

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25年6月20日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659304

 研究課題名（和文） 受精卵の全能性機能を探り出す研究
 —リプログラミング因子を一網打尽に捉える—

 研究課題名（英文）
 Research for exploring totipotency of mouse zygotes

研究代表者

阿久津 英憲 (AKUTSU HIDENORI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・室長

研究者番号：50347225

研究成果の概要（和文）：

究極のリプログラミング能力を示している受精卵（マウス）を対象にリプログラミング因子を突き止める挑戦的研究を行った。受精卵の雄性前核と雌性前核を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行い、*in silico*に胚の転写開始やクロマチンリモデリングなどに関連する遺伝子を中心にリプログラミングに関わると強く示唆される有力な遺伝子を抽出することができた。

研究成果の概要（英文）：

Nuclear reprogramming means that either functional or molecular changes to cells undergoing fate changes, and the mechanism elucidation would deliver great advance not only for the basics of biological systems also more applicable field such as medicine and drug development. In this study, mouse zygotes are focused to be elucidated reprogramming. In early stage of the mammalian preimplantation development, most dramatic epigenetic change is observed the pronuclear formation through their fusion process. Female and male pronuclear materials were collected by micromanipulation technique and were done by the global transcriptional expression analysis using linear amplified RNAs. Gene cluster analysis in conjunction with reprogramming *in silico* was performed. It was able to extract a convincing gene mainly on a gene in conjunction with the chromatin reprogramming.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	0	600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,800,000	660,000	3,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：リプログラミング・幹細胞・受精卵

1. 研究開始当初の背景

発生過程で運命付けされた細胞に未分化性を再獲得させるリプログラミングは近年、体細胞クローン、ヒト ES 細胞樹立、そして iPS 細胞の誕生により基礎研究のみならず再生医学や癌研究への応用による医科学分野での大幅な進歩が社会全体から期待されている。iPS 細胞の生みの親であり京都大・山中伸弥教授は“体細胞のリプログラミング”により、2012 年ノーベル医学生理学賞を受賞した。しかし、リプログラミングによる有用性はより明らかになりつつもその機序はいまだ多くが謎である。受精卵は細胞核リプログラミング現象に関して 2 つの非常に興味深い事象を提示している。卵子と精子が融合（受精）後雌性及び雄性由来の前核を形成する。同一細胞内でありながら前核内では劇的に異なるエピジェネティック変化が起こる。雄性前核内では受精後能動的脱 DNA メチル化が雄ゲノム全体でおこるのに対し、雌性前核では DNA メチル化が維持され、細胞分裂に依存する受動的な脱 DNA メチル化が引き起こされる。

2. 研究の目的

生物学的事象に関与する因子（遺伝子）を網羅的遺伝子発現解析から導き出す場合、対象となるサンプルのユニーク性が高いほどより有意性の高い遺伝子が得られる。体細胞リプログラミングの究極的な証明は体細胞クローン法による個体発生の証明であった。これまで未受精を除核して体細胞を注入することで成功してきた体細胞クローン法の研究から、受精卵を用いたクローン法では体細胞を初期化する能力がなく受精卵はリプログラミング能力が失われているとされてきた。しかし、前核の核膜分解をおこす有糸分裂期にいたった受精卵を用いるとクローンの作成が可能となることが判明した。つまり、前核内には何らかの体細胞リプログラミング関連因子が含まれている。このリプログラミング因子のつまった前核の遺伝子発現解析報告は無く、本研究はリプログラミング現象に関して非常にユニークなサンプルである前核を対象に網羅的遺伝子発現解析からリプログラミング因子を一網打尽にする。

3. 研究の方法

①マウス雌雄前核の採取：マイクロマニピュレーション技術を用いて、受精卵の前核を取り出す。
②網羅的遺伝子発現解析とリプログラミング及び動的 DNA 脱メチル化候補因子抽出：それぞれ 100 個程度のサンプルに対し

て、リニア増幅し DNA マイクロアレイ解析を行う。得られた結果に対して、バイオインフォマティクス解析を行う。

③発現検定解析と機能解析

発現動態を多角的に捉える。特に、前核で抽出された遺伝子群についてその発現特性を解析する。

4. 研究成果

発生学的に運命付け（プログラム）された細胞を細胞・分子機能的に変化させることをリプログラミングといい、iPS 細胞の樹立報告以来その機構解明は基礎生物系のみならず医・薬学応用への展開も大いに期待されている。本研究では、究極のリプログラミング能力を示している受精卵（マウス）を対象にリプログラミング因子関連分子を抽出した。卵子細胞内では精子と融合（受精）後、生物学的に最も劇的な変化がエピジェネティックレベルで雌・雄性前核形成から融合過程で観察できる。この受精卵の雄性前核と雌性前核を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行い、リプログラミングに関連する生体内因子を一網打尽にとらえることができた。得られた遺伝子発現データから、*in silico* にリプログラミングや胚の転写開始に関連する遺伝子群を抽出し GO term 解析を行った。染色体関連としてクロマチンリプログラミングに関連する遺伝子を中心に有力な遺伝子を抽出することが可能であった。

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 6 件)

1. Egli D, Akutsu H. Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 118-125.
2. Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2012;3:8.
3. Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Shinoda K, Soga T, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Sci Rep.* 2012; 2:930.

4. 阿久津英憲,梅澤明弘:「クローン技術を応用するヒトES細胞の可能性」母子保健情報, 66:80-84, 2012.
5. 阿久津英憲, 福田篤, Dieter Egli. 「クローン胚からのES細胞作製」実験医学, 30(10), 1621-1625, 2012.
6. 阿久津英憲, 福田篤. 「生殖細胞の分化誘導」 Medical Science Digest, 38(6), 253-256, 2012.

〔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

阿久津 英憲 (AKUTSU HIDENORI)
独立行政法人国立成育医療研究センター・
生殖・細胞医療研究部・室長
研究者番号：50347225

(2) 研究分担者

豊田 雅士 (TOYODA MASASHI)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター・研究所老年病研究チーム・血管医
学研究・研究副部長
研究者番号：50392486