

レーザ式マイクロインジェクタの開発

Development of Laser Microinjector

外来の遺伝子を培養細胞に移入するマイクロインジェクションは、有用生成物の生産や生体のメカニズムを解明しようとするニューバイオテクノロジーに不可欠であり、農業から医薬、化学、食品にと広範な産業分野に応用されつつある。こうした遺伝子移入法の一つとして、昭和58年、理化学研究所はレーザを用いた新しい方法を開発し、日立製作所は今回この技術を導入して、レーザ式マイクロインジェクタを製品化した。

従来、細胞内に遺伝子を移入するには、遺伝子や細胞を化学的に処理して細胞膜の透過性を良くし遺伝子を移入する方法や、顕微鏡下で微細針を操作して移入する方法がある。

しかし、これらの方法は熟練と多大な労力を必要としたり、細胞の損傷のため発現効率が悪くなるという問題があった。レーザ式マイクロインジェクタは、こうした問題を解決するもので、操作性、処理速度、発現効率を大幅に向上させた装置である。

1 緒言

近年、急速な進歩を見せている細胞工学や遺伝子工学は、各種の新しい技法の導入によりいっそうの飛躍が期待されている。なかでも外来の遺伝子を培養細胞に移入するマイクロインジェクションは、有用生成物の生産や生体のメカニズムの解明を行おうとするニューバイオテクノロジーに不可欠であり、農業から医薬、化学、食品にと広範な産業分野に広がっている。こうした遺伝子移入法の一つとして、昭和58年、理化学研究所はレーザを用いた新しい方法(レーザ法)を開発し、日立製作所は今回この技術を導入して、レーザ式マイクロインジェクタを製品化した。

従来、遺伝子を細胞内に移入するには、遺伝子や細胞膜を化学的に処理して細胞膜の透過性を良くして遺伝子を移入する方法や、顕微鏡でのぞきながら微細針を使って細胞膜を開孔し遺伝子を移入する方法などが採用されている。しかし、化学的な処理方法では発現効率が低く、また微細針を使う方法では操作に熟練と多大な労力を要するといった問題がある。

一方、固い細胞壁に覆われている植物細胞には、化学的な処理で細胞壁を取り除き、異なる細胞を融合させて多核細胞にする細胞融合の方法があるが、目的以外の遺伝子も移入されるという問題がある。

レーザ式マイクロインジェクタはこうした問題を解決するもので、操作性、処理速度、発現効率を大幅に向上させた装置である。

以下、装置の詳細について述べる。

木村信夫* *Nobuo Kimura*
 細見信行** *Nobuyuki Hosomi*
 村上 聖*** *Sei Murakami*
 金子忠雄**** *Tadao Kaneko*
 粕谷敬宏***** *Takahiro Kasuya*

2 レーザ式マイクロインジェクタの特長

レーザ式マイクロインジェクタのシステム構成図を図1に、外観を図2に示す。本装置は作業用レーザと、これを可視化するパイロットレーザを同軸にして対物レンズで細く絞り込み、試料の生細胞に照射して細胞に微小な孔をあける装置である。試料の細胞は、図1の右下に示すように遺伝子を溶かした培養液に接しており、レーザで細胞をせん孔した瞬間、培養液に溶けた遺伝子が微量細胞内に取り込まれる。また、せん孔した箇所は速やかに自己修復する。

レーザの照射方法にはモニタテレビジョン上に細胞を映し出し、照射希望の部位をライトペンで指示して1個1個確実に照射する方法(ポインティングモード)と、レーザは一定パルスで発振させておき、試料台のXYステージを一定速度で走査することによりランダムに高速でレーザを照射する方法(スキッピングモード)がある。図1及び図2の各種の制御装置は、上記のモードを可能にするものである。

レーザ式マイクロインジェクタの特長としては次のようなものが挙げられる。

(1) 容易な操作性

モニタテレビジョンとライトペンにより容易に操作できるため、高度な技術や熟練を必要としない(ポインティングモード)。

(2) 大きな処理能力

毎分600パルスまで(スキッピングモード)の自動処理が可能である。

* 日立製作所機械研究所 ** 日立製作所システム事業部 *** 日立製作所笠戸工場 **** 日立製作所機電事業本部
 ***** 理化学研究所マイクロ波物理研究室 理学博士

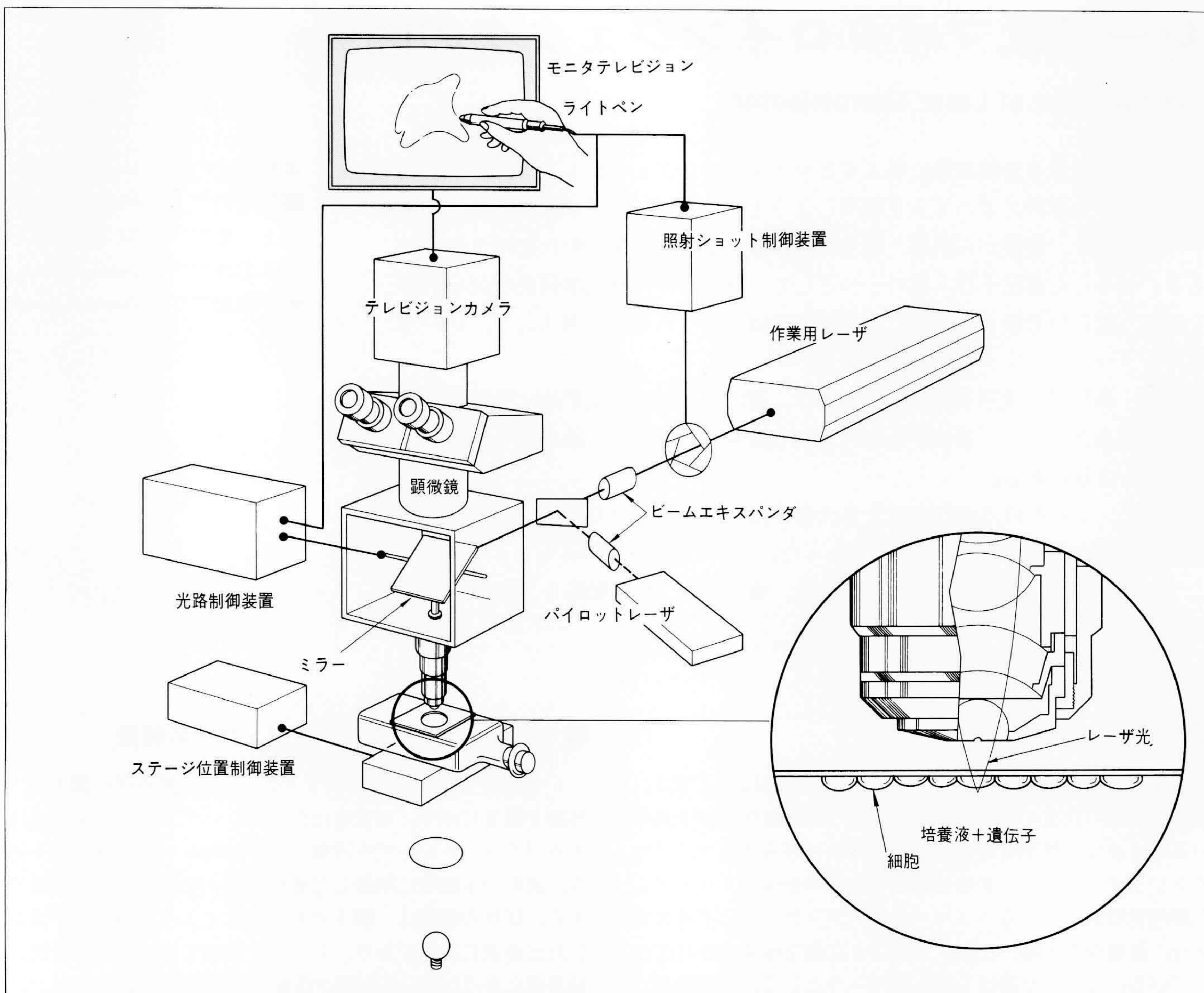


図1 システム構成図 レーザは顕微鏡の対物レンズにより細胞に集光され、細胞に微細な穴をあける。

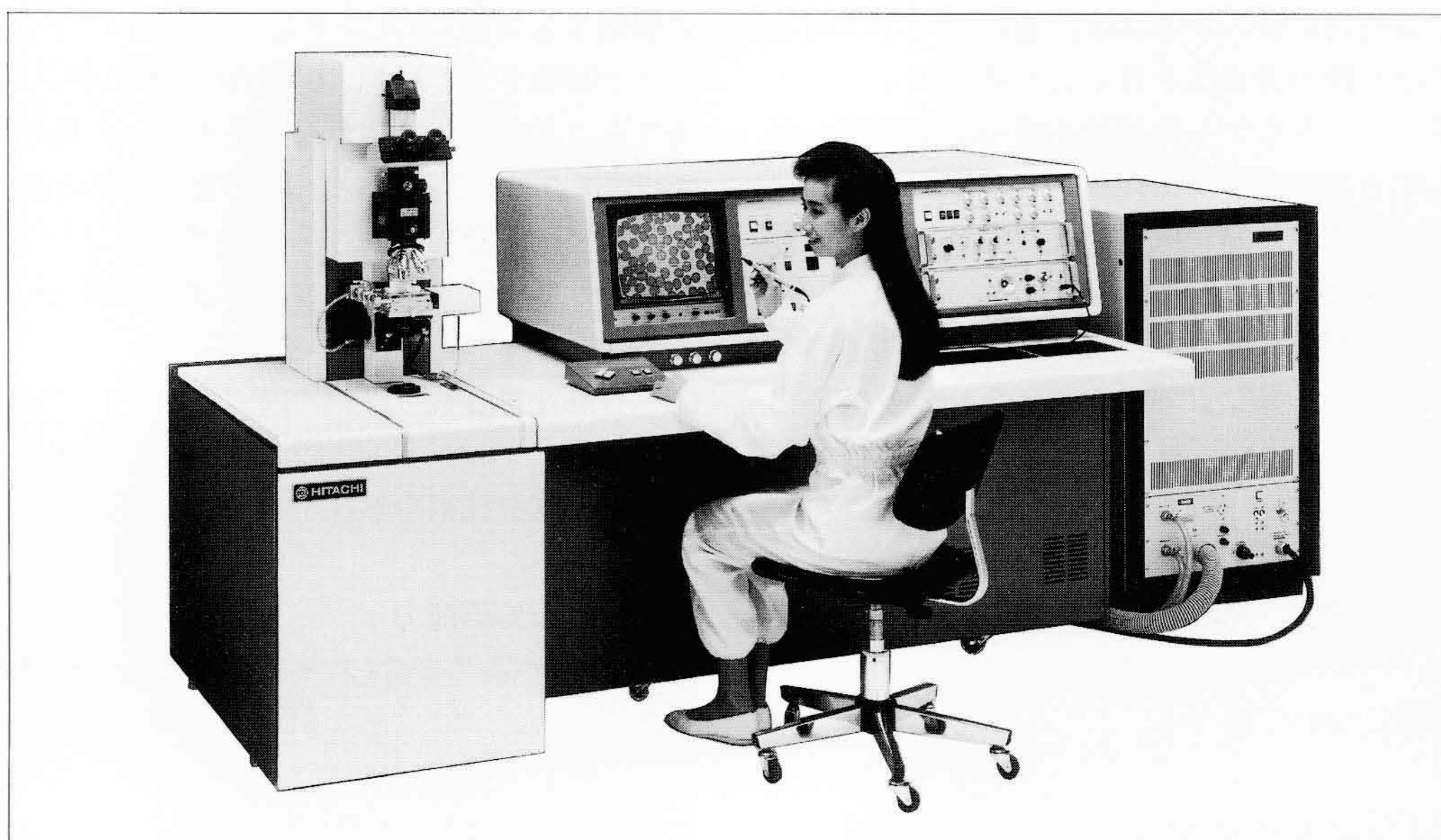


図2 レーザ式マイクロインジェクタの外観 左側から顕微鏡、モニターテレビジョン、制御装置が設置され、作業用レーザーはテーブル下に収納されている。右端はレーザーの電源部である。

(3) 高い形質発現効率

細胞への損傷が少なく、遺伝子によって決定される形質の発現効率を高めることができる。

(4) 多種細胞への広い適用性

レーザ照射の位置、深さ、強度、スポットサイズなどが調整可能であり、各種細胞への遺伝子移入に適用が期待される。

3 装置の構成と機能

レーザ法は、本来、対象にする細胞に応じて種々の物理的パラメータ、例えばレーザ照射の位置、深さ、強度、スポットサイズなどを制御できる自由度を持っている。そのため、装置はこの点を考慮して設計した。

3.1 光学系

図1の作業用レーザはパルス発振のNd:YAG (Neodymium: Yttrium Aluminium Garnet)レーザで、第三高調波(波長355nm, 紫外光)を使用している。第三高調波にした理由は、スポットサイズを小さくするためで、これにより細胞の損傷を最小限に抑えた。パイロットレーザはHe-Neレーザ(波長633nm)である。両者のレーザはビームエキスパンダ、ミラーを経由して、対物レンズに入射する。対物レンズはレーザの集光機能と通常の顕微鏡機能の二つがあり、試料を置く位置(作動距離)は後者により一義的に定まる。ビームエキスパンダは、レーザの焦点面の位置を調整して、上記で設定された試料面とレーザの焦点面を一致させる役目をする。

焦点面近傍を対象にしたスポットサイズの計算例を図3に示す。縦軸はスポットサイズ及び細胞膜のせん孔の可否を決める平均的なエネルギー密度を、焦点面を基準にした相対値で表している。同図のように焦点面から離れるとスポットサイズが大きくなるため、スポットサイズの二乗に逆比例するエネルギー密度は急激に低下する。この現象を利用するとビームエキスパンダを調整することにより、細胞の厚さ方向に対してエネルギーの集中する深さをずらしたり、対物レンズを交換することでスポットサイズをコントロールすることができる。

次にエネルギーについて述べる。生細胞をせん孔する場合、照射したエネルギーが弱すぎればせん孔されず、強すぎれば細胞がバーストする。そのため細胞に応じた適性なエネルギーにコントロールする必要があり、各パルスのばらつきも小さいほうが望ましい。

これに対しYAGレーザの発振特性は、図4にその一例を示すように、発振のしきい値付近(レーザ励起の入力40%)では各パルスのばらつきが非常に大きくなっている。そのため本装置では、YAGレーザの出力をばらつきが小さい箇所に固定し、光路途中に可変減衰器を入れ、この可変減衰器で照射エネルギーを調整する方式にした。これにより照射エネルギーのばらつきを最小限に抑えた。

3.2 制御系

3.2.1 ポインティングモード

ポインティングモードの概要を図5に示す。細胞が映し出されたモニタテレビジョン上にライトペンを押し付けると、

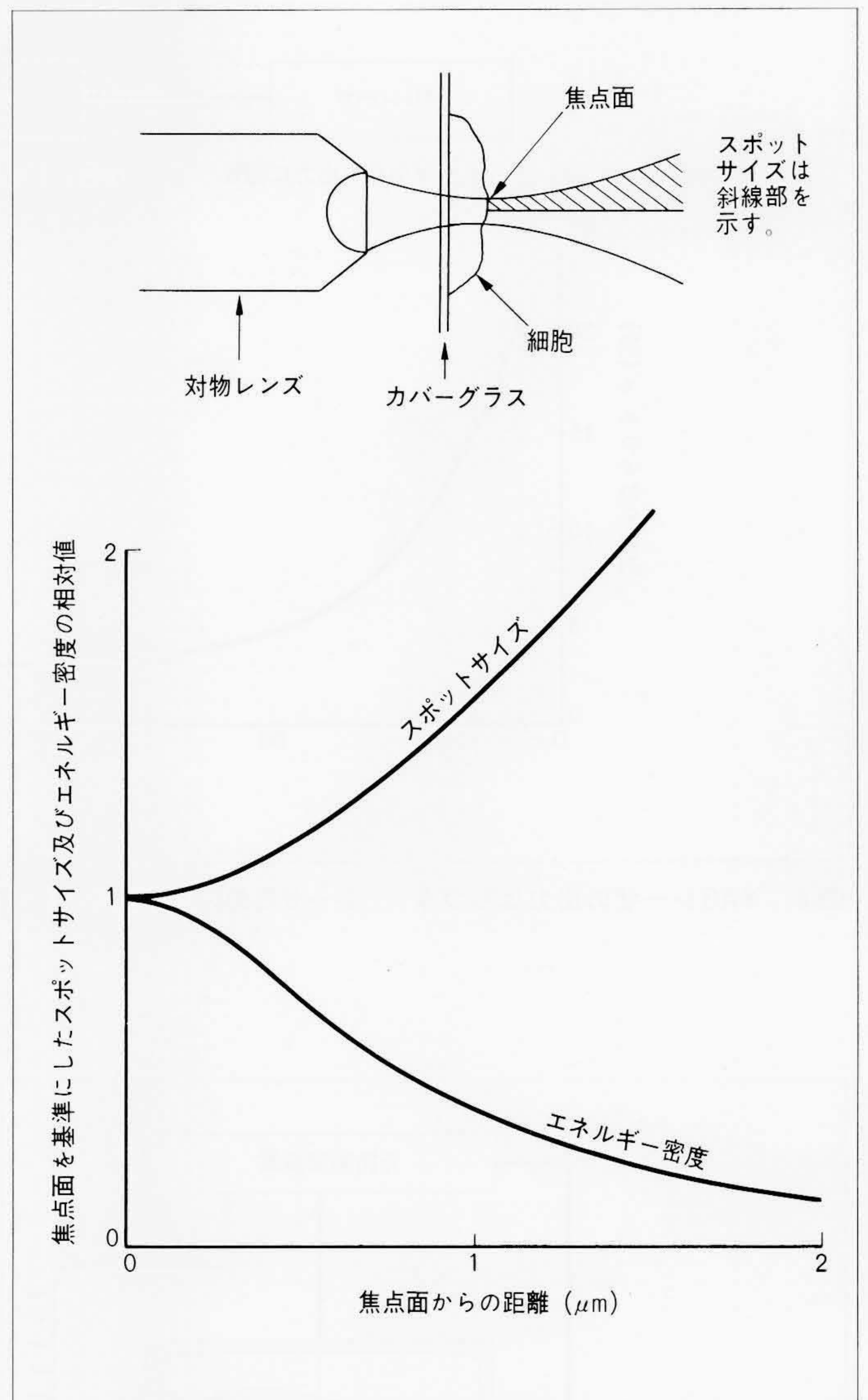


図3 スポットサイズとエネルギー密度の変化 焦点面から離れるとスポットサイズが大きくなるため、エネルギー密度は急激に低下する。

その位置に応じた位置信号が光路制御装置により発生し、光路偏向装置内のミラーが微小角度だけ回転する。このときライトペンはレーザ光路のシャッタ開閉スイッチも兼ねており、上記ミラーでの回転で偏向したレーザは対物レンズを通り細胞上のライトペンでねらった位置に照射される。

この方法では下記のスキヤニングモードより操作速度は遅くなるが、任意の位置にレーザを照射できるため移入の確率が高くなる。

3.2.2 スキヤニングモード

スキヤニングモードの概要を図6に示す。このモードは、シャッタを開いたままの状態を細胞を載せたXYステージをX方向及びY方向にパルスモータで走査する。これにより細胞上に一定の間隔でレーザが照射される。レーザが照射される間隔(照射密度)は、レーザのパルス繰返し周波数及びXYステージの移動速度により変化するため、これらを調整することで細胞の大きさ、分布密度に応じた最適な照射密度を選定することができる。

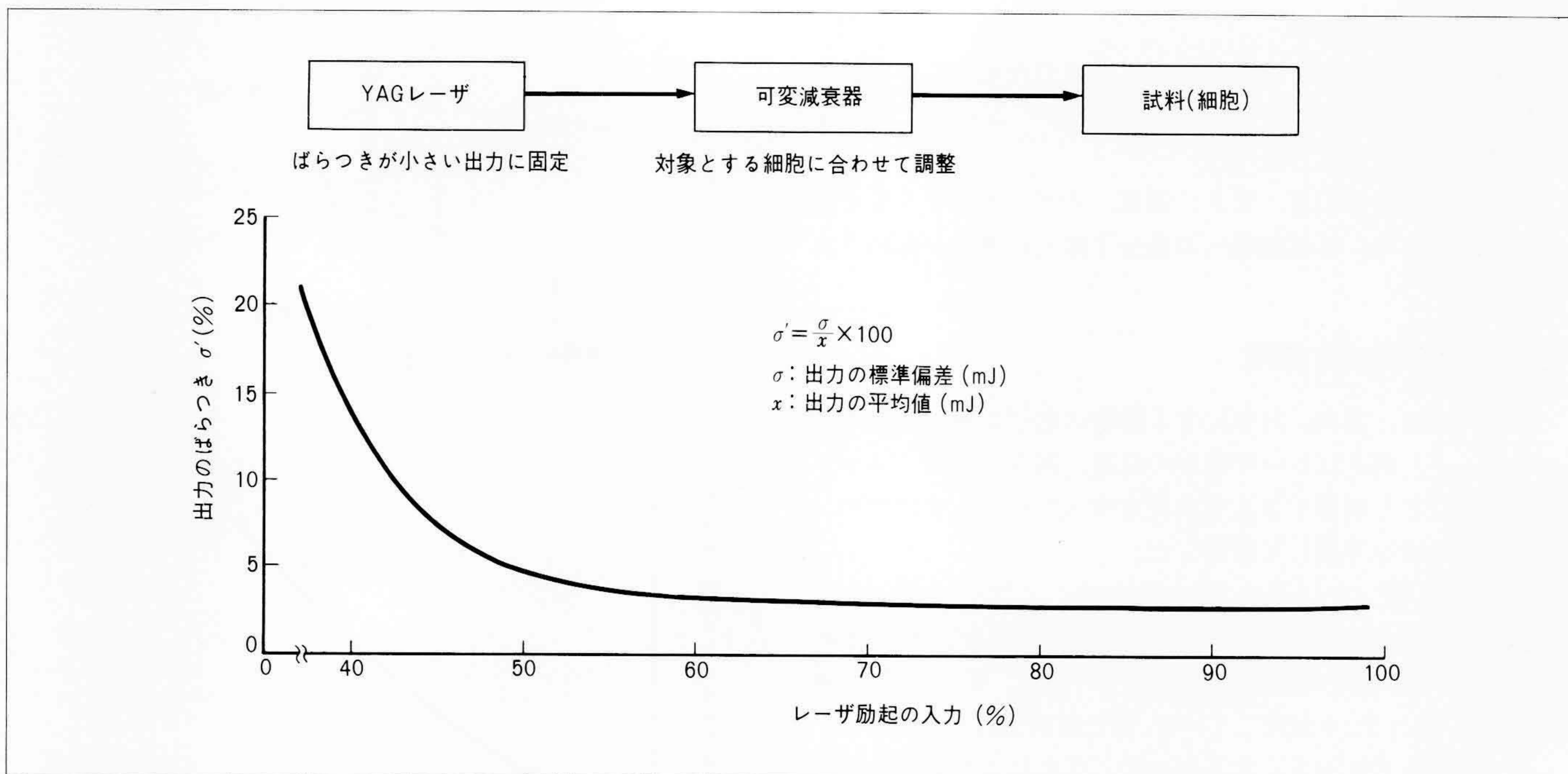


図4 YAGレーザーの出力ばらつき レーザ励起の入力が高いほうでばらつきは小さくなり、細胞のせん孔には適する。

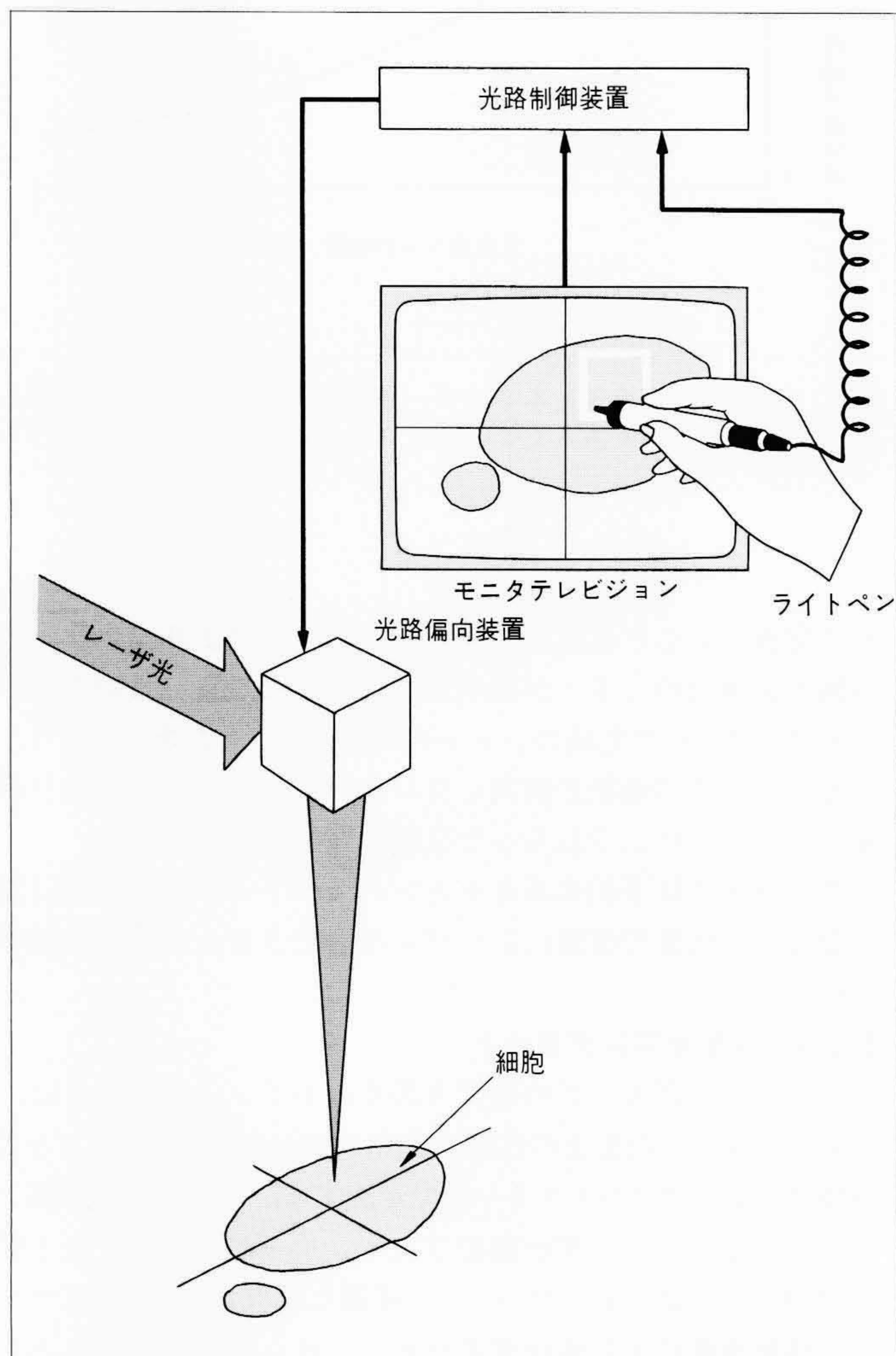


図5 ポインティングモード ライトペンで指示した点と同じ細胞上の位置に、集光されたレーザーが照射される。

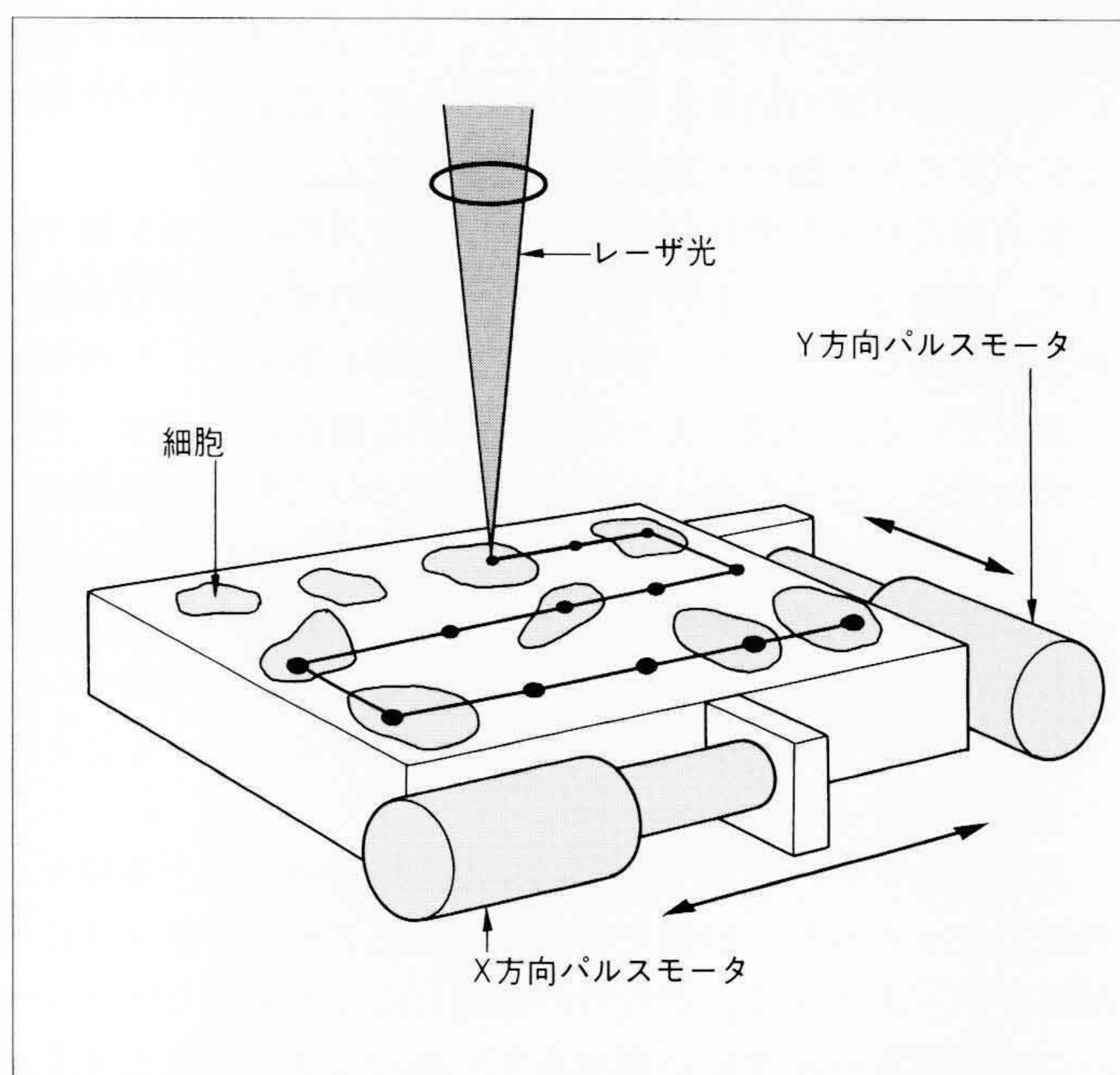


図6 スキャニングモード ステージをパルスモーターでX、Y方向に走査することで、レーザーが細胞上にランダムに照射される。

この方法では、ポインティングモードに比較して移入の確率は低くなるが、大量の細胞を高速で処理することができる。

3.3 せん孔特性

以上、装置の構成について述べたが、本装置のポインティングモードで赤血球をせん孔した例を図7に示す。赤血球内に小さく残っているのがせん孔跡で、直径はサブミクロンのオーダーである。この細胞はスライドガラス上に塗布した死ん

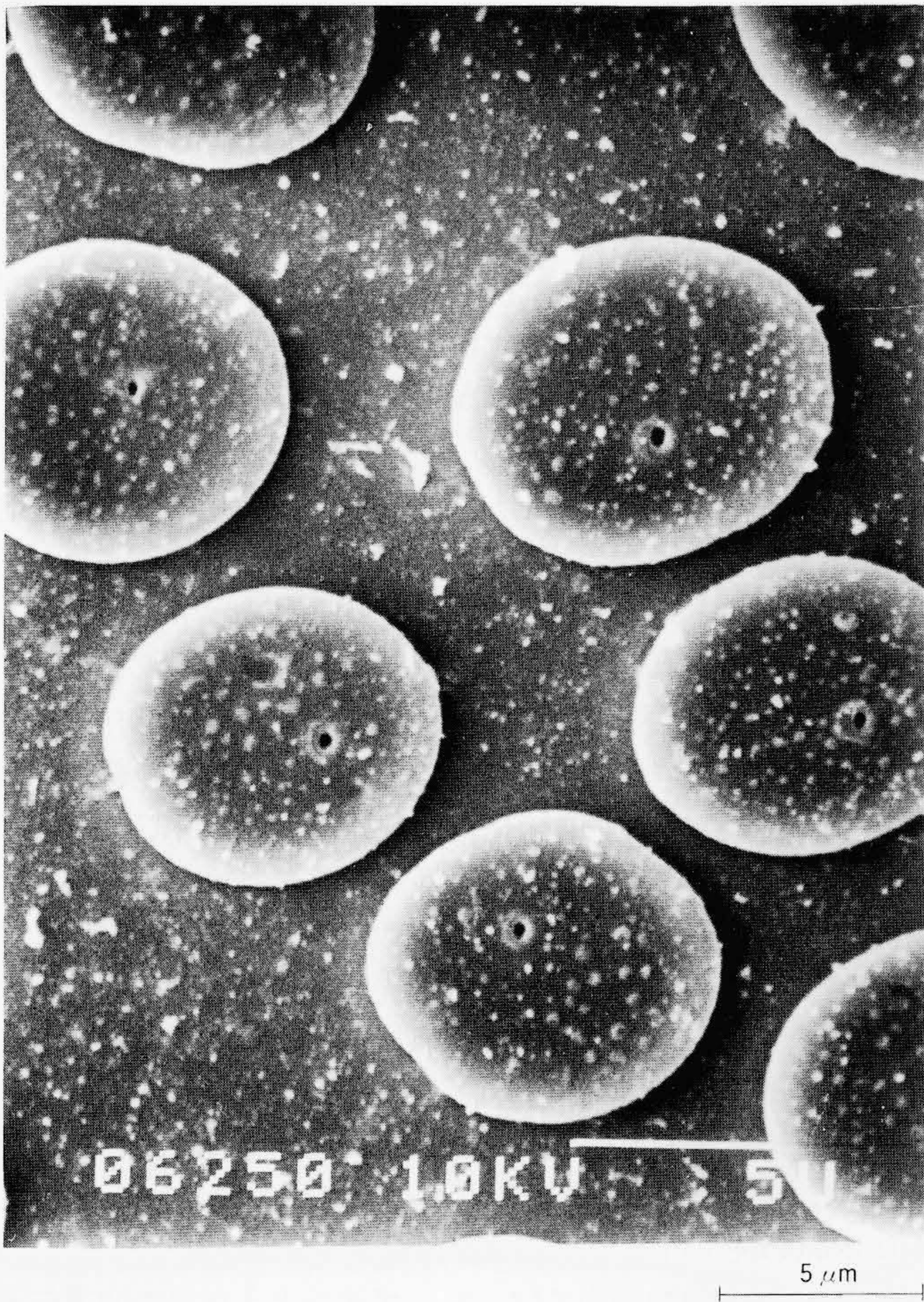


図7 レーザによるせん孔例 赤血球にせん孔したものの電子顕微鏡写真である。生細胞の場合、せん孔された箇所は速やかに修復する。

だ細胞であるためせん孔跡が残っているが、生細胞を対象にした場合、せん孔箇所は速やかに自己修復する。

4 生細胞による試験

本章では理化学研究所で行った遺伝子の移入試験の結果²⁾について述べる。

4.1 遺伝子の移入の検証

まずラットの培養細胞(オズボーンメンデルラット胎児の腎細胞の由来NRK: Normal Rat Kidney)と大腸菌由来のDNA(Deoxyribonucleic Acid: デオキシリボ核酸)断片(大腸菌のプラスミドpBR322にクローンされたpSV2-gpt由来のPvu II-EcoRI断片)を用いたモデル系でレーザ法の有効性を検証した。このDNA断片は、ポジティブな選択マーカーの代表例であるEco gptを載せている〔図8(a)〕。検証方法は図9に示すように、遺伝子を溶かした培養液にラットの培養細胞NRKを接触させ、その右側半分だけにスキャニングモードでレーザを照射し、その後MPA(マイコフェノリック酸)とX(キサンチン)を含む選択培地で4日間培養した。その結果、図10(a)に示すように、レーザを照射した右側半分だけが分裂増殖した。これは図8(b)に示すように、DNA合成がIMP(Inosine 5'-Monophosphate)からXMP(Xanthosine 5'-Monophosphate),GMP(Guanosine 5'-Monophosphate)へというステップを踏み、

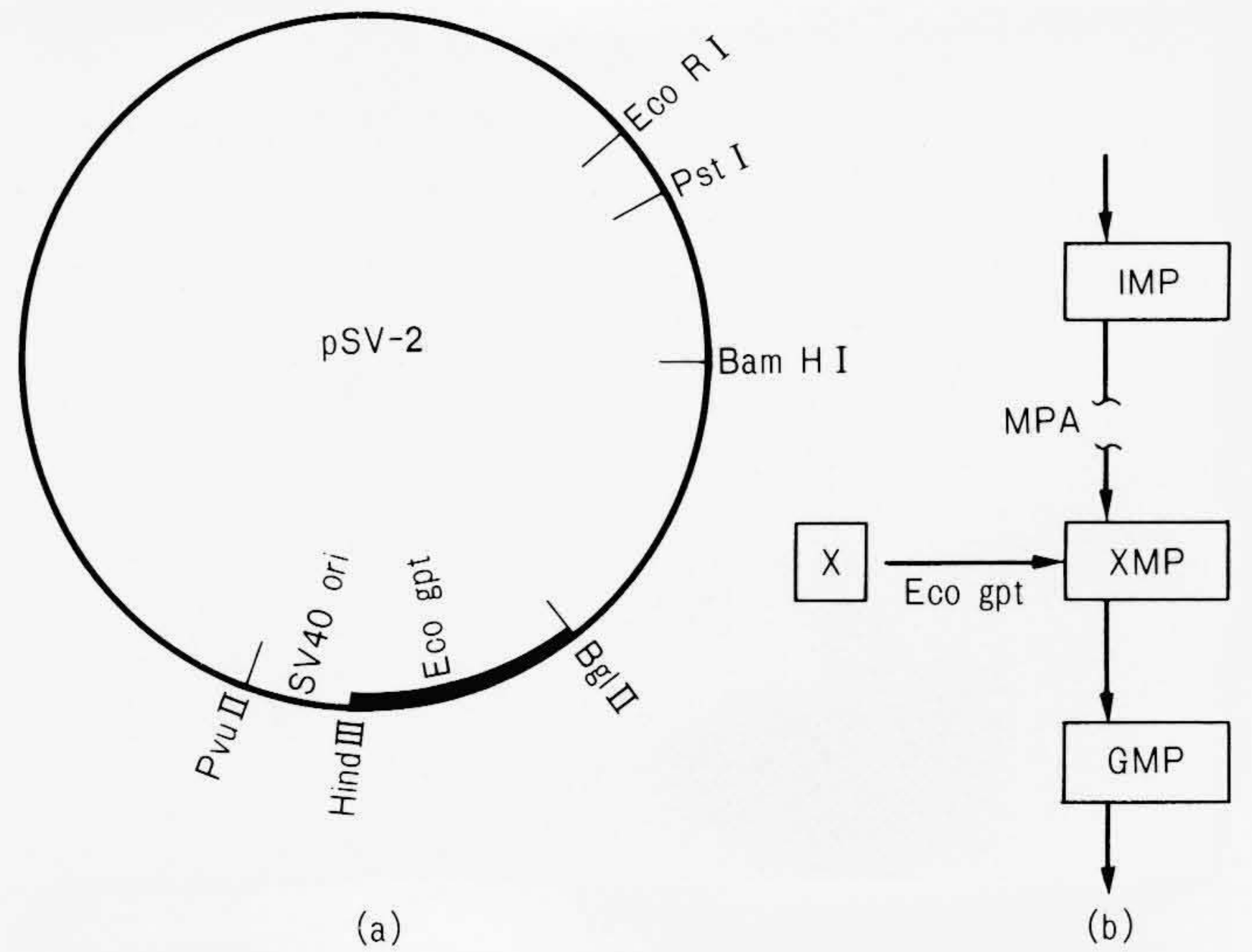


図8 検証試験のためのモデル系 MPA(マイコフェノリック酸)は、IMP(Inosine 5'-Monophosphate)からXMP(Xanthosine 5'-Monophosphate)のステップを阻害するが、遺伝子Eco gptはX(キサンチン)をXMPへ変換する。

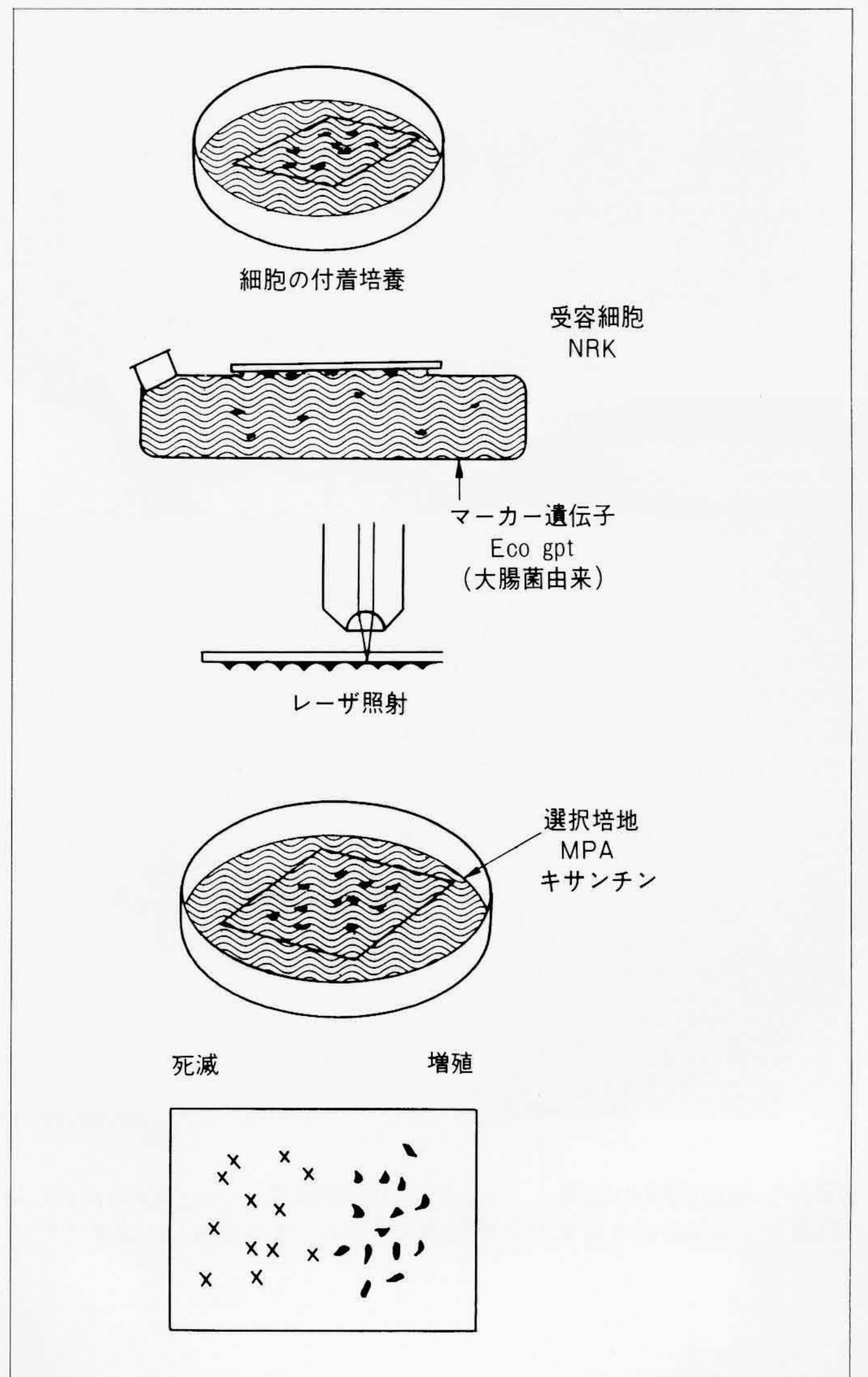
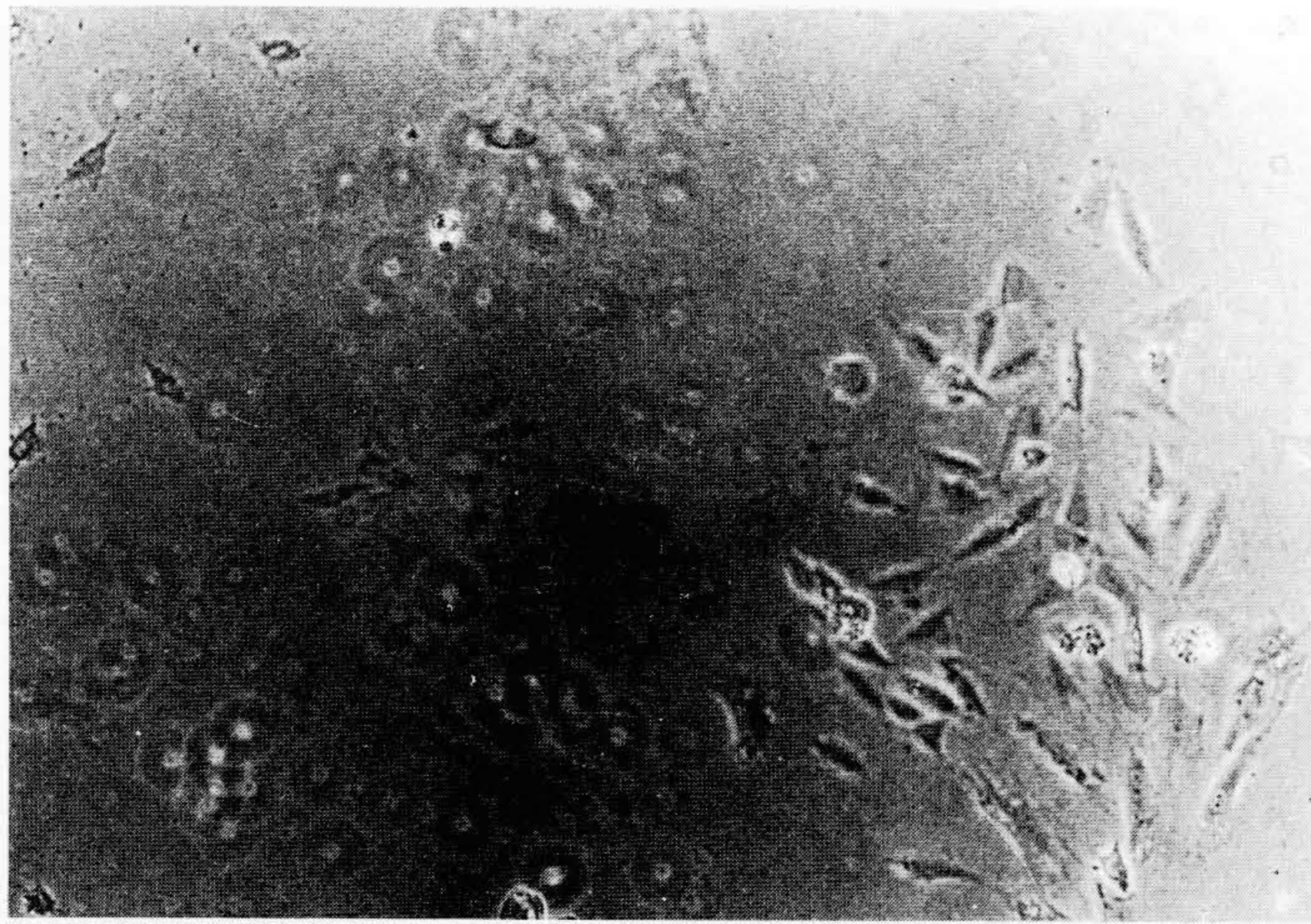
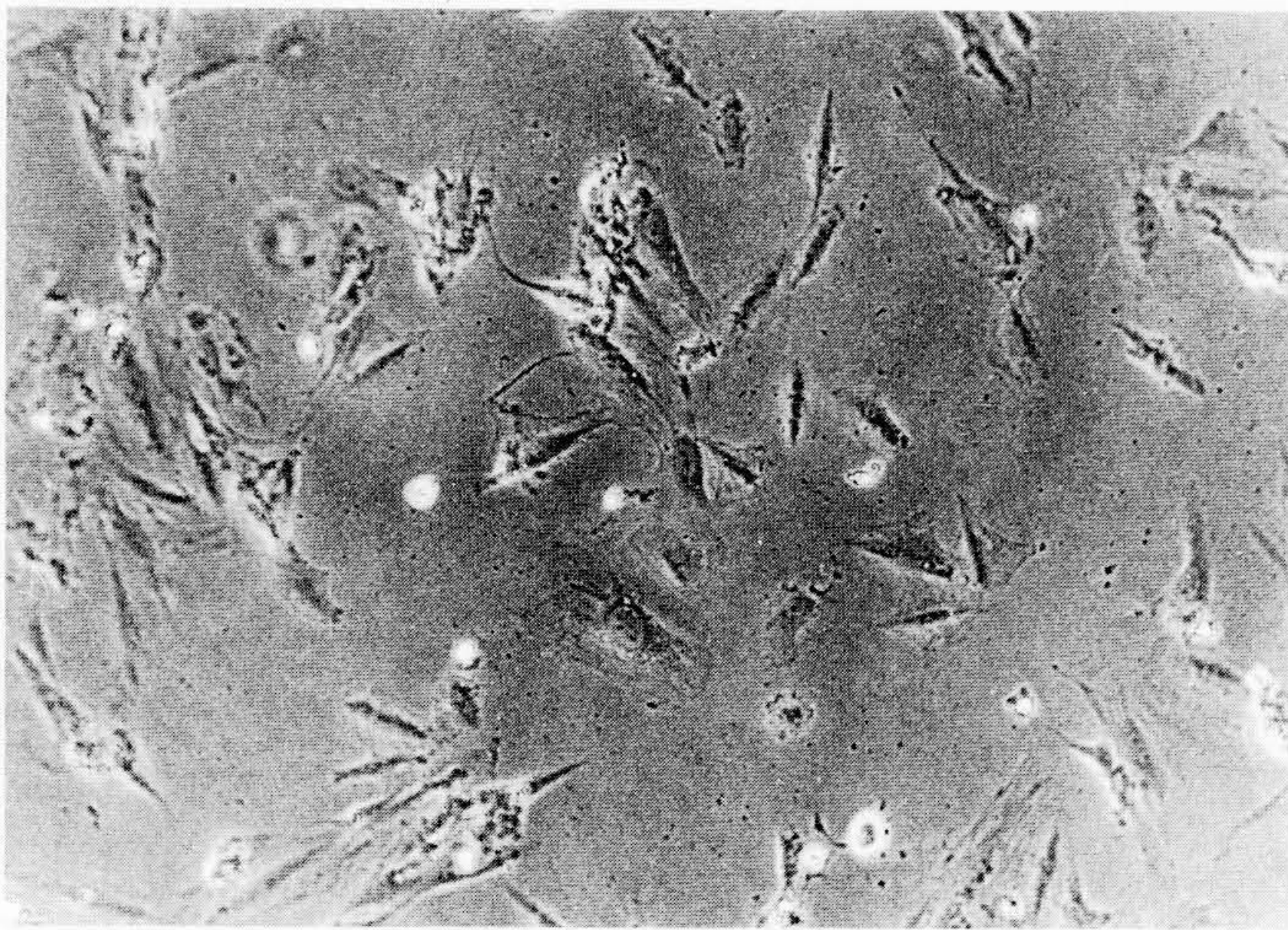


図9 検証試験の方法 カバーガラスに付着培養したNRK(ラット胎児の腎細胞の由来)に、レーザ照射して遺伝子を取り込み選択培地で培養すると、レーザ照射部だけ増殖する。



(a)



(b)



(c)

図10 検証試験の結果 (a)は図9の検証結果を、(b)はDNAを含む培養液で、(c)はDNAを含まない培養液で全面レーザーを照射した結果である。

MPAはIMPからXMPへのステップを阻害するため、レーザーを照射しなかった左側半分がMPAによって死滅したものである。一方、レーザーを照射した右側半分は、せん孔された箇所からEco gptが細胞内に取り込まれているため、XからXMPが合成され分裂増殖したものである。

なお、図10(b)はDNAを含む培養液でレーザーを全面照射した場合、同図(c)はDNAを含まない培養液で全面照射した場合で、(b)は分裂増殖があり、(c)は死滅した状態が観察される。

4.2 レーザ法の適用性

現在、レーザー法の適用例が積み重ねられているが、実用的な見地から重要な例を二、三記す。

- (1) 遺伝病など特定の表現形質を付与する遺伝子を検索するうえで、移入処理能率の高いレーザー法は有効な手段となりうる。その可能性を示す例として、ヒト(人)のぼうこうがん(膀胱癌)から単離された発がん遺伝子を移入してラット腎細胞の転換(がん化)細胞のコロニーを作る系でレーザー法が試みられた。
- (2) 遺伝子工学で宿主細胞として期待される酵母菌でのレーザー法の有効性は、栄養要求性変異株にこれと相補的なアミノ酸産生符号を持つ酵母菌由来のプラスミドを供与する系で実証された。堅い細胞壁を持った細胞にレーザー法が適用できたことは、更に多種多様な細胞での有効性を示唆している。
- (3) 高等植物細胞にもレーザー法による核酸物質移入が可能なことは、タバコの未成熟花粉にTMV(タバコモザイク)のRNA(Ribonucleic Acid)を供与する系で実証された。有効なベクターを持たない植物細胞では、レーザー法のような直接的遺伝子移入が有効である。

5 結 言

以上述べたように、これまでの遺伝子移入方法とは異なるレーザーによる遺伝子移入装置を、理化学研究所の技術指導のもとに製品化した。この装置は、(1)操作方法が容易であること、(2)処理能力が大きいこと、(3)形質発現効率が高いこと、などの特長を持っている。レーザーによる方法が開発されてまだ日が浅いが、現段階で植物細胞にも成功例があり、今後、レーザー法の持つ大きな特長、すなわちレーザー光照射の位置、深さ、強度、スポットサイズなどのパラメータをコントロールすることにより、新たな適用性が開発されることを望むものである。

参考文献

- 1) M.Tsukakoshi, et al.: A Novel Method of DNA Transfection by Laser Microbeam Cell Surgery, Applied Physics B, 35, 2824~2829(1984)
- 2) 粕谷, 外: レーザによる遺伝子移入とその評価, 生命工学研究レポート, 4, 6, 1~12(1985)及び日本分光学会 第22回夏期セミナー資料, 78~85(1986)