

## 実験機器の有効な使い方

## ～RealTime PCR 7500 Fast～

多能性幹細胞分野・助教  
白木伸明

発生研では、「21世紀COE (2003-2007)」「グローバルCOE (2008-)」という二つのCOEプログラムを通じて、多くの有用な共通実験機器が導入されてきました。今回は、実験機器の使い方として、中でもわたしがよく使用しているApplied Biosystems社の7500 Fast PCRシステム(2008年にG-COEで導入)について紹介します。

7500 Fastには、高速96ウェルフォーマットのサーマルサイクリングブロックが組み込まれているため、リアルタイム定量PCRが30分程度で完了します。検出方法は①TaqManプローブを使用するものと②SYBR Greenを使用する二つに大別できますが、発生研ではSYBR法での使用がほとんどです。SYBR法では二本鎖DNAをすべて検出するため遺伝子ごとにプローブを用意する必要がないため、実験コストが安く反応系の構築も容易なのが長所ですが、検出特異性はあまり高くありません。そのため、非特異的増幅を起こさないプライマーを使用する必要があり、毎反応後に解離曲線プログラムで非特異的なPCR産物の確認を行います。解析方法には、①絶対定量と②相対定量があります。絶対定量は、検量線を用いて定量を行う方法で、相対定量は、検量線を使用せずにCt値(PCR増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数)を用いる方法です。わたしは、ES細胞から分化誘導した細胞の成熟度を評価する目的で使用することが多いため、正常組織から抽出したRNAを用いて検量線を作成して、SYBR法で発現量の比較を行っています。7500 Fastの一番の売りは反応時間(解離曲線+でも1時間以内)です。定量的解析には、最適の実験機器といえるでしょう。



## 論文紹介

熊本大学グローバルCOEの若手研究者による論文を紹介します。

キネシン遺伝子Kif26bは  
胎生期の腎臓形成に必須である

Yukako Uchiyama\*, Masaji Sakaguchi\*, Takeshi Terabayashi, Toshiaki Inenaga, Shuji Inoue, Chiyoko Kobayashi, Naoko Oshima, Hiroshi Kiyonari, Naomi Nakagata, Yuya Sato, Kiyotoshi Sekiguchi, Hiroaki Miki, Eiichi Araki, Sayoko Fujimura, Satomi S. Tanaka, and Ryuichi Nishinakamura (\*equal contribution) Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 9240-9245, 2010.

腎臓は、後腎間葉と尿管芽との相互作用によって形成されるが、今回、腎臓発生分野(西中村隆一教授)の内山裕佳子博士(現所属: The University of North Carolina)と阪口雅司(大学院博士課程: COEジュニアリサーチアソシエイト)らは、間葉に発現しているキネシンKif26bが腎臓発生に必須であることを明らかにした。Kif26bは、同分野の高里実博士(現所属: The University of Queensland)が、腎臓発生に必須の転写因子Sall1発現細胞を用いたマイクロアレイによって見いだした遺伝子の一つである(Takasato et al. Mech. Dev. 2004)。Kif26b欠失マウスは、腎臓を欠損して生直後に死亡し、尿管芽が間葉に侵入していなかった。これは、間葉から分泌され尿管芽を引き寄せる液性因子GDNFの発現が維持されないた

めである。さらに、尿管芽に接する正常の間葉細胞は、凝集して側方にN-カドヘリンを、基底側(尿管芽側)にインテグリン $\alpha 8$ を発現するが、Kif26b欠失マウスではこの過程が障害されていた。一方、培養細胞でKif26bを強制発現するとN-カドヘリン依存的に劇的に凝集が亢進した。さらにKif26bの結合因子を探索することによって、この凝集がKif26bと非筋型ミオシン重鎖IIBとの結合に依存することを明らかにした。これらの結果から、Kif26bはミオシンを介して後腎間葉細胞の接着を制御し、インテグリン $\alpha 8$ さらにはGDNFの発現を維持していることが示唆された。キネシンは微小管に結合し、45種類以上存在するが、単一のキネシンの欠失によって臓器が丸ごと欠損するという報告は今回が初めてである。

## COVER&amp;ISSUE



表紙植物: ガーベラ Gerbera / 花言葉: 希望・冒険心  
表紙機器: ローテーターの部品

発行: 熊本大学 グローバル COE プログラム 細胞系譜制御研究の国際的人材育成ユニット  
〒860-0811 熊本市本荘 2-2-1 Tel.096-373-5006 Fax.096-373-5031  
<http://www.g-coe.org/>

編集制作: 株式会社カラースプランニング