

# 脊椎動物脳の細胞系譜の解析

「形とはたらき」領域 弓場 俊輔

## 要 旨

脊椎動物の細胞系譜を解析するためにモデル動物として小型魚類であるメダカを用い、これまでに全くないような実験系の開発を試みた。装置は共焦点走査型レーザー顕微鏡をベースに赤外レーザーを導入したものである。また、対象はメダカのトランスジェニック個体で、赤外レーザーによって個体内の単一細胞を標的に熱ショックを与え、それによって部位特異的組換えを引き起こすものである。この顕微鏡システムを用いて単一細胞における特定遺伝子の誘導に成功した。装置は既に完成し、細胞系譜の解析を始めることができた。

## 1. 研究のねらい

非脊椎動物である線虫では細胞系譜が詳細に解析されているが、脊椎動物ではその細胞数の多さが解析を困難なものにし、技術的な理由でその解析が見送られてきた。そこで、私はその解析技術の開発に重きを置いて課題を提案した。この技術では個体内の単一細胞において特定遺伝子の発現を時間空間的な制約を受けずに誘導できるものである。

発現すべき遺伝子は、細胞系譜なら細胞標識用のレポーター遺伝子であるが、実験によっては機能分子の遺伝子も含まれる。本研究課題では細胞系譜という発生学にこの新技術の導入を試みるが、生理学など他の生物医学分野でも利用可能であること、また、実験対象を他の動植物個体とすることも視野に入れて技術開発を行なった。

## 2. 研究方法と成果

### 2-1 方 法

#### トランスジェニック個体の作成

##### ① 実験動物

課題提案時には実験動物に小型魚類のゼブラフィッシュを選んだが、実験結果に個体間の遺伝的背景の違いが影響する将来の可能性を考慮して研究対象をメダカに変えた。

メダカはこれまでも国内で実験動物として永らく研究されてきたもので、最近になって脊椎動物のモデルとして見直されている。このようにメダカに関しては生物学上の多大な蓄

積があり、遺伝的背景が均一な近交系が国内に何系統も存在すること、さらには細胞系譜の解析という点では発生のスピードがゼブラフィッシュより遅いので解析が容易であることが転向の理由である（表1）。胚が透明で光学的手法を駆使できる点ではゼブラフィッシュと何ら変わらない実験動物である。

表1 モデル動物としての比較

特 徴	ゼブラフィッシュ	メダカ
1世代	12週	10週
性決定	不明	XY染色体
卵殻	軟らかい	硬い
産卵数	100~200個/週	20~30個/日
染色体数	50本	48本
ゲノムサイズ	1700Mb	800Mb
近交系の数	0	12
遺伝的多型性	低 (<1/1000bp)	高 (1/100bp)
連鎖地図	>3000	200
ゲノム情報解析	進んでいる	遅れている
トランスジェニック系統	あり	あり
活性のあるトランスポゾン	未確認	あり
ES様細胞	なし	あり
雌性発生	可	可
精子凍結	可	可
遺伝子およびエンハンサートラップ法	なし	あり
卵母細胞の培養	不可	可
温度感受性変異	非常に稀	多
群泳行動	なし	あり

ただし、細胞特異的プロモーターの評価および熱ショックの条件検討にはゼブラフィッシュを用いた。特に熱ショックの条件検討には東海林互博士（東北大学）らが樹立したトランスジェニック系統（ゼブラフィッシュ Hsp70 プロモーターにオワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白、EGFP 遺伝子を繋いだプラスミドを導入したもの）を用いた。

## ② マーキングベクターの構築

図1Aに示したように、細胞特異的プロモーター下流にレポーター遺伝子としてサンゴ由来の赤色蛍光蛋白、DsRed 遺伝子を繋いだプラスミドを構築した。

## ③ トレーシングベクターの構築

また、図1Bで示したようなプラスミドを構築した。

構成的プロモーターであるアフリカツメガエル EF1 $\alpha$  プロモーターとレポーター遺伝子の間に2箇所の loxP 配列ではさまれた Cre 発現ユニットを挿入した。レポーター遺伝子には EGFP 遺伝子を用いた。

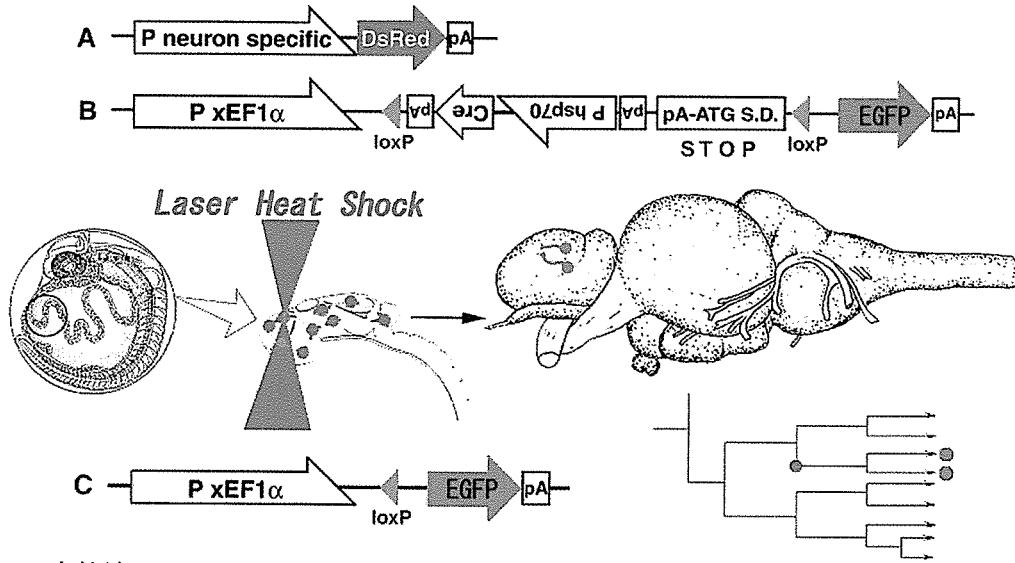


図1 赤外線レーザーによる部位特異的組換え

プラスミドAの導入によって標的細胞をDsRedで可視化。Bは組換え前のプラスミドの構造。Cはレーザー照射による組換え後の構造。Creの発現ユニットが脱落することで、EGFP遺伝子の発現が持続する。

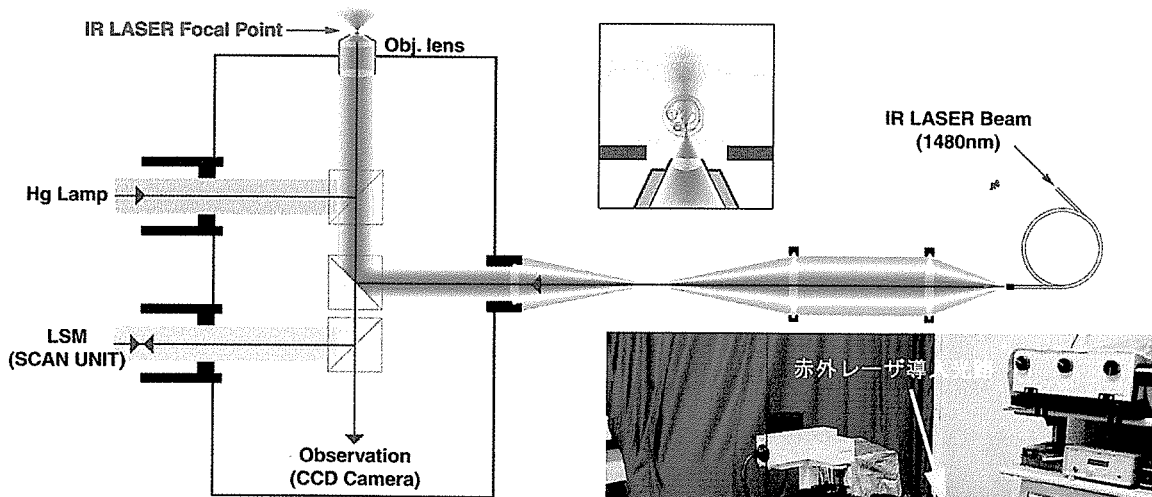


図2 赤外線レーザー顕微鏡システムの概略図と全景風景

観察用の共焦点走査型レーザー顕微鏡に別光路で赤外線レーザーを導入したもの(全景写真顕微鏡躯体右側)

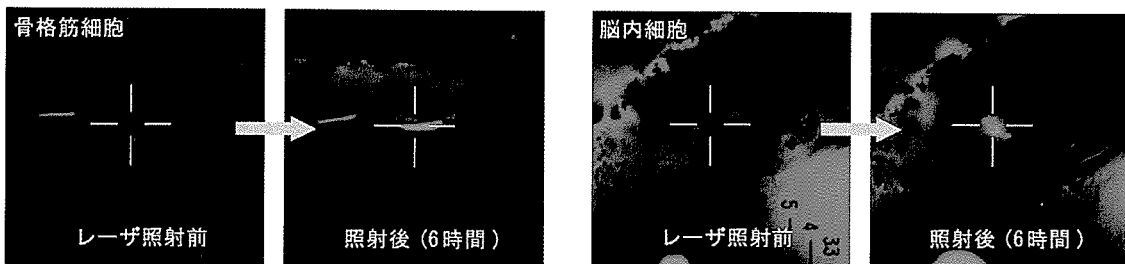


図3 赤外線レーザー照射による熱ショック遺伝子誘導

十字の中央部に赤外線レーザー照射し、熱ショックでEGFP遺伝子の発現を誘導した。左側2枚は骨格筋細胞、右側2枚は脳内細胞の場合。

Cre 発現ユニットは、熱ショックプロモーターであるマウス Hsp68 プロモーター下流に P1 バクテリオファージ由来の部位特異的組換え酵素である Cre 遺伝子を繋いだカセットと遺伝子発現阻止のための STOP カセット（ポリ A 付加シグナル、翻訳開始コドン、スプライシングドナー部位からなる）の 2 つのカセットから構成されている。

このプラスミドが導入された細胞では、熱ショックにより Cre が発現し、自律的に Cre 発現ユニットが標的配列である loxP 部位で切り出される。この結果、EF1 $\alpha$  プロモーターに EGFP 遺伝子が直結し、以後、EGFP 遺伝子の発現が持続することになる（図 1C）。

#### ④ トランスジェニックメダカの作成

①のマーキングベクターと、②のトレーシングベクターをそれぞれメダカ受精卵にマイクロインジェクションによって導入している。

用いるメダカの系統は、若松佑子博士（名古屋大学）らによって樹立された色素欠損変異体の See-through 系統で、細胞の観察、赤外レーザー照射の障害とならないものである。

#### 赤外レーザー顕微鏡システムの構築

ベースにした倒立顕微鏡は、共焦点レーザー走査型顕微鏡（オリンパス光学工業、FLUOVIEW）で、落射蛍光装置も搭載したものである。標的細胞および標識細胞の通常の観察には落射蛍光を用いるが、正確な 3 次元位置の把握には共焦点顕微鏡を用いる。観察用レーザーとして DsRed 用に Green Helium Neon レーザ（波長 543nm）、EGFP 用に Argon レーザ（波長 488nm）を用いた。

また、赤外レーザーは通信用レーザー（シングルモード ラマンレーザー、波長 1480nm）を用いた。波長 1480nm の赤外線は水分子にのみ吸収があり、細胞毒性はほとんど考えなくてよいものである。このレーザーを図 2 に示したような光路を経て倒立顕微鏡本体（オリンパス光学工業、IX70）右側の特注ポートから顕微鏡に導入した。

赤外レーザーの照射時に用いる対物レンズには落射蛍光用の 20 倍のものを用いた。

組み立てた顕微鏡システムについては、蛍光ビーズのレーザートラッピングによって観察時の焦点と赤外レーザーの焦点を一致させた。

（以上、赤外レーザー顕微鏡システムの構築については、早稲田大学理工学部 船津 高志博士との共同研究による。）

## 2-2 成 果

### トランスジェニック個体

#### 《マーキングベクターの構築》

成長円錐特異的蛋白である Growth-associated protein、ラット GAP-43 プロモーターを神経特異的プロモーターの候補として用いた。このプロモーター下流に DsRed 遺伝子をつないだものをゼブラフィッシュ受精卵に導入し、一過性に発現させた(図4)。ニューロンの全体、すなわち細胞体および成長円錐まで含めた神経突起が可視化でき、利用可能であることが判った。

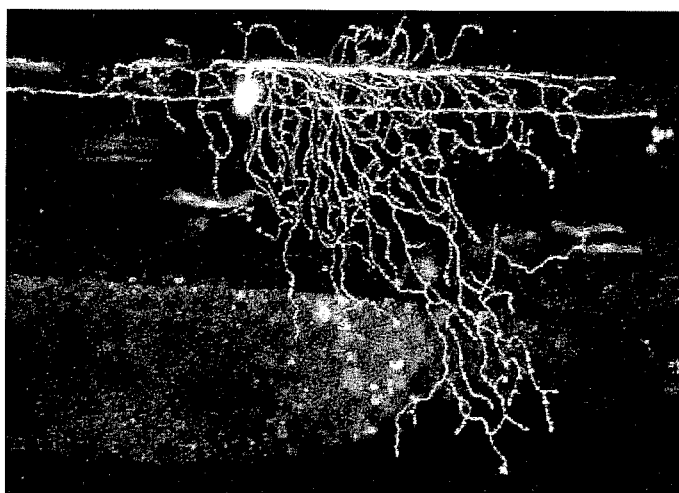


図4 ゼブラフィッシュ胚の Rohon-Beard 感覚神経細胞に発現した DsRed 遺伝子

メダカにおいては、ニューロン、グリア細胞の前駆細胞としての神経幹細胞のマーカーとしてよく知られている中間径フィラメントの Nestin を用いて標的細胞を可視化

しようとしている。ラット Nestin エンハンサーにマウス hsp68 最小プロモーターを繋いだもので EGFP 遺伝子をメダカで一過性に発現させると神経上皮と思われる細胞群が可視化された(図5)。

他に神経特異的プロモーターのクローニングに向けて、メダカ成魚の脳由来 cDNA ライブラリーを作成し、神経特異的 RNA 結合蛋白である Hu、微小管結合蛋白である MAP2 のメダカ cDNA クローニングも終えている。これをプローブにメダカゲノム BAC ライブラリーをスクリーニングし、プロモーターのクローニングに入ると同時に、グリア細胞のマーカーである GFAP や MBP の cDNA クローニングも開始している。同様にメダカ胚由来 cDNA

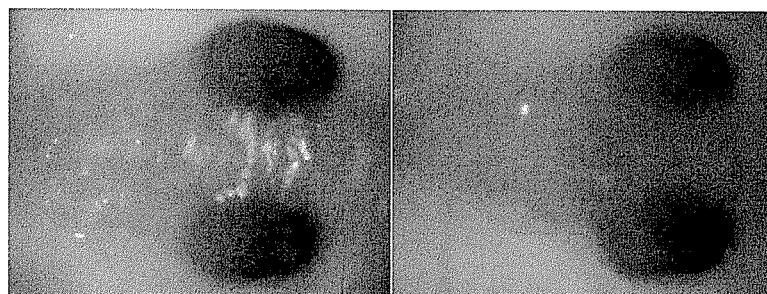


図5 メダカ胚における Nestin プロモーターによる EGFP 遺伝子の発現

ライブラリーも作成し、Nestin の cDNA クローニングも試みている。

### 《トレーシングベクターの構築》

EF1 $\alpha$  プロモーターと EGFP 遺伝子の間に 2 箇所の loxP 配列ではさまれた Cre 発現カセットを挿入するために以下の二つのベクターを構築した。

一つは、Hsp68 プロモーター下流に Cre 遺伝子を繋いだ Cre 発現カセットと STOP カセットの 2 つのカセットから成り、loxP 配列、1 コピーを STOP カセットの端に入れた。これら全てを Kanamycin 耐性遺伝子とともに p15A 由来の複製起点を持つプラスミドに組み込んだ (レコンビナーゼモジュール)。

二つ目は、EF1 $\alpha$  プロモーターと EGFP 遺伝子の間に loxP 配列、1 コピーを入れ、Ampicillin 耐性遺伝子とともに ColE1 由来の複製起点を持つプラスミドに組み込んだ (レポーターモジュール)。

これら、レコンビナーゼモジュールとレポーターモジュールに *in vitro* で組換え蛋白の Cre を作用させて部位特異的組換えによって一つのトレーシングベクターが遂に完成した。

このように最終的に二つのモジュールを合わせてトレーシングベクターを構築することを考案した理由として、

- 1) モジュールを別々に導入したトランスジュニクシステムを作成すると、その 2 システムを交配する手間と時間を要してしまうこと。
- 2) レポーターモジュールのレポーター遺伝子を簡単に目的に応じて他のレポーター、例えば DsRed などにもすることもできるし、機能分子の遺伝子にすることもできるという汎用性。これらの遺伝子をベクターに挿入する際のベクターのサイズも小さい方が利用できる制限酵素部位の点で構築しやすい。

という 2 つの理由が挙げられる。

組換えを厳密に制御できるか否か、このベクターをメダカ受精卵に導入して熱ショックによる誘導実験を行なうところまで進んだ。

### 赤外レーザー顕微鏡システム

波長 1480nm の赤外レーザーで熱ショックを可能とする加熱ができるか？

#### 《物理実験の結果》

レーザー出力を数ワットまで上げてゆくとスライドグラス上の水が沸騰することから、レーザーの出力を制御することによって焦点における温度を熱ショックに十分な程度にできる目処が立った。そこで、温度が上昇すると量子収率が低下して蛍光強度が低下する現象を利用して温度のモニタリングを試みた。まず、蛍光物質の Cy3 をスライドグラス上にコートした

ものをウォームプレートに載せて蛍光強度の変化を測定した。相対輝度と温度の相関は図6Aのようになり、確かにこの現象が生じることを確認した。

次に EGFP 遺伝子を大腸菌で発現させて得られた組換え蛋白を吸着したビーズを標的に構築した顕微鏡システムを用いて赤外レーザを照射し、EGFP 蛋白の蛍光強度を測定した。そのときの赤外レーザの出力と EGFP 蛋白の相対輝度の相関を示したのが、図6Bである。

図6A・Bの結果から、用いた蛍光物質は異なるものの、基本となる現象は同じであると仮定するとおよそ赤外レーザの出力と焦点における温度の相関は図6Cのようになる。実験を全て同じ蛍光物質にして実験を行なって確認すべきだが、赤外レーザの出力の至的条件をとれば、熱ショックが可能なことが十分予想できた。

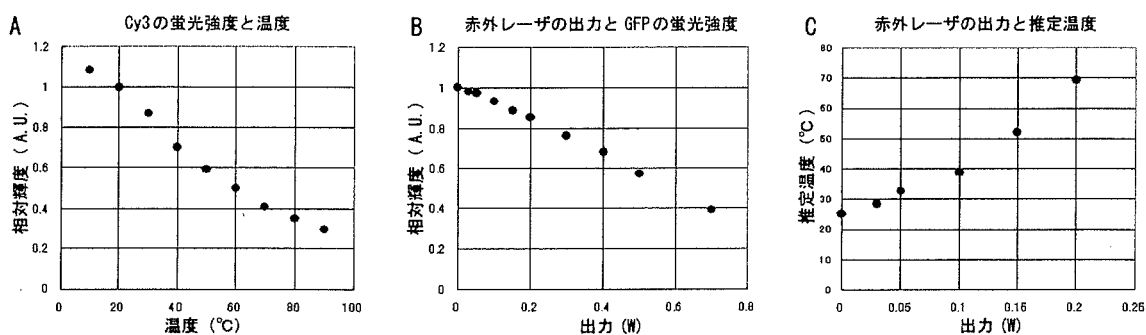


図6 赤外レーザによる蛍光物質の加熱実験

### 《生物実験の結果》

熱ショックプロモーターによって EGFP 遺伝子が誘導できるトランスジェニックゼブラフィッシュ胚 (30時間) に赤外レーザを照射した。

EF1 $\alpha$  プロモーター下流に DsRed 遺伝子を繋いだプラスミドをマイクロインジェクションでトランスジェニック系統の受精卵に導入して DsRed 遺伝子を一過性に発現させた。

これによって発現細胞は個体内でモザイク状に存在し、標的細胞を可視化した。

赤外レーザの出力を至適化するのにこの標的細胞が発現する DsRed の赤色蛍光を指標にした。物理実験と同じように、照射後も蛍光が可逆的に戻る範囲で実験を開始した。

その結果、細胞の形態変化もなく、蛍光も戻る出力として 50 mW を選ぶことができた。

この出力で赤外レーザをトランスジェニック系統の胚の標的細胞に照射した。

照射時間についても個体の安定な姿勢保持という点で数秒から数分が実際的で、この範囲でさまざまな時間をとったところ、骨格筋細胞の場合は、1 ないし 2 秒、脳内細胞の場合は、3 ないし 5 秒という照射が適当であった。この照射後、6 時間経過した同じ細胞を撮影した写真が図3である。

骨格筋の場合、細胞が大きく、確かに単一細胞でのみ EGFP 遺伝子の発現誘導が認められたが、脳内細胞の場合は、EGFP 遺伝子の誘導が認められた細胞が数個認められた。

この結果には2通りの説明ができる。すなわち、1) 赤外レーザーの照射の影響が複数の標的細胞に及んだ可能性、2) 標的細胞は単一であるが、標的細胞が6時間の間に分裂して、複数の細胞になった可能性である。

1) の場合は、さらに赤外レーザーの照射条件（出力、時間）を検討すること、対物レンズの倍率を上げることを考えなければならない。

2) の場合は、6時間以前に観察をさかのぼって、タイムラプス観察ができるような顕微鏡システムを作る必要がある。EGFP 遺伝子の誘導に要する時間は、細胞を観察できないタイムラグとなる。ゼブラフィッシュに比べて発生の進行が遅いメダカを実験動物に用いれば、このようなタイムラグを最小限にとどめることができる。

### 3. 今後の展望

全くの構想だけの課題提案で、まさにゼロからのスタートであった。さきがけ研究21の3年間でとても生物学の研究というところまでには至らなかったが、技術開発という点では当初の夢のような目標を達成できた。これからこの技術を他の医学生物学研究者の皆さんにも使っていただき、その有用性を広く世界に問うつもりである。私自身は、いよいよ独自に開発した新技术を駆使して、地道に脳の「形」、すなわち細胞系譜の解析に取り組み、ライフワークとして続けていく決意である。その一方で、できあがった脳の「はたらき」の研究にも神経回路と行動の関係を探る道具としてこの技術を用いて開拓してゆきたい。

### 4. 特 許

名称：「局所的遺伝子発現調節法」

出願番号：特願平11-322481、出願日：平成11年11月12日

発明者：弓場 俊輔・船津 高志

出願人：科学技術振興事業団

### 5. その他

科学技術振興事業団 平成12年度 独創的研究成果育成事業採択課題

「個体内単一細胞の遺伝子発現を調節する赤外線レーザー顕微鏡システム」

(シグマ光機株式会社)