

3

エレクトロポレーション法による神経細胞への導入

5 脳スライス培養への遺伝子導入

石田綾, 岡部繁男

特徴

※神経細胞への導入全般については4-3-1も参照

- ・細胞種特異的な遺伝子導入が可能
- ・細胞毒性が低い
- ・安全性が高い

1 脳スライス培養へのエレクトロポレーション法の利点

脳スライス（微小組織）培養は、脳の層構造の一部が保たれ、神経回路網がより生体内に近い状態で維持された培養系である。生理的な条件で長時間の実験ができる利点を生かし、分子生物学、形態学、発生学、電気生理学など、幅広いアプローチを用いる解析で利用されている。脳スライス培養への遺伝子導入には、エレクトロポレーション法のほかに、ウイルスベクターや遺伝子銃が用いられる。ウイルスベクターは、細胞毒性や安全性が常に問題となる。また、神経細胞に選択的に遺伝子を導入するためには、適切なウイルス種を選び、プロモーターなどの諸条件を検討する必要がある。遺伝子銃は、機器が高額ではあるが、ウイルスベクターと比較して簡便に利用することができる。スライス内の細胞にランダムかつ低密度に遺伝子が導入されるため、形態学的観察に適するが、細胞種特異的な遺伝子導入には適さない。これらの方法と比較して、エレクトロポレーション法の利点は、安全で準備が簡便であること、発現量が多く、複数の遺伝子を同時に導入することができることがあげられる。また、目的とする細胞の存在部位の特徴を利用することで、効率よく細胞種特異的な遺伝子導入が可能であることも、大きな利点である。

2 細胞選択性に応じた使い分け

エレクトロポレーション法は、細胞のごく近傍にプラスミドDNA溶液を注入し、高電圧をかけることで細胞膜に小さな穴を開け、その瞬間にプラスミドDNAを取り込ませるという方法である。プラスミドDNA溶液の注入方法と、電圧のかけ方を工夫することで、目的に応じたパターンに遺伝子を導入することができる。ここでは、本研究室で利用されている、3種類の脳スライスへのエレクトロポレーション法を紹介する。非特異的遺伝導入法としては、海馬スライス培養を用いた例を紹介する。この方法はできるだけたくさんの細胞に非特異的でもよいから導入したいという目的に用いることができる。プラスミドDNA溶液を、ス

ライス全体を覆うように添加し、スライス全体に電場をかける。細胞種特異的に遺伝子を導入する方法としては、細胞の存在位置の特徴を利用する方法を紹介する。この原理は側脳室帯の神経幹細胞など、さまざまな細胞をターゲットとして用いられているが、ここでは小脳顆粒細胞への導入法を紹介する。幼弱期の小脳顆粒細胞は、脳の表層（外顆粒層）に存在し、発達過程を経て内顆粒層に移動する。外顆粒層の表面にプラスミドDNAが接するように、DNA溶液を小脳溝に注入し、電場を小脳全体にかけることで、顆粒細胞特異的に遺伝子を導入することができる。単一神経細胞エレクトロポレーション法は、特定の1つの細胞に遺伝子を導入する方法である。目的とする細胞表面に、顕微鏡下でプラスミドDNA溶液の入った微小電極を接触させ、細胞特異的に電場をかけることにより、遺伝子を導入する（表）。

表 3種類の脳スライスへのエレクトロポレーション法

	導入できる細胞数	導入できる細胞種	難易度	備考
海馬スライスへの非特異的遺伝子導入法	★★★	非特異的	★	大脳皮質や小脳など、他の組織にも応用可能
小脳顆粒細胞への選択的遺伝子導入法	★★	顆粒細胞	★	細胞の存在位置の特徴を利用することで、神経幹細胞にも応用できる
単一神経細胞へのエレクトロポレーション	★	目的とする個々の細胞	★★★	大脳皮質や小脳など、他の組織にも応用可能



1) 海馬スライス培養への非特異的遺伝子導入

準備するもの

※脳スライス培養の作製方法については、参考文献7を参照。

▶ 1) 機器類

- 遺伝子導入装置… CUY21E（ネッパジーン社）
- ニードル白金電極… CUY611P3-1
- フレーム付シャーレ円形白金電極 2 mm φ… CUY700P2E

▶ 2) 消耗品類

- 解剖用具（ピンセット2本程度）
- メンブレンフィルター… JHWP02500（ミリポア社）
- シャーレなど
- ハンクス緩衝溶液（HBSS）

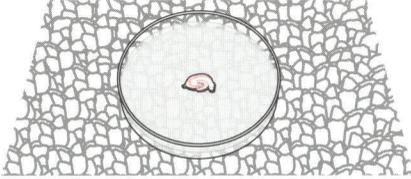
▶ 3) サンプルなど

- プラスミドDNA溶液

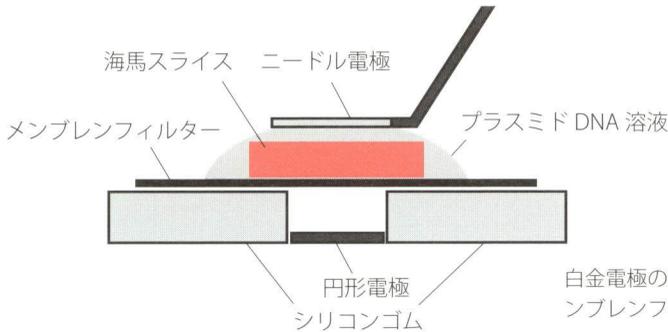
キアゲン社のMaxi kitで精製したプラスミドDNAをHBSに調製する。DNA濃度は、 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ とする。溶液の分布をわかりやすくするため、FastGreen 0.01%（シグマ・アルドリッチ社 #F7258）で着色する。HBSの組成は、子宮内エレクトロポレーション法（4章-3-1参照）と同様である。

プロトコール

- ① マウス胎仔（胎生 15.5 日～生後 0 日目）の海馬から培養用のスライスを作製し、冷たい HBSS の入ったシャーレに入れ、氷上に置く[Ⓐ]



- ② エレクトロポレーション用のチャンバー（フレーム付シャーレ円形白金電極：下図）に冷たい HBSS を満たし、メンブレンフィルターの上に海馬スライスを置く



白金電極の設置されたシャーレ内を冷たい HBSS で満たし、メンブレンフィルターの上に海馬スライスを載せる。文献 2 より

- ③ プラスミド DNA 溶液 $5 \mu\text{L}$ を海馬スライスの上に滴下する
- ④ ニードル白金電極をプラスミド DNA 溶液表面に接触させる
- ⑤ 電気パルスを与える[Ⓑ]
- ⑥ 電場の方向を逆にし、もう一度同様の電気パルスを与える[Ⓒ]
- ⑦ スライスを培養し、数日後に遺伝子発現を確認する（図 1）

Ⓐ 細胞へのダメージを防ぐため、低温を維持する

Ⓑ 電圧値は、導入したい細胞数に応じて $5 \sim 15\text{V}$ に調節する。例えば、電圧 15V 、パルス幅 5 msec 、パルス間隔 995 msec 、5 発

Ⓒ 電気パルスは 10 発以上かける必要があるが、すべて同じ方向にかけると細胞へのダメージが大きい。電気パルスを 5 発かけた後、逆向きのパルスを 5 発かけることで、ダメージを抑え、より多くの細胞に導入することができる。

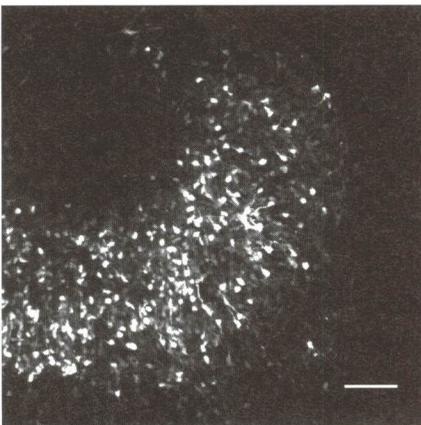


図 1 遺伝子 (EGFP) を導入後、培養 3 日目の海馬スライス培養

多くの幼弱な神経細胞に EGFP の発現が確認された。スケールバー： $100 \mu\text{m}$



2) 小脳顆粒細胞への選択的遺伝子導入

準備するもの

▶ 1) 機器類

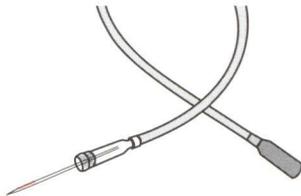
- 遺伝子導入装置… CUY21E (ネッパジーン社)
- ピンセット型電極… CUY650P5 (ネッパジーン社)
- 吸引チューブ (Drummond社)
- インジェクション用ガラスキャピラリー… 30-0066 (Harvard社) など
内径が太めのもの。注入しやすいよう先端を適宜折っておく。
- リン酸緩衝溶液 (PBS)

▶ 2) サンプルなど

- プラスミド DNA 溶液
キアゲン社の Maxi kit で精製したプラスミド DNA を HBS に調製する。DNA 濃度は、 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ とする。溶液の分布をわかりやすくするため、FastGreen 0.01% (シグマ・アルドリッチ社 #F7258) で着色する。HBS の組成は、子宮内エレクトロポレーション法と同様である。

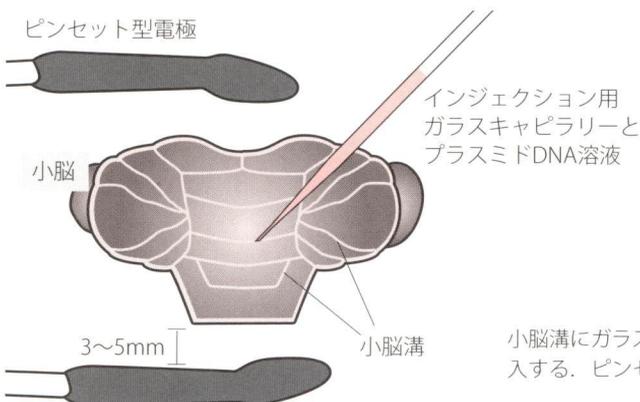
プロトコール

- ① ガラスキャピラリーと吸引チューブを接続し、あらかじめプラスミド DNA 溶液 $10 \mu\text{L}$ を吸っておく



- ② 6 cm ディッシュに PBS 15 mL を入れ、氷上で冷やしておく
- ③ マウス (生後 6~8 日目) の小脳を摘出し、PBS 中に入れる
- ④ 小脳溝にプラスミド DNA 溶液 $10 \mu\text{L}$ を注入する^⑤

- ⑤ 実体顕微鏡で観察しながら、小脳溝にキャピラリーの先端を挿入する。いくつかの角度から、複数の小脳溝に溶液を注入する。



小脳溝にガラスキャピラリー先端を挿入し、プラスミド DNA 溶液を注入する。ピンセット電極は小脳を挟むように小脳溝に平行にもつ

⑤ピンセット型白金電極を、小脳を挟むように^②、小脳溝に平行にもつ

⑥電気パルスを与える^③

⑦小脳スライスを作製し、培養する (図2) ^④

②ただし、じかに接しないように注意.

③電圧値は、導入したい細胞数に応じて30~100Vに調節する. 120V以上では、細胞へのダメージが大きくなる傾向がある. 例えば、電圧100V、パルス幅50 msec、パルス間隔450 msec、5発.

④エレクトロポレーション後のサンプルは氷上に置き、なるべく速やかにスライスを作製する.

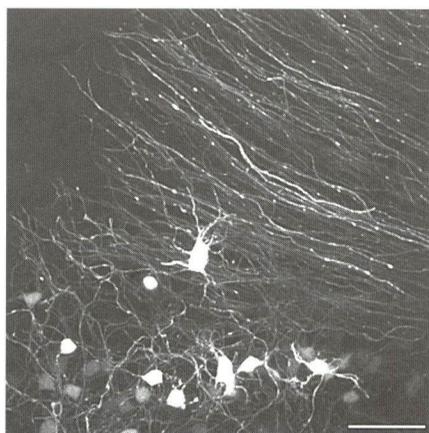


図2 EGFPを導入後、培養6日目の小脳スライス培養

顆粒細胞特異的にEGFPが発現していることを確認した. スケールバー: 40 μ m

3) 単一神経細胞エレクトロポレーション法

準備するもの

▶ 1) 機器類

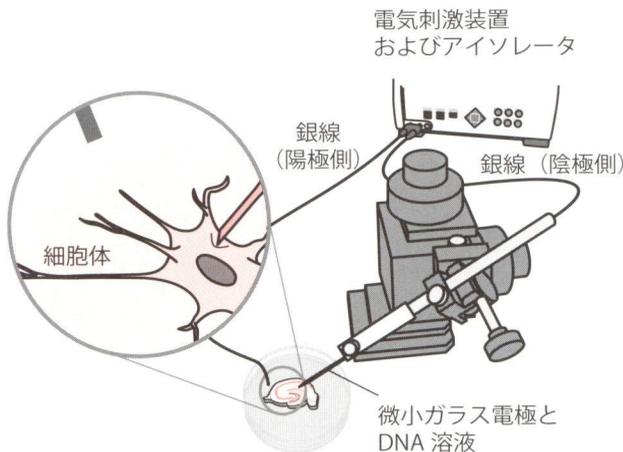
- 電気刺激装置とアイソレータ (日本光電社)
- 手動マイクロマニピュレーター (ナリシゲ社)
- 微小ガラス電極針…64-0787 (Warner Instruments 社) など
先端は細いほうがよく、0.6~1 μ mに調節する.
- 電極用の銀線、2本

▶ 2) サンプルなど

- プラスミドDNA溶液
キアゲン社のMaxi kitで精製したプラスミドDNAを精製水に調製する. DNA濃度は、1 μ g/ μ Lとする. 溶液の分布をわかりやすくするため、FastGreen 0.01% (シグマ・アルドリッチ社 #F7258)で着色する. HBSの組成は、子宮内エレクトロポレーション法と同様である.
- 低濃度血清培地
通常よりも血清濃度の低い培地 (5%ウマ血清).

プロトコール

- ① 微小ガラス電極針にDNA プラスミド溶液を充填し、陰極側の銀線を溶液内まで挿入し、手動マイクロマニピュレーターに設置する



陰極側の銀線は微小ガラス電極内に挿入し、陽極側はスライスの外側の培地に浸るように設置する。細胞体が少しくぼむまで電極を近づけ、電気パルスを与える

- ② 海馬スライス（培養8～10日目）を低濃度血清培地の入ったディッシュに移し、正立顕微鏡下（60倍、水深レンズ）で、目的の細胞を決める
- ③ 陽極側の銀線は、スライスの外の培地中に置く
- ④ マニピュレーターを用いて、ガラス電極先端を細胞体の近傍まで誘導し、細胞体が軽くくぼむ程度まで近づける
- ⑤ 電気パルスをかける^{a)}
- ⑥ 海馬スライスを培養液に戻し、数日後に観察する (図3)^{b)}

- a) 文献5より、最も効率が良いとされる条件を選択した。必要な電圧の大きさは、条件により変わるため、10～50 Vに適宜調整する。例：電圧30 V、パルス幅1 msec、周波数200 Hz、200 発
- b) 単一神経細胞電ポレーション法は、他の方法よりも熟練を必要とする。条件検討の際、プラスミドDNA溶液の代わりに蛍光色素を用いるとよい。電気パルスをかけた直後に、細胞体へ色素がとりこまれているかを蛍光顕微鏡でチェックしながら、電極先端の細胞への接触のさせ方や電圧値を調節する。テトラメチルローダミンデキストラン（細胞トレーシング用の赤色蛍光色素）を利用する場合、電気パルスの方向は、DNAの場合の逆なので注意する。

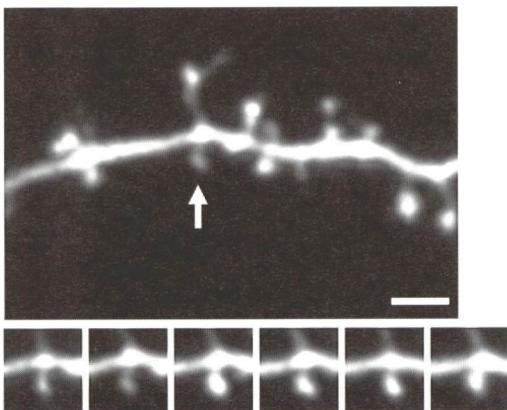


図3 単一神経細胞電ポレーション法によりEGFPを導入した海馬神経細胞を用いた実験例

EGFPが導入された海馬神経細胞に対して、高頻度電気刺激（100 Hz, 100 発）を与えると、スパインの頭部が大きくなる様子が観察された。スケールバー：2 μ m. 文献6より転載



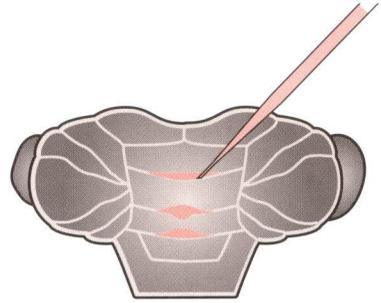
4

遺伝子が導入されない

- 原因**
- ① プラスミド DNA 溶液の注入方法が不適切
 - ② 電気パルスのかけ方に問題がある

原因の究明と対処法

① DNA 溶液の注入方法については、海馬スライス培養への非特異的遺伝子導入法では基本的には問題にならないと思われる。小脳顆粒細胞への選択的遺伝子導入法では、小脳溝にガラス先端を深めに挿入し、DNA 溶液の池ができるようなイメージ（右図）で、多めに注入するとよい。単一神経細胞エレクトロポレーション法では、ガラス電極の先端が細胞体にしっかりと密着する必要がある。あまり押し付けすぎると細胞が死んでしまうので、ちょうどよいところを見つけることが大切である。



② 電気パルスについては、毎回の電流値を確認し、電圧の設定値を調整する。細胞にダメージを与えないように、できるだけ低い電圧を用いる必要がある。まず、やや高めの電圧に設定し、遺伝子の発現を確認できたなら、少しずつ下げていくとよい。

参考文献

- 1) 『必ずうまくいく遺伝子導入と発現解析プロトコール』（仲嶋一範，北村義浩／編），羊土社，2003
- 2) Kawabata, I. et al. : Neuroreport, 15 : 971-975, 2004
- 3) Yang, Z. J. et al. : J. Neurosci. Methods, 132 : 149-160, 2004
- 4) Konishi, Y. et al. : Science, 303 : 1026-1030, 2004
- 5) Haas, K. et al. : Neuron, 29 : 583-591, 2001
- 6) Yamagata, Y. et al. : J. Neurosci, 29 : 7607-7618, 2009
- 7) Stoppini, L. et al. : J. Neurosci. Methods, 37 : 173-182, 1991