

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：57102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420276

研究課題名(和文) 高効率遺伝子導入技術へのパルスパワーの挑戦

研究課題名(英文) Study on Improvement of Gene Transfer Efficiency with Pulsed Power Technology

研究代表者

河野 晋 (Kono, Susumu)

有明工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：30270375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：パルスパワー領域の極短高電圧パルスと通常領域の低電圧長パルスを組み合わせたパルス群を出力できる非対称バーストパルスシステムを製作し対象生物に対する遺伝子導入実験をおこなった。電気パルスの影響を抑えるために、周囲溶液やパルス印加後の対象物の取り扱いに注意が必要であることが分かった。対象生体に効率良くGFPを導入するためには、非対称バーストパルスである前方パルスと後方パルスの形状が重要で、また、極短パルスのパルス幅も導入率に影響することが分かった。

研究成果の概要(英文)：We have assembled the asymmetric burst pulse system that can generate a single rectangular high voltage pulse in nanosecond and some low voltage burst pulses with both polarities from microsecond to millisecond. It was able to introduce some chemical substances into fertilized medaka eggs easily and efficiently with this pulse system. As a next challenge, a preparation of a transgenic organism with the pulse system was studied. Green Fluorescent Protein (GFP) plasmid vector was tried to introduce into fertilized medaka eggs by this system. GFP expression was observed in embryo at some pulse parameters, indicating that plasmid vector was transferred to medaka embryo cell and expressed coding GFP successfully. It became clear that the pulse shapes of both the pre- and the post-burst pulses and the length of H.V. short pulse were important parameters to induce the gene transfer. It is thought that this asymmetric burst pulse system would become a simple and easy incorporation system.

研究分野：パルスパワー

キーワード：パルスパワー エレクトロポレーション バーストパルス 遺伝子 GFP 受精卵 メダカ 物質導入

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究室では、バイオエレクトリクス分野の研究として、メダカ受精卵を用いた物質導入法について in vivo レベルでの実験を行ってきた。この研究背景には、環境ホルモンなどに代表される化学物質が発生初期段階の細胞に及ぼす影響評価の必要性の高まりがあった。一般的に魚類の卵は堅い殻(卵膜)に包まれており、化学物質を内部に取り込ませることは困難であるが、パルスパワー技術を用いた簡便な物質導入法を提案し研究を行ってきた。極短パルス高電圧(15 ns, 6 kV)を一度印加することで、卵内の細胞を傷つけずに、卵内部へ化学物質(シクロヘキシミド)を導入できた。次に高電圧短パルスと低電圧長パルスの1セットをある時間間隔で印加することで、シクロヘキシミド導入量の増加と、より大きな分子量の化学物質(アクチノマイシン)の導入ができた。さらにこれら2パルスの印加順、極性、時間間隔による影響を調査し、導入率が高くかつ受精卵の内部組織に対する電氣的ダメージが少ない条件を示した。一方、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析により、卵細胞に対し電気パルスの影響が無いことも明らかにした。このようにパルスパワー領域の高電圧短パルスと通常領域の低電圧長パルスを組み合わせたパルスシステムは、電氣的ダメージを抑えた高効率な物質導入法として利用できる可能性があることが分かってきた。

(2) iPS 細胞、新たな機能を持つ細胞、微生物および生物の作製には遺伝子組換えが必須であり、バイオ関連研究・産業の更なる進展・発展には遺伝子導入効率の向上が重要な役割を持つ。装置による遺伝子導入法の代表例としてマイクロインジェクション法とエレクトロポレーション法がある。マイクロインジェクション法は高額な専用装置が必要で操作者に高度な技術が要求されるという問題がある。エレクトロポレーション用のパルス発生装置は単純なパルス波形によるものが多く、導入効率があまり高くないという問題がある。しかしエレクトロポレーション装置は前者と比べると簡便で比較的安価であるため、同装置の改良と高効率化に期待する研究者は多いと考えられる。

2. 研究の目的

(1) これまでの研究によりパルスパワー領域の高電圧極短パルスと通常領域の低電圧長パルスを組み合わせたパルス印加システムは、メダカ受精卵に対する化学物質導入実験では十分に効果があることがわかった。そこで、本技術の新展開として、このパルスシステムによる高効率な遺伝子導入の可能性を調査することが本研究の目的である。

(2) 化学物質と比較すると質量の大きい遺伝子を導入するためにはパルスエネルギー

の増加が必要であると考えられる。一方で、エネルギー増加による対象生物へのダメージは抑える必要がある。これまでの研究成果をもとに対象生物に対する最適な印加電圧波形、周囲媒質、反応容器の形状などを検討し、試験体に対する電気パルスの影響(ダメージ)は抑えつつ、物質導入に向上が見られる条件を調査する。

3. 研究の方法

(1) 複数のブルームライン発生器によるナノ秒オーダーの極短高電圧パルスと、RC放電回路による2種類の異なる極性の波形を出力できる継続時間の長い低電圧パルスのさまざまな組み合わせを出力できるパルス印加システム(非対称バーストパルスシステム)を構築した。パルス印加用水容器(キュベット)は、対象となる生物に応じた数種類のものを実験製作した。トリガ信号発生装置内のPIC(Peripheral Interface Controller)をプログラミングし、各パルスの出力タイミング、低電圧パルスのパルス継続時間、パルス出力数などのパラメータを設定した。本パルスシステムの出力波形の概観を図2に示す。

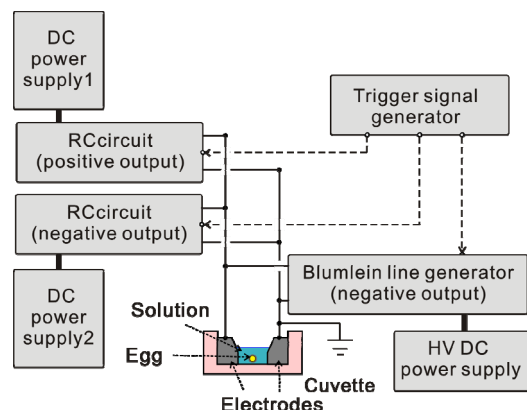


図1 非対称バーストパルスシステム

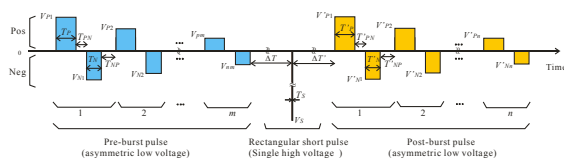


図2 印加パルス波形

(2) 今回、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) の受精卵、線虫 (*C. elegans*)、ラットの受精卵を実験の対象生物とした。

(3) 周囲溶液として導電率の異なる NaCl 溶液 (1.2~30 mS/cm) と表 1 に示す内容の等張液 (13 mS/cm) を準備した。また、試験溶液

として等張液に導入物質（GFP, シクロヘキシミドなど）を混合させたものを準備した。今回使用した GFP は pEGFP-N3 (4.7kb, GeneBank Accession # U57609) である。

Table 1. Composition of the isotonic solution for medaka egg

Substances	Quantity for 100 ml of distilled water
NaCl	750 mg
KCl	20 mg
CaCl	20 mg
NaHCO ₃	Amount to adjust for pH to be 7.3

(4) パルスシステムに接続された対象生物毎に最適化されたキュベットの電極間にマイクロピペットで適量 (90 μ L, 100 μ L) の周囲溶液または試験溶液を入れる。対象生物が受精卵の場合はそこに 1~5 個を入れ、また、線虫は個体数がそれぞれ 20 個/100 μ L となるように調整した。

(5) パルスシステムを用いてパルスを印加し、溶液で浸漬後、観察用プレートに戻し保管した。以降、適当な間隔で対象生物の状況を観察し、それらの影響（死亡、収縮、GFP 発現の有無やそれらの割合など）を調査した。

4. 研究成果

(1) メダカ受精卵

① パルス印加時の周囲溶液、パルス印加後に浸す溶液、また、その移動時間の影響調査を行った。本実験では前方のみの非対称バーストパルス (± 10 V, 300 μ s, 100 発) と高電圧パルス (3 kV, 100 ns) を使用した。

図 3 の実験結果より、パルス印加後 3 日目の正常な個体割合は、パルス印加時の「NaCl 溶液」の導電率によって変化し、導電率 6 mS/cm で最大となることが分かった。

図 4 の実験結果より、パルス印加直後は卵膜の透過性があがっており、その結果、導電率が非常に低い RO 水の影響が大きく現れ、一方、2 時間以上経過すると卵膜は元の不透過性の状態に戻り、RO 水の影響をほとんど受けなくなったと考えられる。

図 5 の実験結果より、NaCl 溶液 (6 mS/cm) 中でパルス印加されたグループは印加パルスによる電氣的ダメージやそれに伴った周囲溶液の影響はほとんどなく、正常な個体割合が 88% となった。一方、「試験溶液 (タンパク合成阻害剤シクロヘキシミド 5 μ M を混合)」中でパルス印加されたグループは“発生遅延”が 70%，“死亡”が 30%で、正常な個体は確認されなかった。これはシクロヘキシミドが導入されたことが主原因である考えられる。

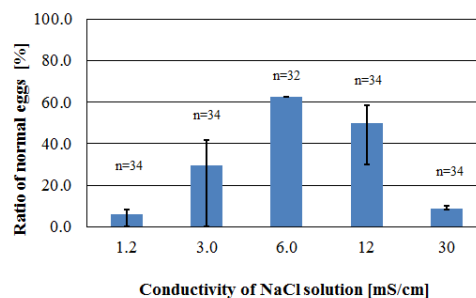


図 3 パルス印加時の周囲溶液の導電率と正常卵の割合（卵は、パルス印加後 2 時間はそのままの周囲溶液に浸漬する）

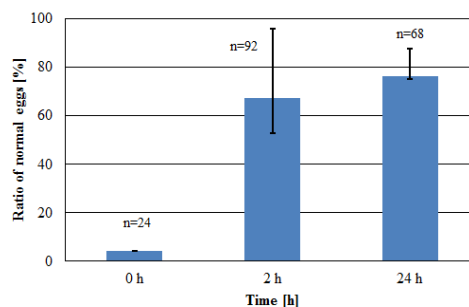


図 4 パルス印加後に RO 水に移すまでの時間 (0h, 2h, 24h) と正常卵の割合（パルス印加時の周囲溶液は 6 mS/cm の NaCl 溶液）

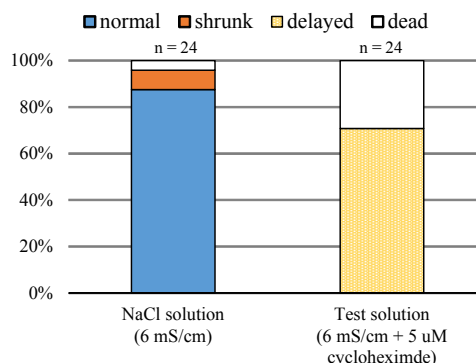


図 5 NaCl 溶液 (6 mS/cm) および試験溶液 (シクロヘキシミド 5 μ M 混合) 中でのパルス印加 1 日後の卵の状態 (パルス印加後 2 時間はその周囲溶液に浸漬する)

これら一連の実験結果から、メダカ受精卵に対する物質導入を目的としたパルス印加時の周囲溶液の調整の重要性、パルス印加後の卵の取り扱い・保管の仕方などが分かった。

② 対象生物に対する物質導入に用いた電圧パルスに起因する電気ダメージをできるだけ抑えて、一方で導入エネルギーを増加することが可能であるかの確認実験を行った。非対称バーストパルスの形状 (パルス幅, 電圧, 間隔, パルス数など), 電極形状, パルス印加前後の周囲溶液などを変化し, 対象生物に

対する電気ダメージの大きさを調査した。本実験では前方のパルスとして正極性バースト (+18 V, 300 μ s, 100 発) を出力した後、または前方の非対称バーストパルス (\pm 18V, 100 発) を出力した後、高電圧パルス (3 kV, 100 ns) を出力した。このとき非対称バーストパルスの正極性パルスは 300 μ s の固定幅とし、負極性パルスを 30 μ s から 300 μ s と変化させた。

電気ダメージの大きさを調査するために周囲溶液を NaCl 溶液 (6 mS/cm) とした実験 (図 6) と、物質導用量の変化を調査するために試験溶液 (NaCl 溶液 (6 mS/cm) に 5 μ M シクロヘキシミドを混合させた溶液) で実験 (図 7) を行った。

図 6 の実験結果より、単極性のバーストパルス ($T_p : T_n = 300 : 0 \mu$ s) を印加した場合、正常な受精卵は約 1 割と電気パルスのダメージが大きく現れた。一方、これに負極性のバーストパルス ($T_n = 30 \sim 300 \mu$ s) を付加すると正常な受精卵が 6 割以上となり、電気ダメージが大きく減少したことが分かる。

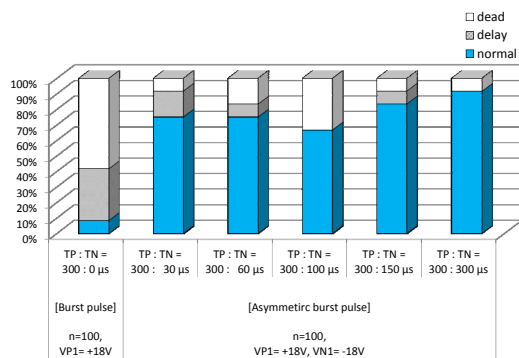


図 6 NaCl 溶液 (6 mS/cm) で各パルス印加後 3 日目の卵の状態

図 7 の実験結果より、正常な卵はすべてのパルス条件で観測されず、成長遅れか死亡となった。これまでに行ったダブルパルスによるシクロヘキシミド (10 μ M) の導入実験では著しい成長遅れとなる卵は観測できたが、死

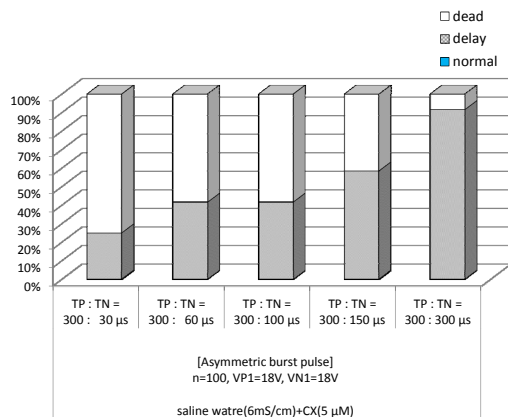


図 7 NaCl 溶液 (6 mS/cm) にシクロヘキシミド 5 μ M 混合した溶液で各パルス印加後 3 日目の卵の状態

亡にいたる卵は確認されていない。正極性パルスに付加する負極性パルスの幅が短くなると死亡する卵の割合が増加し、 $T_n = 30 \mu$ s のときに、8 割近い死亡率となった。これより、非対称バーストパルスによって、対象卵に対する電気ダメージを大きく抑制しつつ、物質導用量を大きく増加させることが可能であることが分かった。

③ 非対称バーストパルスを用いて GFP 導入実験を行った。等張液に GFP ベクター (pEGFP-N3, 300 μ g/mL) を混合させたものを試験溶液とし、その溶液中のメダカ受精卵に非対称バーストパルスを印加し、約 1 日後の卵の状態を蛍光顕微鏡 (Olympus, IX70) で観察した。このとき、使用したパルスパラメータを表 2 と表 3 に示す。

表 2 に示す実験条件 #1)~#4) で、前方および後方バーストパルスの GFP 導入に対する効果を調査する。表 3 に示す実験条件 #5)~#7) で、極短高電圧パルスの GFP 導入に対する影響を調査する。

表 2 GFP 導入実験 (バーストパルスの影響調査)

Pre-burst		HV short		Post-burst	
V_{P1}	8.5 V	V_S	-3.2 kV	V'_{P1}	#3) 8.5 V #4) 7.0 V
T_P	300 μ s	T_S	100 ns	T'_P	300 μ s
T_{PN}	100 μ s			T'_{PN}	100 μ s
V_{N1}	-8.2 V			V'_{N1}	#3) -8.2 V #4) -8.0 V
T_N	30 μ s			T'_N	30 μ s
T_{NP}	100 μ s			T'_{NP}	100 μ s
m	#1) 0 #2) 400 #3) 0 #4) 200			n	#1) 0 #2) 0 #3) 400 #4) 200
? T	100 ms			? T'	100 ms

表 3 GFP 導入実験 (極短高電圧パルスの影響調査)

Pre-burst		HV short		Post-burst	
V_{P1}	13.2 V	V_S	-3.1 kV	V'_{P1}	10.6 V
T_P	300 μ s	T_S	#5) 15 ns #6) 50 ns #7) 100 ns	T'_P	300 μ s
T_{PN}	100 μ s			T'_{PN}	100 μ s
V_{N1}	-10.8 V			V'_{N1}	-10.5 V
T_N	30 μ s			T'_N	30 μ s
T_{NP}	100 μ s			T'_{NP}	100 μ s
m	200			n	200
? T	1000 ms			? T'	10 ms

観察により卵を明視野での「生・死」と蛍光視野での「蛍光の有・無」の 4 つに分類した (図 8)。状態 I は生存、II は死亡であるが蛍光は無し、III は死亡、IV は生存 (正常) で蛍光が確認されたものである。死亡して蛍光が見られる状態 III の卵は、自家蛍光の可能性はある。生存しながら発光している状態 IV の卵は GFP による発光であると考えている。

印加パルス条件毎にこれらの状態の割合をまとめたものを表4と表5に示す。

State of eggs	state I	state II	state III	state IV
(a) Bright-field image				
Growth	normal	abnormal	abnormal	normal
(b) Fluorescence image				
Expression	not expressed	not expressed	expressed	expressed

図8 観察結果

表4から、前方バーストパルス(pre-burst)と後方バーストパルス(post-burst)の「有・無」によって各状態の割合が異なることが分かる。後方バーストパルスの無いパルス条件#1)と#2)では、状態IIIとIVの割合は0%で、蛍光を放つ卵は確認できなかった。後方バーストパルスが付加されたパルス条件#3)では、蛍光が確認できる状態IIIは4.2%、状態IVは0%、前方と後方の両バーストパルスが付加されたパルス条件#4)では、蛍光が確認できる状態IIIは10.4%、状態IVは4.2%であった。

表5から、条件#6)のパルス幅50 nsのとき状態IVは12.5%で、#5)の15 ns(6.3%)や#7)の100 ns(2.1%)よりも高い割合となった。

これらの実験結果より、GFP導入には前方と後方のバーストパルスが付加することが効果的で、また、極短パルスにも最適なものがあることが分かった。

表4 GFP導入実験結果
(バーストパルス影響調査)

#	pre-burst	post-burst	sample N	state I normal & not expressed	state II abnormal & not expressed	state III abnormal & expressed	state IV normal & expressed
1)	-	-	48	87.5%	12.5%	0%	0%
2)	+	-	48	56.3%	43.8%	0%	0%
3)	-	+	48	52.1%	43.8%	4.2%	0%
4)	+	+	48	50.0%	35.4%	10.4%	4.2%

(-無し, +有)

表5 GFP導入実験結果
(極単高電圧パルスの影響調査)

#	HV pulse width, Ts	sample N	state I normal & not expressed	state II abnormal & not expressed	state III abnormal & expressed	state IV normal & expressed
5)	15 ns	48	72.9%	14.6%	6.3%	6.3%
6)	50 ns	48	58.3%	14.6%	14.6%	12.5%
7)	100 ns	48	56.3%	22.9%	18.8%	2.1%

(2) 線虫 (*C. elegans*) 卵

線虫 (*C. elegans*) 卵に対する遺伝子導入実験を行うための予備実験として、パルス幅毎に導入エネルギーを変化させたパルスを印加し、一日後の孵化率を調査した。種々のパルス幅(100 ns から 10 ms)を持つ矩形波

をキュベット内(20個/100 μL)の線虫卵に印加し、インキュベータ(16°C)で一日保管した後、孵化した卵の数をカウントし、コントロールに対する孵化率を求めた。図9にパルスの投入エネルギーに対する孵化率を示す。図より短いパルス(750 ns)のほうが、長いパルス(1 ms)よりも少ないエネルギーで孵化率が低下した。一方、長いパルスではパルス印加直後の観察で破裂した卵が確認された。印加パルスはパルス幅に応じた異なる影響を線虫卵に与えていると考えられる。今後は、非対称バーストパルスシステムを用いてGFP導入に最適なパルスの組み合わせを検証していく予定である。

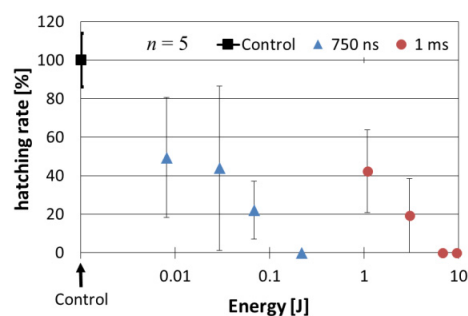


図9 投入パルスエネルギーに対する孵化率の関係(コントロールに対する割合)

(3) ラット受精卵

ラット受精卵に対しmRNA(100 ng/μL)の導入実験を行った。パルス電源として、市販のエレクトロポレータと非対称バーストパルスシステムを用い、キュベットは市販の5 mmギャップとした。非対称バーストパルスシステムのパルスパラメータは、前方パルス(±22V, 正極パルス500 μs, 負極パルス100 μs, 交互500発づつ)、極短パルス(-3.2 kV, 200 ns)、後方パルス(-11V, 50 ms, 5発, +18V, 50 ms, 5発)とした。変異が確認できた受精卵の割合は、市販品では17%(12個中2個)、非対称バーストパルスでは33%(9個中3個)であった。サンプル数が少ないため追実験が必要であるが、非対称バーストパルスシステムの可能性を示した結果となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- ① 河野晋, 米田宗次, 山口明美, 福原義剛, 富永伸明, 非対称バーストパルスシステムによるメダカ受精卵への物質導入実験における周囲溶液の影響調査, 電気学会論文誌A(基礎・材料・共通部門誌), 査読有, Vol. 135, No. 9 (2015), pp. 542-547

- DOI:10.1541/ieejfms.135.542
- ② S. Kono, A. Yamaguchi, M. Yoneda, Y. Fukuhara, N. Tominaga, Application of Asymmetric Burst Pulse System for Preparation of Transgenic Medaka (*Oryzias latipes*), Proceedings of the 20th IEEE Pulsed Power Conference, 査読有, 2015, pp. 94-99
DOI:10.1109/PPC.2015.7296886
- ③ Y. Fukuhara, M. Yoneda, A. Yamaguchi, N. Tominaga, S. Kono, Effects of Pulsed Power Parameters on Material Incorporation Technique into Medaka (*Oryzias latipes*) Eggs, Proceedings of 5th Euro-Asian Pulsed Power Conference, 査読有, 2014, pp.145-148
- ④ S. Kono, A. Yamaguchi, T. Kubo, Y. Fukuhara, N. Tominaga, Incorporation Material into Medaka (*Oryzias latipes*) Eggs by Asymmetric Burst Pulses, Proceedings of the 19th IEEE Pulsed Power Conference, 査読有, 2013, pp. 924-929
DOI:10.1109/PPC.2013.6627555

〔学会発表〕(計8件)

- ① 高田智, 河野晋, 山口明美, 富永伸明, 線虫 (*C. elegans*) の卵への電気パルス印加におけるパルス幅の影響調査, 平成28年度電気学会 基礎・材料・共通部門大会, 2016年9月5日, 九州工業大学戸畑キャンパス (福岡県・北九州市)
- ② 高田智, 富永伸明, 山口明美, 河野晋, パルスパワーが線虫卵に及ぼす影響に関する基礎研究, 平成27年度(第6回)電気学会九州支部高専研究講演会, 2016年3月5日, 有明工業高等専門学校 (福岡県・大牟田市)
- ③ 福原義剛, 山口明美, 富永伸明, 河野晋, メダカ受精卵に対する物質導入実験に用いる印加電圧波形の検討, 電気学会九州支部平成25年度(第4回)高専卒業研究発表会, 2014年3月8日, 熊本高専熊本キャンパス (熊本県・合志市)
- ④ 山口明美, 福原義剛, 河野晋, 渡辺咲子, 中田晴彦, 有菌幸司, 富永伸明, 新規物質導入法を用いたビスフェノール類の発生影響評価, 第16回環境ホルモン学会研究発表会, 2013年12月12日, 東京大学山上会館 (東京都・文京区)
- ⑤ 河野晋, パルス印加による魚類受精卵への高効率物質導入技術, 九州沖縄地区 KOSEN 新技術マッチングフェア 2013, 2013年11月13日, マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市博多区)
- ⑥ 河野晋, 研究紹介 (High Voltage Pulse Generator, メダカ受精卵物質導入システム), 第5回パルスパワーおよび放電の農水系利用調査専門委員会, 2013年10月31日, 名城大学名駅サテライト(愛

知県・名古屋市)

- ⑦ 山口明美, 河野晋, 渡辺咲子, 中田晴彦, 有菌幸司, 富永伸明, ビスフェノール A の新規物質導入法による発生影響評価, フォーラム 2013:衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013年9月13日, 九州大学医学部百年講堂 (福岡県・福岡市東区)
- ⑧ 山口明美, 富永伸明, 福原義剛, 河野晋, 高電界パルスによるメダカ (*Oryzias latipes*) 卵への物質導入 一物質導入量の増加を目的とした電圧パルスの連続印加および分子量と導入効率についての検討一, 第19回日本環境毒性学会研究発表会, 2013年9月8日, 東洋大学白山キャンパス (東京都・文京区)

〔図書〕(計1件)

- ① パルスパワーおよび放電の農水系利用調査専門委員会 (高木浩一, 王斗艶, 高橋克幸, ほか19名) 編, 電気学会, パルスパワーおよび放電の農水系利用, 2015, pp. 41-43

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

出願年月日: 2014年12月1日

国内外の別: 国内

名称: 物質導入方法およびその装置

発明者: 河野晋, 富永伸明, 山口明美
権利者: 独立行政法人国立高等専門学校機構
種類: 特許

番号: 2014-243553

出願年月日: 2014年12月1日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野晋 (KONO SUSUMU)

有明工業高等専門学校・電気工学科・准教授

研究者番号: 30270375

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

富永伸明 (TOMINAGA NOBUAKI)

山口明美 (YAMAGUCHI AKEMI)

金子武人 (Takehito Kaneko)