

オートファジー経路の阻害によるプラズマ導入遺伝子の安定性改善

Stability improvement of plasma introduced gene by inhibition of autophagy pathway.

愛媛大院理工¹, パール工業株式会社², 株式会社ワイズ³ ○(M2) 菊池 勇登¹, 木戸 裕吾^{1,2},佐藤 晋^{1,3}, 神野 雅文¹Ehime Univ.¹, Pearl Kogyo Co., Ltd.², Y's Corp.³, °Yuto kikuchi¹, Yugo Kido^{1,2}, Susumu Satoh^{1,3}, Masafumi Jinno¹

E-mail: mjin@mayu.ee.ehime-u.ac.jp

1. はじめに: プラズマ遺伝子導入法とは、放電プラズマによりエンドサイトーシスを起こして遺伝子導入を実現する技術である[1, 2]。我々は、遺伝子導入プロセスを細胞内への導入と導入後の発現の二段階に分け、高導入効率と高生存率の両立を目標に発現率を向上させるべく細胞内の分解プロセス、分子運搬経路の解明に取り組んでいる。

2. 実験と結果: 細胞内に取り込まれた遺伝子は、オートファジーやエンドサイトーシスの後行程によって分解される[3]ので、本研究ではその経路に焦点を当て、各経路阻害剤である Nocodazole、Chloroquine、LY-294 002 の3つの試薬を用い分子運搬経路を阻害し遺伝子の安定性の改善を試みた。各阻害剤が阻害するポイントを(Fig,1)に表す。Table.1 に示すように Nocodazole を用いて遺伝子導入を用いた場合、阻害剤を用いなかった場合と比べ遺伝子導入効率が約5倍に上昇し、Chloroquine、LY-294 002 を用いた場合も同じように2倍、1.5倍に遺伝子導入効率が向上した。

3. 考察と結論: これらの結果から、各分解経路を阻害することで遺伝子の安定性を改善できることが明らかになった。Nocodazole と Chloroquine を組み合わせてそれぞれの阻害効果で遺伝子発現効率がさらに改善されることを期待したが、その効果は得られなかった。これは、Nocodazole が Chloroquine の試薬作用が発現される前に分子運搬経路を阻害したためと考えられる。したがって、後期エンドソーム以降とオートファゴソームが形成された後の分子運搬経路がほぼ同一であると結論できる。以上の結果から、推測される遺伝子運搬経路マップを(Fig,2)にまとめた。

[1] M. Jinno et al.: Archives of Biochemistry and Biophysics, **605**, 59(2016)[2] M. Jinno et al.: Plasma Sources Science and Technology, **26**, 6, (065016), (2017)[3] C.A. Lamb et al: BioEssays, **35**, 34 (2013)

Table.1 Improvement of gene transfer efficiency by inhibitors

Reagent and irradiation time	Std 5msec	LY 1.5 μ M 5msec	Chloro 30 μ M 5msec	Noco 1 μ M 5msec	Chloro 30 μ M + Noco 1 μ M 5msec
Gene transfection efficiency /%	6.6%	9.27%	10.99%	31.19%	30.31%
Standard deviation	1.1	0.49	1.53	5.34	1.63

※ Chloro = Chloroquine Noco = Nocodazole LY= LY-294 002

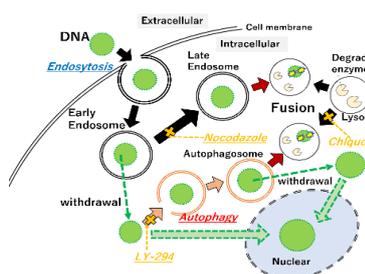


Fig.1 Intracellular molecular transport pathway and working point of each inhibitors

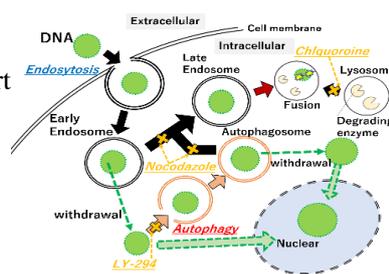


Fig.2 Intracellular molecular transport route obtained from experimental results