

温度制御マルチガスプラズマジェットによる植物細胞へのタンパク質導入機構の解析

Analysis of mechanism for direct protein introduction into plant cells by a temperature controllable multi-gas plasma jet

千葉大・院園芸¹, 理研・CSRS², 東工大未来研³, 農研機構⁴, ○柳川由紀^{1,2}, 相澤駿輝³, 末永祐磨³, 飯島勇介³, 沖野晃俊³, 光原一朗⁴

Chiba Univ.¹, RIKEN², FIRST, Tokyo Inst. Tech.³, NARO⁴, °Yuki Yanagawa^{1,2}, Yuma Suenaga³,

Toshiki Aizawa³, Yusuke Iijima³, Akitoshi Okino³, Ichiro Mitsuhashi⁴

E-mails: yuki.yanagawa@chiba-u.jp / ykyana@gmail.com

タンパク質やDNAなどの生体高分子を外から直接生細胞へ導入する技術は、基礎研究から産業利用まで利用価値があると考えられる。特に、植物細胞へ簡単に生体高分子を導入することができれば、ゲノム編集などを通して農業に貢献できると期待される。しかし、植物はクチクラ層や細胞壁などの構造を有していることから、既存の生体高分子導入法は限られた植物種や組織にしか適用できないという難点があった。

私たちは、これまでに温度制御マルチガスプラズマジェットを用いて無傷の植物細胞に生体高分子(タンパク質やDNA)を外から直接導入する技術を開発し (Yanagawa et al, PLoS One 2017; 特許第 6875686 号)、このプラズマ法を用いて植物細胞にゲノム編集酵素(Cas9/single guide RNA)をタンパク質-RNA 複合体の形で導入してゲノム編集することに成功した (特開 2021-78362)。そこで、本大会では、プラズマ照射による植物細胞への生体高分子導入機構を、タンパク質導入を指標として解析したので報告する(Yanagawa et al, Plant Biotech. 2022)。

まず初めに GFP 融合タンパク質を用いてタバコ葉へのタンパク質導入能の持続期間を調べたところ、プラズマ照射した後、少なくとも 3 時間はタンパク質導入が継続することが明らかになった。さらに、細胞への導入速度を調べたところ、プラズマ照射後、徐々にタンパク質導入量が増加し、プラズマ照射 5 時間後には GFP 融合タンパク質に一晩浸したサンプルと同等の導入量に達することが明らかになった。これらの結果からプラズマ照射によるタンパク質導入能が長時間持続することが明らかになったので、プラズマ照射によるタンパク質導入は能動輸送によって生じるのではと考え、次に薬理的な解析を行った。プラズマ照射したタバコ葉を各種エンドサイトーシス阻害剤を含む PBS buffer に 15 分間浸した後、GFP 融合タンパク質を添加してその細胞内への取り込みを観察したところ、アジ化ナトリウム(ATP 依存的なエンドサイトーシスを阻害)、ショ糖及びブレフェルディン A(クラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害)を処理したタバコ葉では細胞内の GFP 蛍光が有意に低下した(図 1)。これらのことから、プラズマ照射による植物細胞へのタンパク質導入は、クラスリン依存性エンドサイトーシスが関与していると示唆された。

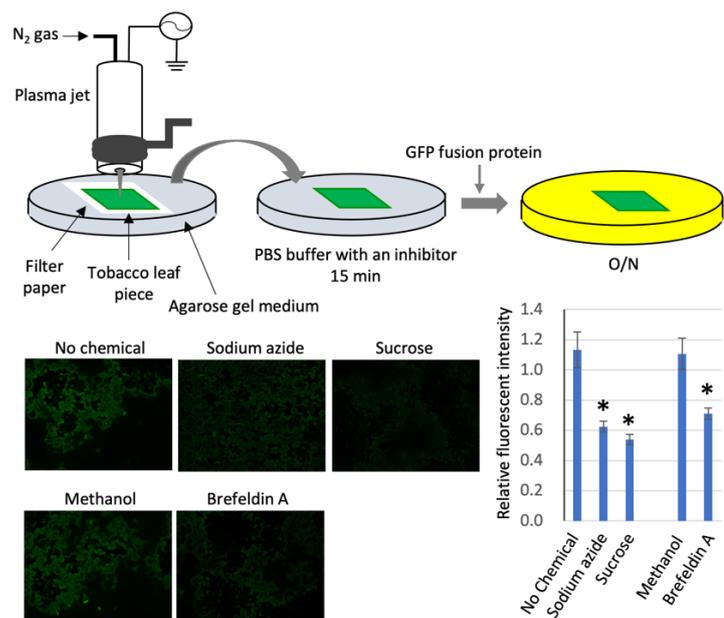


Fig 1 Protein uptake in plant cells induced by plasma treatment was suppressed by clathrin-mediated endocytosis inhibitors. Sodium azide and sucrose were soluble in water. Methanol is a solvent for brefeldin A.