

研究ノート

## レーザービームで細胞の個性を探る

松永幸大\*

Analyses of individual cells with laser technology

Key Words : laserbeam, microdissection, optical tweezers

### 1. はじめに

17世紀後半、オランダのレーベンフックが単眼の顕微鏡を発明して以来、顕微鏡下に広がるミクロの世界は研究者の心を虜にしてきた。今まさに顕微鏡下で観察している細胞1個、細胞内小器官1個さらには染色体1本を単離して分子レベルで解析したい。それは多くの科学者が描いてきた夢である。この夢はレーザービームを用いることによって20世紀末に実現した。顕微鏡下で観察している生体物質をレーザービームで非接触的に回収することで、個々の細胞や微細領域の特性を生物工学的に解析することが可能となった。本稿では、レーザービームを活用して顕微鏡で観察している生体物質を単離回収し解析する顕微解剖工学の最近の成果を紹介する。

### 2. レーザービームによる染色体マイクロダイセクション

顕微鏡下で形態学的に判別した特定の染色体や分染した染色体領域を回収できれば、直接的に遺伝子や染色体特異的なDNAを単離することができる。このため、遺伝子が整然と並ぶ染色体は古くからマイクロダイセクションのターゲットにされてきた。マイクロダイセクションされた染色体断片はPCRで増幅することが可能であり、FISH(fluorescence in situ hybridization)解析や染色体ペインティングのプロー

ブ、染色体領域特異的ライブラリーの構築に用いることができる。従来の染色体マイクロダイセクション法は、細いガラス管で作製したマイクロピペットを装着したマイクロマニピレーターで染色体断片をかきとってくる方法であった。顕微鏡下でマイクロピペットを扱うことは熟練と忍耐を要する作業である。そこで発想を転換し、回収する特定染色体領域以外の領域をすべてレーザービームで昇華するレーザービームマイクロダイセクションシステムを構築した<sup>1)</sup>。このシステムではモニターを見ながらレーザービームを操作し染色体の特定領域を残すことができるので操作は簡単である。筆者らはUVレーザーマイクロビーム(波長337nm)と顕微鏡ステージを自動的に制御するソフトウェアLaser Sweeperを開発し、雌雄異株植物ヒロハノマンテマ(*Silene latifolia*)の性染色体であるY染色体1本だけを回収した(図1)。degenerate oligonucleotide primed PCR(DOP-PCR)を用いてY染色体DNAを増幅し、増幅産物を

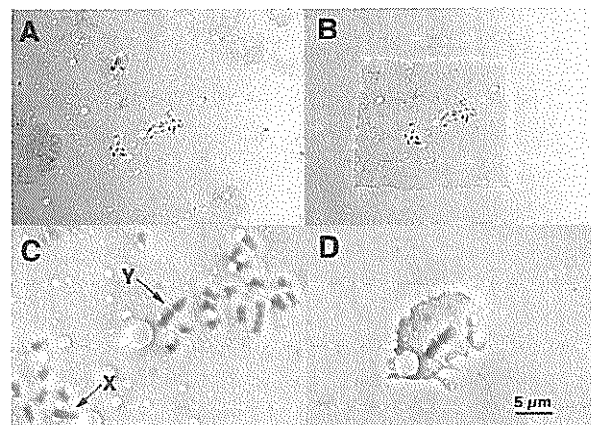


図1 レーザーマイクロダイセクションによるY染色体の単離  
Aの中にある染色体以外の領域をLaser Sweeperで自動的に昇華した(B)。高倍率でCの中のY染色体以外のX染色体と常染色体を昇華した(D)。



\* Sachihiko MATSUNAGA  
1969年9月生  
1998年東京大学大学院・理学系研究科・  
生物科学専攻博士課程修了  
現在、大阪大学大学院・工学研究科・  
応用生物学専攻、講師、理学博士、  
バイオ工学、顕微解剖工学  
TEL 06-6879-4216  
FAX 06-6879-7742  
E-Mail sachi@bio.eng.osaka-u.ac.jp

FISH解析や染色体ライブラリー構築に用いた。このY染色体ライブラリーからはサブテロメア特異的配列が単離され、FISH解析に活用されている<sup>2)</sup>。このように、可視化した染色体から素早く目的遺伝子やDNA断片を回収することが染色体マイクロダイセクションにより可能になったと言える。

### 3. Laser Pressure Catapulting による単花粉解析 (Single Pollen Typing)

顕微解剖学的手法における最重要課題は、レーザービームで切除した領域をコンタミネーションなく回収する技術の開発である。マイクロレベルの生体物質回収を徹速にかつ正確に実現するシステムとして Laser microbeam microdissection (LMM法) と Laser pressure catapulting (LPC法) をドイツの Karin Schütze博士と共に開発した<sup>3)</sup>。LMM法とLPC法の模式図を図2に示した。ポリリジンコートしたポリエチレンメンブレン上に生物組織を固定した後、カバーガラス上に逆さに貼り付け、回収細胞の周囲をメンブレンごとUVレーザーマイクロビームでマイクロダイセクションする。その上に、内側の壁面にミネラルオイルを塗ったPCRチューブキャップを載せる。次に、ビームの焦点位置を少し下げレーザー出力最大でビームを発射すると、光圧力でメンブレンは打ち上がり、PCRチューブキャップ内のミネラルオイルに付着する。このあと、チューブを遠心してPCR解析に用いることが出来る。筆者らはこの方法を利用し、ヒロハノマンテマの花粉一個のDNA解析を行った。花粉は強固な花粉壁に囲まれ花粉内の細胞質を抽出することは難しい。そこで、まずUVレーザーマイクロビームで花粉壁に穴を開けた(レーザードリリング)(図2)。次に花粉周囲の

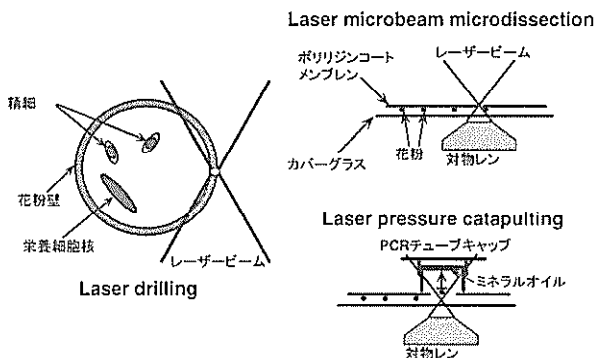


図2 レーザーを用いた花粉の顕微解剖学的解析

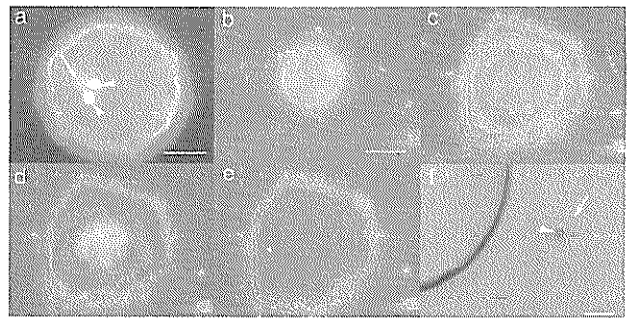


図3 LPC法による花粉1個の単離

a: 蛍光染色した花粉. 矢印が栄養細胞核, 矢頭が精細胞核. バーは10 $\mu$ m. b: ポリリジンコートメンブレン上の花粉. バーは20 $\mu$ m. c, d: LMM法. e: LPC後に残ったメンブレン. f: LPCによりPCRチューブキャップ内に捕捉された花粉(矢頭)とメンブレン(矢印).

メンブレンをマイクロダイセクションし、花粉付着メンブレンをLPC法で回収した。実際に、ヒロハノマンテマの花粉一個をLMM法とLPC法を用いて、PCRチューブキャップ内に回収した写真を図3に示した。回収した花粉をproteinase K処理してタンパク質を分解した後、improved primer-extension preamplification PCR (I-PEP-PCR) で花粉のゲノムDNA全体をランダムに増幅した。このI-PEP-PCR産物から雄性生殖器官特異的遺伝子 *MROS1* と *MROS3* の増幅を試みた<sup>4), 5)</sup>。その結果、一個の花粉由来のDNAからハプロイドゲノム中にシングルコピーで存在している *MROS1* の検出に成功した。また、*MROS3* の二つのクローンはX染色体と常染色体の異なる遺伝子座を持つことが明らかになった。後に染色体フローソーティング解析を行い、上記の single pollen typing解析結果が正しいことを証明している<sup>6)</sup>。さらに、Y染色体マーカーの増幅を調べたところ、約半分の花粉で検出できた。ヒロハノマンテマの性比は1:1であり、花粉はX染色体かY染色体を含むハプロイドのゲノムを持つことから、花粉の雌雄判定ができたことになる。精子の雌雄判定の報告はすでであったが、植物の花粉の雌雄判定法の確立は最初の報告となった<sup>3)</sup>。このレーザー技術を用いた単花粉のDNAタイピングは、遺伝的交配を伴わない組換え率の検定や遺伝子コピー数の算定などに応用可能と考えられる。

### 4. 光ピンセットによる単細胞解析

光ピンセットはレーザービームを顕微鏡の対物レ

レンズを通して対象物に集光させることにより焦点付近に微小な物体を捕捉する方法である。光ピンセットによって直接捕捉可能な生物試料としてはウィルス、細菌、細胞内小器官、染色体、細胞骨格などがある。光ピンセットには生物試料の破壊を避けるために近赤外レーザービーム(波長1064nm)を発射するYAGレーザーが用いられる。物体に近赤外光が集光したとき、物体を透過した光の屈折の反作用力は物体を光軸上に引き上げる方向に働き、反射光と重力は下向きの力を及ぼす。この二つの力が釣り合った時、物体がレーザー光によって保持される。そこで筆者らはこの光ピンセット法を用いて単細胞を敏速に回収するシステムを開発した。カバーガラスを組み合わせた単細胞回収用マイクロチャンバーを作成して、拡散速度よりも早い速度で細胞を光ピンセットで移動させることでコンタミネーションのない単細胞単離を実現化した(図4)。実際に単離したクラミドモナス単一個体から葉緑体DNAを抽出して、母性遺伝の機構により片親由来の葉緑体DNAが10分以内に選択的に消化されることを証明した<sup>7)</sup>。

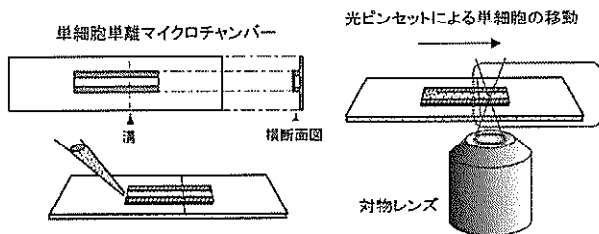


図4 光ピンセットによる単細胞単離  
チャンバー内を溶液で満たした後、チャンバーの端に細胞培養液を注入する。拡散速度よりも速く反対側の端に光ピンセットで目的の細胞を移動させる。移動後、底面カバーガラスに付けた溝部分に力を加えチャンバーを切断後、片側のチャンバーのみサンプルチューブに回収して解析する。

## 5. おわりに

従来の分子生物学、生化学は、細胞や生物を集団

として解析し、その集団内の平均値を結果として扱うことで発展してきた。また、従来の顕微鏡技術は、組織や細胞を形態学的に観察しても、実際に生体物質を取り出して解析することは難しかった。しかし、本稿で述べたように最近のレーザーマイクロビーム技術の発展により、個々の細胞や染色体の特性を解析できるようになった。我々人間社会を見ても一つの組織のなかには実に様々な個性を持った人間がいる。同じように細胞集団内で個々の細胞は実に多様な振る舞いをして「細胞の個性」を発揮している。この「細胞の個性」を発見する手段として、レーザービームを利用した顕微解剖工学的手法は今後益々活用されていくことが期待される。

## 参考文献

- 1) Matsunaga, S., Kawano, S., Michimoto, T., Higashiyama, T., Nakao, S., Sakai, A. and Kuroiwa, T. (1999) *Plant Cell Physiol.* 40, 60-68.
- 2) Kazama, Y., Sugiyama, R., Matsunaga, S., Shibata, F., Uchida, W., Hizume, M., Kawano, S. (2003) *J. Plant Res.* 116, 317-326.
- 3) Matsunaga, S., Schutze, K., Donnison I., Grant S. R., Kuroiwa T. and Kawano S. (1999) *Plant J.* 20, 371-378.
- 4) Matsunaga, S., Kawano, S., Takano, H., Uchida, H., Sakai, A. and Kuroiwa, T. (1996) *Plant J.* 10, 679-689.
- 5) Matsunaga, S., Kawano, S. and Kuroiwa, T. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38, 499-502.
- 6) Kejnovsky, E., Vrana, J., Matsunaga, S., Soucek, P., Siroky, J., Dolezel, J. and Vyskot, B. (2001) *Genetics* 158, 1269-77.
- 7) Nishimura, Y., Misumi, O., Matsunaga, S., Higashiyama, T., Yokota, A. and Kuroiwa, T. (1999) *Proc. Nat. Aca. Sci. USA.* 96, 12577-12582.

