

## 2

## エレクトロポレーション法による細胞・組織への導入

## 3 電気パルスを用いた筋肉への遺伝子導入

宮崎純一, 宮崎早月

## 特徴

※エレクトロポレーションについては4-2-1も参照

- ・ 遺伝子発現用のプラスミドベクターを準備すれば、すぐに生体に導入可能
- ・ 小型動物（マウス、ラットなど）の下肢の筋肉などに対し、効率的な導入が可能
- ・ 費用も安く、短時間に作業を終えることができる
- ・ 動物の受けるダメージは軽微

## 1 電気パルスを用いた筋肉への遺伝子導入法の原理

生体への遺伝子導入法として、遺伝子発現用のプラスミドDNAを直接、筋肉に注射する方法が報告されている（naked DNA法）<sup>1)2)</sup>。この方法は簡単ではあるが、導入効率が非常に低く、応用が限られていた。本法は、DNAを注射した筋肉部位に電気パルスをかけるというものであるが、それにより発現効率が数百倍、改善する。培養細胞に電気パルスをかけることにより、細胞膜に一過性に穴を開けDNAを導入する方法はエレクトロポレーションとよばれ、*in vitro*で広く使用されているが、*in vivo*でも有力な方法であることが示されたわけで、*in vivo*エレクトロポレーションともよばれる<sup>3)4)</sup>。筋肉への遺伝子導入はサイトカインなどの発見、DNAワクチン法などへの応用が考えられる。

## 準備するもの

## ▶ 1) 機器類

- ステンレス製の針電極  
長さ5 mm, 直径0.4 mm, 電極間の間隔 (gap) 5 mm. ネッパジーン社から入手可能である。
- 遺伝子導入装置（電気パルス発生装置）  
矩形波を発生するもの、例えば、CUY21EDIT（ネッパジーン社）。

## ▶ 2) 消耗品類

- 27ゲージの注射針の付いたインスリンシリンジ

## ▶ 3) サンプルなど

- 実験用動物：8週齢の雌のC57BL/6Jマウス  
別の系統、週齢のマウスやラットも使用可能である。あまり弱齢のものは筋肉が小さく、導入が困難である。
- 麻酔薬

50 mg/mL ペントバルビタール溶液を 40 % (v/v) プロピレングリコール, 10.5 % (v/v) エタノールで希釈して, 6 mg/mL とする。

### ● 発現用プラスミドDNA

骨格筋で強い発現を示すプラスミドベクターを使用する。なかでも pCAGGS ベクター<sup>5)</sup> は発現力に定評があり, 推奨される。遺伝子導入効率を評価するためには, EGFP, IL-5, lacZ などを発現するプラスミド, pCAGGS-EGFP, pCAGGS-IL-5, pCAGGS-lacZ などが有用である。プラスミドは大腸菌 HB101 や DH10B などで増やし, プラスミド DNA 精製キット (Endofree Plasmid Kit・キアゲン社) などを用いて精製する。プラスミド DNA はさらに, フェノール抽出, フェノール/クロロホルム抽出, エタノール沈殿し, 純水に溶かし, 吸光度を 260 nm と 280 nm で測定し, 純度, 濃度を測定する。使用前に DNA は 1 ~ 1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  になるように PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) で希釈する。具体的には, 9 容量の DNA に 1 容量の 10  $\times$  PBS を加えて最終溶液とする。

## プロトコール

- ① マウスに麻酔薬 (6 mg/mL ペントバルビタール) を g 体重当たり 0.1 mL 腹腔内注射し, 麻酔する
  - ② 下肢の前脛骨筋内にインスリンシリンジを用いて, 50  $\mu\text{g}$  の精製したプラスミド DNA (1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in PBS) を注射する (図 1A)
  - ③ DNA を注入した部位を挟むように, 一对の針電極を前脛骨筋内に刺す<sup>a)</sup>
  - ④ 電極につないだ電気パルス発生装置を用いて, 50 ~ 100 V の電圧で, 50 msec の長さのパルスを 3 回, 逆向きのパルスを 3 回, 1 秒 1 回の割合でかける (図 1B)<sup>b)</sup>
- a) 抵抗をモニターし, それが 1 ~ 2 k $\Omega$  であれば, 正しく挿入されていることを示す。  
b) 逆向きのパルスをかけることによって経験的に効率が改善する。

| 電圧        | パルス幅   | パルス間隔   | 回数 <sup>**</sup> |
|-----------|--------|---------|------------------|
| 50 ~ 100V | 50msec | 950msec | 3回               |

※さらに逆向きに 3 回

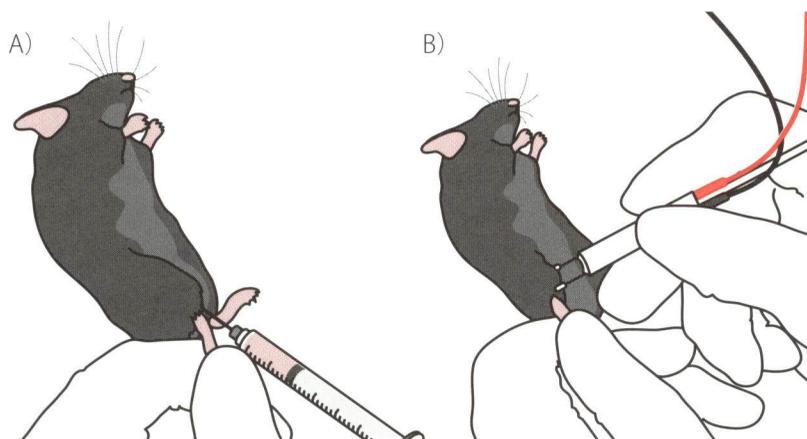


図1 下肢筋肉へのプラスミドDNAの注射と電極の刺入

プラスミドDNAを麻酔下マウスの前脛骨筋に注射し, 電極を刺入し, 電気パルスをか

ける

## 2 遺伝子導入効率の評価

遺伝子導入効率の評価のため、あるいは*in vivo* エレクトロポレーション法の練習のため、IL-5などのサイトカイン、あるいは $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現するプラスミドが使用される。これらを用いた場合の評価法を下記に示すが、EGFPを発現するプラスミドなども有用である。

### 1) IL-5による測定

#### 準備するもの

- マウスIL-5 ELISAキット (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

#### プロトコール

- ① pCAGGS-IL-5 プラスミドDNAを上記①の方法により前脛骨筋に導入する
  - ② 5日後、マウスの尾静脈から採血する
  - ③ 血清中のIL-5をELISAキットを用いて測定する (図2)④
- ④ 5日後に10 ng/mL以上あればうまく導入できていると考えられる。

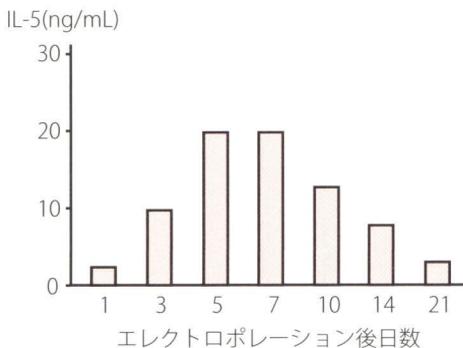


図2 遺伝子導入後の血中IL-5レベル  
pCAGGS-IL-5 プラスミドを前脛骨筋に導入し、経時的に血清中のIL-5を測定した。導入5~7日後に発現のピークがみられる

### 2) $\beta$ -ガラクトシダーゼによる測定

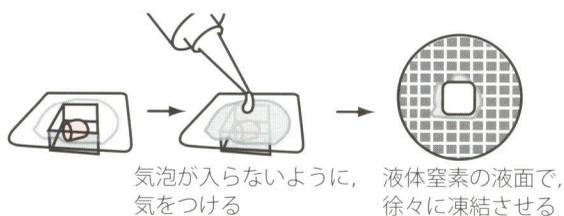
#### 準備するもの

- 4% パラホルムアルデヒド  
PBSで調製しておく
- 40 mM X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)  
dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解したもの。使用時に、PBSで1 mMに希釈する。
- O. C. T. コンパウンド (Miles 社)
- ドライアイス-アセトン
- クリオスタット
- 3-アミノプロピルトリエトキシシランでコートされたスライドガラス (マツナミ社)

- 1.5% グルタルアルデヒドを含むPBS
- エオジン

## プロトコール

- 1 pCAGGS-lacZ プラスミド DNA を上記①の方法により、前脛骨筋に導入する
- 2 5日後、マウスを安楽死させる<sup>a)</sup>
- 3 前脛骨筋を採取し、4%パラホルムアルデヒド液で3時間固定し、PBSで1時間洗う
- 4 筋肉全体でβ-ガラクトシダーゼ活性を見るためには、筋肉サンプルを37°Cで18時間、1 mM X-gal 中で染色する (図 3A)
- 5 横断面を観察するためには、筋肉をO.C.T. コンパウンドに浸け、ドライアイス-アセトン中で凍結する<sup>b)</sup>



- 6 クリオスタットで切片 (15 μm 厚) を切り、3-アミノプロピルトリエトキシシランでコートされたスライドガラスに乗せる<sup>c)</sup>
- 7 切片を1.5% グルタルアルデヒドで室温10分固定し、PBSで3回洗う
- 8 サンプルを37°C、3時間、1 mM X-gal 中で染色する
- 9 エオジンで対比染色する
- 10 顕微鏡で観察する (図 3B)

a) β-ガラクトシダーゼは導入5日目に最も発現が高くなる。

b) 新鮮な凍結ブロックから凍結切片を用いて、速やかに染色するのが望ましい。

c) 剥離防止のため。

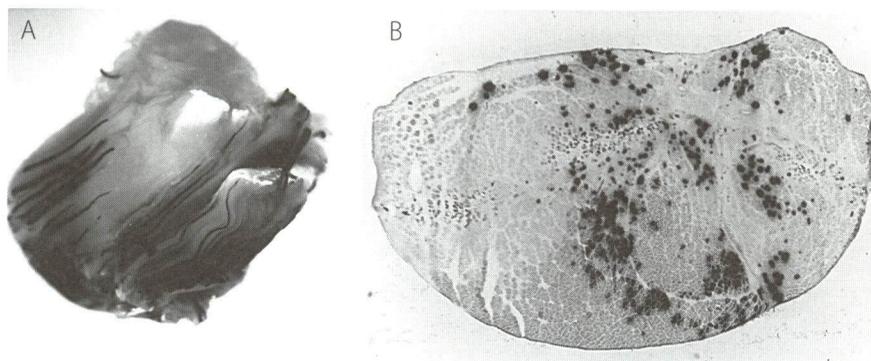
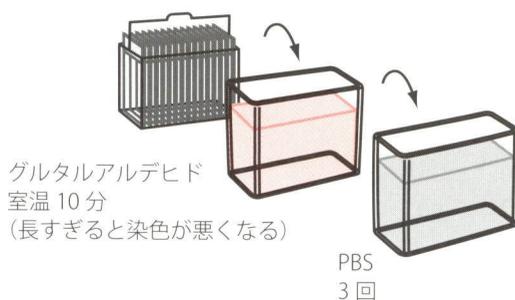


図3 pCAGGS-lacZ プラスミドを導入した前脛骨筋 (A) とその組織切片 (B) のX-gal 染色  
DNA 導入5日後、前脛骨筋を採取し、X-gal で染色した。いずれも導入がうまくいった筋細胞が染色されている



## 導入効率が悪い

- 原因**
- ① プラスミド DNA の純度
  - ② 発現プラスミドの発現レベル
  - ③ 実験手技
  - ④ 対象動物，筋肉
  - ⑤ 電極の選択

### 原因の究明と対処法

- ① 導入に用いるプラスミド DNA の純度は高いことが望ましい。大腸菌由来のエンドトキシンなどが残っていると、免疫反応を引き起こし、発現期間の短縮や実験結果に影響する恐れがある。一般的には、カラムタイプのプラスミド DNA 精製キットを用いて精製すればよいが、さらに、フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿などを行う方が望ましい。
- ② 新たな発現プラスミドについては、前もって *in vitro* で発現を確認することが望ましい。そのためには、C2C12 細胞などのマウス筋芽細胞株にリポフェクションなどにより遺伝子導入する。
- ③ 前脛骨筋は導入などの操作がしやすい筋肉であるが、マウスではかなり小さいので、導入できる DNA 液の容量に限られる (50  $\mu$ L 以下)。色素などを用いて、注射の練習をすることも必要である。
- ④ 針電極を用いる場合、電極間の距離は 5 mm としているが、より大きな筋肉や動物を用いる場合には、この距離を変える必要がある。細胞膜を透過させるためには、電圧ではなく、電場の強さ (voltage/distance) が重要なので、その距離を 10 mm とする場合は、加えるパルスの電圧を 2 倍にする必要がある。
- ⑤ 針電極以外に、プレート型電極なども使用可能である。この場合は、DNA 注射後、プレートに電極液 (心電図用) を付けて筋肉を挟み、パルスをかける<sup>6)</sup>。

### 参考文献

- 1) Wolff, J. A. et al : Science, 247 : 1465-1468, 1990
- 2) Tokui, M. et al : Biochem. Biophys. Res. Commun., 233 : 527-531, 1997
- 3) Aihara, H. & Miyazaki, J. : Nat. Biotechnol., 16 : 867-870, 1998
- 4) Mir, L. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 : 4262-4267, 1999
- 5) Niwa, H. et al. : Gene, 108 : 193-199, 1991
- 6) Horiki, M. et al. : J. Gene Med., 6 : 1134-1138, 2004