

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 29 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 29 年度の達成目標として、核酸保護剤を用いた 0.2 Mb プラスミドを大腸菌に導入する技術の確立と大腸菌最適化細胞透過剤の選抜、の 2 点を設定した。この目標に向かって、2 つの課題を設定し研究を行った。それぞれの課題の目標と計画を以下に示す。

1) 核酸保護剤を用いた 0.2 Mb プラスミドの大腸菌への導入

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、目標とするゲノムサイズ (0.2 Mb) プラスミドの大腸菌への導入を計画した。

2) 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

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。55 種類の細胞透過剤の大腸菌への取り込み効率を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検証した。

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) 核酸保護剤を用いた 0.2 Mb プラスミドの大腸菌への導入

0.2 Mb プラスミドを大腸菌 (DH5 α 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 29 年度は、核酸保護剤 (B) と DNA の混合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) 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

蛍光 (TAMRA) ラベルした細胞透過剤を大腸菌 (DH5 α ケミカルコンピテントセル) に取り込ませた後、大腸菌に取り込まれた細胞透過剤の蛍光を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。この時に、蛍光試薬による膜の染色も行っており、細胞内の取り込みを確認した。加えて、細胞透過剤の細胞毒性についても検証した。

2-2 成果

1) 核酸保護剤を用いた 0.2 Mb プラスミドの大腸菌への導入

核酸保護剤 (B) を用いることで、0.2 Mb プラスミドの大腸菌への導入に成功した (図 1)。核酸保護剤 (B) とプラスミドの混合比 (N/P 比) を詳細に検討した結果、N/P 比 0.1 において、最も高い導入効率を示した (図 1B)。なお、N/P 比 0.1 の導入効率は、エレクトロポレーションを用いた場合に比べて、4 倍程度高い値となった。遺伝子導入した大腸菌からプラスミドを抽出し、制限酵素処理を行い、電気泳動により構造を確認したところ、欠損などは確認できなかった (図 1C)。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて mCherry の蛍光も観察した。これら結果は、核酸保護剤 (B) によりゲノムサイズプラスミドの大腸菌への導入が可能なこと、そして導入プラスミドが「起動」していることを示している。

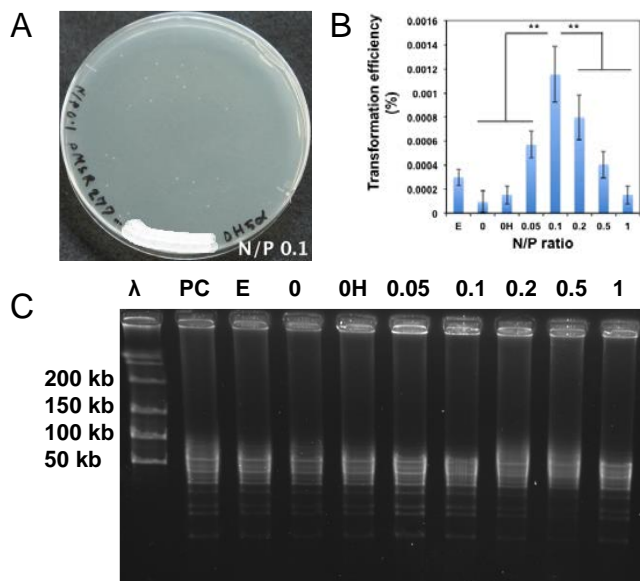


図1 核酸保護剤(B)を用いた大腸菌への0.2 Mbプラスミド導入

A: 遺伝子導入した大腸菌のプレート。数字はN/P比を示す。

B: 異なるN/P比における形質転換効率。

数字はN/P比を示す。Eはエレクトロポレーションによる遺伝子導入と、0は核酸保護剤(B)なしを、0Hは核酸保護剤(B)なしで熱処理による遺伝子導入を意味する。エレクトロコンピテントセルとケミカルコンピテントセルを比較するために、このグラフで表す形質転換効率は、0.2 Mbプラスミドを1 µg用いたコロニー出現数を、pUC19を1 µg用いたコロニー出現数で標準化している。なお、実際の形質転換効率は、

エレクトロポレーション法を用いた場合には8.9 (2.1) cfu/µgで、N/P = 0.1では7.0 (1.2) cfu/µgとなる(標準偏差)。**サンプル間でt検定による有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

C: 各処理から得られたコロニー由来のプラスミドを制限酵素処理した電気泳動像。PCは遺伝子導入に用いたプラスミドを切断した。

2) 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

共焦点レーザー顕微鏡を用いることで、細胞透過剤の細胞への取り込みを詳細に観察した(図2)。蛍光が観察できた細胞透過剤では、細胞膜を通過し、細胞質に取り込まれていることも確認した(図2B、C)。細胞毒性についても検証を行ったが、細胞透過効率と毒性には相関が認められなかった。これら結果から高効率かつ低毒性の細胞透過剤を複数同定しており、大腸菌最適化核酸保護材の開発につながる事が期待できる。

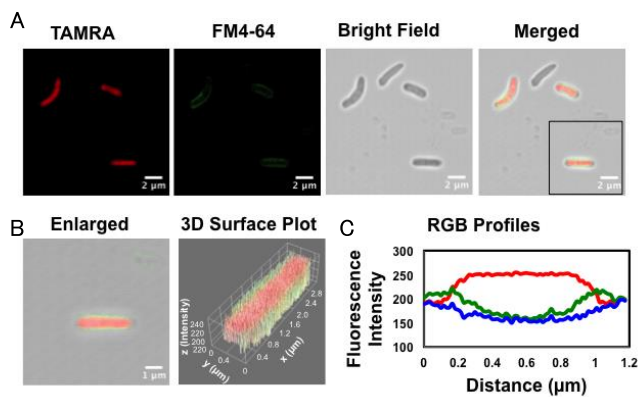


図2 共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞透過剤(C)取り込みの観察

A: 共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光像を示す。TAMRAは細胞透過剤の蛍光、FM4-64は膜を染色する蛍光指示薬の蛍光像となる。B: AのMergedの四角枠の拡大図(左)と蛍光の輝度値を表した図(右、3D Surface Plot)。C: Bの3D Surface PlotのRGB輝度値グラフ。緑で示される膜と赤で示される細胞透過剤(C)は

中央部では重ならないことから、細胞透過剤は細胞質に取り込まれることが明らかである。

2-3 新たな課題など

なし

3. アウトリーチ活動報告

なし