

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580395

研究課題名(和文) 絶滅動物の体細胞核移植によるクローン個体作製に関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for resurrection of extinct animals by somatic cell nuclear transfer

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) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：現有するマンモス軟組織のDNAの状態の解析と、骨髄組織からの体細胞核の回収方法の開発を行った。その結果、骨髄組織からの効率の良い体細胞核の回収方法の開発に成功した。また、ロシア連邦サハ共和国から、更に保存状態の良いマンモスの皮膚・筋肉・皮下組織および骨髄組織の入手に成功した。さらに、異種間核移植の際に再構築胚の発生能力を改善させるために核ドナー細胞と同種のミトコンドリアの共注入を試みたが、再構築胚の発生能力の改善には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The analysis of the conservation state of existing mammoth soft tissue (skin, muscle and bone marrow) by PCR and the development of the method to collect somatic cell nuclei from bone marrow were examined. In results, we succeeded to develop the efficient method to collect somatic cell nuclei from bone marrow. Also we succeeded to have new, well conserved mammoth's skin, muscle, hypodermis and bone marrow from Sakha (Yakutia) Republic. Furthermore, to improve developmental ability of reconstructed embryos, we tried to co-inject mitochondria which derived from cells of same species with donor cell nucleus. However the developmental ability of reconstructed embryos was not improved.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：クローン動物 絶滅動物 異種間核移植

1. 研究開始当初の背景

世界初の体細胞核移植によるクローン動物“ドリー”の報告 (Wilmut *et al.*, *Nature* 385:810-813, 1997) 以来、多くの動物種において体細胞核移植による産子の作製が報告されてきた。その一方で、耐凍剤を用いずに -20 と比較的高温で 16 年間保存されたマウス個体から回収された細胞核を核ドナーとして用いたマウス産子の作製 (Wakayama *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:17318-17322, 2008) が報告された。この報告は、動物個体の死後かなりの期間を経ても細胞または組織が凍結保存されていれば、得られる細胞核をドナーとする体細胞核移植による個体の再生の可能性があることを示している。

また、体細胞核移植による個体の再生を試みるにあたり、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子でまかな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子を、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)、近縁種の卵子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きた。

我国でマンモスとしてよく知られているケナガマンモス (*Mammuthus primigenius*) は、80 万年から 40 万年前にユーラシアの北東部に出現し、北半球のほぼ全域にわたって棲息した後、約 1 万 1 千年前の氷河期の終わりとともにほぼ絶滅した。現在に至るまで、その皮膚、筋肉などの軟組織がシベリアやアラスカの永久凍土から発掘されている。

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、2002 年にはマンモスの凍結した四肢の発掘に成功し、皮膚、筋肉、骨および骨髄のサンプルを入手した。この皮膚および筋肉のサンプルより、Kuretake *et al.* (*Biol. Reprod.*, 55:789-795, 1996) の方法に従って、プロピディウムイオダイド (PI) で染色後、紫外線下で赤色蛍光を発する直径約 3 μm の核様構造物を細胞核として回収した。回収された核を、Wakayama *et al.* (*Nature*,

394:369-374, 1998) の方法に従って、BDF1 雌マウス由来の除核未受精卵子へ注入した。しかし、注入後 1 および 7 時間でも核膜の消失、PCC (Premature Chromatin Condensation) および前核様構造の形成等の変化を示さなかった (Kato *et al.*, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 85:240-247, 2009)。この理由としては、15,000 年もの保存期間に、マンモスの組織中の核の生物学的特性が変化したのか、または、核が変性したタンパク質を含んでいるかそれによって覆われているために、未受精卵子の細胞質内に存在する各種因子に対して反応できなくなっている可能性が考えられた。また、マンモスの核とマウスの卵子細胞質の組み合わせがマンモスの核の卵細胞質中における変化を起こすには不適當だった可能性も考えられた。

2. 研究の目的

絶滅動物の体細胞核移植によるクローン個体作製のためには、核移植へ使用する体細胞核の保存状態が重要な鍵となる。シベリアの永久凍土層から発掘される古生物の軟組織に由来する体細胞核では、多くの場合、核は極端な脱水状態にあり、また、変性した核タンパク質が移植後の核の反応を妨げる可能性も考えられる。本研究では、変性した核タンパク質の除去を含む「核ドナー」の処理方法を開発するとともに、体細胞核移植によるクローン個体作製の為に必要なレシピエント細胞質を確保する為に、異種・異属動物由来の「レシピエント細胞質」を用いた際に核移植後の再構築胚の発生能を向上させる基礎研究を行う。さらに、現在我々が保有するマンモスのサンプルそのものが保存期間中に過度の脱水を受けた結果、その生物の組織としての特性を失っている可能性が考えられるため、新たに保存状態の良いマンモスの軟組織のサンプルをシベリアから入手する。

3. 研究の方法

(1) 平成 23 年度は、まず、現有するマンモスの皮膚・筋肉・骨髄の 3 種の軟組織のう

ち、最も保存状態の良いものがどれかを判定するために、それぞれの組織から回収された Total DNA をテンプレートとし、マンモスの核ゲノム中に存在する *Mc1r* 遺伝子をもとにデザインされたプライマーを用いて PCR を行い、DNA 断片の増幅の有無を検討する。その結果、最も保存状態が良いと判定されたマンモスの軟組織からの体細胞核の効率の良い回収方法の開発を行う。さらに、マンモスの組織由来の細胞核をレシピエント細胞質へ注入した際に、細胞周期を再開するために必要な核の前処理条件について検討する。そのために、マンモスの軟組織から回収した体細胞核を、トリプシン等のタンパク質分解酵素による部分的消化処理、Digitonin や SDS 等化学薬品による部分的分解処理、および ジーンガン等による物理的な部分的破壊処理の 3 つの方法で処理した後にマウスの除核未受精卵子へ注入し、注入後の核の動態を観察する。同時に、マンモスの体細胞核移植に供するのに最適なレシピエント細胞質の探索のため、ウサギまたはマウス未受精成熟卵子を、マンモスの近縁種である現生のゾウおよびマンモスの体細胞核移植のレシピエント細胞質として使用し、比較検討する。核移植後、移植核が何らかの変化を示した胚については、核タンパク質の組成変化および遺伝子の発現変化を解析し、移植核のリプログラミングの状態を解析する。さらに、現有するマンモス組織の体細胞核が既に変性している可能性も考えられるため、別のマンモスのサンプルを入手し、同様の実験を試みる。

(2) 平成24年度は、現生のゾウの培養細胞およびマンモスの組織由来細胞核を「核ドナー」とし、平成23年度に得られた結果を基に決定された、マンモスの体細胞核移植に適切と考えられる動物種の除核未受精卵子を「レシピエント細胞質」とする体細胞核移植を行う。作製されたハイブリッド胚を培養し、ハイブリッド細胞を確立するために必要な条件を検討するとともに、異種・異属の細胞核を受け入れて胚発生を継続する「ユニバーサルレシピエント細胞質」技術の確立を行う。そのために、体細胞

核移植の際に「核ドナー」となる培養細胞を多く用意し、それらの細胞から「ミトコンドリア」および「リボソーム」を細胞分画法によって回収・精製したものを、核ドナーの注入時に同時にレシピエント細胞質へ共注入し、その後の再構築胚の発生能力を検討し、「ユニバーサルレシピエント細胞質」技術を確立する。

(3) 平成25年度は、前年度までに得られた異種・異属動物間核移植胚の発生率の改善を目指し、DNA複製阻害剤等を用いて核移植を実施する前にレシピエント細胞質が持つオリジナルのミトコンドリアを減少させたレシピエント細胞質を用意し、そこへ核ドナーと同種のミトコンドリアを共注入する。そこで平成24年度と同様にレシピエント細胞質としてマウス成熟未受精卵子を用い、マウス卵子中のミトコンドリアを減少させる薬剤として 2',3'-dideoxycytidine(ddC)を用いて実験を行う。

4. 研究成果

(1) 平成 23 年度の研究の結果、現有するマンモスの皮膚・筋肉・骨髄の 3 種の軟組織のうち、最も長い *Mc1r* 遺伝子の DNA 断片が増幅された組織は骨髄であった。これまでの研究から、マンモスの皮膚および筋肉からの細胞核の回収方法は確立されていたが、今回の実験の結果、マンモスの軟組織の中でもより核 DNA の保存状態が良い骨髄組織に、皮膚および筋肉から細胞核を回収する方法を適用してもその回収効率は低く、実験に供する数を確保できなかった。このため、ウシの凍結骨髄組織を材料とした実験によって、骨髄組織のホモジナイズ前にコラゲナーゼ Type で 60 分間処理することによって、有意に高い($P < 0.05$)細胞核の回収方法の開発に成功した。この方法をマンモス骨髄組織へ適用することによって、以前よりも多くの細胞核の回収がなされるようになり、実験へマンモスの骨髄組織由来の体細胞核を供せるようになった。また、ウシ骨髄組織から回収された細胞核を用いて、核移植前の体細胞核に対するトリプシン等酵素による部分的消化

処理、Digitonin 等化学薬品による部分的分解処理の影響を、マウス除核未受精卵子を用いて解析した。さらに、現在所有するマンモスの組織は永久凍土(平均-10℃)という比較的高温での保存期間中の強度の脱水の結果、既に変性している可能性が考えられるため、新たなマンモス組織の入手の可能性を探るため、ロシア連邦サハ共和国ヤクーツク市にてサハ共和国科学アカデミーの主催で行われた「古生物学サンプルの研究セミナー」へ参加した。研究セミナーの後、2010年にシベリアで新たに発見されたユカマンモスのサンプルの入手のための協議をサハ共和国科学アカデミーと行い、新たなマンモス組織の入手について合意した。また、現生のゾウ由来の培養細胞の入手も行った。

(2)平成24年度には、異種間核移植胚の作製とその発生能力の改善方法を検討した。核ドナー細胞としてはアライグマの耳介から採取・培養された繊維芽細胞を用い、レシピエント細胞質には入手のしやすさからB6D2F1マウスの未受精卵を除核して用いた。対照区としては核ドナー細胞として、同じB6D2F1マウスの卵丘細胞を用いた。マウスレシピエント細胞質へアライグマドナー核を注入し、その後再構築胚の活性化処理の間にTrichostatin A (TSA, 5nM)処理を行った。前核様構造の形成については、核ドナーとしてアライグマ培養繊維芽細胞を用いた実験区(88%)とマウス卵丘細胞を用いた対照区(100%)の間に有意な差は無かった。しかし、2細胞期胚へ発生した胚数はアライグマ培養繊維芽細胞を用いた実験区(68%)とマウス卵丘細胞を用いた対照区(88%)の間に有意差が存在した($P<0.05$)。さらに培養を継続すると、マウス卵丘細胞を用いた対照区では43%の胚が胚盤胞期に達したのに対して、アライグマ培養繊維芽細胞を用いた実験区では胚盤胞期に達した胚は存在せず、2個の胚のみが(3%)4細胞期胚に達しただけであり、ほぼ全ての胚が2細胞期でその発生を停止した。アライグマ培養繊維芽細胞を核ドナー細胞に用いた実験区において得られたこれら2個の4細胞期胚が発生を停止した後、PCR法によってアライグマ特異的な核ゲノムの存在を

検討したが、アライグマ特異的な核ゲノムの存在は確認されず、単為発生によって得られたものと考えられた。さらに、マウスレシピエント細胞質へアライグマドナー核を注入して作製した再構築胚の発生能力を改善するため、アライグマミトコンドリアを培養細胞から回収し、マウスレシピエント細胞質へアライグマ核を収入する際にアライグマミトコンドリアを共注入して再構築胚を作製したが、やはり再構築胚の発生は全て2細胞期で停止した。

(3)平成25年度には、前年度のアライグママウス異目間核移植胚の発生率向上を目指し、レシピエント細胞質として用いるマウス成熟未受精卵子からのオリジナルのミトコンドリアの除去を試みた。B6D2F1雌マウスにPMSGを7.5IU腹腔内投与後、46~48時間で卵巣を回収し、0.1%ヒアルロニダーゼを含む培養液中で注射針を用いて卵巣を細切し、GV期卵子を回収した。卵丘細胞を除去した後、これらのGV期卵子を洗浄し、2',3'-dideoxycytidine (ddC)を1, 10, 100および1000 μ Mの濃度で含むmTaM培地中で37℃、16時間培養し、成熟させた。成熟培養終了後の卵子からTotal DNAを回収し、その後定量的PCRを行って、成熟した卵子中の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培地で成熟した卵子を用いて体外受精を行い、体外受精後の胚の発生能力について検討した。その結果、どの濃度のddCを含む培地で成熟させた卵子においても、明確なmtDNAのコピー数の変化は確認されなかった。また、1000 μ MのddCを含む培地で成熟させた卵子では、受精率(17%)が他の区の卵子(40~56%)よりも有意に低かった($P<0.05$)。2細胞期胚および胚盤胞期胚への発生は、ddCを100 μ Mおよび1000 μ Mで含む培地で成熟させた卵子では低下する傾向が見られた。

さらに、平成25年度にはロシア連邦サハ共和国ヤクーツク市のサハ共和国科学アカデミーの所有するユカマンモスの凍結組織の提供を受けることに成功した。その結果、まだ赤い色を呈している筋肉のサンプル、脂肪のサンプルおよび骨髄のサンプルなどを

入手した。筋肉と骨髄の組織切片を作製して観察した結果、特に筋肉組織においてヘマトキシリンに青染される細胞核が多数存在することが認められ、ユカマンモスは、約3万年の保存期間を越えてなお組織の保存状態は良好であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) 近藤健二、吉崎匠、加藤博己、入谷明、*Mc1r* 遺伝子の増幅による各種マンモス軟組織の保存状態の検討、近畿大学先端技術総合研究所紀要、査読有、19、2014、55-61.

(2) 加藤博己、入谷明、マンモス等古生物研究の現状、近畿大学先端技術総合研究所紀要、査読無、17、2012、31-38.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし