

2J11-2 ナノ針を用いた高効率で量的制御が可能なヒト培養細胞への遺伝子導入法の開発

中村 史^{1,2}, ○韓 成雄^{1,3}, 今井 陽介², 木原 隆典^{1,3}, 壽 典子¹, 大串 始¹, 長棟 輝行³, 三宅 淳^{1,2,3}
(¹産総研・セルエンジニアリング研究部門, ²東京農工大院・工,³東大院・工)

【目的】我々は原子間力顕微鏡 (AFM) の探針を集束イオンビームで直径 200nm にエッチングしたナノスケールの針 (ナノ針) を用いた新たな細胞操作技術を開発している。本研究では単一培養細胞への新規遺伝子導入法を開発することを目的とした。【方法および結果】細胞にはヒト由来間葉系幹細胞 (hMSC)、乳ガン細胞 MCF-7 を用い、導入する DNA には GFP 遺伝子を用いた。ポリリジン を化学修飾したナノ針の表面にプラスミドを静電的に吸着させ、AFM で位置制御しながら細胞に挿入する。遺伝子導入が比較的困難な初代培養 hMSC においても 70% 以上の高効率遺伝子導入に成功した。ナノ針による DNA 導入では導入される遺伝子の量はほぼ一定で約 10³ 分子程度であり、リポフェクションやマイクロインジェクションと比較して導入量が一定量に制御出来ることが明らかとなった。核内に直接針を挿入することが可能であるためであると考えられる。また、本遺伝子導入法を用いて、エストロゲン応答 GFP レポーターベクターを MCF-7 単一細胞に導入し、ホルモン製剤の薬効試験を行うことに成功している。【謝辞】本研究は NEDO 産業技術研究助成事業の援助を受けて行われた

High-efficiency and quantity-controllable gene transfer technique for human cells using nanoneedle

Chikashi NAKAMURA^{1,2}, ○SungWoong HAN^{1,3}, Yosuke IMAI², Takanori KIHARA^{1,3}, Noriko KOTOBUKI¹, Hajime OHGUSHI¹, Teruyuki NAGAMUNE³, Miyake JUN^{1,2,3}
(¹RICE/AIST, ²Grad. Sch. Eng. Tokyo Univ. Agric. Technol., ³Grad. Sch. Eng. Tokyo Univ.)

Key words AFM, nanoneedle, gene transfer, cultured cell

2J11-4 レトロウイルスベクターを注入したニワトリ胚における遺伝子導入効率の解析

○河辺 佳典¹, 小松 弘幸¹, 中 努¹, 西島 謙一¹, 上平 正道², 飯島 信司¹
(¹名大院・工・化生, ²名大院・工・化生 (現九大院・工))

【目的】我々は孵卵 55 時間胚にレトロウイルスベクターを注入することでサイレンシングを回避し、導入遺伝子を高発現するトランスジェニックニワトリを作製できることを報告してきた。さらに、導入遺伝子を後代に伝播させ、全ての細胞で導入遺伝子を持つ子 (G1) を取得できている。一方、後代を確立する時間・手間を考慮すると、特に基礎研究分野においては G0 キメラ個体の利用にも意味があると考えられる。本発表では G0 個体における導入遺伝子の分布を解析したので報告する。(方法及び結果) マウスシステムセルウイルス由来の pMSCV をもとにニワトリ β -アクトチンプロモーターの制御によりレポーター遺伝子を発現するウイルスベクターを調製した。孵卵 55 時間前後の各ステージ (ステージ 14~17) のニワトリ胚心臓部にウイルスベクターを注入し、血流を用い胚全身にデリバリーさせた。孵卵 7 日目の全胚を解析した結果、多少の差はあるものの、いずれも高効率で遺伝子導入されていることが確認された。レポーター遺伝子の発現は導入遺伝子量と相関がみられた。次に、リアルタイム PCR 法によって組織別に遺伝子導入量を検討したところ、心臓や腎臓さらに生殖巣では導入量が比較的高く、肝臓では低い傾向であった。これらの結果より、適切なプロモーターの選択により G0 世代においても各組織での遺伝子発現が可能であると考えられた。

Analysis of transduction efficiency in chicken embryos injected a retroviral vector

○Yoshinori KAWABE, Hiroyuki KOMATSU, Tsutomu NAKA, Ken-ichi NISHIJIMA, Masamichi KAMIHARA, Shinji IJIMA
(Dept. Biotech., Grand. Sch., Eng., Nagoya Univ.)

Key words transgenic chicken, retroviral vector, G0 chimera

2J11-3 リポソーム及び培養細胞へのナノ針挿入の力学応答解析

○上石 英希¹, 佐藤 俊也¹, 中村 史^{1,2}, 三宅 淳^{1,2}
(¹東京農工大・工・生命工,²産総研・セルエンジニアリング研究部門)

【目的】我々は、AFM とナノスケールの針 (ナノ針) を利用して、低侵襲な細胞操作を行う技術の開発を行っている。本研究では、リポソーム及び T 細胞をはじめとする培養細胞へナノ針を挿入する際の力学応答を詳細に解析することを目的とした。【方法及び結果】BSA コートした培養ディッシュに細胞の脂質膜固定化剤 BAM を添加して、フォスファチジルコリンからなるリポソーム及び T 細胞 (JM, MOLT4, JURKAT) を培養ディッシュに固定化した。固定化されたリポソーム及び T 細胞に対して通常の AFM 探針で圧入操作を行い、フォースカーブを測定し、Hertz モデルによるフィッティングによりヤング率を算出した。ヤング率は、リポソームでは約 0.2 kPa、T 細胞では 1~2 kPa であった。他の付着性培養細胞と比べて T 細胞のヤング率は小さく、細胞内骨格構造を反映しているものと考えられた。次にナノ針、リポソーム、T 細胞を蛍光染色し、AFM によってナノ針挿入操作を行いながら、共焦点レーザ走査型顕微鏡を用いて針挿入を観察した。T 細胞においてフォースカーブ上で斥力の急激な緩和が観察された場合は 100% 針挿入が成功していた。これに対し、リポソームに挿入を行った場合は、針が挿入しているにもかかわらず、明確な斥力緩和が観察されなかった。このことから、急激な斥力緩和は細胞内骨格蛋白質の有無に依存することが示唆された。

Mechanical response analysis of insertion of nanoneedle into liposome and living cell

○Hideki KAMIISHI¹, Toshiya SATO¹, Chikashi NAKAMURA^{1,2}, Jun MIYAKE^{1,2}
(¹Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²RICE/AIST)

Key words atomic force microscopy, nanoneedle, Young's modulus, T cell

2J11-5 ニワトリオボアルブミンプロモーターのヒストン修飾解析

○西島 謙一¹, モルシェド マハブ¹, 安藤 宗稔¹, 上平 正道², 飯島 信司¹
(¹名大院・工・生物機能,²名大院・工・生物機能 現九大院・工・化工)

当研究室では高力価レトロウイルスベクターを用いることでトランスジェニック鳥類を作製できることを既に見出し、モデル抗体の大量生産に成功している。一方、卵白を産生する組織である輸卵管細胞特異的に目的産物を発現させる技術も重要である。このために、卵白中に多量に含まれ輸卵管特異的に発現するオボアルブミンのプロモーターを用いることが有望であるが、基礎的な解析がまだまだ必要である。我々は既に DNA のメチル化を詳細に解析している。今回高次のクロマチン構造を制御しているヒストン N 末端の修飾に関して解析した結果を報告する。クロマチン免疫沈降法によりヒストンの修飾状態を解析した。その結果、活性化染色体に多いことが知られるアセチル化ヒストンがオボアルブミンプロモーター全体に見られた。ヒストンアセチル化の程度は様様ではなく、脱メチル化がおこっている領域が特にアセチル化されていた。また、不活化染色体の指標とされるメチル化ヒストンはオボアルブミンプロモーター領域ではほとんど見いだされなかった。これらの結果から、オボアルブミンプロモーターは局所的にしか脱メチル化を受けないにもかかわらず、非常に強く発現する事実を反映して、プロモーター全体にわたりヒストンがアセチル化されていることが明らかとなった。

Analysis of histone modification in chicken ovalbumin promoter

○Ken-ichi NISHIJIMA¹, Mahboob MORSHED¹, Munetoshi ANDO¹, Masamichi KAMIHARA², Shinji IJIMA¹
(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., Present: Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words ovalbumin, histone