

Mclr 遺伝子の増幅による各種マンモス軟組織の保存状態の検討

近藤 健二¹⁾、吉崎 匠²⁾、
加藤 博己³⁾、入谷 明³⁾

要 旨

本実験では、約 15,000 年前のマンモス皮膚、筋肉および骨髄の各組織の核 DNA の保存状態を解析する事を目的に、核 DNA に存在する Melanocortin type 1 receptor (*Mclr*) 遺伝子を PCR によって増幅し、その増幅の成否を検討した。その結果、骨髄組織由来 Total DNA を PCR の Template とした区においてのみ、目的とする 221bp の DNA 断片が増幅されたことから、マンモス骨髄組織に存在する DNA の保存状態は皮膚および筋肉組織に比べて良好であることが示された。しかし、骨髄組織由来 Total DNA を Template とした約 500bp 程度の DNA 断片を増幅する *Mclr* 遺伝子増幅プライマーを用いて PCR を行った結果、目的とする DNA 断片は増幅されなかった。以上の結果より、このマンモス組織においては、骨髄中の核 DNA は他の皮膚または筋肉組織中の核 DNA よりも保存状態が良いが、DNA の断片化が進行していることが示された。

キーワード：マンモス、PCR、*Mclr* 遺伝子

1. 緒 論

Wakayama らは、16 年間、 -20°C で凍結保存されたマウスから回収した脳細胞を用いて、核移植胚由来胚性幹細胞を経由する事により、正常なクローンマウスの作製に成功した¹⁾。また、Hoshino らも、10 年間、 -80°C で凍結保存されたウシ精巣周辺組織から培養に成功した体細胞を用いた核移植操作により、クローンウシの作製に成功した²⁾。これらの報告は、死後耐凍剤を用いずに凍結保存されていた組織または細胞から、細胞核を回収する事ができれば、体細胞核移植技術により個体を再生させることが可能であることを示している。

我々の研究グループは、2002 年にシベリアの永久凍土から発掘されたマンモス組織に由来する細胞核を体細胞核移植した際の核の初期の動態を観察することを目的に、マンモスの皮膚および筋肉組織由来細胞核をマウス除核未受精卵子に注入し、早期染色体凝集 (Premature Chromosome Condensation) ならびに前核様構造物の形成について検討した結果、皮膚および筋肉組織からの細胞核の回収には成功したが、回収効率は低く、それらを注入した卵子は、前核様構造物の形成には至らなかった³⁾。この結果から、このマンモスの皮膚および筋肉組織の保存状態は悪く、マンモスの再生には、さらに保存状態の良いマンモス組織の選定および効率的な細胞核の回収法の開発が必要であることが明らかとなった。

近年では遺伝子の解析技術が飛躍的に発達し、少量のサンプルから得られた非常に断片化の進んだ DNA サンプルでも塩基配列の決定が可能になっている。このような研究の潮流の中で、わずかな骨から、マンモスのミトコンドリアゲノム DNA の全塩基配列が解読された^{4), 5)}。また、2008 年には、80% 近くのマンモス核 DNA のドラフト配列が発表されており⁶⁾、マンモスの持っていた遺伝子の実像が明らかになる

原稿受付 2014 年 2 月 26 日

1. 近畿大学大学院 生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学 生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 近畿大学 先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

につれて、マンモスがどのような動物であったかという理解が深まりつつある⁷⁾。しかし、マンモスの遺伝子研究を効率よく行うためには、DNAの保存状態の良いサンプルを獲得することが不可欠である状況は変わらない。

本実験では、この約15,000年前のマンモスから回収した皮膚、筋肉および骨髄組織を用いた核DNAの保存状態を解析する事を目的に、核DNAに存在する事が報告されている *Mclr* 遺伝子⁸⁾ を、PCRによって増幅後、その成否を検討した。

2. 材料および方法

2002年8月にシベリアの永久凍土層から発掘され、国立環境研究所・柴田康之教授らによって約15,000年前のものであることが判明したマンモスの皮膚、筋肉および骨髄組織を実験に用いた³⁾。

(1) マンモス組織およびマウス尾部組織からのDNAの抽出

-80℃で凍結保存されたマンモスの皮膚、筋肉、骨髄組織および、B6C3F1 (C57BL/6N×C3H/HeN) 雌マウスの尾部をそれぞれ細切し、定法に従って Proteinase K (Nacalai tesque: 29442-85) および SDS (Sigma-Aldrich: L5750) を用いて組織を溶解し、Phenol/Chloroform (Nacalai tesque: 26829-96, 08042-55) 処理を行いタンパク質を除去し、その後エタノール沈殿により Total DNA を回収した。

(2) Total DNA の電気泳動

抽出したマンモス皮膚、筋肉、骨髄組織由来 Total DNA およびマウス尾部組織由来 Total DNA とその超音波破砕物を 5μg/μL の濃度に調整し、全量を電気泳動後、Ethidium Bromide (EtBr, Nacalai tesque: 14631-94) で染色し、Printgraph (ATTO) を用いて DNA の存在を確認した。

(3) PCR

本実験で PCR に用いたプライマーを、表 1 に示した。

表 1. *Mclr* 遺伝子 (GenomeNet Accession No.DQ648859) 増幅プライマー

プライマー Set	Tm 値	Product Size (bp)	Sequence (5' -3')
①	67.57	221	F : 5' -GCCACAATGCACTGACCAGA-3'
	66.1		R : 5' -GAGCTCATCCGGGATGGATA-3'
②	64.7	505	F : 5' - ACCTCTGTGACCCCTGTTCCA -3'
	64.8		R : 5' - CACAATGCTGTGGTAGCGAA -3'
③	66.2	521	F : 5' - TTGCAGTGGACCGCTACATC -3'
	65.0		R : 5' - CTTTGAGTGTCTTGCGGAGC -3'

F, Forward プライマー ; R, Reverse プライマー

各 DNA サンプル 3μL (10ng/μL) に、10μL の 2×Ampdirect Plus Buffer (SIMAZU: 241-08890-92)、Forward および Reverse プライマー (50μM) をそれぞれ 0.2μL (表 1)、0.1μL の Nova Taq DNA Polymerase (SIMAZU: 241-08890-92) および 6.5μL の滅菌水を加え、計 20μL の反応液を調製した。これらの反応液を 0.2mL の PCR チューブへ入れ、GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて PCR を行った。PCR 反応の温度条件は、図 1 に示した。PCR 後のサンプルは、電気泳動後、EtBr で染色し、Printgraph を用いて増幅された DNA 断片のバンドを確認した。

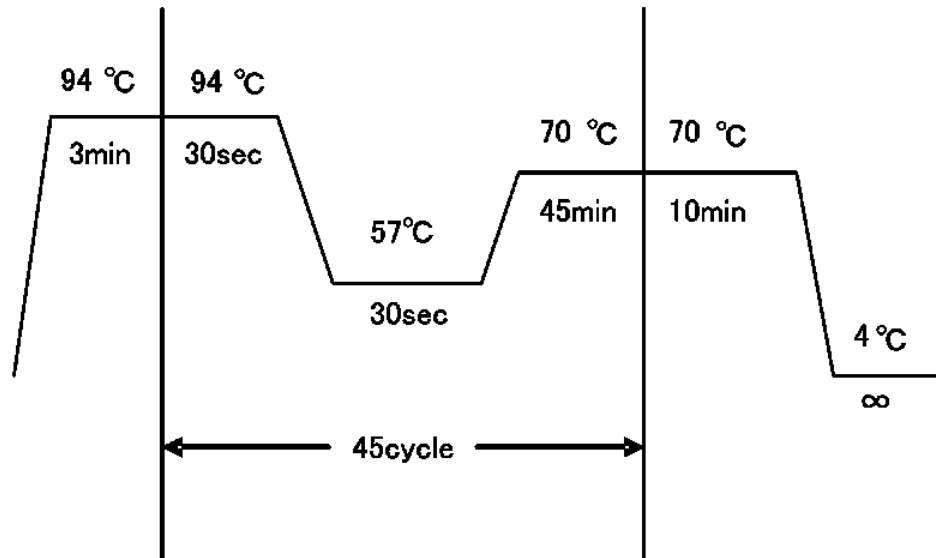


図1. PCRの反応温度条件

(4) 増幅されたDNA断片のクローニングとその塩基配列の決定

PCRにて増幅されたDNA断片は、UV照射下でメスを用いて目的の大きさのバンドを切り出した。続いて、GenElute™ Minus EtBr Spin Column (Sigma-Aldrich: 56501) を用いて、増幅されたDNA断片を含む溶液を回収した。エタノール沈殿後DNA断片を5 μ LのTEバッファー (pH8.0) に溶解し、使用時まで-20°Cで保存した。得られたDNA断片をpGEM®-T Easy Vector System I (Promega: A1360) を用いて、pGEM®-T Easy Vectorへライゲーションし、その後*E.coli* JM109 Competent Cells (タカラバイオ: 9052) へ導入しクローニングを行った。その後、定法に従ってクローニングされたDNA断片の塩基配列を、ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて決定した。

3. 結果

図2には、マンモス皮膚、筋肉および骨髄組織からTotal DNAを回収後、電気泳動を行い、検出されたDNAの状態を示した。対照区として、マウスTotal DNAサンプルおよびマウスTotal DNAを超音波破碎により人為的にDNAを断片化したサンプルを用いた。その結果、すべてのレーンでDNAの存在が確認された。また、マンモス皮膚と筋肉組織のTotal DNAを電気泳動したレーンでは、ゲルの上部で薄いバンドが存在した。マンモス骨髄組織のTotal DNAを電気泳動したレーンでは、約250bp以下にスメア状のDNAが存在した。

マンモス皮膚、筋肉および骨髄組織由来Total DNAをTemplateとして、*Mclr* 遺伝子増幅プライマーを用いてPCRを行った結果、マンモスの皮膚と筋肉組織由来Total DNAをTemplateとしてPCRを行った区では、目的とする221bpの長さのDNA断片は増幅されなかったが、マンモス骨髄組織由来Total DNAをTemplateとしてPCRを行った区では、目的とする長さのDNA断片が増幅された(図3)。しかし、マンモス骨髄組織由来Total DNAをTemplateとして、約500bpの長いDNA断片を増幅する*Mclr* 遺伝子増幅プライマーを用いてPCRを行った結果、目的とするDNA断片は増幅されなかった(図4)。

マンモス骨髄組織由来Total DNAをTemplateとして得られた221bpの長さのPCR産物をクローニングした後、その塩基配列を決定し(データ非表示)、得られた塩基配列をBLASTによって解析した結果、GenomeNetに登録されているマンモス*Mclr* 遺伝子の182番目の塩基配列から402番目の塩基配列との

相同性が 99.5% であった (データ非表示)。

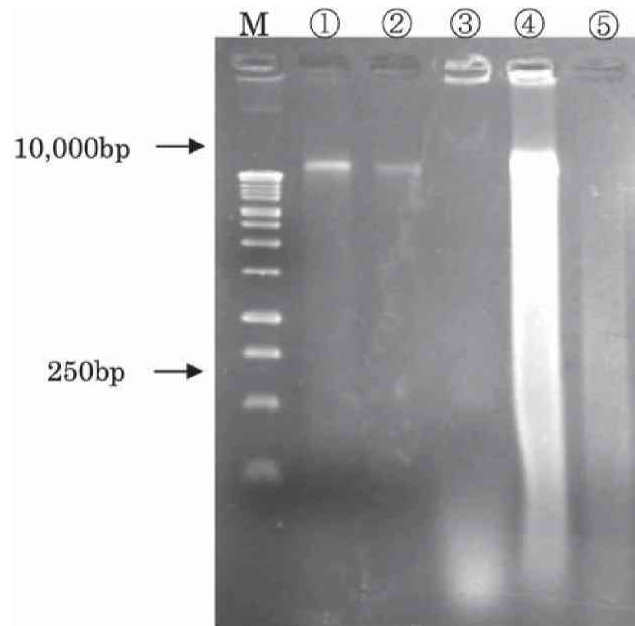


図 2. マンモス 各組織由来 Total DNA の電気泳動結果
Template DNA 量 (5 μ g/Sample)

M : 1kb DNA ラダーマーカー

① : マンモス筋肉組織由来 Total DNA

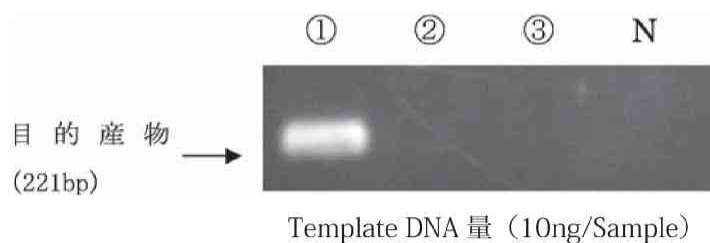
② : マンモス皮膚組織由来 Total DNA

③ : マンモス骨髄組織由来 Total DNA

④ : マウス尾部組織由来 Total DNA (対照区)

⑤ : 超音波破碎したマウス尾部組織由来 Total DNA (対照区)

図 3. *Mclr* 遺伝子増幅プライマーを用いた PCR 結果 (表 1. ①のプライマー Set を使用)



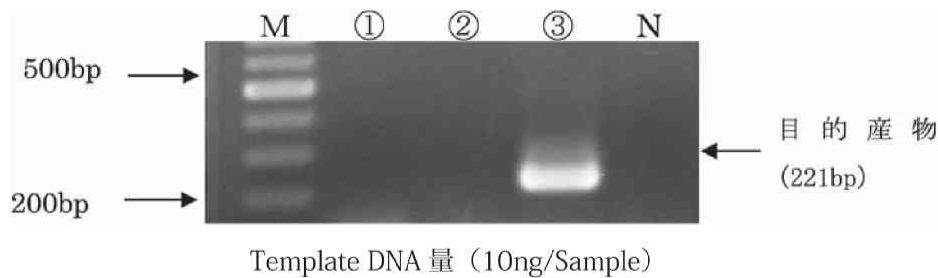
① : マンモス骨髄組織由来 Total DNA

② : マンモス筋肉組織由来 Total DNA

③ : マンモス皮膚組織由来 Total DNA

N : 滅菌水

図 4. 長い DNA 断片を増幅する *Mclr* 遺伝子増幅プライマーを用いた PCR 結果



M：100bp マーカー

①：*Mclr* 遺伝子増幅プライマー（表 1. ②のプライマー Set を使用：目的産物 505bp）

②：*Mclr* 遺伝子増幅プライマー（表 1. ③のプライマー Set を使用：目的産物 521bp）

③：*Mclr* 遺伝子増幅プライマー（表 1. ①のプライマー Set を使用：目的産物 221bp）

N：滅菌水

4. 考 察

回収されたマンモスの Total DNA を Template とした、それぞれ約 200bp の DNA 断片を増幅する *Mclr* 遺伝子増幅プライマーを用いた PCR を行った結果、マンモスの筋肉および皮膚組織由来 Total DNA を Template とした PCR を行った区では目的とする DNA 断片は増幅されなかったが、マンモス骨髄組織由来 Total DNA を Template とした PCR を行った区では目的とする DNA 断片が増幅された。この結果から、マンモス骨髄組織内には、皮膚および筋肉組織に比べて比較的損傷の少ない DNA が存在する可能性が示された。さらにマンモス骨髄組織由来 Total DNA を Template とした、約 500bp の DNA 断片を増幅する *Mclr* 遺伝子増幅プライマーを用いた PCR を行った結果、バンドは検出されなかった。この結果から、我々が所有するマンモス骨髄組織内には、200bp 前後の DNA 断片は存在しているが、500bp 以上の DNA 断片は存在せず、DNA 断片化がかなり進んでいる可能性が考えられた。また、体細胞核移植技術を用いたマンモスの再生に使用するドナー細胞として、骨髄組織が皮膚や筋肉組織よりも適している可能性が示された。骨髄は皮膚や筋肉に比べてリン酸カルシウムの硬い骨質に囲われているために比較的保存状態が良いと考えられる。また、動物の骨髄は個体の成長につれて造血組織である赤色骨髄から脂肪組織である黄色骨髄へと変化し、黄色骨髄には脂質が多く含まれる。Wakayama らの報告でも、 -20°C と比較的高温で 16 年間凍結保存されたマウスから回収した各組織由来の体細胞核を用いた体細胞核移植の研究では、脂質の割合が最も高い組織である脳から採取された細胞核を用いた場合が最も体細胞核移植後の再構築胚の発生が優良であった²⁾。

5. 結 論

今後マンモスのように永久凍土中で比較的高温下 (-10°C) から発掘された動物個体から回収された細胞核を用いた体細胞核移植や遺伝子に関わる研究を行う場合、骨髄組織に由来する細胞から DNA を回収して使用することが、よりよい結果をもたらす可能性が示唆された。

6. 参考文献

- 1 . Wakayama S, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Iwaki T, Kanagawa O, Wakayama T. (2008). Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 17318-17322.
- 2 . Hoshino Y, Hayashi N, Taniguchi S, Kobayashi N, Sakai K, Otani T, Iritani A, Saeki K. (2009). Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a -80 degrees C freezer for a decade. *PLoS One* 4 (1): e4142.
- 3 . Kato H, Anzai M, Mitani T, Morita M, Nishiyama Y, Nakano A, Kondo K, Lazarev PA, Ohtani T, Shibata Y, Iritani A. (2009) Recovery of cell nuclei from 15,000 years old mammoth tissues and its injection into mouse enucleated matured oocytes. *Proc Jpn Acad Ser B*. 85, 240-247.
- 4 . Krause J, Dear PH, Pollack JL, Slatkin M, Spriggs H, Barnes I, Lister AM, Ebersberger I, Pbo S, Hofreiter M. (2006) Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* 439, 724-727.
- 5 . Rogaev EI, Moliaka YK, Malyarchuk BA, Kondrashov FA, Derenko MV, Chumakov U, Grigorenko AP. (2006) Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*. *PLoS Biol* 4, e73.
- 6 . Miller W, Drautz DI, Ratan A, Pusey B, Qi J, Lesk AM, Tomsho LP, Packard MD, Zhao F, Sher A, Tikhonov A, Raney B, Patterson N, Lindblad-Toh K, Lander ES, Knight JR, Irzyk GP, Fredrikson KM, Harkins TT, Sheridan S, Pringle T, Schuster SC. (2008) Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* 456, 387-390.
- 7 . Campbell KL, Roberts JE, Watson LN, Stetefeld J, Sloan AM, Signore AV, Howatt JW, Tame JR, Rohland N, Shen TJ, Austin JJ, Hofreiter M, Ho C, Weber RE, Cooper A. (2010) Substitutions in woolly mammoth hemoglobin confer biochemical properties adaptive for cold tolerance. *Nat Genet*. 42, 536-510.
- 8 . Römpler H, Rohland N, Lalueza-Fox C, Willerslev E, Kuznetsova T, Rabeder G, Bertranpetit J, Schöneberg T, Hofreiter M. (2006). Nuclear Gene Indicates Coat-Color Polymorphism in Mammoths. *Science* 313, 62.

英文抄録

Analysis of the conservation state of 15,000 years old mammoth soft tissue
by the amplification of *Mclr* geneKenji Kondo¹⁾, Takumi Yoshizaki²⁾, Hiromi Kato³⁾ and Akira Iritani³⁾**Abstract**

In this study, to analyze the conservation state of 15,000 years old mammoth skin, muscle and bone marrow tissue by PCR, we tried to amplify the DNA fragment of *Melanocortin type 1 receptor (Mclr)* gene which exists in the cell nuclear. In results, only in the reaction in which the total DNA from the mammoth's bone marrow was used as the template of PCR, the 221bp DNA fragment was amplified. However, when we tried to amplify longer DNA fragment (about 500bp in length) of *Mclr* gene, no DNA fragment was amplified by PCR even when the total DNA from the mammoth's bone marrow was used as the template of PCR. From these results, it was suggested that the conservation state of the bone marrow is better than the skin and muscle tissue, however, the fragmentation of nuclear DNA was also heavily progressed in the bone marrow tissue.

Key words: mammoth, PCR, *Mclr* gene

1. Division of Biological Science, Graduate School of Biology Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

2. Department of Genetic Engineering, Faculty of Biology Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

3. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 642-0017, Japan.

