

はじめに

これまで難しかった正常二倍体細胞への遺伝子導入が、ViaFect でとても簡便になりました。これにより、従来なかった研究の促進が期待できます。

正常二倍体細胞はがん細胞と対極的な解析対象です。正常二倍体細胞には細胞増殖を積極的に止める仕組みが備わっています。よく知られるのは細胞やDNAに問題が生じた際作動するブレーキで、Rbやp53を始めこれまでにいろいろな段階のブレーキが報告されています [1]。

最近これに、一次線毛形成を介した細胞周期休止が新たに加わりました。一次線毛は正常二倍体細胞特有の構造物で、増殖停止期に中心体より生じますが、これに細胞周期を積極的に停止させる作用のあることがわかってきました (Box 1)[1]。なかでも明快だったのが筆者らの培養正常二倍体細胞 (hTERT RPE-1 細胞 : Box 2) を用いた最近の報告です [2] (図1)。この線毛動態の分子基盤は、中心体に局在する「Trichoplein- オロラ A 分裂期キナーゼ経路」が、一次線毛形成を抑えることで細胞増殖を保障するものでした。また、これが無くなるとスイッチが切り替わるように一次線毛が形成され、細胞増殖が休止しました。この報告のインパクトは学術誌の表紙、紹介記事、論文評価サイト「F1000」でも取り上げられました [3,4]。

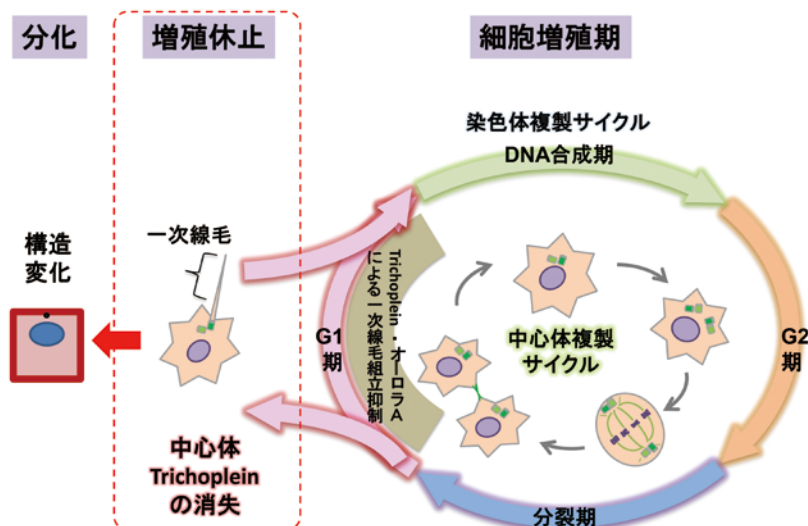


図1：筆者の発見と正常二倍体細胞の学術的位置づけ
筆者らは、中心体へのTrichopleinの局在が一次線毛形成抑制によるG1期進行の保障に必要なことを正常二倍体培養細胞(hTERT RPE-1細胞)で発見した[2]。その消失(赤枠)では一次線毛形成が増殖休止を同期させる点で、細胞周期研究から分化研究への新たな橋渡しとも言える[1]。

そもそも中心体は、培養細胞の紡錘体極としてお馴染みですが、最近の遺伝学的知見の蓄積により、分化組織構築における重要性も加えられつつあります。特に中心体より形成される一次線毛機能の変調は、嚢胞腎、四肢形成異常、網膜の異常などを起こします [1]。その病理の一端は、細胞外からの分化・増殖シグナルの受容障害にあるとされます。しかし、中心体疾患モデル動物は概して致死性が高く in vivo 解析が困難で、分子基盤に不明な点が多いのが現状です。

筆者自身はこのhTERT RPE-1細胞で見出した新たな特徴に、分化研究への橋渡し役を期待しています [1] (図1)。なぜなら、一次線毛形成と細胞周期休止は、どちらも細胞分化にとって必要だと考えられているからです [1]。しかし、正常二倍体細胞は遺伝子導入試薬が概して効きにくく、この2現象間の分子相関解析実験をもっと楽に進められるような、効率の良い遺伝子導入試薬を探していました。幸いhTERT RPE-1細胞ではViaFectが特に効果的で、さらに精度の高いゲノム編集にも適用可能であることがわかりました。この効用は、もともと上皮分化に関わる筆者の研究 [4] のみならず、正常二倍体細胞特性全般の萌芽的な研究促進につながると考えられますので、ここで紹介させていただきます。

Box 1. 一次線毛：増殖休止期にある生体内の分化細胞や血清飢餓状態の正常二倍体培養細胞において、中心体構成成分である母中心小体より形成され細胞膜上に突出する、微小管骨格を軸とする構造物。その異常個体で起こる嚢胞腎、四肢形成異常などは、メカノセンサー機能やソニックヘッジホッグシグナル受容の異常であることから、生体内の一次線毛機能は細胞外シグナルを受容するアンテナと言われています。特にこれが細胞分化に必要であるという知見が増えつつあります。一方培養細胞の一次線毛は動的で、血清飢餓による増殖休止期に同調して生じることが知られていましたが、細胞周期調節との上下関係は、決め手となる実験が無かったため最近まで不明でした。詳細は参考文献1参照。

Box 2. hTERT RPE-1 細胞 (ATCC 細胞株 CRL-4000、住商ファーマイインターナショナル株式会社)：ヒト網膜色素上皮 (RPE, Retinal Pigment Epithelial Cell) の初代培養細胞にヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT, human TElomerase Reverse Transcriptase) を導入し不死化した、正常二倍体に相当する染色体数 (46 本) からなる細胞株。つまり、初代細胞の in vivo の性質を出来るだけ保ちながらも、細胞株のような増殖能を獲得している細胞株です。hTERT によるテロメア延長で細胞老化を防ぐことにより、染色体やチェックポイント遺伝子の過剰な変異を避ける意図があります [5]。

1. 実験デザイン

hTERT RPE-1 細胞に対し、まず ViaFect を含む複数社の遺伝子導入試薬を用いて、プラスミドベクターの導入効率を GFP の発現量で比較しました。次いで最近のゲノム編集技術のひとつである TALEN のプラスミドベクター導入による切断効率を比較し、その実験適用性の広さを探りました。

2. ViaFect による遺伝子導入効率の向上

まずは遺伝子導入効率を比較するため、ViaFect を含む大手 3 社の 4 製品の遺伝子導入試薬を市販の哺乳類用 GFP 発現ベクターを用いて試しました。hTERT RPE-1 細胞への遺伝子導入は、それぞれメーカー指定にほぼ準ずる方法で行いました。ViaFect は試薬 : DNA 比 3 : 1 で用いました。回収したサンプルを蛍光顕微鏡とイムノプロットングで二重判定した結果、ViaFect が発現細胞数と発現量において総合的に最も良好な遺伝子導入効率を示しました (図 2)。ViaFect は生存率においても良好で、他社の製品は程度の差はあるものの、細胞へのダメージにより細胞数の減少や形態変化を認める傾向にありました。このように、hTERT RPE-1 細胞では ViaFect が最も良い相性を示しました。

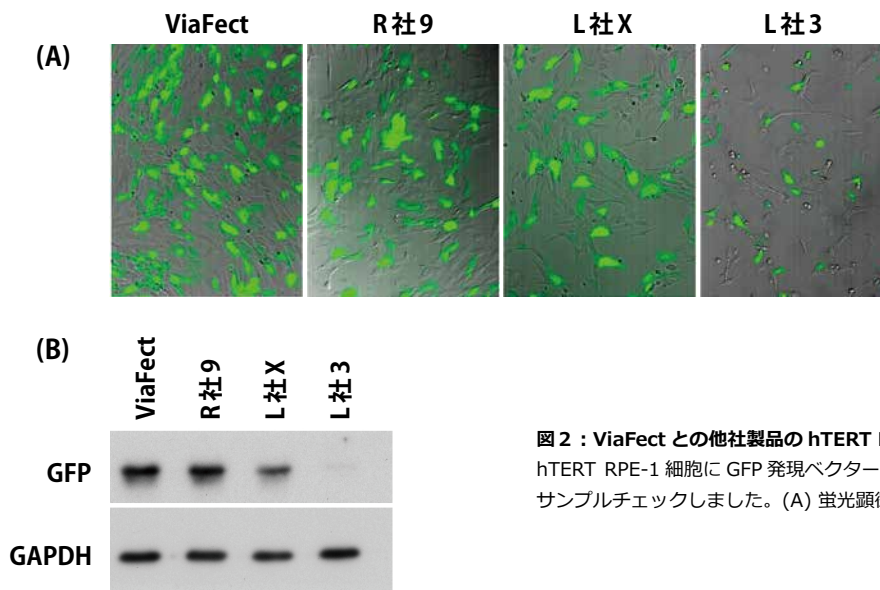


図 2 : ViaFect との他社製品の hTERT RPE-1 細胞における GFP 発現効率比較
hTERT RPE-1 細胞に GFP 発現ベクターをほぼメーカー指定に準ずる条件で導入し、サンプルチェックしました。(A) 蛍光顕微鏡写真。(B) イムノプロットング。

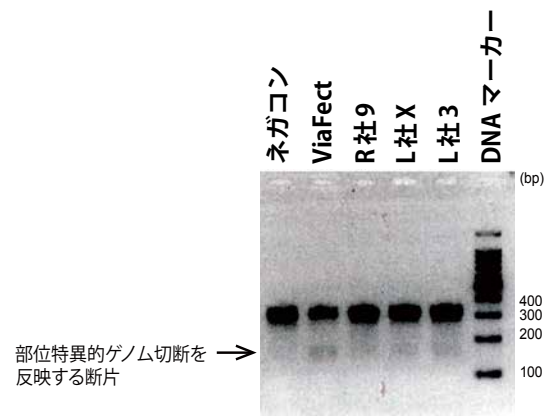
3. ViaFect によるゲノム編集効率の向上

最近の人工ヌクレアーゼすなわち ZFN, TALEN, CRISPR の効用は、これまで非常に難しかった体細胞の正確で完全な標的遺伝子二重鎖切断を可能にしました。特に CRISPR nickase は、その切断特異性をさらに高めるものです [6]。しかもドナー DNA を用いることで、正確な点変異導入まで可能になっています。このようにゲノム編集技術は siRNA にはない精度の高さを持っており、正常二倍体細胞へも適応向上が望まれます。それが ViaFect でも可能か、まずは確立された KIF2A ゲノムを標的とする TALEN のプラスミド発現ベクター [7] を導入して、ゲノム切断効率を比較検討しました。SURVEYOR 遺伝子変異検出キット (Box 3) を用いた検討では、やはり GFP 発現で最も相性がよかった ViaFect が特にゲノム切断効率が良い結果となりました (図 3)。

図 3 : ViaFect と他社製品の hTERT RPE-1 細胞における TALEN 切断効率比較

hTERT RPE-1 細胞にほぼメーカー指定に準ずる条件で KIF2A を標的とする TALEN ベクターを導入し、SURVEYOR assay にてゲノム切断効率をチェックしました。この電気泳動では、矢印の断片量が TALEN による部位特異的ゲノム切断を反映します。原理は Box 3 参照。

Box 3. SURVEYOR 遺伝子変異検出キット (Integrated DNA Technologies) :
ゲノム編集効果を SURVEYOR assay で確認するキット。その原理として、ゲノム編集で生じた標的鎖切断は、多様な Indel mutation として修復されます。そのため標的部位を PCR 増幅するとミスマッチを含んだ増幅断片になります。これを DNA のミスマッチを認識して切断する特殊なヌクレアーゼで処理すれば、その切断率に応じてゲノム編集効率を間接的に評価できます。そのための酵素を含むキットです。



4. ViaFectの効用

正常二倍体細胞は、がん細胞に比べて遺伝子導入やゲノム改変が難しい傾向にあります。これは、自然な生物学的特性ですが、生体への成果還元を意識した研究、特に分化・再生研究にとっては大きな障壁となります。このような障壁を乗り越えるためには高価な電気穿孔装置や、やや扱いに煩雑なレンチウイルスベクターが効果的ですが、現状ではやや汎用的でない印象があります。今回紹介した ViaFect は一例ではありますが、正常二倍体細胞で生存率と遺伝子導入効率の両立を簡便・短時間に実現し、ゲノム編集の一端を垣間見た点で、費用対効果の高い試薬ではないかと思えます。今後もドナー DNA との人工ヌクレアーゼの併用次第では、点変異導入や時限ノックアウトなどのより高度なゲノム編集と、それによる高度な分子基盤解析が期待できます。

これにより、中心体や一次線毛研究のみならず、正常二倍体細胞に特有な現象全般の萌芽的な研究促進につながるのではないかと思います。例えば、細胞周期のブレーキやその病理であるがんの研究、また分化同様に増殖休止に付随する老化や幹細胞の研究 [1] にも効用が期待できるのではないかと思います。

5. 最後に

医学還元を目指す研究では、培養系以上に外因にさらされる生体組織を用いて、再現性やさらなる高次現象に挑戦することが必要になってくるでしょう。生体の分化細胞への遺伝子導入は培養不死化細胞以上に難易度の高いことで知られています。今後も開発されるであろう新しい遺伝子導入試薬が、ベンチトップの集合知によって、人々のさらなる幸せに貢献することを期待します。

最後に、実績のある TALEN ベクター [7] をポジティブコントロールとして快くご提供くださいました広島大学原爆放射線医科学研究所の宮本達雄講師・松浦伸也教授の善意に深くお礼申し上げます。

参考文献

1. 猪子誠人, 稲垣昌樹: 一次線毛動態による新たな細胞増殖制御機構〜トリコプレインーオーロラ A キナーゼ経路〜, 化学と生物 (日本農芸化学学会誌) Vol.51, No.8, 524-533. 2013
2. Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Hayashi Y, Enomoto M, Ibi M, Urano T, Yonemura S, Kiyono T, Izawa I, Inagaki M. Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J Cell Biol.* 197(3):391-405. 2012
3. Ben Short. In Focus: Trichoplein keeps primary cilia silent. *J Cell Biol.* 197:341, 2012 (文献2の紹介記事)
4. Web サイト「猪子 誠人 - 研究者 - researchmap」にもまとめてあります。 <http://researchmap.jp/read0164677/>
5. Kiyono T. Molecular mechanisms of cellular senescence and immortalization of human cells. *Expert Opin Ther Targets.* 11(12):1623-37. 2007
6. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 8(11):2281-308. 2013
7. Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Izumi H, Sakuma T, Yamamoto T, Dynlacht BD, Matsuura S. The Microtubule-Depolymerizing Activity of a Mitotic Kinesin Protein KIF2A Drives Primary Cilia Disassembly Coupled with Cell Proliferation. *Cell Rep.* 10:664-673. 2015

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
ViaFect™ Transfection Reagent	0.75 ml	E4981	55,000
	2 x 0.75 ml	E4982	88,000

0.75 ml は 24 ウェルプレートで約 500 ウェル分のトランスフェクションに十分な量です。

Vol. 1

HaloTag[®] による膜蛋白質の大量精製例

東京大学分子細胞生物学研究所 高難度蛋白質立体構造解析センター 小川 治夫 先生



細胞は細胞膜に存在する膜蛋白質を通じ、情報の伝達や栄養分等の取り込み・排出などを行ないます。今後の医薬品の標的の大半は哺乳類由来の膜蛋白質であるとされ、哺乳類膜由来膜蛋白質を高純度で大量に精製する技術が学術・社会的に求められています。最近我々は、変異アデノウイルス / 哺乳類培養細胞系を用いた大量発現と HaloTag[®] による精製を組み合わせ、ウサギ由来のカルシウムポンプ蛋白質 SERCA1a (分子量約 110k) の大量発現・精製に成功しました。培養液 1L 当たり約 4 mg と驚異的な発現量を達成しています。また、結晶化にも成功し、X線結晶構造解析の結果を最近 Nature 誌 (参考文献) に発表しました。我々の研究室では、本手法を用いて他の多数の膜蛋白質の発現・精製にも成功しております。本手法は今後の膜蛋白質の機能・構造解析にも有用なツールの1つとなると思われますので、ここで紹介をさせて頂きたいと思っております。

Vol. 2

HaloTag[®] を用いた蛋白質に結合する RNA の網羅的解析

大阪大学大学院医学系研究科 神経遺伝学講座 河原 行郎 先生



RNA 結合蛋白質は、転写、スプライシングなどの修飾、RNA の安定性制御、翻訳など、RNA の代謝を様々なレベルで調節しています。また、蛋白質をコードした mRNA のみならず、non-coding RNA の発現や機能調節にも関与しています。最近の報告 (Castello et al, Trends in Genetics, 2013) によれば、我々ヒトの体には 1,500 個もの RNA 結合蛋白質が存在している可能性が示唆されていますが、具体的な機能が特定できているものは限られています。このため、各 RNA 結合蛋白質の標的を網羅的に同定することが、機能を明らかにする上でも重要です。蛋白質に結合する RNA の回収には、従来 RIP (RNA immunoprecipitation) 法が用いられてきました。これは、原理的には DNA を標的とした ChIP (Chromatin immunoprecipitation) 法と同じで簡便ではありますが、RNA を抽出するまでに弱く結合した RNA を相当量失ってしまうことや、非特異的に結合した RNA が混入してしまうなど弱点も多いのが実情です。このため、これらの諸問題を解決するべく、CLIP (UV crosslinking and immunoprecipitation) 法やその改良法である PAR (Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced)-CLIP 法 (Hafner et al, Cell, 2010) などが開発されてきました。

我々の研究室では、HaloTag[®] を利用した PAR-CLIP 法の確立に取り組んできました。その結果、これまで具体的な機能が特定できていなかった Ataxin-2 の標的と機能を明らかにすることに成功し、最近 Molecular Cell 誌 (参考文献) に発表しました。本手法は、今後の RNA 研究に欠かせないツールの1つとなることが期待されますので、ここで紹介させていただきます。

Vol. 3

MiCheck miRNA バイオセンサークローンを用いた miRNA が関わる遺伝子発現抑制の網羅的解析

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 神経薬理研究部 北條 浩彦 先生



マイクロ RNA(miRNA) は、約 21~25 ヌクレオチド鎖長の機能性小分子 RNA です。その miRNA をコードする遺伝子はゲノム上に数百から数千種類存在し (ヒトゲノム上には 2,588 種類の miRNA が存在しています*)、主に RNA ポリメラーゼ II によって転写されています。初期 miRNA 転写産物 (primary miRNA: pri-miRNA) は、核内でプロセッシングをうけステム・ループ構造を持った miRNA 前駆体 (precursor miRNA: pre-miRNA) になります。その後、pre-miRNA は細胞質に移動し、Dicer のプロセッシングを受けて二本鎖の miRNA になり RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれます。最終的には片方の一本鎖 miRNA が RISC に残り、その塩基配列に基づく遺伝子発現抑制が惹起されます。発現抑制は miRNA と相補的または一部相補的なメッセンジャー RNA (mRNA) に対して起こります。そのため、1 種類の miRNA が複数の遺伝子の発現調節に関わっています。このユニークな遺伝子発現調節はさまざまな生命現象・生命機能に関わり、さらに病気にも関連しています。したがって、miRNA の発現状況や活性状態はそれらとの関係を調べるうえで重要な情報となります。

(* 2014 年 11 月 28 日現在)

日本語 Web site : www.promega.co.jp

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2015年6月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店