

## 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 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658091

研究課題名（和文）iPS 細胞誘導因子を用いた受精前後における全能性獲得機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism for the acquisition of totipotency by Yamanaka factors

研究代表者

青木 不学（AOKI FUGAKU）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20175160

研究成果の概要（和文）：

まず、受精前後における4因子の mRNA の発現を調べたところ、すべての発現を検出できたが、*Oct3/4* と *c-Myc* の発現量が多いことが示唆されたため、まずこの2つの因子に着目して研究を行うことにした。

次いで、免疫染色法により、*Oct3/4* と *c-Myc* のタンパク質の局在を調べたところ、いずれも受精直後の1細胞期胚で核内への強い局在が認められた。

次いで、*Oct3/4* の siRNA を作成し、これを成長卵に顕微注入して発現抑制を行ったところ、2細胞期への分裂が阻害され、1細胞期で発生を停止していた。

さらにこれらの胚では、1細胞期に発現する遺伝子の発現量が低下していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The expression of the transcripts of Yamanaka factors was examined by RT-PCR, which revealed that all of the factors were detected in the preimplantation embryos. Since the expression levels of *Oct3/4* and *c-Myc* seemed to be high, I focused on these genes in the further experiments. Immunocytochemistry revealed that the nuclear localization of both of OCT3/4 and c-MYC proteins increased after fertilization. When full-grown oocytes were microinjected with *Oct3/4* siRNA and then subjected to *in vitro* fertilization, the fertilized oocytes did not cleave to the 2-cell stage. In these oocytes, the expressions of the genes which are usually expressed after fertilization were reduced.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：卵、初期胚、リプログラミング

### 1. 研究開始当初の背景

受精前の卵は生殖細胞として最終分化した状態にあるのに対し、受精後の胚はどのような細胞にも分化できる全能性を有している。また分化した体細胞の核を未受精卵あるいは受精直後の胚の細胞質に移植することによって作成された体細胞核クローン胚は、全能性を獲得している。このように受精前後の卵あるいは胚の細胞質中には、分化した細胞核を全能性のあるものに変換する因子が存在するものと考えられる。しかしながら、実際にそれがどのような因子であるのか、そしてその因子によってどのように全能性が獲得されるのかなどについてはほとんど明らかにされていない。

一方、近年、分化した体細胞に4つの因子を強制発現させるだけで、多能性を持つ胚性幹細胞様の細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) に変化させることができることが示された。この4つの因子は、*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc* であり、発見者の名をとって山中因子と呼ばれているおり、多能性獲得の際のリプログラミングに果たす役割について数多くの研究がなされている。しかし一方で、これらの因子が受精前後のリプログラミングに関与しているかどうかについては、これまでまったく明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

山中因子が受精前後、あるいは体細胞核移植の際の全能性獲得機構に何らかの役割を果たしていることが考えられる。そこで、本研究では全能性獲得機構の解明を最終目標として、この機構への山中因子の関与を明らかにすることを試みる。

### 3. 研究の方法

以下のような研究方法を用いた。

(1) 4つの山中因子 (*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*) のそれぞれについて、受精前後における mRNA 発現量の変化を RT-PCR で調べる。また同様にタンパク質についてもその量と局在の変化を免疫染色で調べる。

(2) 核移植胚についても、免疫染色によりタンパク質の動態を調べる。

(3) 上記(1)、(2)の結果、4つの因子の中で受精前後および核移植胚で発現が確認され、かつ変化が見られるものについて siRNA を作成して、マウス成長卵 (Full grown oocyte :

FGO) に顕微注入することでその発現を抑制し、発生及び遺伝子発現への影響を調べる。

### 4. 研究成果

まず、4つの因子の受精前後における mRNA の発現について調べた。その結果、RT-PCR ではすべての発現を検出できたが、*Oct3/4* と *c-Myc* の発現量が多いことが示唆されたため、まずこの2つの因子に着目して研究を行うことにした。

次いで、免疫染色法により、*Oct3/4* と *c-Myc* のタンパク質の局在を調べたところ、いずれも受精直後の1細胞期胚で核内への強い局在が認められた (図1、2)。特に、*Oct3/4* は受精後に著しく核局在が増加することから、*Oct3/4* に焦点を絞って解析を行うことにした。

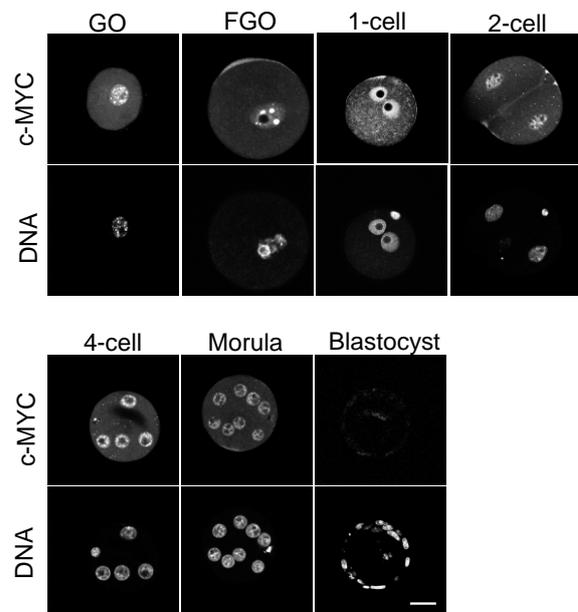


図1. 卵形成および初期発生期における *c-Myc* の発現変化

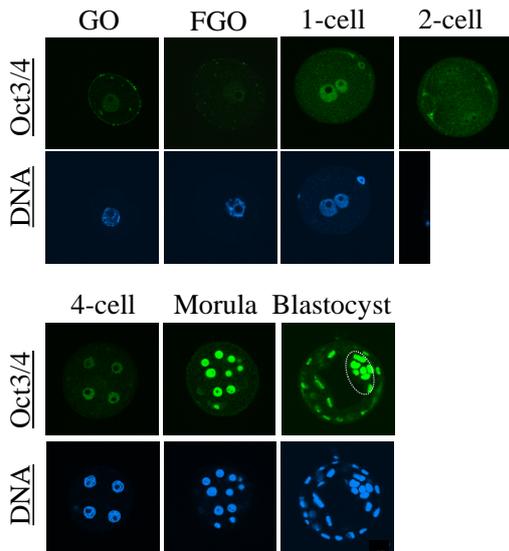


図 2. 卵形成および初期発生期における Oct3/4 の発現変化

また、核移植胚における Oct3/4 の動態を免疫染色で調べたところ、1 細胞期胚同様に移植後に核局在量が増加することが明らかとなった (図 3)。

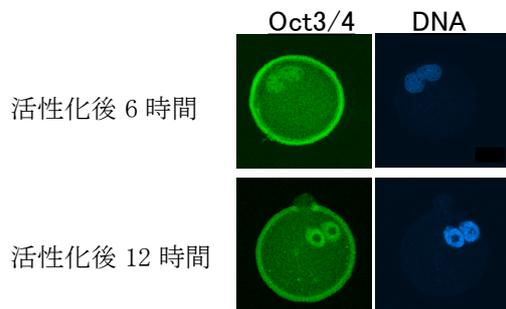


図 3. 核移植胚における Oct3/4 の核局在

次いで、Oct3/4 の siRNA を作成し、これを成長卵 (Full grown oocyte : FGO) に顕微注入した。その結果、siRNA により Oct3/4 の mRNA は分解され、受精後のタンパク質の核局在は著しく減少していた。そしてこのような胚では、2 細胞期への分裂が阻害され、1 細胞期で発生を停止していた (図 4)。さらに 1 細胞期に発現することを当研究室で明らかにした 3 つの遺伝子 (*Zfp352*、*Tkt11*、*Urm1*) についてその mRNA を調べたところ、Oct3/4 の siRNA を注入した胚では、いずれも著しく発現量が低下していることが明らかとなっ

た (図 5)。今後は、どのような機構で発生停および遺伝子発現の低下が起こっているかを解析することで、Oct3/4 のリプログラミングへの関与を明らかにしていく予定である。

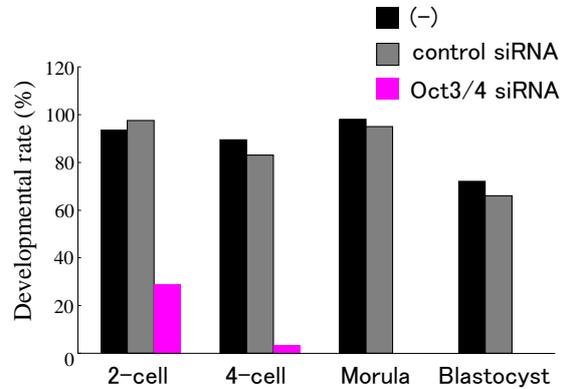


図 4. Oct3/4 のノックダウンが初期発生に及ぼす影響

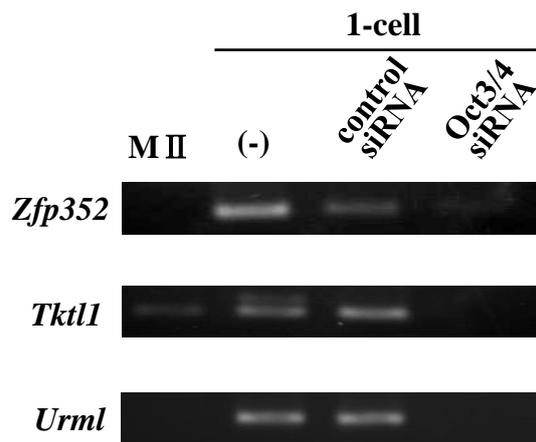


図 5. Oct3/4 のノックダウンが 1 細胞期における遺伝子発現に及ぼす影響

##### 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)

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/seigyoin dex.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 不学 (AOKI FUGAKU)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・  
教授

研究者番号：20172160