

研究機器・方法紹介

電子顕微鏡による遺伝子発現部位の解析

中央研究施設 形態部門

穂田 真澄

本部棟の走査型電子顕微鏡(2台)と、基礎医学棟2階の透過型電子顕微鏡(2台)は、今年1月より、基礎医学棟地下2階に移設されました。ホームページでご承知かと思いますが、この機会をかりて改めてお知らせ致します。

「青色発光ダイオード(LED)の発明」において、一般にはあまり知られておりませんが、電子顕微鏡が果たした役割は大きかったと言われています。電子顕微鏡の中で電子線を浴びた窒化ガリウムがしだいに光りはじめたのが、ヒントとなったそうです。材料工学の分野では電子顕微鏡は必須で、さらに進化しています。医学生物学の分野では、免疫組織化学や遺伝子関連の研究が隆盛で、電子顕微鏡による研究は、かつてほどではありません。遺伝子関連の研究者の多くは、蛍光顕微鏡レベルの知見までで、電子顕微鏡レベルの知見を必ずしも必要としていないように思われます。将来的には、電子顕微鏡レベルの知見まで必要になることは必至と思われます。遺伝子レベルの研究と電子顕微鏡を仲介するのが、今回ご紹介するX-Gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド)染色です。この方法によって、遺伝子の発現部位を透過型電子顕微鏡で見るということが可能となります。これは、レポーター遺伝子として、大腸菌の β -ガラクトシダーゼ(lacZ)遺伝子を用いる方法で、反応産物は電子顕微鏡で観察可能です。神経系に主に発現するInhibitor of DNA binding 4(Id4)によるX-Gal染色の実例を紹介致します。

図1は、Id4遺伝子が、脳と脊髄に強く発現していることを示しています。図2は、Id4遺伝子が、骨にも発現していることを示しています。図3は、発現部位の透過型電子顕微鏡写真です。光学顕微鏡レベルでは同定できませんが、電子顕微鏡によって、比較的幼若と思われる骨細胞に強く発現していることがわかります。

Idと呼ばれるタンパク質は、哺乳類では現在4種類(Id1~Id4)が同定されています。Idは、中枢神経系の発達だけでなく、血管新生、二次リンパ組織の形成などにも重要であることがわかっています。一個の受精卵が、様々な細胞に分化していく際、遺伝情報を担う染色体DNAの特定の部位に転写因子と呼ばれるタンパク質が結合し、必要な

情報を読み取ることが重要と考えられています。この転写因子の働きを負に制御しているのが、Idというタンパク質です。ゲノム医学研究センターの岡崎教授のグループは、Id4というタンパク質が、骨の形成に重要な役割を果たす新規の転写因子であることを明らかにしています¹⁾。Id4を活性化する物質が見つければ、骨粗鬆症の治療や新薬につながる大きな手掛かりになると考えられています。

なお、X-Gal染色に必要な試薬類は、X-Gal Staining Assay Kitとしてフナコシ、Invitrogenなどから市販されていますので、方法の詳細についてはこれらのデータシートを参照して下さい。また、X-Gal染色関連では、Cre-loxPシステムを用いた最近の研究があります。これは配列特異的遺伝子組換え技術の一つであり、目的とする遺伝子を、目的とする器官、組織、細胞において特異的に欠損させることができます。現在、細胞動態や分化の研究手段として盛んに用いられており、これらの試料も電子顕微鏡で観察可能です。

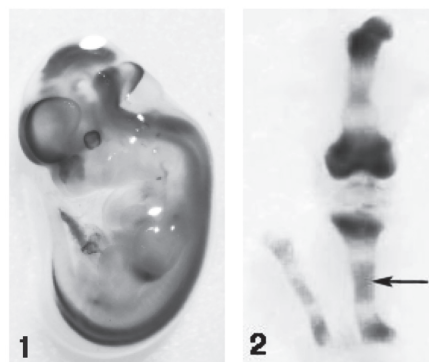


図1. Id4遺伝子の発現部位、特に脳と脊髄が青緑色に染色されている。マウス胎仔(11.5日令)。

図2. マウス胎仔(14.5日令)の下肢の骨; Id4遺伝子の発現部位が青緑色に染色されている。←で示した脛骨の骨幹部の透過型電子顕微鏡写真を図3に示す。

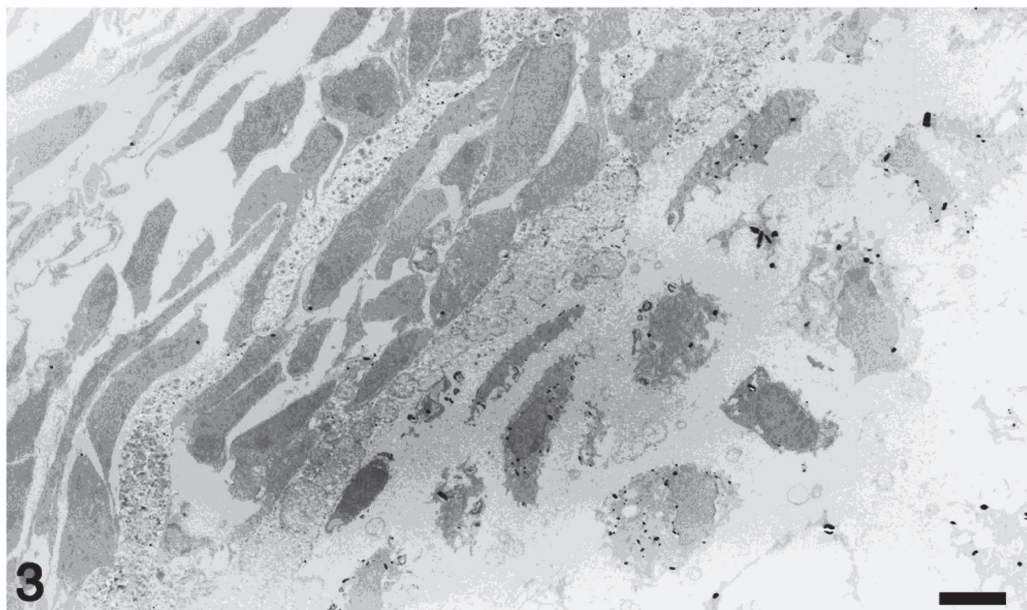


図 3. 図 2 に←で示した脛骨の骨幹部の透過型電子顕微鏡写真 (透過型電子顕微鏡: JEM-1400 による). 写真に向かって右の細胞群 (比較的幼若と思われる骨細胞) に黒色の粒子状の沈着物が多数見られる. 通常の電顕写真と異なり, 酢酸ウラニルと硝酸鉛による電子染色が施されていないので, コントラストが少ない. Scale bar = 5 μ m.

今回, 平成 22 年に私学助成金により導入された透過型電子顕微鏡を用いて, 遺伝子の発現部位を電顕レベルで観察する方法について紹介させて頂きました. 形態部門には, 透過型電子顕微鏡の他, 走査型電子顕微鏡が 2 台あり, 1 台は超高分解能で, もう 1 台は簡易型です. 簡易型では元素分析も可能です. その他, 共焦点レーザー顕微鏡, フローサイトメーター, セルソーターなど最新の機器が設置されております (詳しくはホームページをご覧ください).

<http://smswww.kyoudou/tcr/indexframe.html>

(試料提供: ゲノム医学研究センター所長 岡崎康司 教授)

参考文献

- 1) Tokuzawa Y, Yagi K, Yamashita Y, Nakachi Y, Nikaido I, Bono H, Ninomiya Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Akita M, Motegi H, Wakana S, Noda T, Sablitzky F, Arai S, Kurokawa R, Fukuda T, Katagiri T, Schönbach C, Suda T, Mizuno Y, and Okazaki Y. Id4, a new candidate gene for senile osteoporosis, acts as a molecular switch promoting osteoblast differentiation. PLoS Genet. 2010 Jul 8;6(7):e1001019. doi: 10.1371/journal.pgen.1001019.