

フェムト秒レーザーを用いた植物単細胞への巨大分子の導入

Introduction of Giant Molecule into Single Plant Cell

Induced by Femtosecond Laser Ablation

○片桐大輔¹、坂口さや香¹、米田新²、出村拓²、細川陽一郎¹

(1. 奈良先端大 物質創成、2. 奈良先端大 バイオ)

○Daisuke Katagiri¹, Sayaka Sakaguchi¹, Arata Yoneda², Taku Demura², Yoichiroh Hosokawa¹

(1. Grad. Sch. Mat. Sci. NAIST, 2. Grad. Sch. Bio. Sci. NAIST)

E-mail: katagiri.daisuke.jv0@ms.naist.jp

遺伝子は生物を構成する細胞の機能を制御する役割を持つため、遺伝子を任意に単一細胞に対して導入することができれば、細胞の機能を能動的に制御することが可能になる。フェムト秒レーザーを用いた遺伝子導入手法はその最善策として世界的に注目されており、これまでに特定の単一動物細胞に細胞外物質を導入できることが多数報告されている[1-3]。しかし、植物細胞に対しての成功例は報告されていない。この方法では、フェムト秒レーザーアブレーションによって細胞膜に一時的な微小穿孔を形成し、そこから外部分子を細胞内に導入すると考えられている。この仮説に基づくと、植物細胞には、堅牢で緻密な細胞壁が細胞膜の外側に存在するため、巨大分子である遺伝子の細胞内への導入が妨げられている可能性がある。本研究では、単一植物細胞への遺伝子導入を目的とし、微量の細胞壁分解酵素を用いて細胞壁を軟化させ、上記の問題を解決し遺伝子と同程度の分子量を持つ蛍光性巨大分子を植物細胞内に導入することを試みた。

単一植物細胞であるタバコ BY-2 細胞の細胞壁を酵素 (Cellulase, Pectolyase) を用いて軟化させ、蛍光性巨大分子である FITC-dextran (MW: 2000000, Ex./Em.=492 nm/518 nm) を添加した高張液に、その細胞を分散させて試料とした。共焦点蛍光顕微鏡に、高出力フェムト秒レーザー (800 nm, 150 fs, 1 kHz) を導入し、BY-2 細胞の細胞壁と細胞膜の間にフェムト秒レーザーを対物レンズ (水浸 100×, N.A. 1.00) により 1 秒間集光照射した。レーザー照射前後の蛍光画像を比較し、蛍光分子の導入を評価した。

パルスエネルギー 30 nJ/pulse のレーザーを照射したとき、照射後に細胞内の蛍光強度が上昇していることが確認された。このとき、蛍光分子は液胞には導入されず細胞質内のみ存在していることも併せて観察された。これは液胞が破壊されずに細胞が生理活動を維持している可能性を示している。

一方で、酵素処理をしたときはこのような蛍光強度の上昇は見られず、酵素を用いて細胞壁を軟化させることで細胞壁を通過し細胞内に巨大分子を導入できることが初めて示された。今後はこの手法を応用して植物細胞内への遺伝子の導入と発現を試みる。

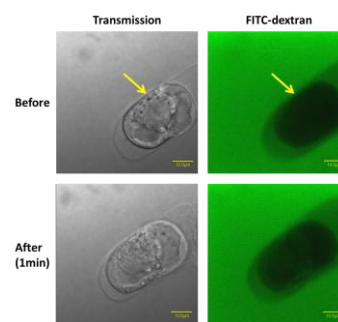


Fig.1 Transmission (left) and fluorescence (right) images of a Tabaco BY-2 cell in culture medium containing FITC-dextran. Top and bottom images are before and after the laser irradiation. Laser irradiation point was arrowed.

[1] U.K. Tirlapur, K. König, Nature **418**, 2002.

[2] Y. Hosokawa, et al, PLoS ONE **6**, 2011.

[3] M. Waleed, et al, Biomedical Optics Express **4**, 2013.