

# ゲノム編集を目的としたプラズマ処理によるタバコカルスへの Cas9 タンパク導入

## Cas9 introduction into tobacco callus by plasma treatment for genome editing

愛媛大院理工<sup>1</sup>, パール工業<sup>2</sup>, ワイ'ズ<sup>3</sup>, 愛媛大院農<sup>4</sup>

°(M1) 宮本 聡一朗<sup>1</sup>, 池田 善久<sup>1</sup>, 木戸 祐吾<sup>1,2</sup>, 佐藤 晋<sup>1,3</sup>, 賀屋 秀隆<sup>4</sup>, 神野 雅文<sup>1</sup>

Ehime Univ.<sup>1,4</sup>, Pearl Kogyo Co. Ltd.<sup>2</sup>, Y's Corp.<sup>3</sup>

°Soichiroh Miyamoto<sup>1</sup>, Yoshihisa Ikeda<sup>1</sup>, Yugo Kido<sup>1,2</sup>, Susumu Satoh<sup>1,3</sup>, Hidetaka Kaya<sup>4</sup>, Masafumi Jinno<sup>1</sup>

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

**1. 序論** 著者らはタバコ葉にプラズマ照射を行い、表皮細胞に遺伝子組換えを想定したプラスミドと同サイズの巨大蛍光分子(FITC-Dextran)を導入することに成功している[1]。本研究ではゲノム編集による育種を想定した植物細胞へのタンパク導入を検討するため、植物のカルス細胞への Cas9 (CRISPR associated protein 9)の導入を試みた。

**2. 実験方法** 図1 に実験の概略図を示す。標的にはタバコのカルス細胞を用いた。導入物質はNLS-GFP-SpdCas9-NLSを用いた。これは GFP修飾したCas9で、核内にCas9を導入できているかどうかをGFP蛍光で確認することが出来る。タバコカルスを3.5 cmディッシュに静置した。電極先端からカルスまでの距離は約1 mm とした。プラズマは、周波数20 kHzの正弦波を用い、印加電圧18 kV、印加時間10 msの条件でプラズマ処理を行った。プラズマ処理後、Cas9溶液を照射部位に10  $\mu$ l 滴下し、一定時間静置した後培地に移し1日経過後、顕微鏡にて蛍光観察を行った。

**3. 結果と考察** 図2にプラズマ処理後のカ

ルスの蛍光観察結果を示す。図より、細胞内に局所的に強い緑の蛍光を観察することができる。本結果よりCas9が細胞内に導入され、かつ核に移行したものと考えられる。このような蛍光は、プラズマ未処理のサンプルおよびCas9のみ滴下したサンプルでは観察されなかった。以上のことからプラズマ処理によりCas9がカルス細胞に導入可能であり、ゲノム編集が可能になると期待できる。著者らは過去の研究により、タバコ葉の表皮細胞にプラズマ処理することで、細胞膜でエンドサイトーシスが誘導され、細胞内に10 kDaから2 MDaまでの蛍光分子を導入可能なことを実験的に明らかにしている[1]。Cas9の分子量は数百kDaであることから、サイズ的にもエンドサイトーシスにより細胞内に導入されたと考えられる。

**4. 結論** プラズマ処理によるタバコカルスへのCas9タンパク導入を試みた結果、核内に局在していると思われるGFP蛍光を確認した。本結果より、プラズマ処理によりCas9タンパクが細胞内に導入され、核移行可能であることが確認された。

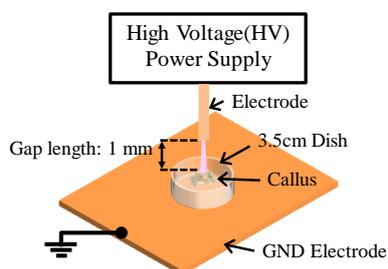


Fig.1 Schematics of surface discharge treatment.

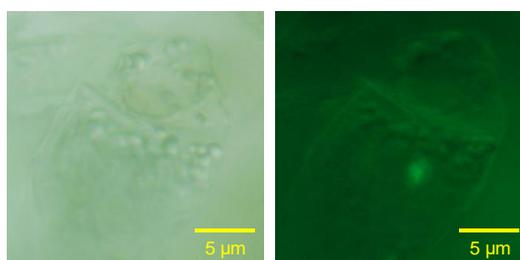


Fig. 2 Fluorescence observation results of Cas9-GFP protein. Green fluorescence in the nucleus by nuclear localization sequences (NLS) is observed.

(Left: Brightfield, Right: Darkfield)

**謝辞** 本研究の一部は JSPS 科研費 19KT0035、愛媛大学リサーチユニットの支援を受けたものです。本研究に用いた NLS-GFP-SpdCas9-NLS は農業・食品産業技術総合研究機構から提供を受けたものです。

**参考文献** [1] M. Nishi et al., *SPP-36/SPSM-31*, PB-19 (2019)