

DNA 修復タンパク質 RAD51 が形成する高次構造体の画像解析

浅野 晃[†] 河野 一輝^{††} 田代 聡^{††}

[†] 広島大学大学院工学研究科情報工学専攻 〒739-8521 広島県東広島市鏡山 1-7-1

^{††} 広島大学原爆放射線医科学研究所 〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3

E-mail: †asano@mis.hiroshima-u.ac.jp

あらまし 細胞の核では、DNA が形成する高次構造体である染色体やクロマチンが整然と配置されていることが、最近明らかになってきた。核内の蛋白質は、クロマチン間領域に高次構造体核内ドメインを形成すると考えられているが、その詳細は不明である。われわれは、DNA 修復タンパク質 RAD51 を過剰発現させると、細胞核内にフィラメント状の高次構造体が形成されることを見出した。この高次構造体は、核内のクロマチン間領域に形成されるため、その形状を観察することで、クロマチン間領域の構造を知ることができると考えられる。本研究は、クロマチンがクロマチン間領域形成に与える影響を検討するために、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 trichostatin A によりクロマチン構造を変化させた細胞核におけるクロマチン間領域の「複雑さ」について、RAD51 フィラメント状構造体の顕微鏡画像から変換された線画像の線素を指標に、定量的解析を行った。

キーワード DNA 修復タンパク質、クロマチン構造体、バイオイメージング

Image analysis of higher-order nuclear architecture formed by a DNA recombinational repair protein RAD51

Akira ASANO[†], Kazuteru KONO^{††}, and Satoshi TASHIRO^{††}

[†] Department of Information Engineering, Graduate School of Engineering, Hiroshima University
Kagamiyama 1-7-1, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8521 Japan

^{††} Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University
Kagamiyama 1-7-1, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 734-8553 Japan

E-mail: †asano@mis.hiroshima-u.ac.jp

Abstract It has been recently shown that the cell nucleus is a highly compartmentalized organelle with chromosome and chromatin domains formed by DNA. Although nuclear proteins also have been speculated to form higher order structure in the compartment between chromatin domains, how the formation of interchromatin compartment is organized is still unclear. We have previously shown that RAD51, a recombinational repair protein, forms nuclear foci, typically during S phase, and accumulates at sites of DNA double-strand breaks. We found that over-expressed RAD51 forms bundle-like structures in the nucleus. Since the structures are formed in the interchromatin compartment, we decided to study the influence of chromatin structure to the organization of interchromatin compartment. For this purpose, we examined the change of the RAD51 bundle-like structure shape after de-condensation of chromatin by the treatment with trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor. The complexity of the GFP-RAD51 bundle-like structures was analyzed quantitatively using digital image processing methods.

Key words recombinational repair protein, chromatin structure, bioimaging

1. まえがき

放射線障害による DNA 二本鎖の切断は、細胞のがん化を引き起こすゲノム異常の原因となる。そこで、ゲノムを正常な状態に修復するゲノム修復システムの解明は非常に重要であり、

ゲノム修復タンパク質の動態の研究が進められている [1]。

ゲノム修復タンパク質の作用する場である細胞核内では、従来、核小体以外の構造物は考えられていなかった。しかし、近年の研究の進歩で、核内には染色体やクロマチンが整然と配置

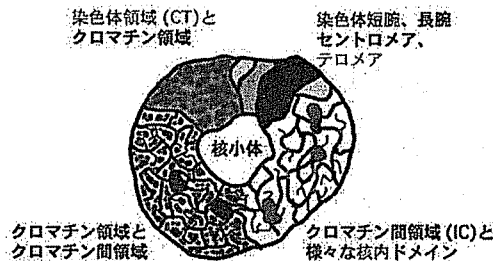


図1 染色体領域—クロマチン間領域モデル

されており、核機能の特定の素反応が、特定の「場」で起きることがわかってきた。この「場」を、ゲノム上の遺伝情報の一次元的な配列である一次構造に対して、核高次構造とよぶ。核高次構造は、遺伝子の修復などの、核機能における素反応が起きる場と、密接な関連があると考えられる。

核高次構造の代表的なモデルに、染色体領域—クロマチン間領域 (chromosome territory - interchromatin compartment, CT-IC) モデルがある [2] (図 1)。このモデルでは、各々の染色体 DNA は、それぞれ核内の一定の領域 (染色体領域) に、まとまって存在している。そして、各々の染色体領域は、染色体 DNA のかたまりであるクロマチン領域と、その隙間であるクロマチン間領域からなっている。核機能に関連するタンパク質が形成する複合体は、クロマチン間領域に存在し、複合体がクロマチン領域に移動するか、あるいはクロマチン領域から特定の染色体 DNA がクロマチン間領域に出てゆくことで、染色体 DNA と複合体が結合すると考えられている。

以上のように、これまでのさまざまな研究により、クロマチン間領域が核タンパク質のはたらきにとって重要であることがわかってきた。しかし、タンパク質複合体がクロマチン間領域に形成する高次構造体である核内ドメインの詳細は、明らかになっていない。そこで、われわれは、DNA 修復タンパク質 RAD51 を過剰発現させると、細胞核内にフィラメント状の高次構造体が形成されることを見出した。この高次構造体は、核内のクロマチン間領域に形成されるため、その形状を観察することで、クロマチン間領域の構造を知ることができると考えられる。

本研究では、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 trichostatin A によりクロマチン構造を変化させた細胞核において、クロマチン間領域の複雑さを定量化する方法を提案する。この方法では、RAD51 フィラメント状構造体の顕微鏡画像から、フィラメントの輪郭を抽出して線素で表現し、各線素を計測することで定量的解析を行う。

2. 画像処理

本研究では、以下の手法で、クロマチン間領域の複雑さを定量化する。

- Canny エッジオペレータにより、フィラメント状構造体

のエッジを、線画像として抽出する。

- 線の分岐部を切断し、線素に分解する。
- 線素の長さの分布を計測する。

2.1 Canny エッジオペレータ

Canny エッジオペレータ [3] は、エッジ出力が明瞭で連続した線として得られる、非常に有効なエッジ検出器として知られている。この方法の特徴は、エッジ画素を検出するというよりも、「エッジを形成する線を描く」という方法になっている点にある。

Canny エッジオペレータは、次の手順でエッジを検出する。

(1) ガウシアンフィルタにより、入力画像にぼかし処理を行う。これにより、ノイズや、エッジとして検出されるべきでない微妙な明暗の凹凸を除く。

(2) 各画素において、画素値の勾配 (gradient) の大きさと方向を求める。

(3) 2つのしきい値 T_{max} , T_{min} を設定する。勾配の大きさが T_{max} よりも大きい画素は、エッジ点とする。勾配の大きさが T_{min} よりも小さい画素は、エッジ点ではないとする。

(4) 勾配の大きさが T_{max} と T_{min} の間である画素については、その画素における勾配の方向を考え、その画素がその方向のエッジ点に接続している場合は、その画素もエッジ点とみなす。

2.2 線素への分割

Canny エッジオペレータは、線図形によってエッジを出力する。しかし、エッジ図形の複雑さを計測するには、これを分岐を含まない線素に分解し、各々の線素を計測するのが有効である。

このためには、まず、エッジ図形を構成している各画素の連結数、すなわち、各画素に接続しているエッジ画素の数を調べる。連結数を調べることににより、以下のような、画素の特徴がわかる。

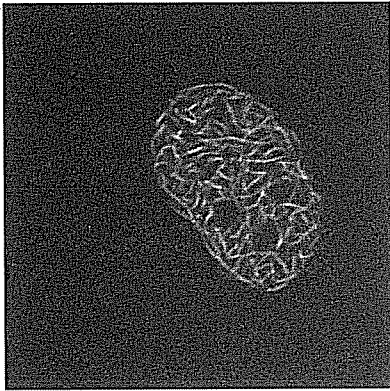
- 連結数 = 1 (端点)
- 連結数 = 2 (連結点)
- 連結数 \geq 3 (分岐点)

そこで、連結数が3以上の画素を除去することにより、線図形を線素に分解することができる。この方法は、われわれの、歯科X線写真からの骨梁抽出の研究に用いた手法 [4] でも利用しているものである。

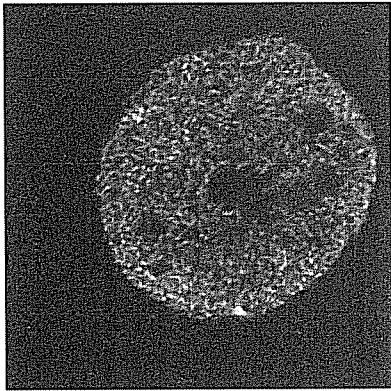
3. 処理結果例

図2は、DNA 修復タンパク質 RAD51 を過剰発現させた細胞核を、免疫蛍光抗体法によって可視化して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影したものである。(a) は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 trichostatin A を作用させないもので、(b) は作用させたものである。

図3は、原画像に Canny エッジオペレータを適用してエッジを抽出し、さらに分岐の切断を行って、線素の形で輪郭を取り出したものである。

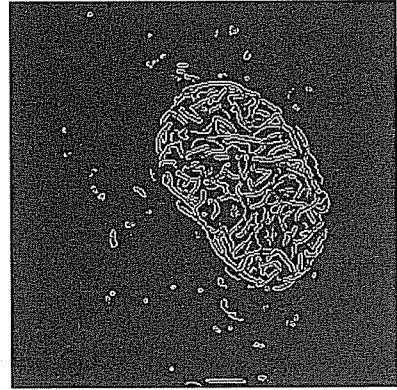


(a)

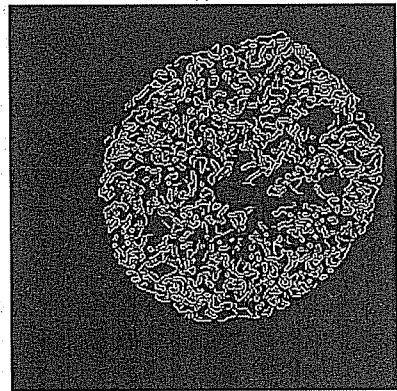


(b)

図2 細胞核画像.

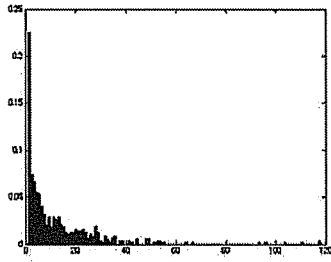


(a)

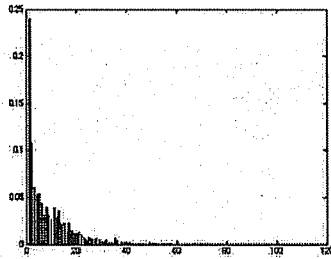


(b)

図3 輪郭線を線素で取り出したもの.



(a)



(b)

図4 線素の長さのヒストグラム。

各画像において、全線素の長さを測定し、線素の平均長さをもとめると、(a)は11.96、(b)は8.510であった。このことは、(a)のほうが平均して長い線素を含むことを示しており、(a)の細胞核のクロマチン間領域が、(b)よりも大まかな構造を持つことを示している。

図4は、各画像について、含まれる全線素の長さのヒストグラムを表したものである。横軸は線素の長さ(ピクセル)、縦軸は相対度数を表す。(a)は、(b)にくらべて、20ピクセル以上の長い線素が、多く含まれていることがわかる。

4. おわりに

本稿では、クロマチンがクロマチン間領域形成に与える影響を検討するために、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 trichostatin A によりクロマチン構造を変化させた細胞核におけるクロマチン間領域の「複雑さ」を、画像処理技術によって定量化する方法を示した。本稿で示した手法を用い、現在、多数の画像を用いた統計的な検討を進めている。

文 献

- [1] 田代聡, 小野厚, 五十嵐和彦, 核高次構造と核機能: 染色体領域-クロマチン間領域モデルを中心として, *細胞工学*, 21, 1154-1156 (2002).
- [2] T. Cremer and C. Cremer, Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells, *Nature Reviews Genetics*, 2, 292-301 (2002).
- [3] J. Canny, A Computational Approach To Edge Detection, *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell.*, 8, 679-714 (1986).
- [4] A. Asano, T. Tambe, A. Taguchi, C. Muraki Asano, T. Nakamoto, K. Tanimoto, M. Muneyasu, and T. Hinamoto, Extraction of trabecular structures of mandible excluding tooth roots on dental panoramic ra-