

2

エレクトロポレーション法による細胞・組織への導入

4 ニワトリ胚への遺伝子強制発現および
ノックダウン

仲村春和

特徴

エレクトロポレーションについては4-2-1も参照

- ・非常に簡便な方法
- ・目的の遺伝子を、目的とする部位で、目的とする発生段階で強制発現、ノックダウンすることが可能
- ・すべての細胞にトランスフェクトできないことがデメリット（60～70%の細胞にトランスフェクト可）
- ・上皮組織には比較的簡単に導入できるが、間充織細胞への導入は難しい

ニワトリ胚は産み落とされてからは、黄身の上で発生が進行するので、操作が行いやすく、実験発生学の材料として用いられてきた。しかし、卵管膨大部で、受精してから子宮で卵白と卵殻をかぶって産み落とされるまでに24時間かかるために、トランスジェニックニワトリを作製したり、ノックアウトニワトリをつくるといったことがきわめて困難で分子生物学の時代になると、実験材料としての価値が下がっていた。われわれは、ニワトリ胚への遺伝子導入を模索していたが、低電圧の矩形波によるエレクトロポレーションにより胚への遺伝子導入が示されたとき、即座にニワトリ胚への導入条件を決定した。本項ではエレクトロポレーションによるニワトリ胚への遺伝子導入法を紹介する。

1 エレクトロポレーション法による遺伝子導入

胚への遺伝子導入にあたっては、胚へのダメージを極力抑えることが重要である。細胞に電場をかけると小さな孔があき、そこからDNAが細胞内に入る。20Vくらいの低電圧だとその孔はやがて閉じ、胚は発生を続ける。DNAは負に帯電しているので、陽極側の組織にDNAが導入される。発現ベクターに、RSV（ラウスサルコーマウイルス）エンハンサーと β アクチンプロモーターをもつpMiwベクター、CMV（サイトメガロウイルス）エンハンサー、プロモーターをもつCMVベクター、あるいはCAGGSベクターなどを用いると、一過性ではあるが、胚のほとんどの組織で発現させることが可能である。GFP発現ベクターなどと混ぜてエレクトロポレーションすると、導入したい遺伝子とGFPなどの発現はほぼ同じ細胞にみられるので、導入効率、導入場所などをモニターすることができる^{1) 2)}。

準備するもの

▶ 1) 機器類

- 遺伝子導入装置… CUY 21 (ベックス社)
- 実体顕微鏡
- マイクロマニピュレーター
- 電極

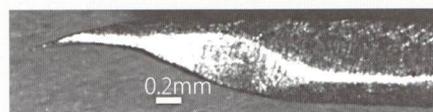
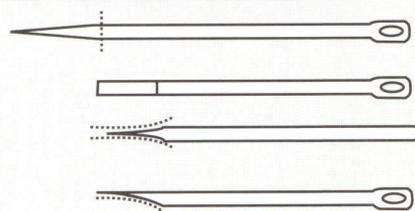
▶ 2) 消耗品類

- 眼科用剪刀
- 精密ピンセット Dumon 5 (2本)
- 持針器にセットした微小メス
縫い針(英国製がよい)を磨いてつくる(右図A)。
先端を切り、歯科用ドリルで平らにする。アーカンサスストーン¹⁾の角を使って、右図に示すような一寸法師の刀に仕上げる。
- 18 Gの注射針
- 10～20 mL注射器
- 墨汁
PBSなどで10倍程度に希釈したロトリングインク。
- 墨汁注入用のピペット(右図B)
市販のPasteur pipetteを伸ばしてつくる。
- 微小ピペット
DNA注入のための微小ピペット作成用ガラスピペット(直径1mm, Narishige GD-1, 右図C)をガラス電極作製器で伸ばしてつくる。

▶ 3) サンプルなど

- 孵卵した受精卵
- ベクター

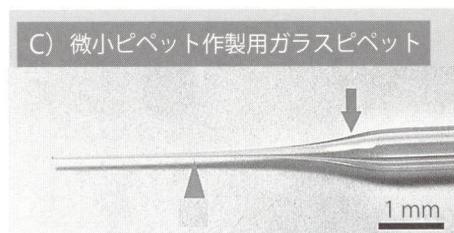
A) 微小メス作製のための縫い針



B) 墨汁注入のためのピペット



C) 微小ピペット作成用ガラスピペット



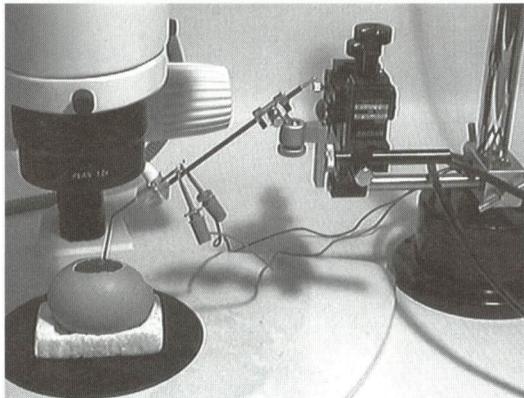


1) 神経管への遺伝子導入

最初に確立されたシステムである^{1) 2)}

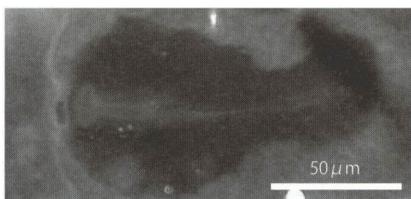
プロトコール

- ①卵を横にして38℃で孵卵する^{a)}
- ②孵卵1.5日 (stage 10前後) に卵のとがった方に穴を開け, 18ゲージの注射針で卵白を2~5 mL 抜く^{b)}
- ③卵殻の上に窓を開け, そこから胚を操作する



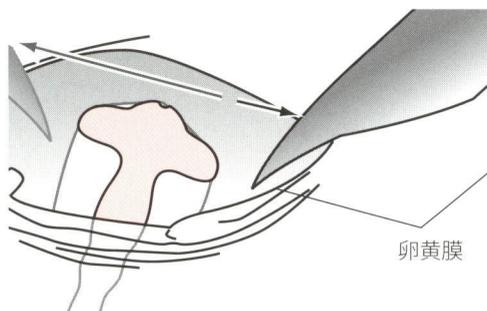
孵卵1.5日の受精卵から2~5 mLの卵白を抜き, 卵殻の上に窓を開け, 実体顕微鏡の下にセットしたところ. 電極はマニピュレーターにセットする

- ④胚を実体鏡の下にセットし, 墨汁注入のためのピペットを使って, 胚の下に墨汁を入れておくと胚が観察しやすい



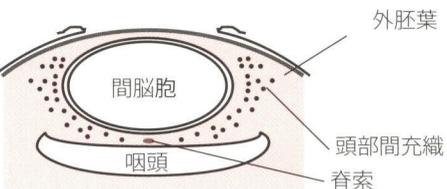
胚の直下 (内胚葉直下) に墨汁を入れ, 胚を見やすくしてある

- ⑤胚の上には卵黄膜 (vitelline membrane) があるのでそれを微小メスでカットする^{c)}



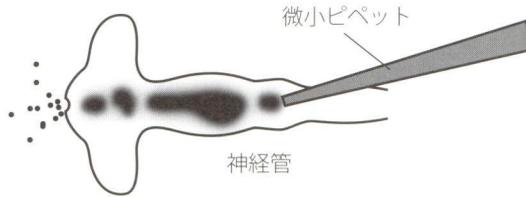
- a) 受精卵のストックは4℃ではなく15℃で行うこと. 40℃だと胚は死ぬ. 15~20℃では胚の発生は進まず, 1週間くらいはストックできる (10日を過ぎると奇形の胚が増える).
- b) 鈍なところには気室がある. 穴は眼科用剪刀でこつこつたいて開ける. 卵白を抜く際は針を真下に向けること. 斜めになると卵黄を傷つけることがある. 窓は眼科用剪刀でちよっと穴を開け, そのまま剪刀でじゃりじゃり切って直径1~2 cmの窓にする. 発生のもっと進んだ段階の胚を操作するときも窓開けまでは1.5日胚で行った方がよい. 後になると血管が卵殻にへばりついて窓が開けられない.

- c) 卵黄膜を切らずに微小ピペットを刺そうとしても, なかなかうまく刺さらず, 胚を傷つけることが多い. 図3 (後述) では, 卵黄膜を切り開いてある状態を見ることができる.

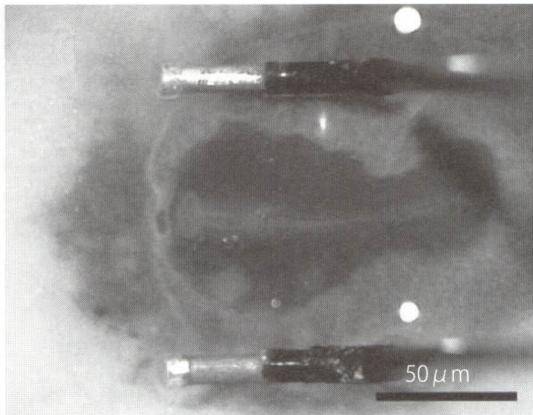


(stage 10)

⑥ ガラス管でつくった微小ピペットにより神経管の中に発現ベクターを入れる^④。DNAにFast greenを混ぜておくと注入の状況が把握しやすい



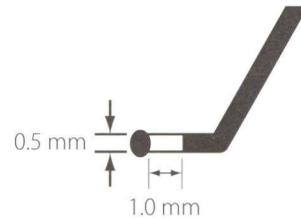
⑦ 胚の両側に電極^⑤を置いて、5V, 50 ms/sの矩形波を数回かける^①



⑧ *lacZ*だと、発現は2時間後から3時間もたつとかなり強くなり (図1A), 24時間後にピークとなる (図1B)

④ $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度のDNAを $0.1\sim 0.2 \mu\text{L}$

⑤ 電極は露出部が1 mmほどで、先端を被覆した方がよい。被覆すると胚を横切るように電場ができる。被覆しないと場が大きくなる。



⑥ この方法だと、神経管の陽極側に遺伝子が導入されるので、陰極側は対照として使用できる (図1).

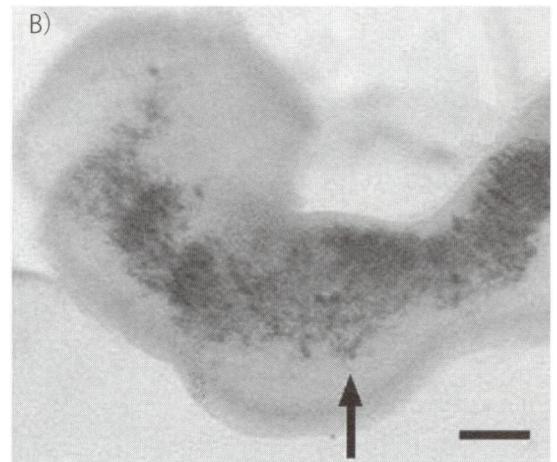
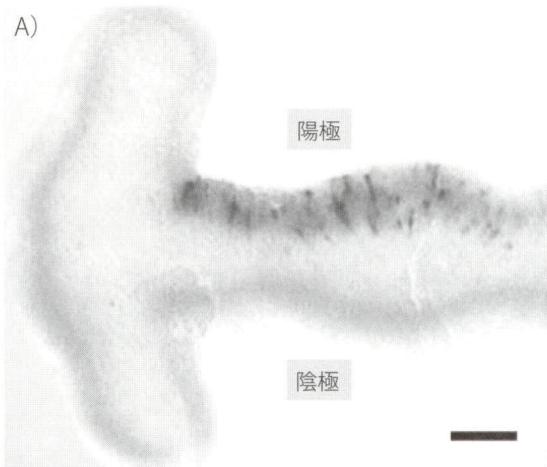


図1 *lacZ*導入後の発現の様子

A) 3時間後。2時間後から翻訳産物が検出でき、3時間ではかなりの量の発現が観察される。B) 24時間後。24時間後に発現のピーク (矢印) が見られる。バー：200 μm



2) 視蓋原基への遺伝子導入

プロトコール

- ① E3～5日の視蓋原基は膨らんでおり，そこにプラスミドを注入する (図2A)
 - ② 棒状で，露出部が約2 mmの陰極 (図2B) を胚の下に，半球状の陽極 (図2C) を漿膜の上に置く^{a)}
 - ③ 5～10V, 50 ms/sの電圧を2,3回かける^{1) 3)}
 - ④ 孵卵3日目にシャーレに卵を移して，shell less culture^{b)}を行い，そこで行った方が電圧の調整などは行いやすい
- ^{a)} 胚の下に棒状電極，漿膜の上に球状電極を置くことによって，ちょうど視蓋を横切る電場が形成される。
- ^{b)} shell less culture：胚を深さ1.5 cm，直径10 cmのシャーレに卵全体を割り込んで，37℃で培養する。割り込む際，卵黄膜を傷つけないよう，また胚が上に来るように注意する。12日目くらいまで培養できる。

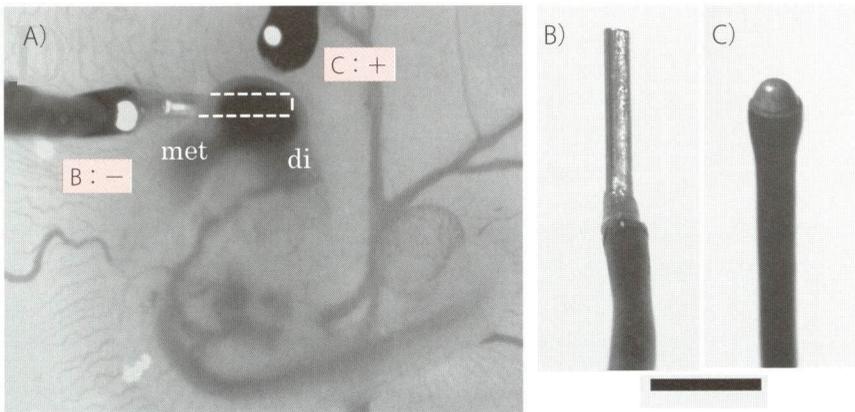


図2 視蓋原基への遺伝子導入

E3～5日胚の視蓋原基（中脳胞）は膨らんでいるが，そこにプラスミドを入れ，視蓋原基の下に棒状の電極を置き（陰極），原基の上の方に半球状の電極を置く（陽極）．5～10V, 50 ms/sの矩形波をかける．di：間脳，met：後脳，バー：2 mm



3) 眼胞への遺伝子導入

プロトコール

- ① E1.5でstage10前後の眼胞にプラスミドを注入する
 - ② 胚の前と耳胞の脇に，胚の長軸に直交するよう電極をおく (図3A)
 - ③ 13V, 50 ms/sの電圧を3回かける^{1) 4)}
 - ④ 網膜の鼻側に導入したいときは胚の前の方を陽極とし，耳側に導入したいときは後ろの方を陽極とする^{a)}
- ^{a)} 棒状電極で，露出部が約1 mm (図3B) を使うとよい。

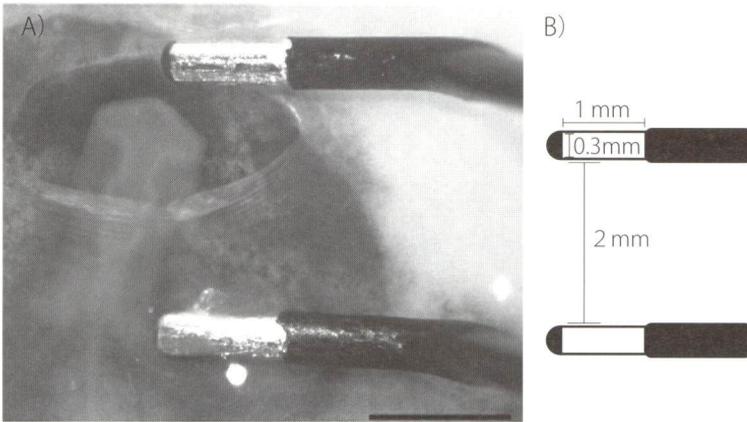


図3 眼胞への遺伝子導入 (A), 棒状電極 (B)
 胚のより頭側と、耳胞あたりに棒状の電極を胚の長軸と直交しておく。13 V, 50 ms/sの矩形波を3回かける。バー：1 mm

4) 中胚葉への遺伝子導入

エレクトロポレーションによる間葉（間充織）細胞への遺伝子導入はなかなか難しい。そのため、中胚葉細胞への導入は原腸陥入直前のエピプラストに行うとよい (図4) ^{1) 3) 5) 6)}。

プロトコール

- ① どのレベルの体節，中間中胚葉，側板中胚葉を狙うかにより，Stage3～9胚の原条のあたりにプラスミドをおく^{a)}
- ② 胚の下（原始内胚葉の下）にタングステン製の棒状電極（図3B，露出部2 mm）を差し込み陽極とし，原条の上にタングステンの微小電極（図4B）を置いて陰極とする
- ③ 5～8 V, 25 ms/sの矩形波を2，3回かける

a) 胚のどの部分に遺伝子を導入するかは，初期ワトリ胚の予定運命図^{7)～9)}を参照して，プラスミドを置いたらよい。

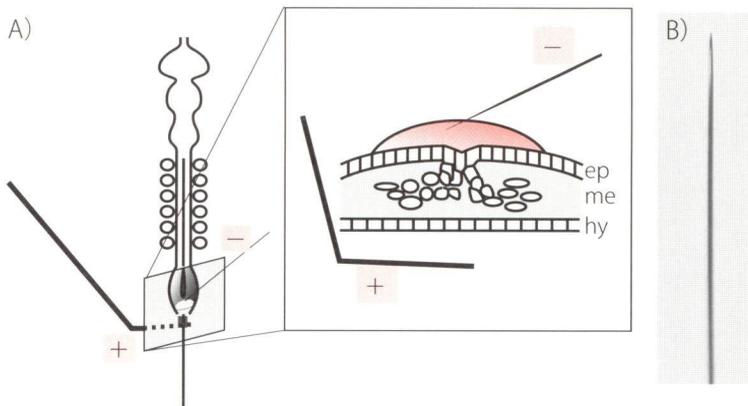


図4 中胚葉への遺伝子導入

間葉組織（間充織）にエレクトロポレーションで遺伝子を導入するのは難しいので，原腸陥入前で，中胚葉細胞がまだエピプラストにあるときに行う。胚の下に棒状の電極（図3B）を置き（陽極），原条の上に針状の電極を置く（陰極，B）。胚はstage 3くらいからstage 9くらいまで，目的により使い分ける。ep：epiblast, me：中胚葉, hy：hypoblast



5) その他の組織への導入

内胚葉系の組織、肢芽への遺伝子導入に関しては、それぞれFukuda¹⁾, Suzuki^{1) 10)}の論文参照のこと。

2 長期にわたる導入遺伝子の発現

1 レトロウイルス・プロウイルスのエレクトロポレーション

RCAS プロウイルスを培養細胞にトランスフェクトし、ウイルスパーティクルを濃縮して感染させるのが一般的なレトロウイルスによる遺伝子導入であるが、プロウイルスをエレクトロポレーションすることにより、ウイルスを精製する手間が省けると、しかも次の点でウイルス感染法に比べて優れている。

ウイルスが感染していると干渉により、他のウイルスが感染しない（ウイルス抵抗性）ので、ウイルス感染実験のためにはウイルス感染のない受精卵を準備する必要がある。エレクトロポレーションだと、ウイルス抵抗性の胚にも導入でき、その際はトランスフェクトした細胞の子孫細胞だけに遺伝子が導入されるので、細胞系譜が追跡できる。ウイルス感受性胚を用いると、トランスフェクトした細胞によりつくり出されたウイルスにより感染が広がっていくので、広範囲の細胞に遺伝子導入が可能である^{1) 11) 12)}。

2 トランスポゾンによる導入遺伝子の染色体への組み込み

川上らのグループが開発したメダカのトランスポゾンTol2システム¹³⁾を高橋らのグループがエレクトロポレーションに応用したものである^{1) 14)}。Tol2ベクターは2つよりなり、1つはCAGGSプロモーターの下流にTol2トランスポゼースを組み込んだベクター（**図5A**, pCAGGS-T2TP）、もう1つはTol2エレメントをもつベクターで、Tol2エレメントに挟まれて、導入したい遺伝子が組み込まれている（**図5B**, pT2K-XXX）。この2つのベクターをエレクトロポレーションすると、CAGGSプロモーターによりTol2トランスポゼースが発現し、

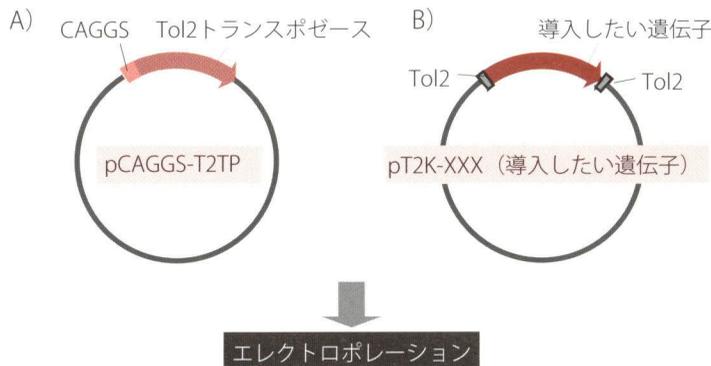


図5 トランスポゾンベクター

Tol2で挟まれた目的遺伝子を切り出して、ホストの細胞のゲノムに組み込むことができ、長期にわたる遺伝子発現が可能となる。

3 コンディショナルな遺伝子発現

これは、CAGGSプロモーター下流にテトラサイクリン依存性転写活性化因子 (rtTA) あるいは抑制因子 (rTA) をもつプラスミド (図6A, pT2K-CAGGS-M2) と、TRE (tet-responsive element) の下流に目的遺伝子を組み込んだプラスミドを同時にエレクトロポレーションするものである^{1) 15)}。翻訳されたrtTAはテトラサイクリンが存在するときだけTREに結合し転写を活性化するので (Tet-on), テトラサイクリンの誘導体であるDox (ドキシサイクリン) を投与することにより、導入遺伝子を発現させることができる (図6B)。rTAタンパク質はTREに結合し転写を活性化しているが、Doxを投与するとTREに結合できず転写が止まる (Tet-off)。

このrtTAあるいはrTAと、TRE-標的遺伝子をそれぞれTol2で挟み、Tol2トランスポゼースを組み込んだプラスミド (図5, pCAGGS-T2TP) と一緒にエレクトロポレーションすると、rTAあるいはrtTA、TRE-標的遺伝子を細胞のゲノムに組み込むことができ、長期的にDoxによる導入遺伝子の発現調節が可能となる。

なお、TREをもつプラスミドは両方向性でGFPと標的遺伝子を発現させるBIベクターとしてタカラバイオ社から発売されている。

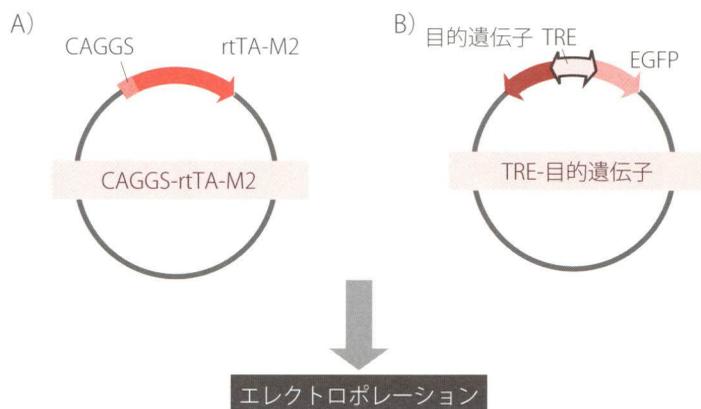


図6 Tet-onベクター

4 ノックダウン

1 shRNAによるノックダウン

標的となるcDNAから20塩基ほど選び、そのセンスおよびアンチセンスをヘアピンルー

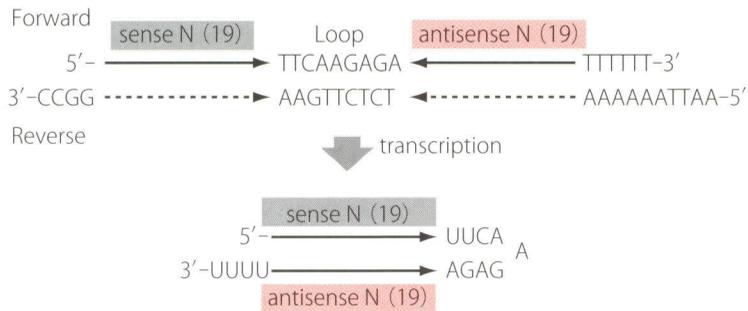


図7 shRNA

センス、アンチセンスの配列をループで挟み、順、逆方向のDNAを合成して、Pol IIIにより転写を行う発現ベクターに組み込む。転写されるとヘアピン状の二本鎖RNA (shRNA) ができるが、やがて、ヘアピンは切断され、siRNAとして作用する

プでつないだコンストラクト (図7) を siRNA 用ベクターに組み込み、目的とする組織にエレクトロポレーションで導入する。通常このような短い RNA の転写は RNA ポリメラーゼ III (Pol III) による転写システムをもつベクターを使う。H1 や U6 プロモーターによりドライブする発現ベクターを購入できる。転写された RNA からはヘアピンが切除され短い二本鎖 RNA となり、デザインが適切な場合は標的 mRNA を切断する。ニワトリ胚中脳胞で、siRNA による En2 ノックダウンでは、エレクトロポレーション 6 時間後には *in situ* hybridization により効果が検出されはじめ、12 時間たつとタンパク質レベルでも En2 のノックダウンがみられた^{1) 16)}。

2 コンディショナルなノックダウン

Pol II による転写のコンディショナルな制御は難しい。それで、石井らにより開発された pDECAP と、強制発現の項 3 で述べた Tet-on システムによる siRNA の発現調節が開発された。pDECAP ベクターはライボザイムを含み、Pol II により転写された RNA からキャップ構造が切り取られる。また、MYC-associated zinc finger protein (MAZ) site をもつために PolyA tail ができない。そのために、転写された RNA は核から細胞質に運ばれず、核内で Dicer により siRNA に切断される (図8)¹⁷⁾。

pDECAP に 400 塩基長ほどの標的遺伝子のセンス、アンチセンスをスペーサーを挟んで組み込み、それをさらに、TRE をもつ BI ベクターに組み込み、必要部分を切り出して Tol2 ベクターに組み込む。この pT2K-BI-TRE-EGFP-DECAP と、pCAGGS-T2TP, pT2K-CAGGS-rfTA-M2 の 3 つのベクターを同時にエレクトロポレーションする (図8A)¹⁸⁾。

Dox 投与により長期にわたる siRNA 発現の調節が可能となる (図8B)。ただこのベクターの作製には長い二本鎖 RNA を pDECAP に組み込むので、クローニングは難しい。

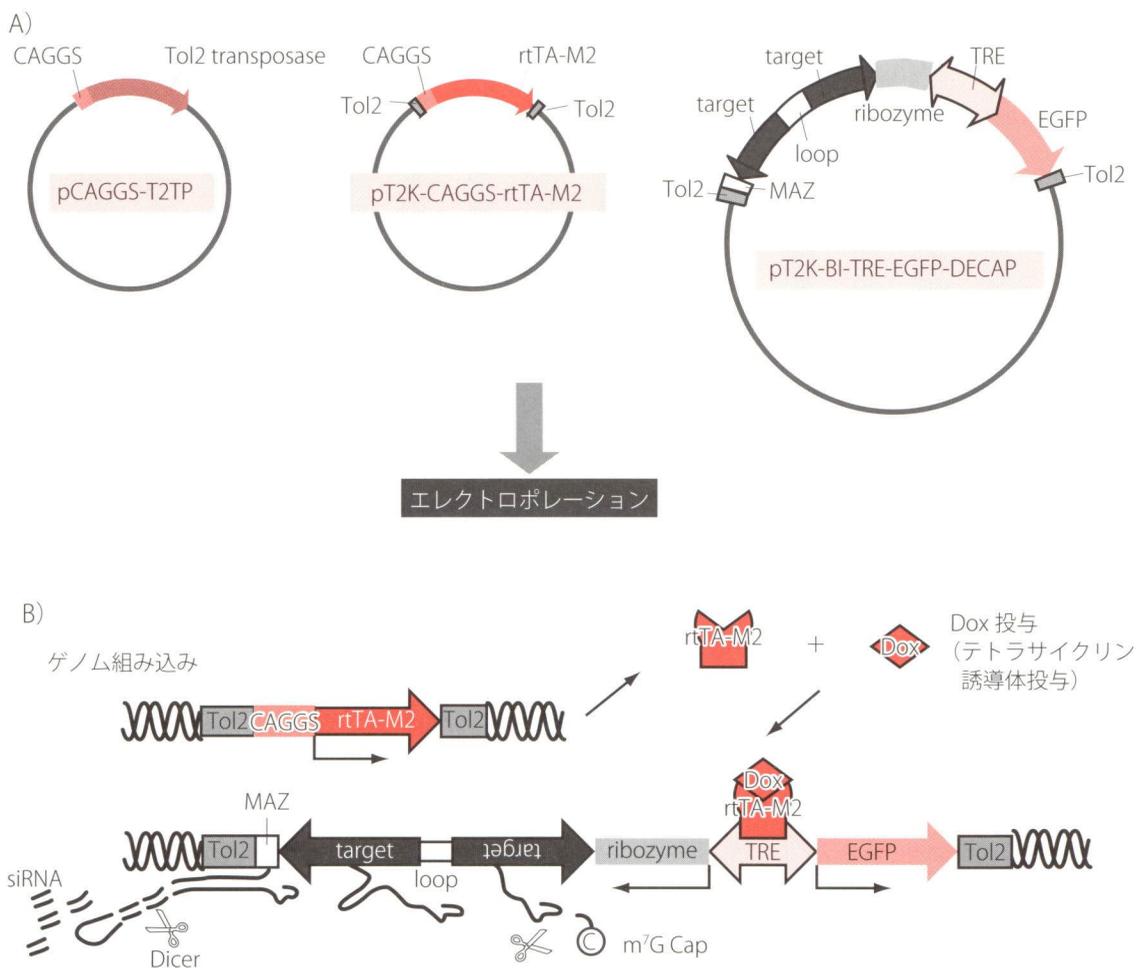


図8 コンディショナルsiRNA法

A) Tol2トランスポゼース発現ベクター (pCAGGS-T2TP), CAGGSプロモーター制御の下にrtTAを発現させるカセットをゲノムに組み込むようTol2で挟んだベクター (pT2K-CAGGS-rtTA-M2), EGFPを一方にもち、もう一方にDECAPカセットの中にセンスおよびアンチセンスRNAを組み込んであるBIベクターのカセットをTol2で挟んだベクター (pT2K-BI-TRE-EGFP-DECAP) をエレクトロポレーションする。B) BIベクターとrtTAカセットがゲノムに組み込まれ、Doxを投与すると、Dox結合したrtTAがBIベクターに含まれるTREに結合し、EGFPとDECAPカセットの発現が開始される。DECAPにはRibozymeが含まれているのでキャップ (m⁷G Cap) が切り取られ、またMAZ配列があるため、poly Aがつかない。そのため転写された長い二本鎖RNAは核内でDicerにより切断され、siRNAとなり細胞質にでていく。DECAPカセットの代わりに発現ベクターカセットを組み込めば、強制発現のTet-onシステムになり、pT2K-CAGGS-rtTA-M2の代わりにpT2K-CAGGS-rtTA-M2を用いれば、強制発現のTet-offシステムとなる

5 応用

発生の早い時期には胚は電場をかけることにより奇形を生じやすい。エレクトロポレーションの条件をより厳密に制御するために穴のあいた濾紙に胚をはり付けて切り出し、*in vitro*でエレクトロポレーションして、濾紙にはり付けたまま培養する方法がある (New

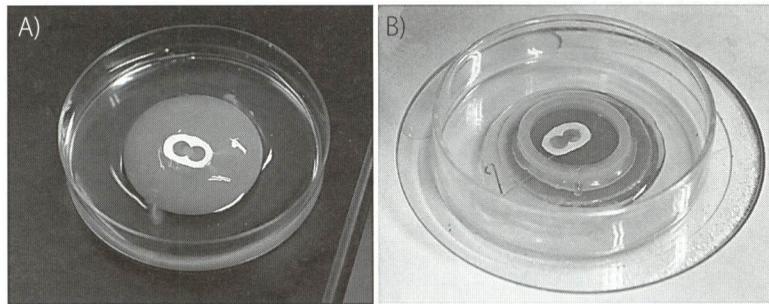


図9 変法 new culture

穴の開けた濾紙を胚の上に置き (A), そのへりに沿って、胚と卵黄膜を切り取り、アガロース・アルブミンプレートの上で培養する (B)。アガロース・アルブミンプレートの作り方は、まず、新鮮な卵からアルブミンを採取し、10%グルコース水を0.3%になるよう加える。そして、123 mMのNaClを含む0.6%アガロース水を煮沸、50℃で等量混ぜ、35 mm ディッシュに2 mL ずつ注ぎ、固める。文献22より転載(嶋村教授のご厚意による)

cultureの変法, 図9) ^{1) 19)}。このような方法では stage 17 くらいまで培養できるので, エンハンサーの解析などが行われている ^{1) 20)}。

初期に遺伝子導入を行って器官形成に及ぼす影響を調べるためにはさらに発生を継続させる必要がある。そこで, 変法 New culture でしばらく培養した胚をまた卵に戻し, E5.5 まで孵卵を続ける方法も開発された ²¹⁾。この方法と臓器特異的プロモーターを利用して, 目的とする臓器に遺伝子を導入し ²¹⁾, その効果を調べることが可能である。

参考文献

- 1) 『Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology』 (Nakamura, H. ed.), Springer Japan, 2009
- 2) Funahashi, J. et al.: Dev. Growth Differ., 41: 59-72, 1999
- 3) Odani, N. & Nakamura, H.: Dev. Growth Differ., 50: 443-448, 2008
- 4) Harada, H. et al.: Dev. Growth Differ., 50: 697-702, 2008
- 5) Sato, Y. et al.: Development, 129, 3633-3644, 2002
- 6) Ito, K. et al.: Dev. Biol., 351: 13-24, 2011
- 7) Lopez-Sanchez, C. et al: Cells Tissues Organs, 169: 334-346, 2001
- 8) Psychoyos, D. & Stern, D. C.: Development 122: 1523-1534, 1996
- 9) Selleck, M. A. & Stern, C.: Development, 112: 615-626, 1991
- 10) Suzuki, T. & Ogura, T.: Dev. Growth Differ., 50: 459-465, 2008
- 11) Sugiyama, S. & Nakamura, H.: Development, 130: 451-462, 2003
- 12) Sakuta, H. et al.: Dev. Growth Differ., 50: 453-457, 2008
- 13) Kawakami, K. et al.: Gene, 225: 17-22, 1998
- 14) Sato, Y. et al.: Dev. Biol., 305: 616-624, 2007
- 15) Watanabe, T. et al.: Dev. Biol., 305: 625-636, 2007
- 16) Katahira, T. & Nakamura, H.: Dev. Growth Differ., 45, 361-367 2003
- 17) Shinagawa, T. & Ishii, S.: Genes Dev., 17: 1340-1345, 2003
- 18) Hou, X. et al.: Dev. Growth Differ., 53: 69-75, 2011
- 19) Hatakeyama, J. & Shimamura, K.: Dev. Growth Differ., 449-457, 2008
- 20) Uchikawa, M.: Dev. Growth Differ., 50: 467-474, 2008
- 21) Tanaka, J. et al.: Dev. Growth Differ., 52: 629-634, 2010
- 22) Hanashima, J. & Shimamura, K.: 『Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology』 (Nakamura, H. ed.) , pp43-53, Springer Japan, 2009