

3-2-1 細胞の構造・動きを観る

概要

細胞の構造や動きをみるための顕微鏡法の中で蛍光顕微鏡法に焦点を当てて解説する。より専門的な文献を読むために必要な蛍光顕微鏡法の基礎知識をまず説明する。次に、実際の実験の応用例として、蛍光免疫染色法および生細胞イメージングを紹介し、実験の原理・ポイントについて紹介する。また、カバーしきれない部分については、5. 項に参考図書をもとめている。また一貫した実験手技の実例として6. ウニ卵を用いた細胞生物学的実験 について解説した。

1. はじめに

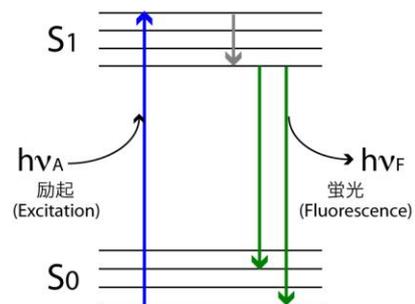
現在の細胞生物学では、より高い時間・空間分解能で細胞を観る、言い換えれば、一つの細胞レベルにおいていつどこでどのような変化が起こるかを明らかにすることが非常に重要になってきている。この目的のために様々な顕微鏡の実験法が存在するが、ここでは現在よく用いられる蛍光顕微鏡法に絞り詳述したい。紙面の都合で割愛せざるを得なかったその他の光学顕微鏡法（位相差・微分干渉・暗視野など）については、最後にまとめている参考図書を参考にして欲しい。

2. 蛍光顕微鏡の原理

2. 1 蛍光物質

蛍光物質は、ある特定の波長の光を吸収して、それに比べてより長い波長の光を放出する性質を持つ。たとえば現在細胞生物学の分野でよく用いられる改良された緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein / GFP）は、青色の光を吸収し、緑色の光を放する。その物理学的基礎は、蛍光物質が複数のエネルギー状態を持つことにある。図1で示すように、通常、蛍光物質はエネルギーの低い基底状態（ S_0 ）にある。光が当たると、蛍光物質は、光の持つエネルギーを受け取り一時的にエネルギーの高い励起状態（ S_1 ）になる。しかし、エネルギーの高い状態は不安定で、蛍光物質はすぐに元の基底状態に戻る。その際に蛍光が放出される。

実際の生物学の実験では、大きく分けて2種類の蛍光物質を用いる。一つは、フルオレセイン（fluorescein）も



$$E = hv = hc/\lambda$$

E:光のエネルギー h:プランク定数
v:光の周波数 c:光速度 λ:光の波長

図1. 蛍光物質のエネルギー準位
下から上へいくに従いより高いエネルギー状態を示す。 S_0 :基底状態、 S_1 :励起状態。光は hv で表されるエネルギーを持っており、蛍光物質との間でエネルギーのやり取りを行う。

しくはローダミン (rhodamine) ような低分子有機化合物の蛍光色素である。主な用途としてタンパク質や核酸のラベルに用いる。特に蛍光ラベルした抗体は、タンパク質の細胞内での局在を観る目的で、蛍光免疫染色法に頻繁に用いる。二番目は、蛍光タンパク質である。ノーベル賞を受賞したオワンクラゲの GFP が有名である。こちらは、遺伝子工学的に別のタンパク質と融合させたものを生きた細胞内で発現させ、タンパク質の動きを観る目的で良く使われる。

自分の実験の目的に合った蛍光物質を選択するためには以下の要素を考慮する必要がある。

励起・蛍光スペクトル (Excitation/emission spectra) : 蛍光物質の励起されやすさの光の波長

に対する依存性を示したものが励起スペクトル, 放出される蛍光の波長特性を示したものが

蛍光スペクトルもしくは放出スペクトルである。

改良された GFP (Enhanced GFP / EGFP) の

スペクトルを図2に載せた。波長 489 nm をピークとして

450-500 nm の波長帯で効率よく励起が起

こり, また 508 nm をピークとして 500

-530 nm の波長帯で蛍光放出があることが分

かる。生物学の実験ではしばしば二色以上の

蛍光を用いるが, 蛍光顕微鏡で観察したとき

に2つのシグナルが混じり合わないよう

にしなければならない。その目的のために励起・

蛍光スペクトルに注意を払う必要がある。

モル吸光係数 (Molar extinct coefficient) : 蛍光

物質が光を吸収する効率。光路 1 cm に対する

1 M の蛍光物質の吸光度として表される。

量子効率 (Quantum yield) : (放出される光子の数) / (吸収された光子の数)。量子効率が

高くモル吸光係数が高い蛍光物質ほど一般的に明るい。

蛍光寿命 (Life time) : 通常光を与え続けると蛍光物質が変性して蛍光を発さなくなる。その

過程を褪色 (fading) と呼び, 多くの場合, 褪色の時間依存性は指数関数で近似できる。褪色

は, 蛍光顕微鏡法では大きな問題であり, 出来るだけ励起光の強度を小さくし照射時間を

短くするという基本的な注意が必要である。また, 活性酸素除去剤や褪色防止剤を入れて褪色

を遅らせることが可能な場合も多い。しかし, 基本的には褪色が遅い蛍光物質を用いるの

がベストである。例えば, 緑色蛍光の場合, フルオレセインは褪色が非常に速いが, その誘

導体である AlexaFluor488 や DyLight488 は同様の励起・蛍光スペクトルを持つにも関わらず

非常に安定である。

以下の表1と表2に実験でよく用いられる蛍光色素と蛍光タンパク質についてそれぞれま

とめた。

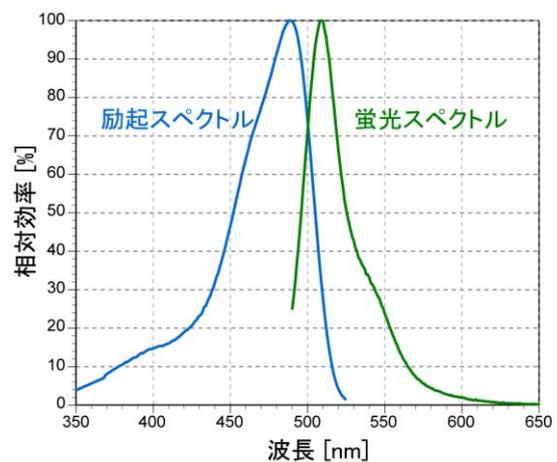


図2. EGFPの励起および蛍光スペクトル
EGFPは、波長 489 nm の光を最も良く吸収し、波長 508 nm の蛍光を最も良く発する。これら最大効率のときに比べた相対値 (%) として励起スペクトル (水色) および蛍光スペクトル (緑色) を示した。

表 1. 代表的な蛍光色素

名称	CAS 番号	励起波長 (極大)	放出波長 (極大)
Fluorescein	2321-07-5	495 nm	519 nm
Tetramethylrhodamine	70281-37-7	552 nm	578 nm
Texas Red	82354-19-6	595 nm	613 nm
Cy TM dyes (Cy2, Cy3, Cy5 など)	Cytometry 11:418-430 (1990) http://www.jacksonimmuno.com/technical/f-cy3-5.asp		
AlexaFluor TM dyes	J.Histochem.Cytochem. 47:1179-1188 (1990) http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probe/s/Key-Molecular-Probes-Products/alexa-fluor.html		
DyLight TM dyes	http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=9AA97866-4822-4AFE-B36D-49F7E1D7D653 http://www.jacksonimmuno.com/technical/DyLight.asp		

*蛍光色素のスペクトルについては、様々なリソースがあるが、例えば

http://www.mcb.arizona.edu/IPC/spectra_page.htm

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>

http://www.bdbiosciences.com/external_files/media/spectrumviewer/index.jsp

<http://www.jacksonimmuno.com/technical/spectratext.asp#txfl>

などが便利である。

表 2. 代表的な蛍光タンパク質

ソース	タンパク質名/参考文献	DNA の入手先
オワンクラゲ <i>Aequorea Victoria</i>	wtGFP (wild type GFP), BFP (青), CFP (水色), EGFP, YFP (黄色), Photo-activatable GFP J.Cell Sci. 114:837-838 (2001) Science 297:1873-1877 (2002)	(wtGFP) Clontech 社 * (Photoactivatable GFP) Dr. Lippincott-Schwarz
<i>Discosoma striata</i> (珊瑚の一種)	DsRed, mCherry, mStrawberry, tdTomato Nat.Biotech. 22:1567-1572 (2004)	Clontech 社 Dr. Roger Tsien
<i>Dendronephthya sp.</i> (珊瑚の一種)	Dendra2 (光刺激により緑から赤へ変換) Nat.Biotech 24:461-465 (2006)	Clontech 社 Evrogen 社

* *Aequorea Victoria* 由来の GFP を改良したもの (BFP, CFP, EGFP, YFP) については現在販売中止 (特許の問題による)。EGFP の代替品として *Aequorea coerulea* 由来のタンパク質が強い蛍光を持つように改変したもの (pAcGFP1-N1, pAcGFP-C1 など) を販売している。

**この他に理化学研究所の宮脇敦史博士のグループが様々な蛍光タンパク質の開発を行っている。

サンプルのリクエストはこの Web site へ (<http://cfds.brain.riken.jp/mta.html>)。

***<http://www.olympusfluoview.com/applications/fpcolorpalette.html> などでより詳しい説明が得られる。

2. 2 蛍光顕微鏡法の原理

図3に良く使われる水銀ランプを光源とする落射型蛍光顕微鏡の基本的な構成を示す。水銀ランプが発する光はいろいろな波長の光が混じっている。そこで、まず励起フィルター

(Excitation filter) を用いて、使用する蛍光色素もしくは蛍光タンパク質に適した波長帯の光を透過させる。図4で示すようなEGFP用の蛍光フィルターの場合は、450-490 nmの光のみを透過するフィルターを使用する。次にあるビームスプリッター (Beamsplitter; ダイクロイックミラーとも呼ばれる) は、波長帯の光に対してはあたかも鏡のように反射させるのに対して、別の波長帯の光にはガラスのように透過させるという特殊な光学特性を持つ。図4の例の場合、励起フィルターを透過した450-490 nmの光に対してビームスプリッターの透過率はほぼ0で鏡として働く。反射した励起光は対物レンズを経て標本に届く。放出された蛍光のうち500 nm以上のものについてはビームスプリッターの透過率は90%と高く、蛍光はカメラもしくは接眼レンズへ向かう光路へ向かう。励起光の反射や散乱の大部分は再びビームスプリッターによって反射されるが、

一部はビームスプリッターを通過してしまう。そこで、吸収フィルター (Emission filter) を用いて放出された蛍光のみを選択的に透過させ、低いバックグラウンドを実現する。これらの蛍光フィルターは、通常、フィルターキューブと呼ばれるホルダーの中にまとめて嵌め込まれている。

蛍光フィルターの選択は、蛍光色素や蛍光タンパク質の選択と密接に関連しており、良い蛍光像を得るための重要なファクターである。最適の蛍光フィルターを使用しない場合、効率の悪い励起光しか得られなかったり、放出された蛍光の多くの部分をビームスプリッターや吸収フィルターで失ったりして、結果として暗い像となる。また、2種類もしくは3種類の蛍光物質を使う場合、蛍光フィルターによっては両方からのシグナルが観察されてしまうケー

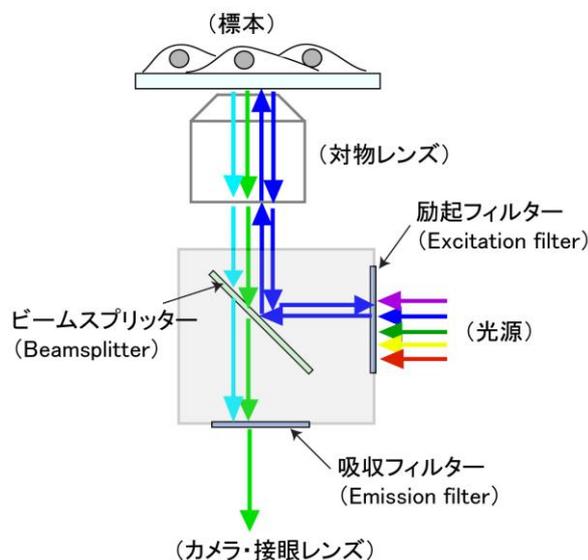


図3. 落射型蛍光顕微鏡の構成

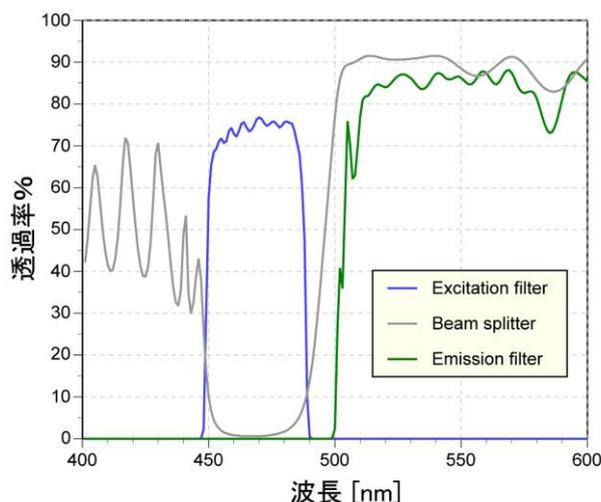


図4. EGFP用の蛍光フィルターの特性
Chroma社のHQ-EndowGFPフィルターの数値データによる。

スもある。蛍光フィルターに関しては、Chroma Technology 社 (<http://www.chroma.com/>) と Semrock 社 (<http://www.semrock.com/>) が高品質で多種類のものを用意している。

2. 3 蛍光顕微鏡法の構成

蛍光顕微鏡は、顕微鏡本体・対物レンズ・蛍光フィルターキューブ・光源という基本セットに様々な付属品が加わることで構成される。ほとんどの場合は、蛍光とは別に透過光の光路も確保され、位相差もしくは微分干渉顕微鏡法で標本が観察できるようになっている。詳しい情報は、顕微鏡メーカーの web site で得られる。

オリンパス <http://www.olympus.co.jp/jp/lisg/bio-micro/>

ニコン <http://www.nikon-instruments.jp/jpn/products/list/model1.aspx>

Zeiss <http://www.microimaging.zeiss.co.jp>

Leica <http://www.leica-microsystems.co.jp/>

3. 蛍光免疫染色法

3. 1 原理

標的分子を非常に認識する抗体の性質を利用して、細胞の中のタンパク質の局在を可視化するのが蛍光免疫染色法 (immunofluorescence) である。図 5 にその原理について示す。まず、観察したい標的分子に対する抗体 (一次抗体; primary antibody) を加

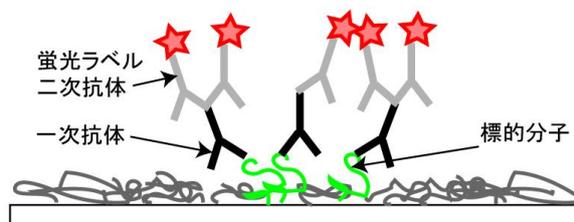


図 5. 蛍光抗体染色法の原理

える。その次に、一次抗体を認識する抗体 (二次抗体; secondary antibody) を加える。そして、二次抗体に付加されている蛍光を観察することで、標的分子の局在を知ることが出来る。一連の反応はすべて適度な塩濃度を持った緩衝液中で行い、乾燥させないのが基本である。

3. 2 抗体

3. 2. 1 一次抗体

一次抗体は、標的分子の全体もしくは一部をウサギ、マウス、ラット、モルモット、ニワトリなどに接種させて作った抗体である。抗体を作成するのは免疫系の B 細胞である。B 細胞が抗体をつくるように成熟化する過程において、免疫グロブリン H 鎖および L 鎖の遺伝子が再構成する。その結果、1 つの B 細胞はたった 1 種類の抗体しか作ることができない。通常、標的分子を接種した動物の血液から回収した抗体は、複数の B 細胞により作られた種類の異なる抗体の混合物であり、ポリクローナル抗体 (polyclonal antibody) と呼ぶ。一方、B 細胞を不死化させて大量に培養し、大量に 1 種類の抗体のみを作成する方法も確立されている。このような抗体をモノクローナル抗体 (monoclonal antibody) と呼ぶ。表 3 にポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の特徴をまとめた。哺乳類の抗体はその構造によって 5 つのクラスに分かれる。多くの場合実験に使用される抗体は IgG であるが、まれに IgM の場合もあ

るので注意が必要である。抗体と抗原の結合の強さや非特異的な吸着は抗体によって千差万別なので、実験を始める際には、いくつかの希釈倍率を試し最も良い条件を試す必要がある。

表3. モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の比較

モノクローナル抗体	ポリクローナル抗体
良い抗体の場合バックグラウンドの蛍光が非常に低い。	非特異的な結合により、バックグラウンドの蛍光が若干ある場合が多い。
抗体の品質が比較的安定している。	抗原を接種した動物の個体差によるロットによる違いがある。
作成するのに時間・労力・費用がかなり掛かる。	モノクローナル抗体に比べると掛かる時間・労力・費用が少ない。
多くの場合はマウス IgG. ラット IgG のものもある。	ウサギ, ラット, モルモット, ニワトリなど由来。

3. 2. 2 二次抗体

免疫グロブリンには、遺伝子の再編成によって変化する可変領域と変化しない定常領域に分かれる。この定常領域に対して作成した抗体が、二次抗体として用いられる。二次抗体の作成には通常ヤギもしくはロバを用いる。定常領域を抗原としているために1つの二次抗体は多数の異なる一次抗体を認識することができるので、蛍光の種類および抗原免疫グロブリンの種類（クラス/動物種）の違う蛍光標識二次抗体を1セット要しておけば以後の実験に十分である。以下が二次抗体の入手先の例となる。

Molecular Probes <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>

(AlexaFluor dye でラベルした二次抗体の入手先はこのみ)

Jackson Immunoresearch <http://www.jacksonimmuno.com/home.asp>

(種類が非常に多い)

二次抗体は、遮光チューブに小分けして保存しておくのが良い。例えば、遮光を十分に行わないと、AlexaFluor647 のは本来の赤外領域の蛍光の他に緑色の蛍光も発するように変性してしまう。保存方法は、(1) PBS など適当な緩衝液に溶けた状態で、-20 °C から-80 °C で保存し、一度融解したあとは4 °C で保存、(2) 適当な緩衝液とグリセロールを体積比で1:1に混ぜて-20 °C で凍結させずに保存、の2種類がある。

3. 2. 3 二重および三重染色を行う際の注意点

二重もしくは三重染色とは、2種類もしくは3種類の一次抗体を用いて、複数のタンパク質の局在を同時に調べることである。上記で述べたような通常の蛍光免疫染色法の場合は、一次抗体をつくった動物種は異なるものにしなければならない。また、組み合わせる蛍光色素の選択も十分に考慮する必要がある。さらに、二次抗体が他の種の免疫グロブリンに対する反応性も考慮に入れる必要がある。例えばマウスとラット由来の一次抗体を併用するときは、ラット IgG に反応しない蛍光標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immunoresearch 社の

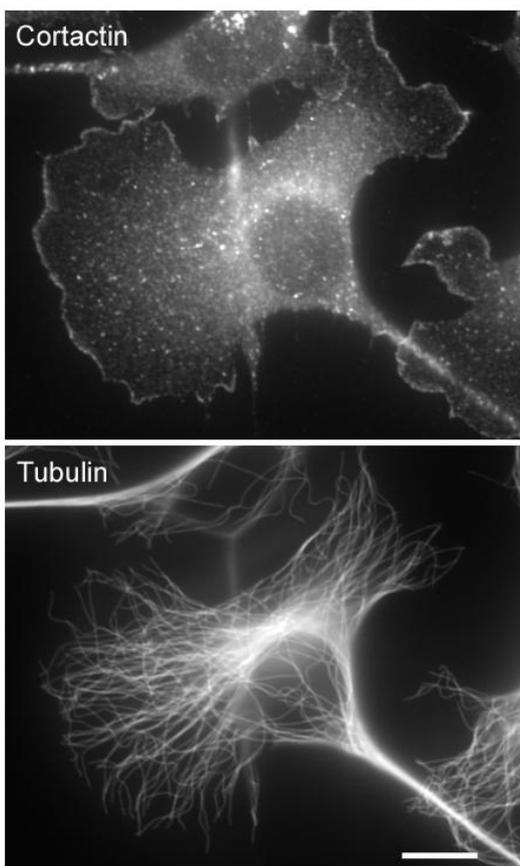
Cat#715-485-151 もしくは Molecular Probes 社の A-11029 など) が必要となる。

3. 3 細胞標本の調整法

生きた細胞の細胞膜は抗体を通さない。そこで、蛍光免疫染色法では、細胞に適切な処理を加えて抗体が標的分子に接近できるようにする。その方法としては、(1) アルデヒド基を持つ化学物質でタンパク質同士を化学架橋したのちに、界面活性剤で細胞膜に穴を開ける、(2)-20 °C 以下に冷やした有機溶媒 (おもにメタノールやアセトンが使われる) に細胞を冷やしタンパク質を変性させるとともに膜を取り除く、という大きく分けて2種類がある。どの方法が良いかは、ケース・バイ・ケースで、結局試してみるしかない。

3. 3. 1 化学架橋による固定および界面活性剤による膜除去

化学架橋には通常パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde) もしくはグルタルアルデヒド (glutaraldehyde) を用いる。これらの試薬はタンパク質中のリジン残基もしくはアルギニン残基のアミノ基と反応して化学架橋を行う。 <http://publish.uwo.ca/~jkiernan/formglut.htm> にその原理が詳しい。用いる試料によって、試薬組成や反応時間が変わってくる。哺乳類培養細胞に対する場合は、パラホルムアルデヒドは濃度 4% で用い室温で 15-30 分反応、グルタルアルデヒドは濃度 0.2-2% で用い室温で 10-20 分反応する。グルタルアルデヒドの方が、固定作用が強いが、界面活性剤による膜除去のあとに、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH₄) を未反応のアルデヒド基に対して反応させるクエンチング (Quenching) というステップが必要である。またグルタルアルデヒド固定の場合、細胞自体が持つ自家蛍光が強くなったり、抗体の非特異的な吸着が上がったりする短所もある。そのため、パラホルムアルデヒドによる固定の方が良く用いられる。パラホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒド廃液は、可燃性液体として処理する。



界面活性剤による膜除去は、培養細胞試料の場合は、0.2-1% の TritonX-100 を用いて室温で 1-5 分処理する。あまり長時間、高濃度の界面活性剤を試料に反応させない方がよい。膜除去が不十分だと細胞によって染色の明るさが違う染めむらが起こる。

図 6. Rat2 繊維芽細胞の二重染色像

固定: 2% Glutaraldehyde 室温 10 分間

膜除去: 1% TritonX-100 室温 5 分間

後処理: 1 mg/mL NaBH₄ 室温 10 分間 X 2

一次抗体: 4 °C 一晚

ウサギ抗 cortactin 抗体 (Polyclonal)

マウス抗 α -tubulin 抗体 (Monoclonal; clone DM1A)

二次抗体: 室温 30 分間

DyLight594 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体

DyLight488 標識ロバ抗マウス IgG 抗体

すべての試薬は PBS で希釈した。一次抗体および二次抗体反応のあとは室温で PBS で 5 分間 X 3 洗った。サンプルは、50% グリセロール/50% PBS 中で保存。

Cortactin 染色 (上) で葉状仮足と呼ばれる細胞伸長端でのアクチン構造を、チューブリン染色 (下) で微小管を可視化した。スケールバーは 10 μ m。

3. 3. 2 冷却した有機溶媒による処理

冷メタノールによる方法が最も一般的である。細胞試料を5分間浸けておくだけで済むので手軽で良く用いられる。但し、冷メタノールで処理する際に膜が壊れ、可溶性のタンパク質が流れ去ってしまうので、可溶性のタンパク質には不向きである。また有機溶媒から水をベースにした緩衝液に移す際に標本が乾燥しやすいので注意が必要である。

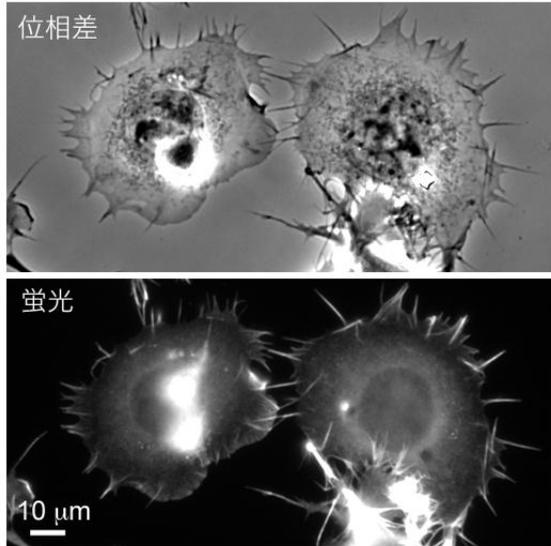


図7. Neuro2A 細胞の蛍光染色像

処理：メタノール -20℃ 5分間

膜除去：1% TritonX-100 室温 5分間

一次抗体：室温 1時間

マウス抗 fascin 抗体 (Monoclonal; clone 55K-2)

二次抗体：室温 30分間

TRITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体

(TRITC: Tetramethylrhodamine isothiocyanate)

すべての試薬は PBS で希釈した。一次抗体および二次抗体反応のあとは室温で PBS で5分間 X 3 洗った。サンプルは、50%グリセロール/50% PBS 中で保存。上に位相差像、下に蛍光像を示す。Fascin 染色により糸状仮足と呼ばれる F-アクチンを含む細胞突起を可視化した。中央部で暗く抜けているのが細胞核である。スケールバーは 10 μm。

4. 蛍光生細胞イメージング

4. 1 概論

従来は、蛍光色素で標識したタンパク質をマイクロインジェクションで細胞へ導入する方法が主であった。しかしこの方法は、いろいろ技術的に難しい点が多かった。生細胞イメージングが広く使われるようになったのは、蛍光タンパク質 GFP が普及してからである。蛍光タンパク質を用いた生細胞イメージングでは、まず遺伝子工学的に、自分の観察したいタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質の遺伝子をつくる。次のステップとして、(1)試験管内で合成した mRNA 合成を細胞へマイクロインジェクションする、または、(2)遺伝子 DNA 自体を細胞の核の中に導入し mRNA への転写・タンパク質への翻訳を行う、という二通りの方法がある。前者はユニ・ゼブラフィッシュ・カエルの実験で使われているが、後者の方がより一般的である。

4. 2 注意点

タンパク質の活性を損なわない。

- 蛍光色素による標識では、蛍光色素・反応基・反応時間を最適化して、タンパク質へのダメージが少ない標識方法を確立する。
- 蛍光タンパク質の融合は、通常は目的タンパク質の N 末端もしくは C 末端に蛍光タンパク質を付加するが、一方で問題が起こる場合もある。また蛍光タンパク質と目的タンパク質をつなぐ部分は適度な長さ(10 残基くらい)あった方が良いと言われる。

細胞へのダメージを最小限にする。

- 蛍光タンパク質との融合タンパク質の過剰発現は細胞に害がある。
- DNA の導入法は、細胞毒性の低いものを選ぶ。例えば、培養細胞へのリポフェクションの場合は、効率が高いものは逆に毒性も高い。Roche 社の FuGENE シリーズや TaKaRa Mirus 社の TransIT シリーズが、毒性も低く中程度の発現を実現する。
- イメージング中の細胞の周りの環境、特に温度に注意する。また水分の蒸発により塩濃度が変わらないように、何らかの策を講じる必要がある場合もある。
- 細胞への励起光の照射は、最小限に留める。焦点を合わせるときはまず透過光を用いて行った方が良い。

イメージングの条件を検討する。

- 使用する顕微鏡の種類・対物レンズ・倍率や撮影の時間間隔を、自分の使っている生物材料・生命現象に合わせて最適化する。
- 感度良くシグナルを取得するために、対物レンズ・蛍光フィルター・カメラを検討する。
- 励起光の当てっぱなしは避ける。自動シャッターを設置することは必須である。

4. 3 具体例

生細胞イメージングは使う材料によって実験方法が大幅に異なってくる。ここでは、当研究室で行っている哺乳類培養細胞の生細胞イメージングの方法について簡単に紹介する。蛍光タンパク質に融合した目的タンパク質は、CMV プロモーターの下流で発現する。融合タンパク質の発現プラスミドは、通常のトランスフェクション試薬（当研究室の場合は TaKaRa Mirus 社の TransIT-LT1）を使って細胞内に導入する。トランスフェクションの 24 時間後に、生細胞観察用のディッシュに細胞を播き、さらに 24 時間培養を行う。生細胞観察用のディッシュは、通常の組織培養用の 35 mm プラスチックディッシュの底に工作工場で穴をあけて、カバーガラスを自分で SYLGARD™ 184 シリコン接着剤（DOW CORNING 社）で糊付したものである。使用する前に紫外線を照射して殺菌している。イメージングを開始する 1 時間ほど前に、2% FBS および 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の gentamycin（抗生物質）が入った Leibovitz-15 に細胞培養の培地を変える。蛍光観察の際の背景蛍光を下げるために、この培地にはフェノールレッドは入っていない。また、顕微鏡とサーモスタット付きの温風機 ASI 400 Air Stream（Nevtek 社）の電源を予め入れておく。生細胞ディッシュ内の培養培地が 30 °C~35 °C になる程度の設定で温風をおくことで、顕微鏡のステージを予め温めて平衡状態にしておく。蛍光顕微鏡は、自動シャッターと CCD カメラが同期して作動するようにコンピュータ制御されたものを用いる。生細胞イメージングを始める直前に培養培地の上にミネラルオイルを重層して乾燥を防ぐ。ミネラルオイルは細胞毒性のないものを選ぶ必要がある。図 8 で示す例では、蛍光タンパク質 mEGFP（monomeric EGFP）とヒト β -アクチンを融合したものをラット Rat2 細胞に発現させた。ムービーは、蛍光顕微鏡 IX-70（オリンパス社）に ImageEM CCD カメ

ラ（浜松フォトニクス社）を取り付けて、MetaMorph ソフトウェアで制御を行うことで撮影を行った。

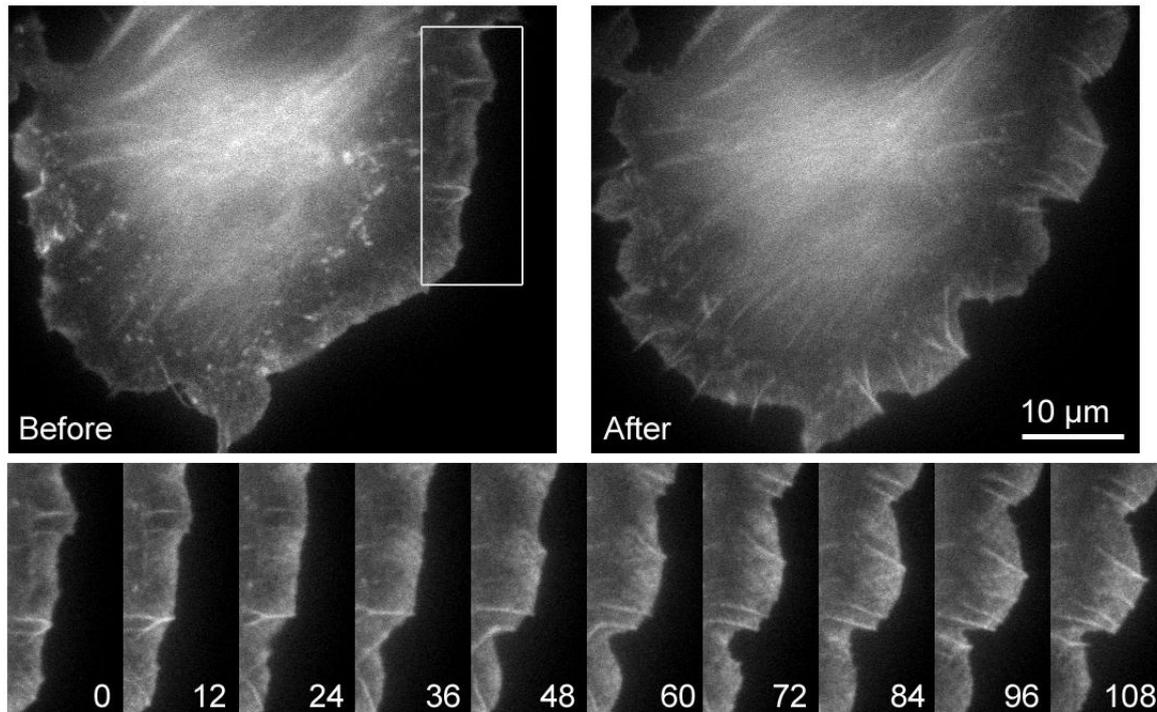


図 8. mEGFP-Actin を発現した Rat2 細胞の蛍光生細胞イメージング

上にタイムラプスを撮り始める前および後の細胞の写真を示す。スケールバーは 10 μm 。四角く囲んだ部分の時間変化を下でのモンタージュで示してある。細胞周辺部が伸長していくに従って、細胞内のアクチンフィラメント構造が変化していく様子が分かる。数字は秒を表している。

5. 参考図書

ビデオ顕微鏡—その基礎と活用法, Shinya Inoué, Kenneth R. Spring 著, 寺川 進, 渡辺 昭, 市江 更治 訳 (共立出版, 2001年)

Handbook of Biological Confocal Microscopy 3rd ed., James B. Pawley 編 (Springer, 2006年)

ヘクト光学1 基礎と幾何光学, Eugene Hecht 著, 尾崎義治, 朝倉利光 訳 (丸善, 2004年)

ヘクト光学2 波動光学, Eugene Hecht 著, 尾崎義治, 朝倉利光 訳 (丸善, 2004年)

The Image Processing Handbook 5th ed., John C. Russ 著 (CRC Press, 2006年)

Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rd ed., Joseph R. Lakowicz 著 (Springer, 2006年)

講義と実習生細胞蛍光イメージング—阪大・北大顕微鏡コースブック, 原口 徳子 著・編, 平岡 泰, 木村 宏 編 (共立出版, 2007年)

Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols (Methods of Biochemical Analysis, Volume 47, 2nd ed.), Martin Chalfie, Steven R. Kain 編 (Wiley-Liss, 2005年)

Fluorescent Proteins (Methods in Cell Biology, Vol.85, 2nd ed.), Kevin F. Sullivan 編 (Academic Press, 2007年)

Live Cell Imaging: A Laboratory Manual 2nd ed., Robert D. Goldman, Jason R. Swedlow, David L.

Spector 著・編 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009年)

Bioconjugate Techniques 2nd ed., Greg T. Hermanson 著 (Academic Press, 2008年)

Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow, David Lane 著 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988年)

Making and Using Antibodies: A Practical Handbook, Gary C. Howard, Matthew R. Kaser 編 (CRC Press, 2006年)

6. ウニ卵を用いた細胞生物学的実験

6. 1 はじめに

ウニの卵は受精を手軽に行うことができ、分裂・発生の同調性が極めて良いため受精・細胞分裂・初期発生の研究に古くから用いられてきた。卵は等黄卵(卵黄が卵内に均等に分布する)で、初期卵割は全等割を行い、また種類によっては透明で、内部の観察にも有利である。また精子も鞭毛運動研究の良い材料となっている。

6. 2 観察材料

バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*)

分類 後生動物 (Metazoa)

棘皮動物門 (Echinodermata)

ウニ綱 (Echinoidea)

エキヌス目 (Echinida)

産卵期 1月ー4月

(参考) 他のウニの産卵期 (東京近辺)

ムラサキウニ (*Anthocidaris crassispina*) 6ー8月

アカウニ (*Pseudocentrotus depressus*) 10ー11月

タコノマクラ (*Clypeaster japonicus*) 6ー8月

6. 3 実験器具および試薬

顕微鏡、顕微鏡用光源、フラットシャーレ、ピンセット、スライドグラス、カバーグラス、ピペット、試験管 (卵用には赤ラベル、精子用には黄ラベルが貼ってあるものを用いる)、海水、キムワイプ、濾紙、アイスボックス、蒸留水、10 mM アセチルコリン/海水溶液、0.5 M KCl 溶液、ビニールテープ、サランラップ、注射器 (1 ml)、注射針 (25 か 26 ゲージ)、その他。

6. 4 方法と観察・実験

6. 4. 1 採卵と採精

バフンウニはある程度雌雄を見分けることができる。♀は咀嚼器 (= 口、アリストテレスの提灯、Aristotle's lantern) の周辺が黄色っぽく、♂は白っぽい。放卵及び放精を引き起こさせるには様々な方法がある。ここではアセチルコリン (acetylcholine) の溶液を用い

る。咀嚼器の周囲の皮膚に注射針を 1 mm~2 mm 差し込み、1-10 mM アセチルコリン溶液を 0.05~0.1 ml 注入する。すると口の反対側にある五つの放卵口、もしくは放精口から、放卵もしくは放精が始まる。この方法によりウニを生かしたまま採卵、採精できる。卵や精子の量が少なければ咀嚼器をピンセットもしくは解剖バサミで切り取って除去し、体腔液も除去したのち、体腔に 0.5 M KCl 溶液をピペットで適量注ぎ込む。

♂は放精口を下にしてシャーレ上におく。しばらくして溜った精液の濃い部分をピペットで吸い取り、氷冷して保存すると 2-3 日は使える。使用前に海水で希釈する。

♀は、海水を満たした小口のビーカーもしくは広口試験管の上に放卵口を下にして置き、放卵された卵が底にたまるのを待つ。上澄みの海水を捨て、新たに海水を加える。卵が沈んだら希釈して以下の実験に用いる。KCl で放卵させた場合は卵の洗浄をもう二度繰り返す。この時注意してみると、沈んだ卵の体積が洗浄後では増えていることに気付くであろう。これは卵を包んでいるゼリー層が膨潤するためである。卵の洗浄の時、手回し遠心機を使うとはやい。卵は室温で置いておき 5-6 時間以内に使う。

ウニは♀、♂とも使い終わったら速やかに海水にもどしてやる。

観察 1. 未受精卵と精子の観察ならびに大きさの測定

試料を両端のあいたスぺーサー付スライドグラスにとり、カバーグラスをかけた後、余分の海水を小さく切った濾紙で吸い取る。そしてまず 10 倍、続いて高倍率の対物レンズで観察する（必ず低倍から始める）。この時、横から見ながら対物レンズをカバーグラスの上 1 mm 程度まで下げ、その後ゆっくりと対物レンズを上げて行くこと。なお、高倍率で観察する場合には、シャーレをステージに載せるのではなく、必ずスライドグラスを用いること。

（注意 1）精子には黄色、卵には赤のビニールテープを貼ってあるピペットおよび試験管を区別して用いること。特に精子を扱ったピペットでは、けっして未受精卵を扱ってはならない。さもないと知らぬ間に受精が起こり、未受精卵のつもりで受精卵を観察してしまうことになる。

（注意 2）放精されたままの濃い状態の精子は、氷上で長時間保存できるが、海水で一旦薄めるとせいぜい 20 分ほどしかもたない。従って、受精にはなるべく新しく薄めた精子を用いること。

6. 4. 2 受精

フラットシャーレに卵懸濁液をとり、海水を加えて深さ 5mm 程度にする。これに希釈した精子液を 1~2 滴加えて、手早く混ぜる。ピペットでこの一滴をとり、スライドグラスにのせ、顕微鏡観察する。精子を加えて 1 分程で受精膜が形成される。

観察 2. 受精とそれに伴う変化

受精の過程を観察するために、両端のあいたスぺーサー付きスライドグラス上に卵を含む海水を一滴とり、カバーグラスをのせる。対物レンズを 10 倍にして卵にピントを合わせる。卵の密度は、視野内に 10 個以上が見られるのが望ましい。つぎにグラスの片端に精子を含ん

だ海水を少量加え、必要に応じて反対側から濾紙で海水を吸い取る。精子は泳いでやがて卵子とぶつかり受精する。卵に精子が接近してくるのを確認したら、卵に起こる変化を注意深く観察すること。次にフラットシャーレに深さが 5 mm 程に海水を入れ、卵を含む海水を数滴加える。これに希釈した精子液を一滴加え良く混ぜる。1～2 分後に一滴をスライドグラス上にとり、受精膜の上だったものと上がらないものの数を数え(50 以上)受精率が 90%以上であることを確認する。

(参考 1) 一つの精子が卵表面に到達し、進入すると透明な受精膜が卵表面から膨らみ始めやがて卵全体を包む。バフンウニの受精膜はよく膨らむので観察しやすい。精子の進入点がちょうど卵の真横だと、卵のその部分がふっくらと盛り上がってくるのを観察できる場合がある。これを受精丘と言う。受精丘にはアクチン繊維が重合して集まっており、精子を飲み込む構造と考えられている。

(参考 2) このように人工的に精子を与え受精させることを媒精 (insemination) という。媒精の最適濃度は卵近傍において精子数匹/卵であり、卵あたりの精子の数が多すぎると多精 (一つの卵に多数の精子が進入し多核となる) となり、発生が正常に進まない。また逆に少なすぎると受精率が悪くなる。

6. 4. 3 細胞分裂

受精率が 90%以上であったら培養を続ける。水温は 15～20℃程度が最適である。気温が低い時 (20℃以下の時) は、フラットシャーレに蓋をし、温水インキュベーターに入れる (但し水が混入しないように注意すること。また、顕微鏡にのせる時にはよく底を拭き、ステージを濡らさぬこと)。気温によるが、受精後 1～1.5 時間ぐらいで第一分裂の核分裂期にはいる。これは核膜の消失に始まり、微小管から成る分裂装置の形成、染色体の分裂、その移動、そして娘核の形成と進むが、これらの過程はバフンウニでは卵黄粒が多く細胞質が不透明であるため、諸君の使用する顕微鏡でははっきりとは見えない場合が多い。しかし前中期の核膜の消失は、少量の卵懸濁液 (<1 滴) をスライドグラスにのせ、カバーグラスをかけ、余分の海水を濾紙で吸い取って卵をつぶしぎみにすることにより観察できる。また分裂装置は色素顆粒が排除された眼鏡状の形状として観察される。また前期の核膜の消失は、スぺーサーを用いないスライドグラス上で海水を濾紙で吸い取ることによって減らし、卵をカバーグラスで若干押しつぶしてやすと観察可能である。受精後 70～80 分位で分裂溝が形成され二つにくびれていく (細胞質分裂、卵割)。分裂溝にはアクチン繊維でできた収縮環が形成されており、アクチンとミオシンの相互作用による収縮で細胞をくぶり切ることが分かっている。

観察 3. 細胞分裂

細胞分裂の起こる前後の細胞の様子を注意深く観察すること。また、細胞質分裂においてくびれの形成の様子を観察するとともに、受精後、第一分裂までの時間、くびれきるまでにかかった時間も測定すること。

(注意 3) ランプを光源とする場合、つけっぱなしにしておくと海水が温まり蒸発するので、観察しないときには必ず電源スイッチを切ること。また、長時間シャーレの蓋を開け放しにしておくと、水分が蒸発するのでなるべく蓋をしておく。もし長時間開け放しにしてお

いた場合(2-3時間)には、卵を吸い取らないように上澄みの海水をピペットで吸い取り、新たに海水を等量加えるとよい。

6. 4. 4 初期卵割

第二分裂はやはり等割で、第一分裂面に垂直な面でおこる(経割)。第二分裂までの時間は、第一分裂までの時間に比べると短くなる。第三分裂はやはり等割であるが、前二者に対して垂直な面で割れる(緯割)。第四分裂は赤道面をはさんで、等割である経割と不等割である緯割に分かれる。等割の生じた側の極を動物極と呼び、生じた8個の細胞を中割球と呼ぶ。反対側の極を植物極と呼び、植物極半球の極付近の小さい4個の細胞を小割球、赤道側の4個の大きい細胞を大割球と呼ぶ。この時点までに各細胞の分化的運命は既に決定している。この時期以後では、分裂していく個々の細胞を追跡する事は困難になる。この後数時間が経過し、まだ表面の凹凸がわかる程度(いくらか不規則な割球の集合した状態)の胚を桑実胚とよぶ。

(注意4) フラットシャーレのまま観察する時には、対物レンズを海水につけないように注意すること。もし誤ってつけてしまったら、海水の付着したレンズ周りを蒸留水で洗い、ティッシュペーパーでよく拭くこと。

6. 4. 5 桑実胚以後の発生

桑実胚以後は、3~4日かけてプルテウス幼生となり、1ヶ月以上後に変態して親ウニとなる。それまでの過程は以下の解説の項を参照されたい。

実験1. 受精膜の除去

受精膜は多精の阻止に働き、また発生中の胚を保護する物理的・化学的に丈夫な膜である。しかし、これが形成される途中をねらえば除去することができ、以下の2、4のような実験を行うことができるようになる。

50~100 ml のビーカー中で卵を比較的高密度で受精させ、精子を加えてから一部をスライドグラスにとって受精膜の形成の様子を観察する。精子侵入点からあがってきた受精膜が卵全体をおおった瞬間に(媒精約1分後)、卵懸濁液の約10倍容の1M尿素-10mM NaHCO₃を加える。受精膜が正常と比べ大きくあがったことを確認したらすぐ、70µmのナイロンメッシュを通して別のビーカーに受ける。この操作により受精膜が除去される。卵を静置し、大部分が底に沈んだら上澄みをアスピレーターで除去し、CaFSWを静かに加える。尿素中では卵が弱るのでこの時激しく加えると卵がこわれてしまう。また尿素中に卵を長時間おくのは良くない。同様な操作でCaFSWによる洗浄をさらに2回繰り返す。(海水でなくCaFSWを用いたのは、次の2、4の実験のためである:微小管、アクチン繊維ともCaイオン存在下で破壊されるおそれがある)。この卵を静置状態で培養し、発生した胚の状態を観察してみるといい。

CaFSW の組成(5l中)

NaCl	138 g
KCl	3.5 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	17 g

MgSO ₄ · 7H ₂ O	60.5 g
NaHCO ₃	10 g

実験 2. 分裂装置(MA)の単離

バフンウニ卵の場合、分裂装置 (mitotic apparatus, MA) は観察しにくいですが、単離すると染色体や微小管の配列の様子がよくわかる。単離分裂装置は分裂装置の成分の解析、その微細構造の観察、染色体運動の人為的誘導などの研究に用いられてきた。

受精膜を除いた卵を CaFSW 中で飼育する。核膜が消え、卵が中期に達したことを確認したらスピッツ管に移し、手廻し遠心機で卵を集める。卵の量は 0.1 ml 以下がよい。海水をアスピレーターで除き、一度 1 M glucose で洗浄する。遠心した卵に 5 ml の MA 単離液を加え、スピッツ管を激しく振って細胞膜を壊す。単離 MA の観察には位相差照明かノマルスキー照明を用いる。これらの操作はできるだけ手早く行う。

MA 単離液の組成

- 0.5% Nonidet P-40(NP-40)
- 1 M glycerol
- 10% (v/v) dimethylsulfoxide
- 5 mM MgCl₂
- 2 mM EGTA
- 10 mM MES buffer, pH 6.2

実験 3. サイトカラシン B、ラトランキュリン A による細胞質分裂の阻害

サイトカラシン B (cytochalasin B) はカビの一種から得られる抗生物質で、アクチン繊維の B 端に結合する。ラトランキュリン A (latrunculin A) は海綿から得られた物質で G-アクチン (アクチンモノマー) に結合し、重合を阻害する。いずれも細胞膜を通過するので細胞内のアクチン繊維に影響を及ぼす。受精後 50 分ほどたった卵に、これらの物質を 0.1~2 μ g/ml の濃度に加え*、第一分裂に対する影響を調べよ。この時、核分裂についても 1 に述べたような方法で卵を押しつぶしぎみにして観察するとよい。また分裂阻害が見られた場合、その可逆性についても調べよ。

アクチン繊維が実際にどういう影響を受けているかは、以下の実験 4 の方法を行うことにより蛍光観察できる。ただし予め受精膜を除去しておく必要がある。

*原液はジメチルスルフォキシド(dimethyl sulfoxide, DMSO)に溶かしてある。

実験 4. 収縮環の観察

アクチン繊維は多数存在していても微小管のように光学顕微鏡で観察できない。そこで蛍光顕微鏡を用いて観察を試みる。スライドガラスにビニールテープを 2 cm 角位の大きさに貼り、カッターでスリットを作る (図 4)。スリットに 10 mg/ml プロタミン溶液をのせ、10~20 分置き、プロタミンをガラス表面に吸着させる。プロタミン溶液をピペットで除去し、スライドガラスを放置して乾燥させておく。

受精膜を除去した分裂中の卵の懸濁液をスリットにのせ、1分ほどおいて、卵をスライドグラスに接着させる。片手でアスピレーターを使い、もう片手でパスツールピペットを使ってCaFSWを固定液と交換する。交換したら液が蒸発しないようスライドグラスをスチロールケースに入れて30分放置する。さらに0.2% NP-40のはいった固定液で30分処理する。その後、固定液をglycerol-F-bufferで洗い流し、最後にglycerol-F-bufferで1/50希釈したローダミンファロイジン（アクチン繊維染色物質） $1 \mu\text{g/ml}$ DAPI (DNA 染色物質) 0.1 M β -mercaptoethanol 溶液をを50 μl 加え、カバーグラスをかけて観察する。ローダミン観察にはGフィルター、DAPI観察にはUVフィルターを用いる。器用な人は染色溶液を加えてからビニールテープをはがし、カバーグラスをのせ、余分な液を可能な限り濾紙で吸い取り、卵をカバーグラスでつぶすようにしてみるとよい。カバーグラスの縁はマニキュアで封じて乾燥を防ぐ。このようにするとアクチン繊維の様子を詳しく観察できる。ただし、カバーグラスによって卵を斜めの方向に押す力が加わると卵は簡単にこわれてしまい原型をとどめなくなってしまう。

固定液の組成

5% Formalin

0.7 glucose

0.1 M KCl

2 mM MgCl₂

5 mM EGTA

10 mM MOPS buffer, pH 7.4

\pm 0.2% Nonidet P-40

glycerol-F-buffer

0.8 M glycerol

0.1 M KCl

2 mM MgCl₂

5 mM EGTA

10 mM MOPS buffer, pH 7.4

6. 5 解説

1) 受精 fertilization

卵の細胞膜のすぐ外側にはタンパク質でできた卵膜(vitelline coat)があり、その外側に糖タンパク質でできたジェリー(jelly)層がある。卵の細胞膜の内側には細胞膜に接して直径1 μm ほどの表層粒(cortical granules)がびっしりしきつめられている。精子はジェリー層に到達すると失体反応(acrosome reaction)を起こし、ジェリー層、卵膜を溶かす酵素を放出するとともに失体系を伸長させてこれらの層をつき進む。精子と卵の細胞膜同士が融合するとその近辺の表層粒の膜が細胞膜と融合して内容物が外部に放出され、卵膜と結合する結果受精膜が形成され、また透明層も形成される。この反応を表層反応と呼ぶ。この反応は1分以内に卵の全域に及び、受精膜が完成する。精子の侵入した部位の卵表層ではアクチン繊維(actin filaments)が重合して盛り上がる。これを受精丘と呼ぶ。このアクチンの重合は1~2分の

うちに卵の全表層に及ぶ。また数分のうちに表層全域で微絨毛(microvilli)の伸長がおこる。微絨毛の中にはアクチン繊維の束がみられる。侵入した精子核のまわりには中心体を中心として微小管が重合し、星状体(aster)が作られる。精子核と卵核は微小管(microtubules)の働きによって引き合い、受精後 15 分位で近接し合体する(この時期を受精と呼ぶ場合もある)。

2) 細胞分裂 cell division

精子核と卵核の融合の後に DNA 合成がおこり染色体数は $4n$ となる。また、中心子の複製がおこって、2 つの中心体がそれぞれ星状体を伴い、核の両側へ移動して分裂の極となる。これが核分裂前期(prophase)である。前中期(prometaphase)には核膜が崩壊し、星状体微小管が核の内部に侵入して染色体を動原体部位でとらえる。次の中期(metaphase)には染色体が細胞赤道面に円盤状に配列する。この時染色体を微小管に沿って動かすモータータンパク質が働いていると考えられている。この結果、紡錘体と星状体から成る”分裂装置”(mitotic apparatus)が完成する。後期(anaphase)には突如としてすべての染色体が 2 つに離れはじめ、動原体に付着した微小管に引かれるようにして両極へ等速で移動する。これが後期染色体運動であり、多くの細胞生物学者を魅了し続けている現象である。この時に、前中期とは異なるモータータンパク質が働いていると考えられている。移動した染色体は両極に到着すると胞状となり互いに融合して娘核を形成する。これが終期(telophase)である。以上が細胞分裂の前半の核分裂の諸過程である。

終期のはじめに赤道面の卵表層にアクチン繊維が集積しはじめ、次第に細胞をとりまくリングになっていく。このリングは収縮環(contractile ring)と呼ばれ、動物細胞の細胞質分裂の際に一般的にみられる構造である。収縮環の形成は分裂装置が出す何らかのシグナルによっておこると考えられているがその実体は今のところ謎である。収縮環にはアクチン繊維とともにミオシン(myosin)も含まれ、これが ATP を加水分解することによって放出されるエネルギーで収縮がおこる。これが細胞質分裂(cytokinesis, 卵の場合は卵割とも呼ぶ)である。収縮環は分裂後には再び消失してしまう。収縮環のこのダイナミックな性質は真核細胞の様々な運動系の典型的な例といえる。

3) 初期発生

桑実胚はさらに分裂を続け、表面が比較的滑らかな胚となるが、これを胞胚(blastula)と呼ぶ。この時期、細胞は胚の表面に一層に配列し内部に割腔を生じている。やがて繊毛(cilia)が生え、受精膜内で回転運動をする様子がみられるようになる。続いて孵化酵素が分泌され、受精膜が溶けて胚が泳ぎ出てくる。これを孵化と呼ぶ。出てきた胚は回転しながら活発に泳ぎまわるが、これを遊泳胞胚と呼ぶ。

遊泳胞胚は少しずつ形をおむすび型に変える。この時期、進行方向先端部はやや尖っており、ここに生えている繊毛は長く、あまり運動しないので観察しやすい。こちらが動物極である。一方後部(植物極側)では注意深く観察すると、細胞が細長く、細胞の層が厚くなっており、さらに割腔内に入り込んでいる細胞があることがわかる。この腔内に落ち込んだ細胞群を、第一次間充織細胞と呼ぶ。この第一次間充織細胞は 16 細胞期の小割球由来のものであり、後に骨片を形成する。やがて植物極側の表層の細胞は更に割腔の中に陥入していく。こうしてできた管状のくぼみの開口部を原口と呼び、管の部分を原腸と呼ぶ。原腸は陥入を

続け、動物極側の天井に達する。そして原腸の先端部を構成している細胞の一部が、また腔内に落ち込む。これは第二次間充織細胞と呼ばれ、後に中胚葉となる。なお原腸は内胚葉となる。原腸の陥入がおこっているこの時期の胚をのう胚（原腸胚, *gastrula*)と呼ぶ。

やがて原腸胚はおむすび型から円錐型に変わり、原腸は少し曲がって側面に達しそこに新たに開口部を作る。さらに全体の形は四面体が変わっていく。この時期をプリズム型幼生 (*prism*)と呼ぶ。ここで新たにできた開口部が口であり、原口は肛門となる。このような発生過程を経るため、後口動物と呼ばれるのである。原腸は食道、胃、腸へと分化する。

一方、新たに作られた口を含む面の三つの頂点は、内側に骨片の形成をともないつつ、さらに伸びて腕を形成する。こうしてプルテウス幼生 (*pluteus*)が誕生する。プルテウス幼生になるまで、3~4日を要する。その後消化器側面にウニ原器が形成され、そこに形成される管足、刺がやがて体外に飛び出てきて変態を行い親ウニとなる。

参考書：

バイオマニュアル UP シリーズ：細胞生物学の基礎技術「細胞骨格、細胞運動へのアプローチ」 羊土社

現代発生生物学シリーズ3：海産無脊椎動物の発生実験 培風館