

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22364

研究課題名(和文)金ナノ粒子とレーザー光を利用した受精卵の分化制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Differentiation Control Mechanism of Fertilized Eggs Using Gold Nanoparticles and Laser Light

研究代表者

南 直治郎(Minami, Naojiro)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：30212236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発生途中のマウス受精卵の1割球における遺伝子発現を制御する実験系を開発する目的で、受精卵に導入した金ナノ粒子にレーザーを当てて特定の割球内でヒートショックを誘導し、HSP70プロモーターの下流の遺伝子を強制発現させる系を考案した。その結果、高温条件下でプロモーターが機能することと、受精卵に導入した金ナノ粒子にレーザーを照射することで、割球を加熱できることが確認できた。また、HSPプロモーターを導入した受精卵の作出効率が10-30%と低かったことからノックインマウス系統の樹立を試みたが、目的のノックインマウスを得ることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精卵における発生初期の細胞分化の研究は、細胞がどのような過程をたどって個体へと発生していくかの第一歩を明らかにするものであり、どのような遺伝子発現により細胞の分化が始まるかは明らかになっていない。本研究で目的とした、各割球における遺伝子発現の差を人的に誘導することが可能になれば、割球の分化開始シグナルを同定することができ、これまで不明であった全能性から多能性への移行メカニズムの解明や正常な発生に必要な遺伝子発現ネットワークを理解することができ、将来的には生殖補助医療などの治療に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to develop an experimental system to control gene expression in one blastomere of developing mouse fertilized eggs, we devised a system to induce heat shock in specific blastomeres by irradiating gold nanoparticles introduced into fertilized eggs with a laser, and to forcibly express genes downstream of the HSP70 promoter. As a result, it was confirmed that the promoter functions under high temperature conditions and that blastomere can be heated by irradiating a laser on gold nanoparticles introduced into fertilized eggs. Since the production efficiency of fertilized eggs introduced with the HSP promoter was as low as 10-30%, the establishment of a knock-in mouse line was tried, but the target knock-in mouse could not be obtained.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精卵 遺伝子発現 金ナノ粒子 ヒートショック

## 1. 研究開始当初の背景

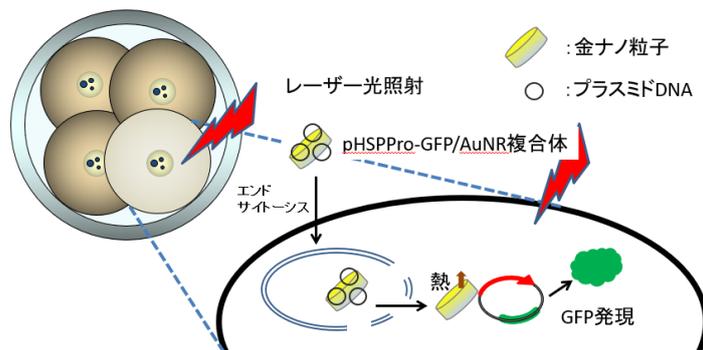
哺乳類の受精卵では、1細胞期から2細胞期、2細胞期から4細胞期、4細胞期から8細胞期となる3回の分裂は空間的に均等に起こる。マウスの受精卵では2細胞期までの割球は単独でも個体に発生する能力を有しており、「全能性」を持っていると言われている。ところが、4細胞期に分裂した受精卵の単一の割球はこの全能性を喪失している。4細胞期以降の発生では、それぞれの割球が将来胎仔になる内部細胞塊と将来胎盤になる栄養膜細胞へと分化し、受精後4.5日になると子宮に着床する。細胞の遺伝子発現とそれに伴う分化は、一般的にDNAのメチル化やヒストンタンパク質の化学修飾などのエピジェネティックな修飾の変化に制御されている。申請者らは、受精直後の胚においてヒストンH3の4番目のリジン（H3K4）のメチル化を認識するクロマチンリモデリング因子（クロマチンの構造を変化させ、遺伝子発現を制御する因子）CHD1が、発生の早い段階で受精卵特異的転写因子である*Hmgpi*の発現を介して、胎子への分化に関わる*Oct4*や*Nanog*と着床時の胎盤誘導に機能する*Cdx2*の発現を調節し、着床に至るまでの発生を制御していることが明らかにした（Suzukiら、2015）。このことは、割球の分化制御が発生の早い段階で始まっていることを示唆するものである。また、Tabanskyらは（2013）は4細胞期の割球には胎子に寄与する傾向が強い割球と胎盤に寄与する傾向が強い割球がすでに存在することを示唆している。これらの研究の知見から、4細胞期の割球におけるエピジェネティックな修飾を制御することで、細胞の運命決定である分化を制御できるのではないかという構想に至った。

## 2. 研究の目的

哺乳動物の初期発生は受精によって開始される。受精前の精子と卵子は遺伝子発現を完全に停止した終末分化細胞であり、受精後卵母細胞に蓄えられた母性因子によって遺伝子発現を再開し、発生を開始する。マウスにおいては数回の細胞分裂を経て、受精後4.5日ほどで子宮に着床する。最初の分裂後の2細胞期の各割球は単独で個体への発生能力（全能性）を持っているが、4細胞期の各割球は単独では個体に発生することが出来ず、この時期の割球はすでに分化が始まっていると考えられている（Rossant, 1976）。着床前の受精卵は、胎子を形成する内部細胞塊と胎盤を形成する栄養外胚葉という細胞群からなっており、互いにその後の発生における役割を分担している。2細胞期に全能性を持った割球が、どのような過程を経て発生における役割を分担するように運命づけられるのかは、ほとんどわかっていない。そこで本研究では、割球間で遺伝子発現を変化させることで、割球のその後の発生運命がどのような影響を受けるかを検討できる実験系の確立を目的とした。通常、受精卵の割球間で遺伝子発現を制御する際は単一割球への顕微注入法が用いられるが、4細胞期の割球間の違いには極体との位置関係が重要であることが報告されており（Torres-Padilla, 2007）、顕微注入によって極体との位置関係が変化してしまうリスクが生じる。本研究では、1細胞期受精卵に近赤外線レーザーで加熱される金粒子を導入し、4細胞期の単一割球にレーザーを当てることで非侵襲的に遺伝子発現を制御できる実験系の確立を試みた。

### 3. 研究の方法

本研究ではヒートショックタンパク質プロモーターの下流に連結した EGFP とレーザー光によって熱を発することができる金ナノ粒子を受精卵に導入することによって、レーザー光を照射した割球のみで遺伝子発現の制御ができる実験系の樹立を試みた。



#### 【研究 1】 近赤外線レーザーによる金粒子導入受精卵の加熱

PVP-GNS を顕微注入した受精卵をオイル被覆した培養培地の中に配置し、5%の CO<sub>2</sub> 濃度を維持した恒温装置の中で 800nm の近赤外線レーザーを照射する実験を行った。

#### 【研究 2】 金粒子のマウス受精卵への導入と発生率への影響

金ナノ粒子の直径は 30 nm ほどであり、受精卵の周りに存在する糖タンパク質の層である透明帯を通過すると期待されたため、カチオン性脂質である 1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DOTAP) でコーティングし、Rhodamine-PE で蛍光標識した金ナノ粒子 (DOTAP-AuNR) (Nakatsuji ら、2015、2017) を ICR マウスの 1 細胞期胚を培養している培地に添加することで、トランスフェクションが可能か検討した。また、DOTAP-AuNR 及びポリビニルピロリドン (PVP) でコーティングされた市販の金ナノシェル (PVP-GNS) を 1 細胞期胚の細胞質に顕微注入し、胚盤胞期までの形態観察を行った。

#### 【研究 3】 HSP プロモーターカセットの受精卵への導入

ヒト由来のヒートショックタンパク質である HSPA6 のプロモーター配列の下流に GFP を連結した配列 (HSPPro-GFP) を ROSA26 領域へ挿入するため、ROSA26 配列のホモロジーアームを持つドナープラスミド、Cas9 およびガイド RNA と共に ICR マウスの 1 細胞期胚の前核に顕微注入し、4 細胞期で 43°C20 分の熱処理を施した後に GFP の蛍光を確認した。また、HSPPro-GFP 配列のノックインマウス系統を樹立するため、C57/B6 マウスの 1 細胞期胚前核に顕微注入を行い、偽妊娠雌マウスへ卵管移植を行った。

### 4. 研究の成果

#### 【研究 1】

DOTAP-AuNR を培養培地に添加したが、Rhodamine 蛍光の局在から DOTAP-AuNR は透明帯を通過できなかったことが示唆された。また、顕微注入によって DOTAP-AuNR の導入を試みたが、顕微注入操作の間にアグリゲーションを起こし、粒子が針に張り付いてしまうことが確認さ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

れた。そのため非イオン性である PVP でコーティングされた PVP-GNS を用い、1 細胞期胚の細胞質に顕微注入したところ、胚盤胞までの発生に影響は見られなかった。

### 【研究 2】

PVP-GNS を顕微注入した受精卵ではレーザーを照射することで細胞内の水分が蒸発したことが確認できた(図 2)。これらの結果から、PVP-GNS を導入した受精卵において近赤外レーザーによって割球特異的な遺伝子発現制御が可能であることが示された。

共焦点レーザー顕微鏡で5%レーザー(800nm)で5秒5回加熱

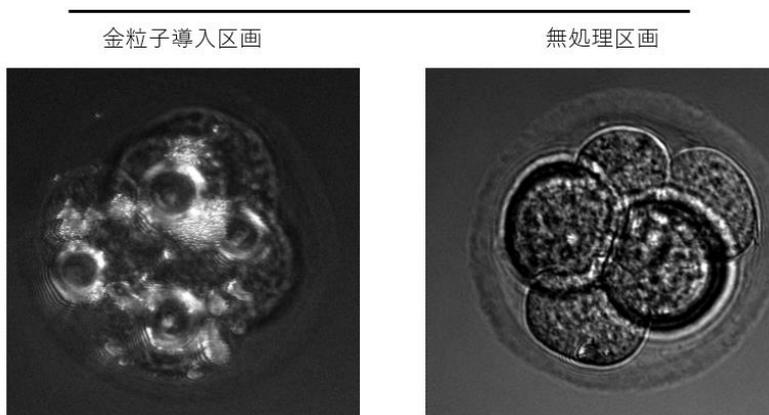


図 2. レーザー光照射による割球の発熱

### 【研究 3】

HSPPro-EGFP、Cas9、および gRNA を顕微注入した胚では、熱処理後に GFP 蛍光を確認することができ、遺伝子型解析により計測したノックイン効率は先行研究と同程度の 20-30%であった(図 1)。近赤外線レーザーによる金粒子の加熱実験を効率よく行うため、ノックインマウス系統の樹立を試みたが、生まれた 19 匹のマウスのうち HSPPro-EGFP を持つ個体は 1 匹のみだった(約 5%)。また遺伝子型解析により、生まれた個体では目的配列が ROSA26 領域に挿入されていないことがわかり、交配によって得られた受精卵に熱処理を施しても GFP 蛍光は確認されなかった。ノックインマウスの作出効率が低かった原因として、ヒートショックタンパク質のプロモーターは熱刺激がない状態では遺伝子発現が抑制されるため (Leung, 1990)、ノックインによってクロマチン構造を変化させてしまった可能性がある。現在は内在性ヒートショックタンパク質の下流に GFP を挿入したノックインマウスの作出に着手している。

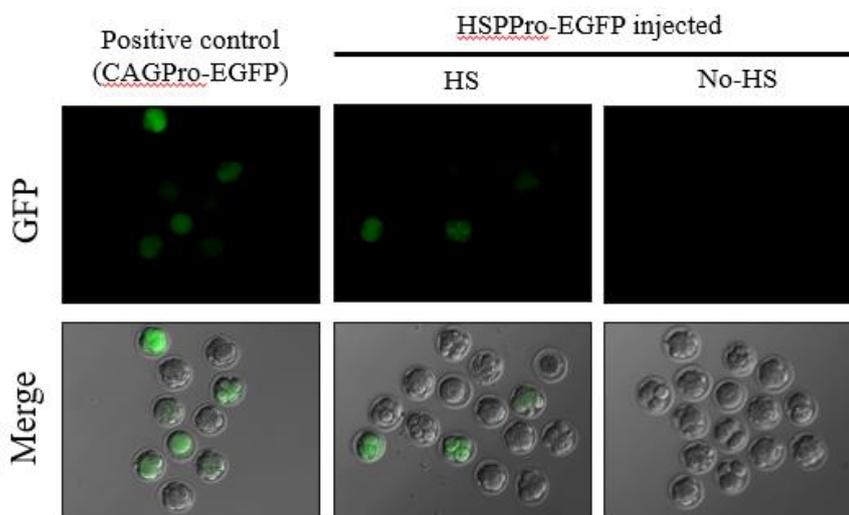


図 3. 熱処理による HSPPro-EGFP の活性化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

<引用文献>

**Leung TK, Rajendran MY, Monfries C, Hall C, Lim L** (1990) The human heat-shock protein family. Expression of a novel heat-inducible HSP70 (HSP70B') and isolation of its cDNA and genomic DNA. *Biochem J*, 267 (1): 125-132. Doi:10.1042/bj2670125.

**Nakatsuji H, Numata T, Morone N, Kaneko S, Mori Y, Imahori H, Murakami T** (2015) Thermosensitive Ion Channel Activation in Single Neuronal Cells by Using Surface-Engineered Plasmonic Nanoparticles. *Angew. Chem. Int.*, 28;54(40):11725-9. doi: 10.1002/anie.201505534.

**Nakatsuji H, Kawabata Galbraith K, Kurisu J, Imahori H, Murakami T** (2017) Surface chemistry for cytosolic gene delivery and photothermal transgene expression by gold nanorods. *Sci. Rep.*, 7(1):4694. doi: 10.1038/s41598-017-04912-1.

**Rossant J** (1976) Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *Development*, 36:283-290. doi: 10.1242/dev.36.2.283

**Suzuki S, Nozawa Y, T&sukamoto S, Kaneko T, Manabe I, Imai H, Minami N** (2015) CHD1 acts via the *Hmgpi* pathway to regulate mouse early embryogenesis. *Development*, 142(13):2375-84. doi: 10.1242/dev.120493.

**Tabansky et al.**, (2013) Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres. *Curr. Biol.*, 23(1):21-31. doi: 10.1016/j.cub.2012.10.054.

**Torres-Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M** (2007) Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature*, 445(7124):214-8. doi: 10.1038/nature05458.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------