

組織内エレクトロポレーション法による マウス子宮内胎児脳への遺伝子導入

正岡実

医学系技術支援室 生物・生体技術系

概要

私が技術支援業務を行っている研究室では、GFP などのマーカー遺伝子や脳の発生に関与する遺伝子などを、組織内エレクトロポレーション法を用いて、マウス子宮内胎児脳への遺伝子導入を行っている。エレクトロポレーション法は、細胞膜に短時間に高電圧をかけることより、微小の穴をあけ、その穴を通して細胞内に遺伝子を導入する方法で、プラスミドベクターさえあれば、即座に目的とする遺伝子の効率的な導入が果たせることから、有力な組織内遺伝子発現ツールとしてさまざまな対象に対して応用されている。今回、マウス胎児の大脳皮質への組織内エレクトロポレーション法の方法について紹介します。

1 原理

マウス胎児脳の側脳室へ、ガラスキャピラリーを用いてプラスミド DNA 溶液を注入し、電気パルスを加える。注入されたプラスミド DNA はマイナスに荷電しているので、電場の中を陽極側へと移動し、電気パルスによって形成された細胞膜の穴をとおして脳室帯の細胞の内部に流入する。プラスミドは脳室に面していた細胞にだけ入る。

2 準備するもの：(図 1)

- ・ 遺伝子導入装置 [a]
- ・ ピンセット型電極 [b]
- ・ ガラスキャピラリー
- ・ マイクロインジェクター [c]
- ・ ファイバーライト [d]
- ・ 保温マット [e]
- ・ 恒温槽 [f]
- ・ 手術道具一式 [g]
- ・ 生理食塩水
- ・ ナイロン製縫合糸 [h]
- ・ プラスミド DNA 溶液
- ・ 0.1%FastGreen
- ・ 1/10 希釈ソムノペンチル注射液
- ・ 70%エタノール

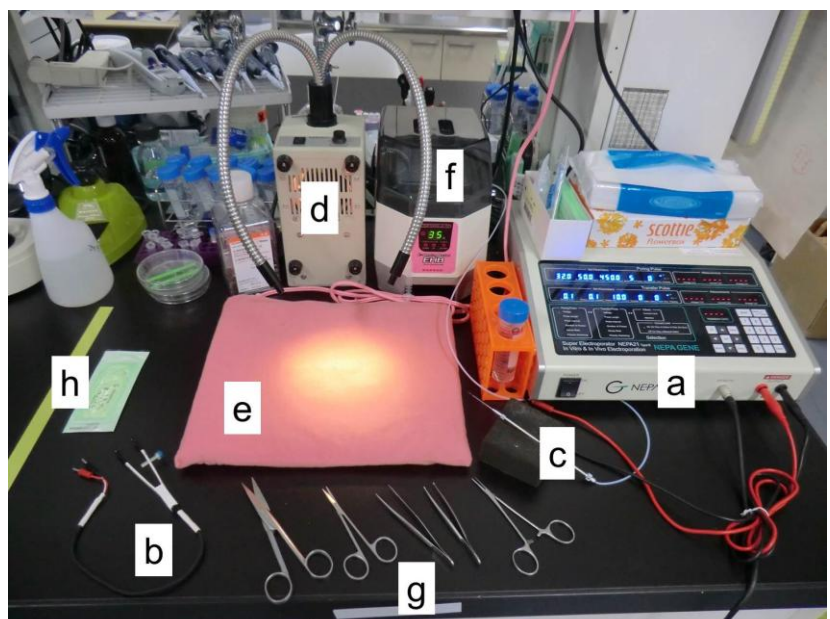


図 1 準備する機械・器具

3 方法 (妊娠 12.5~14.5 日目の場合)

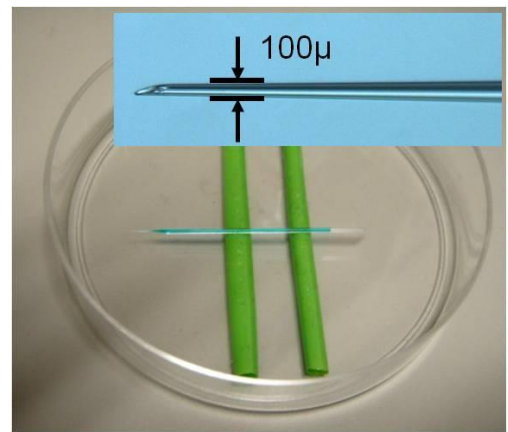
(1)妊娠マウスの体重を測定し、体重 10g 当たり 120 μ l の割合で腹腔内に投与する。麻酔が深くかかるまで 10 分程度かかるのでその間にプラスミド DNA 溶液 (1/10 量の 0.1%FastGreen を加えたもの) をガラスキャピラリーに充填する。[図 2]

(2)呼吸が深く安定した状態になったら、保温マットの上に仰向けに寝かせ、腹部を 70%エタノールで消毒する。ファイバーライトで照らしながらピンセットとはさみで腹部の皮膚、腹壁を 2~3cm 程度、正中線に沿って切開する。切開部に生食を含ませたティッシュをあてがい、リングピンセットで子宮を傷つけないように子宮角を取り出す。

(3)子宮壁を通して胎児の側脳室がみえるので、インジェクターにガラスキャピラリーを取り付け胎児の側脳室の片側に 1~2 μ l 程度注入する。[図 3]

(4)胎児をピンセット型電極で子宮壁越しに胎児の頭部をはさみ、電気パルスを与える。[図 4] 電圧、電極の径は妊娠日数によって変える。[表 1] 片方の子宮角に対する操作が終了したら腹腔内に戻し、もう一方の子宮角にも同様の作業を行う。

(5)子宮角を腹腔内に戻した後、生食で腹腔内を満たし腹壁、皮膚を縫合する。麻酔の効果によりマウスの体温が低下しているため、しばらく保温マットの上においてから飼育ケージに戻す。



[図 2]



[図 3]



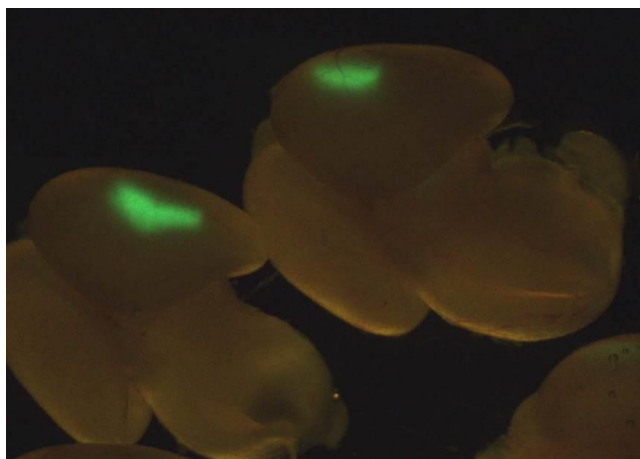
[図 4]

[表 1]電圧.電極.パルス設定条件

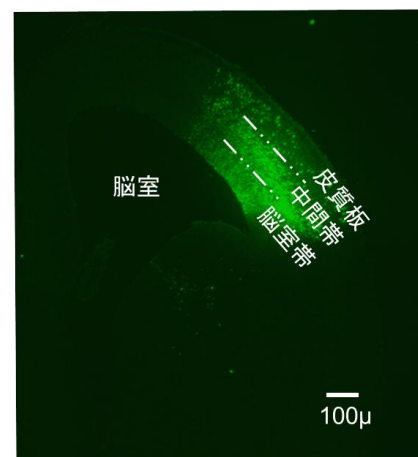
妊娠日数	電圧	電極の径	パルス幅	パルス間隔	回数
12.5	33V	3mm	50msec	450msec	5
13.5	34V	3mm	50msec	450msec	5
14.5	35V	5mm	50msec	450msec	5

4 実験例

妊娠 12.5 日目の ICR マウスの胎児にエレクトロポレーションを行い、二日後の 14.5 日目に胎児の脳を蛍光実体顕微鏡で観察した。(図 5)これらの脳において大脳半球の外側が遺伝子導入され、GFP による蛍光を認めることができた。これらの脳から凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。(図 6) 脳室帯で遺伝子導入された GFP 陽性細胞が中間帯や皮質板にまで進入してきていることが観察された。



[図 5]



[図 6]

5 まとめ

組織内エレクトロポレーション法は、機械さえあれば簡便に組織内へ遺伝子導入できる方法である。プラスミド DNA が、与えられた電場の陽極側のみに導入されるのが特徴であり、これにより電極の向きを変える事により、脳内の様々な部位への方向性をもった遺伝子導入が可能である。プラスミド DNA の注入量や電極の向きによって、個体ごとに DNA の導入率にばらつきがでやすいので、ある程度の熟練は必要である。

参考文献

- [1] 目的別で選べる遺伝子導入プロトコール (中嶋一範,北村義浩,武内恒成/編),羊土社,2012
- [2] 図・写真で観る発生・再生実験マニュアル(安田國雄/編),メディカルドゥ,2002