

改良リン酸カルシウム法による神経細胞のトランスフェクション

Min Jiang & Gong Chen

Department of Biology, Huck Institutes of Life Sciences, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802.

クロンテック社の CalPhos™ Mammalian Transfection Kit を用いて神経細胞（ニューロン）を高効率でトランスフェクションする新規な方法について述べる。我々の方法では、標準的な方法よりも10倍高いトランスフェクション効率を得られ、細胞毒性の低さは変わらない。この改良は、主としてわずか2つの重要なステップを改変するだけで達成できる。第一は、DNA-Ca²⁺溶液とリン酸溶液を穏やかに混合することにより、非常に微細で均一なDNA-Ca²⁺-リン酸の沈殿粒子を得ることである。第二は、その沈殿を細胞に加えてインキュベートした後、弱酸性の培地でインキュベートすることにより沈殿粒子を溶解し、その毒性を減少させることである。高効率で毒性の低いこの新たなプロトコールにより、自己シナプス形成性神経細胞（single autaptic neuron；ニューロンが自身にシナプスを形成する、単一神経ネットワーク標本）や成熟神経細胞を容易にトランスフェクトすることができる（1）。

培養神経細胞はDNAのトランスフェクションが最も困難な細胞の一つであり、微小環境の変化に非常に敏感であり、トランスフェクション後すぐに死滅しやすい。リン酸カルシウム法は簡単で毒性が低いため、神経細胞のトランスフェクションに最も広く用いられている方法の一つである（2-7）。しかし、他の方法と比べ、トランスフェクション効率が一般的に非常に低い（平均で約1~5%）（2, 8, 9）。理想的なトランスフェクションプロトコールは、リン酸カルシウム法の使いやすさと毒性の低さを維持したままトランスフェクション効率を向上させるプロトコールであろう。これが叶えば、遺伝子の機能解析に広く利用されるであろう。

均一なDNA-Ca²⁺-リン酸 沈殿粒子の形成

これまでのプロトコールでトランスフェクション効率を制限していたと思われる重要な因子をいくつか同定することにより、低毒性を維持したままトランスフェクション効率を非常に向上させる、クロンテック社のCalPhos™ Mammalian Transfection Kit（製品コード 631312）を用いる方法を我々は開発した（図1）。このプロトコールのステップごとの完全な記載やトラブルシューティングについてはJiang, M. & Chen, G., 2006（1）を参照されたい。我々のプロトコールで最も重要なステップの一つは、微細で均一なDNA-Ca²⁺-リン酸の沈殿粒子を形成させるステップである（図2）。この沈殿粒子はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、その後、DNA分子が核に移行すると考えられている（8）。

我々は、これまでのプロトコールで用いられているボルテックスで連続的に攪拌する方法では、大きくて不均一な沈殿粒子がしばしば生成することを見出した。これらの粒子は効率よくエンドサイトーシスされないと我々は考えている（図2、パネルA）。DNA-CaCl₂溶液と2×HBS溶液を穏やかに混合し、非常に穏

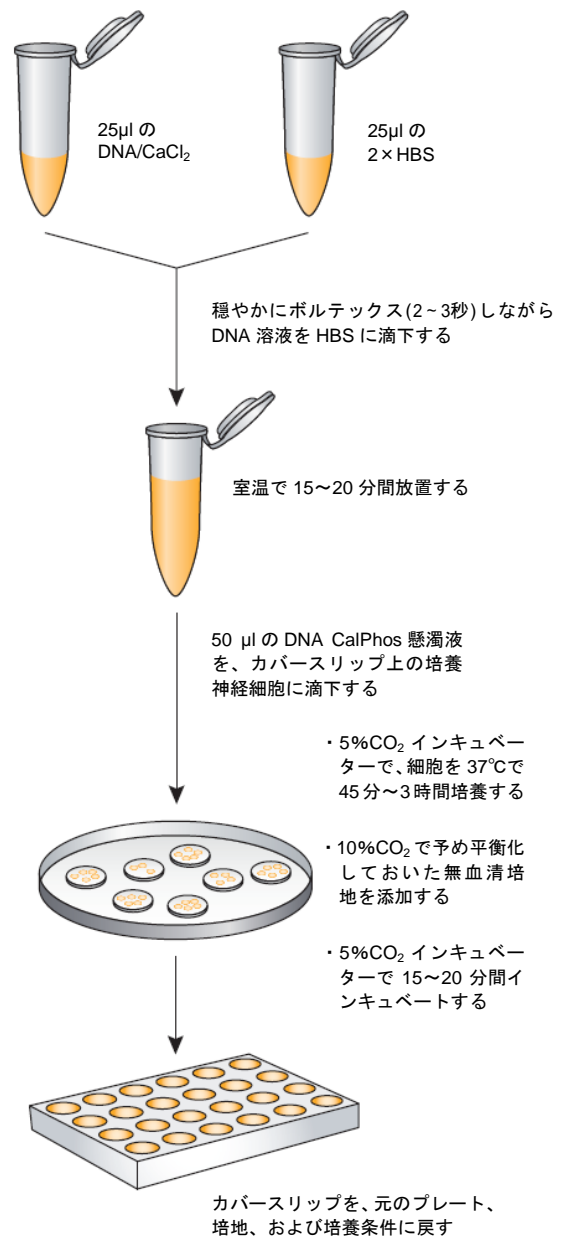


図1. 我々のリン酸カルシウムトランスフェクションプロトコールのフローチャート
詳細については、Jiang, M. & Chen, G., 2006（1）を参照されたい。

やかにボルテックスすることにより、エンドサイトーシスされやすい微細な沈殿粒子を常に形成させることができる（図2、パネルB&C）。

DNA-Ca²⁺-リン酸 沈殿粒子の溶解

我々のプロトコルでもう一つの重要なステップは、トランスフェクション・インキュベーション期間の終了時にDNA-Ca²⁺-リン酸の沈殿粒子を溶解するステップである。ほとんどのプロトコルは、単にトランスフェクション培地で細胞を洗浄することを推奨しているが、それでは余分な沈殿を効率的に除去できないことを我々は見出した。トランスフェクトされた細胞の培地を、10% CO₂インキュベーターで予め平衡化しておいた無血清トランスフェクション培地と交換し、次にプレートを5% CO₂インキュベーターに戻して短時間インキュベートすることにより、この問題を解決した（図2、パネルD）。10% CO₂インキュベーターで予め平衡化しておくことにより培地が弱酸性になり、これにより沈殿が溶解しやすくなる。このステップにより神経細胞に対する毒性が著しく減少するため、細胞と沈殿のインキュベーション時間をはるかに長くすることができ、その結果、トランスフェクション効率がかかり増大する。

我々のプロトコルでもう一つ重要なステップは、新しい培養プレート（細胞はカバースリップの上に存在する）でトランスフェクションを行い、トランスフェクションが完了したら細胞を元の培養プレートと培地に戻すステップである。これらの改良により、低密度の初代培養神経細胞で60%ものトランスフェクション効率を達成できた（図3）。我々の方法はこのような高いトランスフェクション効率を達成できる初めての方法であり、トランスフェクション沈殿を溶解することにより細胞毒性を低い状態のままに抑えている。我々は最近、シナプス小胞エンドサイトーシスにおけるエンドフィリンの機能を研究するために、この改良したリン酸カルシウム法を使用した（10）。

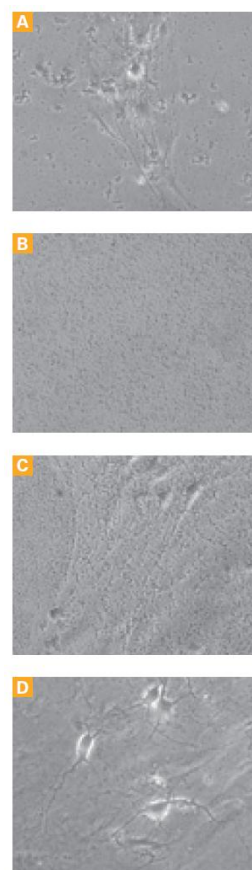


図2. DNA-Ca²⁺-リン酸 沈殿粒子の形成と溶解 パネルA. DNA-Ca²⁺とリン酸バッファーをボルテックスで連続的に攪拌して混合すると、大きな沈殿の塊が形成される（1時間インキュベーション後の画像）。パネルB&C. 穏やかにボルテックスして混合すると、最適なDNA-Ca²⁺-リン酸 沈殿粒子が形成される（1時間インキュベーション後の画像）。パネルD. 10% CO₂インキュベーターで予め平衡化して弱酸性にした培地で沈殿を溶かした場合の画像（1時間インキュベーション後の画像）。（参考文献1および12より引用）

低密度の海馬培養細胞の高効率トランスフェクション

プラスミドが異なると、効率的なトランスフェクションに必要なインキュベーション時間が異なる可能性がある。本プロトコルでは、溶解前のDNA-Ca²⁺-リン酸の沈殿粒子に細胞をさらす時間を変えることにより、プラスミドと細胞のインキュベーション時間を最適化することができる。我々は、最小限の細胞毒性で高効率のトランスフェクションを行うためには45分～3時間のインキュベーション時間が最適であることを見出した。我々の改良法は高効率であることを図3に示す。この図は、大半の神経細胞がGFPコンストラクトでうまくトランスフェクトされたことを示している。1つのマイクロアイランドには22の神経細胞が含まれていたが、そのうち17の神経細胞がトランスフェクトされており、これは約80%のトランスフェクション効率に相当する（図3、パネルC&F）。カバースリップ上には全体で211の神経細胞が存在し、そのうち127の細胞がトランスフェクトされており、これは約60.2%のトランスフェクション効

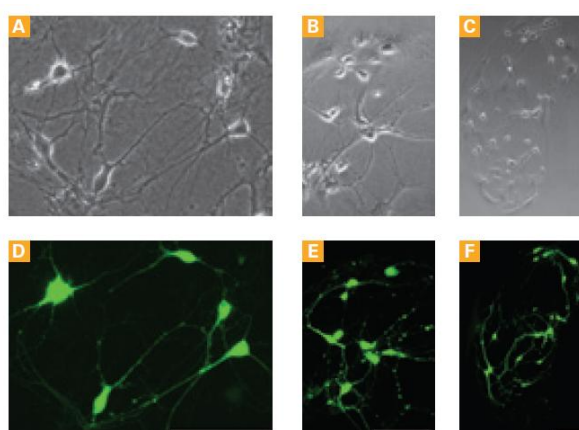


図3. 改良プロトコルによる、低密度の海馬培養細胞の高効率トランスフェクション

パネルA～C. 位相差顕微鏡画像。パネルD～F. 3回の個々のトランスフェクションで得られたGFP導入細胞の蛍光画像。マイクロアイランドの神経細胞の大半がトランスフェクトされていることに注目されたい。神経細胞は、以前報告した方法（11, 12）に従って10～15日間培養した。スケールバー：50 μm。（参考文献1および12より引用）

率に相当する。この値は、これまで報告されているトランスフェクション効率の平均値(1~5%; 2, 13, 14)よりもはるかに優れている。意義深いことに、外来遺伝子の発現は安定で、非常に迅速に起こった。神経細胞でのGFP発現はトランスフェクションの4時間以内に検出され、1週間以上続いた。

成熟神経培養細胞のトランスフェクション

リン酸カルシウムトランスフェクション法は、若い神経細胞(2~10日間の培養で増殖した細胞)のトランスフェクションにしばしば用いられてきた。成熟した神経細胞はトランスフェクションのすぐ後に死滅する傾向があるため、そのトランスフェクションはより困難であった。我々の改良プロトコールを用いると、2~82日間培養した神経細胞でもトランスフェクションをうまく行うことができることがわかった。そのため、シナプスネットワークを十分に形成している細胞(すなわち、20日間以上培養した細胞; 図4)で遺伝子解析を行うことが可能である。神経細胞が3ヶ月以上の培養で生き残ることは稀であるため、82日間培養した神経細胞でトランスフェクションが成功したことは驚くべきことである。この繊細な細胞のトランスフェクションにより、我々のプロトコールは、成熟した神経細胞に対しても本質的に無害であることが明らかになった。

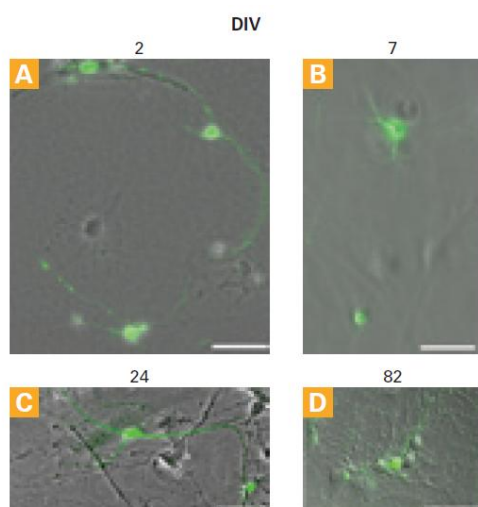


図4. 成熟した神経細胞でも未成熟の神経細胞でもトランスフェクションをうまく行うことができる
パネルA&B. 2日間および7日間 *in vitro* 培養 (d.i.v) した若い神経細胞にEGFPをトランスフェクションした例。**パネルC&D.** 24日間および82日間 *in vitro* 培養した成熟神経細胞にEGFPをトランスフェクションした例。スケールバー: 50 μm。(参考文献1より引用)

神経細胞は高効率でトランスフェクトされるが、グリア細胞はほとんどトランスフェクトされない

皮質アストロサイト(グリア細胞の一種)の単層上に神経細胞を播種するため、我々の神経細胞培養液には多くのグリア細胞が含まれている。アストロサイトはバックグラウンドシグナルを発生したり(例えば、GFPの場合など)、あるいはニューロン・グリア相互作用により神経細胞の機能に直接悪影響を与える可能性があるため、アストロサイトが過度にトランスフェクトされることは好ましくない。注目すべきことに、我々の方法では、これらの混合細胞培養液中のグリア細胞はほとんどトランスフェクトされない(図5)。これは、グリア細胞の増殖を抑制するシトシン・アラビノシドが存在し、これがトランスフェクションを阻害するためであるかもしれない。また、ニューロンとグリア細胞の接触がほとんどないBankerタイプの培養の場合でもトランスフェクションが可能であった。簡潔に言えば、我々のプロトコールでは、低密度の培養神経細胞のトランスフェクション効率は、アストロサイトが存在してもしなくても変わらないようである(トランスフェクション効率はそれぞれ25.2%、21.6%)。

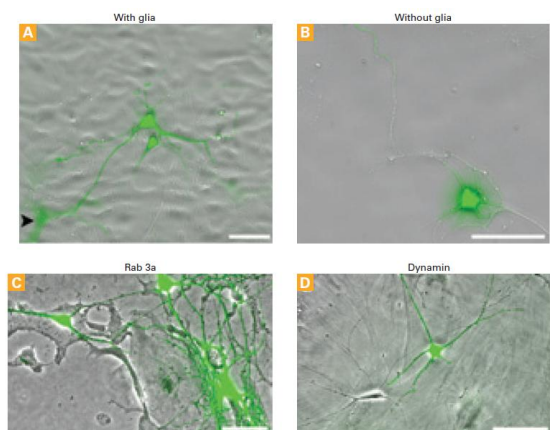


図5. グリア細胞のトランスフェクション効率は非常に低い
パネルA. アストロサイトの単層上で培養した神経細胞中のグリア細胞(矢印の先端で示す)は、わずしかトランスフェクトされなかった。**パネルB.** 通常では神経細胞とグリア細胞の直接接触がないBankerタイプの培養の場合でも、神経細胞のトランスフェクション効率は高いままであった(21.6%)。**パネルC&D.** 我々のプロトコールを用いることにより、多くのコンストラクトを神経細胞にトランスフェクトすることができる。ここでは、EGFP-Rab3a(パネルC)とEGFP-dynamin(パネルD)の例を示す。スケールバー: 50 μm。(参考文献1より引用)

このプロトコルを用いることにより、培養した神経細胞を非常に低い毒性で高効率にトランスフェクトすることができる。本法の重要な特徴は、微細なDNA- Ca^{2+} -リン酸沈殿粒子を注意深く形成させ、次にその沈殿を弱酸性の培地に短時間さらして溶解することである。成熟および未成熟の神経細胞の両方をトランスフェクトすることができる。トランスフェクション効率が高いため、遺伝子の機能解析のために自己シナプス形成性神経細胞 (single autaptic neuron) に対してもうまくトランスフェクションを行うことができる。

参考文献

1. Jiang, M. & Chen, G. (2006) *Nat. Protoc.* **1**(2):695–700.
2. Xia, Z. *et al.* (1996) *J. Neurosci.* **16**(17): 5425–5436.
3. Micheva, K. D. *et al.* (2003) *Nat. Neurosci.* **6**(9):925–932.
4. Chen, W. G. *et al.* (2003) *J. Neurosci.* **23**(7):2572–2581.
5. Holz, R. W. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* **275**(23):17878–17885.
6. Passafaro, M. *et al.* (2003) *Nature* **424**(6949):677–681.
7. Goetze, B. *et al.* (2004) *J. Neurobiol.* **60**(4): 517–525.
8. Craig, A. M. (1998) *Transfecting Cultured Neurons*. MIT Press, Cambridge, MA.
9. Washbourne, P. & McAllister, A. K. (2002) *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**(5):566–573.
10. Chen, Y. *et al.* (2003) *Cell* **115**(1):37–48.
11. Chen, G. *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**(4):1063–1068.
12. Jiang, M. *et al.* (2004) *Gene Ther.* **11**(17): 1303–1311.
13. Kohrmann, M. *et al.* (1999) *J. Neurosci. Res.* **58**(6): 831–835.
14. Watanabe, S. Y. *et al.* (1999) *Neurosci. Res.* **33**(1):71–78.

製品ガイド

- ▶ CalPhos™ 哺乳類細胞用トランスフェクション試薬