

平成 28 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 遺伝子工学科 教授 細井美彦 共同研究者：生物理工学部 遺伝子工学科・教授 宮本裕史、講師 永井宏平 先端技術総合研究所・客員教授 入谷 明、教授 三谷 匡、教授 加藤博己、 准教授 安齋政幸 医学部付属病院高度先端総合医療センター・助教 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二面から、深く探究する。

2. 研究経過及び成果

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ことで、絶滅動物であるマンモス組織再生への可能性を検討した。まず、これまでの研究成果を踏まえ、従来の体細胞核移植操作（ホノルル法）において作製された再構築卵子は、その後の発生能が著しく低下することを認めている。一方、HDACi 添加による発生改善は同種間において発生改善は可能であるがアセチル化の機能改善は限定的である。申請者らのグループでは、ヒドロシキラジカルの抑制と DNA 新規メチル化の活性改善に培地中への HDACi と水溶性ビタミンの添加により同種間クローンの作製を大幅に改善することを示した。本新規核移植法を用いて異種・異属間核移植をおこなった結果、異種間核移植では、活性化処理後 2 細胞期胚への発生改善が確認された。さらに、異属間核移植では、これまで発生を認めてない野生マウス由来ドナー核において、発生後期への進行(5%: 2/44)が改善される新しい知見を得た。また、異種・異属間核移植においても、新規メチル化(H3K9me3)の発現低下が同種間核移植と同様であることを明らかにした。次に、昨年度マンモス筋肉組織から体細胞核の回収方法を開発し、それら体細胞核を用いて体細胞核内における内部構造の動態を検討している。本年度は免疫組織染色操作のさらなる改善を施し、明確に Histone H3 及び膜タンパク質 (Lamin B2) の共局在を示す体細胞核像の検出に成功した。さらに、ライブセルイメージング技術によって、異種間体細胞核移植後の卵子にはマンモス由来 DNA の存在を示す結果を得た。

また、iPS 細胞技術を利用した希少動物の再生を目的に、様々な動物由来の細胞を用いて 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に加えて、レッサーパンダ、アミメキリンの耳介由来繊維芽細胞から iPS 細胞の樹立を試みた。樹立方法は、ヒト *Oct4*・*Sox2*・*Klf4*・*LMyc*・*Lin28*・マウス *p53DD* 遺伝子が組み込まれているエピソーマルベクターを用いて遺伝子導入を行い、iPS 細胞の樹立を実施した。同法を用いてコントロールとしてヒト線維芽細胞から iPS 細胞の作出を試みたところ、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、多能性幹細胞のマーカー遺伝子の発現が示され、維持培養が可能であることから体細胞から iPS 細胞にリプログラムできていると考えられた。しかしながら、アフリカサヴァンナゾウ、レッサーパンダおよびアミメキリン由来の細胞からは、初期コロニー様の細胞は認められたが、その後維持することができなかった。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

以前の研究では、マンモス由来組織から得られる個体再生へ繋がる情報の獲得は、ほぼ不可能とされていた。今回の研究申請では、発掘された保存状態の良好な組織の分与のみならず研究スタッフの先鋭なアイデアによってマテリアルの改善が飛躍的に進み、「タンパク質質量分析・DNA次世代シーケンス・体細胞核機能動態評価・新規細胞樹立」といった、これまでにない新たな情報が確認された。また、将来絶滅の危機に瀕する動物種について、複数の動物園と連携して提供された動物組織を遺伝資源保存のみならず積極的に研究資源としての活用方法を見出した。これらの研究の一部は、本学と（株）アワーズ「和歌山アドベンチャーワールド」との連携協定締結に至っている。今後、この研究成果を踏まえ、異種・異属間核移植における新規 DNA メチル化の評価をおこないクローン胚の発生改善や遺伝資源の再生として医学部と連携した細胞技術の確立を検討することで、将来に渡る持続可能な遺伝資源研究の基盤を構築したい。また、本年度の研究の結果から、動物種が異なることで iPS 細胞を取り巻く未分化維持機構が異なり、ヒトだけでなく様々な動物において保存されているリプログラム関連遺伝子の発現機構あるいは培養環境の適正化が各種動物の iPS 細胞の樹立には必要であるため、その基礎研究を実施したい。

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 63 回日本実験動物学会総会	ポスター発表 (3 件)	平成 28 年 5 月 18~20 日
第 22 回日本野生動物医学会総会	ポスター発表 (1 件)	平成 28 年 9 月 16~18 日
第 50 回日本実験動物技術者協会総会	ポスター発表(1 件)	平成 28 年 9 月 29~10 月 1 日
ICZ22 ZSJ87 joint meeting 2016	ポスター発表(1 件)	平成 28 年 11 月 16~19 日
第 39 回日本分子生物学会年会	ポスター発表 (1 件)	平成 28 年 11 月 30~12 月 2 日
平成 28 年度日本実験動物技術者協会 関東支部第 42 回懇話会	口頭発表 (1 件)	平成 29 年 3 月 18 日
第 64 回日本実験動物学会総会	ポスター発表 (2 件)	平成 29 年 5 月 25~27 日
近畿大学生物理工学部平成 28 年度 第 3 回公開講座	講演	平成 28 年 6 月 20 日
近畿大学先端技術総合研究所紀要	調査報告(22:25-34)	平成 29 年 3 月 31 日