

細胞改変システムの植物細胞への適用拡大

システム科学技術学部 知能メカトロニクス学科

1年 麻生 詩織

1年 舟波 美音

指導教員 システム科学技術学部 知能メカトロニクス学科

准教授 齋藤 敬

1. 目的

細胞壁をもつ植物細胞への物質導入は、そのままでは大変困難で、通常の研究室で実施できる手法としては、金属粒子を散弾銃のように細胞に発射するパーティクルガン法ぐらいしか適用例はない。これに対し、我々の独自技術である光化学細胞膜穿孔法は、光増感剤を含み、表面にサブミクロン径の無数の突起(以下、ナノ剣山構造)を有する細胞膜穿孔体(以下、穿孔体)を使用する穿孔法である。この穿孔体のナノ剣山構造を細胞膜に接触させ光照射を行うことで、光増感剤が光を吸収し、得たエネルギーを他の物質に受け渡すことで化学反応プロセスを助けるといふ、光触媒機能によって細胞膜の局所的な酸化が行われる。酸化された箇所は、細胞膜を構成しているリン脂質の柔軟性が失われ硬化する。ここにナノ剣山によるせん断応力がかかり、細胞膜を穿孔する。穿孔後、約30秒から数分の経過によって、細胞の自己回復機能が作用し、細胞膜の穴が閉じる。

従来は、動物細胞に対し適用されてきた光化学細胞膜穿孔法だが、植物細胞の細胞壁に対しても酸化反応による溶解が認められたとの報告があり、今回、植物細胞に対して改めて穿孔試験を行い、細胞壁の除去が不要な植物細胞の新たな改変手段が拓けるか、まずは細胞加圧条件や光照射量を様々に試したい。

2. 研究内容

植物細胞の代表としてタマネギの表皮細胞を用いて、穿孔実験を行う。本実験では遺伝子導入の代わりに、蛍光色素を導入させ、穿孔した細胞を観察した

使用薬品：蛍光ペン充填インク原液（蛍光ピンク）

使用細胞：タマネギの表皮細胞

細胞膜穿孔装置：セルスタンパーCP-01（丸大機工(株)）[1]

使用穿孔体：圧力分散型細胞膜穿孔体[1]

使用ソフト：ImageJ(画像解析) [開発 Wayne Rasband (NIH)]

3. 実験手順

- ① タマネギの表皮細胞をナイフで、約1cmの正方形に切り分ける
- ② 切り取ったタマネギの皮を直径35mmのプラスチックシャーレに肥厚葉とくっつい

ていた面が表になるように入れた

- ③ 20 μm の等張液（砂糖水）をタマネギの表皮細胞全体にかかるように広げた
- ④ 穿孔プログラムの起動
- ⑤ 細胞に加える圧力を設定し、穿孔する(120s)
- ⑥ 穿孔した細胞に蛍光インクをタマネギの表皮細胞全体にかかるように広げる
- ⑦ 蛍光インクのついた細胞を洗浄液で蛍光インクをおとす
- ⑧ 洗浄した植物細胞をプレパラートに重ならないように広げる
- ⑨ 蛍光顕微鏡 (IX71, オリンパス) を用いて透過像と蛍光像を観察, 撮影する (SP350, オリンパス)
- ⑩ 「ImageJ」によって輝度値を計測する

4. 結果・考察

4-1) 穿孔結果

- ・ 実験は以下の条件に分けて行った.
- ・ 600g/cm² 120s 光照射なし (図1)
- ・ 600g/cm² 120s 光照射あり (図2)
- ・ 0g/cm² 120s 光照射あり (図3) ※画像は印刷用に明るさ, コントラスト調整済

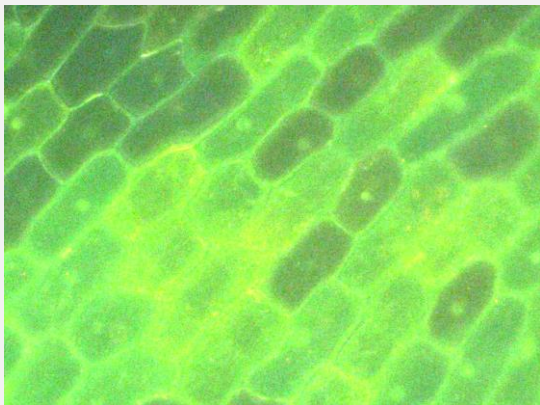


図 1

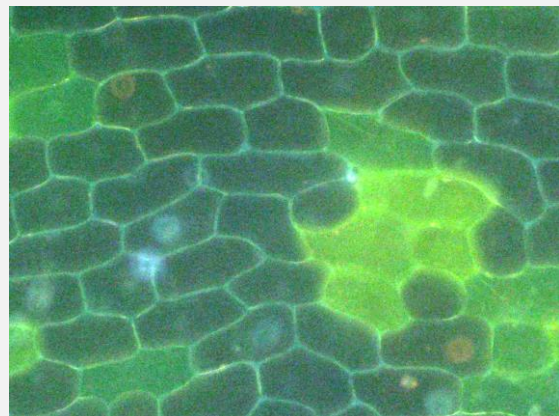


図 2

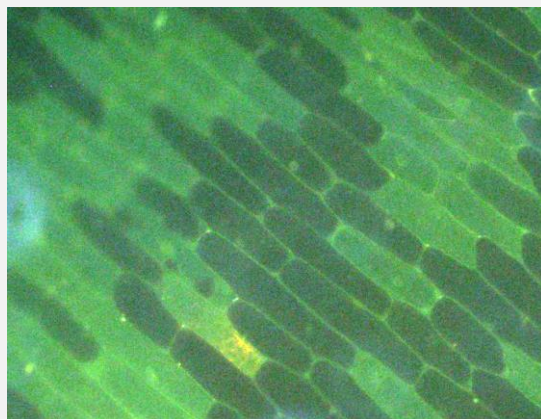


図 3

この画像から、色素が導入されているのかを確認する。蛍光している細胞とそうでない細胞を3つずつ選び、画像解析ソフト(ImageJ)を用いて輝度値を出した。

下記の表1~4は、条件ごとに明るい部分と暗い部分の輝度を255階調で数値的に現した表である。数値は0-255の範囲で、大きいほど明るいということになる。表5では、各条件での蛍光している細胞とそうでない細胞の数の比率を現した表である。

表1 条件ごとの暗い部分の画像解析
条件 平均輝度

| | |
|----------------------------|-------|
| 600g/cm ² 光照射あり | 36.5 |
| | 40.05 |
| | 36.11 |
| 600g/cm ² 光照射なし | 26.41 |
| | 28.63 |
| | 27.43 |
| 0g/cm ² 光照射あり | 28.6 |
| | 30.83 |
| | 29.48 |

表2 条件ごとの明るい部分の画像解析
条件 平均輝度

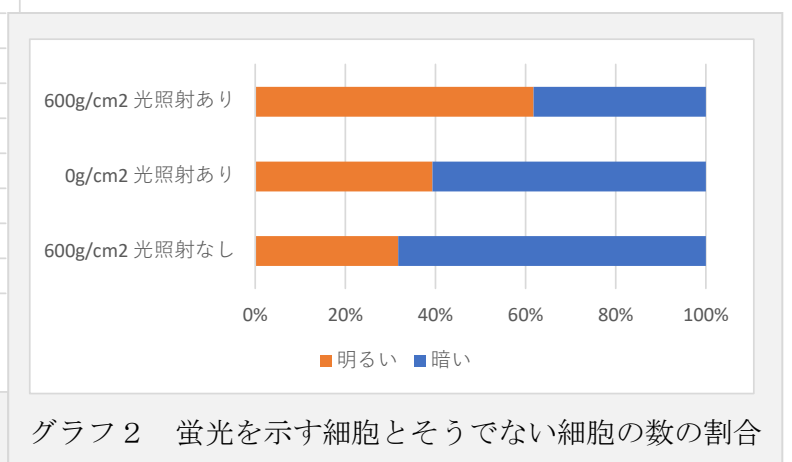
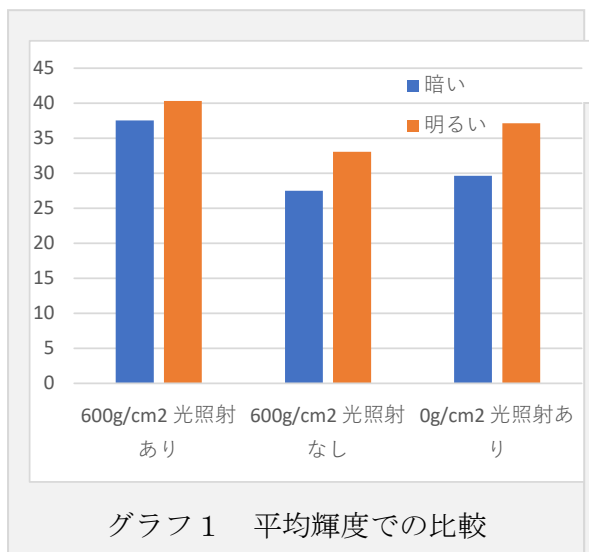
| | |
|----------------------------|-------|
| 600g/cm ² 光照射あり | 40.35 |
| | 40.22 |
| | 40.34 |
| 600g/cm ² 光照射なし | 32.27 |
| | 35.51 |
| | 31.38 |
| 0g/cm ² 光照射あり | 34.96 |
| | 39.16 |
| | 37.3 |

表3 条件ごとの暗い部分の輝度平均

| 条件 | 平均輝度 |
|----------------------------|----------|
| 600g/cm ² 光照射あり | 37.55667 |
| 600g/cm ² 光照射なし | 27.49 |
| 0g/cm ² 光照射あり | 29.63667 |

表4 条件ごとの明るい部分の輝度平均

| 条件 | 平均輝度 |
|----------------------------|----------|
| 600g/cm ² 光照射あり | 40.30333 |
| 600g/cm ² 光照射なし | 33.05333 |
| 0g/cm ² 光照射あり | 37.14 |



4-2) 考察

本実験では、穿孔する際の圧力は $600\text{g}/\text{cm}^2$ で統一し、光照射の有無での違いを確認、観察できた。その結果の下記の表を見ると、グラフ 1 では、光照射ありとなしの平均輝度を比べると、光照射ありの平均輝度が高いことが分かる。また、さらに、グラフ 2 を見ても、明らかに、光照射ありの方では蛍光している細胞の割合が高いため、効果があったと考えられる。

5. まとめ

光化学細胞膜穿孔法によって、植物細胞への蛍光色素導入が増したという結果が得られた。なお今回試験した穿孔体は、2回目以降では導入効率に及ぼす変化が確認されず、穿孔時に表面に何らかの阻害物質が吸着している可能性がある。今後、細胞壁を分解するような酵素処理を穿孔体に行う等、複数回の穿孔が可能になるか、またどのような物質が細胞内に導入出来るか、試験を行いたい。

参考文献

[1] K. Kobayashi, K. Imamura, K. Suzuki, K. Takemasa and T. K. Saito, "Injection Molding of Cell Membrane Perforator with Photochemical Perforation Function and Surface Modification," 2021 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation (ICMA), 2021, pp. 837-842, doi: 10.1109/ICMA52036.2021.9512635.