

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650093

研究課題名（和文）フェムト秒レーザーによる動物胚の単一細胞へのバイオナノ粒子の物理的導入方法の開発

研究課題名（英文）Femtosecond laser-introduction of bionanomolecules in targeted single cells of living vertebrate embryos

研究代表者

田中 幹子（TANAKA MIKIKO）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号：40376950

研究成果の概要（和文）：

本研究では、高出力フェムト秒レーザーを用いて、脊椎動物胚体の単一細胞に遺伝子やナノ粒子を物理的に導入する方法の確立を目指した。まず、我々は、高出力フェムト秒レーザーを用いたフォトポレーション技術により、ゼブラフィッシュ胚やニワトリ胚の単一細胞にデキストラン、モルフォリノオリゴヌクレオチドやDNAプラスミドを高効率で導入できる手法を確立した。また、本手法を用いて、ニワトリ胚の単一神経細胞にも遺伝子発現ベクターを導入できる系を確立した。さらに、我々は、本手法により、ゼブラフィッシュ胚の単一神経細胞に mRNA を導入することで、単一神経細胞の運命を操作することに成功した。本研究により、高出力フェムト秒レーザーによるフォトポレーション技術が、脊椎動物胚の単一細胞に任意のバイオナノ粒子を導入し、単一細胞の機能操作を可能にする新しい技術として確立された。

研究成果の概要（英文）：

Introduction of biomolecules into cells in living animals is one of the most important techniques in molecular and developmental biology research, and has potentially broad biomedical implications. Here we report that biomolecules can be introduced into single cells in living vertebrate embryos by photoporation using a femtosecond laser amplifier with a high pulse energy and a low repetition rate. First, we confirmed the efficiency of this photoporation technique by introducing dextran, morpholino oligonucleotides, or DNA plasmids into targeted single cells of zebrafish, chick, and shark embryos. Second, we demonstrated that femtosecond laser irradiation efficiently delivered DNA plasmids into single neurons of chick embryos. Finally, we successfully manipulated the fate of single neurons in zebrafish embryos by delivering mRNA. Our observations suggest that photoporation using a femtosecond laser with a high pulse energy and low repetition rate offers a novel way to manipulate the function(s) of individual cells in a wide range of vertebrate embryos by introduction of selected biomolecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：発生工学、技術開発

1. 研究開始当初の背景

実験動物胚を用いた遺伝子操作技術としては、ウイルスを用いる方法、化学的方法、物理的導入法等が導入されている。物理的導入方法としては超音波、遺伝子銃、高電圧パルスを用いる方法が開発されているが、導入効率・選択効率・細胞の生存率のすべてを高く保つ方法は未だ確立されていなかった。特に、胚体の単一細胞レベルを対象とした遺伝子操作は導入効率が大きな課題となっていた。また、疾患モデル動物胚を用いた実験系では、細胞レベルのドラッグデリバリー等のナノ粒子の導入技術が必要とされる局面が多いが、研究開始当初は、遺伝子銃による不特定多数の細胞群への低効率な導入法しか確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、高出力フェムト秒レーザーを用いて、脊椎動物胚体の単一細胞に遺伝子やナノ粒子を物理的に導入する方法を確立することを目標として研究を行った。具体的には、脊椎動物のモデル実験動物として代表的なゼブラフィッシュ胚やニワトリ胚の特定の単一細胞に遺伝子操作を目的としたアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドや遺伝子発現ベクターを高効率に導入する技術の確立を目指した。さらに、将来的に胚体の特定の細胞へのドラッグデリバリー技術を確認することを視野に入れ、比較的分子量の大きいデキストランを脊椎動物胚体の単一細胞に導入する技術の確立も試みた。

3. 研究の方法

高出力フェムト秒レーザー装置

高出力フェムト秒チタンサファイアレーザーを倒立顕微鏡に導き、10 倍の対物レンズ（開口数 0.25）を用いて、顕微鏡の結像面に集光し、1 kHz の周期でパルスを照射した。

アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド、デキストラン、プラスミド、mRNA

Fluorescein-tagged standard control morpholino antisense oligonucleotides (FITC-MOs; Gene Tools) は最終濃度 5 ng/ml になるように用意した。蛍光ラベルされた各種デキストラン(10,000MW)は、Invitrogen より購入した。pCAGGS-EGFP と pCAGGS-RFP

は最終濃度 10 mg/ml になるように用意した。Capped mRNA は直線化した pCSEGF、または pCSdnPKA を鋳型にして、合成した。

ゼブラフィッシュ胚の単一細胞へのフォトポレーション

麻酔したゼブラフィッシュ胚は、3 % メチルセルロースに埋め込んだ。単一上皮細胞を標的とする場合は、コリオンと胚の間に 5 ng/ml MOs や 5% 蛍光デキストランをインジェクションし、標的細胞にレーザーの焦点をあわせた。単一神経細胞を標的とする場合は、400 ng/ μ l *EGFP* mRNA もしくは *dnPKA* mRNA in 2.5% 蛍光デキストランをコリオンと胚の間にインジェクションし、neural keel の標的神経細胞にレーザーの焦点をあわせた。レーザー照射後は、胚のコリオンを剥き、洗浄した。

ニワトリ胚の単一細胞へのフォトポレーション

ステージ 12-16 のニワトリ胚は New culture 法で培養した。単一上皮細胞を標的とする場合は、5% 蛍光デキストランや 10 mg/ml pCAGGS-EGFP を vitelline membrane と epiblast ectoderm の間にインジェクションし、標的細胞にレーザーの焦点をあわせた。単一神経細胞を標的とする場合は、10 mg/ml pCAGGS-RFP を神経管内にインジェクションし、標的神経細胞にレーザーの焦点をあわせた。レーザー照射後、胚は新しい New culture プレートで培養した。

4. 研究成果

まず、ゼブラフィッシュ胚の単一上皮細胞に FITC-MOs を導入することを試みた。28 h post fertilization (hpf) 胚のコリオン内に FITC-MOs を導入し、フェムト秒レーザーパルス (120 fs, 800 nm, 50 pulses at 1kHz) を照射した。200 nJ/pulse で照射したところ、単一上皮細胞で FITC 蛍光が観察される割合は、22% であった (2/9)。一方、300 nJ/pulse や 400 nJ/pulse で照射した場合には、それぞれ 52.6%、68.4% であった (10/19、13/19)。800 nJ/pulse で照射すると、単一上皮細胞で蛍光が観察されることはなく、照射領域付近での細胞の飛散が確認された (6/7; 図 1)。これらのことから、28 hpf ゼブラフィッシュ胚の単一上皮細胞に FITC-MOs を導入するには、300-400 nJ/pulse

のレーザーパルスが最適であることがわかった。

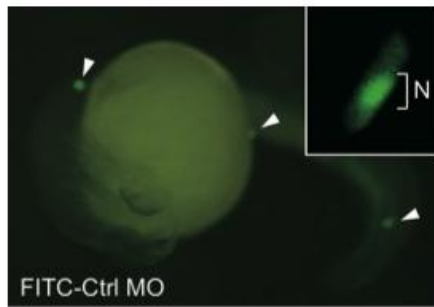


図1 FITC-Ctrl MOを単一細胞に導入された 28 hpf ゼブラフィッシュ胚。(Hosokawa et al., 2011 より改変)

次に、比較的分子量の大きい 10,000 Da のデキストランを 25-26 hpf のゼブラフィッシュ胚の単一細胞に導入することを試みた。コリオン内にデキストランをインジェクション後、400 nJ のレーザーパルスで照射した場合には 76.5% の高効率で単一の細胞にデキストランが導入できた (12/17)。一方、800 nJ のパルスで照射すると、単一細胞への導入はおこらず、全てのケースで細胞の飛散が確認された (11/11)。また、400 nJ/pulse で照射 24 時間後に胚を観察すると、分裂中の細胞で蛍光が観察された。

これらのことから、我々のフォトポレーション技術により、ゼブラフィッシュ胚の単一細胞に 10,000 Da までの分子量の分子であれば、導入が可能であることが明らかとなった。

次に、我々はフェムト秒レーザーによるフォトポレーションでニワトリ胚の単一細胞に分子を導入することを試みた。ステージ 15 のニワトリ胚を New culture 法で培養し、10,000 Da のデキストランを vitelline membrane と ectoderm の間にインジェクションし、400 nJ のパルスでレーザーを照射した。その結果、単一の上皮細胞にデキストランが導入される確率は、71%であった (32/45)。

さらに、我々は DNA をニワトリ胚の単一細胞に導入することを試みた。デキストランと pCAGGS-EGFP プラスミドの混合液をステージ 14-16 のニワトリ胚に上述の方法でインジェクションし、400nJ のパルスで照射した。レーザー照射の 15-24 時間後に観察したところ、デキストランの赤色蛍光と EGFP 蛍光が単一上皮細胞、もしくは分裂中の単一上皮細胞の 50%で観察された (5/10)。

次に、ニワトリ胚の単一神経細胞への DNA の導入を試みました。pCAGGS-RFP プラスミドをステージ 12-14 のニワトリ胚の神経管に導入し、400 nJ のレーザーで単一神経細胞を照射しました。照射 24 時間後に観察すると、RFP 蛍光が単一神経細胞で観察できました (図 2)。

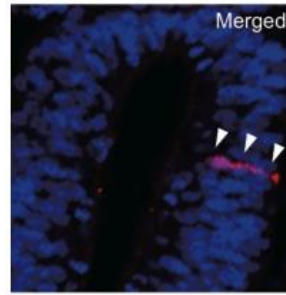


図2 pCAGGS-RFP (赤)を導入されたニワトリ胚の単一神経細胞 (矢尻)。青は神経管の細胞核 (DAPI染色)。(Hosokawa et al., 2011より改変)

さらに我々は、このフォトポレーション技術を用いて、胚の単一細胞の運命を操作することを試みた。Protein kinase A (PKA) は中枢神経系でヘッジホッグ経路に関わっており、ドミナントネガティブ型 PKA mRNA (dnPKA) を 1 細胞期の胚に導入すると、神経底のマーカー *spondin1b* が神経管の背側に異所的に発現することが知られている (Ungar and Moon, 1996)。そこで、我々は、16 hpf のゼブラフィッシュ胚のコリオン内に dnPKA mRNA、もしくはコントロールとして EGFP mRNA を導入し、神経管の背側の単一神経細胞に 400 nJ/pulse のレーザーを照射し

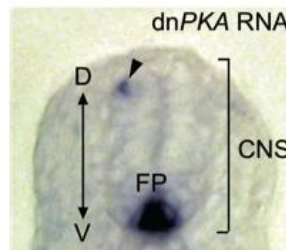


図3 dnPKA RNAを導入されたゼブラフィッシュの単一神経細胞が異所的に *spon1b* を発現している (矢尻)。(Hosokawa et al., 2011より改変)

た。24 hpf まで育ててから、*spon1b* の発現を解析したところ、dnPKA mRNA を導入された単一神経細胞では、異所的に *spon1b* の発現が確認された (図 3)。

このことから、高出力フェムト秒レーザーを用いたフォトポレーション法は、高等脊椎動物胚の単一細胞の運命を操作することも可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yohichiro Hosokawa*, Haruki Ochi, Takanori Iino, Akihiro Hiraoka and Mikiko Tanaka* (2011). Photoporation of biomolecules into single cells in living vertebrate embryos induced by a femtosecond laser amplifier. *PLoS ONE* 6, e27677. (*Co-corresponding authors. These authors contributed equally to this work.) 査読有

〔学会発表〕(計3件)

① Mikiko Tanaka, Haruki Ochi, Takanori Iino, Akihiro Hiraoka, Yoichiro Hosokawa
“ Femtosecond laser-introduction of bionanomolecules in targeted single cells of living vertebrate embryos”, 44th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Okinawa, May 18-21, 2011

② 細川陽一郎、越智陽城、田中幹子、再生増幅フェムト秒チタンサファイアレーザーを利用した動物胚の1細胞へのDNA・RNAの導入、第31回日本レーザー医学会、2010年11月13-14日、愛知

③ 細川陽一郎、越智陽城、飯野敬矩、平岡章宏、田中幹子、フェムト秒レーザー誘起衝撃力によるゼブラフィッシュ胚への生体分子導入、第71回応用物理学会学術講演会、2010年9月15日、長崎

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 幹子 (TANAKA MIKIKO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
准教授
研究者番号：40376950

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

細川 陽一郎 (HOSOKAWA YOHICHIRO)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・准教授
研究者番号：20448088

越智 陽城 (OCHI HARUKI)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教
研究者番号：00505787