

植物細胞への遺伝子導入用カーボンナノチューブ材料開発

CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire Alberto Bianco,
名古屋市立大学大学院薬学研究科 水上 元
名古屋大学大学院工学研究科 馬場 嘉信



上左：CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire Alberto Bianco
上中央：名古屋市立大学大学院薬学研究科 水上 元
上右：名古屋大学大学院工学研究科 馬場 嘉信



1. はじめに

カーボンナノチューブ (CNT) は、動物細胞に対して、遺伝子や様々な化合物を導入するのに優れたナノ材料であり、Alberto Bianco 教授は、当該分野における最先端研究を進められている [1][2]。しかし、植物細胞は、動物細胞と同じ細胞膜のさらに外側にセルロースでできた細胞壁があるために、CNTのみならず他のナノ材料をもってしても遺伝子や化合物を導入するのが非常に困難であった。Bianco 教授と馬場は、日本学術振興会ストラスブルセンター主催の日仏学術交流シンポジウムにおいて招待講演を行い、お互いの研究内容について議論することにより、Bianco 教授と CNT による植物細胞への遺伝子導入の共同研究を開始することとした。さらに、水上教授は、植物細胞の薬理学的な研究を進めておられていたが、植物細胞内への遺伝子導入およびナノ材料の植物細胞内局在イメージングに関して課題をもたれており、その解決のために、三者における共同研究を開始した。本共同研究において、我々は、CNT に対して細胞壁を分解する酵素を固定化することで、細胞壁にナノサイズの細孔を形成することで、遺伝子をはじめとした様々な化合物を植物細胞に導入するという新しいアイデアのもとに、

CNT による植物細胞への遺伝子導入について研究を進めた [3][4][5][6][7][8][9]。

まず、マルチウォールカーボンナノチューブおよびシングルウォールカーボンナノチューブの植物細胞への導入と細胞内動態について基礎的な検討を行った。次に、細胞壁を分解する酵素を固定化した CNT を合成することに成功し、さらに、DNA を混合するだけで、疎水相互作用により CNT-DNA 会合体を形成することに成功した。この新規 CNT 材料により非常に効率的に植物細胞に対して遺伝子導入することに成功した。細胞への毒性や細胞増殖への影響を検討し、CNT 材料は、毒性が低く、細胞増殖にも影響を及ぼさないことを明らかにした。さらに、CNT による植物細胞への遺伝子導入の機構解明を行い、TEM、共焦点顕微鏡を駆使する共に、RICS (raster scan image correlation spectroscopy) 法を開発することで、CNT の細胞内の小器官である核等への精密な分布解析と遺伝子導入機構解明に成功するだけでなく、細胞内小器官へのターゲティングに成功した。

本稿においては、カーボンナノチューブの植物細胞への導入と細胞内動態計測および、植物細胞への遺伝子導入のための新たなカーボンナノチューブ材料の合成と植物細胞への遺伝子導入について述べる。



2. カーボンナノチューブ材料による植物細胞への遺伝子導入

Bianco 教授らは、これまでに、カーボンナノチューブを種々の分子で修飾することに成功し、細胞内に遺伝子や医薬品をはじめとした様々な分子を導入することに成功しており、カーボンナノチューブ材料を用いた drug delivery systems (DDS) および gene delivery systems (GDS) の領域を切り開いてきた [1][2]。しかし、Bianco 教授らがこれまでに扱ってきた動物細胞と異なり、植物細胞には、セルロース等で形成される細胞壁が細胞膜の外に存在しているために、これまでのカーボンナノチューブ材料では、遺伝子や医薬品を植物細胞に導入することができなかった。また、水上教授らは、ゲノム情報に基づく薬用資源植物の多様性の解析とその生薬評価への応用および植物二次代謝機能の遺伝子制御と有用物質生産の研究を進めていたが、植物細胞に対する効率の良い遺伝子導入材料に課題を有していた。

本研究においては、Bianco 教授および水上教授と共同研究を進めることにより、新規カーボンナノチューブ材料の合成による植物細胞への遺伝子導入について研究を進めた (図 1)。そのために、基礎研究として、細胞壁をあらかじめ酵素等により取り除いた植物細胞プロトプラストを用いることで、既存のカーボンナノチューブ材料を細胞内導入し、細胞内におけるカーボンナノチューブ材料の動態の精密計測を行った。次に、細胞壁を有する通常の植物細胞について、細胞壁に空いている 5nm 程度の細孔を通り抜ける直径のカーボンナノチューブ材料

を用いて細胞壁を通過して、植物細胞内へのカーボンナノチューブ材料の導入と細胞内の動態の精密計測を行った。さらに、より効率よく植物細胞に遺伝子を導入するために、カーボンナノチューブ材料に細胞壁を分解する酵素を融合することにより、細胞壁を有する植物細胞に対して、遺伝子および医薬品等を高効率で導入するための研究を行った。また、細胞内に導入したカーボンナノチューブ材料を細胞核やエンドソームなどの細胞小器官に精密に局在させることに成功し、さらには、細胞内からカーボンナノチューブ材料を排出することにも成功した。



3. マルチウォールカーボンナノチューブの細胞壁を持たない植物細胞プロトプラスト内導入

植物細胞の細胞壁を酵素で分解することで、植物細胞プロトプラストを調製した (図 2 左下)。さらに、マルチウォールカーボンナノチューブに蛍光試薬を結合させた分子を合成し、この植物細胞プロトプラストへの導入を行った。マルチウォールカーボンナノチューブ材料は、植物細胞プロトプラスト内に導入できることを確認した。さらに、共焦点顕微鏡により、植物細胞内のマルチウォールカーボンナノチューブ材料の動態を精密に計測した。その結果、植物細胞内に導入されたマルチウォールカーボンナノチューブ材料は、液胞 (vacuola) および細胞核内に導入されていることが確認された。しかし、図 2 に示すとおり、緑色の蛍光を発するマルチウォールカーボ

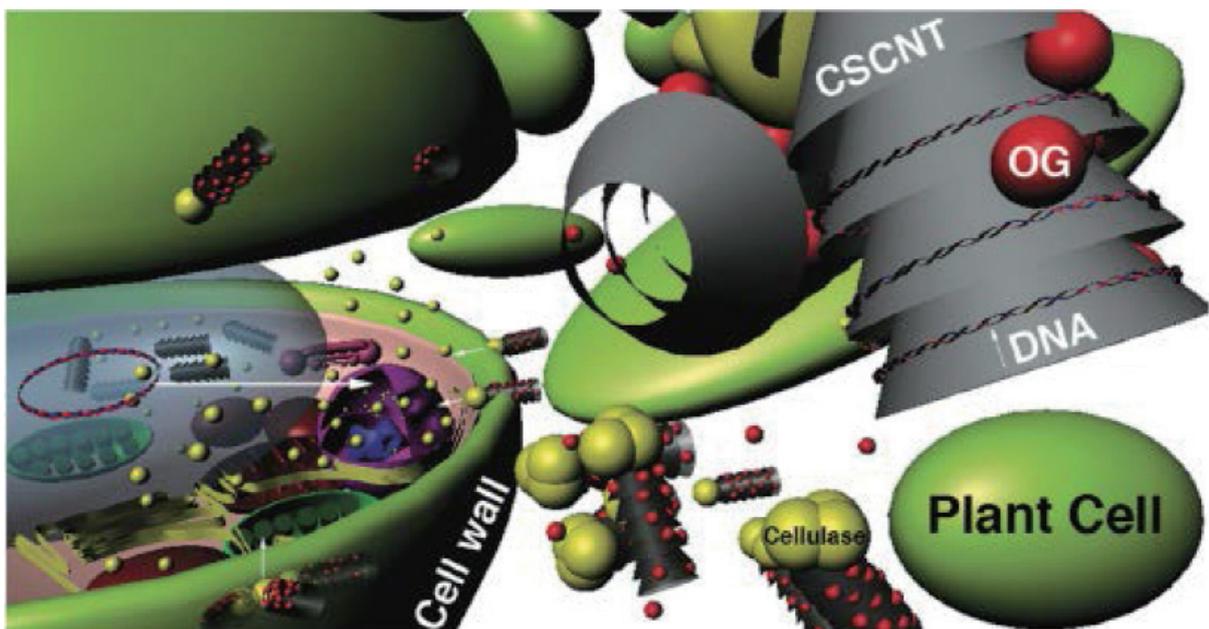


図 1 カーボンナノチューブによる植物細胞への遺伝子導入

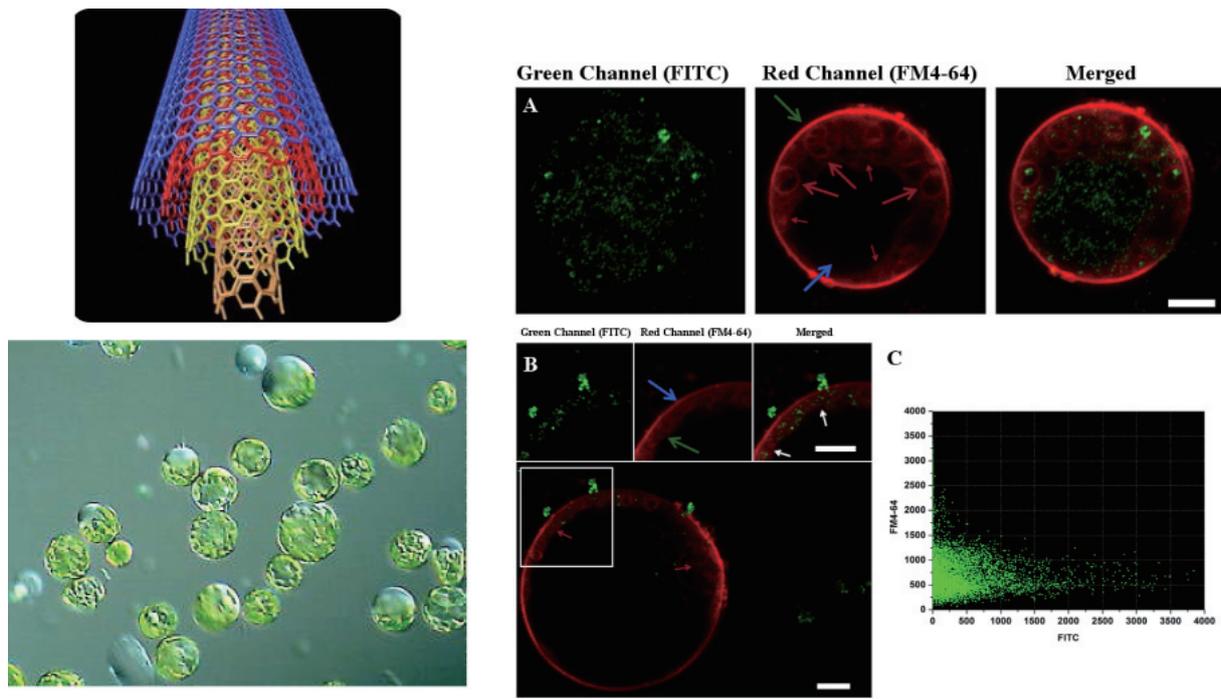


図2 マルチウォールカーボンナノチューブの植物細胞プロトプラスト内動態

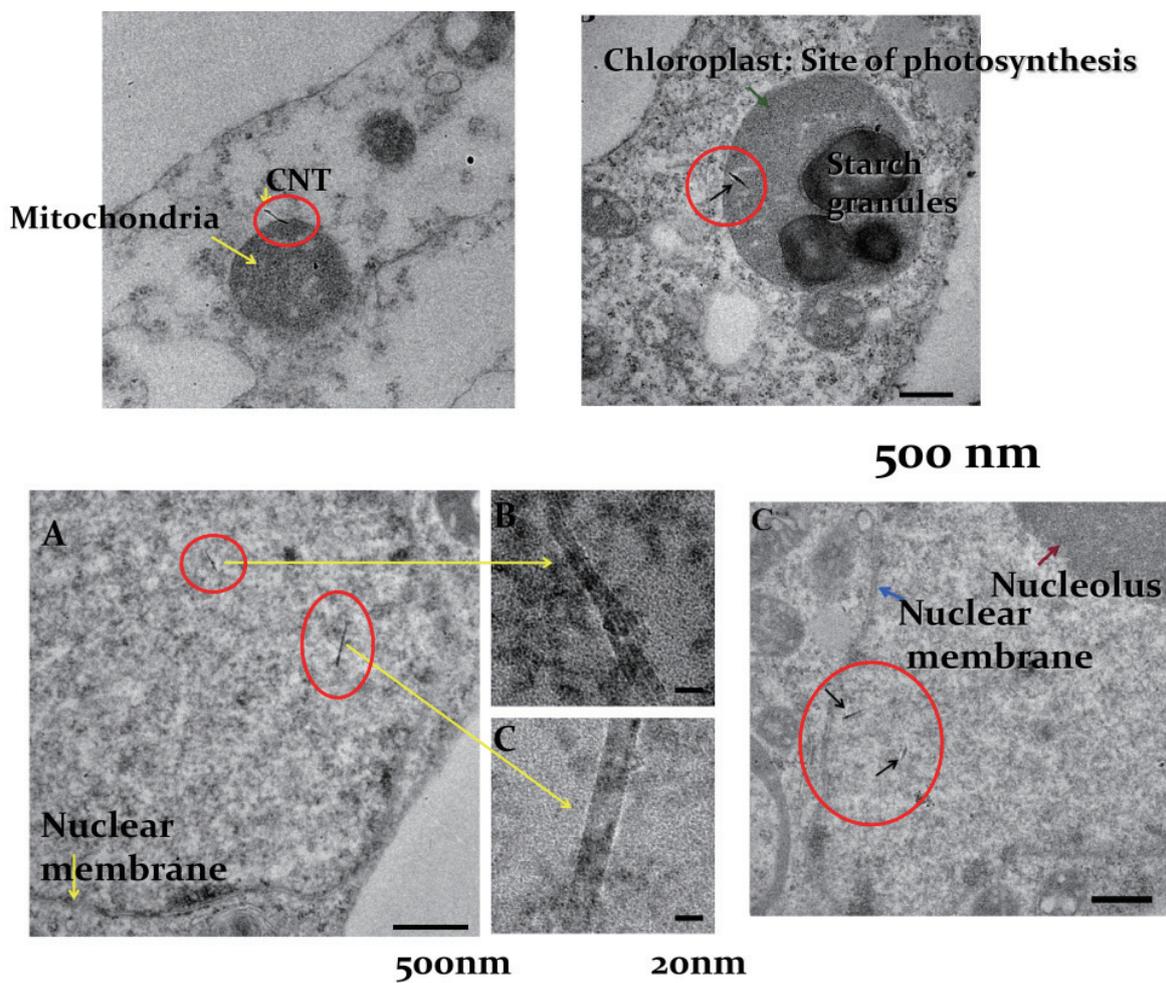


図3 マルチウォールカーボンナノチューブの植物細胞プロトプラスト内動態計測

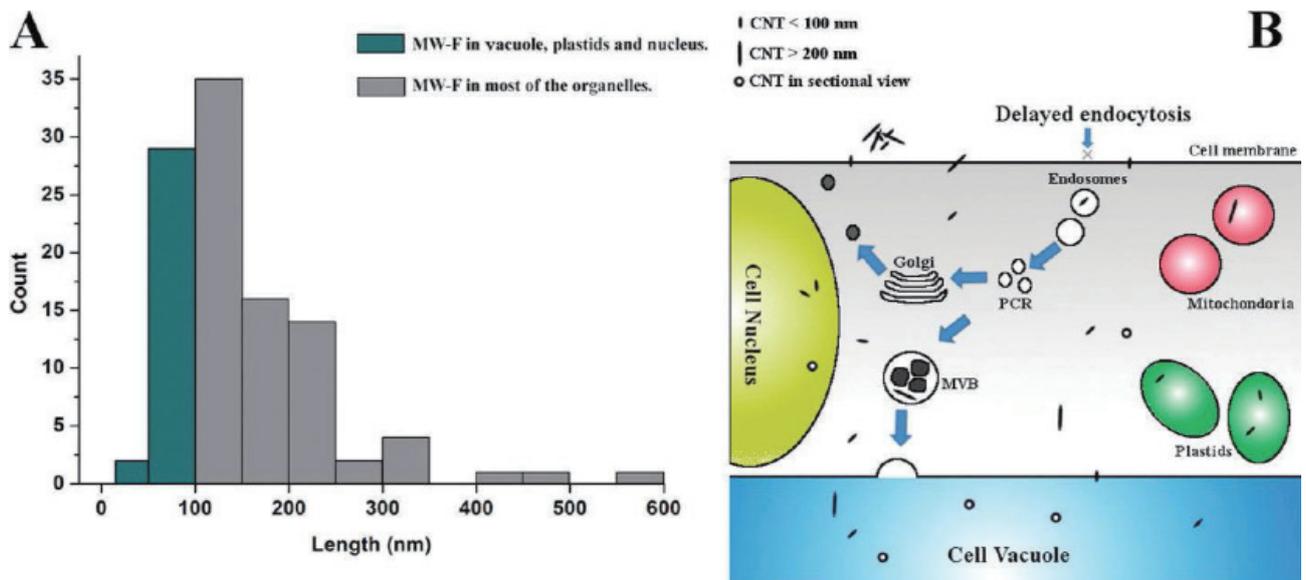


図4 マルチウォールカーボンナノチューブの植物細胞プロトプラスト内動態

ンナノチューブ材料は、赤い蛍光試薬で染色したエンドソーム内には、ほとんど局在していないことが明らかとなった。エンドソーム内にマルチウォールカーボンナノチューブ材料が局在してしまうと、マルチウォールカーボンナノチューブ材料は、細胞外に排出されるために、遺伝子導入等の妨げとなる。本研究による動態の精密計測により、マルチウォールカーボンナノチューブ材料は、効率よく遺伝子や医薬品を植物細胞プロトプラストに導入できることが明らかとなった。

マルチウォールカーボンナノチューブ材料の植物細胞プロトプラスト内の細胞内小器官への局在をより精密に計測するために、電子顕微鏡による計測を行った(図3)。電子顕微鏡による観察で明らかとなっており、マルチウォールカーボンナノチューブ材料は、ミトコンドリアや葉緑体および細胞核に局在していることが明らかとなった。さらに、植物細胞プロトプラストの細胞膜においては、マルチウォールカーボンナノチューブ材料は、つきささるように細胞内に導入されること、また、液胞には局在するが、エンドソームには分布しないことなどが、明らかとなり、これらは、共焦点顕微鏡の結果と一致していた。

図4は、長さの異なるマルチウォールカーボンナノチューブ材料の植物細胞プロトプラスト内の細胞小器官への局在を示している。図から明らかとなっており、50～100nmのマルチウォールカーボンナノチューブ材料は、細胞核に効率良く導入されるのに対して、100nmより長いマルチウォールカーボンナノチューブ材料は、細胞質および液胞へは局在するが、細胞核内には導入されにくいことが明らかとなった。

これらの結果から、植物細胞に遺伝子導入するには、50～100nm程度の長さのカーボンナノチューブ材料が適していることが明らかとなった。

4. シングルウォールカーボンナノチューブの細胞壁を持つ植物細胞内導入

マルチウォールカーボンナノチューブ材料は、植物細胞プロトプラスト内に遺伝子等を導入するのに適した材料であることが明らかとなった。しかし、植物細胞から細胞壁を除く酵素反応は、植物細胞そのものに大きなダメージを与えるために、細胞壁を有する植物細胞に遺伝子導入できる材料の開発が重要である。

細胞壁には、5nm程度の細孔が空いており、この細孔より小さい直径のカーボンナノチューブ材料を合成することにより、細胞壁を有する植物細胞に遺伝子を導入できると期待される。本研究では、シングルウォールカーボンナノチューブに蛍光分子を結合させた分子を合成し、細胞壁を有する植物細胞に導入されるかについて検討した。

図5に示すとおり、シングルウォールカーボンナノチューブ材料は、細胞壁を有する植物細胞内に導入されることを見いだした。さらに、植物細胞内の局在を精密に計測するために、電子顕微鏡、共焦点顕微鏡を用いた観察に加えて、RICS (raster scan image correlation spectroscopy) 法により、カーボンナノチューブ材料の細胞内局在の精密計測・イメージングに成功した(図6)。

5. カーボンナノチューブの植物細胞内動態の精密計測と動態制御

これらの方法を駆使することで、細胞壁を有する植物細胞に導入されたカーボンナノチューブ材料が、液胞、ゴルジ体および細胞核に局在することを明らかにした。

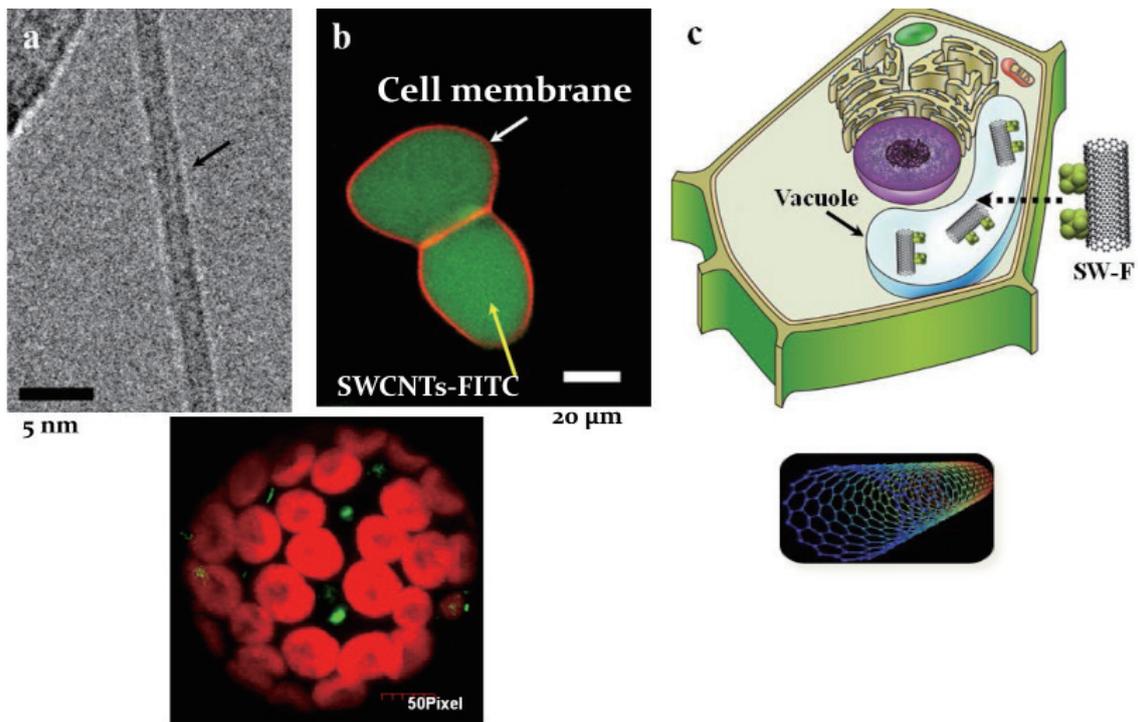


図5 シングルウォールカーボンナノチューブの植物細胞内導入

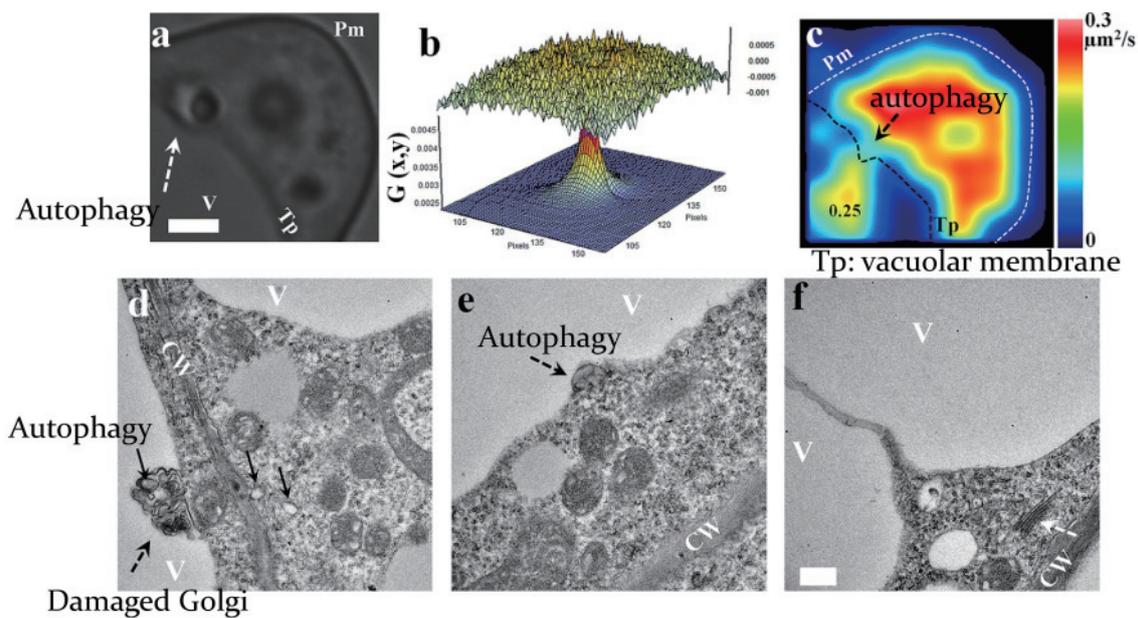


図6 カーボンナノチューブの植物細胞内動態の精密計測

さらに、植物細胞内に導入したカーボンナノチューブ材料が液胞に導入されるのを阻害する化合物で処理することで、カーボンナノチューブ材料が液胞に導入されることを防ぐことに成功した。さらに、通常の状態では、カーボンナノチューブ材料はエンドソームには局在しないが、植物細胞の培養液の組成を変化させることにより、液胞内のカーボンナノチューブ材料をエンドソーム内に移動させることに成功した (図7)。また、エンドソームに移

動したカーボンナノチューブ材料が細胞外に排出されることを明らかにした。

この研究により、合成したカーボンナノチューブ材料を、植物細胞に導入し、細胞質あるいは細胞核に局在させることにより遺伝子を発現させ、反応が終了したら、カーボンナノチューブ材料を植物細胞外に排出することで、植物細胞への毒性を最低限に保つことができる (図8)。

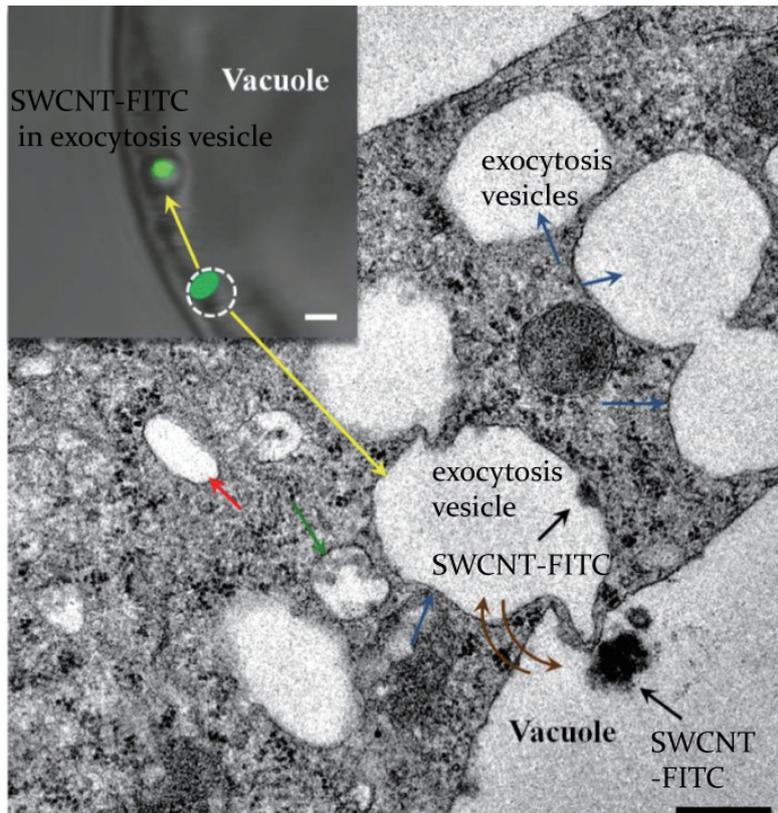


図7 シングルウォールカーボンナノチューブの植物細胞内精密動態制御

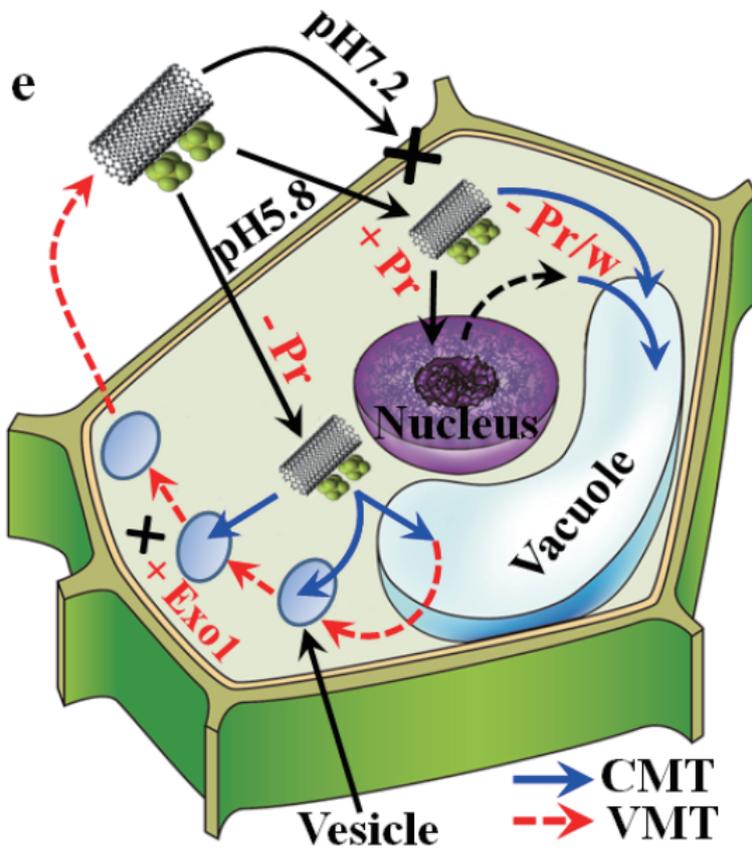


図8 シングルウォールカーボンナノチューブの植物細胞内精密動態制御



7. まとめ

本研究では、新規カーボンナノチューブ材料の合成と植物細胞内の動態・局在の精密計測により、植物細胞に遺伝子や医薬品を導入できる新規材料の開発を行った。本研究成果は、今後、植物細胞の高機能化などの研究に応用されることが期待される。

本研究は、文部科学省・先端研究施設共用イノベーション創出事業・名古屋大学中部地区ナノテク総合支援および文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業・名古屋大学分子・物質合成プラットフォームの支援を受けて実施しました。



参考文献

- [1] K. Kostarelos, Lara Lacerda, Giorgia Pastorin, Wei Wu, Sébastien Wieckowski, Jacqueline Luangsivilay, Sylvie Godefroy, Davide Pantarotto, Jean-Paul Briand, Sylviane Muller, Maurizio Prato, Alberto Bianco, Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type, *Nature Nanotechnology* 2007, 2, 108-113.
- [2] Dimitrios Tasis, Nikos Tagmatarchis, Alberto Bianco, Maurizio Prato, Chemistry of Carbon Nanotubes, *Chem. Rev.*, 2006, 106, 1105-1136.
- [3] Maged F. Serag, Noritada Kaji, Claire Gaillard, Yukihiro Okamoto, Kazuyoshi Terasaka, Mohammad Jabasini, Manabu Tokeshi, Hajime Mizukami, Alberto Bianco and Yoshinobu Baba, Trafficking and sub-cellular localization of multi-walled carbon nanotubes in plant cells, *ACS Nano*, 2011, 5, 493-499.
- [4] Maged F. Serag, Noritada Kaji, Enrica Venturelli, Yukihiro Okamoto, Kazuyoshi Terasaka, Mohammad Jabasini, Manabu Tokeshi, Hajime Mizukami, Alberto Bianco, and Yoshinobu Baba, Functional Platform for Controlled Subcellular Distribution of Carbon Nanotubes, *ACS Nano*, 2011, 5, 9264-9270.
- [5] Maged F. Serag, Kevin Braeckmans, Satoshi Habuchi, Noritada Kaji, Alberto Bianco and Yoshinobu Baba, Spatiotemporal Visualization of Subcellular Dynamics of Carbon Nanotubes, *Nano Letters*, 2012, 12, 6145-6151.
- [6] Maged F. Serag, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, and Yoshinobu Baba, Introducing Carbon Nanotubes into Living Walled Plant Cells through Cellulase-Induced Nanoholes, *RSC Advances*, 2012, 2, 398-400.
- [7] Maged Fouad Serag, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Alberto Bianco and Yoshinobu Baba, The plant cell uses carbon nanotubes to build tracheary elements, *Integrative Biology*, 2012. 4, 127-131.
- [8] Maged F. Serag, Noritada Kaji, Satoshi Habuchi, Alberto Bianco and Yoshinobu Baba, Nanobiotechnology Meets Plant Cell Biology: Carbon Nanotubes as Organelles Targeting Nanocarriers, *RSC Advances*, 2003, in press.
- [9] 特願 2007-163867, PCT/JP2008/060689, 特許第 4469959 号, US 61/470,173

(名古屋大学大学院工学研究科 馬場 嘉信)



【お問い合わせ】

分子・物質合成プラットフォーム

名古屋大学

☎ 052-789-4609

E-mail nano-platform@apchem.nagoya-u.ac.jp

ホームページ

<http://nano-platform.apchem.nagoya-u.ac.jp/>