

## プラズマ遺伝子導入機序に対する導入分子量の影響

### Effect of molecular weight on the mechanism of plasma gene transfection

○佐藤 晋<sup>1,2</sup>、明上 純子<sup>1</sup>、木戸 祐吾<sup>1,3</sup>、池田 善久<sup>1</sup>、本村 英樹<sup>1</sup>、神野 雅文<sup>1</sup>

(1. 愛媛大院理工、2. ワイ'ズ、3. パール工業)

○Susumu Satoh<sup>1,2</sup>, Junko Myojo, Yugo Kido<sup>1,3</sup>, Yoshihisa Ikeda<sup>1</sup>, Hideki Motomura<sup>1</sup>, Masafumi Jinno<sup>1</sup>

(1.Ehime Univ., 2.Y's Corp, 3.Pearl Kogyo Co., Ltd)

E-mail: satoh@ys-pbs.jp

#### 1. はじめに

プラズマ遺伝子導入では、ラジカルなどの反応種の酸化作用や電流、電荷によって生じる細胞膜への穿孔と、エンドサイトーシスやイオンチャネルなど細胞が物質を取り込む作用の両方が分子導入機序として有効だと考えている[1,2]。本報告では、機序解明の一助として導入分子・遺伝子の大きさや構造がプラズマ遺伝子導入に及ぼす影響について検証する。

#### 2. 実験方法

分子量が 1000~15000 程度の蛍光分子として YOYO-1、5'末端が蛍光分子 FAM で標識された一本鎖オリゴヌクレオチド(20 塩基および 45 塩基)、5'末端が FAM 標識された二本鎖オリゴヌクレオチド、EGFP を発現する遺伝子がコードされた DNA 断片(3Kbp、5.5Kbp)およびスーパーコイル pCX-EGFP プラスミドを用いる。96Well で培養した L-929 細胞に TE および PBS により希釈した蛍光分子およびプラスミドを滴下し、マイクロキャピラリ電極を用いて印加電圧 15 kVpp、周波数 20 kHz、照射時間 5 ms の条件でプラズマを照射する。プラズマ照射後に培地を加え、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で細胞を培養し、24 h 後に蛍光観察を行う。導入効率はイメージングサイトメータ (Cytell: GE ヘルスケアバイオサイエンス)により測定する。

#### 3. 結果と考察

図 1 に L-929 細胞へのそれぞれの分子の導入効率と分子量の関係を示す。分子量の小さい YOYO-1、オリゴ 20、オリゴ 45、オリゴ 45bp のグループと、分子量の大きい pCX-EGFP の断片およびスーパーコイルのグループでは分子量に対する導入効率の変化量が異なっている。この結果より、取り込む分子のサイズによって遺伝子導入機序が異なっていることが示唆された。また、オリゴ 45 とオリゴ 45bp とを比較すると、オリゴ 45 の分子量はオリゴ 45bp の約 1/2 であるが、導入効率は低い結果となっている。同様にスーパーコイル pCX-EGFP プラスミドは、同じ 5 Kbp の断片と比べて導入効率が低い。この結果より、分子量だけではなく分子の構造によっても導入効率が影響を受けることが示唆される。

#### 4. まとめ

本結果より、分子量 1000 kDa 付近を境として細胞内への導入効率が大きく異なり、更にそれ以上の大きさの分子の細胞への導入には導入される分子のサイズと立体構造が影響することが示唆された。

#### 謝辞

本研究の一部は、JSPS 科学研究費補助金 新学術領域研究 (25108509, 15H00896) の助成により行われた。DNA 試料は本学学術支援センター (ADRES) より提供を受けた。

#### 参考文献

- [1] M.Jinno *et al.*: *J. Photopolymer Sci. Technol.*, 27(2014)399  
 [2] M.Jinno *et al.*: *AEPSE2015*, 23am-C-3 (2015)

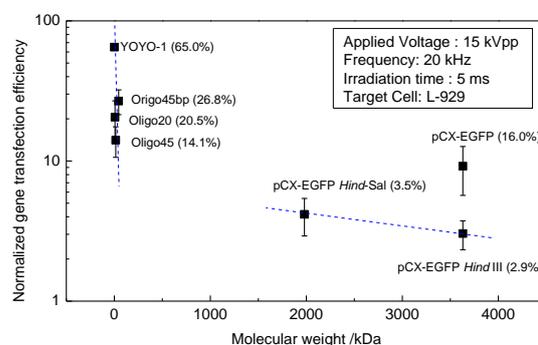


Fig.1 Gene transfection efficiency as a function of molecular weight.