

プログラム名：豊かで安全な社会と新しいバイオものづくりを  
実現する人工細胞リアクタ

PM名：野地博行

プロジェクト名：「ふえる」人工細胞デバイス

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平 成 2 8 年 度

研究開発課題名：

核酸保護剤を用いたゲノム導入法

研究開発機関名：

国立研究開発法人理化学研究所

研究開発責任者

吉積 毅

## I 当該年度における計画と成果

### 1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

平成 28 年度の達成目標として、0.2 Mb プラスミドの安定化と、核酸保護剤で 0.08 Mb プラスミドを大腸菌に導入する技術の確立、の 2 点を設定した。この目標に向かって、3 つの課題について研究を行った。それぞれの課題の目標と計画を以下に示す。

#### 1) 0.2 Mb を超えるゲノムサイズ DNA を安定化する技術の開発 (課題 1)

この課題では、リポソーム形成時に行うボルテックスを「現実的な」物理的剪断とし、この剪断からゲノムサイズプラスミドを保護する技術の開発を目標としている。使用する核酸保護剤として、報告者らが開発した核酸保護剤(A および B)に加えて、PEG (ポリエチレングリコール) とポリリジンなどを使用した。

#### 2) 0.2 Mb を超えるゲノムサイズ DNA を大腸菌に導入する技術の開発

##### 2)-a. 核酸保護剤を用いた 0.08 Mb プラスミドの大腸菌への導入 (課題 2)

本年度は、核酸保護剤(B)を用いたゲノムサイズプラスミド導入に向けた条件検討を目的とし、サブゲノムサイズと捉えられる 0.08 Mb プラスミドの大腸菌への導入を計画した。

##### 2)-b. 大腸菌に対して高効率かつ低細胞毒性核酸保護剤の開発 (課題 3)

現在使用している核酸保護剤(B)は、植物用に開発した核酸保護剤であるため、大腸菌には最適ではない可能性がある。加えて、この保護剤の一部に使用している細胞透過剤は抗菌活性を持つことから、強い細胞毒性のために導入効率が低い可能性もある。そこで、55 種類の細胞透過剤ライブラリーから、大腸菌に対して効率の高い細胞透過剤を選抜する計画を立てた。

### 2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

#### 2-1 進捗状況

1) ゲノムサイズプラスミド安定化技術開発では、まず物理的剪断処理条件を検討した。ボルテックス(タイテック社製 Se-03)処理を 10 秒から 60 秒まで行い、0.2 Mb プラスミドがどの程度破砕されるか検証を行った。得られた結果から 30 秒という処理条件を設定し、核酸保護材による 0.2 Mb プラスミドの保護を調べた。平成 28 年度に用いた保護剤として、核酸保護剤(A および B)、ポリリジン、そして、PEG となる。なお、核酸保護剤(A)は核酸保護剤(B)の DNA 結合に関わる部位となる。

2)-a. 0.08 Mb プラスミドを大腸菌 (DH5  $\alpha$  ケミカルコンピテントセル)へ核酸保護剤(B)を用いて導入した。平成 28 年度は、核酸保護剤(B)と DNA の比や複合体量など複数項目について検証した結果、最適な条件が得られている。

2)-b. 大腸菌最適化細胞透過剤を 55 種類の細胞透過剤ライブラリーからスクリーニングした。方法は、蛍光(TAMRA)ラベルした細胞透過剤を大腸菌(DH5  $\alpha$  ケミカルコンピテントセル)に取り込ませた後、大腸菌の蛍光をプレートリーダーで測定し定量化すると共に、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析も行った。

#### 2-2 成果

1) ボルテックス処理条件の検討実験から、0.2 Mb プラスミドは物理的剪断に対して 0.08 Mb プラスミドより遥かに高感受であることが明らかになった(図 1a)。次に、30 秒のボルテックス処理を用いた

4種類の核酸保護剤の検証を行った。用いた保護剤の内、最も保護効果が高かったのがポリリジンとなる(図1)。しかし、ポリリジンを用いた場合、プラスミドとの結合が強く、プラスミドの回収量が低い結果も得られている。

2)-a. 複合体調整などの様々な条件を検討することで、核酸保護剤(B)を用いた場合に、プラスミドのみ、熱処理を加えた場合に比べて有意な導入に成功した(図2)。一方で、エレクトロポレーション法と比較すると、導入効率は非常に低い値となった。なお、得られたコロニーからは目的の大きさのプラスミドを単離できている(図2c)。

2)-b. 細胞透過剤ライブラリーの中から大腸菌への導入効率の高い細胞透過剤を得ることに成功した(図3)。プレートリーダーを用いた解析結果から、上位10、中位5、そして下位4を選び共焦点レーザー顕微鏡観察による確認を行った。これら結果は、概ね相関していた。

図1 核酸保護剤の保護効果検証

- a ボルテックス30秒後の0.2 Mbプラスミドの構造  
 -: ボルテックス無処理(保護剤なし)、+: ボルテックス処理(保護剤なし)、A: 核酸保護剤(A)、B: 核酸保護剤(B)、Lys: ポリリジン、PEG: PEG3350。なお、保護剤を加えた場合にはボルテックス処理を行っている。矢印と矢頭は、それぞれ超らせん構造と直鎖のプラスミドを示す。  
 b 超らせん構造(SC)と直鎖(L)プラスミドの総量(SC+L)  
 c 超らせん構造と直鎖プラスミドの比(SC/L比)  
 cのグラフ内の数字はボルテックス無処理プラスミドの比を示す。ポリリジンを用いることで、核酸保護剤を用いなかった場合に比べて7倍の保護効果を示す。

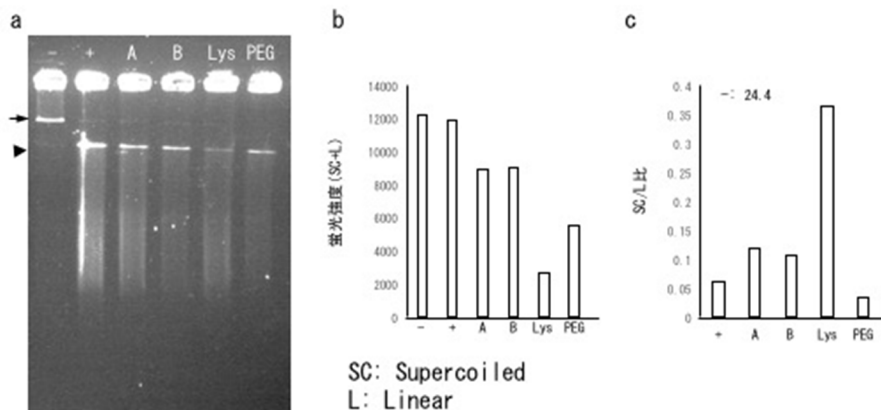
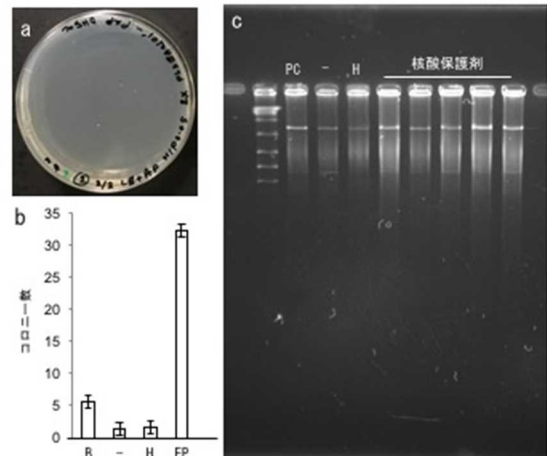


図2 0.08 MbプラスミドのDH5αケミカルコンピテントセルへの導入

- a 核酸保護剤(B)を用いた遺伝子導入によって得られたコロニー  
 b 核酸保護剤(B)を用いた遺伝子導入によって得られたコロニー数  
 B: 核酸保護剤(B)、-: 無処理(プラスミドの添加のみ)、+: 熱処理、EP: エレクトロポレーション エレクトロポレーションのコロニー数はケミカルコンピテントセルの細胞数で補正している。  
 c 得られたコロニーより抽出したプラスミドの構造  
 PC: 遺伝子導入に用いたプラスミド、-: 無処理から得られたコロニー、H: 熱処理から得られたコロニー、核酸保護剤: 核酸保護剤(B)処理から得られたコロニー  
 プラスミドはミニプレップで抽出し、パルスフィールドゲル電気泳動を行った。マーカーとしてλファージゲノムを用いている。エラーバーは標準偏差を示す。



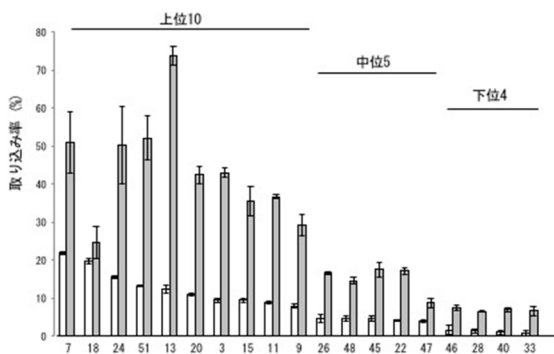


図3 大腸菌最適化細胞透過剤のスクリーニング結果

白色棒グラフはプレートリーダーによる蛍光取り込みから得られた値、灰色棒グラフは、共焦点レーザー顕微鏡観察から得られた値となる。共焦点レーザー顕微鏡の取り込み率は、視野当たり的大腸菌に対する蛍光を示した大腸菌となる。エラーバーは標準偏差を示す。55種類の細胞透過剤の内、プレートリーダーを用いた解析結果により同定した上位10、中位5、下位4種類を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。棒グラフ下に示した数字は、各細胞透過剤の番号を示す。

### 2-3 新たな課題など

成果で示したように、核酸保護剤(B)を用いた 0.8 Mb プラスミド導入には成功しており、再現性に乏しいが、形質転換効率が飛躍的に上昇する実験結果が得られている。現在のところ、これまでの低い形質転換効率の原因はプラスミドへの多糖の混入ではないかと推測している。課題 3A の立教大学より、有効な多糖の除去法の提案を受けている。今後はこの方法を利用して抽出したプラスミドを用いることで、効率の高い遺伝子導入に繋げたい。また、大腸菌への高効率の細胞透過剤候補の選抜に成功した。しかし、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察を行ったが、大腸菌のサイズが小さすぎたため、これら細胞透過剤がどの程度細胞内に取り込まれているか定量できていない。今後、膜を染色する蛍光色素などと組み合わせた観察を行う必要がある。加えて、細胞毒性について、選抜した細胞透過剤の評価も行う必要がある。

### 3. アウトリーチ活動報告

なし。