

創薬を変えるトランスフェクション(遺伝子導入)アレイ

促進剤により RNA 干渉法を実用レベルまで高効率化

遺伝子導入ができる新しい DNA マイクロアレイを開発した。導入促進剤を開発することで、チップの集種化、低コスト化が可能となった。このアレイ上で細胞を培養しながら、導入した遺伝子が細胞に与える影響を経時的・多角的に把握することができる。本マイクロアレイ技術を細胞のシグナル伝達パスウェイ解析に応用するための研究を推進している。

The Cell Informatics Research Group of Research Institute for Cell Engineering has developed a novel DNA microarray for multiple gene transfection. We found a method to significantly increase the on-chip transfection efficiency. Real-time and multiple gene transfection assays are performed on the microarray under the variable tissue culture conditions. The newly developed microarrays are applied to analyze intracellular signaling pathways.

創薬標的探索におけるこれからの技術ニーズ

創薬の標的を効率的に探索するためには、治療に係わるシグナル伝達ネットワーク(パスウェイ)の解析が必要不可欠である。そのため、RNA干渉法がアンチセンス法に代わる新しい細胞パスウェイ解析ツールとして浮上してきた。これは短い二本鎖RNA分子を細胞内に導入して、メッセンジャーRNAのタンパク質への翻訳を阻害する方法である。様々な遺伝子をRNA

干渉法で阻害したときの細胞の変化を調べることにより、医薬等の化合物の作用に関与する細胞のシグナル伝達パスウェイを系統的かつ網羅的に解析できる。

しかし現状は、実際の細胞への導入(トランスフェクション)が難しくRNA干渉法が非常に限られた対象にしか応用されていない。細胞種によってトランスフェクションの起こりやすさが異なり、同じ細胞種であっても、実験間のばらつきが大きい等の問題が

三宅 正人 みやけ まさと
masato-miyake@aist.go.jp

セルエンジニアリング研究部門
細胞情報工学研究グループ 研究グループ長
(関西センター)

ヒト代替技術としての細胞アレイ等の研究に従事。化合物がヒトに及ぼす影響を支配している遺伝子ネットワークを分析するための研究から、トランスフェクションマイクロアレイや酵素動力学チップ(Nature Biotech. 23, 622 (2005))等の細胞機能解析ツールを開発した。今後はこれらの技術を情報工学と融合させ、ヒトに安全な創薬標的、化合物の設計を可能にする新しい技術を開発し、細胞を用いた薬物のヒト代替評価技術の確立を目指したい。上記技術の移転により設立した産総研ベンチャー企業の育成にも注力している。

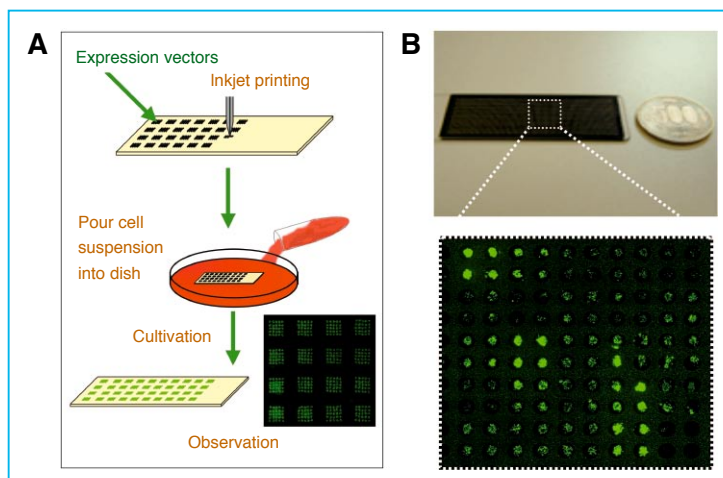
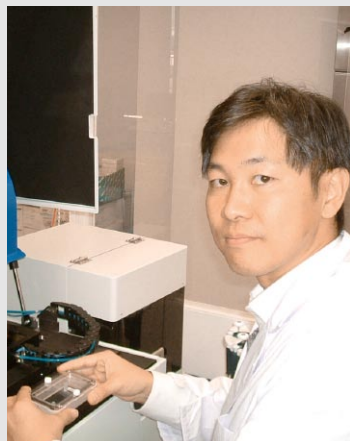


図1 トランスフェクションマイクロアレイ™

A: インクジェットを用いて DNA/ トランスフェクション試薬を固着させてアレイチップを製造する。チップをシャーレに入れ、細胞懸濁液を注ぐと、細胞がチップ表面に付着し、トランスフェクションが起こる。

B: トランスフェクションマイクロアレイ。緑色蛍光タンパク質(EGFP)を付けたレポーター遺伝子を導入して、観察された蛍光。蛍光の強さがパスウェイの強弱を示す。

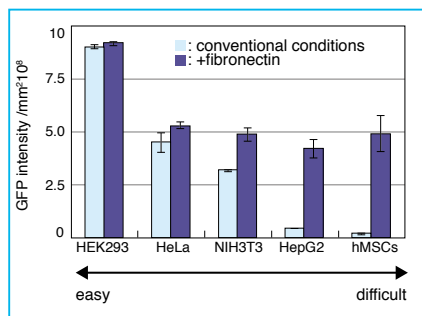


図2 トランスフェクション促進剤（フィブロネクチン）の効果

ある。このような問題が実験精度を下げ、複雑な細胞のシグナル伝達パスウェイを解析できる大規模なRNA干渉実験を実用上困難にしていた。また、1回のトランスフェクション実験には $10^5 \sim 10^7$ 個程度の細胞が必要であり、初代培養細胞の場合、細胞の供給速度が間に合わず、しかも高コストであることが普及の妨げになっていた。

遺伝子導入促進剤によりコストを100分の1以下に

RNA干渉法による細胞パスウェイ解析を実用的に可能にするために、我々は、RNAやプラスミドDNAを高効率で安定に導入できる、トランスフェクションマイクロアレイTMを開発した(図1)。さらに、トランスフェクション促進剤を開発したことで、細胞の種類に関わらず、大規模なRNA干渉実験を高速化することに成功した¹⁻³⁾。例えば、開発した促進剤により、ヒト間葉系幹細胞へのプラスミドDNAの導入効率は40倍に向上させることができた(図2)。

効率が向上したことで、アレイをミニチュア化することもできるようになり、1枚のスライドガラス上で1512種類のトランスフェクション試験を同時に行えるようになった。その結果、1試験(約100細胞使用)あたりのコストは24ウェルプレートを用いた試験の

100分の1以下にまで下がった。また、細胞を基板上に固定化する分子を用いて、浮遊系細胞への応用も可能にした³⁾。トランスフェクションマイクロアレイTMはさまざまな外部刺激に対する細胞内分子、細胞形状の応答を同時多元的に、しかも時系列で計測できることを特徴とする。

細胞の代謝パスウェイ解析へ応用

我々は、細胞のシグナル伝達パスウェイの解析を実現する研究を始めている。まず、外部刺激に相当するsiRNA (small interfering RNAs: RNA干渉で使用する21~23塩基の二本鎖RNA) と蛍光を発する細胞内パスウェイレポータープラスミドを同時に細胞へ導入し、各パスウェイに与する

る転写因子の活性を定量化できることを確認した(図3)。さらにパスウェイレポーターやsiRNAの種類を拡大したアレイを設計し、株化ガン細胞の転写調節ネットワークの解析を試み、パスウェイ間の連関を示す近似解を得た。実用性を評価するために、チロシナーゼをターゲットとしたsiRNAを網羅したアレイを用いてパスウェイの異なる神経分化誘導系へ与えるsiRNAの影響を解析した。その結果、神経突起伸長に関わるチロシナーゼ遺伝子を網羅的に同定することができ、実用的な技術になりつつあることが確認された。現在、細胞のシグナル伝達パスウェイ解析システムの実用化に向けてさらに開発を推進している。

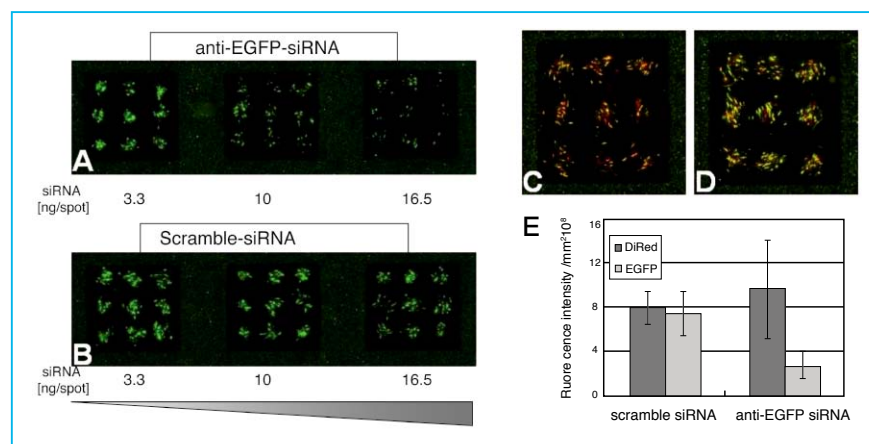


図3 種々のsiRNAと蛍光性レポータープラスミドをアレイ上でヒト間葉系幹細胞に導入した結果
A: 抗EGFP遺伝子siRNA+EGFP発現プラスミド: siRNAの回着量に依存してEGFPの発現(緑色蛍光)が抑制されていることがわかる。
B: スランブルsiRNA+EGFP発現プラスミド: EGFP発現量(緑色蛍光)はsiRNAの影響を受けない。
C: 抗EGFP遺伝子siRNA+EGFP発現プラスミド+Ds-Red発現プラスミド: EGFP発現(緑色蛍光)のみが抑制されDs-Redの赤い蛍光が観測された。
D: スランブルsiRNA+EGFP発現プラスミド+Ds-Red発現プラスミド: EGFPとDs-Redの蛍光がともに観測された。
E: CとDの結果を数値化し、比較した。

関連情報:

- 1) T. Yoshikawa et al., J. Controlled Release 96, 227-232 (2004)
- 2) E. Uchimura et al., Neuroscience Letters. 378, 40-43 (2005)
- 3) E. Uchimura et al., Cytometry Research. 14, 39-44 (2004)
- 4) K. Kato et al., BioTechniques 37:444-452 (2004)
- 5) Transfection Array Project (<http://unit.aist.go.jp/rice/research/cellinfo/index.htm>)