

3. 遺伝子導入と発現シリーズ

遺伝子導入と発現 (1)

折茂 英生

日本医科大学大学院医学研究科医科生物化学

3. Gene Delivery and Expression Series

Gene Delivery and Expression (1)

Hideo Orimo

Division of Medical and Biological Chemistry, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

Abstract

The delivery of genes into cells is a basic procedure in molecular biology. The induction of genes into prokaryotic cells is referred to as transformation, which is a basic method in gene cloning, whereas that into eukaryotic cells is called transfection. Several transfection methods have been reported: physical, chemical, and biological. In this technical note, a transfection method using cationic lipids is described for studies of gene function and the expression of mutant proteins.

(日本医科大学医学会雑誌 2011; 7: 92-96)

Key words: transformation, transfection, vector, cationic lipids, luciferase

はじめに

外来の遺伝子を細胞に導入し、細胞内で発現させることは分子生物学の基本的な手技の一つであり、さまざまな目的で用いられる。対象とする細胞も前核細胞、真核細胞により手技が異なる。本シリーズでは、前核細胞である細菌への遺伝子導入による蛋白質の大量発現系、真核細胞である昆虫細胞を利用した蛋白質の大量発現系、ヒトを含む哺乳類細胞へのウイルスベクターを用いた遺伝子導入と発現について解説する予定である。第1回の今回は introduction として遺伝子導入の一般論と真核細胞への遺伝子導入法について解説する。細胞はもともと外来の核酸を取り込まないし、核酸も細胞膜も負に荷電しており、自然の状態では両者

は結合、融合しない。そこで核酸の導入に際しては人工的手段が必要となる。前核細胞である大腸菌への遺伝子導入は transformation (形質転換) であり、コンピテントセルの状態にした大腸菌を用いる。真核細胞への遺伝子導入は transfection と称され、導入に際しては何らかの補助的因子を必要とする。また、導入する遺伝子はプラスミドなどに含まれた形で細胞へ送り込むのが一般的であり、このように遺伝子運搬手段として用いるものをベクターとよぶ。

細胞への遺伝子導入

大腸菌への遺伝子導入

大腸菌への遺伝子導入は分子生物学の最も基本的な手技である。遺伝子のクローニング、サブクローニン

Correspondence to Hideo Orimo, MD, PhD, Division of Metabolism and Nutrition, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: orimohd@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

表1 哺乳類細胞への遺伝子導入（トランスフェクション）法

方法	特徴	事例
a. 物理的方法		
直接注入法	特定の細胞に導入可, 機器が必要	マイクロインジェクション
粒子衝撃法 (biolistic particle delivery)	金粒子と結合した核酸を高速度で注入	遺伝子銃
electroporation	ベクターを要しない, 機器が必要	
レーザー照射法	レーザー顕微鏡が必要	optoporation
sonoporation	超音波を使用	
magnetofection	磁場を使用	
b. 化学的方法		
カチオン性ポリマー	細胞毒性あり	DEAE-デキストラン, ポリエチレンイミン, ポリブレン, デンドリマー
リン酸カルシウム カチオン性脂質	効率良 簡便, 多くの市販品がある	lipofectin, lipofectamine, FuGene
c. 生物学的方法		
ウイルス	効率良, <i>in vivo</i> にも使用可	レトロウイルス, レンチウイルス, アデノウイルス, アデノ随伴ウイルス

グに際して適当なベクターを選び、大腸菌に導入 (transform) して増殖させる方法は、どのような分子生物学の実験書にも書かれていることであり、ここでは詳細は述べない⁴⁾。一般に用いられる大腸菌は K12 株に由来する JM109 や DH5 α であり、transform に際してはカルシウム処理により DNA を取り込みやすい状態にしたコンピテントセルを用いる。ベクターとして用いるプラスミドは pBR322 に由来するものであり、非常に多くの組換えプラスミドが市販されている。蛋白質を大量発現するために大腸菌へ遺伝子を導入する方法および発現蛋白質の精製法などは本シリーズの第 2 回で解説する。

昆虫細胞への遺伝子導入

蛋白質の大量発現の目的で用いられる。本シリーズの第 3 回で詳細を解説する。

哺乳類細胞への遺伝子導入⁵⁾

主に遺伝子の機能解析と哺乳類での蛋白質の発現とその機能解析に用いられる。遺伝子導入の方法には大きく分けて 3 種類の方法がある。a. 物理的方法, b. 化学的方法, c. 生物学的方法, である。それぞれに特徴があり、目的によって使い分ける必要がある(表1)。

a. 物理的方法

物理的方法には細胞への直接注入や electroporation

法などがある。特殊な機器を必要とするか、技術的習熟が必要なものがある。

b. 化学的方法

最もよく用いられ、簡便であるが、一般的には導入効率は低い。カチオン性ポリマー、リン酸カルシウム、カチオン性脂質などであり、プラス電荷をもつこれらの化学物質と負に荷電した核酸が全体としてプラス電荷をもつ複合体を形成し、負に荷電している細胞膜に接着し、endocytosis などにより細胞に取り込まれると説明されている。これらがどのようにして核に到達して発現されるかははっきり分かっていない。最も古くから用いられているのはカチオン性ポリマーである。リン酸カルシウム法は化学的方法としては導入効率が高いがカチオン性脂質に比べ手技が複雑である。カチオン性脂質は最も簡便な方法で多くの商品が市販されている。ただしターゲットとなる細胞によって導入しやすいものとしにくいものがあり、適切な組み合わせを選択する必要がある。

c. 生物学的方法

最も一般的に使用される生物学的方法はウイルスを使用した方法 (transduction) である。この方法は導入効率が高く、宿主ゲノムに組み込まれる性質をもつウイルス (レトロウイルスなど) を用いれば、導入遺伝子が宿主細胞のゲノム DNA に挿入され

(integrate), 発現される。しかしウイルス本来の生物学的性質から、細胞毒性や免疫原性が問題となることがある。また、ゲノムに integrate されるウイルスをベクターとして用いる際には、癌抑制遺伝子の破壊や癌遺伝子の活性化などの恐れがあり、治療用ベクターとしては克服されねばならない問題点である。ウイルスベクターは哺乳類細胞だけでなく、昆虫細胞への導入にも特有の感染性をもつバキュロウイルスが使用される。なおウイルスベクターを用いて哺乳類細胞に遺伝子を導入する方法については本シリーズの第4, 5回で解説する。

一過性発現と安定的発現

導入遺伝子の細胞内発現には一過性 transient 発現と安定的 stable 発現があり、研究の目的に応じて選択する。一過性発現とは導入遺伝子がホスト細胞の遺伝子に integrate されない場合で、導入された DNA が一旦導入細胞の核に到達し転写されるか、導入された mRNA が細胞質内で翻訳されて蛋白質が合成されるが、細胞が分裂すると、導入されている細胞数は相対的に減少するため、時間とともに発現量は減少する。一方、安定的発現ではホストゲノムに導入遺伝子が integrate されるので、細胞分裂に伴って子孫の細胞に受け渡され、細胞数の増加に伴って発現量が減少することはない。しかし、どのような導入法を用いてもすべての細胞に遺伝子が導入され integrate されることはないので、ゲノムに integrate された細胞を選択する過程が必要である。

トランスフェクションの目的

哺乳類細胞に哺乳類遺伝子を導入する目的は大別すれば遺伝子機能の解析と蛋白質の発現である。遺伝子機能の解析としては遺伝子調節領域の機能解析や siRNA の導入による遺伝子のノックダウンなどに用いられる。蛋白質の発現としては、変異蛋白質の発現による遺伝病などの病態解析、正常な蛋白質の発現による導入細胞の機能修復、組換え蛋白質の大量発現による生物学的薬剤の作製などがある。哺乳類蛋白質のもつ特有の糖鎖などの修飾が蛋白質機能に不可欠の場合は哺乳類細胞を用いて発現させる必要がある。例えば、ヒト tPA (tissue plasminogen activator) の CHO (Chinese hamster ovary) 細胞による生産などの生物学的薬剤の作製には哺乳類細胞が使用される。

本稿では広く行われている遺伝子調節領域の解析と

変異蛋白質の発現の2点に絞ってその実際を解説する。

遺伝子機能の解析：遺伝子調節領域の解析

レポーター・プラスミドベクターへの調節領域の挿入
解析したい遺伝子の調節領域をサブクローニングし、レポーター遺伝子を含むプラスミドベクターに挿入する。例えば転写調節活性をもつ配列を解析する場合、段階的な欠失変異体を作製し、それぞれレポーター遺伝子の上方に挿入して下記の方法で転写活性を比較する⁶。

レポーター遺伝子

レポーター遺伝子としてかつては CAT (chloramphenicol acetyl transferase) 遺伝子や β -ガラクトシダーゼ β -galactosidase 遺伝子がよく使われたが、今日ではルシフェラーゼ luciferase 遺伝子を用いるのが一般的である。ルシフェラーゼはルシフェリンを基質として発光反応を行うホタルの発光酵素であり、感度が高く短時間で測定できるが、発光測定用のルミノメーターが必要である。ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子をもつプラスミドは多くの種類が市販されており、実験にもっともふさわしいものを選んで使用する。一般に、これらのベクターは大腸菌でのサブクローニング用に大腸菌の replication origin (ori) とアンピシリン耐性遺伝子 (β -lactamase)、プロモーターやエンハンサーを挿入するための multiple cloning site、ルシフェラーゼ発現のための poly (A) シグナルなどを含んでいる。ルシフェラーゼ測定用のキットも市販されており、キットとルミノメーターがあれば測定は容易である。

内部標準 internal standard

細胞への導入効率が一定であることが実験の再現性を保証するので、トランスフェクション効率と発現が一定であることを示す内部標準を用いる。内部標準として、CAT や β -galactosidase に替わって近年ではウミシイタケ (seapansy; *Renilla reniformis*) ルシフェラーゼがよく用いられる。ホタル・ルシフェラーゼ・レポーターベクターとウミシイタケ・ルシフェラーゼ発現ベクターを細胞に cotransfection し、細胞を溶解後それぞれの発光試薬を加えて連続して発光を測定することにより (dual assay), レポーター遺伝子の活性と内部標準の活性を同時に測定し、アッセイごとの内部標準による補正が直ちに行える。

細胞へのレポーター遺伝子と内部標準のトランスフェクション

リポフェクション法による方法を解説する。レポーター遺伝子を含むベクターと内部標準を含むベクターを一定の割合で低血清培地 (Opti-MEM I など) により希釈し、カチオン性脂質 (lipofectamine など) も同様に低血清培地で希釈する。この両者を混合して一定時間置くことにより、DNA とカチオン性脂質が結合した状態となる。導入する細胞の培地は抗生物質を除いたものに換えておく。DNA とカチオン性脂質が結合した溶液を培地に加え、通常の場合 (37°C, 5% CO₂) で培養する。エンハンサーの解析で *trans* の因子が必要な場合は培地に添加する。24 時間から数日で一過性の発現がピークとなるのでこの時間を決定し、細胞を採取してレポーター遺伝子と内部標準の活性を測定する。通常、ルシフェラーゼ測定キットには細胞溶解用緩衝液が含まれているので、解説書の指示に従って使用する。

変異蛋白質の発現と機能解析

蛋白質の機能解析や遺伝病の病態解析⁷のために変異蛋白質を哺乳類細胞で発現させ、解析することは広く行われている。

変異蛋白質発現プラスミドの構築

変異体発現の目的での cDNA への変異導入法は分子生物学実験法の成書に譲る。多くの変異導入用のキットが市販されている。一旦クローニングされた野生型の cDNA に変異を導入し、サブクローニングし発現ベクターに挿入する。哺乳類細胞内での発現を目的としたプラスミドベクターは多数市販されている。このような発現プラスミドは一般に大腸菌でのサブクローニングに利用される ori とアンピシリン耐性遺伝子をもつと同時に cDNA 挿入のための multiple cloning site、細胞内での強力な発現プロモーターである CMV プロモーター、poly(A) シグナルなどの他、neomycin 耐性遺伝子 (*neo*: neomycin phosphotransferase をコードする) などの安定的な発現のための選択マーカーを含んでいる。

発現ベクターのトランスフェクション

トランスフェクションそのものは前項で述べた方法と同一であり、リポフェクション法が簡便である。内部標準は用いた方が確実であるが、用いなくとも野生型の発現が一定であれば、その実験はほぼ一定の導入

効率であったと推測できる。

一過性の発現であれば前項で述べたように 24 時間から数日でピークに達するので、その時間を確定し、細胞を収集して目的とする蛋白質の機能解析 (例えば酵素活性の測定) を行う。安定的な発現をする細胞が必要な場合は、選択マーカー遺伝子 (*neo* など) を含むベクターを用いる。導入遺伝子が integrate された細胞は neomycin アナログである G418 に対し抵抗性をもつので、G418 を培地に加えることによりゲノムに組み込まれた細胞を選択する。この選択には数週間を要し、生き残ったコロニーを分離して以後 G418 を含む培地で培養を継続する。

機能解析

変異体の解析を行う場合、野生型との比較が重要である。例えば酵素の遺伝的欠損症をきたす変異を *in vitro* で再現する場合、野生型酵素の何%の活性があるかを示すのが一般的である。このような実験を行う場合は、野生型の発現ベクター、変異体の発現ベクター、空のベクター (遺伝子が挿入されていない発現ベクター: negative control として用いる) の 3 種のベクターを並行して細胞に導入し比較する。導入する細胞の選択も重要であり、COS-7 などの SV40 large T antigen を発現する細胞では、SV40 origin をもつベクターが episomal に複製されるため、導入細胞として選択されるケースが多いが、遺伝病の解析の場合であれば表現型に関係する細胞を選ぶべきである。また、CMV のような強力なプロモーターで強制発現するため、発現パターンが本来の組織内とは異なる可能性にも留意しなくてはならない。

機能解析に用いられるプロモーターには、上記のような強力な constitutive に下流の遺伝子を発現させる CMV immediate early promoter などが用いられることが多いが、組織特異的なプロモーターも使用される。また、Tet-on system のように、一定の条件下で導入遺伝子を発現させるものがある。テトラサイクリン抵抗性の細菌から得られた TetR を基に、その変異体の reverse tetracyclin-dependent transactivator を組み込んだ Tet-on system では、培地にテトラサイクリン誘導体を加えた時のみプロモーターが活性化されターゲット遺伝子を発現させることができるほか、組み合わせによりさまざまな発現調節が可能である⁸。

おわりに

ここで解説した内容は一般的なものであり、使用す

る遺伝子のサイズや細胞の種類により検討が必要である。量的な問題をほとんど述べなかったのは個々のケースで検討が必要になるからである。哺乳類細胞へのトランスフェクションに使用するベクターやカチオン性脂質、解析用のキットなど多くのものが市販されており、それらのメーカーの解説書は重要な資料である。頻用される株化細胞を使用した条件は記載されていることが多いが、自分で用いたい細胞や、特殊な条件下ではそれらの記載された実験条件がそのまま使用できないことも多いので、予備実験により決定しておく必要がある。

文 献

1. Sambrook J, Russell DW: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 Vol.). 3rd ed, 2001; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
2. 村松正實編：新ラボマニュアル遺伝子工学. 2003; 丸善出版 東京.
3. 田村隆明編：遺伝子工学実験ノート. 改訂第3版(上, 下), 2009; 羊土社 東京.
4. 村松正實, 山本 雅, 岡崎康司編：新遺伝子工学ハンドブック. 改訂第5版. 2010; 羊土社 東京.
5. Kim TK, Eberwine JH: Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397: 3173-3178.
6. Orimo H, Shimada T: Regulation of the human tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene expression by all-*trans*-retinoic acid in SaOS-2 osteosarcoma cell line. *Bone* 2005; 36: 866-876.
7. Orimo H, Goseki-Sone M, Hosoi T, Shimada T: Functional assay of the mutant tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene using U₂OS osteoblast-like cells. *Mol Genet Metab* 2008; 94: 375-381.
8. Berens C, Hillen W: Gene regulation by tetracyclines: Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3109-3121.

(受付：2011年2月21日)

(受理：2011年3月30日)