

電気穿孔により導入した遺伝子の発現の細胞周期依存性の研究

東京大学 工学部機械工学科 松永朋浩

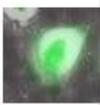
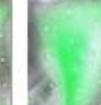
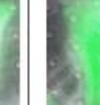
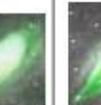
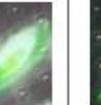
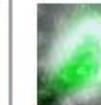
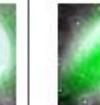
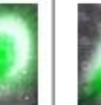
細胞内に遺伝子を導入する技術は、iPS細胞の作製技術の一つとして研究されている。このiPS細胞とは、山中因子と呼ばれる数種類の遺伝子を細胞内に導入、発現させることによって体細胞が初期化して得られる万能細胞であり、今後再生医療に用いられることが期待される。この遺伝子の導入方法には様々な手法が存在するが、簡便かつ安全なものとして、エレクトロポレーション法（電気穿孔法）によって細胞膜に穿孔を起こし、遺伝子を細胞内に送り込むものが存在する。

一方、当研究室では電界集中を用いたエレクトロポレーションを行っている。電極間にオリフィスシートを配置し、シート上に細胞を接着させることで、オリフィス近傍で電界集中が起き、その部分に狙った電圧をかけることができる。また、細胞核がオリフィス直上に位置すると電気力線が細胞核を必ず通るため、電気泳動によってプラスミドを核に直接導入することができる。ところが、本手法を用いてGFPプラスミドを導入した細胞をタイムラプス観察すると、細胞分裂を経ることなしに、早いものでは1時間以内、遅いものでも12時間以内にGFPの発現が生じることが確認されている。このように、導入遺伝子が発現するまでに要する時間に差が生じる原因の一つとして、細胞周期依存性が挙げられる。

そこで本研究では、細胞周期可視化プローブと呼ばれるFucciを有するHeLa細胞に、オンチップエレクトロポレーションによりGFPプラスミドを導入し、導入直後からのGFPの発現と細胞周期の関係を調べた。

その結果、G1期では発現は少なく、S期-G2期-M期においてGFP発現が多いという傾向が観察され、特にG1期からS期に入った直後では急激に数が増えるという結果であった。この原因としては、G1期では自身のタンパク質合成が優先して行われるためGFPの発現は少なく、G1期直後では自身のタンパク質合成を終えたフリーなRNAポリメラーゼが多くなり、タンパク質合成に使われるアミノ酸も多いため、GFP発現が活発に起こると考えられる。

表 1 時間経過による蛍光変化

	導入後	1.5時間	3時間	4.5時間	6時間	7.5時間	9時間	10.5時間
Fucci緑 (S期～M期) でGFP発現								
Fucci赤 (G1期) でGFP発現								
Fucci赤・緑 (S期初期) でGFP発現								

30μm

表 2 12 時間後までの各周期での発現数

	発現数(個)
Fucci緑での発現 (S期～M期)	40
Fucci赤での発現 (G1期)	4
Fucci赤・緑での発現 (S期初期)	11
合計	55