

令和 4 年 8 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06447

研究課題名(和文) 古代動物の体細胞核移植による再生に関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on resurrection by somatic cell nuclear transfer in ancient animals

研究代表者

加藤 博己 (Kato, Hiromi)

近畿大学・先端技術総合研究所・教授

研究者番号：60330320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：異種間核移植胚の中で起こると考えられる呼吸鎖複合体の形成不全を回避するための基礎研究を行った。ブタ卵を異種間核移植におけるレシピエント細胞質として使用する際に、卵細胞中のミトコンドリアを不活化するために、成熟培養中にマイトマイシンCで処理した後に単為発生させ、培養後48時間での胚1個あたりのATP量を測定した。マイトマイシンC処理卵由来胚では2.1pmolであるのに対して未処理卵由来胚では48時間で28.3pmolであり、マイトマイシンC処理はミトコンドリアの複製だけでなく、機能の抑制にも有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体細胞核移植による動物個体作製が可能になり、絶滅種・絶滅危惧種・希少種への適用が期待されているが、体細胞核移植による個体作製には多くのレシピエント細胞質となる卵を必要とするため、個体数の少ない種においては同種卵の使用は不可能である。この問題の解決のためには異種間核移植技術の確立が不可欠であるが、これまでの研究より、核ドナーとレシピエント細胞質の系統関係が遠いと、核移植胚の発生が低率であることが示されている。本研究は異種間核移植による低い胚発生率の一因として、核移植胚の呼吸鎖複合体を構成するタンパク質の不適合の問題に着目し、その解決に一步を踏み出したものであり、大きな学術的・社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Basic research was conducted to avoid dysfunction of the respiratory chain complex, which is thought to occur in interspecific nuclear transplanted embryos. Porcine eggs were treated with mitomycin C to inactivate mitochondria in the egg cells during in vitro maturation culture. After in vitro maturation culture, porcine eggs were activated parthenogenetically and cultured for 48 hours. ATP contents per parthenogenetic embryo was measured. Mitomycin C-treated egg-derived embryos have 2.1 pmol ATP, while untreated egg-derived embryos have 28.3 pmol ATP, indicating that mitomycin C treatment is effective not only for mitochondrial genomic replication but also for suppression of mitochondrial function.

研究分野：家畜繁殖学、古生物学、分子生物学

キーワード：古生物 異種間体細胞核移植 呼吸鎖複合体 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに、我々はマンモスの復元を最終目標として、ロシア連邦サハ共和国において発掘調査を行い、平成 23～25 年度に受けた科学研究費・基盤 C の結果、平成 25 年にロシア連邦サハ共和国において発掘された、保存状態の非常に良いマンモスの筋肉・皮膚・骨髄組織の入手に成功した。それらのサンプルを用いてマンモスの復元を目指した体細胞核移植に関する研究を行った結果、永久凍土中に保存された約 2,8000 年前の生物由来サンプルにおいても、細胞核はその生物学的特性を一部保持していることが示された (Yamagata *et al.*, *Sci. Rep.* 9:4050. doi:10.1038/s41598-019-40546-1, 2019)。

体細胞核移植による個体の再生を実施するにあたり、絶滅または絶滅危惧種では、レシピエント細胞質を同種の卵で賄うことは困難である。これに対して、同種ではなく近縁種の卵を、体細胞核移植のレシピエント細胞質として用いて産子を得た報告がなされており (Lanza *et al.*, *Cloning* 2:79-90, 2000)、近縁種の卵を用いることにより絶滅または絶滅危惧種の体細胞核移植による個体再生も可能となっている。しかし、その一方で、我々が復元を目指しているケナガマンモスの場合は、同種が絶滅種であることに加えて、近縁種は現生の長鼻目である。現生の長鼻目に属する動物種は、アジア地域に生息するアジアゾウ、アフリカ大陸に生息するアフリカゾウとマルミゾウの 3 種のみであり、いずれもが「絶滅のおそれのある野生動物の種の国際取引に関する条約」(ワシントン条約)の付属書 に掲載され、個体のみならず細胞等に関してもその国際間取引は厳しく監視され、制限を受ける。このため、マンモスの復元に関する実験を行うために海外から日本へ現生のゾウの卵巣や卵を輸入することは困難であり、事実上不可能である。そこで、本研究ではマンモスと同時代の氷河期に生息し、軟組織を含む遺物がシベリアの永久凍土から発掘される、げっ歯目ネズミ科の動物に着目した。

げっ歯目ネズミ科の動物の現生種のうち、マウス(ハツカネズミ)やラット(ドブネズミ)は、広く実験動物として使用されており、生殖生理の研究も細部にわたって行われ、体細胞核移植による産子の作製も報告されている。本研究では、マンモスの復元を体細胞核移植によって目指す研究のパイロットプロジェクトとして、シベリアの永久凍土から発掘されたげっ歯目ネズミ科の動物に由来する体細胞核を核ドナー、現生のマウス(ハツカネズミ属)またはラット(クマネズミ属)の卵をレシピエント細胞として用いて体細胞核移植を行い、体細胞核移植による古代動物の再生に関する基礎研究を行う。

2. 研究の目的

体細胞核移植による“ドリー”作製の報告以来、多くの哺乳動物種において体細胞核移植による個体作製の報告がなされてきた。この技術は絶滅動物や希少種にも応用が可能とされ、実際に絶滅したピレネーアイベックス (Folch *et al.*, *Theriogenology*, 71:1026-1034, 2009) や絶滅が危惧されるガウル (Lanza *et al.*, *Cloning*, 2:79-90, 2000) の産仔作製の成功が報告がされている。更に、この技術はマンモスの再生にも適用されうるとして期待が高まっているが、実際に古代動物の体細胞核を体細胞核移植に用いた研究の論文報告は、我々の 2009 年と 2019 年の論文のみである (Kato *et al.*, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 85:240-247, 2009, Yamagata *et al.*, *Sci. Rep.* 9:4050. doi:10.1038/s41598-019-40546-1, 2019)。この理由としては、実際に古代動物の軟組織のサンプルを入手することが困難であることが挙げられる。我々は、動物の繁殖生理学および発生工学分野

において 30 年以上の実績を有し、かつ、20 年以上にわたってロシア連邦サハ共和国の古生物学者と研究協力体制を確立しており、氷河期に生息した古代動物の軟組織の入手と、それを核ドナーとした体細胞核移植の実施という、本来学術的に隔たりの大きい古生物学と発生工学の融合した非常に独創的な本研究の実施に適合している。

また、多くの古代動物においては、体細胞核移植のレシピエント細胞質として、同種由来卵を用いることは不可能である。そのため、現生の近縁種由来卵をレシピエント細胞質に使用することが考えられるが、現在、ゾウやサイなど、多くの大型哺乳類は希少種や絶滅危惧種に指定されており、その卵を多くの数の卵を必要とする体細胞核移植の実験に供することも不可能である。そのため、古代動物の体細胞核移植による再生には、レシピエント細胞質として現生の実験動物または家畜の卵を用いることが適切であると考えられた。そこで本研究では、食肉処理場で多くの卵巣が入手可能であり、多くの卵を採集可能なブタ卵を用いた異種間体細胞核移植技術の確立に向けた基礎研究を行った。

3. 研究の方法

近年、マウスの亜種間核移植胚の作製実験において、再構築胚が胚性致死を示す例が報告された (Ma H. *et al. Cell Metab.* 2016)。その原因は、細胞内で ATP の合成に必要な呼吸鎖複合体の形成不全がおこったためと考えられている。呼吸鎖複合体を構成するタンパク質は、核およびミトコンドリアゲノムの両方に由来し、異種間核移植によって作製された再構築胚においては、呼吸鎖複合体を構成するタンパク質の不適合が起こる可能性を示唆している。このため、レシピエント細胞質として使用する卵が本来持っているミトコンドリアを不活化させ、その後ドナー核の移植の際にドナー核と同種に由来するミトコンドリアをレシピエント細胞質へ共注入することによって呼吸鎖複合体を構成するタンパク質の不適合を回避する研究を行った。

本研究においては、食肉処理場で入手したブタ卵巣から卵を回収し、44 時間の体外成熟培養を行う間に、二本鎖 DNA のグアニン間に架橋することによって DNA 鎖の開裂を阻害し、DNA 鎖の複製および RNA への転写を阻害するマイトマイシン C で処理して、ブタ卵が本来持っているミトコンドリアを不活化させた後、マウス体細胞を核ドナー細胞、マイトマイシン C で処理したブタ卵をレシピエント細胞質とする異種間体細胞核移植を行い、体細胞核移植による古代動物の再生に関する基礎研究を行った

研究期間の 3 年の間に、

- : レシピエント細胞質となる体外成熟ブタ卵のミトコンドリアを不活化するのに最適なマイトマイシン C の濃度と作用時間の検討
- : マイトマイシン C 処理した卵を単為発生処理して得られたブタ胚におけるミトコンドリア DNA のコピー数の変化と、産生された ATP 量の検討
- : マイトマイシン C 処理した卵をレシピエント細胞質として用いた体細胞核移植胚における、胚発生の検討

の 3 つの実験を実施し、体細胞核移植による古代動物の再生に関わる異種間核移植の基礎的知見を集積した。

4. 研究成果

体外成熟培養の間に 10 μ g/mL のマイトマイシン C で処理したブタ卵は、成熟培養後、単為発生処理を行っても 2 細胞期以降へ発生することは無かった。マイトマイシン C で処理したブタ卵と処理しなかったブタ卵を用いて核移植操作によって相互に核置換を行った所、マイトマイ

シン C 未処理卵細胞質と未処理核の組み合わせでは 18%の再構築胚が胚盤胞期へ発生したのに対し、マイトマイシン C 処理卵細胞質と未処理核の組み合わせでは 11%の再構築胚が 4 細胞期へ発生したがそれ以上のステージへの発生はなく、マイトマイシン C 未処理卵細胞質と処理核の組み合わせでは 2 細胞期へ発生した再構築胚はなかった。この結果より、マイトマイシン C でレシピエント細胞質となる卵を処理することによって、卵が本来持っているミトコンドリアの機能を低下させることができることが示された。

マイトマイシン C の処理時の濃度に関しては、当初 10 μ g/mL で処理を行ったが、5 μ g/mL で処理を行っても成熟培養後の卵成熟率およびミトコンドリア DNA のコピー数には差がなかったため、マイトマイシン C の細胞毒性による影響を低減するために、以降の実験ではマイトマイシン C は 5 μ g/mL の濃度で処理を行った。

5 μ g/mL の濃度のマイトマイシン C で処理したブタ卵と処理しなかったブタ卵を用いて核移植操作によって相互核置換を行った所、マイトマイシン C 未処理卵細胞質と未処理核の組み合わせでは 9%の再構築胚が胚盤胞期へ発生したのに対し、マイトマイシン C 処理卵細胞質と未処理核の組み合わせでは 27%の再構築胚が 8 細胞期へ発生したがそれ以上のステージへの発生はなく、マイトマイシン C 未処理卵細胞質と処理核の組み合わせでは 2 細胞期へ発生した再構築胚はなかった。

さらに卵の成熟培養後に、BioVision 社の ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit を用いて卵 1 個あたりの ATP 量を測定したところ、マイトマイシン C 未処理卵では 70.5 \pm 55.4pmol であったのに対して、5 μ g/mL マイトマイシン C 処理卵では 75.8 \pm 58.9pmol であり、両処理区の間には差はなかった。この後、成熟培養を終了したブタ卵に活性化処理を行って単為発生させ、発生培養後 24 または 48 時間での単為発生胚 1 個あたりの ATP 量を測定したところ、マイトマイシン C 未処理卵由来胚では 24 時間で 20.0pmol、48 時間で 28.3pmol であったのに対して、マイトマイシン C 処理卵由来胚では 24 時間で 6.0pmol、48 時間で 2.1pmol であり、成熟培養中にマイトマイシン C 処理卵由来する単為発生胚では、コントロールの単為発生胚よりも低い ATP の濃度を示し、マイトマイシン C 処理は、ミトコンドリアの複製だけでなく、ミトコンドリア機能の抑制にも有効であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新型コロナウイルスのパンデミックと、ロシアによるウクライナ振興のため、当初計画していたシベリアにおける古代動物組織の日本への導入が実施できなかった。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	黒坂 哲 (Kurosaka Satoshi) (30625356)	近畿大学・先端技術総合研究所・講師 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関