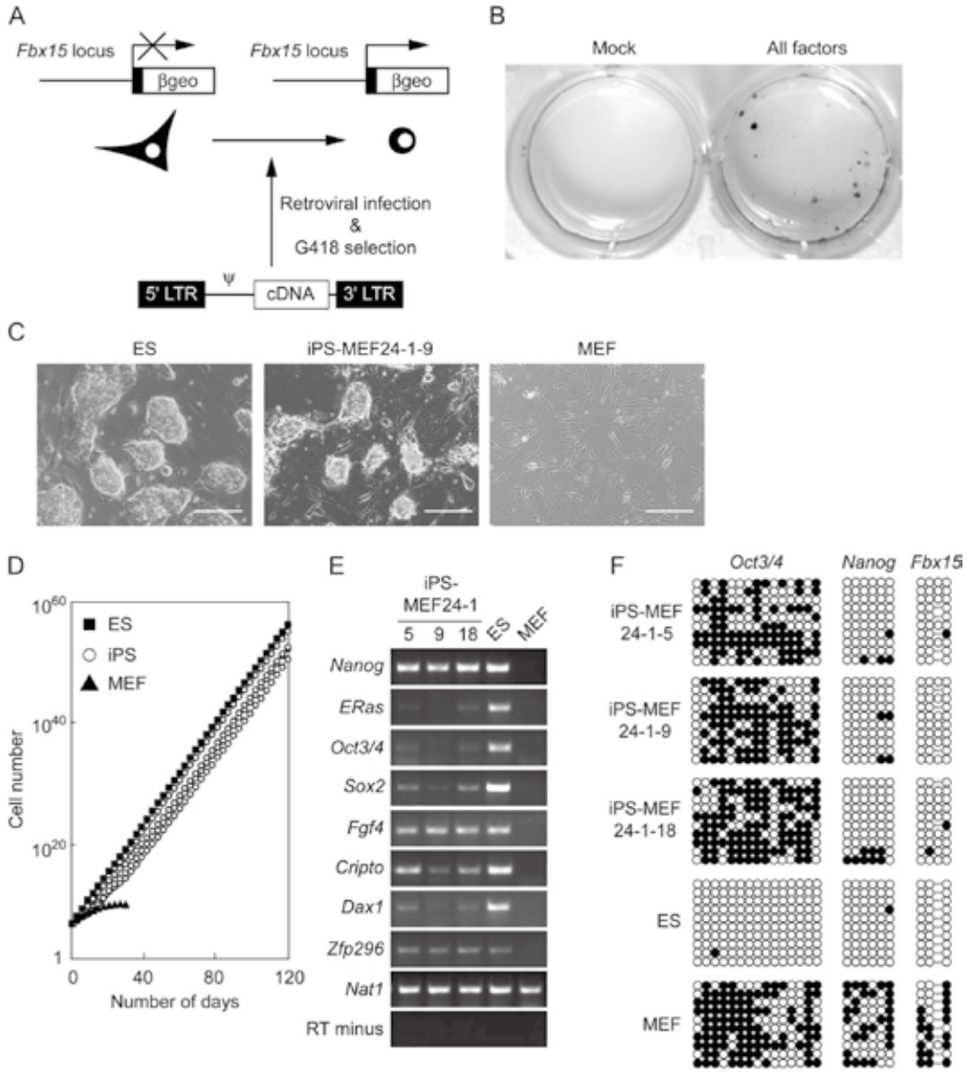


Figure 1. Generation of iPS Cells from MEF Cultures via 24 Factors

(A) Strategy to test candidate factors.

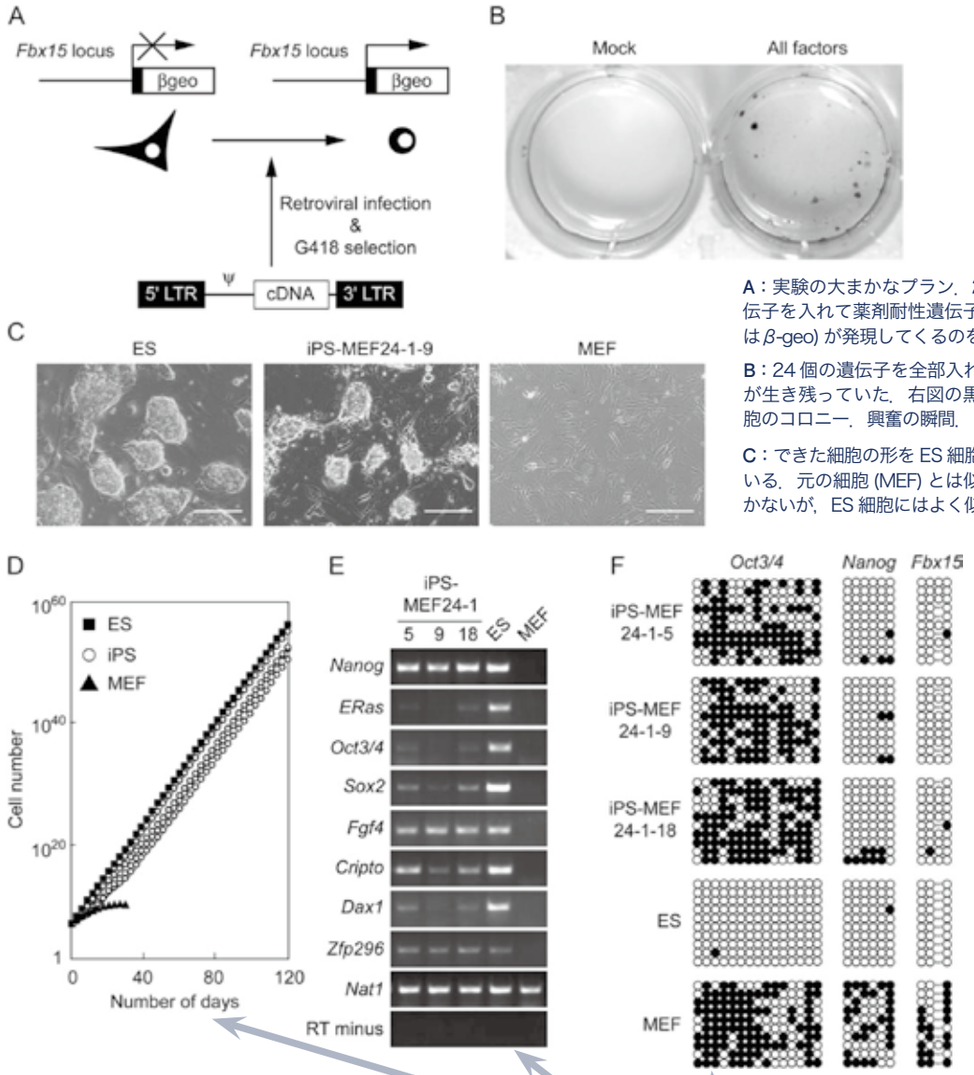
(B) G418-resistant colonies were observed 16 days after transduction with a combination of 24 factors. Cells were stained with crystal violet.

(C) Morphology of ES cells, iPS cells (iPS-MEF24, clone 1-9), and MEFs. Scale bars = 200 mm.

(D) Growth curves of EScells, iPS cells (iPS-MEF24, clones 2-1–4), and MEFs. 3×10^5 cells were passaged every 3 days into each well of six-well plates.

(E) RT-PCR analysis of EScell marker genes in iPS cells (iPS-MEF24, clones 1-5, 1-9, and 1-18), ES cells, and MEFs. Nat1 was used as a loading control.

(F) Bisulfite genomic sequencing of the promoter regions of Oct3/4, Nanog, and Fbx15 in iPS cells (iPS-MEF24, clones 1-5, 1-9, and 1-18), ES cells, and MEFs. Open circles indicate unmethylated CpG dinucleotides, while closed circles indicate methylated CpGs.



A：実験の大まかなプラン．24 個の遺伝子を入れて薬剤耐性遺伝子（ここでは β-geo) が発現してくるのを待つ．

B：24 個の遺伝子を全部入れたら細胞が生き残っていた．右図の黒い点が細胞のコロニー．興奮の瞬間．

C：できた細胞の形を ES 細胞と比べている．元の細胞 (MEF) とは似ても似つかないが，ES 細胞にはよく似ている．

図 1.　24 の因子による MEF 培養からの iPS 細胞の作製

(A) 候補因子の試験の戦略．

(B) G-418 耐性コロニーが，24 の因子の組み合わせの形質導入から 16 日後に観察された．細胞はクリスタルヴァイオレットで染色した．

(C) ES 細胞, iPS 細胞 (iPS-MEF24, クローン 1-9)および MEFs の形態．スケールバー =200 μm.

(D) ES 細胞, iPS 細胞 (iPS-MEF24, クローン 2-1-4）および MEFs の増殖曲線．3×10^5 細胞を 6 ウエルプレートの各ウエルに植え込んで, 3 日毎に継代した．

(E) iPS 細胞 (iPS-MEF24, クローン 1-5, 1-9 および 1-18)，ES 細胞および MEFs の ES 細胞マーカー遺伝子の RT-PCR 分析．Nat1 をサンプルの装填量の確認に使用した．

(F) iPS 細胞 (iPS-MEF24, クローン 1-5, 1-9 および 1-18)，ES 細胞および MEFs における Oct3/4, Nanog および Fbx15 のプロモーター領域の重亜硫酸塩ゲノムシークエンシング．白丸はメチル化されていない CpG ジヌクレオチドを示し，黒丸はメチル化された CpG を示す．

DEF：できてきた細胞と ES 細胞との比較．

D：ES 細胞の培養条件では ES 細胞と同じように iPS 細胞もよく増える．

E：しかし，未分化性の維持に関わる遺伝子の発現はここでは ES 細胞の方が高い．

F：DNA のメチル化状態を調べている．黒丸が多いほどメチル化されている．MEF 段階では黒丸が多い（メチル化されている）．一方 ES 細胞ではほとんど白丸（メチル化されていない）ばかり．リプログラミングとともに Nanog, Fbx15 遺伝子のメチル化が外れる事がわかる．この当時は Oct3/4 のメチル化は外れずに残っている．これも今では外れる事がわかっている．