

論文内容の要旨

博士論文題目 Photoinjection of macromolecules into single plant cells applying femtosecond laser amplifier

(フェムト秒レーザー増幅器を利用した単一植物細胞への巨大分子の導入)

氏名 Taufiq Indra Rukmana

(論文内容の要旨)

植物への細胞選択的分子導入法は植物の機能を一細胞レベルから明らかにするための技術としてその開発が期待されている。これまでに近赤外のフェムト秒レーザーを植物細胞に集光して細胞壁と細胞膜に小孔を形成し、培養液に添加した低分子を導入した結果が報告されているが、タンパク質やDNAのような分子量の大きな生体分子の導入は実現していない。本論文では植物細胞へ細胞選択的に巨大分子を導入する手法として、従来法よりもパルスエネルギーが大きなフェムト秒レーザー増幅器と酵素処理による細胞壁の部分分解を組み合わせることで、細胞培養液へ添加した 2 MDa の高分子糖鎖及び粒形 80 nm のナノ粒子の導入に成功した結果についてまとめられている。

第 1 章では植物細胞への一般的な分子導入法を俯瞰し、選択的分子導入の意義と実現に向けた課題、フェムト秒レーザー増幅器を用いた方法の利点を概説している。第 2 章では実験に用いたタバコ BY-2 細胞の調製をはじめ、細胞に導入する巨大分子の詳細と、共焦点蛍光顕微鏡とフェムト秒レーザーを組み合わせた分子導入・観察システムについて述べられている。第 3 章では通常の培養液中と浸透圧調整により内部圧力を緩和した状態、さらに酵素処理により細胞壁を部分的に分解した状態のタバコ BY-2 細胞に関して、顕微フェムト秒レーザーシステムを用いて蛍光標識された 20 kDa と 2 MDa の高分子糖鎖の導入を実証し、分子サイズと細胞試料の状態に依存した導入率の変化を示している。第 4 章では第 3 章で示した実験と同様の系を用いてよりサイズの大きな物質の導入を検討し、直径 80 nm のナノ粒子に関しても細胞への導入が可能であることを示している。第 5 章では高強度のフェムト秒レーザーパルスの集光位置を変化させたときの高速カメラ像と分子導入効率の変化からフェムト秒レーザー増幅器により植物細胞に巨大分子を導入されるメカニズムに関する議論を展開している。第 6 章では細胞選択的に導入した巨大分子の細胞内及び細胞間の分子拡散の観測結果を基に、本手法の植物生理研究への応用可能性に関して述べられている。第 7 章では、本論文の研究成果と将来展望をまとめて、本論文の総括としている。

(論文審査結果の要旨)

植物への細胞選択的分子導入法は植物の機能を一細胞レベルから明らかにするための技術としてその開発が期待されている。これまでに近赤外のフェムト秒レーザーを植物細胞に集光して細胞壁と細胞膜に小孔を形成し、培養液に添加した低分子を導入した結果が報告されているが、タンパク質やDNAのような分子量の大きな生体分子の導入は実現していない。植物細胞への巨大分子導入に向けては植物細胞を保護する厚くて硬い細胞壁の存在が大きな障害となっている。本研究では細胞壁に効果的な小孔を形成し、植物細胞へ細胞選択的に巨大分子を導入する手法として、従来法よりもパルスエネルギーが大きなフェムト秒レーザー増幅器と酵素処理による細胞壁の部分分解を組み合わせることを提案している。論文では提案した手法により細胞培養液へ添加した高分子糖鎖及びナノ粒子の導入に成功した結果および植物細胞に集光した高強度のフェムト秒レーザーパルスの作用機序についてまとめられている。

植物細胞として用いたタバコ BY-2 細胞にフェムト秒レーザーパルス照射し、その前後の共焦点顕微鏡蛍光像の比較により培養液に添加した蛍光性巨大分子の導入量を評価している。レーザー照射する際のタバコ BY-2細胞の状態やレーザー照射条件を変化させて分子導入効率を評価した結果、フェムト秒レーザー増幅器を用いることで遺伝子導入に用いられるプラスミドと同程度の大きさを有する 2 MDa の高分子糖鎖が導入可能であり、植物細胞壁の部分分解により導入効率が増加することを実証している。さらに同様の系を用いてよりサイズの大きな直径 80 nm のナノ粒子も細胞への導入に成功しており、これは、これまでの導入サイズ上限であった 40 kDa を大きく上回る成果である。また高強度のフェムト秒レーザーパルスの集光位置を変化させたときの高速カメラ像と分子導入効率の変化からフェムト秒レーザー増幅器により植物細胞に巨大分子を導入されるメカニズムに関する議論を展開し、高強度フェムト秒レーザーによる細胞膜と細胞壁のレーザーアブレーションによる小孔形成以外にも集光点近傍に伝搬する機械作用による膜の変形が巨大分子導入に寄与することを見出している。さらに、巨大分子導入後の細胞内や細胞間での拡散の観察や機能性ナノ粒子の設計を通して、本技術の応用展開にも言及している。

本論文の結果は、高強度のフェムト秒レーザーパルスで植物細胞に集光することで細胞壁を有する植物組織においても細胞選択的な巨大分子導入が行える可能性を示しており、一細胞レベルでの植物生理機能の解明につながる革新的分子導入技術へ繋がることを期待される。よって審査員一同は本論文が博士(工学)の学位論文として価値あるものと認めた。