

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 9 年 度

研究開発課題名：

リポソーム内 DNA 封入法の開発

研究開発機関名：

中央大学

研究開発責任者

鈴木 宏明

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

現在のバイオテクノロジーでは、数十 kbp より大きな DNA を細胞に効率よく導入する方法は広く確立されていない。一方、自然界のウイルスは、キャプシド中に詰め込まれたゲノム DNA を宿主細胞内に効率的に導入する。本研究では、巨大 DNA を高密度で脂質ベシクルに包み込んだ人工ベクターを開発し、宿主細胞との融合による巨大ゲノム導入法を確立する。平成 29 年度は、課題 3A（立教大学）より提供された 200 kb の巨大 DNA を大腸菌に導入し、その遺伝子を起動させる方法および条件の検討を行った。

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

200 kb 巨大プラスミドの細胞内導入

野地プログラムの他グループ（研究開発課題 3A（立教大学）、課題 4A（東京大学））との協力関係の下、200kb の Bacterial Artificial Chromosome (BAC; 細菌人工染色体) を保有する大腸菌株の提供を受け、この DNA（マーカー遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子、mCherry 保有）の大腸菌内送達を試した。細胞内 DNA 導入法として従来法（エレクトロポレーション法、リポフェクション法）とリポソームを用いた細胞内 DNA 導入法を検討した。

1. 従来法による細胞内 DNA 導入

1-1. エレクトロポレーション法

- ・ 電気穿孔法（エレクトロポレーション法）での導入を実施し、200 kb サイズの DNA をエレクトロポレーション法で導入できる条件を最適化した。

1-2. リポフェクション法

- ・ カチオン性脂質を用いた方法（リポフェクション法）での導入を実施した。

2. リポソームを用いた細胞内 DNA 導入

- ・ リポソームを用いた DNA 導入（①リポソーム内封入、②リポソーム膜外吸着）を実施した。

2-2 成果

1. 従来法による細胞内 DNA 導入

1-1. エレクトロポレーション法

エレクトロポレーション後、200kb BAC が持つカナマイシン耐性遺伝子を利用して、カナマイシン存在下で寒天プレート培養した。電気パルスや緩衝液の条件を複数試したが、最終的に、 10^4 cfu/ μ g DNA 程度の形質転換効率を得た。また、ここで増殖したコロニーは、カナマイシン耐性遺伝子のコロニー-PCR が陽性であり、かつ、顕微鏡観察により赤色蛍光タンパク質(mCherry)の発現が確認でき、全長のプラスミドが正しく導入され、遺伝子が働いている（起動している）ことが強く示唆された。少なくとも 200 kb サイズの DNA（保護なし）をエレクトロポレーション法で導入できる条件を最適化した。比較のため、3.4kb の（通常

サイズの) プラスミド, および課題 3A (立教大学) より提供された 80kb のプラスミドでも同様に電気穿孔法を行ったところ, それぞれ 10^7 と 10^5 cfu/ μ g DNA 程度の形質転換効率であった.

1-2. リポフェクション法

一般的によく用いられるカチオン性脂質を用いた方法 (リポフェクション法) でも DNA 導入可能か評価を行った. この方法では, 3.4kb のプラスミドでは 10^4 cfu/ μ g DNA 程度の効率が得られたが, 80kb および 200kb ではごく少数のコロニーが出現したものの, カナマイシン耐性遺伝子が検出されず, 少なくとも 80 kb 以上の DNA には不適であった.

2. リポソームを用いた細胞内 DNA 導入

200kb の DNA は電気穿孔法により問題なく大腸菌内に導入できることを確認した. しかし, この方法では裸の DNA を用いるため, 流体のせん断や電気パルス印加時の静電的応力の影響が無視できず, より大きなゲノムサイズ DNA を細胞内導入する際には, 効率が著しく低下する恐れがある. そこで, 本課題ではリポソーム (脂質) を保護分子かつキャリアとして利用した DNA 送達法を提案した. 具体的には, ①リポソーム内に DNA を圧縮封入し, 封入したリポソームを介して大腸菌に導入する方法と, ②あらかじめ大腸菌由来脂質を用いて作製したリポソームと DNA を混合させ, 二価金属カチオンの存在下で大腸菌と一定時間インキュベーションして導入する方法である. ①リポソーム内封入に関しては, 200 kbp プラスミドにおいてコロニーPCR によりカナマイシン耐性遺伝子の欠落が示唆された. ②リポソーム膜外吸着では, 大腸菌とリポソームとのインキュベーション後カナマイシン選択培地でコロニー数を確認した. その結果, 3.4kb のプラスミドでは 10^4 cfu/ μ g DNA 程度の形質転換効率を得られ, 80 kb および 200 kb の BAC ではほぼ等しく 10^1 cfu/ μ g DNA のオーダーであった. これらの大腸菌は, コロニーPCR で, 導入した DNA にのみ存在するカナマイシン耐性遺伝子および蛍光タンパク質遺伝子の存在が確認できた. これは, 全長の DNA が導入されたことを強く示唆している. 現在, 最小の必須条件を探索中である.

以上の実験結果により, 中性脂質 (特に大腸菌由来脂質) を保護分子とし, 200kb の DNA を大腸菌内に導入・起動させることが可能であることを示した.

2-3 新たな課題など

現在, リポソームをキャリアとした大腸菌への DNA 導入法について, 条件を精査し, 必須条件の洗い出しと, より形質転換効率を高める条件の検討を行っている. その過程で, コロニーが出現するものの, 導入したはずのターゲット遺伝子が PCR で確認できないという条件が存在する. 次年度は, 配列解析による直接的な確認方法も採用し, 巨大 DNA の導入・起動法のさらなる効率化および安定化を図る.

3. アウトリーチ活動報告

なし。