

細胞透過性ペプチドによる タンパク質トランスフェクション

円居隆宏 高蔵 晃 タカラバイオ株式会社 製品開発センター

<http://www.takara-bio.co.jp/>

タンパク質トランスフェクションは、翻訳後修飾を経た活性型タンパク質を直接、好適なタイミングで細胞に導入できる、細胞生物学において有効な実験手法だと考えられている。しかし、機能発現に必要なタンパク質量の導入が困難という課題があった。クロンテック社が開発したXfect™ Protein Transfection Reagentは、改良型細胞透過性ペプチドを使うことで、高効率かつ低毒性に、多量の目的タンパク質を導入できる技術である。

*1 WST-1 assay

細胞の生存率や増殖率の測定法。生細胞にのみ活性があるミトコンドリア脱水素酵素によって、テトラゾリウム塩 (WST-1) が分解されて生成するホルマゼン色素量を吸光度で定量する。

1 タンパク質導入の現状

現代生物学において遺伝子導入は欠かすことができない実験手法である。ところが仮に、標的細胞に対して目的遺伝子ではなく、発現産物であるタンパク質を直接導入することができれば、転写・翻訳の過程で生じうるサイレンシングや、標的細胞ゲノムへのランダムなDNA挿入による望ましくない変異などの障害が回避できる。

しかし現状は、プラスミドトランスフェクションやウイルスベクターによる遺伝子導入が主流となっている。その一因は、毒性がなく細胞内での機能発現に必要な量のタンパク質を導入することが困難な点にある。

カチオン性脂質を媒介とする、従来の一般的なタンパク質導入法は、一定の効率とタン

パク質量の導入が期待できるが、同時に強い細胞毒性を示すため、実験の信頼性が低下し、実験自体が成り立たないこともある。

これに対して、近年開発された細胞膜透過性ペプチドを用いる手法は、細胞毒性こそ低いものの、残念ながら導入効率も低く、また細胞内での機能発現に必要な量の導入が困難であった。

しかしクロンテック社は、新規細胞透過性ペプチドを開発し、細胞毒性がなく、高効率かつ十分量の導入を可能とするタンパク質導入試薬、Xfect™ Protein Transfection Reagentを発売したので、本コラムでその有効性を紹介したい。

2 さまざまな細胞に、 細胞毒性なく 細胞内での機能発現に 必要なタンパク質を導入

Xfect™ Protein Transfection Reagentは、細胞透過性ペプチドによって目的タンパク質に細胞膜を通過する性質を付与することで、その機能を保持した状態で、細胞毒性なしに細胞内導入を可能にする。

さまざまな哺乳動物細胞に対して、Xfect™ Proteinを用いて蛍光タンパク質 rAcGFP1を導入した結果、実験に供したすべての細胞に

製品情報

製品名	容量*	製品コード	価格(税別)
Xfect™ Protein Transfection Reagent	30回	631323	¥43,000
	100回	631324	¥92,000

※ 6ウェルフォーマットプレートの1ウェルでの反応回数

において、同様の細胞透過性ペプチドを用いた従来試薬と比較し、より高い導入効率が得られた(図 1a, b)。さらに蛍光強度についても、既存試薬と比較して値が高く、1細胞あたりに導入されるタンパク質量が大きく向上している(図 1c)。これらの標的細胞には、従来は形質転換が困難であるとされてきた、浮遊細胞 HL-60 や Jurkat 細胞、あるいはマウス ES 細胞 E14TG2A が含まれ、広範な細胞種に対して等しく効力を発揮している。

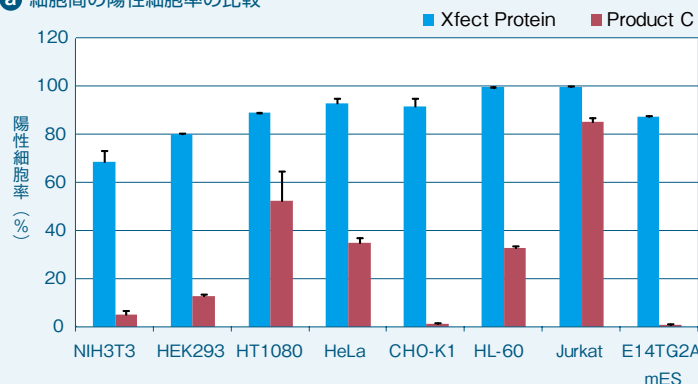
このように Xfect™ Protein は、細胞生物学的実験に耐えうるレベルでのタンパク質導入を可能にしたと考えられる。しかも導入試験後の WST-1 assay^{*1}によって、カチオン性脂質とは異なり、ほぼ無毒性といえるほど、細胞の生存率にほとんど影響を与えないことを確認している。さらに、高密度に生育した細胞群を用いても性能が低下しないため、細胞増殖をとまなわぬ実験においても、必要量の材料が容易に確保できる。つまり Xfect™ Protein は従来実施が困難であった、タンパク質導入によるさまざまな細胞生物学実験の実現に役立つと考えられる。

3 細胞内での機能発現に必要なタンパク質導入の具体例

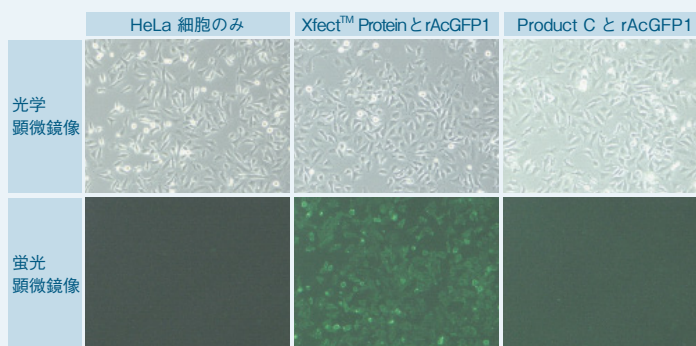
遺伝子導入によって細胞実験に必要なタンパク質を発現させるとき、とくに翻訳後修飾の各過程を経て最終形態のタンパク質が生成される場合、導入から最終形態のタンパク質生成までの時間差があり、そのうえサイレンシング、不十分な翻訳や翻訳後修飾など、さまざまな理由で最終形態のタンパク質が生成されないリスクをとまなう。したがって、それぞれのステップのばらつきがアッセイの至適タイミングに影響を与えるなど、実験の精度の低下が危惧される。また最終形態のタンパク質を直接発現させた場合、漏出による持続的な発現が

図 1 Xfect™ Protein を用いた哺乳動物細胞に対する蛍光タンパク質 rAcGFP1 の導入結果

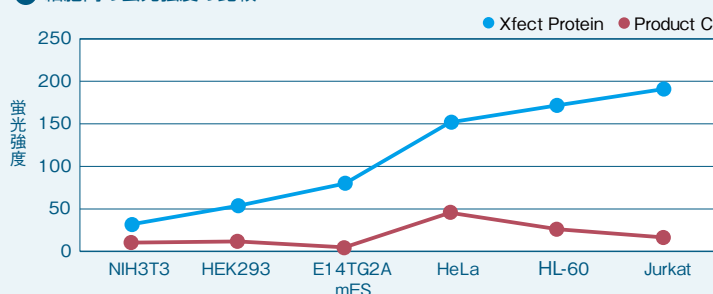
a 細胞間の陽性細胞率の比較



b 導入 HeLa 細胞の光学/蛍光顕微鏡写真



c 細胞間の蛍光強度の比較

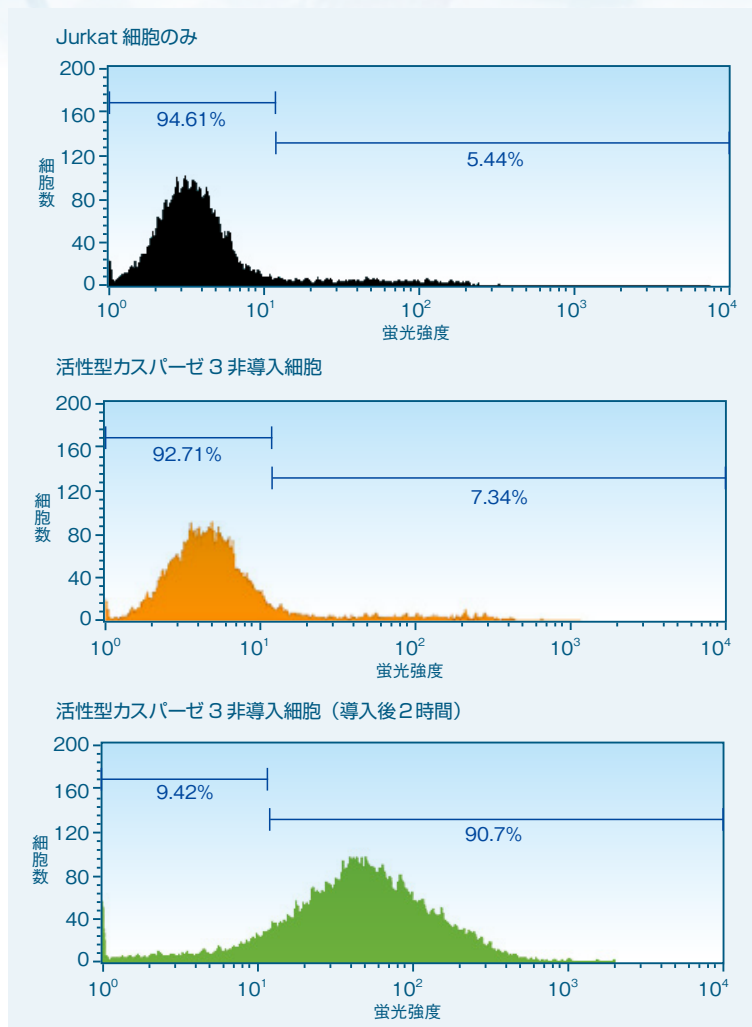


実験系に悪影響を与えることもよくある。

プロセッシングを受けて活性化されるタンパク質の一例として、クロンテック社はカスパーゼ3の活性型タンパク質を直接 Jurkat 細胞に導入し、アポトーシス誘導する実験をおこなった。導入2時間後に Annexin V 解析^{*2}をおこなったところ、非導入細胞ではアポトーシスが観測されないのに対して、導入細胞の大半でア

*2 Annexin V 解析
蛍光標識された Annexin V 抗体による免疫染色と、フローサイトメトリーによる陽性細胞の検出。抗体は、アポトーシスの初期段階で細胞膜外に表出するホスファチジルセリンに高い親和性を示し、結合する。

図2 Xfect™ Protein を用いたカスパーゼ3 導入結果



ポトーシスが誘導された (図2)。

つまり Xfect™ Protein が、カスパーゼ3の活性化状態を保持しつつアポトーシス誘導に十分な量を導入できたこと、細胞毒性などで細胞実験系に悪影響をおよぼさないこと、活性発現に翻訳後修飾などを必要とするタンパク質でも活性型で直接導入することで、好適なタイミングで細胞を評価できることを示している。

4 高い汎用性により 広がる可能性

これまで紹介してきた Xfect™ Protein の特性は、広範な実験に応用可能な高い汎用性を示唆していると考えられる。たとえば、体細胞か

らの多能性幹 (iPS) 細胞の人工樹立にはレトロウイルスあるいはレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入が多用されているが^(1, 2)、標的細胞ゲノムへの導入遺伝子の挿入をとまなうため、がん化の危険性が指摘され、再生医療への応用を阻む大きな障害と目されている。一方プラスミド導入などの代替法はいずれもいちじるしく誘導効率が低く^(3, 4)、タンパク質導入による成功例もまた同様にわずかし報告されていない^(5, 6)。

さらには、iPS 細胞などの幹細胞から体細胞への分化誘導の研究において、各分化段階の複雑な一連の遺伝子発現の制御を、人工的に再現しようと試みれば、分化段階の変化にあわせて発現時期を調整した、各種転写因子の一過的な発現が有効であり、プラスミドトランスフェクションやアデノウイルスを用いた一過性発現あるいは shRNA による発現抑制などの手法が活用されている⁽⁷⁻⁹⁾。

タンパク質導入は、転写、翻訳、翻訳後修飾を必要としないので、機能発現のタイミングが重要な iPS 細胞作製や分化誘導に対し、最適な実験手法の一つと考えられてきたが、既存の導入技術がそれらの使用目的に耐えうるレベルになかったため、タンパク質導入を用いるアプローチを遅延させる一因となっていた。

そのような問題点を解決するために、クロンテック社が開発した Xfect™ Protein は、上記使用目的にも耐えうる性能を有していると考えられるので、先の事例だけにとどまらず、転写制御・細胞周期・がん発生のメカニズム解明など、多くの研究分野で活用され、タンパク質導入法を用いる研究の加速に貢献できると期待している。

参考文献

- [1] Takahashi K et al : Cell 131 (2007) 861-872
- [2] Yu J et al : Science 318 (2007) 1917-1920
- [3] Yu J et al : Science 324 (2009) 797-801
- [4] Zhou W et al : Stem Cells 27 (2009) 2667-2674
- [5] Zhou H et al : Cell Stem Cell 4 (2009) 381-384
- [6] Kim D et al : Cell Stem Cell 4 (2009) 472-476
- [7] Liew C G et al : PLoS One 3 (2008) e1783
- [8] Tashiro K et al : Stem Cells 27 (2009) 1802-1811
- [9] Hiraoka-Kanie M et al : Biochem Biophys Res Commun 351 (2006) 669-674