

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		改変未受精卵を用いた体細胞核移植の初期化促進の試み			
研究テーマ (欧文) AZ		Attempt to enhancement of nuclear reprogramming for nuclear transfer using modified unfertilized oocytes			
研究氏 代表者	カナ CC	姓) タニ	名) テツヤ	研究期間 B	2008 ~ 2010 年
	漢字 CB	谷	哲弥	報告年度 YR	2010 年
	ローマ字 CZ	TANI	TETSUYA	研究機関名	近畿大学農学部
研究代表者 CD 所属機関・職名		谷 哲弥 近畿大学農学部 講師			
概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)					
<p>体細胞核移植における初期化能力を促進できるかどうかを検討するため、ブタ体細胞核移植の実験系を用いて未受精卵に様々な初期化促進効果が予測される因子を注入した後、体細胞核移植を行うことで胚盤胞期までの体外発生能及び胚の未分化関連遺伝子発現を指標にして初期化が促進するか調べた。最初に効率的なブタ体細胞核移植の実験系を確立した。すなわち、本来培養液に血清や卵胞液を用いる培養系が用いられてきたが、そのロット差により実験結果が安定しないことがあるため体外成熟から発生培地に PZM 培地に PVA を添加した完全合成培地による培養系の確立によりその問題を克服した。次に核移植では、核移植卵を 1mM のバブプロ酸で 48 時間処理することによりその胚盤胞期への発生率を 25% から 70% に向上させることができた。次に改変未受精卵の作製法を検討した。最初に GFP をコードする mRNA をブタ未受精卵に注入し翻訳効率を蛍光強度で解析した。体外成熟前の卵殻胞期への mRNA の注入よりも成熟後の第二減数分裂中期へ poly-A を付加させた mRNA を注入することで 2 時間以内に効率的に GFP を発現させることが明らかとなり実験系の確立ができた。そこで、iPS 細胞の樹立に用いられるような転写因子 (Oct4, sox2, klf4, c-Myc, Nanog, Lin28) や初期化の核リモデリングに重要な DNA 脱メチル化を促進する酵素 (Gadd45a, Apobec1) の mRNA をマウス ES 細胞からクローニングし、核移植前の未受精卵に予め注入することで改変未受精卵を作製してその影響を調べた。予想に反して、転写因子群を注入することによりその濃度依存的に核移植卵の発生能は損なわれた。また Gadd45a や Apobec1 を注入しても発生能は変わらず、核移植後の DNA メチル化レベルを免疫染色法により確認したが、脱メチル化の促進は観察されなかった。以上の結果から、iPS 細胞の核初期化に関わる初期化因子を未受精卵に発現させることにより、その後の初期発生が阻害されること、DNA 脱メチル化酵素は未受精卵内において活性化しないことが明らかとなり体細胞核移植による初期化促進には至らなかった。</p>					
キーワード FA	初期化	核移植	未受精卵		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

欧文概要<sup>EZ</sup>

I examined whether oocyte-base reprogramming facilitates by using injection of mRNA for reprogramming related factor into unfertilized oocyte before somatic cell nuclear transfer (SCNT). The acceleration of reprogramming was assayed by developmental ability to blastocyst stage and gene expression of undifferentiated related gene. The firstly, I established efficient pig SCNT system with defined culture system. Treatment of 1mM valproic acid (Histone deacetylase inhibitor) for 48 hours during activation and culture period, the developmental ability dramatically increased (25% vs 70%). For efficient modification of unfertilized oocytes, injection of poly-A tail GFP mRNA into second metaphase II stage oocytes 2 h before SCNT was most effective for GFP protein expression. Therefore I modified the pig oocytes by injection of defined reprogramming-related factors (Oct4, sox2, klf4, c-Myc, Nanog, Lin28) or DNA demethylation enzyme (Gadd45a, Apobec1), and then SCNT was performed. Unfortunately development of SCNT embryo strongly interfered in a mRNA-dependent manner and methylation level did not altered by injection of DNA demethylation enzyme. In conclusion, I established efficient pig SCNT system and modification of unfertilized oocyte. However modified oocytes by injection of defined reprogramming related factor could not facilitates oocyte-base reprogramming.