プラズマ遺伝子・分子導入におけるクラスリン依存エンドサイトーシス

Clathrin-mediated endocytosis contribution on plasma gene transfection

○大西 章仁[1], 磯崎 勇希[1], 木戸 祐吾[1, 2], 池田 善久[1], 本村 英樹[1], 佐藤 晋[1, 3], 神野 雅文[1]
(1. 愛媛大院理工, 2. パール工業, 3. ワイ’ズ)
○Akihito Onishi[1], Yuki Isozaki[1], Yugo Kido[1,2], Yoshihisa Ikeda[1], Hideki Motomura[1],
Susumu Satoh[1, 3], Masafumi Jinno[1]
(1.Ehime Univ., 2.Pearl Kogyo Co., Ltd., 3.Y’s Corp.)
E-mail: mjin@mayu.ee.ehime-u.ac.jp

1. はじめに

マイクロプラズマを用いた遺伝子導入[1]では, 遺伝子や分子は細胞膜に生じた穿孔やエンドサイトーシス, イオンチャネルを通って細胞内に導入されていると考えられる[2]。本実験では, クラスリン依存エンドサイトーシスを選択的に阻害することで、マイクロプラズマ遺伝子導入におけるクラスリン依存エンドサイトーシスの寄与の大きさを確認した。

2. 実験方法

96 ウェルプレートにて培養した L-929(マウス結合組織由来の線維芽細胞)をプラズマ照射前にクラスリン阻害剤(ab144650: Abcam plc.)で処理し, クラスリン媒介のエンドサイトーシス阻害環境を形成した。クラスリン阻害剤は濃度 25μM で無血清培地に混ぜて使用し, 10 分間処理した。各実験のプロトコルを図 1 に示す。実験で用いたプラズマの生成条件は, 15kVpp/ 5.0msec/ 20kHz とし, 導入分子は分子量 3630 kDa のプラスミド DNA を用いた。

3. 結果と考察

各プロトコルの遺伝子導入効率を図 2 に示す。クラスリン阻害剤の処理では, 通常のプラズマ遺伝子導入と比較して導入効率の約 6 割の減少が確認できた。一方、ネガティブコントロール(ab144658: Abcam plc.)で処理した場合の導入効率は, 通常のプラズマ遺伝子導入と同程度の遺伝子導入効率であったことから、クラスリン依存エンドサイトーシスによって導入される遺伝子の割合が, 全体の約 6 割を占めていることが示唆される。

残り 4 割の遺伝子導入については, 電流、電荷およびプラズマが生成した反応種による酸化ストレスによる細胞膜穿孔の他、クラスリン非依存のエンドサイトーシスなどが考えられる。

謝辞

本研究の一部は, JSPS 科研費・新学術領域(25108509, 15H00896)の助成により行われた。DNA 試料は本学総合科学センター(INCS)より提供を受けた。

参考文献

[1] T. Okihiro *et al*.: *Proc. of 4th Int. Cof. Plasma Medicine* (2012) 74.
[2] M. Jinno *et al*.: *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 27 (2014) 399.

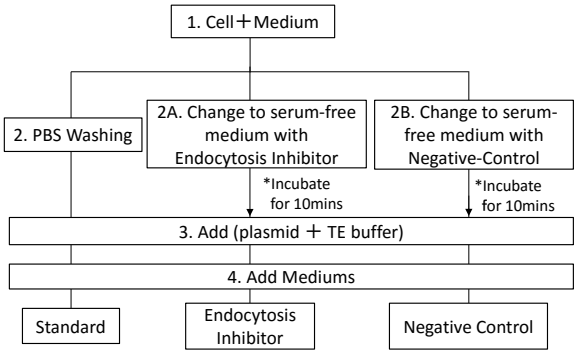

Fig.1 Sample treatment protocols.

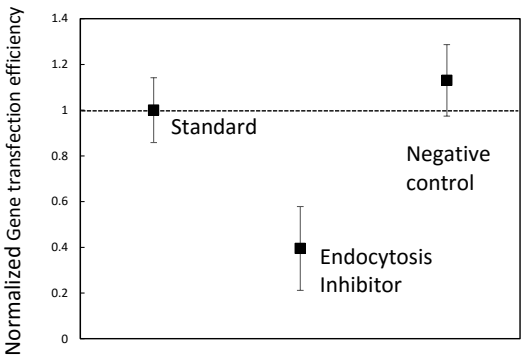

Fig.2 Normalized gene transfection efficiency of each protocols.

© 2016年 応用物理学会