

論文内容の要旨

【目的】

モルホリノオリゴヌクレオチド (MO) は、標的 mRNA に結合し翻訳を阻害することにより遺伝子発現を抑制することができる。MO を用いた技術は、さまざまな脊椎動物の胚発生研究において成果をあげている。この研究でわれわれは、マウス着床前胚に対して MO を用いた簡易で効果的な遺伝子発現抑制法の開発を試みた。

【方法】

(1) 胚の準備・培養: マウス着床前胚は、in vitro fertilizationにより準備した。MO 処理のために2細胞期胚、桑実胚、胚盤胞は媒精 24 時間、72 時間、96 時間後にそれぞれ回収した。胚盤胞はマウス胚線維芽細胞フィーダー層上で4日間共培養した。(2) MO 導入: 胚への MO 導入は、導入試薬 ethoxylated polyethylenimine (EPEI) を用いた。胚への MO 導入の至適条件を設定するために、MO 濃度 (1, 2, 5, 10, 20 μ M)・EPEI 濃度 (0.14, 0.28, 0.56 μ M)・MO 処理時間 (3時間・24時間)・MO 処理回数 (1回・2回) について検討した。MO 処理は媒精 24 時間、72 時間、96 時間、144 時間後に実施し、胚盤胞に発育した胚の数と胚盤胞の追加培養4日後の派生物を形態学的に検討した。(3) 実験①: 桑実胚に対して、FITC を標識した MO (FITC-MO) を用い、上記の条件下で MO 処理を実施した。FITC-MO の細胞内への導入は共焦点レーザー顕微鏡により検討した。(4) 実験②: 内因性 Oct4 (標的遺伝子) の MO によるダウンレギュレーションについて検討した。MO 濃度 20 μ M, EPEI 濃度 0.56 μ M, 処理時間 3 時間の条件で媒精 24 時間、72 時間、96 時間、144 時間後に MO 処理し、胚盤胞の派生物を形態学的に、かつ蛍光免疫染色法により検討した。

【結果】

①MO 濃度 20 μ M, EPEI 濃度 0.56 μ M, 処理時間 3 時間の MO 処理が胚に対する毒性が最小限で、効果的に細胞内に MO を導入した。②桑実胚期での MO 処理は、Oct4 発現を抑制しなかった。2 細胞期での MO 処理は、胚盤胞期まで Oct4 発現を抑制したが、胚盤胞の追加培養4日後 Oct4 発現抑制は維持されなかった。2 細胞期と胚盤胞期での2段階 MO 処理は、Oct4 発現を抑制した。2 細胞期での MO 処理は胚盤胞期まで Oct4 を抑制し、胚盤胞期での2回目 MO 処理は、追加培養の4日間 Oct4 抑制を維持させることができた。この2段階処理による派生物の表現型は、Oct4 欠損胚と同じであった。

【結論】

EPEI を用いた MO 導入システムは、マウス着床前胚の遺伝子機能解析において簡易で、かつ効果的な技術であることが示された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2006 年 6 月 日 公表予定	出版物名 Tohoku journal of experimental medicine
	公 表 内 容	
	全 文	2006 年 6 月 日 発行予定

氏 名 辻 いさお 勲

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 医 第 8 9 5 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目 Inhibition of gene expression in mouse preimplantation embryos using morpholino antisense oligonucleotides
(モルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたマウス着床前胚の遺伝子発現抑制)

論文審査委員 (主 査) 教授 星 合 昊

(副主査) 教授 植 村 天 受

(副主査) 教授 義 江 修

論文審査結果の要旨

Eにホリオリゴヌクレオチド(MO)は、mRNAに結合し
 翻訳を阻害することにより遺伝子発現を抑制する
 この技術はさまざまな脊椎動物の発生研究に
 応用できているが、マウスでの報告は少ない
 この研究では導入試薬 EPEIを用いた MO 導入の
 内因性 Oocyte 遺伝子と標的遺伝子とで、マウス着床前胚
 にかつる遺伝子発現抑制に適用することからその
 検討を行った。
 その結果 2細胞期と胚盤胞期への2段階の
 MO 処理が、Oocyte 遺伝子発現を抑制することに
 成功した。この処理で胚盤胞期の Oocyte 蛋白の
 量は低下を認めた。胚盤胞培養4日後、
 胚の発生物は、トコホラス細胞に分化した。
 胚盤胞期で発生停止を起した。
 この表現型は Oocyte 受精卵と類似しているように
 思われた。
 EPEIを用いた MO 導入がマウス着床前胚にかつる
 遺伝子発現抑制に適用できることを証明した。
 この結果は学位論文の価値があると考え
 評価する。

氏名	正木 浩喜			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	医第896号			
学位授与の日付	平成18年3月22日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
学位論文題目	2型糖尿病モデルOLETFラットにおける性ホル モン異常の研究			
論文審査委員(主査)	教授	青木	矩彦	
(副主査)	教授	星合	昊	
(副主査)	教授	安田	佳子	