

電界集中型エレクトロポレーションによる DNA 導入過程の実時間観察

バイオエンジニアリング専攻 修士2年 住田 洋輔

iPS 細胞とは、体細胞の核内へ数種類の遺伝子を導入することにより分化万能性と自己複製能を持たせた細胞である。体細胞から作ることができるこの iPS 細胞は再生医療への応用が期待されるが、ウイルスをベクターとした遺伝子導入にはガン化の危険性があるため、その問題を解決でき、細胞の樹立効率の良い導入手法が求められている。その手法のひとつとして、プラスミド遺伝子をベクターとしたエレクトロポレーションによる導入法が挙げられる。当研究室では、電界集中を利用したエレクトロポレーションを用いることで、低侵襲かつ高収率の遺伝子導入を実現している(Fig.1)。

電界集中型エレクトロポレーションでは、電気泳動力によって電気力線に沿ってプラスミド遺伝子が導入される。電気力線は核内にも通っているはずであるため、この手法を用いればプラスミド遺伝子が直接に核内にまで導入されることが期待される。そこで、本研究では、電界集中型エレクトロポレーションによる DNA の導入過程を実時間観察できる実験系を構築することで、導入された DNA が核内にまで入り込むか、またどのくらいの量が導入されるのかを実験的に調べることを目的とした。

Fig.2 に示すような微細オリフィス付き PDMS デバイスを作製し、蛍光ナノ粒子 Qdot で可視化した DNA を用いることで、導入される DNA の挙動を実時間観察できる実験系を構築した。

膜穿孔のために直流パルスを印加する際に、電界集中しているオリフィス部から反発力を受ける負の誘電泳動が細胞に対して発生するが、細胞とオリフィスの間に隙間ができると、Qdot 標識 DNA が細胞周辺に漏れ出し、バックグラウンドが強くなって細胞内の観察が困難になるという問題が発生する。そのため、吸引固定と正の誘電泳動を利用して細胞をオリフィスへ誘導し、細胞膜修飾剤 BAM を用いて細胞をオリフィス部に密着させることで、細胞を固定し、細胞とオリフィスの間の隙間を塞いだ。

このように構築された実験系のもと、細胞に対して電圧 2.0 V、印加時間 100 ms の条件で方形波パルスを数回印加した結果、核内に導入された DNA が観察できた(Fig.3, Fig.4)。ただし、パルス印加時の DNA の挙動についてはバックグラウンドの蛍光によって観察が困難であり、DNA 側流路内の Qdot の蛍光を拾わない様にするのが求められる。

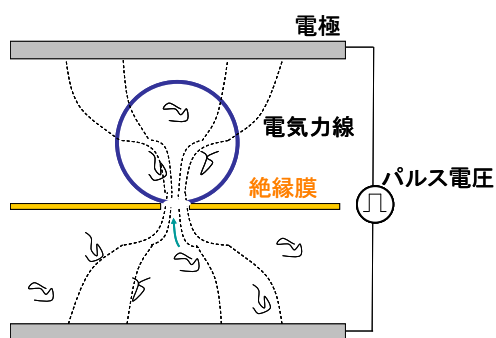


Fig. 1 電界集中を利用したエレクトロポレーション

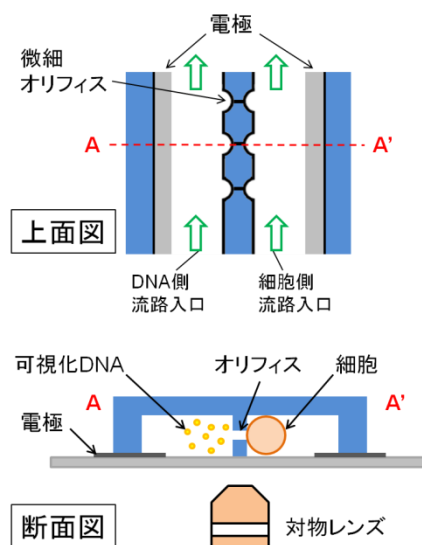


Fig. 2 微細オリフィス付きマイクロデバイス

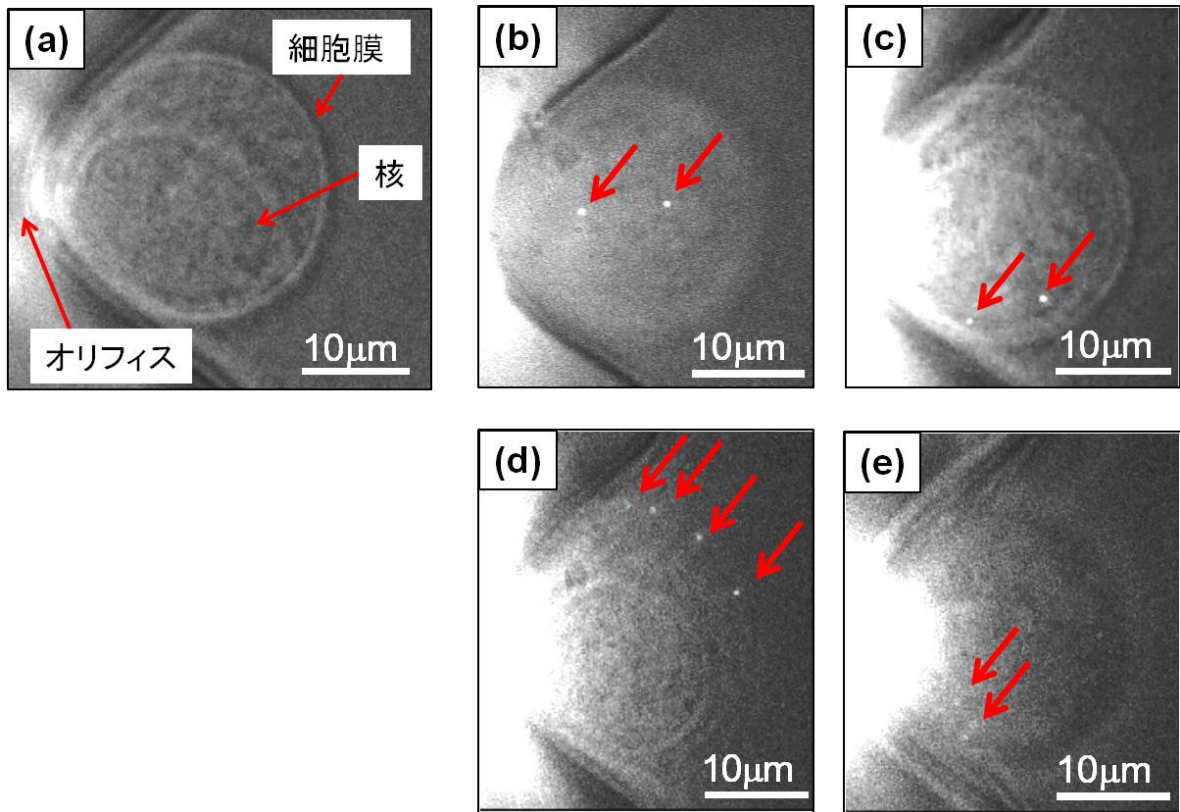


Fig. 3 細胞内に導入された Qdot 標識 DNA の観察

- (a) 微細オリフィスに固定した細胞 (明視野)
- (b) 細胞内 (核外) で観察された 2 つの Qdot の輝点 (明視野&Y 励起)
- (c) 細胞内 (核内) で観察された 2 つの Qdot の輝点 (明視野&Y 励起)
- (d) 細胞内 (核外) で観察された 4 つの Qdot の輝点 (明視野&Y 励起)
- (e) 細胞内 (核内) で観察された複数の Qdot の輝点 (明視野&Y 励起)

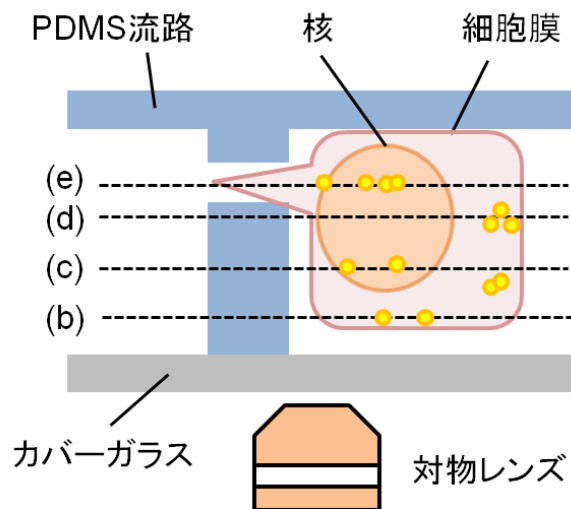


Fig. 4 細胞内で観察された Qdot 標識 DNA の位置の模式図
および Fig.3 (b)-(e) の画像の位置