

細胞-導入分子間の衝突周波数から見た沿面放電法における遺伝子導入効率の分子量依存性

Explain molecular size dependence of gene transfer efficiency in surface discharge with collision frequency between cell membranes and introduced molecules.

○(M1)平松 達弥¹, (M1)平重 寛子¹, (D)木戸 祐吾^{1,2}, 佐藤 晋^{1,3}, 神野 雅文¹

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

○Tatsuya Hiramatsu¹, Hiroko Hirashige¹, Yugo Kido^{1,2}, Susumu Satoh^{1,3}, Masafumi Jinno¹

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

1.はじめに 沿面放電式の遺伝子導入法は一度の処理で広範囲に遺伝子の導入が可能であるが[1]、実用化には導入機序の解明が必要である。本研究では、機序解明の一端として、本法の導入効率の分子量依存性の明確化を試みた。

2.実験方法 標的細胞は HDF（ヒト皮膚線維芽細胞）を用いた。細胞を培養した 3.5 cm ディッシュに、Table.1 に示した各種サイズの 1 μg/μl のプラスミド溶液を 120 μl 滴下する。その後沿面放電処理を行い、24 時間培養後に蛍光観察を行った。電極間には 20 kHz の正弦波を負極に半波整流して印加した。電極は 2 対 4 本を使用し、2 本は高压側、もう 2 本はアースに接続した。回路図および電極配置を Figure.1 に示した。

3.結果と考察 プラスミド DNA の分子量と導入効率の関係および Stokes-Einstein の式を用いた分子量比率に対する DNA 分子-細胞間の衝突確率の簡易的計算値を Figure.2 に示した。実験の結果、DNA サイズの増大と共に導入効率は低下し、8 MDa 以上はほとんど導入が確認されず、この分子量が沿面放電法での導入の上限と考えられる。一方、7 MDa 以下の範囲では、分子量比率の-4/3 乗に比例して DNA 分子と細胞膜との衝突が減少するという計算結果と、実測値の減少の傾きはほぼ一致しており、DNA 分子と細胞膜の衝突が導入に深く関係していることが示唆される。

4.まとめ 沿面放電遺伝子導入法における、DNA のサイズと導入効率の関係が明確になり、本手法の機序の一端が解明された。

謝辞 本研究は JKA 及び愛媛大学リサーチユニットプログラムの支援によって行われた。

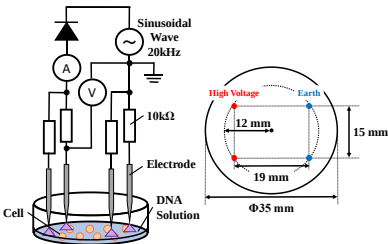


Figure.1 Schematic of the surface discharge device and position of electrodes.

Table. 1 Size of plasmid DNA

Plasmid DNA	Base pairs	MW
	(kbp)	(MDa)
pAcGFP1-N1 (I)	4.73	2.95
pCX-EGFP (II)	5.51	3.44
pCXLE-EGFP-SmaI (III)	7.00	4.37
pCXLE-EGFP (IV)	10.9	6.81
pCX-EGFP-tBE (V)	13.2	8.23
pCXLE-FLAG-hTET1-PGK-turboRFP-SmaI (VI)	14.2	8.88
pCXLE-FLAG-hTET1-PGK-turboRFP (VII)	18.1	11.3

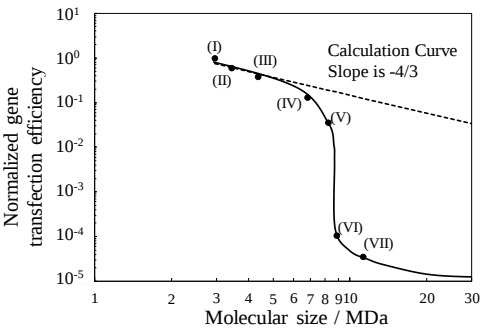


Figure.2 Relation between transfection efficiency and calculated value.

[1] 平重他：第 79 回応用物理学会秋季学術講演会, 21a-144-1(2018)