在研究を続行している。

*

以上、従来の試験管ベースの手法に代わる、物理的手段による DNA のハンドリングについて紹介した。そのキーワードは、任意の分子上の任意の位置へのアクセスを可能にする「空間分解能」であろう。近年、これを実現するため、蛍光染色をはじめとする可視化技術や、微細加工・マイクロマニピュレーション技術などが急速に発達している。分子ハンドリングが、DNA の解析・分子手術などの工学的応用や、DNA-酵素間の相互作用など基礎研究を通じ、新しい生化学への道を開くことを期待して本稿を閉じたい。

謝辞：本研究は、(株)アドバンス黒澤修氏、京都大学加畑博幸博士、理化学研究所山本貴富喜博士、国立遺伝学研究所嶋本伸雄教授、成蹊大学鈴木誠一助教授、東京大学畑村洋太郎教授・中尾政之助教授らとの共同研究に基づくものです。ここに謝意を表します。また、文部省科学研究費、NEDO (新規産業創造型提案公募事業 97S07-005)、(株)アドバンス、豊田理化学研究所の御支援に感謝します。

文献

- 1) M. Washizu & O. Kurosawa : *IEEE Trans. Ind. Appl.*, **26**, 1165 (1990).
- 2) M. Washizu, O. Kurosawa, I. Arai, S. Suzuki & N. Shimamoto : *IEEE Trans. Ind. Appl.*, **31**, 447 (1995).
- 3) H. Kabata, O. Kurosawa, I. Arai, M. Washizu, S.A. Margason, R.E. Glass & N. Shimamoto : *Science*, **262**, 1561 (1993).
- 4) T. Yamamoto, O. Kurosawa, H. Kabata, N. Shimamoto & M. Washizu : Conference Record of '98 IEEE/IAS annual meeting, 44-03, 1998, 1.

顕微解剖により細胞を分子細胞生物学的に見る

松永幸大^{*1}, 黒岩常祥^{*2}

^{*1} 東京大学大学院新領域創成科学研究科, ^{*2} 東京大学大学院理学系研究科

顕微鏡を覗いたときに広がるミクロの世界、そこに織りなす組織や細胞の形態の美しさにはいつも心奪われる。「今まさに顕微鏡下で観察している細胞1個やオルガネラ1個を、実際にとってきて分子レベルで解析できたら、それは多くの生物学者が夢に描いてきたことである。この夢がレーザービームを用いることによって現実化しようとしている。顕微鏡下で観察している個々の細胞や微細領域を、レーザービームで非接触的に切断し回収することにより、それらの特性を分子細胞生物学的に解析することが可能となった。本稿では、レーザービームを使った「見たものを切り出し解析する」顕微分子細胞生物学の最近の知見を紹介する。

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できる特定の染色体や、分染した特定領域を回収できれば、直接遺伝子や染色体特異的 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。実際に、マイクロダイセクションされた染色体断片を PCR で増幅し、FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 解析や染色体ペインティングのプロブ、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。従来から用いられてきた染色体断片回収方法は、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ュレーターで、染色体断片をかきとってくるものであった⁽¹⁾。

しかし、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ダイセクションシステムが構築され、ヒトや植物の染色体特異的部位回収に用いられるようになった^(2,3)。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。筆者らも、UV レーザーマイクロビームと顕微鏡ステージを自動的

図 1 ■ UV レーザーマイクロビームを使用した染色体のマイクロダイセクション

Y 染色体以外の X 染色体と常染色体をレーザーマイクロビームで昇華した(b)。バーは 10 μm を示す。

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 Y 染色体だけを回収した(図 1)。トポイソメラーゼ I 処理で染色体高次構造をほどこいた後、DOP-PCR(degenerated oligonucleotide-primed PCR)を用いて Y 染色体 DNA を増幅し、増幅産物を FISH 解析や染色体ライブラリー構築に用いた⁽⁴⁾。今後もレーザービームを用いた手軽な染色体マイクロダイセクション法は、個々の染色体や染色体特定領域回収に威力を発揮していくであろう。

Laser Capture Microdissection による癌細胞群の単離

現在、レーザービームによるマイクロダイセクションは、癌細胞の分子細胞学的解析において最も活躍している。特に、1996 年にアメリカの NIH で開発された Laser Capture Microdissection(LCM 法)により、飛躍的に組織切片内での癌細胞群の回収が進んだ⁽⁵⁾。

LCM の原理を簡単に説明する(図 2)。約 5 μm の組

図 2 ■ LCM(laser capture microdissection)法の模式図

レーザービームを照射後、矢印方向にチューブキャップを引き上げる。

織切片上に、熱可塑性の EVA(ethylene vinyl acetate)で下方部分をコートしたチューブのキャップをかぶせる。顕微鏡で回収したい細胞を見つけ、その細胞にキャップ上からカーボンレーザービームを照射する。すると、レーザービームの熱で EVA が溶解し、目的細胞に付着する。そして、キャップを持ち上げると、目的細胞のみが周囲の切片から剥がれ回収できる。一つのチューブキャップと一枚の切片から、最大 6,000 個までの細胞を回収でき、チューブ内で EVA から溶出された細胞群は、PCR を用いた DNA 解析の他、RNA やタンパク質を抽出するなど発現解析にも用いることができる。

アメリカの Cancer Genome Anatomy Project では、LCM 法により単離された各組織の癌細胞群から cDNA ライブラリーが作製されている。実際に、LCM 法により単離された前立腺癌細胞群から cDNA ライブラリーを作製し、EST(expressed sequence tag)解析を行なったところ、3 つの新規の前立腺癌細胞特異的発現遺伝子が発見された⁽⁶⁾。また、LCM 法で大量に単離された癌細胞は、発現タンパク質の比較のためにタンパク質 2 次元電気泳動解析、突然変異部位検出のためのオリゴヌクレオチドアレイの作製、遺伝子発現比較のための cDNA マイクロアレイ作製に用いられている⁽⁷⁾。LCM 装置はアメリカの病理学や組織学の研究室を中心に急速に普及しており、今後癌細胞の解析にとどまらず、様々な分野

図 3 ■ レーザーマイクロビームを使用した人工授精

で応用されていくに違いない。

マイクロレーザービームを用いた人工授精

レーザービームの中でも、窒素レーザーから照射される UV レーザーマイクロビームは、高エネルギーかつ焦点直径が小さいため「マイクロメス」としての応用範囲が広いことが知られている。1994 年にドイツで、マイクロビームを倒立顕微鏡に導入した、PALM レーザーマイクロビームシステム (PALM システム) が開発された⁽⁸⁾。この装置には、波長 337 nm の UV マイクロレーザービームを発射する窒素レーザーの他に、光ピンセットとして利用する波長 1,064 nm の IR (infrared) レーザーマイクロビームを照射できる YAG (yttrium aluminum garnet) レーザーも搭載されており、同一光路で同時使用が可能である。この利点を活かしてドイツでは、ヒトの顕微鏡授精に利用されている⁽⁹⁾。

まず、卵の受精膜に UV レーザーマイクロビームで穴を開ける (図 3-a)。次に、精子を IR レーザーマイクロビームで捕捉し、卵の穴付近に移動させる (図 3-b)。UV レーザーマイクロビームで鞭毛を切断後、卵の中へと導入する (図 3-c)。この人工授精法で受精した卵は母親の胎内に戻され、実際に健康な子供が何人も誕生している⁽¹⁰⁾。筆者らの研究室でも日本で初めて PALM システムを導入し、真正粘菌のミトコンドリアの解析を行ない、わずか 9 個のミトコンドリアから PCR により DNA を増幅することが可能であることを示した⁽¹¹⁾。また最近、緑藻クラミドモナスを光ピンセットで 1 個体ずつ単離し、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示した⁽¹²⁾。

Lase Pressure Catapulting による花粉 1 個の雌雄判定

1998 年にはさらに、PALM システムを用いた細胞回

図 4 ■ UV レーザーマイクロビームを使用した花粉単離の模式図

a: レーザードリルで花粉壁に穴を開ける, b: LMM 法を用いて花粉周囲のメンブレンを切る, c: LPC 法で花粉付着メンブレンを打ち上げる。

収法の改良が進み、Laser Microbeam Microdissection (LMM 法) と Laser Pressure Catapulting (LPC 法) が

図 5 ■ UV レーザーマイクロビームによる花粉単離の実際

a: ヒロハノマンテマの花粉をメンブレンとともに LMM 法で切り出す。バーは 20 μm 。b: LPC 後の残ったメンブレン。c: LPC 法により PCR チューブキャップのミネラルオイル上に付着した花粉(矢頭)とメンブレン(矢印)。バーは 100 μm 。

開発された。LMM 法と LPC 法の模式図を図 4 に示した。

材料をポリリジンコートしたポリエチレンメンブレン上に作製後、カバーガラス上に逆さに貼り付け、目的細胞の周囲をメンブレンごと UV レーザーマイクロダイセクションする(図 4-b)。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(図 4-c)。この後、チューブを遠心して PCR 解析に用いることができる。実際に、上皮性悪性腫瘍切片から LPC 法で個々の細胞を回収し、1 個の細胞から RT-PCR により癌遺伝子 *c-Ki-ras2* の点突然変異部位の解析を行ない、変異の確認に成功した⁽¹³⁾。

筆者らはこの方法を改良し、ヒロハノマンテマの花粉 1 個の DNA 解析を行なった。まず花粉内部から細胞核を出しやすくするために、回収前に UV レーザーマイクロビームで花粉壁に穴を開けた(レーザードリル)(図 4-a)。次に花粉周囲の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 1 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 5 に示した。回収した花粉をプロテイナーゼ K 処理した後、I-PEP-PCR (improved primer-extension-preamplification PCR) で花粉のゲノム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^(14,15)。その結果、1 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 2 つのクローンは、異なる遺伝子座由来であることを示した。さらに Y 染色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もつことから、花粉の雌雄判定ができたことになる⁽¹⁶⁾。このレーザー技術で単離した個々の花粉を用いた 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。

*

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、従来の顕微鏡観察法では、組織や細胞を形態学的に観察できても、その後に実際に対象を取り出して、分子生物学的手法で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、組織の中の個々の細胞、さらには細胞の中の個々の染色体の特異的部位や細胞内小器官も分子生物学的手法で解析できるようになった。我々人間社会を見ても、一つの組織の中には実に様々な個性をもった人間がいる。生物の一つの組織においても、個々の細胞は実に多様な振る舞いをしている。「細胞の個性」を発見する手段として、レーザーマイクロビームを使用したマイクロダイセクションは、今後ますます活用されていくであろう。

文献

- 1) 松永幸大: 遺伝, 51, 37 (1997).
- 2) S. Hadano, M. Watanabe, H. Yokoi, M. Kogi, I. Kondo, H. Tsuchiya, I. Kanazawa, K. Wakasa & J.-E. Ikeda: *Genomics*, 11, 364 (1991).
- 3) K. Fukui, M. Minezawa, Y. Kamisugi, M. Ishikawa, N. Ohmido, T. Yanagisawa, M. Fujishita & F. Sakai: *Theor. Appl. Genet.*, 84, 787 (1992).
- 4) S. Matsunaga, S. Kawano, T. Michimoto, T. Higashiyama, S. Nakao, A. Sakai & T. Kuroiwa: *Plant Cell Physiol.*, 40, 60 (1999).

- 5) M.R. Emmert-Buck, R.F. Bonner, P.D. Smith, R.F. Chuaqui, Z. Zhuang, S.R. Goldstein, R.A. Weiss & L.A. Liotta : *Science*, **274**, 998 (1996).
- 6) G. Vasmatazis, M. Essand, U. Brinkmann, B. Lee & I. Pastan : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 300 (1998).
- 7) N.L. Simone, R.F. Bonner, J.W. Gillespie, M.R. Emmert-Buck & L.A. Liotta : *Trends Genet.*, **14**, 272 (1998).
- 8) K. Schütze & A. Clement-Segelwald : *Nature*, **368**, 667 (1994).
- 9) K. Schütze, A. Clement-Segelwald & A. Ashkin : *Fertil. Steril.*, **61**, 783 (1994).
- 10) S. Amtinori, H.A. Selman, B. Caffa, C. Panci, G.L. Dani & C. Varsaci : *Hum. Reprod.*, **11**, 2488 (1996).
- 11) T. Kuroiwa, K. Ishibashi, H. Takano, T. Higashiyama, Y. Nishimura, N. Sasaki & S. Matsunaga : *Protoplasma*, **194**, 275 (1996).
- 12) Y. Nishimura, O. Misumi, S. Matsunaga, T. Higashiyama, A. Yokota & T. Kuroiwa : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12577 (1999).
- 13) K. Schütze & G. Lahr : *Nature Biotech.*, **16**, 131 (1998).
- 14) S. Matsunaga, S. Kawano & T. Kuroiwa : *Plant Cell Physiol.*, **38**, 499 (1997).
- 15) S. Matsunaga, S. Kawano, H. Takano, H. Uchida, A. Sakai & T. Kuroiwa : *Plant J.*, **10**, 679 (1996).
- 16) S. Matsunaga, K. Schütze, I.S. Donnison, S.R. Grant, T. Kuroiwa & S. Kawano : *Plant J.*, **20**, 371 (1999).

プロフィール

高橋 秀実 (Hidemi Takahashi) 昭和28年8月13日生<略歴>1980年日本医科大学医学部医学科卒業/同年同大学付属病院第三内科学教室入局/1985年同大学大学院博士課程修了(医博)/1989年同大学微生物学免疫学教室助手/1994年同大学付属病院第三内科学兼任/1997年同大学微生物学免疫学教室教授/1998年京都大学ウイルス研究所客員教授, 現在にいたる。この間, 1987~89年米国立癌研究所客員研究員<研究テーマと抱負>①細胞性免疫応答の解析と賦活, ②微生物と宿主の攻防, ワクチンの開発, ③自然界由来の天然物による免疫応答の制御<趣味>旅, 音楽鑑賞

中坪 信昭 (Nobuaki Nakatsubo) 昭和37年9月6日生<略歴>昭和60年東京大学工学部計数工学科卒業/62年同大学大学院工学系研究科修士課程修了/同年三共(株)入社, 現在にいたる。この間, 昭和63~平成2年大阪大学大学院医学研究科修士課程, 平成4~5年獨協医科大学生理学第二講座研究員, 医博<研究テーマと抱負>HTSロボットシステム, バイオセンサ<趣味>いつかミツバチを飼うのが夢

藤田 雅也 (Masaya Fujita) 昭和41年9月14日生<略歴>1992年富山大学理学部地球科学科卒業/1999年東北大学大学院工学研究科材料化学専攻博士後期課程修了/同年(財)野口研究所博士研究員/2000年東北大学大学院工学研究科材料化学専攻助手<研究テーマと抱負>糖加水分解酵素を用いた新規糖鎖合成, 生命現象における糖鎖の役割を考え

ていきたい<趣味>スポーツ観戦

鮎 信学 (Nobutaka Funa) 昭和51年3月13日生<略歴>1998年慶應義塾大学理工学部化学科卒業後, 現在東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程後期在学中<研究テーマと抱負>タイプIII PKSを用いた有用物質の生産<趣味>テニス, HPLC(逆相)

堀之内末治 (Sueharu Horinouchi) 昭和27年1月1日生<略歴>昭和49年東京大学農学部農芸化学科卒業/54年同大学大学院農学系研究科博士課程修了/56年同大学農学部農芸化学科助手/62年同助教授/平成6年同大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻教授, 現在にいたる。この間, 昭和54~56年米国ウィスコンシン大学医学部留学<研究テーマと抱負>①放線菌の抗生物質生産と形態分化に関する遺伝生化学的研究, ②遺伝子工学的手法による各種微生物の生産する有用酵素および生理活性物質の増産・改良に関する研究, ③蛋白質工学的手法による各種蛋白質の構造・機能相関の解析, ④下等真核微生物の糖鎖付加に関する研究

松尾 高稔 (Takatoshi Matsuo) 昭和47年6月27日生<略歴>1996年宮崎大学工学部物質工学科卒業/1998年北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科博士前期課程修了/同年東京工業大学生命理工学研究科博士後期課程入学, 現在にいたる<研究テーマと抱負>生体内に存在する金属蛋白質の機能解明<趣味>スポーツ観戦(主にモータースポーツ), 球技(野球など)

松永 幸大 (Sachihito Matsunaga) 昭和44年9月5日生<略歴>平成5年東京大学理学部生物学科卒業/10年同大学大学院理学系研究科生物科学専攻博士課程修了/同年日本学術振興会 PD 特別研究員/11年同大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻・日本学術振興会 PD 特別研究員, 12年同助手, 現在にいたる。この間, 平成10~11年米国ノースキャロライナ大学チャペルヒル校博士研究員<研究テーマと抱負>高等植物の性分化・性決定機構<趣味>ルアー釣りから海のボート釣りまでのあらゆる魚釣り

孫田 浩二 (Koji Magota) 昭和33年7月21日生<略歴>1982年九州大学薬学部薬学科卒業/1984年同大学大学院薬学研究科修士課程修了/同年サントリー(株)生物医学研究所入所, 現在にいたる<研究テーマと抱負>科学の発見・知見を人の暮らしに役立てる<趣味>絵

光 富 勝 (Masaru Mitsutomi) 昭和28年11月27日生<略歴>1976年佐賀大学農学部農芸化学科卒業/1978年同大学大学院農学研究科修士課程修了/同年林原(株)入社, 東北大学歯学部出向/1980年佐賀大学農学部助手/1992年同助教授/2000年同教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>糖質および糖質関連酵素の構造と機能, その応用<趣味>テニス, スポーツ観戦