

# 平成 30 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	展示動物からの細胞・配偶子を用いた新規生物多様性保全技術の開発と動物園・水族館との統合研究連携モデルの構築	
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 三谷 匡 共同研究者：先端技術総合研究所生物工学技術研究センター 教授 加藤 博己 生物理工学部 遺伝子工学科 教授 松本 和也 先端技術総合研究所生物工学技術研究センター 准教授 安齋 政幸 生物理工学部 遺伝子工学科 准教授 山縣 一夫 生物理工学部 遺伝子工学科 講師 宮本 圭 先端技術総合研究所生物工学技術研究センター 講師 黒坂 哲 先端技術総合研究所生物工学技術研究センター 講師 松橋 珠子 医学部附属病院高度先端総合医療センター 助教 竹原俊幸 農学部 バイオサイエンス学科 講師 岡村 大治	

## 1. 研究目的・内容

現在、地球上で多くの動物が絶滅の危機に瀕しており、生物多様性の維持に向けた取組は急務である。しかし、ワシントン条約による商取引の禁止や繁殖・増産技術が未確立であることから、域外保全事業は困難な状況に直面している。本研究は、近畿大学と包括連携協定を締結したアドベンチャーワールド（株）アワーズ）をはじめ国内の動物園・水族館と連携し、展示動物を対象に最先端の動物生命工学を駆使して、展示動物の域外保全のプラットフォームとなる生殖工学・発生工学の基盤技術を研究開発するとともに、橋渡し研究を通じて国内の横断的な域外保全事業を担う人材育成に資する。本研究では、①展示動物からの細胞・配偶子の採取と生殖・発生工学技術に基づく人工繁殖技術の開発、②展示動物からの細胞核の回収と機能修復技術の開発、③分化細胞の遺伝子発現プログラムの書き換えによる全能性再獲得誘導技術の開発、④展示動物からの iPS 細胞・ES 細胞の開発と当該幹細胞からの配偶子の作製をめざす。

## 2. 研究経過及び成果

【課題 I】 展示動物からの細胞・配偶子の採取と生殖工学技術に基づく人工繁殖技術の開発

アドベンチャーワールドと連携し、バンドウイルカおよびキングペンギンについて射出精液の凍結保存操作の検討を行った。

(1) バンドウイルカ射出精液の凍結保存技術の開発

バンドウイルカは、日本動物園水族館協会（JAZA）加盟施設では捕獲動物の受け入れができなくなったことから人工繁殖技術の開発が急務である。そこで、射出精液の凍結保存技術の普及要件として、①低コストであること、②保存操作が短時間ですむこと、③高価な機器を要さないこと、④手順のマニュアル化とデバイスや保存液の共通化を念頭に検討を行った。

平成 30 年度は、市販の精子保存液（株）日本医科器械製作所）にて凍結保存をおこない、融解後運動性の高い精子の回収に成功した。採精から保存操作まで約 1 時間程度で完了し、保存液も安価であることから、本邦の動水族園への普及に資すると考えられる。さらに、本法のマニュアル化を進め、簡易ビデオマニュアルを作成した。

(2) キングペンギン射出精液の凍結保存技術の開発

JAZA 加盟動水族園において、キングペンギンはアドベンチャーワールドが血統登録機関に選定されている。そこで、バンドウイルカで設定した①～④の要件に加え、⑤グリセリンを含まない保存液の開発、⑥夾雑物の除去方法、⑥融解後、直ちに人工授精に使用できる凍結デバイスの選択、を念頭に検討を行った。

キングペンギンは季節繁殖性を有することから、実験期間を期ごとで記す。本課題の研究期間

の前年度（第1期（2017年12月～2018年2月））において、グリセリンを除き DMSO とラフィノースを組み合わせた凍結保存液を作製し、凍結デバイスとしてストローを用いて保存した。融解後、生存精子が確認され、運動能は約 2 時間保持されていた。さらに、精子回収方法と精子保存方法のマニュアルならびに簡易ビデオマニュアルを作成した。第2期（2018年5月）および第3期（2018年12月～2019年1月）は、精液希釈液と凍結保存液の改良について検討した。精液希釈液の至適浸透圧は 270-330mOsm 程度であり、既知の BPSE 溶液をベースに改良を進めた。保存液については、DMSO+ラフィノースに代わりセルバンカーで実施した結果、融解後運動性を保持していることが確認された。

[課題Ⅲ] 分化細胞の遺伝子発現プログラムの書き換えによる全能性再獲得誘導技術の開発

始原生殖細胞は「単分化能性」でありながら、Oct4 や Sox2 などの多能性関連分子のすべてを発現していることから、再プログラム化におけるエピジェネティック修飾やシグナル伝達経路の一部を人為的に誘導・阻害することにより、始原生殖細胞からの多能性幹細胞化が実現可能ではないかと考えた。平成 30 年度において、p38 MAP kinase 阻害剤を培養下に添加することで、マウス始原生殖細胞から従来の EG 細胞とは異なる多能性幹細胞を作製することに成功した。当該多能性幹細胞は、従来のナイーブ・プライム型とは大きく異なる性質を有しており（未公表データ）、「多能性スペクトル」を研究する有用なモデルになることが期待される。

[課題Ⅳ] 展示動物からの iPS 細胞・ES 細胞の開発と当該幹細胞からの配偶子の作製

平成 30 年度は、アフリカサヴァンナゾウ耳介由来細胞からの iPS 細胞の樹立について、第三世代リプログラミングシステムとして開発された self-replicative RNA transfection 法を用いて試みた。ヒト OCT4, SOX2, KLF4, GLIS1 遺伝子および B18R RNA をアフリカゾウ線維芽細胞に導入後、細胞の増殖が促進された。一方で、細胞死が強く認められ、iPS 細胞の獲得には至らなかった。ゾウなどの大型動物ではがん抑制遺伝子のひとつである p53 遺伝子の機能が亢進していることが明らかとなっており、過剰な p53 の活性化が細胞死につながった可能性が考えられた。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

[課題Ⅰ] 展示動物からの細胞・配偶子の採取と生殖工学技術に基づく人工繁殖技術の開発

精子保存液の改良とマニュアル化を進める。さらに、アドベンチャーワールドにおいて雌イルカを選定し、凍結融解精子を用いたバンドウイルカの人工繁殖技術の確立を目指す。また、高解像蛍光顕微鏡および透過型・走査型電子顕微鏡を用いた精子の形態学的解析を試みる。キングペンギンについては、射出精液に混入した腸内細菌叢の除去と尿酸の影響の低減を図り、抗生物質の組み合わせや尿酸の除去方法について改良を加えていく。

[課題Ⅱ] 展示動物からの細胞核の回収と機能修復技術の開発

連携する動水族園からの死亡個体の提供に応じて、随時、細胞核の回収を試みる。

[課題Ⅲ] 分化細胞の遺伝子発現プログラムの書き換えによる全能性再獲得誘導技術の開発

マウス始原生殖細胞の「再プログラム化」により樹立された多能性幹細胞と従来のナイーブ・プライム型多能性幹細胞とを比較し、「多能性スペクトル」の姿を明らかにしていく。

[課題Ⅳ] 展示動物からの iPS 細胞・ES 細胞の開発と当該幹細胞からの配偶子の作製

リプログラミング過程における p53 遺伝子の発現上昇を適正に抑制できるシステムの構築を実施し、iPS 細胞の誘導を行う。

### 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）
日本実験動物技術者協会 関東支部会報 184: 16-19	会報	2018年
第2回野生動物保全繁殖研究会	ポスター発表	2018年7月12～13日
第2回野生動物保全繁殖研究会	ポスター発表	2018年7月12～13日
第24回日本野生動物医学会大会	ポスター発表	2018年8月31日～9月3日
日本分子生物学会	ワークショップ (口頭発表)	2018年11月29日
Developmental Biology 446: 43-55	原著論文（査読有）	2019年2月1日