

## 10. iPS 細胞誘導遺伝子のゼブラフィッシュ初期発生と成体における発現

(代表) 浜田 愛子	(医学部 保健学科 検査技術科学専攻 2年)
渡辺 理沙	(医学部 保健学科 検査技術科学専攻 2年)
藤川 千恵子	(医学部 保健学科 検査技術科学専攻 4年)
田口 廣臣	(医学部 保健学科 検査技術科学専攻 4年)
野中 真澄	(医学部 保健学科 検査技術科学専攻 4年)
山下 友樹	(医学部 保健学科 検査技術科学専攻 4年)

### 指導教員

馬渡 一浩 (医薬保健研究域保健学系 准教授)

### 1. 背景と研究目的

哺乳類の発生初期の細胞は、全ての細胞に分化することができる全能性を持っている。しかし、一度分化のスイッチが入ると全能性を失ってしまう。このように、細胞は、発生が進むにつれてその性質が大きく異なってくる。その一例として、中枢神経ニューロンの軸索伸長能力が挙げられる。哺乳類の中枢神経ニューロンは、発生過程では軸索を伸長し神経回路網を形成していくが、成体になるとその伸長能力を失う。このことは、中枢神経の再生が困難な要因の一つである。一方、魚類の中枢神経ニューロンは、成魚になっても軸索伸長能力を有している (Arora and Sperry, 1957)。そのため、損傷をうけても再生が可能である。本研究では、哺乳類と魚類における中枢神経ニューロンの性質の違いが何に起因するかについて着目した。

iPS 細胞は、2007 年京都大学の山中教授らのグループによって樹立された分化万能性を有する細胞である (Takahashi et al., 2007)。この細胞は体細胞に *c-myc*、*KLF4*、*sox-2*、*OCT3/4* の 4 つの遺伝子を導入することで生み出された。これらの iPS 細胞誘導遺伝子を導入すると、体細胞が分化万能性をもつ iPS 細胞へと初期化される。我々は、魚類の中枢神経ニューロンは損傷を受けるとこれらの遺伝子が働くことで、ニューロンが初期化されたような状態となり、軸索伸長が可能になるのではないかと考えた。そこで、本研究ではゼブラフィッシュを用いて発生初期と成魚および視神経損傷網膜における iPS 細胞誘導遺伝子の発現について調べた。

### 2. 研究方法

#### 1) 実験動物

実験にはゼブラフィッシュ (*Danio rerio*, 体長 4-5cm) を使用した。飼育は 12 時間 -

1 2 時間の明暗サイクル、28℃の水槽中で行った。自然交配により得た初期胚は、目的の時間まで28℃のインキュベーター内で飼育した。氷水中で低温麻酔した魚の視神経を眼球より後方1mm以内で切断した。

## 2) RNA 調整

発生初期の RNA サンプルは、30匹の初期胚を用いた。ゼブラフィッシュの網膜 RNA サンプルは、水晶体を除去した眼球を試料とした。これらのサンプルからの全 RNA の抽出は、AGPC 法 (セパゾール RNA I Super) を用いて行った。

## 3) クローニング

RT-PCR 用のプライマーは GenBank (<http://www.genome.jp/en/>) に登録されている情報を参考に設計した。今回使用したプライマーの塩基配列を表 1 に示す。これらのプライマーとゼブラフィッシュ初期胚から得た全 RNA を用いて RT-PCR (TaKaRa RNA PCR Kit AMV Ver. 3.0, TaKaRa) を行った。増幅された cDNA 断片は Ligation

cmyc-a	Upper: 5'-GGC TAG CAA CAA TCA CAG CA-3'
	Lower: 5'-TAA TGT GAA CTC CGC AGC TG-3'
cmyc-b	Upper: 5'-GGT GTT TCC CTT TCC ACT GA-3'
	Lower: 5'-TTC TCT TTT CCA CCG TGA CC-3'
KLF4	Upper: 5'-ATG TGC CTC TTC ATG TGC AG-3'
	Lower: 5'-AGA TGG CGC TTC ATG TGC AG-3'
sox-2	Upper: 5'-CGC TCC AGT ACA ACT CCA TGA CC-3'
	Lower: 5'-TTA CAT ATG CGA TAA GGG CCT CGT GC-3'
OCT3/4	Upper: 5'-ACA ATC TGC CGC TTT GAG GC-3'
	Lower: 5'-TAG CTG GTG AGA TGA CCC AC-3'

表1 プライマーの塩基配列

-Convenience Kit (ニッポンジーン) を用いて pGEM-T EasyVector (Promega) にライゲーションした。このベクターを competent cell JM 109 (TOYOBO) にトランスフォーメーションしサブクローニングを行った。大腸菌からのプラスミドの抽出には、E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit (Omega Bio-tek) を用いた。

## 4) 塩基配列の解析

PCR で増幅させた cDNA 断片の塩基配列は、Dynamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences) を用い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析した。塩基配列の相同性はゲノムネットデータベース (<http://align.genome.jp/>) で調べた。

## 5) RT-PCR

mRNA の増幅は、RT-PCR 法 (TaKaRa RNA PCR Kit AMV Ver. 3.0, TaKaRa) で行った。mRNA 量は、PCR 産物のアガロースゲル電気泳動結果を Scion Image (Scion Corporation) を用いて定量化した。

## 3. 研究成果と考察

### 1) シーケンス解析

表 1 で示したプライマーを用い増幅した PCR 産物の塩基配列を決定した。その結果、今回得られた cmyc-a クローンは既知配列と 98% の相同性を示した (図 1)。さらに、cmyc-b、KLF4、sox-2、OCT3/4 全ての PCR 産物も既知配列と 98% 以上の相同性を示した。以上の結

果から今回設計したプライマーで目的遺伝子の特異的な増幅が可能であることがわかった。

```

myca      GGCTAGCAACAATCACAGCATCAACAGCAGCAGCAACAGGCATGTGAAGCAGCGCAA
Clone    GGCTAGCAACAATCACAGCATCAACAGCAGCA-----ACAGGCATGTGAAGCAGCGCAA
          *****
myca      GTGTGCGAGTCTCGCACATCGGATTCTGAGGACAATGACAAACGCAGGACTCACAATGT
Clone    GTGTGCGAGTCTCGCACATCGGATTCTGAGGACAATGACAAACGCAGGACTCACAATGT
          *****
myca      GCTGGAGCGACAGCGCAGGAATGAACTCAAACCTAGCTTTTTCGCGCTACGGGATGAGAT
Clone    GCTGGAGCGCCAGCGCAGGAATGAACTCAAACCTAGCTTTTTCGCGCTACGGGATGAGAT
          *****
myca      CCCTGAGGTCGCAATAACGAGAAAGCTGCTAAAGTGGTTATCCTAAAGAAGGCGACAGA
Clone    CCCTGAGGCCCGCAATAACGAGAAAGCTGCTAAAGTGGTTAACCTAAAGAAGGCGACAGA
          *****
myca      GTGCATCCACAGCATGCAGTTGGACGAGCAGAGGCTGCTGTCCATCAAAGAACAGCTGAG
Clone    GTGCATCCACAGCATGCAGTTGGACGAGCAGAGGCTGCTGTCCATCAAAGAACAGCTGAG
          *****
myca      GCGAAAGAGCGAACAGTTAAAACACAGGCTTCAGCAGCTGCGGAGTTCACATTA
Clone    GCGAAAGAGCGAACAGTTAAAACACAGGCTTCAGCAGCTGCGGAGTTCACATTA
          *****

```

図1 PCR産物と既知配列との相同性  
上段:既知配列 下段:PCR産物 相同性 98%

## 2) RT-PCR

### ①発生初期 (図2)

RT-PCR 法で発達段階の増殖期と分化期における山中因子mRNA 発現を調べた。増殖期のサンプルには受精後5時間の初期胚を、分化期のサンプルには受精後3日の稚魚を用いた。myc-a と myc-b mRNA については、増殖期で弱く分化期で強い発現が見られた。KLF4 mRNA 発現は、増殖期と分化期の間で大きな違いは見られなかった。対照的に sox-2 と OCT3/4 の mRNA 発現は sox-2 は分化期のみ、OCT3/4 は増殖期のみ発現が見られた。コントロールとして用いた GAPDH mRNA は増殖期と分化期の間で差は見られなかった。以上の結果から、iPS 細胞誘導遺伝子は4種とも異なる発現パターンを示すことがわかった。

増殖期 分化期

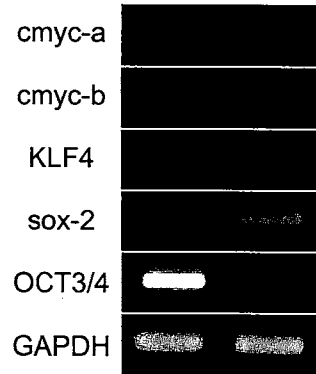


図2 発生初期の増殖期・分化期における mRNA の発現

### ②成魚ゼブラフィッシュ (図3)

成魚のゼブラフィッシュ網膜では、myc-a および c-mycb mRNA が比較的強く発現し、KLF4 と sox-2 mRNA はわずかな発現しかみられなかった。OCT3/4 mRNA の発現は全くみられなかった。

マーカー  
myc-a  
myc-b  
KLF4  
sox-2  
OCT3/4

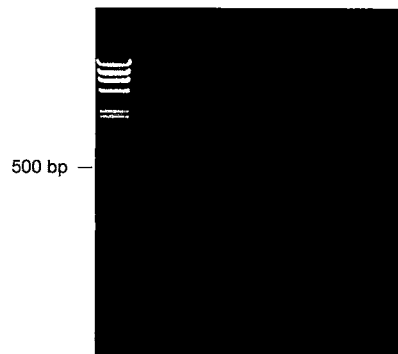


図3 成魚網膜における mRNA 発現

### ③視神経再生期 (図4)

発生初期の増殖期と分化期の両方で発現が見られ、成魚においても発現量の多かった myc-a と myc-b mRNA の発現について、成魚視神経切断後の網膜を用いて調べた。myc-a mRNA は視神経を切断後3、5、

10日でその発現量に変化は見られなかった。一方、*cmyc-b* mRNAは視神経切断後3日で増加傾向にあり、5日で有意な増加がみられた。この増加は10日で切断前のレベルに戻った。視神経切断後5日は視神経の再生軸索が伸長しはじめる時期であることから(Kaneda et al., 2008)、*cmyc-b*が視神経再生に関与していることが示唆された。

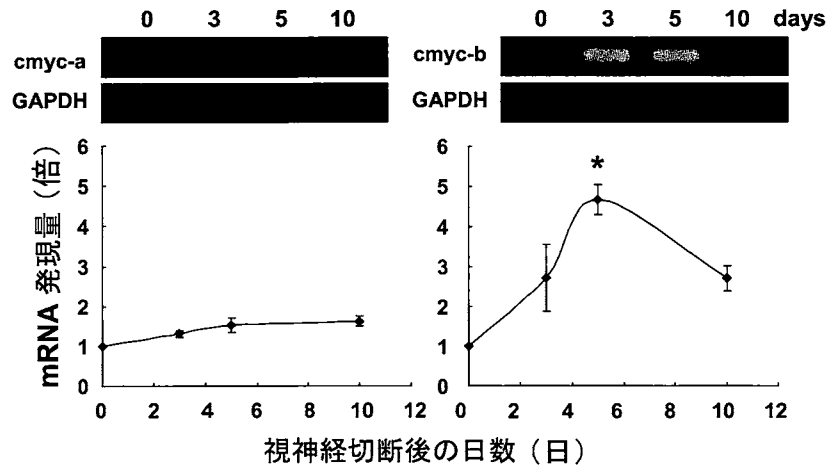


図4 視神経切断後のゼブラフィッシュ網膜における *cmyc-a*、*cmyc-b* mRNA 発現の経時変化

#### 4. 結論

本研究によって次のことが明らかになった。

- 1) 増殖期では、OCT3/4 mRNA が強く発現し、*sox-2* mRNA 発現は見られなかった。
- 2) 分化期では、*c-myc* と *sox2* の発現量が多く、OCT3/4 は見られなかった。
- 3) 成魚ゼブラフィッシュ網膜では、*cmyc-a*、*c-mycb* mRNA が強く発現し、*KLF4*、*sox-2* mRNA はわずかな発現しか見られなかった。OCT3/4 mRNA 発現は全く見られなかった。
- 4) 視神経切断後の網膜では、*cmyc-a* mRNA 発現量に変化はみられなかったが、*c-mycb* mRNA は処理後5日で4.5倍に増加していた。

今後はこれら遺伝子の視神経再生への関与を調べる目的で、*cmyc* 以外の遺伝子について、視神経切断後の発現量の変化やその局在など詳細な検討を行いたい。

#### 参考文献

1. Arora and Sperry, 1957. Myotypic respecification of regenerated nerve-fibers in cichlid fishes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* (5) 256-263.
2. Takahashi K et al., 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* (131) 861-872.
3. Kaneda et al., 2008. Changes of phospho-growth associated protein 43 (phospho-GAP43) in zebrafish retina after optic nerve injury: a long term observation. *Neurosci. Res.* (61) 281-288.