

## 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 4月15日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22655052

研究課題名（和文） iPS細胞作成効率の画期的改善

研究課題名（英文） Improvement of production efficiency of iPS cells

研究代表者

世良 貴史（SERA TAKASHI）

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：10362443

研究成果の概要（和文）：

従来の作製効率をさらに上昇させるために、新たな手法を開発することを目的とする。それぞれのサイトを標的とする4種類の分子のもとを合成し、さらに精製した。それらを個別に動物細胞に導入し、その中で最も標的の機能を調節する分子を分子生物化学的な手法を用いて同定した。さらに、この分子の機能を高めたものを作製し、複数の精製法を組み合わせることで純化することができた。この分子を用いて、細胞内の標的の機能を調節することができた。

研究成果の概要（英文）：

The goal of this study is to develop a new method to improve the production efficiency of iPS cells. We designed four molecules for the purpose. We generated and purified them. We identified the best molecule based on molecular biological properties. We furthermore improved the function of the molecule. Using it, we modulated the target function in cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：

タンパク質工学、遺伝子工学、細胞工学

科研費の分科・細目：

複合化学・生体関連化学

キーワード：

バイオテクノロジー

### 1. 研究開始当初の背景

患者さん自身の体細胞を受精卵のように初期化して、どの細胞にも分化できるようにすることができれば、他人の臓器の移植に伴う拒絶反応のない、夢の再生医療が可能となる。植物の体細胞にはそのような万能性を有することは知られていた。たとえば、植物の体細胞をあるホルモンの働きにより初期化し、植物個体を再生することが可能である。しかし、ヒトを含むより高等な動物細胞は特別であり、そのような万能性を付与することは不可能と考えられていた。

しかしながら、その常識が完全に覆された。ご存知のように、山中先生の画期的な研究により、たった4つの遺伝子 (Oct3/4、Sox-2、cMyc、Klf4) を体細胞へ導入するだけで、多分化能を有する iPS 細胞の作製が可能となった。この画期的な研究により、ES 細胞に比べて倫理上および拒絶反応の問題がなく、再生医療の実現が現実味を帯びてきた。しかしながら、その作製効率は1%未満と低く、その技術の実用化のネックとなっている。当然のことながら、体細胞の分化した状態を維持するメカニズムが存在するからである。しかし、2009年山中らにより、ガン抑制遺伝子の p53 を破壊すると、4つの遺伝子の体細胞への導入による iPS 作製効率が20%くらいまで上昇することが報告された。iPS 細胞の実用化のためにはさらなる iPS 作製効率の上昇が必要で、そのための最も合理的なアプローチは、まずどのように体細胞の分化状態が維持されるか、あるいはどのように体細胞が iPS 細胞へ脱分化するかを明らかにすることである。現在その候補遺伝子の探索に世界中の多くの研究者がしのぎを削っているが、そのメカニズムを解明することは生物学上の大きなテーマのひとつであり、その全容の解明には多大な労力と時間が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、iPS 化効率を画期的に改善する方法を新たに開発することである。そこで、まず iPS 化を阻害すると考えられる複数の遺伝子の発現を阻害する分子をデザインし、それらを用いてどれくらい標的の遺伝子の発現を抑制できるかどうかを評価し、iPS 化効率を改善する手法の開発につなげていく。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子発現の抑制を目指した分子の創出

まずゲノムデータベースを用いた詳細な解析により、標的サイトの探索を行った。最

終的に絞り込んだ4つのサイトをそれぞれ標的とする分子をデザインし、それぞれをコードするフラグメントを化学合成した。それぞれを制限酵素で消化した後、ベクターの BamHI と AgeI 間に導入し、大腸菌で増幅させ、得られたものを最終的に分子生物学的に同定した。

#### (2) デザインした分子による標的遺伝子発現の抑制

ヒト由来細胞 HEK293 の  $1 \times 10^5$  cells へそれぞれのベクター  $0.45 \mu\text{g}$  と pCMV- $\beta$   $0.05 \mu\text{g}$  を導入した (コントロールには代わりに pcDNA3.1 を使用した)。その全量 (培地  $100 \mu\text{l}$ ) を PDL-96 well plate へ播種した。37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 48、72 時間培養後細胞を洗浄し、 $1 \times \text{PLB } 100 \mu\text{l}$  で細胞ライセートを調製した。それぞれの細胞ライセートを用いて、SDS-PAGE 用サンプルを調製した。また、NI Protein Assay を用いて総タンパク質濃度を測定した。標的遺伝子産物、デザインした分子確認用のウェスタンブロットには総タンパク質  $0.5 \mu\text{g}$  分を、また GAPDH 発現確認用のウェスタンブロットには総タンパク質  $1 \mu\text{g}$  分を使用し、以下の抗体を用いて検出した。

標的遺伝子産物：1次抗体、2次抗体  
anti-mouse 抗体

デザインした分子：anti-FLAG-HRP 抗体  
GAPDH：1次抗体 anti-GAPDH、2次抗体  
anti-mouse 抗体

標的遺伝子産物及び GAPDH のバンド強度をデンストメーターで解析し、バンド強度 (標的遺伝子産物) / バンド強度 (GAPDH) を pcDNA3.1 を 100% として評価した。

#### (3) デザインした分子の改良

デザインした4つの分子のうち、最も高い抑制能を示した分子2のコーディング領域を分子生物学的手法により増幅した。得られたフラグメントを BamHI と HindIII で消化した後、元となるベクターの BamHI と HindIII 間にクローニングしてベクターを構築した。この発現ベクターで大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を形質転換した。得られた形質転換体を LB-Amp、Cm 培地で OD<sub>600</sub>=0.65 くらいまで 37°C で振とう培養した。次に、LB-Amp、Cm、IPTG (終濃度 1 mM) 培地 120 ml で 37°C、3 時間、振とう培養した。得られた大腸菌ペレットをライシスバッファー (100 mM Tris-HCl (pH8.0)、100 mM NaCl、protease inhibitor 1 粒、5 mM DTT) 10 ml で懸濁した。得られた懸濁液の凍結・融解操作を4回繰り返した後、ソニケーションして細胞ライセートを調製した。遠心後のペレットを変性用バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、100 mM NaCl、

8 M urea, 5 mM DTT) で懸濁して室温で1時間インキュベートした。遠心後の上清を、あらかじめ平衡化バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、100 mM NaCl, 8 M urea, 5 mM DTT) で平衡化させておいた BioRex70 に吸着させた後、カラムを洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、100 mM NaCl, 8 M urea, 5 mM DTT) で数回洗浄した。続いて、溶出バッファーで (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、500 mM 続いて 600 mM NaCl, 8 M urea, 5 mM DTT) で溶出した。各フラクションを SDS-PAGE で分析し、目的物を有するすべてのフラクションをひとつにまとめて、透析により含有尿素濃度を段階的に 8 M → 2 M → 0.5 M → 0 M へ減少させた。その際の透析バッファーとしては、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 M NaCl, 0.2 mM DTT (尿素濃度は前述の通り徐々に減少させたもの) を用いた。透析により尿素を除いた溶液を限外濾過操作により約 250  $\mu$ l まで濃縮した。得られた分子の濃度は、NI Protein Assay により決定した。

#### (4) 改良分子による標的遺伝子発現の抑制

まず HEK293 の  $5 \times 10^4$  cell (培地 100  $\mu$ l) を PDL 96-well へ播種した後、37°C・CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターで 24 時間培養した。精製した改良分子を Opti-MEM で 5  $\mu$ M に希釈して 1 well 当たり 10  $\mu$ l を添加した (終濃度 500 nM)。37°C・CO<sub>2</sub> 5% インキュベーターで 24、48 時間培養後細胞を洗浄し、1×PLB 100  $\mu$ l で細胞ライセートを調製した。細胞ライセートを用いて、SDS-PAGE 用サンプルを調製した。また、及び NI Protein Assay を用いて総タンパク質濃度を測定した。標的遺伝子産物確認のウェスタンブロットには総タンパク質 0.5  $\mu$ g 分を、改良分子および GAPDH 発現確認のウェスタンブロットには総タンパク質 1  $\mu$ g 分を使用し、以下の抗体を用いて検出した。

標的遺伝子産物：1次抗体、2次抗体

anti-mouse 抗体

改良分子：1次抗体 anti-V5 tag 抗体、2

次抗体 anti-mouse 抗体

GAPDH：1次抗体 anti-GAPDH、2次抗体

anti-mouse 抗体

標的遺伝子産物及び GAPDH のバンド強度をデンシトメーターで解析し、バンド強度 (標的遺伝子産物) / バンド強度 (GAPDH) を Opti-MEM 添加の条件を 100% として評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子発現の抑制分子の作製

まずゲノムデータベースを用いた詳細な解析により、標的サイトの探索を行った。多数リストアップした候補の中から、当研究室において蓄積された情報に基づき、最終的に

有望な上位4つのサイトに絞り込んだ。次に、それぞれのサイトを標的とする分子をデザインし、それぞれをコードするものを化学合成した。それぞれをベクターに導入し、微生物で増幅させ、得られたものを分子生物学的に同定した。

### (2) デザインした分子による標的遺伝子発現の抑制

作製した分子1~4をそれぞれヒト由来細胞 HEK293 に導入し、48時間あるいは72時間培養した。各培養後、細胞を破碎し、細胞内のタンパク質混合物を SDS-PAGE で分離した後、抗体を用いて、標的遺伝子の発現量をタンパク質レベルで評価した。その結果を図1に示す。

この図で示されるように、デザインした4つの分子のうち、分子2および分子4が最も効率よく標的遺伝子の発現を抑制した。

次に、4つの分子の細胞内での存在量を抗体を用いて解析し比較してみたところ、図2のような結果が得られ、分子2が分子4よりも圧倒的に存在量が低いことがわかった。すなわち、細胞内での存在量が低くても、図1

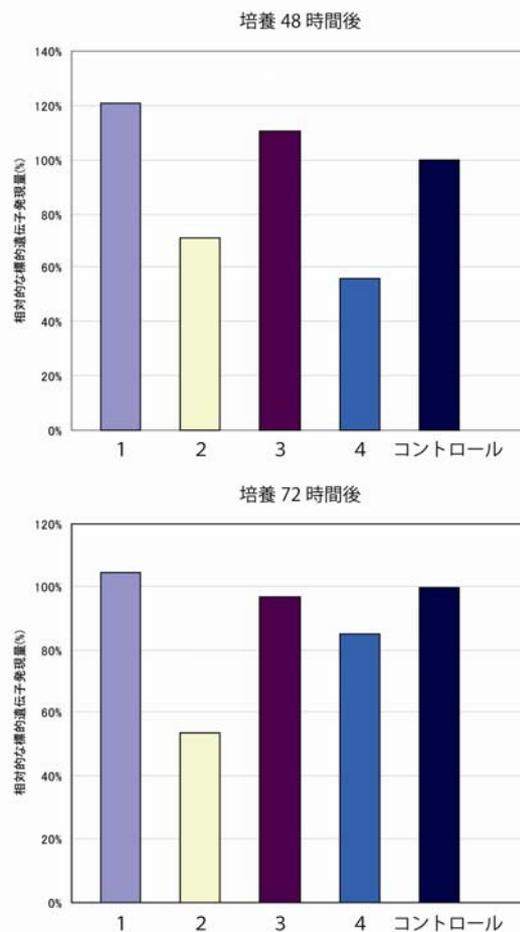


図1. 標的遺伝子発現の抑制

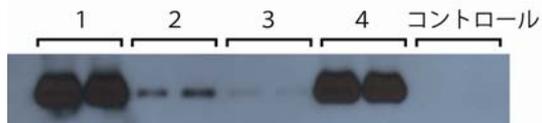


図2. 細胞内での各分子の存在量の比較

に示されたように高い抑制能を示すことから、以後の実験では、分子2を用いることにした。

### (3) 分子2による標的遺伝子発現の抑制

上述したように、分子2をコードするベクターによる細胞への導入では、ヒト由来細胞内で作られる分子2の量が非常に少なかったことから、その問題を解決するため、分子2を大腸菌で作らせて精製したものを用いて、標的遺伝子発現の抑制を試みた。終濃度0.5 μMで分子2を用いた場合、培養後1日では標的遺伝子の抑制はあまり見られなかったが、培養2日後では約60%発現を抑制できることがわかった。

以上述べてきたように、今回新たにデザインした分子で標的遺伝子発現を抑制することを確認できた。今後、分子を導入する条件を様々に変えてみて、標的遺伝子発現の調節法を最適化する予定である。現在、分子自体の抑制能をさらに高めるため、改良を行っているところである。今回作製した分子を元に、今後iPS化効率を改善する手法の開発につなげていきたいと考えている。

### 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

世良 貴史 (SERA TAKASHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：10362443

#### (2) 研究分担者

該当なし

#### (3) 連携研究者

該当なし