

プラズマ処理による単子葉植物(ミナトカモジグサカルス)への 蛍光分子導入

Introduction of Fluorescent Molecules into Embryogenic callus of Monocotyledonous Plants(*Brachypodium distachyon*) with discharge plasma

愛媛大院理工¹, パール工業², アイジーン³

°(M1) 坂本 流¹, 宮本 聡一郎¹, 濱田 侑希¹, 池田 善久¹, 木戸 祐吾^{1,2}, 佐藤 晋^{1,3}, 神野 雅文^{1,3}

Ehime Univ.¹, Pearl Kogyo Co. Ltd.², i-Gen Corp.³

°Ryu Sakamoto¹, Soichiroh Miyamoto¹, Yuki Hamada¹, Yoshihisa Ikeda¹, Yugo Kido^{1,2},

Susumu Satoh^{1,3}, Masafumi Jinno^{1,3}

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

1. 序論 筆者らはプラズマを用いた植物細胞への新しい分子導入技術を研究しており、双子葉植物のタバコカルスへCas9およびsgRNAを導入し、ゲノム編集に成功している[1]。イネやムギなどの単子葉植物は遺伝子組換えやゲノム編集が困難であり、新しい分子・遺伝子導入法が求められている。本研究では、単子葉植物のイネ科モデル植物であるミナトカモジグサカルスを用いて単子葉植物へのプラズマ分子導入法の有効性を検証した。

2. 実験方法 実験の概略図を図1に示す。標的細胞にはミナトカモジグサ (Riken BRC: rpc10001)のカルスを用いた。導入物質はFITC-dextran(250kDa)を用いた。導入機序を調べるため、エンドサイトーシス阻害剤(Sigma Aldrich: ES9-17)を用いた導入比較を行った。ミナトカモジグサカルスを3.5 cmディッシュに静置し、電極先端からカルスまでの距離を1 mmとしてプラズマ処理を行った。印加電圧は正弦波の11 kVppとした。処理後、FITC-dextran溶液(5 µg/µl)を10 µl滴下し、一定時間静置した後に洗浄し、顕微鏡にて蛍光観察を行った。

3. 結果と考察 プラズマ処理後のカルスの蛍

光観察結果を図2に示す。図より、プラズマ処理したカルスはプラズマ処理していないコントロールに比べて約3倍の明るさで緑色蛍光していることを確認した。コントロールの蛍光は自家蛍光と洗浄後の残留色素の蛍光である。

またプラズマ処理前にES9-17による処理を行ったカルスは、プラズマ処理してもコントロールと同程度の緑色蛍光しか得られなかった。ES9-17はクラスリン依存エンドサイトーシスを阻害するため、プラズマ処理によるミナトカモジグサカルスへの蛍光分子導入の導入経路は、タバコカルスと同様にクラスリン依存エンドサイトーシスによることが明らかとなった。

導入に最適なプラズマ処理条件はタバコカルスとミナトカモジグサで異なっており、エンドサイトーシスの惹起に必要な刺激のバランスが植物種で異なることが示唆された。

4. 結論 プラズマ処理によりミナトカモジグサカルスへの蛍光分子導入に成功した。またES9-17による阻害効果を確認したことから、導入はクラスリン依存エンドサイトーシスによることが明らかとなった。

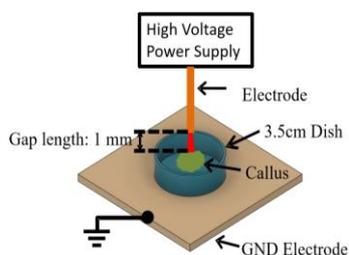


Fig.1 Schematic diagram of plasma treatment.

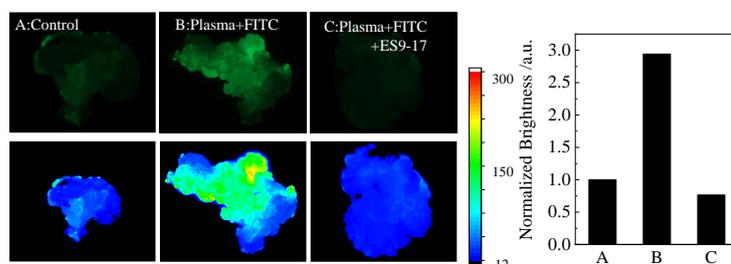


Fig. 2 Fluorescence observation results.

Left: Dark field images and heat maps, Right: Normalized Brightness (A: Control, B: Plasma+FITC, C: Plasma+FITC+ES9-17)

参考文献 [1] 宮本 他, 第 82 回応用物理学会秋季学術講演会, 8p-Z07-11, (2020).

謝辞 本研究の一部は JSPS 科研費 (17H01068, 15H00896, 25108509)、愛媛大学リサーチユニットの支援を受け実施した。本研究に用いたミナトカモジグサカルスは理研 BRC から提供を受けた。