試みた¹⁰⁾。この方法は DNaseI による DNA 切断の顕度がヒストンや DNA 結合蛋白との結合による DNA の保護の程度に依存しているために、酵素の activator を用いずに酵素基質の結合能を温存した状態では、転写活性化したクロマチンなどがその結合部位となる事を利用している¹¹⁾¹²⁾。

当実験では、*D. Melanogaster* の多糸染色体のうち 3L 染色体に注目し、DNaseI-Gold 染色した後ロータリーシャドウイングを行い、gold 標識されたクロマチン活性部位を先に作成した computerized EM map を使って電顕的に解析し、検討したので報告する。

材 料 と 方 法

双翅目の *Drosophila melanogaster Oregon Q₂* の第 3 令幼虫の唾腺染色体を材料とした。Fig. 1. に実験方法の全体図を示す。

① Surface-spread polytene (SSP) 法

唾腺腺を pre-treatment solution (3.18 M クエン酸, 8.82 M プロピオン酸) の中で摘出し、10 μ l の pre-treatment solution の入ったマイクロチューブに移して 10 分間静置した後、針でほぐし、更に 40 分~120 分室温でインキュベートした。シリコン処理したスライドグラス上に spreading medium (4M urea, 0.3 M HCl・pH 2.0) をひろげ、マイクロチューブ内の suspension の水滴をマイクロピペットの先に作り静かに接触させた。位相差顕微鏡でよく広がった染色体を探し、ホルムバル膜をはってカーボン補強した one-hole grid で拾い、D. D. W. で 10 分間洗浄してからイソプロパノールで脱水し、風乾してから、JEOL-100 C 透過型電子顕微鏡で観察した。

② Computerized EM map の作成

SSP 法により得た 3L 染色体の電顕的染色体地図のうちから、1) 重なるの無いまっすぐな染色体、2) 相同部分の分離、破れなどのない染色体、3) 横方向、縦方向へのひろがりの度合の高い染色体、4) 多糸化の度合が類似している染色体、5) 幼虫の成長段階がほぼ同じ染色体。以上の条件を満たすものを数本選び、比較検討しながら 4 種類のバンドタイプを用いてバンドパターンをコンピュータマウスにより入力した。このコンピュータプログラムでは更に条件の良い標本を得た場合、新たなバンドの insert、バンドタイプの change、バンドの幅や長さの数値・マウスの両方法による change、が可能である。

③ DNaseI-Gold solution による染色

A. DNaseI-Gold complex の作成

DNaseI (SIGMA) 50 μ g を D. W. で溶解し、10 ml の colloidal gold (ϕ 17 nm) と 0.15 ml の 5% ポリエチレングリコール (M. V. 20000) を静かに混合して 4°C、24000 r. p. m. で 40 分間遠沈した後、上澄みを除去し、残りを DNaseI-Gold complex solution として使用した。

B. SSP 染色体の染色

①の要領で広げた多糸染色体を grid に捨い D. D. W. で洗浄した後、PBS (PH 6.0) に 10 分間 float させて PH 調整を行った。A で作成した DNaseI-Gold complex を PBS (PH 7.2) で 50 倍に希釈し、この solution 上に grid を float させて 37°C で 1 時間インキュベートした後、0.01% Tween 20 (PBS, PH 7.2) で洗浄し D. W. で jet wash してからイソプロパノールで脱水、風乾した。この脱水標本に白金・カーボンのロータリーシャドウイング (Pt-10°, C-10°) を行い透過型電子顕微鏡 (JEOL-100 C) で観察した。

結 果 と 考 察

① SSP 法による EM map

電顕的染色体地図と computerized EM map を fig. 2 に示した。各セクションの A、B ~ 区分は Bridges¹³⁾ の map に準じた。今回得た 3L 染色体のバンド総数は 533 本で、Bridges の 516 本より増加している。更によく広がった SSP 染色体標本が得られれば、より多くのバンド数になる可能性もある。しかし、Sorsa¹⁴⁾らの map のバンド数よりは少なくなっておりこれは超薄切片法による彼らの map が 3L 染色体を部分的に観察しているためと考えられる。

② DNaseI-Gold stain SSP chromosome

金標識された多くの部位のうちで常に特異的に金標識されたのは 68 C、71 C 部位であった (Fig. 3, 5.)。この部位は glue protein 遺伝子を含むことが知られている

が¹⁵⁾¹⁶⁾, この glue protein 遺伝子は8種類の sgs proteins をコードしており, この遺伝子群は3令幼虫後期に唾腺でのみ発現する発生時期, 発生組織ともに特異的な遺伝子と言われている¹⁵⁾. 染色体のバフ形成は3令中期に intermolt バフと呼ばれる一群のバフ形成に始まり, 蛹化が近づくとそれに変わり early バフ, late バフが形成されてくる. バフは一般に転写活性の高い場所であり, このように幼虫の成長段階によってバフ形成が変化していく事は発生に伴う唾腺での遺伝子発現の推移を顕著に示している. 当実験で用いた3令後期の幼虫の唾腺染色体において68C部位の金標識されたバンドが71Cのそれに比べて多い事は, 68C部位では glue protein 遺伝子のうち sgs-3, 7, 8の構造遺伝子を持つものに対し, 71C部位が sgs-6のみである事と関連があると予想される. 又, 68C部位ではクロマチンに沿って縦方向に約5000Åの長さに金標識された部分が見られ, 他のインターバンドが金標識されなかった事を考えると hn-RNA 合成期におけるクロマチンの活動的な転写が伺える. この金標識された転写活性の active な部分の DNA が仮に完全に naked な状態であったとすると, この DNA は約1400 bp の長さになり又, ヌクレオソーム構造をとりながらそのリンカー DNA だけが完全に stretch した状態であるとすると, 約3600 bp となる. しかし, Fig. 4に示した高倍写真を見ると金標識された繊維の太さは, ロータリーシャドウイングに因って多少太く見える事を考慮に入れても殆んどが約30 nmであった. この事は, ソレノイド構造が保持されている事を示唆しているが, DNaseI と結合し得る程度にソレノイドの三次元構築が loose になっていると考えられる. 又, この部分を除いて大部分のコロイド金が約30 nm fiber 上で間隔をおいてついている. これはソレノイド構造の中で, その転写活性により一部構造的な変化がおきて凝集の緩んだ部分がある間隔毎に生じ, その部分がDNaseIの攻撃を受けた結果とみる事ができる. つまり調節領域を含む転写活性領域を示す活性クロマチンも, ヌクレオソームコアヒストンを持つことになるが, このヒストンがDNAに沿って動くポリメラーゼの障害になるとは考え難く, 活性領域のコアヒストンは不活性領域のものと同様に構造的に異なっているか, 又は, ヌクレオソームとDNAとの結合が緩んでポリメラーゼの移動を容易にしていると考えたほうが自然である. しかし, 転写活性の盛んなDNA領域がその転写産物で保護されたために金標識されなかった可能性も無視できない.

又, glue protein 遺伝子のうちの sgs-3 遺伝子と類似した塩基配列を持つ遺伝子に hsp-26, 27がある. これ

は, 高温ショック (heat shock protein genes)¹⁹⁾²⁰⁾と呼ばれ sgs 遺伝子群と同様に発生時期特異性を示す. 当実験で用いた3令後期の3L染色体に於いては, 63 BC・64 EF・67 Bの各部位が heat shock バフ (HSP) を形成することが知られている (Fig. 2). Sgs 遺伝子群, hsp 遺伝子群共にステロイドホルモンであるエクダイソンにその発現が制御される事が既に知られており²¹⁾, 遺伝子発現とホルモンの関連を容易に予想できる.

近年, DNaseI の高感受性部位を決める多くの実験により, この部位が転写活性の高い部位の5'端のすぐ上流に局在する事が報告されている²²⁾²³⁾²⁴⁾. これは, その転写調節配列がある領域やその付近が高感受性領域である事を示している. つまり, 先に述べたように当実験で金標識された部分の DNA が実行に naked な状態である可能性は薄く, 転写活性領域は立体構造の異なったヌクレオソームコアヒストンを含んで広域にわたる事になり, 遺伝子発現とクロマチンの広域にわたる構造変化との関連が示唆された.

結 語

多糸染色体に於けるクロマチン活性部位を DNaseI-Gold を用いて電顕的に解析した結果調節領域を含む活性遺伝子のクロマチン領域を *in vivo* に近い状態で再現する事ができた. 更に, クロマチンの3次元構築への発展が期待される.

本論文の要旨は, 第94回日本解剖学会総会(1989, 宮崎)にて展示発表した.

文 献

- 1) Reiling, H., Kalisch, W. E., Whitmore, T. and Tegtmeir, K.: Computer map of salivary gland chromosomes in *Drosophila hydei*. *Eur. J. Cell. Biol.* **34**: 336-338, 1984.
- 2) Kalisch, W. E.: EM chromosome mapping using surface-spread polytene chromosome. *Genetica* **60**: 21-24, 1982.
- 3) Kalisch, W. E. and Hagele, K.: Surface spread polytene chromosome. *Eur. J. Cell. Biol.* **23**: 317-320, 1981.
- 4) Kalisch, W. E. and Whitmore, T.: Differences in the number of polytene chromosome bands as studies by electron microscopy. *Cytobios* **37**: 37-43, 1983.
- 5) Kalisch, W. E., Whitmore, T. and Schwitalla,

- G.: Electron microscopic map of surface-spread polytene chromosome in *Drosophila hydei*. *Chromosoma* **92**: 265-272, 1985.
- 6) **Kalisch, W. E., Whitmore, T. and Reiling, H.:** Computerized EM maps of surface spread polytene chromosome. I. Digitizing and plotting of banding pattern. *Cytobios* **41**: 47-62, 1984.
 - 7) **Wu, M. and Davidson, N.:** Transmission electron microscopic method for gene mapping on polytene chromosomes by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78**: 7059, 1981.
 - 8) **Hutchison, N. J., Langer-Safer, P. R., Ward, D. C. and Hamkalo, B. A.:** In situ hybrid detection by autoradiography and colloidal gold. *J. Cell. Biol.* **95**: 609-618, 1982.
 - 9) **Leary, J. J., Brigati, D. J. and Ward, D. C.:** Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotinlabeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose; Bio-blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**: 4045-4049, 1983.
 - 10) **Bendayan, M.:** Ultrastructural localization of nuclei acid by the use of enzyme-gold complex. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 531-541, 1981.
 - 11) **Gazit, B. and Cedar, H.:** Active gene are sensitive to deoxyribonuclease I during metaphase. *Science* **217**: 648-650, 1982.
 - 12) **Kerem, B. S., Goitein, R., Richler, C., Marcus, M. and Cedar, H.:** In situ nicktranslation distinguishes between active and inactive X chromosomes. *Nature* **304**: 88-90, 1983.
 - 13) **Bridges, C. B.:** Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* **26**: 60-64, 1935.
 - 14) **Sorsa, V., Sauro, A. O. and Heiro, T. I.:** Electron microscopic map of divisions 61, 62, and 63 of the salivary gland 3L chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **90**: 177-184, 1984.
 - 15) **Garfinkel, M. D., Pruitt, R. E. and Meyerowitz, E. M.:** DNA sequences, gene regulation and modular protein evolution in the *Drosophila* 68C glue gene cluster. *J. Mol. Biol.* **168**: 765-789, 1983.
 - 16) **Crowley, T. E., Bond, M. W. and Meyerowitz, E. M.:** The structural genes for three *Drosophila* glue protein reside at single polytene chromosome puff locus. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 623-634, 1983.
 - 17) **Meyerowitz, E. M., Crosby, M. A., Garfinkel, M. D., Martin, P3H., Mathers, P. H. and Vijayraghavan, K.:** The 68 C glue of *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 347-353, 1985.
 - 18) 藤堂 剛: ショウジョウバエの発生時期特異的かつ組織特異的に発現される遺伝子。蛋白質・核酸・酵素 **34**: 20-25, 1989.
 - 19) **Bonner, J. J. and Kerby, R. L.:** RND polymerase II transcribes all of the heat shock induced genes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **85**: 93-108, 1982.
 - 20) **Dangli, A. and Bautz, E.-K. F.:** Differential distribution proteins from polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* after heat shock. *Chromosoma* **85**: 201-207, 1983.
 - 21) **Meyerowitz, E. M. and Hogness, D. S.:** Molecular organization of a *Drosophila* puff site that responds to ecdysone. *Cell* **28**: 165-176, 1982.
 - 22) **Bourouis, M. and Richards, G.:** Hybrid genes in the study of glue regulation in *Drosophila*. *Cold Spring Horber Symp. Quant. Biol.* **50**: 355-360, 1985.
 - 23) 榎 佳之: 動物遺伝子の基本構造. 細胞工学 **2**: 431-437, 1983.
 - 24) **Wwisbrod, S.:** Active chromatin. *Nature* **297**: 289-295, 1982.

Explanation of figures

- Fig. 2. Transmission electron microscopic (TEM) map and computerized map of salivary gland chromosome in *D. melanogaster Oregon Q₂*. TEM image of all 3L chromosome are prepared by surface-spread polytene (SSP) method. The glue protein genes (▼) and heat shock protein genes (▽) localized in 3L chromosome are indicated. (X2300)
- Fig. 3. TEM image of the division 68 sequence labeled with DNaseI-gold. The two labeled bands involved in the region are indicated by arrow marks.
- Fig. 4. Same experiment as in Fig. 5, and labeling site is fully magnified. Band (B) and interband (IB) region are easily distinguished.
- Fig. 5. TEM image of the division 71 sequence labeled with DNaseI-gold. The arrow indicated laabeling band.

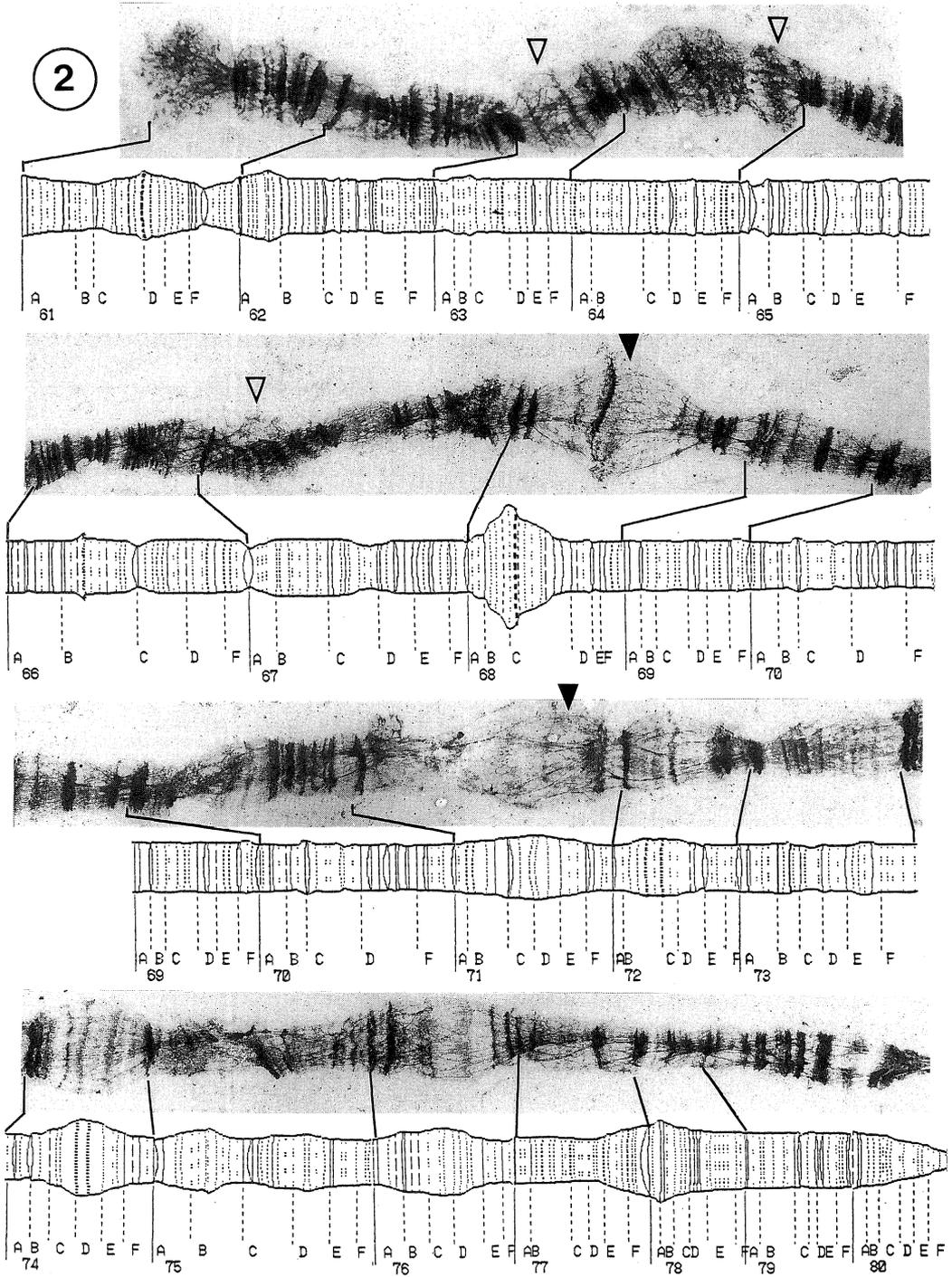


Fig. 2.

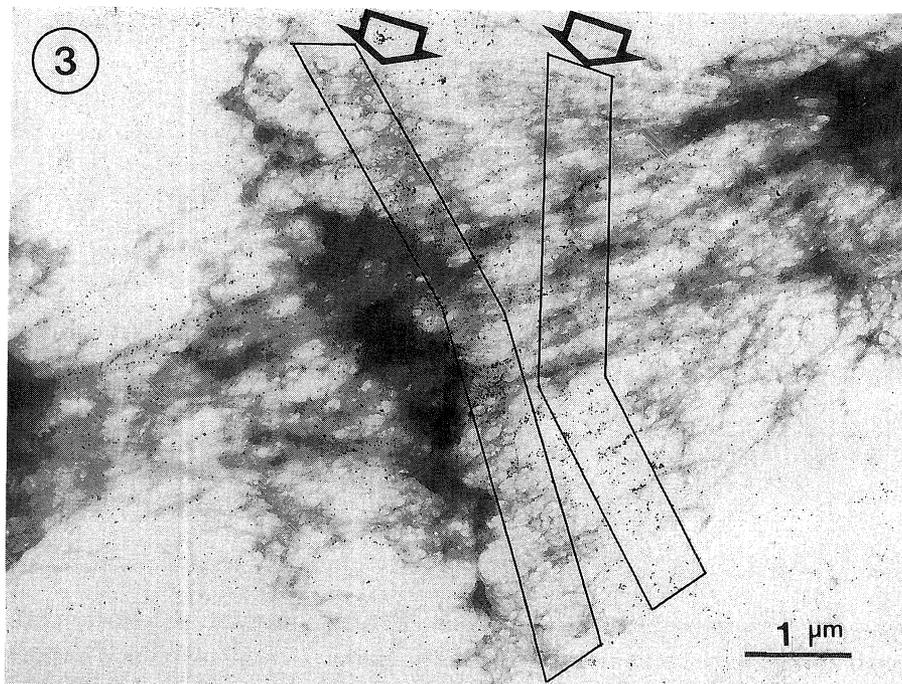


Fig. 3.

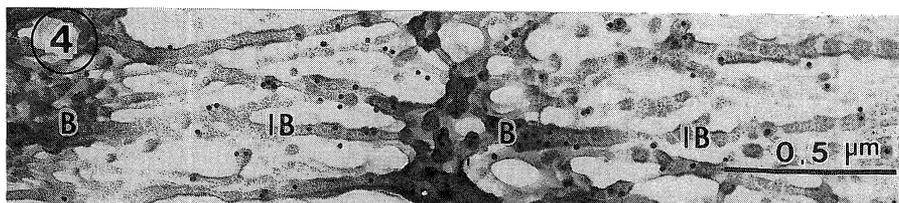


Fig. 4.

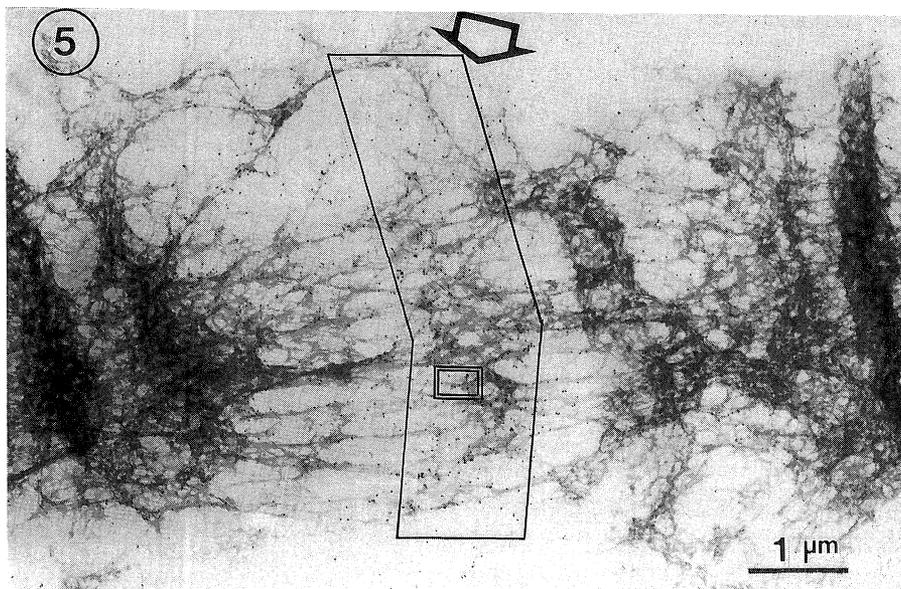


Fig. 5.