

フェムト秒レーザー分子導入に伴う植物細胞の生理状態の評価

Evaluation of physiological states of plant cells to establish a femtosecond laser photoporation

奈良先端大物質¹, 奈良先端大バイオ², ○上田 勇真¹, Taufiq Indra Rukmana¹,
國枝 正², 出村 拓², 安國 良平¹, 細川 陽一郎¹

Div. Mat. Sci. NAIST¹, Div. Bio. Sci. NAIST² ○Yuma Ueda¹, Taufiq Indra Rukmana¹,
Tadashi Kunieda², Taku Demura², Ryohei Yasukuni¹, Yoichiroh Hosokawa¹

E-mail: ueda.yuma.us1@ms.naist.jp

近赤外のフェムト秒レーザーを用いた動物細胞のフォトポレーションでは、これまでに蛍光分子から遺伝子まで様々な分子の導入が報告されている。近年我々は植物細胞に対してもフェムト秒レーザーを使ったフォトポレーションを行いタバコ BY-2 細胞に 2M Da の高分子糖鎖を導入することに成功している。[1, 2]しかし動物細胞とは異なり細胞壁や液胞を有する植物細胞へのフェムト秒レーザー加工が長期的にその生理活性に及ぼす影響の詳細は明らかでなく、今後植物の生理機能に関する研究や遺伝子導入技術などへ応用する為には、フェムト秒レーザー照射が植物細胞の生理状態に与える影響を深く理解することが求められる。そこで本研究では、分子導入実験の条件下においてフェムト秒レーザー照射がタバコ BY-2 細胞の生理活性に及ぼす影響を酵素活性と細胞膜の状態により評価した。

分子導入実験と同様に、試料として継代 2 日後のタバコ BY-2 細胞に細胞内の浸透圧を陰圧にするためのマンニトール処理と、細胞壁を軟化させるためのセルラーゼとペクトリナーゼによる酵素処理を行ったものを用いた。ディッシュ内の全てのタバコ BY-2 細胞(150~200 個)に関してフェムト秒レーザー(150 fs, 800 nm, 20nJ/pulse)の単パルスで 100 倍の対物レンズ(NA=1.25, oil)を用いて細胞壁と細胞膜の接点に集光照射した。レーザー照射後のタバコ BY-2 細胞を、酵素活性に依存した蛍光発光から細胞の生理活性を評価する Fluorescein diacetate (FDA)及び細胞膜の透過性を評価する Propidium iodide (PI)で二重染色し、共焦点蛍光イメージングにより観察した。

フェムト秒レーザー照射 12 時間後の試料に FDA と PI を添加し染色率を測定したところレーザーを照射していない細胞群と比較して FDA の染色率はどちらも約 95%で大きな違いは見られなかったことから、どちらの条件でも細胞は酵素活性を維持しており生理的ダメージは少ないと考えられる。一方、PI の染色率はレーザー照射により約 10%から 20%へと上昇しており、レーザー照射 12 時間後であっても細胞膜の透過性が高い状態にあることが示唆された。これらの実験を通じて、細胞の生理状態を多角的に評価し、レーザー照射の最適条件について検討し、植物細胞への遺伝子導入の実現を目指す。

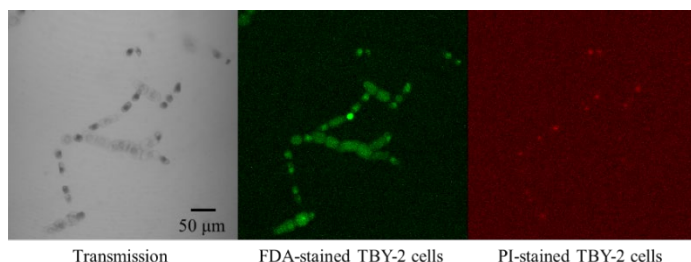


Fig. 1 Transmission and FDA and PI fluorescence images of tobacco BY-2 cells 12 hour after laser irradiation with single 20 nJ pulse.

[1] T. I. Rukmana *et al*, Scientific Reports, 9, 17530 (2019).

[2] T. I. Rukmana *et al*, APL photonics, 5, 066104 (2020).