

哺乳類細胞における核内ゲノムダイナミクスの 可視化技術とその応用展開を目指して

奥 村 克 純

三重大学大学院生物資源学研究科

The Visualization Technique of Intranuclear Genome Dynamics in Mammalian Cells and Its Application

Katsuzumi OKUMURA

Graduate School of Bioresources, Mie University, 1577 Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie, 514-8507, Japan

Abstract

Recent advances in the clone technique based on the nuclear transfer in the fields of animal production and regenerative medicine demonstrate that a nucleus has all the information for the mammalian development. The huge mass of DNA molecules forms chromatin and is packed into the nucleus. The fundamental intranuclear events such as DNA replication, transcription, and repair proceed dynamically under the strict regulation and the disruption of these processes drives cells to mutation, malignancy, and death. In this review, methods based on visualization of single copy DNA/RNA molecules under the fluorescence microscope to solve the mysterious processes in the nucleus are described. Advanced methods using fluorescence *in situ* hybridization and the overview of their applications covering the analysis of DNA replication timing, replication forks, gene transcription, and the role of the nuclear matrix in the nuclear processes are mentioned.

Key Words: cell nucleus, mammalian genome, fluorescence microscopy, FISH

1. はじめに

核移植によって個体を生み出すことができる体細胞クローン技術でもわかるように、細胞核が動物個体形成のほとんど全ての情報をもっていると言っても過言ではなからう。もとは一つの細胞から、発生・分化の過程を経て膨大な細胞数の動物個体が形成される。60 兆個にもおよぶと言われている私たちの体を構成する細胞の一つ一つに細胞核があり、その直径わずか数ミクロンの核の中には父母それぞれから 30 億塩基対を受け継ぎ、計 60 億塩基対にもものぼる DNA が収納されている。染色体として 23 対、すなわち 46 本、細胞の核を

野球のボールにたとえるなら、一個のボールに実際に数百メートルの細い糸が 46 本もつめこまれていることになる。一個の細胞から個体に至るすべての過程で、細胞が倍加するときには全てのゲノム DNA が正確にコピーされ、絡まることなくそれぞれの娘細胞に分配されなければならない。また、ゲノム上に並んでいる 2 万数千とされる遺伝子は適切なタイミングで働かなければならない。これらの過程を秩序だった制御を通してうまく行うために、ゲノム DNA はタンパク質との複合体としてクロマチンという形をとり、様々なレベルで折りたたまれている。ゲノムの複製や遺伝子の転写の際には、これを部分的に解きほぐす。種々の因子や修

2007 年 3 月 31 日受理

〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

* For correspondence (e-mail: katsu@bio.mie-u.ac.jp)

飾によって引き起こされるこのようなクロマチンの凝縮、脱凝縮が、複製の開始や遺伝子発現のスイッチのオン・オフの制御と密接に関係している。一方、個々の染色体 DNA は細胞核内でもある程度まとまりをもって空間を占有しているが、これはさらに小さなゲノム機能ドメインともいべきまとまりから成り、複製や転写はその核内における配置や折りたたみの状態、核内に存在すると考えられるネットワーク構造との相互作用などによって影響を受ける。細胞分裂中期の染色体と異なり、全て同じように見える間期核の中では、ゲノムの複製や遺伝子の転写をはじめ、様々なイベントがダイナミックではあるが厳密な制御下に進行しており、たとえ些細なことでもこの制御の破綻が、細胞の変異やがん化、細胞死を導くと考えられる。

著者らは、細胞が健常に発生・分化するために

は、核内高次構造の秩序が保たれる必要があり、これを知ることが、クローン動物を含め、山積する生物学的な諸問題を解決する鍵となると信じている。その一端であるゲノムの複製や遺伝子の転写などの核内イベントを、「見る」という手段を通じて個々の細胞でとらえ、多数の細胞集団の平均値として解析する生化学や分子生物学的手法では見出すことができない現象を捉えることができると考えている。

本稿では、主として哺乳類細胞の核内でおこなっている DNA の複製や遺伝子の転写といった様々な基本過程を、個々の核内、あるいは核から引き出したゲノム DNA やクロマチン上で捉えて、蛍光顕微鏡下に可視化する手法について、筆者らが開発改良を重ねてきた技術を中心に解説し、その応用展開についても言及する。

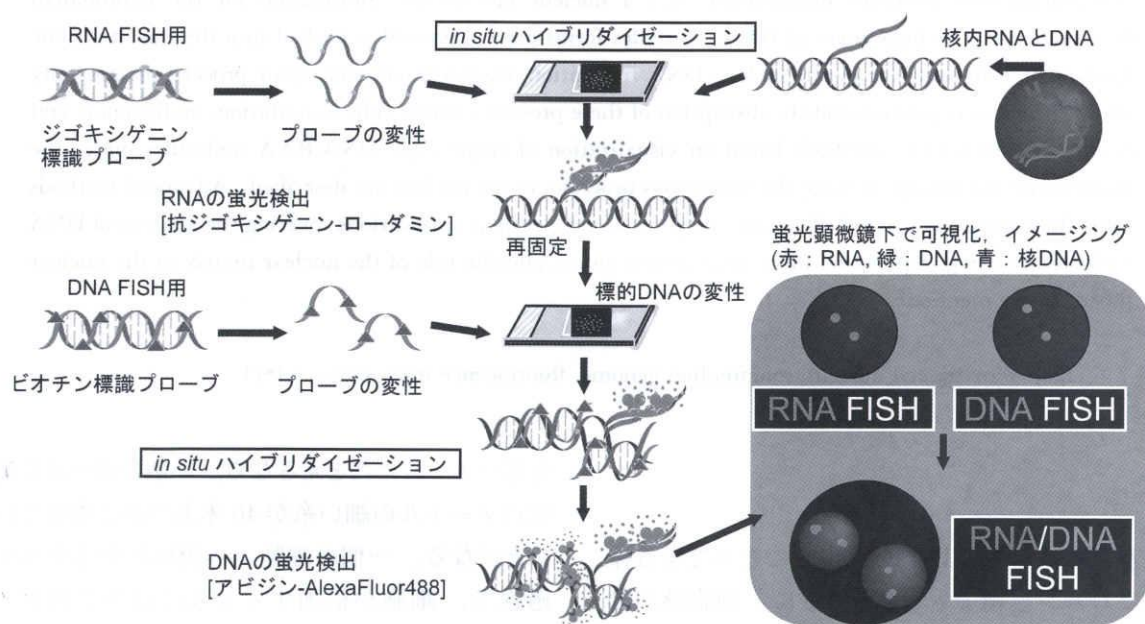


図1 三次元 RNA/DNA FISH による遺伝子とその転写物の同時検出のフローチャート

二本鎖 DNA プローブを用いて RNA, DNA を同じ細胞核標本上で視覚的に捉えることができる RNA/DNA FISH の概略を示した。検出したい遺伝子の二本鎖 DNA をニックトランスレーション等によってジゴキシゲニン化、ビオチン化ヌクレオチドで標識し、それぞれ RNA, DNA 検出用プローブとする（逆でも良い）。細胞をスライドガラス上に立体的に固定し、界面活性剤で膜の透過性を上げた細胞核に対し、まず RNA の検出を行う。ジゴキシゲニンラベルプローブを変性し一本鎖にした後、核内で一本鎖として存在する RNA に対してハイブリダイズさせる。続いて蛍光物質（ローダミン）が結合したジゴキシゲニンに対する抗体を結合させ、以下のステップでこの蛍光抗体が脱落しないように再固定する。RNase 処理して RNA を除去した後に DNA を検出するため、標本を変性処理して核内 DNA を一本鎖とし、同様に変性処理したビオチンラベルプローブをハイブリダイズさせ、さらに、アビジン-AlexaFluor 488 で検出する。最後に、DAPI などで核全体を染色し、蛍光顕微鏡で観察する。適切な蛍光フィルターを用いれば、ローダミンは赤色、AlexaFluor 488 は緑色、DAPI は青色で可視化できる。遺伝子が十分転写されていれば、緑色の DNA シグナルと赤色の RNA シグナルがほぼ重なった状態をとらえることができる。また、高感度 CCD カメラ、可変 Z ステージと解析ソフトウェアがあれば立体的に核内 RNA, DNA をイメージング、立体再構築でき、解析のための情報量が増える。（カラーページ参照）

2. 可視化技術とゲノム DNA の核内動態

1) 1 個の遺伝子を可視化できる蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法

まず、本稿の主体となる可視化技術について解説する。1 コピーの遺伝子を蛍光顕微鏡下に可視化できる FISH 法は、その開発以来、遺伝子やゲノム断片のマッピングを中心にヒトゲノム計画を支える基本的技術としてその有効性をいかに発揮してきた。ゲノム解析における FISH に対するニーズがその技術開発を促進し、標本作製法を含め様々な改良がなされてきた。SKY などヒトやマウスの全染色体を染め分け、転座などをマルチカラーで一挙に判定できる手法から、質の高い個別染色体ペインティングプローブを用いたゲノムの核内配置のダイナミクスを解析する手法、ゲノムを核から引き出して DNA ファイバー上で高解像度に解析できる手法、また転写物やそのプロセシングを検出する手法、さらにはこれらをタンパク質の免疫染色と組み合わせる手法に至るまで多様に技術開発・改良が進んできた。Live cell imaging 技術が進展する中、FISH は一見時代遅れと考えてしまう研究者もいるかもしれないが、工夫次第で核ダイナミクス解析の極めて有効なツールとして利用できる。図 1 に 1 つの遺伝子の DNA と RNA を同時に捉える FISH の基本原理のフローチャートを示した。詳細は図の説明やプロトコール集を参照していただきたい¹⁻²⁾。応用編として、抗体を用いたタンパク質の検出との併用や、検出したい対象、細胞種等で標本調製を含め様々な工夫が必要であるが、およそこのフローチャートに従われている。

2) ゲノム DNA の核内動態

個々の染色体は細胞核内で、ある程度まとまった空間を占めており、クロモソームテリトリー (CT) と呼ばれている。さらに小さなまとまりをドメインと呼ぶが、CT は 1 Mb 程度のクロマチンドメインから、さらにこのドメインは 100 kb 程度のクロマチン (ループ) ドメインから成り、ドメインの間隙部で転写や複製が行われると考えられている³⁾。CT や個々の遺伝子は DNA を特異的に検出できる FISH 法で可視化できる。FISH をもちいて、ゲノムの核内配置や凝縮度と

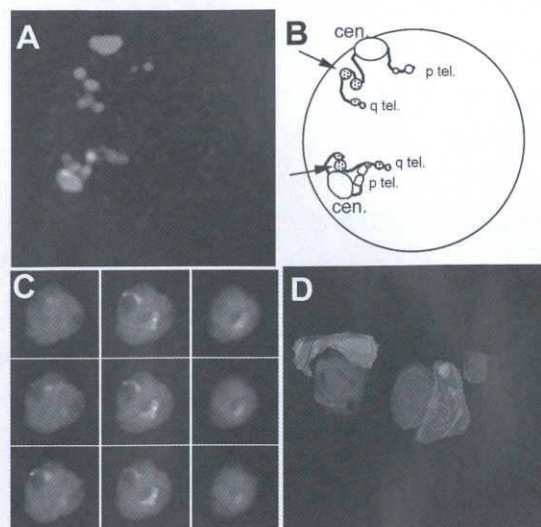


図2 マルチカラー FISH によるゲノムの核内配置の可視化

(A) ヒト 12 番染色体の核内配置の立体再構築イメージと、(B) その推定模式図⁷⁾。セントロメア (cen.) と短腕 p の数個のゲノムプローブを緑で、長腕 q の数個を赤で検出。tel. はテロメア。(C) ヒト 15 番染色体 CT (オレンジ)、セントロメア (ピンク)、インプリント遺伝子 *SNRPN* (緑) の核内配置の断面イメージ (70 断面のうちの一部)⁸⁾と (D) その核内配置のコンピュータグラフィックス。(カラーページ参照)

複製や転写が関連する例も示されている。例えば、ゲノムサイズが似ているヒト 18 番、19 番染色体の比較で、遺伝子密度の低い 18 番と高い 19 番は、それぞれ核の周辺部と内部に配置され、しかもこれは進化的に保存されていることが示されている^{4, 5)}。また、二本ある女性の X 染色体間で、不活性化されている方は核の周辺部に配置され、CT の形も表面積が小さく、複製される時期も遅い⁶⁾。筆者らも、一本の染色体の相対的な核内配置を調べ、S 期において早く複製する領域は核の内部に、遅く複製する領域は核の周辺部に配置されることを示した⁷⁾(図 2 AB)。また、ヒト 15 番染色体の CT、セントロメアとその近傍に存在するゲノム・インプリンティングを受ける遺伝子、核の 4 種をそれぞれ染め分けて、それらの核内配置を解析した (図 2 CD)。図は rRNA が転写される核小体の周りに存在すること (ヒト 15 番染色体の一端には rRNA 遺伝子が多コピー並んでおり、核小体で転写される)、遺伝子は強く染色される“CT のコア”の周囲に、セントロメアは CT コアの内部にあることを示している⁸⁾。注意すべきことは、一般的に染色体ペインティングプ

ロープで検出して CT として描かれる領域は、染色の感度に依存することで、実際には CT の内部にあるように見えても、間隙部が入り込んでいて種々の因子が接近しやすくなっていたり、また、CT の外でも、クロマチンループが張り出していると認識すべきである。CT の表示は染色体が核内で占める大まかな全体像で、遺伝子は発現状態にかかわらず、小さなドメインの周辺部に配置しており、発現状態にある遺伝子は“開いた”クロマチン状態に、転写不活性な遺伝子は“閉じた”クロマチン状態にあって、転写や複製は“開いた”クロマチンやクロマチンドメインの間隙部で起こると考えられている^{3, 4)}。このように、大まかに見ても複製や転写はゲノムの核内構造や配置と密接に関係しており、以下に個々の過程についてさらに詳細に解説する。

3. ゲノム複製の可視化

1) 核内複製部位の可視化

動物細胞のゲノムの複製は、細胞分裂周期の S 期に 6–8 時間かけておこる。個々のゲノム領域はこの S 期の中で決まったタイミングで複製するが、この複製タイミングはマクロには染色体レベルのバンド構造やゲノムの核内配置、ミクロにはクロマチンの構造や遺伝子の発現などと密接に関連している⁹⁾。クロマチンの凝縮度が低い R バンド領域は S 期の前半に複製し、クロマチンの凝縮度が高い G バンド領域は S 期の後半に複製するが、これらの染色体バンドが前述の 1 Mb レベルの核内クロマチンドメインに相当すると考えられる。筆者らは FISH 法をもちいる個々のゲノム領域の複製タイミングの単純な判定法を開発し、組織特異的に発現する遺伝子の転写の有無と複製タイミングが相関することを示した¹⁰⁾。Cedar のグループは、この方法をもちいてインプリント領域を解析し、父母から受け継いだ一対の対立遺伝子アレル間で複製タイミングが異なることを示し、さらに、複製タイミングのアレル間での非同調性は発生初期の細胞ですでに確立されており、インプリント遺伝子のアレル特異的転写制御より早い段階で起こることを明らかにした^{9, 11)}。図 3 AB に互いに近接するインプリント遺伝子の複製タイミングの解析例を示す。筆者らも、このようなイン

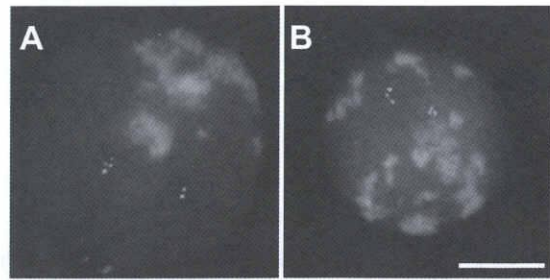


図3 ゲノム複製タイミングの可視化

(A, B) 核内 FISH シグナルによる遺伝子の複製状態の判定例¹³⁾。マウス 7 番染色体上の二つの近接するインプリント遺伝子がアレル間で異なるタイミングで複製することを示す。A では緑赤ともに左がダブルドットで複製後、右がシングルドットで複製前を示す。B は逆のパターン。スケールは 10 μ m。

(カラーページ参照)

プリント領域は、数百 kb におよぶ複製タイミングドメインを形成していること、ドメインレベルのクロマチン構造が異なること、また、このようなアレル間の非対称性は、クロマチン構造の修飾に影響するヒストン脱アセチル化酵素の阻害により見られなくなることなどを示している^{12, 13)}。

このように、ゲノム DNA はドメインレベルで複製タイミングの制御を受けているように見えるが、それでは DNA 複製はゲノム上で実際、どのように進行するのであろうか？真核生物のゲノム上には多数の複製開始点 (ori) が散在しており、これらが適切なタイミングで順次活性化されて短時間のうちに長大なゲノムが効率よく複製を完了できる。個々の ori は S 期の中でも決まった時期に活性化され複製を開始するが、動物ゲノムについては ori に共通する塩基配列は同定されておらず、いくつかの ori がマップされているものの、何万もあると考えられる ori がゲノム上のどこに存在し、どのように並んでおり、どのようなタイミングや頻度で活性化されるのかについては、よくわかっていないのが現状である。これらを詳細に解析する手法として取り組まれてきた DNA ファイバーを用いる方法について以下に解説する。

2) DNA ファイバー上での複製フォークの解析

細胞を市販の特殊被覆していないスライドガラスに滴下し、風乾後 SDS 入りの溶解液に浸して細胞を溶かし溶液から引き出してスライドガラス

を傾け、風乾する。核内 DNA は溶解液の流れに乗って展開され、はだかの二重らせんとしてスライドガラスに張りつく。あとは通常の FISH を行い、変性させて二重らせんを開きプローブをハイブリさせれば、染色体上ではクリアな点状の蛍光シグナルとして検出されたプローブでもサイズに応じたライン状蛍光シグナルとして検出される。これで数百 kb から 1 Mb ぐらいまでのゲノム領域が解析できる。

一方、複製フォークを DNA ファイバー上に可視化する試みは 1960 年代のファイバーオートラジオグラフィー (RI 標識チミジンを hot ラベル, warm チェイスの二段階で複製標識) に始まる^{14, 15)}。その後、1980 年代後半に BrdU を取り込ませ、複製フォークの進行方向はわからないものの、ファイバー上に複製部位を蛍光検出する方法が報告された¹⁶⁾。さらに CldU, IdU を染め分ける抗 BrdU 抗体 (親和力が異なる) の開発で複製フォークの進行方向も判定できるようになり、RI では検出に数ヶ月も要したのが数時間に短縮された。留意点はあるものの DNA ファイバー上で複製部位と特定のゲノムクロンの FISH をマルチカラーで併用して検出すれば、ファイバーオートラジオグラフィーではできなかった特定部位の複製フォークや複製起点の解析が理論的には可能である¹⁷⁾。

細胞の複製標識法としてはプロモデオキシウリジン (BrdU) などのハロゲン化ヌクレオチドやビオチン等修飾ヌクレオチド、生細胞で観察できる蛍光標識ヌクレオチドが用いられるが、これらのヌクレオチドは検出に DNA の変性を必要とせず、ファイバー上に寸断のない高質の蛍光シグナルが得られる。筆者らは、微細なガラスビーズで細胞をスクラッチしてできる隙間から修飾ヌクレオチドを細胞内に入れるビーズローディングや、細胞を一時的に低張状態にしてヌクレオチドを移入するハイポトニックシフトを用いている¹⁸⁾。特に後者では、ほぼすべての細胞に移入でき、細胞内に入るヌクレオチド濃度も均一に近く、さらに浮遊系の細胞にも用いることができ使いやすい。この方法を用いて複製標識後 DNA ファイバー標本作製し、複製フォークを検出した結果、驚くべきことに図 4 A に示すような流れ星様の蛍光シグナルを観察し、二段階の複製標識を使わずと

も単色蛍光ラベルで複製フォークの進行方向を判定出来ることがわかった¹⁹⁾。これは核内に入った修飾ヌクレオチドが複製の進行に伴って消費されるか、拡散あるいは代謝され複製鎖に取り込まれる確率が下がるためと考えられるが、いずれにしろこの方法によれば DNA ファイバー上に高質の蛍光シグナルが検出でき、二種のヌクレオチドを使い、またそれらの濃度を変えて使うことで複製起点の高解像度の解析やフォークのスピードを見ることが出来る (図 4 BC)。修飾ヌクレオチドによる複製標識と FISH を併用して特定ゲノム領域上の複製フォークの進行の様子を捉えることができる¹⁹⁻²¹⁾ (図 4 D)。

細胞から DNA を引き出す SDS ファイバー法で問題となるポイントは、DNA 鎖伸展の均一性とファイバーの重なりである。顕微鏡の一視野内では伸展率はある程度均一であるが視野を変えて比較するとシグナルの長短関係は必ずしも一致しない。また、スライドガラスに塗布する細胞数が多い場合や、少なくとも核から DNA が束になって引き出されるので、特に複製フォークと FISH を組み合わせる際には同一 DNA ファイバー上のシグナルを見ているかどうか注意を要する。これらはある程度解決する手法として登場したのが分子コーミングである。

3) 分子コーミング

分子コーミング [Dynamic Molecular Combing (DMC) 後に命名] の最初の報告は、1994 年に遡る²²⁾。DMC とは、溶液中に DNA 分子を浮遊させ、溶液にカバーガラスを浸して一定の速度で引き上げ、DNA 分子を櫛状に均一な伸展率で張りつけるというものである (図 5 A)。この方法の特に重要なポイントは、DNA を張りつける顕微鏡用カバーガラスのコーティング方法と DNA 溶液の調製法、さらに DNA 分子の引き延ばし方にある。分子コーミングを用いた研究報告は徐々に出てきているが、複製と FISH を別々に検出する場合には大きな問題はないであろう (図 5 B)。しかし、両者を併用し 3~4 色蛍光で検出するのは困難である。FISH と複製標識を併用した特定ゲノム領域上での複製解析例は、ゲノム量の小さい酵母や遺伝子増幅系がほとんどであるが、重要な方法として注目されている^{23, 24)} (図 5 C)。

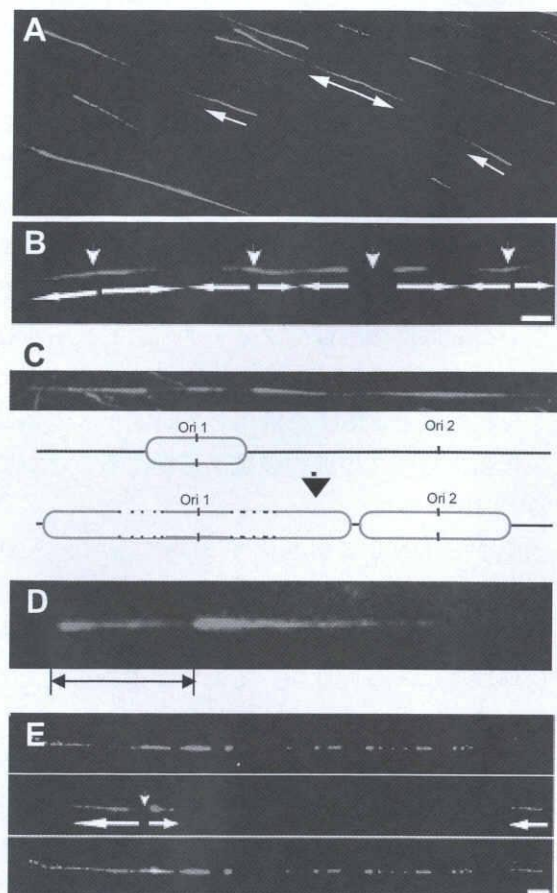


図4 ゲノム上の複製フォークの可視化

(A) マウス胚性線維芽細胞 m5S をビオチン-dUTP で複製標識後、界面活性剤で細胞を溶かして DNA ファイバー標本を作製し、複製フォークを検出した。この方法によれば非変性条件下で質の高い検出ができる。複製フォークは矢印の方向に進み、両方向に進むフォークの中心には複製開始点が存在すると推定される¹⁹⁾。(B) レプリコンクラスターの検出例。m5S 細胞にジゴキシゲニン-dUTP を取り込ませ、DNA ファイバーを作製し、赤の蛍光で検出した。矢頭は推定の複製開始点 ori の位置、スケールバーは 10 μ m。4つの複製開始点がほぼ同様のタイミングで複製を開始したことを示す。(C) 隣り合う二つのレプリコンの複製進行過程を示す。m5S 細胞にジゴキシゲニン-dUTP、20分後にビオチン-dUTP を取り込ませ、DNA ファイバーを作製し、それぞれを赤、緑の蛍光で検出した。図中の矢頭は推定の複製開始点 ori の位置、スケールバーは 10 kb。右側の ori が少し遅れて複製を開始したことを示す。イメージの下に複製進行過程の模式図を示した²⁰⁾。(D) B と同様の方法で進行速度を測定する例。赤の開始点と緑の開始点の間の距離を測り（矢印間）、標識時間（分）で割ると単位時間あたりのフォークの進行速度を算出できる²⁰⁾。(E) A の方法で FISH を併用した。非変性条件下でもその領域が複製する時期には FISH 検出が可能で、特定領域の複製開始点の存在が推定できる²¹⁾。（カラーページ参照）

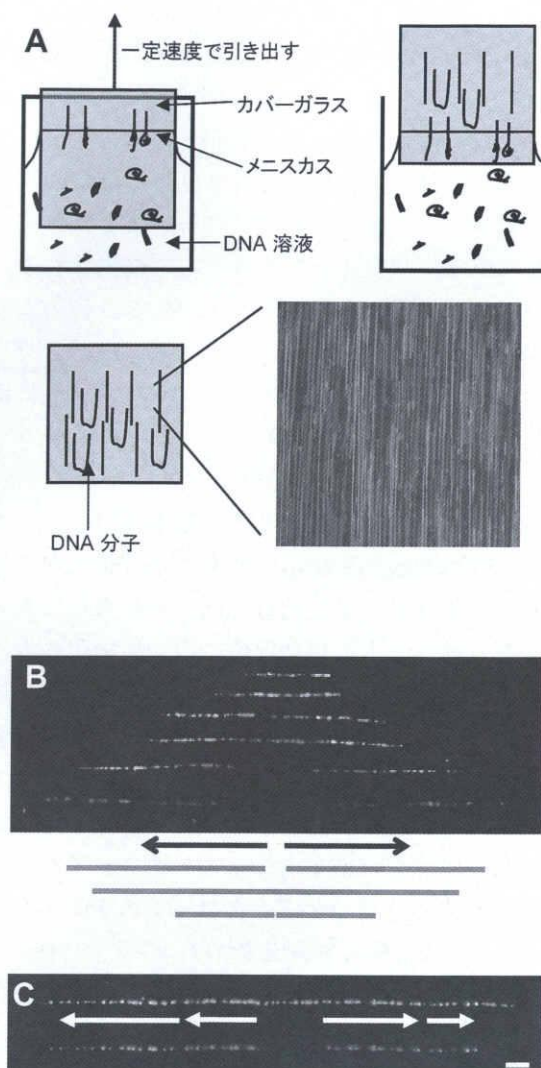


図5 分子コーミングの原理と FISH を併用したゲノム上の複製部位可視化

(A) コーティングしたカバーガラスを DNA 溶液に浸し、一定の速度で引き上げる。DNA 分子はメニスカスの移動にしたがい直鎖状に張りつく。下図右は張りついた DNA 分子の YOYO 染色蛍光顕微鏡像。(B) DMC を用いた標本上での複製フォークの検出。複製開始点からフォークが進んでいるパターンの例。2種類のアロゲン化ヌクレオシドで 20 分ずつ連続的に複製標識した細胞から DNA を調製し、DMC 標本を作製した。下の模式図のように矢印の方向に複製フォークが進み、各ファイバーの中央に複製開始点が存在するとみなせる^{23,24)}。(C) 特定ゲノム配列上の複製フォークの可視化例。DMC を用いた標本上での複製フォークと特定ゲノム領域の FISH を同時検出した。スケールバーは 10 kb。（カラーページ参照）

4. 遺伝子の転写の可視化と核の内部構造

1) 転写中あるいは転写直後の RNA の可視化

一個の細胞核内における一遺伝子の転写状態も顕微鏡下に視覚的に捉えることができる。FISH法は遺伝子マッピングなどを通してDNAを可視化する手段としてよく知られているが、核内で転写されるRNAやそのプロセッシングを解析する方法としても有効である²⁵⁾。筆者らは、RNA/DNA FISHによって転写中および転写直後の一次転写産物RNAと転写される側の遺伝子DNAを同時に可視化して転写状態を解析している。すなわち、図1に示したようにターゲットとする遺伝子についてジゴキシゲニンおよびビオチン標識した二種のプローブDNAを用意する。RNAが分解されないように細胞を注意深くスライドガラス上に固定し、核内DNAの変性処理をせずに、プローブ（例えばジゴキシゲニン標識）を一本鎖状態の一次転写産物RNAにハイブリダイズさせ、ローダミン抗ジゴキシゲニン抗体でまずRNAを検出する。続いて、標本を再固定後DNA変性処理し、ビオチン標識プローブをハイブリダイズさせ、FITC-アビジンでDNAを検出すれば、赤いRNAのスポットシグナルと緑のDNAのスポットシグナルが核内でほぼ同じ位置に重なって見える（図6 AB）。哺乳類の細胞核内にはほとんどの遺伝子について父方、母方由来の一对の対立遺伝子（アリル）が存在するが、両アリルが転写される通常の遺伝子では二つのスポットが観察される。

筆者らは、父母由来の一方のアリルのみが転写されるインプリント遺伝子を含め、いくつかの遺伝子の転写状態をRNA/DNA FISHによって詳細に検討した²⁶⁾。その結果、図6に示すように、両アリルから転写されるもの、一方のアリルのみから転写されるものが効率よく可視化でき、特にインプリント遺伝子では、父母どちらか一方のアリルのみから高い割合で転写されることが示された。その一方で、この方法によれば、同じ細胞集団でも遺伝子の種類や個々の細胞で転写のパターンが異なることも観察できた。また、インプリント遺伝子近傍に存在する反復DNA配列で、個人によってコピー数が異なる多型マーカーが利用できる場合や一方のアリルが欠失している場合などは、父母どちらのアリルから転写されているかも、

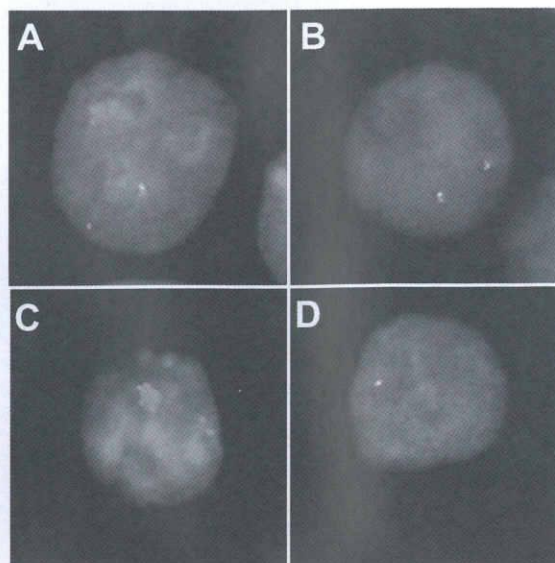


図6 インプリント遺伝子のアリル特異的転写

(A~D) RNA/DNA FISHによるSNRPN遺伝子の転写状態の検出²⁶⁾。赤はRNA、緑はDNAの蛍光シグナル。(A)は一つのアリルからのみ、(B)は両アリルから転写。(C)はSNRPNのRNA(赤)と反復配列DNAマーカー(緑)の検出例。SNRPNは反復数の多いDNAをもつ父方アリルからのみ転写されている。(D)SNRPN遺伝子の母方アリルの欠失細胞での転写状態。SNRPN遺伝子は欠失していない父方アリルから転写されている。(カラーページ参照)

視覚的に決定できる（図6 CD）²⁶⁾。Singerのグループは様々な蛍光検出とコンピュータ処理を組み合わせ、11種類の遺伝子を一個の核内で可視化することに成功している²⁷⁾。

2) 核マトリックスと遺伝子の転写

複製や転写などの様々な核内イベントの進行には核の内部構造が密接に関係する。動物細胞のクロマチンDNAはループ構造をとり、ループの起点としてゲノム上のところどころに存在するMAR(matrix attachment region)とよばれる配列を介して核の内部構造と相互作用していると考えられている。すなわち、クロマチンの凝縮度だけではなく、クロマチンと核の内部構造との結合状態も転写や複製に重要であることがわかる。図7 ABにヒト急性前骨髄性白血病細胞株HL 60の細胞質を弱い界面活性剤で除去して核膜透過性をよくし、さらに高塩処理によって核内タンパク質を抽出して作製したハロー核に対するセントロメアおよびテロメアのFISH画像を示した。テロメアが核の内部構造にしっかりと結合した小さい点

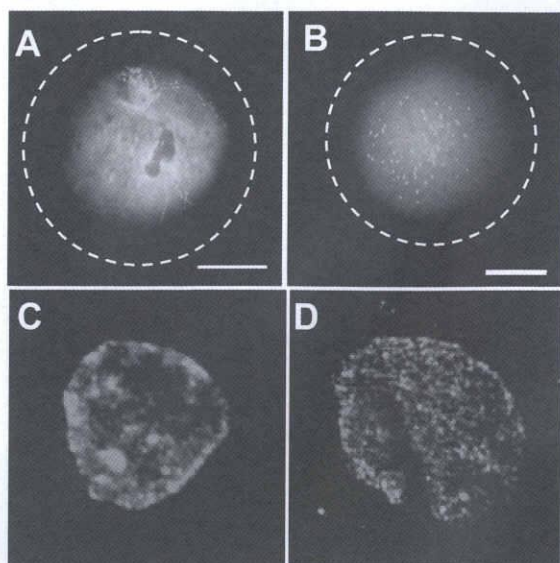


図7 ゲノムと核マトリックスの相互作用

(A, B) ヒト急性骨髄性白血病細胞 HL-60 から調製したハロー核標本に対して、ヒト 12 番染色体セントロメアおよび全染色体のテロメアをそれぞれ FISH 検出した。破線のところまで核から DNA ループがとびだしており、セントロメアはループ上に広がって検出される²⁴⁾。スケールバーは 10 μ m。(C, D) 核マトリックスに結合している *SNRPN* 遺伝子の検出。赤は増幅法で検出された *SNRPN* 遺伝子の DNA シグナル。緑は核マトリックスを構成する Lamin B の免疫染色。(C) は一方のアリルのみ、(D) は両アリルが核マトリックスに結合していることを示している²⁶⁾。

(カラーページ参照)

状シグナルで検出されるのに対し、セントロメアはところどころ引っかかりながらも核外へ引き出されたファイバー状シグナルとなっているが、これらはゲノム領域によって核の内部構造との相互作用が異なる典型的な例である。核内でクロマチンはどのような状態で存在し、転写や複製などとかかわっているのだろうか？

核の内部構造として核マトリックスとよばれる概念がある。細胞を界面活性剤処理し、さらに DNase で処理した後、高塩処理でタンパクを抽出したあとにもなお残っている画分で、調製法によって核スカuffォールドともよばれる。クロマチンのうち露出した DNA 部分が DNase で切断され除かれるので、図7の核ハローのループ部分が除かれた状態を想像していただきたい。ただし、核マトリックスでは核内 DNA の 85–90% が除かれているので DAPI ではほとんど染まらない²⁸⁾。核マトリックスのような核内構造が生理的条件下で存在するかどうかの議論もあるが、筆者は核マ

トリックスが核内に張りめぐらされたしっかりしたネットワーク構造というよりはむしろ、ダイナミックに動き得る、あるいは構造変換し得る DNA/RNA/タンパク複合体のようなものと考えている。最近、核マトリックス関連タンパク質が数多く報告されつつあり、転写や複製は核マトリックスに結合した転写ファクトリー、複製ファクトリーで起こるというモデルが支持されている²⁹⁾。筆者らはインプリント遺伝子を例として、転写を RNA/DNA FISH で、それぞれの遺伝子と核マトリックスとの結合を高感度 DNA FISH で可視化して解析した。図7CDに示すように、緑で検出した核マトリックス上に、転写されている遺伝子では、一つの核当たり一点または二点の赤のスポット状のシグナルが検出され、一方もしくは両アリルが核マトリックスに結合していると推定された。一点のみ検出される核はインプリント遺伝子で多く観察され、これらのパターンの割合は、図6ABの RNA/DNA FISH の結果と極めてよく一致していた²⁶⁾。以上の結果は、細胞レベルで転写されている遺伝子は核マトリックス上に検出され、転写されていない遺伝子は検出されないことを意味し、転写が核マトリックスに結合した転写ファクトリーを介して進行するというモデルを強く支持する。

それでは、転写不活性の遺伝子の転写を誘導された場合も核マトリックスが関与するのであるか？筆者らは転写誘導可能な熱ショックタンパク質 *HSP 70* 遺伝子領域を例として解析し、遺伝子の転写の割合と核マトリックスへの結合性の割合がきわめてよく一致することを示した。つまり、遺伝子の MAR 以外の部分はクロマチンのループ上にあり、転写時に核マトリックス上に形成された転写ファクトリーに引き込まれるわけである³⁰⁾。

3) 核マトリックスと複製

クロマチン DNA の複製も核マトリックス上に形成された複製ファクトリーにクロマチン DNA が引き込まれて進行すると考えられている。筆者らは、異なる複製タイミングをもつことがわかっている3つの DNA 領域について、複製依存的に核マトリックスと結合性を示すかどうかを調べ、それぞれのプローブは複製タイミングと一致して

核マトリックス結合性を示すことを確認した。つまり、クロマチンループ上の DNA は複製時に核マトリックスに引き込まれ、複製後直ちに核マトリックスから離れることを意味している。

複製開始点と核マトリックスの関係も同様であろうか？ 詳細なデータは省くが、筆者らはウエスタンブロット、複製開始新生鎖の定量による複製開始点の確認や、核マトリックス画分に含まれる DNA の定量的 PCR などを実施し、S 期初期と後期に活性化される複製開始点の核マトリックス結合性を検討した。その結果、予備的ではあるが、複製開始点は、まず複製開始点認識タンパク質 (ORC) によって初期および後期複製開始点ともに複製開始点と認識され、G1 期初期に核マトリックスに結合し、引き続き複製開始前複合体 (pre-RC) の形成、複製装置の結合により核マトリックス上に複製ファクトリーが形成される、S 期に入り複製した初期複製開始点は、核マトリックスから離れるが、後期開始点は核マトリックスに結合したままで、S 期後期になって複製後に離れることを示すデータを得ている²⁴⁾。

4) エピジェネティクス

ゲノムはクロマチンとして存在するが、その構造や凝縮度は一定ではなく、ゲノム上の個々の遺伝子やゲノム領域の複製・転写は、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化・メチル化などの修飾を通して形成されたクロマチン構造によって様々なレベルの制御を受ける。これらの修飾はエピジェネティックな修飾、エピジェネティクスと呼ばれ、DNA の配列に記されていない制御として生命科学の一大研究領域を形成するに至っている³¹⁾。クロマチンのエピジェネティックな修飾は核内ダイナミクスの重要な要因であり、筆者らもインプ

リント遺伝子の複製や転写制御、ヘテロクロマチンの形成などとの関連性について研究を展開しているが、本稿では可視化手法を主とした総説にしておき、その詳細については他の総説を参考にさせていただきたい^{12, 24, 30, 31)}。ここではヒストンの修飾や他のタンパク質と上述の FISH の併用例をあげるにとどめる。図 8 はマウスセントロメア領域のヘテロクロマチンの形成に関与するタンパク質、修飾ヒストンの同時検出例を示す。DNA のメチル化やヒストン修飾の変化に伴ってクロマチン構造やその形成に関与すると考えられるタンパク質や RNA が変化する様子をマルチカラーで捉えることができる。

5. 今後の展開

1) 技術的側面

本稿では DNA ファイバー上の複製フォークや FISH 検出、転写中あるいは直後の RNA やそのプロセッシングを観察できる RNA/DNA FISH、核マトリックスについて解説したが、異なる遺伝子が集まって巨大な転写ファクトリーを形成し転写が起こる例もある³²⁾。また、Chromosome Conformation Capture (3C) という方法を用いて、塩基配列上かなり離れていたり異なる染色体にあるが核内では近接して協調的に転写が行われる例も示されており³³⁾、こうした中での核マトリックス、転写・複製ファクトリーがどのような関係にあるのかも興味深い。テロメアの鎖特異的に検出する CO-FISH や ReDFISH, RNA, DNA, タンパクを同時検出する系なども核ダイナミクスの解析に今後も有効な手段であることは変わりないであろう。また、DNA ファイバーではなくクロマチンファイバー上でタンパク間相互作用やヒス

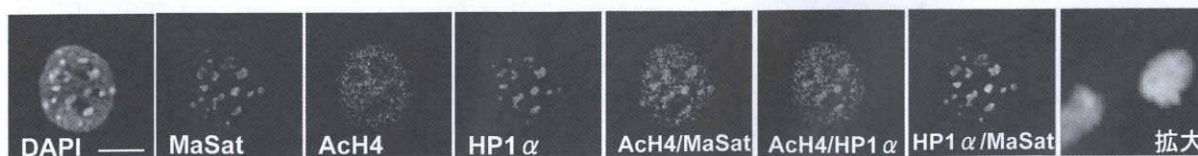


図 8 マウスセントロメアヘテロクロマチン領域を構成する DNA、タンパク質のマルチカラー検出

m5S 細胞について修飾ヒストンなどの局在を蛍光検出した。左から DAPI, MaSat の FISH, アセチル化ヒストン H4, HP1α をそれぞれグレー、青、緑、赤で検出した同一核のイメージに続いて、二種ずつを重ね合わせた。メジャーサテライト DNA (MaSat) 領域は凝縮し、低アセチル化状態で HP1α が局在している。スケールバーは 10 μm。(カラーページ参照)

トン修飾, さらには DNA FISH との併用を試み
てみるのもおもしろい。一方, 浸透性のよいプロー
ブとして使えるペプチド核酸 (PNA) の合成も
注文できるようになり, さらに次世代の核酸とし
て LNA (locked NA) が注目を浴びている。こ
れについては次の機会に検討結果を示したい。原
理的に退色しない微粒子による蛍光 Quantum
dot など, プローブ側, 蛍光試薬側の開発改良も
進んで, 今後さらに一般化して選択肢が増えるこ
とになろう。

2) 実用的側面

FISH を用いるゲノム可視化技術は既に遺伝病
の診断や, 染色体異常の解析などに利用されてき
た。一方で, 例えば遺伝子の転写応答を RNA
FISH で捉えれば, より迅速で高感度の判定が期
待できる。すなわち, 食品中の機能性成分や, 残
留農薬, 重金属等の有害物質などは動物細胞に何
らかの刺激を与えることが推定され, その刺激を
細胞のストレス応答として遺伝子の転写を検出す
れば, 高感度のスクリーニングシステムを構築で
きる可能性がある。また, 脂肪細胞の脂肪蓄積量
と遺伝子応答などの関係を調べれば, 生活習慣病
に関連する診断システムの開発に応用できるかも
しれない。RNA FISH は核内での遺伝子の直接
的なオン・オフを捉えている点で, マイクロアレ
イや他の方法とは異なる。こうした分野での応用
は本法の新たな展開を導くことになろう。筆者ら
は, こうした応用展開についてすでに研究を進め
予備的な結果を得ており, 次の機会にそれらの詳
細について紹介したい。

6. おわりに

本稿では, 哺乳類細胞の個々の核内でおこる複
製や転写, クロマチン修飾など様々なイベントを
蛍光顕微鏡下に可視化する手法について筆者らの
グループが開発改良を重ねてきた技術を中心に解
説した。これらの技術は, 何も哺乳類に限ったわ
けではなく, 他の動植物や微生物にも十分適用可
能なものである。また組織や個体レベルでの解析
にも応用でき, こうした技術が, 多種多様な生物
を対象とする生物資源学の研究領域で幅広く応用
されることを期待したい。

和文要約

体細胞クローン技術でもわかるように, 細胞核
が動物個体のほとんど全ての情報をもっていると
言っても過言ではなかろう。長大な DNA 分子が
クロマチンを形成し, 1つの核に収納されている
が, 核内における DNA 複製や転写などの基本的
な核内イベントは厳密な制御下にダイナミックに
進行し, その破綻は細胞を変異やがん化, 死に導
く。本総説では核内で進行する神秘的な過程を解
き明かすための, 蛍光顕微鏡下に一コピーの
DNA/RNA 分子を可視化する方法を解説する。
DNA 複製タイミング, 複製フォーク, 遺伝子の
転写, 核マトリックスの役割等の解析をはじめと
する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションの最新
の方法とその応用例を列挙した。

謝 辞

本稿で述べた研究の基礎は Yale 大学 David C.
Ward 教授に FISH 技術の薫陶を受けたことに発
しており, 支援をいただいた当時の Ward 研究
室の各位に感謝致します。本稿に示したデータは,
三重大学大学院生物資源学研究科分子細胞生物学
研究室で 1991 年ごろから現在までにおこなわれ
たもので, この間筆者と共同研究を進めていただ
いた研究者諸氏, ならびに共に研究を進め, 支え
ていただいた学生諸君に感謝致します。また, こ
こに述べた研究を進めるにあたり, 研究活動の場
を与えていただきご理解をいただいた三重大学名
誉教授・嶋林幸英先生, 自由にやらせていただき
助言いただいた現三重大学教授・田口寛先生, 特
に学生指導や細胞の取扱いおよび解析などの技術
的側面で支えていただいた現助教・緒方進先生に
感謝致します。

最後に本稿寄稿に際し, 機会を与えていただき,
様々な便宜をおはかりいただいた田口寛先生に重
ねてお詫びとお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) 松原謙一, 吉川 寛編. (1994) FISH 実験プロト
コール—ヒト・ゲノム解析から染色体・遺伝子診
断まで—細胞工学, 別冊 秀潤社

- 2) 押村光雄, 平岡泰編. (2004) クロマチン・染色体実験プロトコール, 羊土社
- 3) CREMER, T. and CREMER, C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* **2**: 292-301.
- 4) CROFT, J. A., BRIDGER, J. M., BRYLE, S., PERRY, P., TEAGUE, P. and BICKMORE, W. A. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* **145**: 1119-1132.
- 5) TANABE, H., MULLER, S., NEUSSER, M., von HASE, J., CALCAGNO, E., CREMER, M., SOLOVEI, I., CREMER, C. and CREMER, T. (2002) Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 4424-4429.
- 6) EILS, R., DIETZEL, S., BERTIN, E., SCHROCK, E., SPEICHER, M. R., RIED, T., Robert-Nicoud, M., CREMER, C. and CREMER, T. (1996) Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J. Cell Biol.* **135**: 1427-1440.
- 7) NOGAMI, M., NOGAMI, O., KAGOTANI, K., OKUMURA, M., TAGUCHI, H., IKEMURA, T. and OKUMURA, K. (2000) Intranuclear arrangement of human chromosome 12 correlates to large-scale replication domains. *Chromosoma* **108**: 514-522.
- 8) NOGAMI, M., KOHDA, A., TAGUCHI, H., NAKANO, M., IKEMURA, T. and OKUMURA, K. (2000) Relative locations of the centromere and imprinted *SNRPN* gene within chromosome 15 territories during the cell cycle in HL60 cells. *J. Cell Sci.* **113**: 2157-2165.
- 9) GOREN, A. and CEDAR, H. (2003) Replicating by the clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 25-32.
- 10) SELIG, S., OKUMURA, K., WARD, D. C. and CEDAR, H. (1992) Delineation of DNA replication time zones by fluorescence in situ hybridization. *EMBO J.* **11**: 1217-1225.
- 11) SIMON, I., TENZEN, T., REUBINOFF, B. E., HILLMAN, D., MCCARREY, J. R. and CEDAR, H. (1999) Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* **401**: 929-932.
- 12) 奥村克純. (1996) 蛋白質核酸酵素 **41**: 2191-2201.
- 13) KAGOTANI, K., TAKEBAYASHI, S.-I., KOHDA, A., TAGUCHI, H., PAULSEN, M., WALTER, J., REIK, W. and OKUMURA, K. (2002) Replication timing properties within the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 1046-1051.
- 14) CAIRNS, J. (1966) Autoradiography of HeLa cell DNA. *J. Mol. Biol.* **15**: 372-373.
- 15) HUBERMAN, J. A. and RIGGS, A. D. (1966) Autoradiography of chromosomal DNA fibers from Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**: 599-606.
- 16) TOMILIN, N., ROSANOV, Y., ZENIN, V., BOZHKO, V. and VIG, B. (1993) A new and rapid method for visualising DNA replication in spread DNA by immunofluorescence detection of incorporated 5-iododeoxyuridine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**: 257-262.
- 17) NORIO, P. and SCHILDKRAUT, C. L. (2001) Visualization of DNA replication on individual Epstein-Barr virus episomes. *Science* **294**: 2361-2364.
- 18) KOBERNA K, STANEK D, MALINSKY J, ELTSOV M, PLISS A, CTRNACTA V, CERMANOVA S, RASKA I. (1999) Nuclear organization studied with the help of a hypotonic shift: its use permits hydrophilic molecules to enter into living cells. *Chromosoma* **108**: 325-335.
- 19) TAKEBAYASHI, S.-I., MANDERS, E. M., Kimura, H., TAGUCHI, H. and OKUMURA, K. (2001) Mapping sites where replication initiates in mammalian cells using DNA fibers. *Exp. Cell Res.* **271**: 263-268.
- 20) TAKEBAYASHI, S.-I., SUGIMURA, K., SAITO, T., SATO, C., FUKUSHIMA, Y., TAGUCHI, H. and OKUMURA, K. (2005) Regulation of replication fork progression at the R/G chromosomal band boundary and pericentromeric heterochromatin in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* **304**: 162-174.
- 21) SUGIMURA, K., TAKEBAYASHI, S.-I., OGATA, S., TAGUCHI, H. and OKUMURA, K. (2007) Non-denaturing fluorescence in situ hybridization to find replication origins in a specific genome region on the DNA fiber. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 627-632.
- 22) BENSIMON, A., SIMON, A., CHIFFAUDEL, A., CROQUETTE, V., HESLOT, F. and BENSIMON, D. (1994) Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* **265**: 2096-2098.
- 23) 杉村和人, 奥村克純. (2006) 複製フォーク進行制御のダイナミクス. 蛋白質核酸酵素 **51**: 2123-2125.
- 24) 奥村克純, 杉村和人, 竹林慎一郎, 齋藤辰朗. (2007) 核内クロマチン構造と複製タイミング・

- フォークの制御. 染色体サイクル制御の分子メカニズム 実験医学増刊 **25**: 739-746.
- 25) CUSTODIO, N., Carmo-Fonseca, M., GERAGHTY, F., PEREIRA, H. S., GROSVELD, F. and ANTONIOU, M. (1999) Inefficient processing impairs release of RNA from the site of transcription. *EMBO J.* **18**: 2855-2866.
- 26) KAGOTANI, K., NABESHIMA, H., KOHDA, A., NAKANO, M., TAGUCHI, H. and OKUMURA, K. (2002) Visualization of transcription-dependent association of imprinted genes with the nuclear matrix. *Exp. Cell Res.* **274**: 189-196.
- 27) LEVSKY, J. M., SHENOY, S. M., PEZO, R. C. and SINGER, R. H. (2002) Single-cell gene expression profiling. *Science* **297**: 836-840.
- 28) PHILIMONENKO, V.V., FLECHON, J.E. and HOZAK, P. (2001) The nucleoskeleton: a permanent structure of cell nuclei regardless of their transcriptional activity. *Exp. Cell Res.* **264**: 201-210.
- 29) COOK, P. R. (1999) The organization of replication and transcription. *Science* **284**: 1790-1795.
- 30) 奥村克純. (2005) 核内クロマチン構造と複製・転写のダイナミクス. *生化学* **77**: 191-199.
- 31) LIEB, J. D., BECK, S., BULYK, M. L., FARNHAM, P., HATTORI, NAKA., HENIKOFF, S. LIU, X. S., OKUMURA, K., SHIOTA, K., USHIJIMA, T. and GREALLY, J. M. (2006) Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease. *Cytogenet. Genome Res.* **114**: 1-15.
- 32) OSBORNE, C. S., CHAKALOVA, L., BROWN, K. E., CARTER, D., HORTON, A., DEBRAND, E., GOYENECHEA, B., MITCHELL, J.A., LOPES, S., REIK, W. and FRASER, P. (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat. Genet.* **36**: 1065-1071.
- 33) LING, J. Q., LI, T., HU, J. F., VU, T. H., CHEN, H. L., QIU, X. W., CHERRY, A. M. and HOFFMAN, A. R. (2006) CTCF mediates interchromosomal colocalization between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1. *Science* **312**: 269-272.

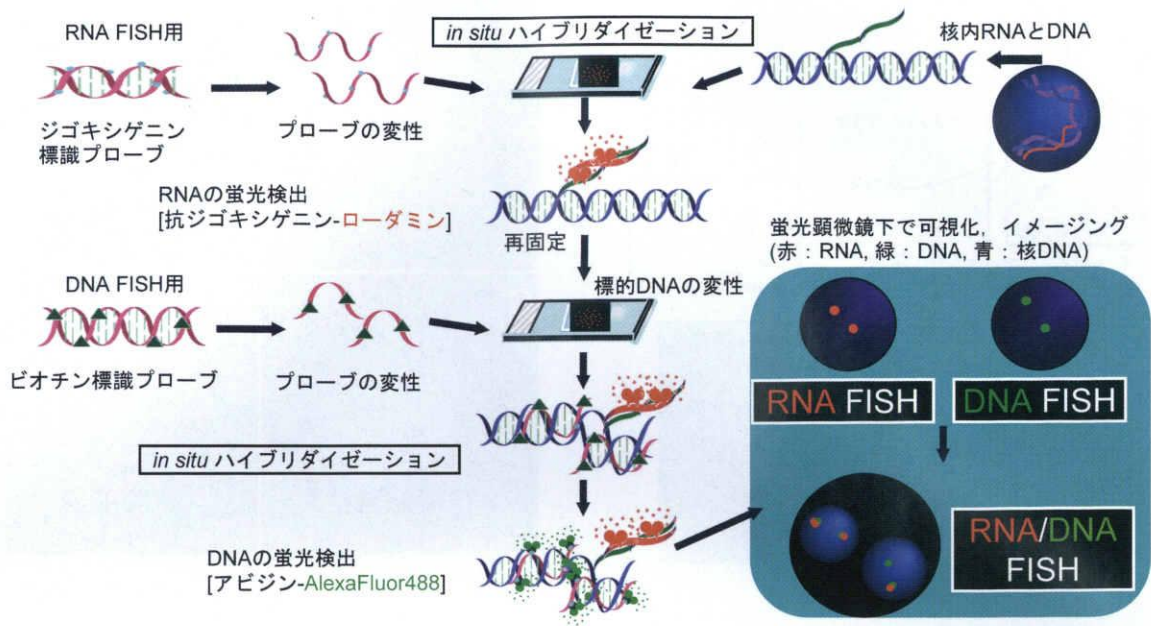


図1 三次元 RNA/DNA FISH による遺伝子とその転写物の同時検出のフローチャート

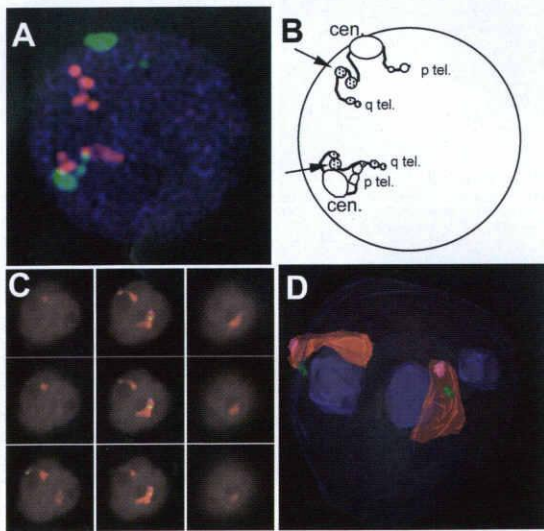


図2 マルチカラー FISH によるゲノムの核内配置の可視化

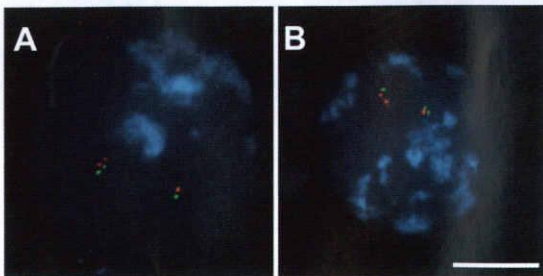


図3 ゲノム複製タイミングの可視化

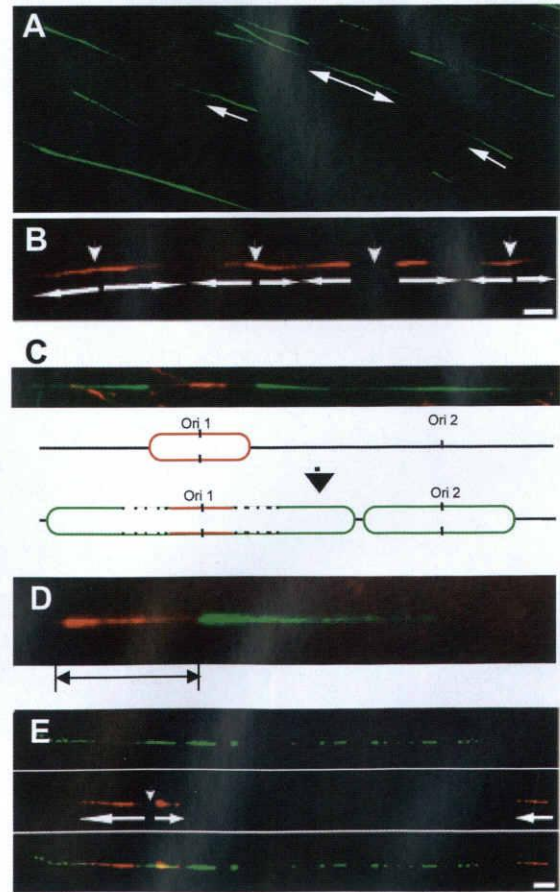


図4 ゲノム上の複製フォークの可視化

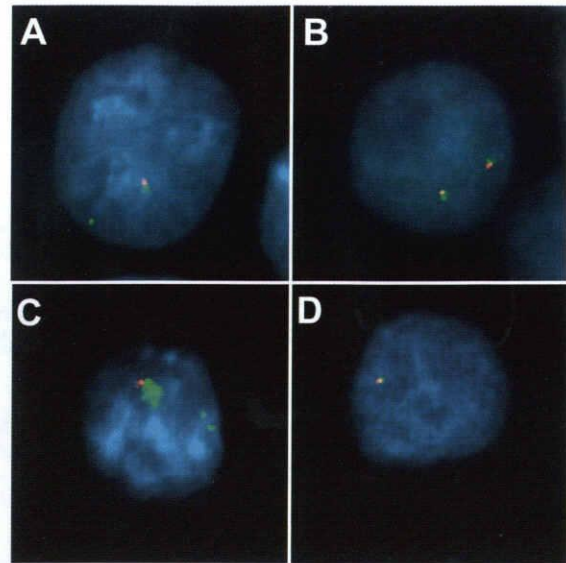
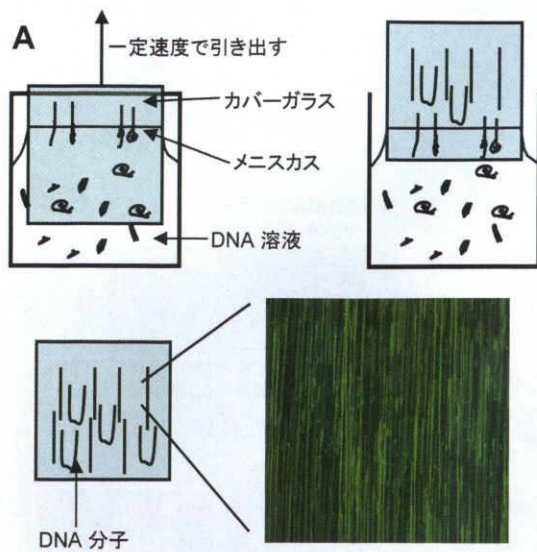


図6 インプリント遺伝子のアレル特異的転写

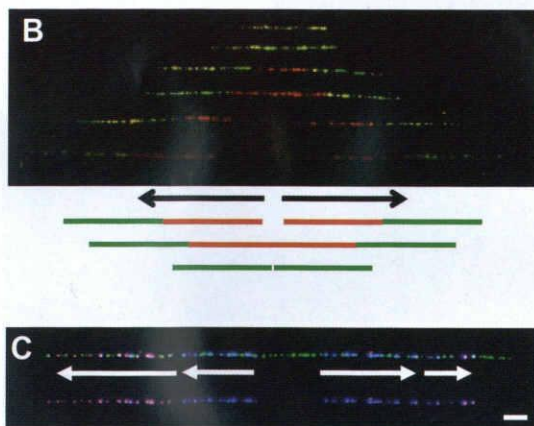


図5 分子コーミングの原理と FISH を併用したゲノム上の複製部位可視化

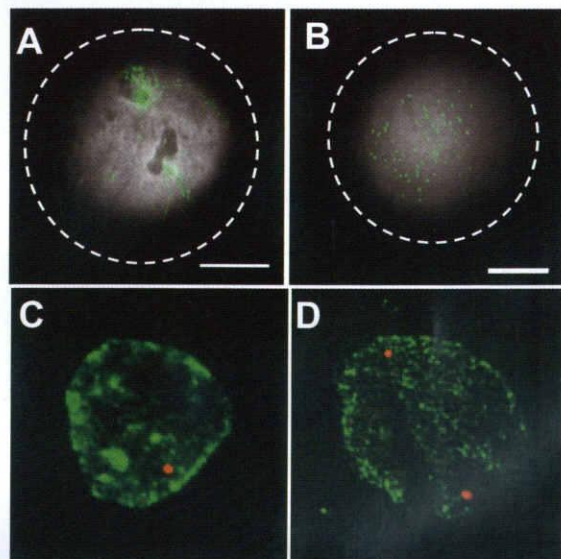


図7 ゲノムと核マトリックスの相互作用

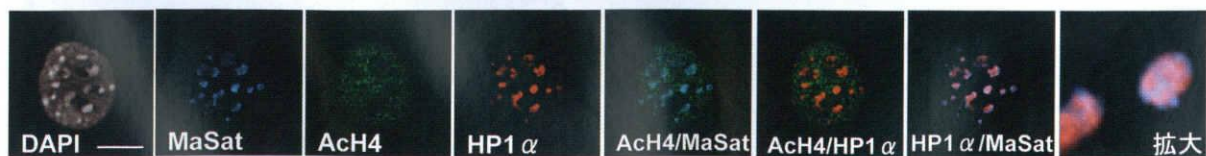


図8 マウスセントロメアヘテロクロマチン領域を構成する DNA, タンパク質のマルチカラー検出

Effects of Types of Soils and Geosynthetics on Pullout Behavior

Md. Zakaria HOSSAIN

Graduate School of *Bioresources, Mie University*, 1515 Kamihama-cho, Tsu, Mie 514-8507

Abstract

An experimental investigation was conducted with the objective to find out the effects of types of soils and geosynthetics on pullout behavior because of their contentious issues in designing all sorts of reinforced earth structures. A series of pullout tests with two types of geosynthetics such as forttrac and stabilanka under six normal stresses were carried out in order to obtain the pullout resistances both in sandy and clayey soils. The analyses of the data and information revealed that the stabilanka has more frictional resistance in clayey soil than that of the forttrac whereas it has less frictional resistance in sandy soil and the cohesion of stabilanka is conspicuously higher as compared to forttrac in both types of soils. The usual characteristic is that there is an increase in pullout stress with the increase in displacement as well as with the increase in normal stress for any combination of geosynthetic and soil. This feature agrees the results of other studies found in the literature.

Key Words: geosynthetics, reinforced soil, pullout behavior, forttrac, stabilanka, experiment, multiple effects

1. INTRODUCTION

It is well recognized that the types of soil and reinforcement in earth structures plays a significant role on the overall performance of reinforced soil structures (Williams et al, 1987). Pullout behavior is one of the major phenomena for examining the stability of reinforced embankments and soil structures (Madhab et al., 1998, Zanzinger et al., 2001). Various types of geosynthetics are widely utilized for the improvement of stability of embankments and soil structures. In the present investigation, two types of geosynthetics such as forttrac and stabilanka are used owing to their ease of availability in the local market as well as their wide spread use all over the world for soil reinforcement applications. The available literature review clearly indicates that the pullout resistances are scattered in strengths depending on different reinforcing materials as well as soil types (Kuwano et al., 1999, Izawa, et al., 2001, Mahmood, et al., 2000, Ghionna, et al., 2001). It is, therefore, most important to investigate the individual reinforcement with varying soil properties for clear understanding of pullout behavior as well as their effectiveness and suitability for practical application. Unfortunately, there is no code or guideline available on the effect of types of geosynthetics such as forttrac and stabilanka on pullout strength of reinforcement even though it presents a considerable versatility in the development of reinforced soil structures. Moreover, to the knowledge of the authors, no attempt has so far been made to investigate the comparative study on pullout strength of geosynthetics treated in this paper with sandy and clayey soils.

The present investigation is, therefore, undertaken for comparing the overall response of types of

geosynthetics on the pullout behavior of reinforcement embedded in two types of soils. Pullout tests of two types of geosynthetics namely fortirac and stabilanka are carried out using sandy and clayey soils of Mie prefecture, Japan. A series of pullout tests under six normal stresses such as 6 kN/m², 12 kN/m², 18 kN/m², 24 kN/m², 30 kN/m² and 36 kN/m² have been carried out in order to find out the effect of type of soil and geosynthetics on pullout behavior. Results of these tests are depicted to understand thoroughly of the stress-displacement relationships and ultimate strengths of pullout tests.

2. Properties of materials

1.1 Properties of sandy soil

The particle size distribution curve of sandy soil reveals that nearly 9% of the soil is coarse clay, 7% is fine silt, 6% is coarse silt, 14% is fine sand, 44% is medium sand and more than 20% is coarse sand which mean that more than 90 percent of the soil being in the silt and sand fraction. The average specific gravity of the sandy soil is calculated as 2.64 (Fig. 1). The other properties of the sandy soil used in these tests are given in Table 1.

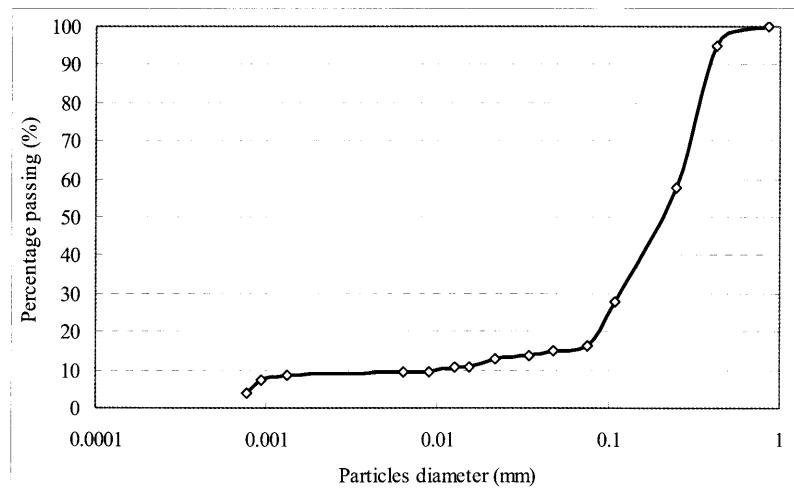


Fig. 1 Particle size distribution curve of sandy soil

Table 1 Properties of sandy soil

Dry density (γ_d)	1.83 t/m ³
Optimum water content (W_{opt})	15.3%
Specific gravity (ρ_s)	2.64
Cohesion (c)	5.01 kN/m ²
Angle of internal friction (ϕ)	32.19°
Sand, $> 75 \mu m$	78%
Silt, $5 - 75 \mu m$	13%
Clay, $< 5 \mu m$	9%

1.2 Properties of clayey soil

The particle size distribution curve of clayey soil plotted in Fig. 2 indicates that nearly 33% of the soil is clay, 24% is fine silt, 5% is medium silt, 4% is coarse silt, 12% is fine sand, 14% is medium sand and 6% is coarse sand which mean that more than 66% percent of the soil being in the clay and silt fraction.

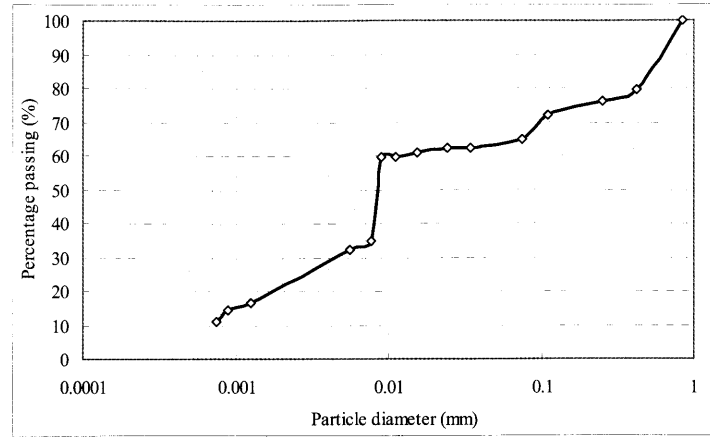


Fig. 2 Particle size distribution curve of clayey soil

Liquid limit, plastic limit and the plasticity index of the soil are 56.2%, 29.3% and 26.9, respectively. The average specific gravity of the soil is calculated as 2.70. The other properties of the clayey soil used in these tests are depicted in Table 2.

Table 2 Properties of clayey soil

Dry density (γ_d)	1.53 t/m ³
Optimum water content (W_{opt})	25.0%
Specific gravity (ρ_s)	2.70
Cohesion (c)	64.31 kN/m ²
Angle of internal friction (ϕ)	16.01°
Sand, $> 75 \mu m$	34%
Silt, $5 - 75 \mu m$	33%
Clay, $< 5 \mu m$	33%
Liquid limit	29.3%
Plastic limit	56.2%
Plasticity index	26.9

1.3 Properties of forttrac geosynthetic

The physical appearance of forttrac geosynthetic obtained commercially is manufactured from polyester yarns (Fig. 3a). The junctions of this mesh are directly connected and greatly improved by interweaving the yarns and then it is coated with protective sheathing. The strength of the junctions is adequate to transmit the envisaged loadings. The cross-section of geogrid strand is 2mm \times 6mm in longitudinal direction and 1.0mm filament diameter in transverse direction with center to center openings of 24mm in longitudinal direction and 20mm in transverse direction. This mesh is commercially nomenclatured as Type 150/30-20 which has tensile strength 150kN/m in longitudinal direction and 30kN/m in transverse direction.

1.4 Properties of stabilanka geosynthetic

The stabilanka geosynthetic is made of polyester yarns by interweaving each other in such a way that there is no gap among the filaments (Fig. 3b). Thus, the stabilanka geosynthetic looks like a sheet in nature. The junctions are not sheathed nor connected with protective sheathing. This sheet is

commercially nomenclatured as Type 800/100, which means that it has tensile strengths 800 kN/m in longitudinal direction and 100 kN/m in transverse direction. The thickness of the sheet is 2mm.

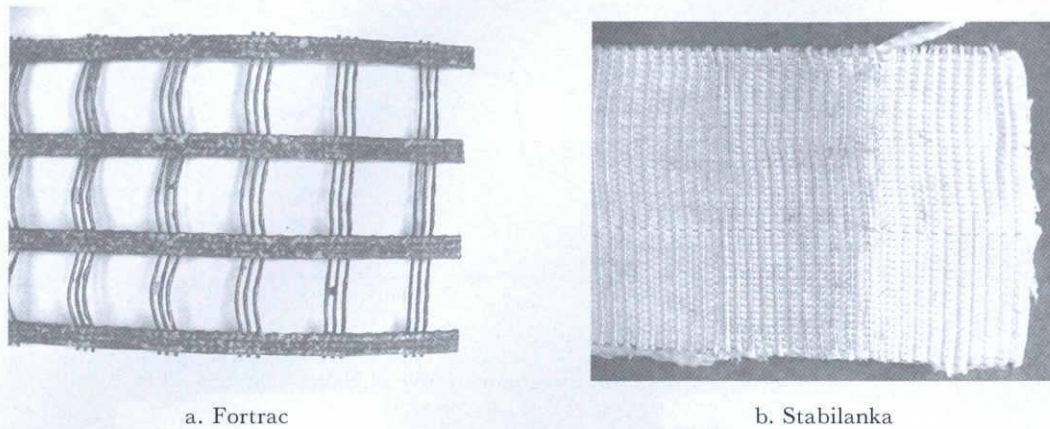


Fig. 3 Physical appearance of geosynthetic

2. EQUIPMENT AND METHODOLOGY

2.1 Major parts of the testing equipment

The apparatus used in this study is capable of performing both pullout and direct shear tests (Fig. 4). For convenience of the readers, the important components of the testing equipment are numbered numerically starting from top-left to right-down in the increasing way such as, the number from [1] to [12] where the number [1] is the pullout stress monitoring display, [2] is the normal stress reactor, [3] is the upper part of the pullout box, [4] is the electrically operated pullout jack, [5] is the pullout stress measuring device, [6] is the reinforcement clamping jack, [7] is the reinforcement, [8] is the clearance screw between the upper box and the reinforcement, [9] is the lower part of the pullout box, [10] is the horizontal displacement measuring dial gauge, [11] is the vertical displacement measuring dial gauge and [12] is the normal stress measuring dial gauge.

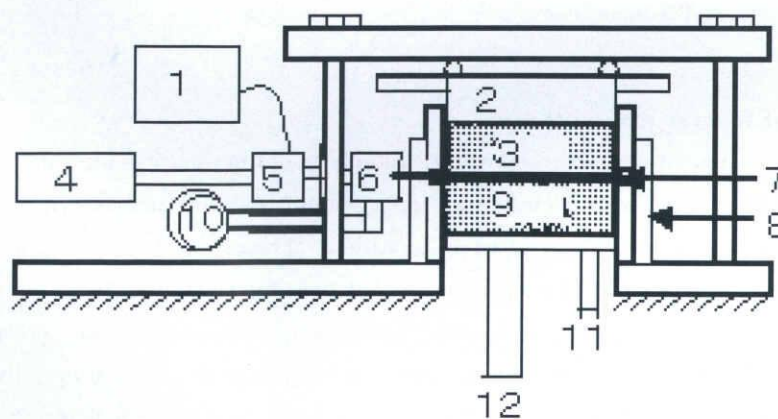


Fig. 4 Pullout and shear test apparatus

2.2 Outline of the testing equipment

Some important features incorporated in the testing equipment are the monitoring of soil dilatancy and the testing arrangement wherein the clamping system for pullout test is located outside the compacted soil to ease of clamping the reinforcement. The pullout box is a rectangular shape of size 150 mm in length,

100 mm in width and 100 mm in height. The box is divided into two parts namely lower and upper boxes, both are 50mm in depth. The apparatus is designed in such a way that the upper box can be separated from the lower box to ease in pouring the soil into the lower box as well as geosynthetics setting and clamping. The lower box is fixed while the upper box can be pushed forward relative to the lower box during shear testing. The friction between the upper box and the geosynthetics is eliminated with the help of the vertical screw those have been set at both sides of the upper box. The normal stress at the bottom surface of the lower box applied through the lower jack in the upward direction is balanced by the opposite stresses of the upper box. The stresses into the soil are uniformly distributed by adjusting the screw at the top surface of the upper box. The lower and upper boxes are set in such a way that there is no friction between the box wall and the geosynthetics. For the pullout test, the upper part is set to the lower part with clamping screw. It can be freed while performing the direct shear test. The upper box can then be pushed forward relative to the lower box. As for the instrumentations, the pullout/direct shear force can be measured by means of an electrical loading cell, which is set to a display panel. Front displacements, vertical displacements and the displacements along the reinforcement (for pullout test only) can be monitored using dial gages. The width of the geosynthetics was the same as that of the width of the pullout box (inner sides).

2.3 Method of testing

The geosynthetic was cut to obtain rectangular pieces of 200 mm by 100 mm in size. The specified lengths of the pieces were selected in order to facilitate ease of clamping with the pullout apparatus. The geosynthetic was clamped into the box in such a way that the embedded length of the geosynthetic is 150 mm in the loading direction and 100 mm in the transverse direction. Water was added gradually to the soil and mixed up to obtain desired water content uniformly throughout the soil and then it was poured into the bottom box. After embedding the geosynthetics on the soil poured in the lower part of the box, the upper part was fastened to the lower part and then additional soil was filled in the upper box. The tests were carried out in the way of pulling out the geosynthetic from the soil with constant speed of 1 mm/min by means of screw jack under electrically operated constant pressure. The pullout force was measured using a tension load cell with a least count of 5 N. The load cell was set between the geosynthetic and the clamping jack to facilitate direct load measurement on the cell avoiding any frictional discrepancy on the machine components. The displacements were measured at the front of the mesh by means of a dial gage with a least count of 0.001 mm. After each testing, the geosynthetic piece was removed and replaced with another one to account for the damages in the geosynthetic's texture that might have occurred as a result of previous test. The dilatancies were measured at the lower side of vertical load jack by means of a dial gage with a least count of 0.001 mm.

The soil was compacted in three layers for all the tests and thus obtained the same density of the soil for all the pullout tests. The tests were carried out with 14.63% water content of sandy soil and 26.54% water content of clayey soil whereas the optimum water contents were calculated as 15.3% and 27.0% for sandy and clayey soils, respectively.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Pullout behavior as stress-displacement relationships

The pullout behavior as stress-displacement relationships of the four categories such as fortirac in sandy and clayey soils, and stabilanka in sandy and clayey soils are plotted in Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7 and Fig. 8,

respectively.

3. 1. 1 Stress-displacement relationships for fortrac in sandy soil

The relationships between the pulling stress and the displacement of fortrac geosynthetic under normal stresses of 6 kN/m², 12 kN/m², 18 kN/m², 24 kN/m², 30 kN/m² and 36 kN/m² for sandy soil with water content of 14.63% are given in Fig. 5. It can be seen from this figure that the pullout stress is increasing linearly with the increase in displacement in the amount of about 12mm. After that, the pullout stress increases nonlinearly with the increase in displacement of about 16mm. The pullout stress fluctuates with displacement exceeding 16 mm and continues in the same fashion of up to 50 mm. This may be due to the variation of stress distribution along the reinforcement in the loading direction. Because of the rectangular cross section of the fortrac reinforcement, there might be an accumulation of some soils in the front side of the filament section which gives an increase in soil pressure and after accumulation of certain amount of soil i.e. while the accumulation exceeds the limit to cause failure, the pullout stress becomes decrease by slippage of the soil particles. As expected, for all the test results, the pullout resistance is more for higher normal stresses. It is noted here that most of the stress-displacement curves became horizontal or changed their upward trend to downward trend at pullout displacement of 15mm i.e. at 10% strain for most of the cases, indicating the ultimate pullout strengths of the stress-displacement curves. Therefore, the pullout displacement in the amount of 15mm is considered as the key distance for calculating the ultimate pullout strengths by taking account of the maximum cases of results reported in this paper. The ultimate pullout strengths for fortrac geosynthetic in sandy soil are calculated as 14.4 kN/m², 12.4 kN/m², 26.6 kN/m², 30.8 kN/m², 36.6 kN/m² and 58.4 kN/m² for normal stresses 6 kN/m², 12 kN/m², 18 kN/m², 24 kN/m², 30 kN/m² and 36 kN/m², respectively.

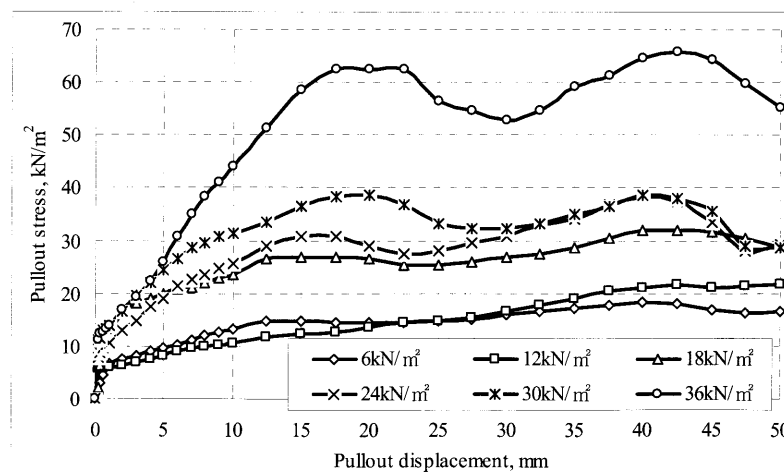


Fig. 5 Stress-displacement curve (fortrac, sand, $w=14.63\%$)

3. 1. 2 Stress-displacement relationships for fortrac in clayey soil

Fig. 6 indicates a typical stress-displacement relationship of the pullout tests for fortrac in clayey soil with 26.54% water content. An inspection of the plotted results of the stress-displacement relationships indicates that they are, in general, apparently bi-linear characteristics. However, a resemblance of linearity is seen for smaller part of the relationships between 0.0mm to 1.0mm displacement in which the pullout stress increases proportionately with the increase in displacement. The nonlinear range at the lower limit starts with displacement of nearly 2.0 mm and then gradually changing its direction to x-axis of up to 10.0 mm displacement. A greater part of linearity of the pullout stress can be taken from 12.0 mm

to 35.0 mm displacement and then it shows downward trend upto the displacement of 50 mm except for the lower normal stresses such as of 12 kN/m², 18 kN/m² and 24 kN/m², for which the stress-displacement curves slightly fluctuate and show upward trend upto the end of the test. Unlike the curves of sandy soil in Fig. 5, all the graphs of clayey soil are almost same trend owing to the effect of even distribution of stresses on the forttrac geosynthetic. It is noted here that the pullout stress-displacement curves under higher normal stresses are slightly upward trend for sandy soil (Fig. 5) whereas it is slightly downward trend for clayey soil (Fig. 6). This is thought to be the combined effect of forttrac geosynthetic and particles size of the soil. As compared to sandy soil, the clayey soil containing more amounts of smaller particles, and therefore, undergoes more deformation easily and thereby facilitates more compression especially under higher normal stresses. Moreover, the forttrac geosynthetic with transverse filament creates more accumulation of sandy soil due to its coarser particles than that of the clayey soil in front of the transverse strands and thus, showed more pullout stress at higher normal stresses. Similar to the previous case, the ultimate pullout strengths for clayey soil are recorded as 17.6 kN/m², 19.8 kN/m², 24.0 kN/m², 29.0 kN/m², 32.6 kN/m² and 34.0 kN/m² corresponding to normal stresses 6 kN/m², 12 kN/m², 18 kN/m², 24 kN/m², 30 kN/m² and 36 kN/m², respectively.

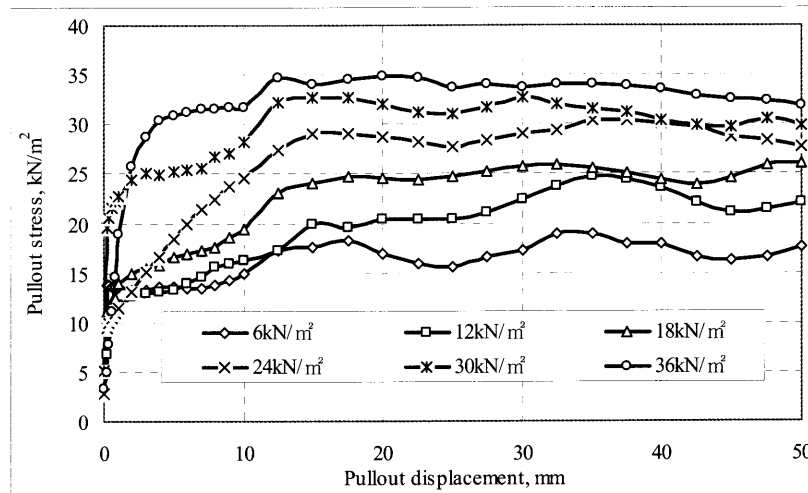


Fig. 6 Stress-displacement curve (forttrac, clay, $w=26.54\%$)

3. 1. 3 Stress-displacement relationships for stabilanka in sandy soil

The stress-displacement relationships of pullout tests for stabilanka under six normal stresses for sandy soil with water content of 14.63% are depicted in Fig. 7. All the six graphs belong to the same characteristic at the initial stage and can be taken in a group with the linear portion restricted to the displacement of about 3.0 mm. After that, all the curves become nonlinear with the pullout displacement of 4.0 mm to 10.0 mm. A greater part of linearity can be taken from 10.0 mm to 45.0 mm displacement for higher normal stresses such as 18 kN/m², 24 kN/m², 30 kN/m² and 36 kN/m². The fluctuating trend of the pullout stresses with the increase in pullout displacement for lower normal stresses such as 6 kN/m² and 12 kN/m² is clearly evident from this figure. This phenomenon mainly depends on the soil type and geosynthetic type. Unlike to the previous two cases, pullout stresses are almost smooth at higher normal stresses and fluctuates rapidly at lower normal stresses owing to more smoothing surface of stabilanka than that of the forttrac geosynthetic. The sandy soil with more coarse particles allowed a uniform distribution of stresses on the stabilanka geosynthetic with higher normal stresses. Similar to the previous two cases, the ultimate strengths vary apparently; they have values of 13.66 kN/m², 20.73 kN/m², 21.2 kN/m², 26.33 kN/m², 26.66 kN/m² and 29.53 kN/m² for the six applied normal stresses.

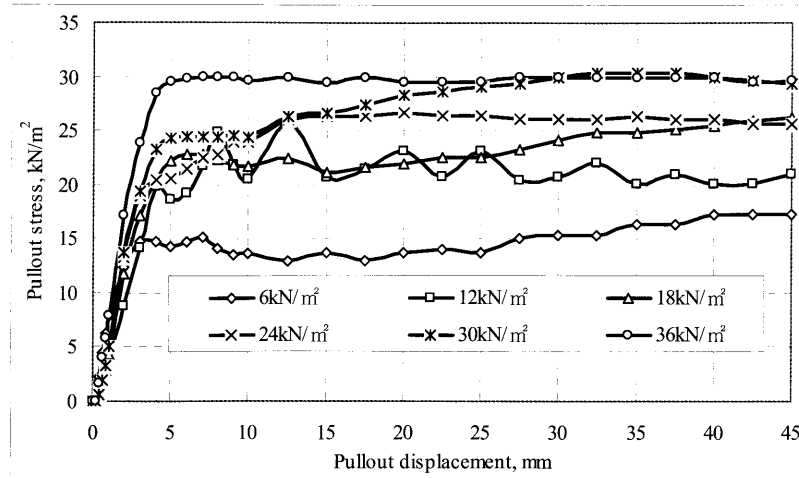


Fig. 7 Stress-displacement curve (stabilanka, sand, $w = 14.63\%$)

3. 1. 4 Stress-displacement relationships for stabilanka in clayey soil

Fig. 8 depicts the stress-displacement relationships of pullout tests for the stabilanka geosynthetic with clayey soil having 26.54% water content. It can be observed from this figure that the applied pullout stress increases proportionately with the increase in displacement of about 4.0 mm. After the displacement of about 4.0 mm, it is clearly evident that the pullout stresses are getting upswing and downswing simultaneously for any normal stress condition. Obviously, this oscillation depends on the finer particles of soil as well as surface roughness of the stabilanka. Unlike to all the previous cases, the stabilanka geosynthetic with its rough surface and smaller grid than the forttrac allows clay particles to accumulate and release simultaneously on its surface with the increase in pullout displacement causing fluctuation of the pullout stresses under any normal loading condition. Due to the more compressive feature of clayey soil than that of the sandy soil, the clayey soil showed its oscillating characteristics even with the higher normal stress condition. The ultimate pullout stresses are found as 30 kN/m², 34.73 kN/m², 38.4 kN/m², 46.33 kN/m², 48.0 kN/m² and 61.13 kN/m² corresponding to the normal stresses 6 kN/m², 12 kN/m², 18 kN/m², 24 kN/m², 30 kN/m² and 36 kN/m², respectively.

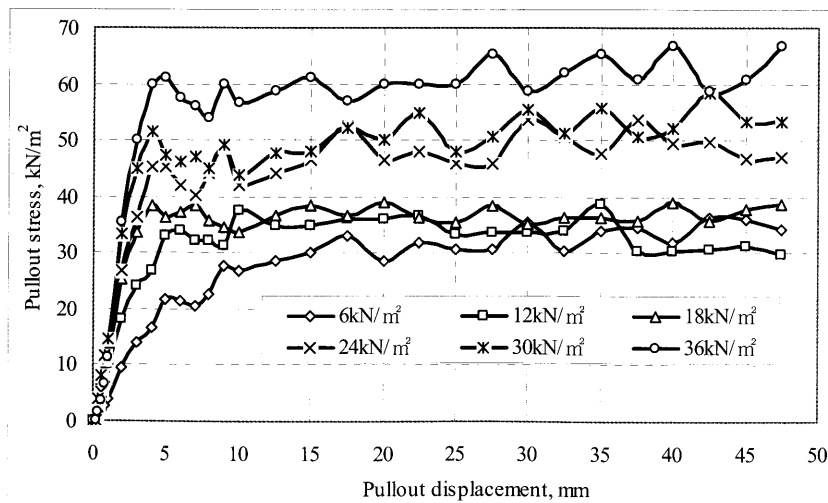


Fig. 8 Stress-displacement curve (stabilanka, clay $w = 26.54\%$)

3. 1. 5 Pullout behavior as ultimate strengths

For the sake of clear perception of the bearing capacity of reinforced soil under pullout test, the ultimate pullout strengths corresponding to the different overburden pressures (normal stresses) of pullout test are plotted as bar diagram in Fig. 9. It is evident that the ultimate pullout strengths are increasing with the increase in overburden pressure containing any type of soil and geosynthetic. Fortrac geosynthetic shows more pullout stress in sandy soil whereas stabilanka geosynthetic has higher pullout stress in clayey soil under higher normal stresses. This may be the effect of surface resistance as well as cohesion of the soil and the geosynthetic. The surface resistance of forttrac geosynthetic is more in sandy soil and cohesion of stabilanka is comparatively more for clayey soil. A slight scatter is observed in the test results that the ultimate pullout strength of stabilanka in sandy soil with 12 kN/m² normal stress is more than that of the forttrac geosynthetic in clayey soil. The ultimate pullout strengths of forttrac under normal stresses 6 kN/m² and 12 kN/m² are higher values in clayey soil than in sandy soil. The other features are followed the usual trends of the ultimate pullout strengths.

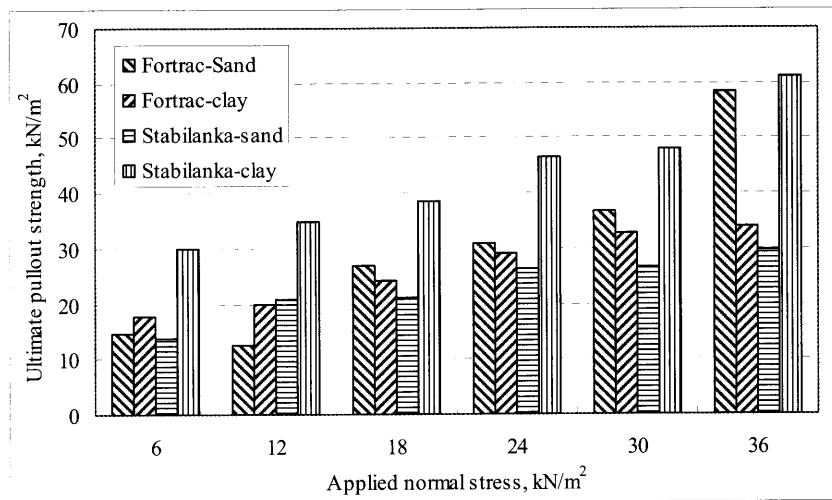


Fig. 9 Comparison of ultimate strengths of pullout tests

3. 1. 6 Regression analysis of the ultimate strengths

For more clarification of ultimate strengths among the four types of combinations reported in this paper, least square linear regression lines of the ultimate pullout strengths corresponding to applied normal stress are depicted in Fig. 10. This figure indicates the applied normal stress as the controlled variable as given in abscissa and the ultimate pullout strengths as the random variable as given in ordinate. As it can be observed from this figure that the rate of increase of the ultimate pullout strength for forttrac geosynthetic in sandy soil is more than that of the other cases with the increase in overburden pressure i.e. applied normal stress. This feature is mainly attributed owing to the more frictional resistance of the sandy soil with larger grid size of forttrac than that of the other cases. Because of the larger grid of forttrac, the soil particles interlock into the grid and possess higher surface traction and thus, it gives more frictional resistances as compared to others. Clayey soil having finer particles may have lower frictional resistances even they get interlock into the grid. Though the rate of increase of stabilanka in clayey soil is smaller than that of the forttrac in sandy soil, it possesses highest ultimate strengths among all the categories. This may be depends on the bonding phenomena between clayey soil and stabilanka. For this case, the surface area of stabilanka is too high as compared to forttrac and thereby facilitating more bonding properties of stabilanka in clayey soil. It is noted here that the R-square or the coefficient of determination of the regression analysis has the values of 0.886, 0.9789, 0.9181 and 0.9481 for the cases of forttrac-sand (f_s),

fortrac-clay (f_c), stabilanka-sand (ss) and stabilanka-clay (sc), respectively, i.e. the R-square value for all the cases close to 1.0 indicates that the tests data are fitted well and we have accounted for almost all of the variability with the variables specified in this paper.

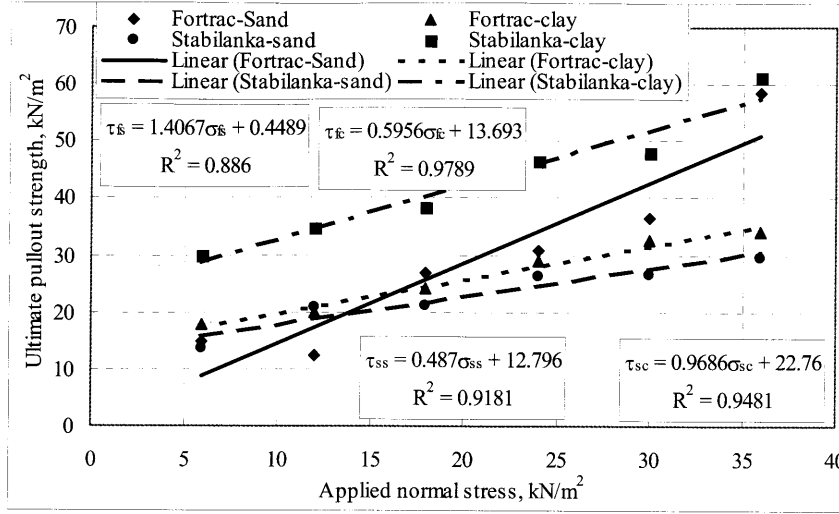


Fig. 10 Linearized curves of ultimate strengths

3. 1. 7 Pullout behavior as interaction resistances

In calculating the interaction resistances under pullout test, it is necessary to clarify the common method of finding out these important parameters. In general, the methods of Failure Envelope and Mohr-Circle are well known in determination of cohesion and internal frictional resistances. In the first method, for obtaining a failure envelope, a number of identical specimens are tested under different normal stress. The shear stress required to cause failure is determined for each normal stress. The failure envelope is obtained by plotting the points corresponding to the shear strength at different normal stresses and joining them by a straight line. The inclination of the failure envelope to the horizontal gives the angle of the shearing resistances and its intercept on the vertical axis is equal to the cohesion intercept. The Mohr-Circle method is needed when the stress on failure planes are not directly known. In the present research, the pullout test is carried out by pulling out the reinforcement from the soil under different normal stresses. The pullout stresses acted on both sides of reinforcement are measured directly and plotted in Fig. 10 with the applied normal stresses as abscissa and pullout out stresses as ordinate. The least square linear lines obtained by the regression analysis for the four categories are similar to that of the method of failure envelope for direct shear test but having the resistance at two surfaces of the reinforcements. Two surfaces of reinforcement means two times of pullout stresses as compared to direct shear test which gives double intercept at y-axis but there is no effect on the angle of the linear lines because all the normal stresses will increase in the same fashion when the resistance acted on two surfaces. These points should be taken into account in calculating the cohesion and internal frictional resistances under pullout test.

The following equations are obtained as a result of pullout tests for the fortrac-sand (f_s), fortrac-clay (f_c), stabilanka-sand (ss) and stabilanka-clay (sc), respectively from the straight lines as plotted in Fig. 10.

$$\tau_{fs} = 1.4067 \sigma_{fs} + 0.4489 \quad \text{--- (1)}$$

$$\tau_{fc} = 0.5956 \sigma_{fc} + 13.693 \quad \text{--- (2)}$$

$$\tau_{ss} = 0.4870 \sigma_{ss} + 12.796 \quad \text{--- (3)}$$

$$\tau_{sc} = 0.9686 \sigma_{sc} + 22.760 \quad \text{--- (4)}$$

Where, τ is the shear resistance of reinforced soil on both surface of reinforcement under pullout test in kN/m^2 and σ is the applied normal stress (overburden pressure) on reinforcement in kN/m^2 . Therefore, the angles of internal friction are calculated as 55.42, 25.97, 30.78 and 44.09 degrees. The values of cohesion as given in the above equations are obtained as 0.4489 kN/m^2 , 13.693 kN/m^2 , 12.796 kN/m^2 and 22.76 kN/m^2 , respectively.

4. CONCLUSION

In designing earth structures where clay particles are more, utilization of stabilanka geosynthetic may be recommended for more improvement of strengths and stability. Fortrac geosynthetic may be recommended in designing reinforced soil structures with sandy soil. The design cohesion values may be taken as the half of the pullout cohesion values where the soil structures tends to slip over the geosynthetic like as a direct shear failure on one surface of the geosynthetic. Equations for strength parameters of reinforced soil such as cohesion and internal friction of the individual categories presented in this paper may be useful to aid in design of reinforced soil structures.

REFERENCES

- WILLIAMS, N. D. and HOULIHAN, M.R. (1987): Evaluation of interface friction properties between geosynthetics and soils, *Geosynthetics, New Orleans*, 616-627.
- MADHAB, M. R. et al. (1998): A theoretical model for the pullout response of geosynthetic reinforcement, *Geosynthetic International*, 5 (4), 399-424.
- ZANZINGER, H et al. (2001): Practical experience in small-scale pullout test, *Landmarks in Earth Reinforcement*, 1, 177-182.
- KUWANO, J. et al. (1999): Mechanical properties and pullout characteristics of geogrids used in Japan, *Geosynthetics Engineering Journal*, 14, 195-204.
- IZAWA, J. et al. (2001): Effects of geogrid properties on pullout resistance, *Landmarks in Earth Reinforcement*, 1: 55-60.
- MAHMOOD, A. A. et al. (2000): Studies on geotextiles/soil interface shear behavior, *Electronic Journal of Geotechnical Engineering*, 13: 1-14.
- GHIONNA, V. N. et al. (2001): Experimental evaluation of the factors affecting pullout test results on geogrids, *Landmarks in Earth Reinforcement*, 1: 31-36.