

公益財団法人 立松財団 御中

様式 2021A1,A2,B

2024年8月6日

所属:豊橋技術科学大学

氏名:栗田 弘史



## 2022年度助成

研究経過・**終了**報告書

※ゴシック文字で記入下さい。

研究テーマ	電気穿孔による細胞への外来分子導入機序の究明と性能向上
研究の結果	<p>本研究課題は、遺伝子や薬剤などの外来物質を細胞に導入する物理的手法のひとつである電気穿孔(エレクトロポレーション:EP)に関連するものである。細胞に対し数kV/cmのパルス電場を印加することで生じる細胞膜穿孔が重要なプロセスであり、現在までに実験・理論の両面から研究がなされてきた。研究代表者は、独自に開発したEP技術による外来遺伝子導入機構を解析する過程で、低導電率緩衝液を使用してEPを行った際に、細胞生存率の低下が顕著に生じるのは、細胞懸濁液にDNAを含んだ場合のみであり、DNA非共存下では細胞生存率が低下しないことを発見した。本研究課題は、この現象の詳細な解析を目的としている。DNA共存下かつ低導電率緩衝液使用時に生じる細胞生存率の低下について、DNA共存下で顕著な細胞膜の破壊が生じ、細胞生存率が大きく低下していると考え、この仮説を実証するために、細胞内分子の細胞外への漏出を解析した。具体的には、生細胞蛍光染色試薬であるカルセイン(分子量623)をあらかじめ細胞に負荷し、電圧印加前後の蛍光強度変化をフローサイトメーターで測定することで解析した。その結果、プラスミドDNAの有無やDNA量がカルセイン漏出量に影響することを明らかとなり、電圧印加直後と20分経過後のフローサイトメトリー計測の結果から細胞内分子の漏出が電圧印加後も継続していることが示唆された。また、DNAの形状(環状または開環状)とサイズの影響も同様に解析し、環状DNAよりも直鎖状DNAを用いた場合に膜損傷が顕著に生じた一方、サイズ依存性は認められなかった。これらの成果は論文としてまとめたほか、学会発表を行っている。</p>
研究発表 (実績)	<p>原著論文(査読有)</p> <ol style="list-style-type: none"><li>Y. Tsurusaki, Y. Watanabe, R. Numano, T. Shibata, and H. Kurita, "Influence of DNA characteristics on cell membrane damage stimulated by electrical short-circuiting via a low-conductive aqueous droplet in dielectric oil," <i>PLOS ONE</i>, Vol. 18, e0285444 (16 pp.), May 2023.</li></ol> <p>国内学会発表(○印は発表者を示す)</p> <ol style="list-style-type: none"><li>○津留崎 佳乃, 渡邊 優喜, 沼野 利佳, 栗田 弘史, "電気穿孔法を用いた細胞膜への細胞形成におけるDNAの影響", 第84回応用物理学会秋季学術講演会, 21p-A601-5(口頭発表)(熊本城ホールほか3会場, 熊本市)2023年9月21日</li><li>○津留崎 佳乃, 渡邊 優喜, 沼野 利佳, 栗田 弘史, "油中液滴への高電圧印加による電気穿孔における細胞膜損傷の解析", 第47回静電気学会全国大会講演論文集, pp. 165-166(口頭発表)(山形テルサ, 山形市)2023年9月12日</li><li>○渡邊 優喜, 沼野 利佳, 栗田 弘史, "油中液滴の静電的操作による電気穿孔への2価カチオンの影響", 第45回日本分子生物学会年会, 1P-453(ポスター発表)(幕張メッセ, 千葉市)2022年11月30日</li><li>○津留崎 佳乃, 渡邊 優喜, 沼野 利佳, 栗田 弘史, "静電界と油中液滴を用いた遺伝子導入における液滴導電率の影響", 第45回日本分子生物学会年会, 1P-454(ポスター発表)(幕張メッセ, 千葉市)2022年11月30日</li></ol> <p style="text-align: right;">他6件</p>

提出期限:研究期間終了後、すみやかに助成金の「必要経費使途明細書」「領収書」と合わせて提出下さい。  
年度をまたぐ場合は毎年3月末日までに、途中経過をご記入の上、報告願います。