

平成26年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	マンモス研究拠点の形成に向けて: YUKA マンモスのサンプルを用いたマンモスの総合的研究	
研究者所属・氏名	研究代表者: 生物理工学部・細井美彦 共同研究者: 生物理工学部・宮本裕史、永井宏平 先端技術総合研究所・入谷 明、三谷 匡、加藤博己、安齋政幸 医学部付属病院高度先端総合医療センター・竹原俊幸	

1. 研究目的・内容

本研究では、平成25年に入手に成功した YUKA マンモスに由来する保存状態の非常に良い軟部組織を用いて、その個体の再生を目指すとともに、マンモスとはどのような動物であったのかを遺伝子とタンパク質の2面から、深く探究する。

2. 研究経過及び成果

本年度は、YUKA マンモス組織から体細胞核の回収を目的に、筋肉組織からの体細胞核の回収を検討した。まず、標準試料として、死後4年経過したマウス筋肉(−20℃保管:大腿部)を用いて、細胞組織の溶解と筋肉繊維組織の膨潤を促進するため、ショ糖、酵素、界面活性剤等を用いて組織の溶解処理を行なったところ、界面活性剤処理において、体細胞核の回収が可能であることを明らかにした。また、本法(MIP法)を用いて、死後2ヶ月経過した、モルモットおよびラット筋肉(−20℃保管:大腿部)から同様の体細胞回収を試み、いずれの組織からも体細胞核の回収が可能であることを認めた。これらの結果、死後、2~48ヶ月経過した筋肉組織からの体細胞核の回収は可能であることが示された。次に、MIP法を用いた YUKA マンモス筋肉組織からの体細胞核の回収を検討したところ、夾雑物組織の遊離が極めて困難であるものの、回収した組織溶液内に単離した体細胞核の存在を認めた。また、得られた体細胞核を用いて、DAPI染色法によるDNAの検出を行った結果、体細胞核内にDAPIと結合するDNAが保持していることを認め、MIP法における YUKA マンモス由来体細胞核の回収に成功した。次に、組織内の脱水が進行し乾燥・硬化状態にある YUKA マンモスは、夾雑物が多く体細胞核の回収数が少ない。また、同様に人工的に作製した凍結真空乾燥由来筋肉組織においても夾雑物と脂質が分離した状態で観察されることを認めた。これらのことから、MIP法に替わる新たな体細胞核回収方法を検討したところ、硬化な組織片を物理的に破碎する方法(バイオマッシャー)において夾雑物の破碎が容易であり、YUKA マンモス組織から効率的に体細胞核の回収が可能となった。また、本法(TM法)により回収した体細胞核をDAPI染色法により、体細胞核内にDNAが保持していることを認めた。以上、本研究において2種の独立した体細胞核回収方法を開発することに成功した。なお、MIP法による体細胞核の回収方法による成果は、実験動物種を用いた成果報告を本年度、第19回日本野生動物医学会および第37回日本分子生物学会において、アジアゾウを用いた成果報告を平成26年度日本実験動物技術者協会関西支部広島大会において、それぞれ報告した。

また、マンモスを主とした希少動物の再生にむけて、ゾウを対象としたiPS細胞の作製を試みた。本年度は、アフリカサヴァンナゾウ耳介由来繊維芽細胞からiPS細胞の樹立を実施した。樹立方法は、Oct4・Sox2・Klf4・cMyc 遺伝子が組み込まれているレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、iPS細胞の樹立を試みた。導入3週間後において継代培養が可能な細胞集団を得ることができた。これらの細胞は、多能性幹細胞およびリプログラム時の初期の指標として知られているアルカリフォスファターゼ活性を有するか検定を行ったところ、陽性反応が観察された。しかしながら、iPS細胞の最大の特徴のひとつである分化能について検定を行ったところ、分化能を示さなかったことから、iPS細胞とは異なった不完全なリプログラムを引き起こした細胞株であると考えられた。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究では、貴重なマンモス組織を多量に使用することが困難であり、これまで申請者が開発した体細胞核回収方法においても回収された細胞核は極めて少ない。したがって、今後のマンモス組織内から回収される体細胞核を用いた詳細な正常性を評価することを目的として計画を進める。申請者は、これまで実験動物を用いた細胞間接着性を保持していない体細胞核に対する効率的な免疫組織化学的手法を開発した。申請者は、マンモス組織の代替として生理的寿命を終えた貴重な動物園動物を対象とする組織由来体細胞核の構造的正常性を検証する。さらに、核移植操作による再構築卵子の作製を検討することで研究資源としての展開を試みる。また、基礎研究の結果、筋肉組織由来体細胞核には核移植操作後、前核期への発生は認められているが、その後の胚発生は低率である。同様にマンモス由来核においては DNA 断片化と核膜の構造崩壊が進んでおり、仮に体細胞核移植を試みても再構築卵子の作製は困難である。今後、筋肉組織由来体細胞核のリプログラミング能を補完することによる発生改善を試みると共に、mRNA(Histone H2B-mRFP1 mRNA)注入により発生させた異種間体細胞核移植卵子のライブセルイメージング技術による体細胞核分裂機構の解明を試みる。

ゾウを対象とした iPS 細胞の作製の試みとしては、今後は染色体に組み込まれずがん化を引き起こしにくいとされているエピソーマルベクターを用いて樹立を試みる。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
第19回日本野生動物医学会	口頭発表(1件)	平成26年9月14日
第37回日本分子生物学会	ポスター発表(1件)	平成26年11月27日
平成26年度日本実験動物技術者協会 関西支部広島大会	口頭発表(1件)	平成26年11月29日
日本実験動物技術者協会関東支部第 40回懇話会	口頭発表(1件)	平成27年3月7日
近畿大学先端技術総合研究所紀要	原著論文(20:19-30.)	平成27年3月31日
第62回日本実験動物学会総会	ポスター発表(2件)	平成27年5月28~30日
第21回日本野生動物医学会総会	口頭発表(2件)	平成27年7月29~8月2日 (予定)
第108回日本繁殖生物学会大会	ポスター発表(1件)	平成27年9月17~20日 (予定)
第49回日本実験動物技術者協会総会	ポスター発表(1件)	平成27年10月9~10日 (予定)