

# 平成25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

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、

- 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。
- 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。
- 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った。

## 2. 研究経過及び成果

①に関した研究では、異種間核移植胚におけるヘテロプラスミーの改善を目的として、レシピエント細胞質として用いるマウス未受精卵中のミトコンドリアを減少させることを試みた。B6D2F1 雌マウスを PMSG で処理して過剰排卵処理をおこない、GV 期卵を回収した。2',3'-dideoxycytidine(ddC)を 1,10,100 および 1000  $\mu$  M の濃度で含む mTaM 培地中で卵丘細胞を除去した卵を 16 時間培養し、成熟させた。培養終了後の卵から Total DNA を回収し、その Total DNA をテンプレートとするリアルタイム PCR を行って、卵中の mtDNA のコピー数を解析した。さらに、それぞれの濃度で ddC を含む mTaM 培地で成熟した卵を用いて体外受精を行い、胚盤胞期へ発生した胚中の mtDNA コピー数についてもリアルタイム PCR によって解析した。どの濃度の ddC を含む培地で成熟させた卵においても、明確な mtDNA のコピー数の変化は確認されなかった。また、10,100 および 1000  $\mu$  M の濃度で ddC を含む培地で成熟させた卵から発生した胚盤胞期胚では、mtDNA のコピー数は約半分に低下する傾向にあった。

②に関した研究では、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。本年度では、引き続きアフリカサヴァンナゾウ耳介由来繊維芽細胞から iPS 細胞の樹立を検討した。レンチウイルスベクターをベースとし、Oct4・Sox2・Klf4・cMyc 遺伝子が組み込まれているベクターを用いて遺伝子導入を行ったところ、細胞への感染効率が低く、導入遺伝子の発現が低く、iPS 細胞の樹立には至らなかった。そこで、レトロウイルスベクターをベースとし、Oct4・Sox2・Nanog・Klf4・cMyc が組み込まれたベクターを用いた iPS 細胞の作製を試みた。ウイルス感染後において非常にわずかながら、iPS 細胞様の形態を示す細胞コロニーの出現が認められた。これらの細胞コロニーを単離し、ヒト iPS 細胞と同じ培養環境で培養することで、継代後も iPS 細胞に特徴的な大きな核及び小さな細胞質を有する扁平型コロニーの形態を維持しながら増殖することが可能であることが観察された。また、Westernblot 法を用いて導入遺伝子発現の解析を行ったところ、未分化関連遺伝子のひとつである Oct4 タンパク質の発現も認められた。しかしながら、iPS 細胞の基本的な特徴のひとつであるアルカリフォスファターゼ活性は陰性であり、また、分化能を有しておらず、iPS 細胞とは異なる性質をもつ株化細胞であると示唆され、iPS 細胞樹立には至らなかった。

③に関した研究では、みさき公園より依頼を受け、同園飼育のフタユビナマケモノ(*Choloepus didactylus*)5 個体の性判別を行った。ナマケモノの個体より体毛を鉗子を用いて採集し、毛根を含む約 8mm の長さの体毛 5 本から Total DNA を抽出し、Murata and Masuda (*J. Vet. Med. Sci.* 58:1157-1159 1996)の報告に従って、Y 染色体内の SRY (Sex-determining region Y)遺伝子を標的とするプライマー(RG4, RG7: Griffiths and Tiwari, *Mol. Ecol.* 2:405-406, 1993)を用いて PCR を行い、性判別を行った。その結果、5 頭のうち新たに生まれた個体を含む 2 頭が雄で 3 頭が雌という結果で

あった。また、神戸市立須磨海水族園より依頼を受け、同園飼育のサンショクキムネオオハシ (*Ramphastos sulfuratus*) の性判別を行った。サンショクキムネオオハシの胴体より回収した3本の羽毛から Total DNA を抽出し、鳥類の性染色体である Z および W 染色体内の *CHD* (chromo-helicase-DNA binding protein) 遺伝子を標的とする primer 2550F および 2718R (Fridolfsson and Ellegren, *J. Avian Biol.* 30:116-121 1999) を用いて PCR を行い、個体の性を判別した。その結果、依頼を受けたサンショクキムネオオハシの個体は雄であることが判明した。

### 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、マウス未受精卵中のミトコンドリアを減少させる研究を継続し、マウス未受精卵子をレシピエント細胞質とした異種間核移植法を確立していく。

②に関連した研究は、本年度において、不完全なリプログラミング状態と思われる株化細胞の樹立までは可能であった。そこで、今後は iPS 細胞の樹立効率を向上させる他の遺伝子の追加や small molecule などを用いた培養環境の改良を行い、iPS 細胞の樹立を試みる。また、本研究で得られた株化細胞は不完全な iPS 細胞と考えることができるので、これらを材料とし、再度、iPS 細胞の樹立を試みることで、遺伝子を再活性化し、完全なリプログラミングを誘導することができないか検討を行う。特に得られた細胞に対して、iPS 細胞に特徴的な性質を中心に特性解析を実施する。

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。それとともに、同様に天王寺動物園から提供された雌雄のシロフクロウの *CHD* 遺伝子の塩基配列を決定し、フクロウ類における *CHD* 遺伝子の塩基配列を基にした分類について研究を行う。

### 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)