

## 3

## エレクトロポレーション法による神経細胞への導入

3 培養皿上の成熟神経細胞への  
遺伝子導入

田谷真一郎, 星野幹雄

## 特徴

※神経細胞への導入全般については4-3-1も参照

- ・ 遺伝子(プラスミド DNA)を初代培養神経細胞に過剰発現 / 発現抑制する
- ・ さまざまな発生段階の神経細胞に遺伝子導入できる
- ・ 高効率で遺伝子導入できる
- ・ 高生存率を維持できる

## 1 成熟神経細胞への導入の原理

ラット/マウス由来の初代培養神経細胞に遺伝子を導入することは比較的難しい実験系とされている。筆者の経験上、培養皿上の成熟神経細胞への遺伝子導入効率だけを比較すると、ウイルスによる感染>エレクトロポレーション>リポフェクション、の順になる。ウイルス感染を用いる方法は、使用許可申請の手続きの煩雑さや実験設備の関係により、敬遠されがちである。一方、エレクトロポレーションは手技的に簡易で、短時間に成熟神経細胞への遺伝子導入が可能になる系である。本項では、筆者がネッパジーン社のスーパーエレクトロポレーター NEPA21を使用しているため、このシステムに対応した紹介をする。NEPA21が特に優れている点は、3ステップ式マルチパルス方式を取り入れている点である。エレクトロポレーションの原理は、電気刺激により、細胞に穴を空け、遺伝子(プラスミドDNA)を細胞に送り込むものである。この技術により、一般的に遺伝子導入が困難とされている初代培養神経細胞に対しても物理的に遺伝子を導入することができる。しかし、細胞が受けるダメージは大きく、電気刺激の強さに依存して生存率が低下してしまう。NEPA21は細胞膜に微細な穴をあけるポアーリングパルス(高電圧・短時間)と遺伝子を細胞内に送り込むトランスファーパルス(低電圧・長時間)の3ステップ式マルチパルス方式を自由に設置できる点が長所である。導入したい細胞への3ステップ式マルチパルス方式の条件設定を決定してしまえば、高効率で遺伝子導入でき、かつ高生存率を維持することができる。電気条件は細胞により異なるために、本項ではラット由来の海馬初代培養神経細胞への遺伝子導入の条件を紹介する。

## 2 導入時期の使い分け

研究目的として、神経細胞のさまざまな成熟過程において、研究対象の分子の機能を知りたいと考えている方は少なくないと思う。この目的に対する具体的な解決法は、神経細胞において目的分子の過剰発現の効果・RNAiによる発現抑制の効果などを検討するのが一般的である。神経細胞にも多数の種類が存在しているが、著者は遺伝子導入する *in vitro* の神経培養細胞として、海馬初代培養神経細胞がその発達過程が詳細に解析されているため扱いやすいと考えている。

海馬初代培養神経細胞は1990年代にBankerらによって5つのステージに分けられた(図1)<sup>1)</sup>。この神経細胞は培養開始後にみられるラメリポディアの形成(ステージ1)から数時間後に複数の非常に活発に動く神経突起を形成する(ステージ2)。その半日後に複数の突起の中の1本が急速に伸長し、神経軸索の特徴を有するようになる(ステージ3)。この間残りの突起の伸長は非常に遅く、後に樹状突起となる(ステージ4)。樹状突起は成熟してシナプスを形成する(ステージ5)。海馬初代培養神経細胞は、このステージに対応する大まかな培養日数(DIV)がすでに報告されている。したがって、研究対象の分子の機能を、神経細胞のどの成熟過程に対して検討するのか計画を立てやすい。例えば、神経細胞の軸索・樹状突起への運命決定(極性形成機構)を解析したいのであれば、神経細胞を組織から分散した直後(DIV0)に遺伝子導入しなければならないので、4章-3-4の項目を参考にしてほしい。本項では、樹状突起形成やシナプス形成への効果が検討できる培養皿上の成熟神経細胞への遺伝子導入について紹介する。

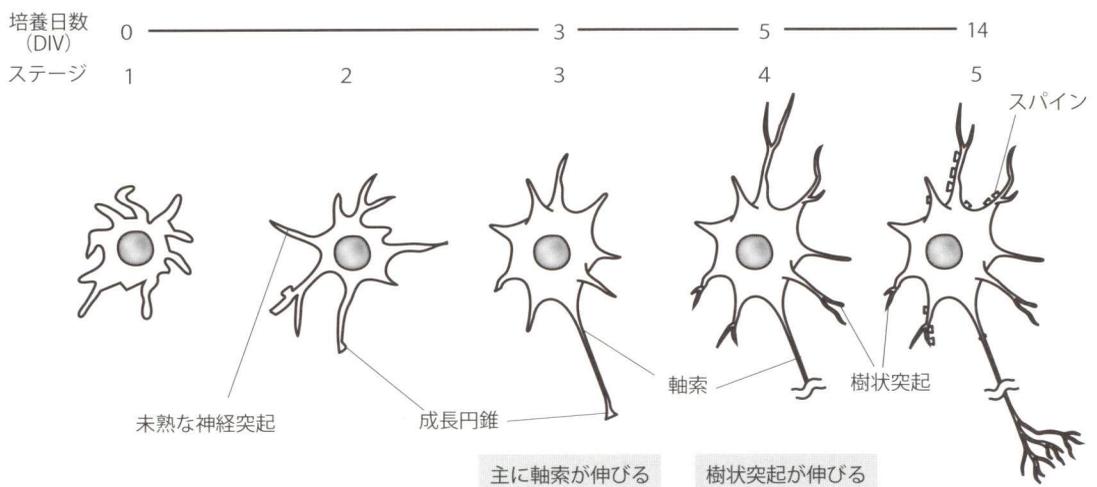


図1 海馬初代培養神経細胞の発達過程

ステージ3 (DIV3) は軸索が伸び、ステージ4 (DIV5) は樹状突起が伸びる

## 準備するもの

### ▶ 1) 機器類

- 遺伝子導入装置…NEPA21 (ネッパジーン社, 右図上)
- 付着細胞用脚付電極 24 ウェル用…CUY900-13-3-5 (ネッパジーン社, 右図下)  
培養皿上の (神経) 細胞に遺伝子導入する際に用いられる。



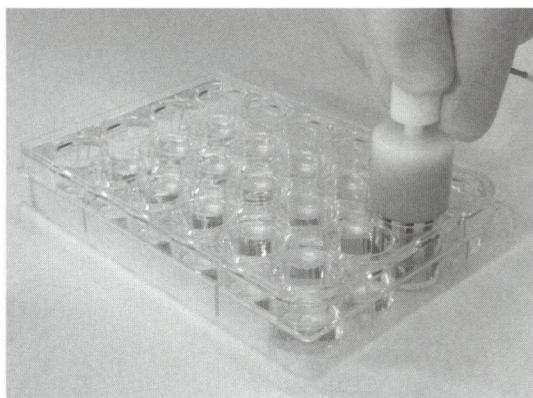
スーパーエレクトロポレーター NEPA21 (ネッパジーン社)

### ▶ 2) 試薬類

- ポリ-D-リジン
- 12~13 mm カバースリップ (マツナミ社)
- 24 ウェルプレート 平底タイプ
- 無血清培地
- Opti-MEM (ライフテクノロジー社インビトロジェン製品)

### ▶ 3) サンプルなど

- 2~10 mg/mL プラスミド DNA  
高発現させたい遺伝子をコードするプラスミド DNA. キアゲン社 EndoFree kit 精製相当。



付着細胞用脚付電極 (CUY900-13-3-5)

## プロトコール

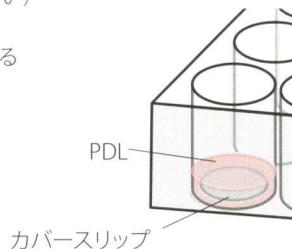
### ▶ 1) 細胞の培養

- ① 海馬初代培養神経細胞 (約  $3 \times 10^4$  cells/well) をポリ-D-リジンでコートしたカバースリップ上に播き, 24ウェルプレート中で目的に応じた時期まで培養する

### ▶ 2) プラスミド DNA の準備

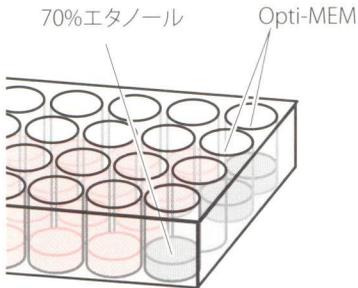
- ② キアゲン社 EndoFree kit などを用いて, 10 mg/mL プラスミド DNA を準備する
- ③ エレクトロポレーションに用いるプラスミド DNA は, 最終濃度 1 mg/mL となるように, Opti-MEM で希釈する (DNA 混合溶液)

- ④ コートしないと細胞が吸着しない。コートする手順は次の通り。
  - ① ポリ-D-リジン (PDL) を加え, 37°C オーバーナイト (12時間くらい)
  - ② PBS で 3 回洗う
  - ③ 使用培地を加える



### ▶ 3) 付着細胞用脚付電極の滅菌

- ④ 24 ウェルプレートに 70%エタノール (~1 mL) と Opti-MEM (~1 mL) を用意する
- ⑤ 付着細胞用脚付電極を 70%エタノールのウェルに 1~2分浸け置き、滅菌する
- ⑥ 次に、Opti-MEMのウェルでエタノールを十分洗浄し、もう1つ準備したOpti-MEMのウェルに付着細胞用脚付電極を置いてエレクトロポレーションに使用する



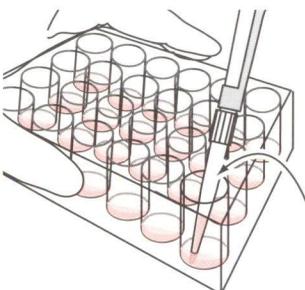
### ▶ 4) エレクトロポレーション

- ⑦ 24 ウェルプレートの培地を回収する (回収した培地は⑪にて再利用)<sup>b)</sup>
- ⑧ 海馬初代培養細胞を培養している 24 ウェルプレートに DNA 混合溶液 (300 μL) を加える
- ⑨ 付着細胞用脚付電極を 24 ウェルプレートに細胞に衝撃を与えないように、静かに置く
- ⑩ 抵抗値を測定し、エレクトロポレーションを行う<sup>c)</sup>

#### 電気条件

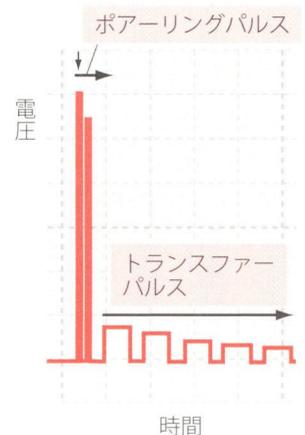
	電圧	パルス幅	パルス間隔	回数	減衰率
ポアーリングパルス	200 V	5 msec	50msec	2回	10%
トランスファーパルス	30 V	50 msec	50 msec	5回	40%

- ⑪ エレクトロポレーション終了後、DNA 混合溶液を丁寧<sup>d)</sup>に吸引する。すぐに、⑦で回収した神経細胞の増殖用培地を加え、培養する<sup>d)</sup>



細胞にダメージを与えないようそっと入れる

- <sup>b)</sup> 神経細胞を無血清培地 (Neurobasal medium など) で培養している場合はすぐにエレクトロポレーションに移行できる。血清を含む培地で培養している場合は、Opti-MEM で 2 回洗浄する。
- <sup>c)</sup> 広範囲に遺伝子導入したければ、エレクトロポレーション後に、電極を 90 度回転させて、再度エレクトロポレーションを行う。



- <sup>d)</sup> 複数回エレクトロポレーションを行うのであれば、DNA 混合溶液を回収し再利用する (著者は 5 回までなら問題なくエレクトロポレーションできることを確認している)。

⑫ DIV18まで培養し、EGFPのシグナルを観察する (図2) ①

① EGFPのシグナルはスパイン様構造物にみられる。エレクトロポレーションする時期を調整することで樹状突起伸長・分岐やシナプス形成への影響を検討することができる。

EGFP (0.2 mg/mL)

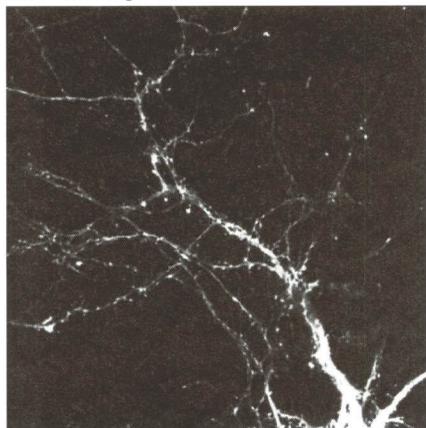


図2 DIV7でエレクトロポレーションし、DIV18で固定 (×60レンズで撮影)

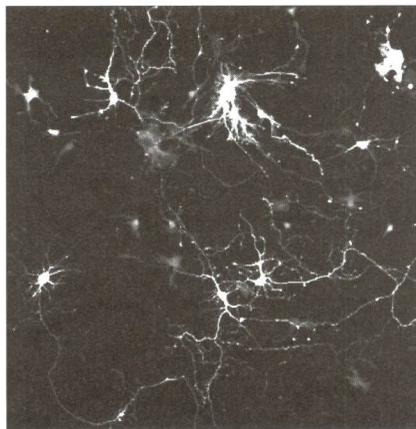
DIV7を用いることで軸索の影響よりも樹状突起形成やシナプスに与える影響をみることができる。DIV18ではシナプス形成がみられる

### 3 条件検討のヒント

#### 1 プラスミドDNA濃度

ネッパジーン社推奨のプラスミドDNAの濃度は最終的に1 mg/mLである。この条件でエレクトロポレーションを行うと遺伝子導入された細胞が隣接し、どの軸索/樹状突起がどの細胞体由来なのかわからなくなってしまう恐れが生じる (図3A)。そこで、プラスミドDNAの濃度は最終的に0.2 mg/mLになるようにして同様の実験を行った。その結果、適度に遺

A EGFP (1 mg/mL)



B EGFP (0.2 mg/mL)

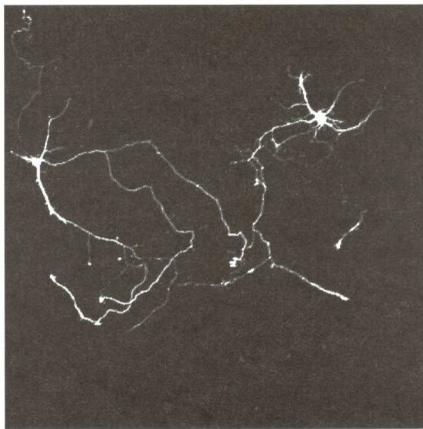


図3 DIV2でエレクトロポレーションし、DIV5で固定 (×20レンズで撮影)

AとBの細胞密度は同一である。A) 高濃度のプラスミドをエレクトロポレーションした場合、高密度のプラスミドを用いたため、多くの神経細胞に遺伝子導入できている。しかし、軸索や樹状突起が交差しているために、どの細胞体からでている軸索/樹状突起なのか区別が難しい。これらの区別ができないと、長さや分岐数の計測が困難になる。B) 低濃度のプラスミドをエレクトロポレーションした場合、低濃度のため、適度の神経細胞に遺伝子導入できている。しかし、Aに比べると細胞1個あたりに導入されている遺伝子のコピー数が減少し、その遺伝子の効果が見えにくくなる可能性がある

伝子導入された細胞を分散させることに成功した (図3B)。ただし、気をつけなければならない点は、おそらく細胞に導入されたプラスミドDNAの濃度も1/5に減っている可能性がある。この結果、過剰発現やRNAiの効果に影響を与えるようであれば問題であるので、注意していただきたい。

## 2 コスト

最後に本項で紹介したエレクトロポレーションに関して、コストの説明をする。初期投資として、スーパーエレクトロポレーター NEPA21を購入する必要がある。初期投資としては高くつくと思われるが、その後のランニングコストはOpti-MEMとプラスミドDNAの調製だけなので非常に安価である。また、別売りのキュベットを購入すれば成体に対しての*in vivo*、胎児に対しての*in utero*、組織切片に対しての*ex vivo*、浮遊細胞に対しての*in vitro*などの各種エレクトロポレーションなどが可能(4章-2-1参照)になるため、今後の研究の展開次第では、有効なツールになるのではないかと考えている。



### エレクトロポレーションされた細胞が確認できない

- 原因**
- ① プラスミドDNAの純度が低い
  - ② プラスミドDNAの濃度が低い
  - ③ エレクトロポレーターのトラブルが生じている

#### 原因の究明と対処法

- ① プラスミドDNAの検査(吸光度や電気泳動)をする。
- ② プラスミドDNAの再精製をする。
- ③ 実験ごとに抵抗値を測定する。また、必ずワークするポジティブコントロールを用意する。



### 高濃度のプラスミドDNAを精製できない

#### 原因の究明と対処法

必要量のプラスミドDNAを用意し、エタノール沈殿させた後、Opti-MEMで再度溶かし直す。

#### 参考文献

- 1) Craig, A. M. & Banker, G. : Annu. Rev. Neurosci., 17 : 267-310, 1994