

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製法の確立	
研究者所属・氏名	研究代表者：先端技術総合研究所・加藤博己 共同研究者：先端技術総合研究所・入谷 明、宮下 実、安齋政幸 生物理工学部 遺伝子工学科・岸上哲士 附属生石農場・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・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う。

2. 研究経過及び成果

①に関連した研究では、死後0～4日間4℃で冷蔵保存された各種動物の耳介組織を用いて初代培養細胞の樹立を行い、培養細胞樹立の可否と、樹立された培養細胞の染色体数の正常性の検討を行った。平成23年度にはアライグマ、タヌキ、チョウセンイタチ、ハクビシン、アナグマの初代培養細胞の樹立に成功した。培養細胞の樹立成功率は各種においておよそ80～100%であった。さらに、樹立された培養細胞の染色体数の正常性の検討を行ったところ、全ての培養細胞において75以上の正常性が示された。また、死後日数が経過した耳介に由来する培養細胞では、染色体数の正常性がわずかに低下することも示された。

②に関連した研究では、まずマンモス iPS 細胞作製技術の確立のため、マンモスと同亜科である現生のマルミミゾウの細胞を材料として、iPS 細胞の作製を試みた。iPS 細胞の元となる細胞は、マルミミゾウの耳介由来繊維芽細胞 (RCB2319 および RCB2320：理研バイオリソースより寄託) を使用した。まず、これらの細胞を安定的に増殖させ、凍結ストックの作製を行った。次に増殖した細胞を用いて iPS 細胞の作製を試みた。本研究では、iPS 細胞作製において2種類の異なったウイルスベクターの使用を試みた。まず、増殖期ではない細胞においても感染するという利点があるレンチウイルスベクターをベースとし、*Oct4・Sox2・Klf4・cMyc* が組み込まれたベクターを用いてゾウ繊維芽細胞に感染させた。しかしながら、感染後若干の細胞の増殖及び形態変化が認められたものの、Western blot 法を用いて実際に導入遺伝子が発現しているか解析を行ったが、どの遺伝子においても発現が認められなかった。

次に、増殖期の細胞でのみ感染することができないが、感染力が強いとされる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て iPS 細胞の作製を試みた。すると、導入後1週間以内に細胞の形態が変化し、また高い増殖能を示した。Western blot 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 タンパク質の発現が認められた。しかしながら、長期的に安定した細胞コロニーを獲得することができず、iPS 細胞樹立にまでは至らなかった。

③に関連した研究では、天王寺動物園から分与された各種鳥類の肝臓からゲノム 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。アオサギ(コウノトリ目・サギ科)、シュバシコウ(コウノトリ目・コウノトリ科)、イワトビペンギン(ペンギン目・ペンギン科)、カンムリシロムク(スズメ目・ムクドリ科)、オオタカ(タカ目・タカ科)、シロフクロウ(フクロウ目・フクロウ科)の6種について実験を行ったところ、イワトビペンギンとシロフクロウを除く4種で、雄ではZ染色体に由来する約650bp

のバンドが、雌では Z 染色体に由来する約 650bp のバンドに加えて W 染色体に由来する約 450bp のバンドが得られ、雌雄の判別が可能であることが示された。シロフクロウでは雌雄とも Z 染色体に由来すると考えられる約 650bp のバンドの増幅に加えて雌では約 1kbp のバンドが現れた。現在このバンドをクローニングし、このバンドがシロフクロウの雌の W 染色体上の *CHD* 遺伝子に由来したものかどうかを検討している。イワトビペンギンでは雌雄とも約 650bp のバンドのみが増幅され、PCR 法のみでは雌雄判別は不可能であった。PCR 法によって増幅された DNA 断片を用いて、フンボルトペンギンで報告のある制限酵素 *HaeIII* および *Xmn I* を用いた制限酵素断片長多型による雌雄判別法 (Constantini *et al.*, 2007) をイワトビペンギンに対して適用したところ、雌雄を判別することが可能であることが示された。

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、次年度に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を検討する。また、各種動物の組織の採集を継続して行い、組織からの初代培養細胞の樹立を行う。

②に関連した研究は、次年度では引き続きゾウ繊維芽細胞より iPS 細胞の樹立を試みる。改善方法として、本年度で使用した方法に加えて、最近 iPS 細胞の樹立効率を向上させると報告があった *Glis1* 遺伝子などを加えて導入し、リプログラミング効率の向上、そして iPS 細胞の樹立を目指す。また樹立後得られた細胞の詳細な特性解析を行う。

③に関連した研究は、次年度では引き続きほ乳類および鳥類の各種由来のサンプルを採集し、それらをテンプレートとした PCR 法による性判別法を各種において確立する。

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)