

オンチップエレクトロポレーションを用いた浮遊系細胞核への遺伝子直接導入

東京大学工学部機械工学科 鷲津・小穴研究室 03120233 堀江真央 指導教官：鷲津正夫教授

1、研究の背景及び目的

遺伝子導入技術とはプラスミドを細胞内に入り込ませる技術のことである。

本研究で扱っているエレクトロポレーションはその細胞内へ物質を導入する技術のひとつであり、細胞に電圧を印加することで人工的な穿孔を細胞膜にあけるとい手法である。

このエレクトロポレーションにさらに電界集中の機構を加えたオンチップエレクトロポレーションという新しい手法について当研究室では研究を続けており、その適用範囲を浮遊系細胞にまで広げるといのが本研究での目的である。

現在はその性能を確立している接着細胞に対するオンチップエレクトロポレーションとの比較から、この浮遊系細胞でのプラスミド導入の発現成功例が少ない理由を細胞核のオリフィス位置との相対位置関係の違いによるものと推測し、吸引力を利用した核の位置制御という手法で収率の改善に取り組んでいる。

2、方法

2-1 オンチップエレクトロポレーション

右上の図にある通り、細胞懸濁液を電極の間にに入れて電圧を印加するのが通常のエレクトロポレーションである。そして、オンチップエレクトロポレーションはその電極の間にオリフィスシートという微細孔のあいた絶縁体シートをはさみその上に細胞をのせるかたちで実行する手法である。(Fig.1)

このオリフィスシートによって電極間に電界集中が生じ、オリフィス近傍の細胞膜にのみ印加電圧がすべてかかる。その電界集中部分でのみ膜破壊電圧に達するように調整することで従来のエレクトロポレーションの問題点であった粒径依存性や低再現性などを改善した。

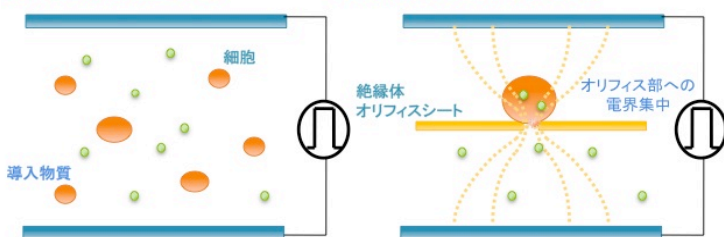


Fig. 1 通常のエレクトロポレーション(左)とオンチップエレクトロポレーション(右)の比較

このエレクトロポレーションの方法は低侵襲であるほかにも、シート上でエレクトロポレーションを行うことができるので、経過観察や発現所要時間短縮などのメリットがあるが、それは接着細胞に対してのみで、浮遊系細胞に関しての収率はわずか数%程度にとどまっている。

2-2 吸引による細胞変形を行ったうえでのエレクトロポレーション

現段階ではその低収率の原因を細胞核とオリフィスとの位置関係の違いによるものと推察し、その解決策として吸引機構を利用した細胞変形を考えている。(Fig.2)

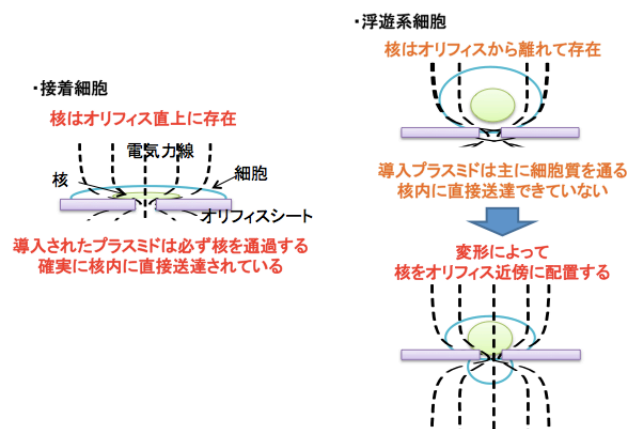


Fig. 2 吸引圧を利用した核の位置制御

これは、オリフィスに核が近づくことでプラスミドの電気泳動経路上の核存在確率が高まると考えられるからである。

3、結論

PDMS を用いて作製した細胞核より小さい大きさのオリフィスを有するデバイスによって、細胞を吸引変形し、パルス電圧を印加するところまでは行うことができたが、その細胞はエレクトロポレーション後に 21 時間培養している過程ですべて死滅してしまった。(Fig.3)

そのため、吸引による変形を用いた細胞核への遺伝子直接導入を行うにはより低侵襲な条件を考案する必要があるという結論に至った。

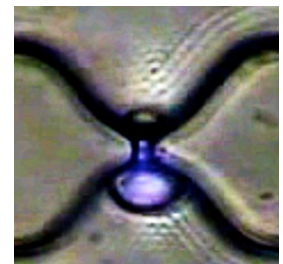


Fig. 3 吸引によって変形された細胞