

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	マンモスおよび希少動物の再生に向けて：異種間核移植法と iPS 細胞を介した配偶子作成法の確立	
研究者所属・氏名	研究代表者：先端技術総合研究所・教授・加藤博己 共同研究者：先端技術総合研究所・教授・入谷 明、教授・宮下 実、講師・安齋政幸 生物理工学部 遺伝子工学科・准教授・岸上哲士 附属生石農場・准教授・岸 昌生 医学部附属病院 高度先端総合医療センター 再生医療部・助教・竹原俊幸	

### 1. 研究目的・内容

<p>本研究では、現有するマンモスおよび希少動物の組織サンプルから、個体再生を目指して、</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① マンモスおよび希少動物の培養細胞を核ドナーとする異種間核移植を行い、ハイブリッド胚の発生能力を検討することによってマンモスおよび希少動物の再生方法を確立する。</li> <li>② マウス iPS 細胞またはマンモスおよび希少動物の細胞から樹立した iPS 細胞を、遺伝的に配偶子または性腺を欠損するマウス胚盤胞期胚へ移植し、胚盤胞補完法により希少動物 iPS 細胞から配偶子を形成する技術を開発する。</li> <li>③ 希少動物の細胞から得られたゲノム DNA を用いて、各種における PCR による性判別法を確立する。以上の3項目について実験を行う。</li> </ol>
--

### 2. 研究経過及び成果

<p>①に関連した研究では、平成 23 年に樹立された初代培養細胞を用いて異種間核移植を行い、作製された再構築胚の発生能力の検討とその改善を行った。アライグマの初代培養細胞を核ドナー細胞とし、マウスの未受精卵細胞質をレシピエント細胞質として用いた異種間核移植を行い、再構築胚を作製した。異種間核移植胚は、生存した再構築胚のうち 69% (51/74) の胚が 2 細胞期にまで発生したが、発生はそこで停止し、4 細胞期へは発生しなかった。この発生停止現象を改善するため、ヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチン A(5nM)で再構築胚を処理したが、発生は改善されなかった。また、異種間核移植胚における核 DNA 上にコードされている遺伝子とミトコンドリア DNA 上にコードされている遺伝子の不調和により再構築胚の発生が低率である可能性を考え、核ドナー細胞であるアライグマ培養細胞からミトコンドリアを回収し、核移植を行う際にレシピエント細胞質へ核とミトコンドリアを共注入して再構築胚を作製した。生存した再構築胚のうち 45% (25/55) の胚が 2 細胞期にまで発生したが、発生はそこで停止し、4 細胞期へは発生しなかった。</p> <p>②に関連した研究では昨年度に引き続き、マンモス等の希少動物再生にむけて iPS 細胞の樹立方法の確立を行うために、マンモスと同亜科であるマルミミゾウを材料とし、iPS 細胞の樹立を試みた。昨年度までの研究結果から、iPS 細胞の樹立に使用するウイルスベクターは、感染力が強いとされている「レトロウイルスベクター」が適しており、導入する遺伝子は山中 factor である <i>Oct4・Sox2・Klf4・cMyc</i> を基本的な遺伝子の組み合わせとした。また、ウイルス感染初期に確実に遺伝子が導入されているか、また初期化が起こった後に外来遺伝子のサイレンシングが行われているかを確認できるように <i>GFP</i> 遺伝子をレポーター遺伝子とし、5 遺伝子を同時に導入した。導入後 2 週間後に様々な細胞集団 (コロニー) の出現が認められた。そのうちのひとつのコロニーは継代培養後も安定的に増殖し、株化まで至った。しかしながら、この細胞株は多能性幹細胞の特徴のひとつであるアルカリフォスファターゼ活性を持たず、さらにコロニーの形態が iPS 細胞とは異なるものであった。さらに、多能性幹細胞の性質を表す分化能についても検討したが、様々な細胞への分化能は持ち合わせていないことがわかった。この細胞株は、ヒトなどにおいても同様に出現するものであり、初期化に失敗した細胞であると思われる。しかしながら、<i>GFP</i> 陽性細胞の存在を確認できていることから遺伝子の導入は正常に行われていると考えられる。また同時に今回用いている方法が iPS 細胞の樹立に適しているか検証するため、実験に用いている繊維芽細胞と同じ細胞系譜のヒト繊維芽細胞を材料に iPS 細胞の樹立を試みたところ、アルカリフォスファターゼや多能性関連遺伝子の発現、さらに外来遺伝子のサイレンシングを起こしているヒト iPS 細胞が得られた。</p> <p>以上のことから本法で用いている方法は iPS 細胞の樹立に適した方法であるが、何らかの問題によってゾウ細胞の初期化を起こすまでに至っていないことから、これらを解決することが必要である。</p> <p>③に関連した研究では、平成 24 年度はアドベンチャーワールドから分与されたエミュー、オニオオ</p>
--

ハシ、ルリコンゴウインコ、ベニコンゴウインコおよびカンムリヅルの各種鳥類の羽軸からゲノム DNA を抽出した。得られた DNA をテンプレートとして鳥類の性染色体である Z および W 染色体上に存在する *Chromo-helicase-DNA binding protein (CHD)* 遺伝子の配列を基にして作成されたプライマー(Fridolfsson and Ellegren, 1999)を用いて PCR を行い、増幅された DNA 断片の長さを検討することによって鳥類の雌雄判別の可否を検討した。使用した鳥類のうちオニオオハシ、ルリコンゴウインコ、ベニコンゴウインコおよびカンムリヅルにおいてはこの方法で個体の雌雄を判別することができた。しかし、平胸類であるエミューではこの方法では雌雄の個体からそれぞれ増幅される DNA 断片の長さに差が無いため、雌雄判別はできなかった。そこで、エミューについては de Kloet(2001)によりデザインされた *ESEX* 遺伝子の断片を増幅するように設計されたプライマー EF9 および ER10 を用いて PCR を行い、増幅された DNA 断片を制限酵素 *Bgl*II を用いて切断することによって、エミュー各個体の性を判別した。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

①に関連した研究は、これまでに確立した各種動物の初代培養細胞を核ドナーとしマウス卵を細胞質レシピエントとする異種間核移植を行い、作製したハイブリッド胚の発生能力の改善を再構築胚の TSA 処理時間および濃度を検討することにより行う。また、同種細胞由来のミトコンドリアおよびリボソームの核との共注入による再構築胚の発生能力の改善についても各種条件を検討して行っていく。更に、胚盤胞補完法を用いた配偶子作成法の実験についても実施していく。

②に関連した研究は、引き続きゾウ繊維芽細胞より iPS 細胞の樹立を試みる。本年度で使用した方法はヒトにおいて iPS 細胞の樹立が可能であることから、引き続き同方法を用いて iPS 細胞の樹立を試みる。また、サイなどの種では、ヒトと比較して非常に初期化を引き起こす率が低いことが報告されていることから、ゾウにおいても同様な現象が生じている可能性がある。そこで、樹立効率を向上させる追加遺伝子や HDAC 阻害剤処理等の方法を利用し、初期化を向上させる検討を行う。また、今後出現したコロニーについても引き続き細胞の詳細な特性解析を行う。

③に関連した研究は、天王寺動物園から提供された雌雄のキーウィーの羽軸サンプルから DNA を抽出し、*CHD* 遺伝子および *ESEX* 遺伝子の塩基配列を決定してそれらの遺伝子の塩基配列の雌雄差を決定し、キーウィーにおける分子生物学的な雌雄判別法を確立する。

### 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)