

課題番号 : F-14-GA-0010  
利用形態 : 共同研究  
利用課題名(日本語) : 遺伝子導入デバイスの作製  
Program Title (English) : Fabrication of electroporation device for plant cell  
利用者名(日本語) : 秋光 和也  
Username (English) : K. Akimitsu  
所属名(日本語) : 香川大学農学部 応用生物科学科  
Affiliation (English) : Department of Applied Biological Science Faculty of Agriculture, Kagawa University

### 1. 概要(Summary)

近年、環境適応力や病虫害抵抗性を向上させ、作物の安定供給や農業生産性向上を目的とした植物への遺伝子組み換え技術の研究が進められている。主に、アグロバクテリウム法やパーティクルガン法、エレクトロポレーション法(EP 法)が用いられているが、いずれも対応細胞種の制限や遺伝子導入効率の低さといった問題がある。これらの問題を MEMS 技術により解決しようという試みが進んでおり、マイクロ領域で選択的に EP を行う $\mu$ EP 法を検討した。特に本年度は、多数のデバイスを製作、評価して、印加電圧を最適化することで、細胞生存率の向上と植物細胞内へのプラスミドベクター導入・発現を検討した。

### 2. 実験(Experimental)

#### ・利用した主な装置

- ・触針式表面形状測定器 (ULVAC 社製, DEKTAK8)
- ・ノズル移動型スプレーコータ (ナノテック社製, DC110-EX)
- ・イオンシャワー (エリオニクス社製, EIS-200ER)

#### ・実験方法

ソフトリソグラフィ法を用いて細胞固定オリフィスを有する遺伝子導入デバイスを製作した。始めに、平滑基板の上にスプレーコータを用いて厚膜フォトレジストを均一塗布し、回転傾斜露光法により 3 次元形状を有する樹脂製微細 鑄型 を製作した。つぎに、鑄型に Polydimethylsiloxane (PDMS) を流し込み、加熱硬化して、離型することによって、透明微細流路を作製した。最後に、あらかじめ電界印加用の電極を配置したガラス基板上に、酸素プラズマ接合を用いて、ガラスと PDMS 製チップを接合し、デバイスが完成する。

### 3. 結果と考察(Results and Discussion)

製作したデバイスを用いて、電圧 4 V 印加後の細胞の蛍光画像を Fig. 1 に示す。電圧印加前は孔形成判別試薬とした Propidium Iodide(PI)の赤色蛍光を発していなかった細胞が印加後、蛍光していることから細胞膜への孔形成には成功していると考えられる。しかし、導入したベクターによる GFP 蛍光は観察されなかった。GFP の蛍光が観察されなかった理由としては、タンパク発現に問題があると考えられる。導入後の静置時間が短い為、GFP の発現量は十分に観察出来るまで至っておらず、また、従来の遺伝子導入法では導入後生育培地に交換し、細胞の活性化を促しているが、本手法では溶液交換が困難という環境条件も発現の妨げになっていると考えられる。今後、デバイス内の液置換法を検討する。

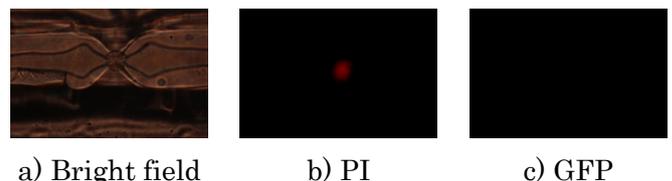


Fig. 1 Photographs of transgenic test using the fabricated micro-device

### 4. その他・特記事項(Others)

共同研究者: 香川大学 鈴木孝明 准教授  
科研費 基盤研究 A 「植物ミトコンドリア病を制御する tRNA 介在領域分解タンパク質複合体」 2014 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日予定

### 5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

なし

### 6. 関連特許(Patent)

なし