

メダカ初期発生における生理機能解析

2 種類の蛍光プローブを用いたバイオイメーシングの試み -

キーワード: medaka, mitochondria, caspase-3
先端生命科学専攻 動物生殖システム分野 江村 真実
学籍番号 46513
指導教員: 三谷啓志 教授
2006 年 3 月修了

緒言

近年多くの GFP 改変体が開発され、生きた細胞におけるタンパク質動態や遺伝子活性の詳細を可視化できるようになった。また光学顕微鏡や画像処理の技術においても改良され、ムービーによる高次生命現象の生体内細胞動態研究が可能となった。本研究では膜が透明であるメダカ受精卵の優れた特性を活かし、2 種類の機能性蛍光プローブ (AFpH-mito と SCAT3.1) を RNA インジェクション法によりメダカ受精卵において簡便かつ迅速に発現させ、生きた個体レベルにおいて分子レベルの生理機能を解明することを試みた。

研究 1 メダカ初期胚を用いた初期発生におけるミトコンドリア活性の解析

【序論】

ミトコンドリアは細胞エネルギー産生の中核であり、アポトーシスに代表されるような生命活動における重要な生理現象に関わっている。ミトコンドリア呼吸により発生する内膜をはさんでの H^+ 濃度勾配は膜電位と pH から形成されており、それらの測定は細胞内器官の生理状態を知る上で極めて重要である。本研究では pH sensor である AFpH にミトコンドリア移行配列を備えた蛍光プローブ AFpH-mito を用い、ミトコンドリアマトリックスの pH (pHm) 変化を可視化して細胞活性の変動をモニターすることを試みた。AFpH は蛍光強度が pH の上昇に応じて蛍光強度が強まる GFPuv (励起光 380nm) と pH に依存しない Venus (励起光 480nm) を直列に連結させたものである。2 波長励起、1 波長測光により、Venus に対する GFPuv の蛍光強度の比の変化から pH 変動を定性的に測定することができる。

【結果と考察】

1 ; AFpH-mito の発現とメダカ発生への影響

AFpH-mito-cRNA (450ng/ μ l) を受精卵にインジェクションした胚のうち 72.5% の胚が蛍光を示し孵化した。AFpH-mito 由来の蛍光は 2 日目まで容易に観察されたが、モニターしやすいメダカの 0 日胚 (発生段階 8 前後) を以後の実験に用いた。

2 ; AFpH-mito を用いたミトコンドリアマトリックス pH (pHm) 測定の検討

ミトコンドリアに特異性を持ち、アルカリ性化する試薬としてオリゴマイシンの効果を検討したところ pH の上昇をモニタリングしていると思われたが、コントロール用いた場合でも同様の結果となり、pH の上昇はオリゴマイシンの作用に起因する結果とはいえなかった。そこで pHm を酸性化する FCCP (Carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone) を用いて同様に実験したところ、pHm は上昇または不変であることが示され、この結果は酸性化試薬として用いた FCCP の作用と矛盾していた。以上からメダカ初期胚において AFpH-mito は pHm の変化をモニタリングしていない結果が得られた。

AFpH-mito がミトコンドリアへ局在していない可能性が考えられたため、細胞内をアルカリ性化する試薬として硫酸アンモニウムを、酸性化する試薬として酢酸ナトリウムを用いて同様に実験を行った。どちらの試薬を用いても結果はインジェクション前と比べて pHm が上昇または不変であることが明らかとなった。

3 ; AFpH-mito のミトコンドリア局在

ミトコンドリア局在性が知られている EYFP-mito を発現させた発生段階 8 前後にある胚において EYFP-mito に由来した蛍光がミトコンドリアに局在していることを示すような観察像はみられなかった。そこで主要な組織が形成される 2 日胚において、Mito-tracker を用いて二重染色により AFpH-mito と EYFP-mito のミトコンドリア局在を検討した。EYFP-mito は観察したすべての細胞においてミトコンドリアに局在していた (図 1) が、AFpH-mito は観察した細胞のうちミトコンドリアへ局在していた細胞は 15% に過ぎず、85% が細胞全体に均一に分布していた (図 2)。AFpH-mito のミトコンドリア局在性の違いの原因として細胞種の違いが挙げられる。また、EYFP-mito が早い段階ではミトコンドリアへ局在していなかったが、発生段階 24 では局在していた。このことから、AFpH-mito の pHm モニタリングを実現するためにも、ミトコンドリア移行タンパク質の輸送系と発生段階との関係を解明する必要がある。

研究2 メダカ初期胚における 線照射における caspase-3 活性の可視化の試み

【序論】

アポトーシスは器官発生・形成や組織ホメオスタシスに本質的な生理的役割を果たすとともに、細胞の癌化や心臓の虚血などの病態形成にも深く関与している。本研究ではヒト由来 caspase-3 活性の indicator として知られている SCAT3.1 を用いて、メダカ初期胚における caspase-3 の活性を可視化することを試みた。SCAT3.1 は ECFP(蛍光; 475nm)と Venus(蛍光; 520nm)、ヒト由来 caspase-3 認識切断配列を介して直列に連結させ FRET を利用した蛍光プローブである。1 波長励起(ECFP の励起光: 435nm)、2 波長測光により得られた画像の蛍光強度比(F_{475}/F_{520})から、caspase-3 の活性を可視化する。

【結果と考察】

1; SCAT3.1 の発現とメダカ胚への影響

SCAT3.1-cRNA(200ng/ μ l)をインジェクションした胚のうち正常に孵化した胚は 53%だった。発生段階 5 から発生段階 24 まで容易に蛍光を確認できた。蛍光強度には個体差が生じたが、観察する上で十分な蛍光をもつ胚が得られるため、cRNA の濃度として 200ng/ μ l を以後の実験に用いた。

2; ヒト由来リコンビナント active caspase-3 による SCAT3.1 の切断

SCAT3.1 を発現した胚(発生段階 5)の 8 個の細胞のうち両端 4 個あるいは 1 個の細胞にリコンビナント active caspase-3(2000unit/ml)をインジェクションしたところ、直後からそれらの細胞は他の細胞より蛍光強度比が高くなっているのが観察された。このことから初期胚において発現された SCAT3.1 がヒト由来の活性化 caspase-3 により切断される様子を蛍光強度比の変化としてモニターすることが確かめられた。caspase-3 に対する基質特異性はヒトとメダカで似ていることが知られているので、メダカ初期胚において発現した SCAT3.1 はメダカ由来の caspase-3 に対しても機能する可能性があることが示唆された。

3; 線照射によるアポトーシスの検出

SCAT3.1 を発現した胚(発生段階 7)に 10Gy を照射し、直後から 8 時間後まで観察したが、蛍光強度比が高い細胞は観察されなかった。発生段階 12 に照射した胚では 6 時間後に蛍光強度比が高い細胞が 1 個あり、非照射の胚でも 1 個観察された。さらに、8 時間後では照射した胚では蛍光強度比が高い細胞が 11 個あり(図 3A)、非照射胚では 3 個観察された(図 3B)。SCAT3.1 を発現させた胚を用いて caspase-3 の活性化している細胞を個体レベルで検出することができるといえる。

Aizawa(2003)らの実験により、発生段階 12 にあるメダカ初期胚に 28.5Gy を照射すると 30 分後には TUNEL 陽性細胞が非照射と比べて多く検出されていることが報告されている。今回行った実験では少なくとも照射直後から 4 時間までは caspase-3 の活性が観察された細胞はみられなかった。SCAT3.1 で識別できる caspase-3 活性化細胞がアポトーシスを促すのかを検討するためには、時間的、空間的な解析を行う必要がある。

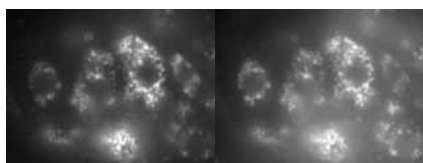


図1 EYFP-mito Mito-tracker 染色像

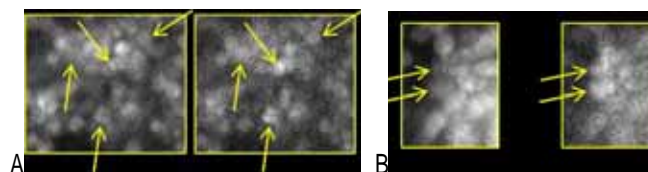


図3 線照射によるアポトーシスの誘導

A;照射胚 B; コントロール 520nm(A,B-左)と 475nm(A,B-右)による画像の一部 矢印は 475nm 蛍光が強い細胞を表す。



図2 AFpH-mito Mito-tracker 染色像