16p-A3-11

フェムト秒レーザーを用いた植物試料への単一細胞分子導入の検討

A New Experimental Preparation for Photoporation of Biomolecules into Single Plant Cell by Femtosecond Laser

奈良先端大学物質創成　○新屋　龍太郎，坂口　さや香，細川　陽一郎

Grad. Sch. Mat. Sci., NAIST ○Ryutaro Shinya, Sayaka Sakaguchi, Yoichiroh Hosokawa

E-mail: s-ryutaro@ms.naist.jp

生物を構成する細胞の持つ機能は遺伝子によって制御されているため、単一細胞レベルで遺伝子や蛍光性分子を導入できると、細胞の機能を人為的に制御、観察することができる。近年、顕微鏡による可視化技術の発達に伴い、単一細胞レベルでの挙動が詳細に観察され、その制御が望まれている。しかし、未だ植物に対する単一細胞レベルでの分子導入は大変困難である。これまでに我々は、フェムト秒レーザーを利用して、脊椎動物胚の単一の動物細胞に遺伝子を導入することに成功している。[1]　本研究では、植物に対する遺伝子導入の前段階として、レーザー照射直後に分子導入を観察することのできる生態適合性蛍光分子を用いてその基礎検討を行った。

実験では試料としてシロイヌナズナ（*Arabidopsis*）の葉を使用し、生態適合性蛍光分子である FITC-dextran に浸し、フェムト秒レーザー短パルス（150fs, 800nm, 60-150nJ/pulse）を導入できる共焦点顕微鏡システムに配置した。Fig.1 に示すように励起波長 488nm、検出波長 510-570nm で、この試料を観察すると、葉が影になるようにその周囲に強い蛍光が観察された。これは、葉の周囲が FITC-dextran で満たされているが､葉の内部には FITC-dextran が浸透していないことを示す。この葉と FITC-dextran の境界にフェムト秒レーザーを集光照射した。

Fig1 は、レーザー照射後の共焦点顕微鏡像であるが、レーザー照射前と比べて、植物細胞内の蛍光強度に顕著な違いは見られなかった。これは、植物細胞内に生じている膨圧（内側から外側への圧力）により、細胞外の FITC-dextran の導入が妨げられている可能性を示す。つまり、植物細胞に貫通口を形成しても、膨圧によって細胞内物質が外部に流出するため、外部分子を細胞に導入するのが困難であり、これまで成功例が報告されていない一因は、このためであると考えられる。

そこで我々は、顕微鏡下で、試料の外圧を上昇させる圧力制御装置を開発し[2]､細胞内より細胞外が圧力が高い状態にして、植物細胞内への外部分子の導入を実現しようとしている。本発表ではその結果を示す。

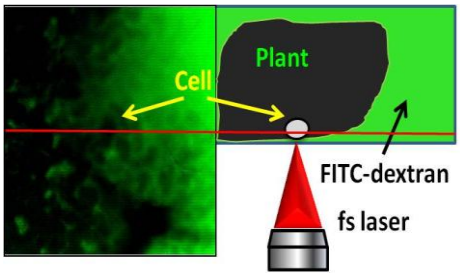

Fig.1 Confocal image (left) and its side view illustration (right) of leaf of *Arabidopsis* immersed in FITC-dextran solution.

1. Y. Hosokawa, H. Ochi, T. Iino, PLoS ONE, 2011, 6:e27677
2. 新屋ら，第 60 回応用物理学会春季学術講演会, 4.7, 29a-D2-14

© 2013 年　応用物理学会