

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K20055

研究課題名(和文) アマミノクロウサギの無限分裂細胞とゲノムの解明、生きる化石のゲノムの特徴は？

研究課題名(英文) Primary and immortalized cell derived from amami rabbit

研究代表者

福田 智一 (Fukuda, Tomokazu)

岩手大学・理工学部・教授

研究者番号：40321640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：アマミノクロウサギは我が国の特別天然記念物である。本研究ではゲノム構造を決定し、アジアに生息した古代ウサギの特徴を明らかにすることを目的とした。ロードキルされた死体から筋肉組織を得た。細胞の形態から筋肉由来の初代培養細胞を得た。PCR法を用いて導入遺伝子の検出を行なった。変異型CDK4、サイクリンD1、TERT遺伝子の導入が行われたことが判明した。ウェスタンブロットにてタンパク質を発現していることが判明した。連続継代実験を行なったところ、野生型は最大でPD値で40で分裂を停止した。K4DおよびK4DT細胞は分裂回数でおよそ90ほどに達した。アマミノクロウサギ由来の細胞は無限分裂に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

絶滅危惧種であり、我が国の特別天然記念物であるアマミノクロウサギから無限分裂細胞の樹立に成功した。我々の樹立に成功したアマミノクロウサギ由来の細胞は無限分裂し、元の初代培養細胞の性質をある程度保持していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The amami rabbit has an biological characteristics of ancient rabbit. In recent years, genome structure can be clarified on the progress of the next generation sequencing. In this study, we tried to establish the primary cells and immortalized cell derived from amami rabbit. Furthermore, we also tried to clarify the genome structure of the amami rabbit. We obtained primary cells from 10 roadkilled animals. The primary cells were maintained in the liquid nitrogen tank until use. The PCR detection indicated that we successfully introduced the expression cassettes of mutant CDK4, Cyclin D1, TERT. In the sequential passage, although the primary cell halted the cell proliferation around PD value of 40, K4D and K4DT cells showed the continuous cell proliferation more than PD value of 90. From these observations, we concluded that we successfully established the immortalized cells from amami rabbit.

研究分野：生物多様性保全学

キーワード：生物多様性 絶滅危惧種 培養細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国の国土は東西に広く、様々な動物や植物が気候と風土に適応した固有種の宝庫である。この固有種の多さから、多様性のホットスポットと呼ばれている。その中でも奄美大島はその特徴的な歴史から、独自の生態系の進化を遂げた重要な土地である。しかしその何十億年もかけて形成された生態系および固有種が絶滅と破壊の危機に瀕している。本研究ではその絶滅危惧種、そして我が国の特別天然記念物であるアマミノクロウサギの初代培養細胞を作製した。さらに元の染色体パターンを保持したまま無限分裂させることを試みた。また初代培養細胞から高分子ゲノム DNA を抽出し、全ゲノム解析を試みた。

### 2. 研究の目的

奄美大島は日本本土および台湾から海で隔てられていた。太古にはアジアには現在のアマミノクロウサギと同様に繁殖力が低く、そして短い耳、夜間行動する祖先が広く分布していたと考えられている。その後、氷河期に入り北米大陸で増加していた現在のアナウサギが凍結したベーリング海峡を超えてアジアに侵入を開始した。アナウサギは多胎で多くの子を産み、繁殖力に優れている。加えて行動も早く、アジアに存在していた祖先を駆逐したと考えられている。一方で海によって台湾、日本本土の両方からのアナウサギの侵入がなかった奄美大島にはアマミノクロウサギと呼ばれるムカシウサギの特徴を保持したウサギが残ることになった。この背景からアマミノクロウサギは生きる化石と呼ばれている。この重要なアマミノクロウサギであるが、近年中国が大型シーケンサーの導入により、様々な動植物のゲノムを次々と解読している。アマミノクロウサギは我が国固有の特別天然記念物であり、我が国の研究者によって解読したいと発想した。加えて従来の技術では不可能であったロングリード次世代シーケンサーとショートリード次世代シーケンサーを組み合わせて解析する手法が編み出されている。本研究ではアマミノクロウサギの全ゲノム構造を決定し、アジアに生息した古代のウサギのゲノムの特徴を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

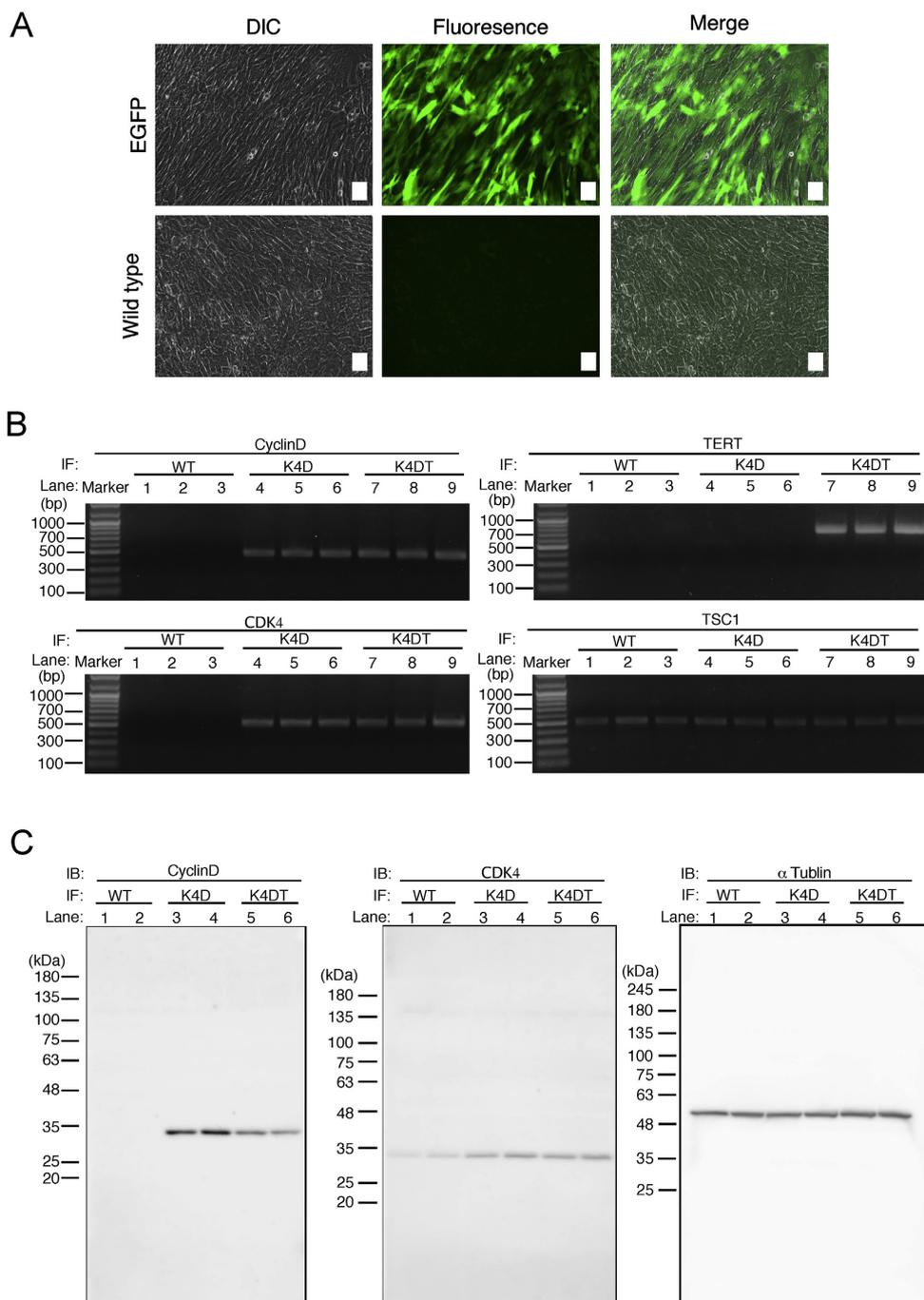
奄美大島の獣医師の協力の元、ロードキルされたアマミノクロウサギの死体から筋肉組織を得た。その筋肉組織から初代培養を行い、筋肉由来の線維芽細胞を得た。合計 10 個体の初代培養細胞を得ることに成功した。初代培養細胞を無限分裂化させるために、ヒト由来 R24C 変異型サイクリン依存性キナーゼ 4 (CDK4)、サイクリン D1、テロメア逆転写酵素 (TERT) を発現するレンチウイルスを調製した。同時に遺伝子導入効率を推定するために、オワンクラゲ由来の蛍光タンパク質 (EGFP) を発現するレンチウイルスも同時に調製した。作製したレンチウイルス溶液はポリエチレングリコール (PEG) 6000 存在下で濃縮を行なった。おおよそ 30 倍濃縮を行なった組み換えウイルスをアマミノクロウサギ由来の初代培養細胞へおおよそ 48 時間暴露を行なった。変異型 CDK4 およびサイクリン遺伝子を同時に導入した細胞をその遺伝子の名称から K4D 細胞、2 遺伝子にさらに TERT を導入した細胞を K4DT 細胞として実験を行なった。細胞形態、そして PCR 法による挿入遺伝子の検出、ウェスタンブロットによる導入遺伝子のタンパク質レベルでの検出、連続継代培養、細胞老化の検出、細胞周期ステージの検出、染色体パターンの解析を実施した。さらに 1 匹のオス個体を選出し、培養細胞からフェノールクロロフォルム法にて高分子ゲノム DNA を抽出した。高分子 DNA を元に HiSeqX によってまず、ショートリードシーケンサー解析を行なった。さらにゲノムのカバレッジを向上させるために、10XGenomics による擬似的ロングリード解析を実施した。さらに Sequel1 シーケンサーを用いることでロングリード解析を実施した。以上のゲノム解析の結果をデノボアセンブルし、アナウサギ、ナキウサギのゲノム配列と比較を実施した。

### 4. 研究成果

#### 初代培養細胞の性質

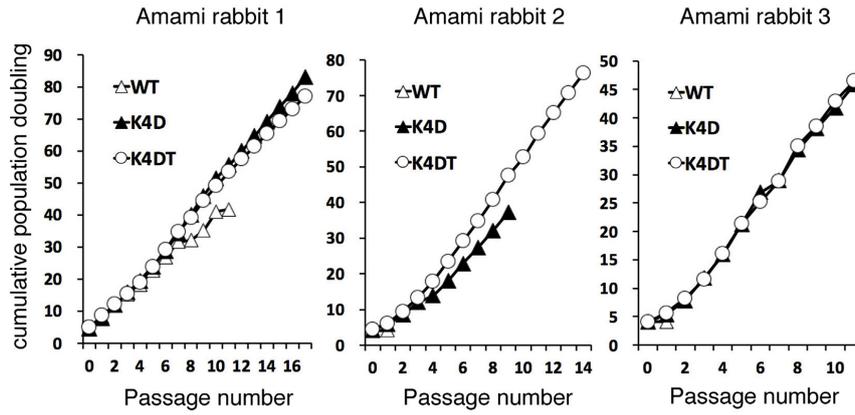
細胞の形態から筋肉由来の線維芽細胞と推測される初代培養細胞を得た。ロードキルされた組織から、合計 10 個体の初代培養細胞を得た。初代培養細胞は凍結し、液体窒素中にて再使用するまで安定的に保存した。初代培養細胞へオワンクラゲの蛍光タンパク質を発現するレンチウイルスを導入した結果が Figure1A である。おおよそ 50% 程度の遺伝子導入効率を得られており、導入効率としては十分であると考えられた。次に PCR 法を用いて導入遺伝子の検出を行なった。Figure1B にあるように、変異型 CDK4、サイクリン D1、TERT 遺伝子の導入がアマミノクロウサギ由来の細胞に行われたことが判明した。また、Figure1C にあるようにウェスタンブロットにて導入した遺伝子がタンパク質を発現していることが判明した。連続継代実験を行なったところ、3 個体中、野生型は最大で PD 値で 40 で分裂を停止した (Figure 2A)。一方で K4D および K4DT 細胞は分裂回数でおおよそ 90 ほどに達した。加えて Figure2B に示したように、細胞老化の指標である SA-beta ガラクトシターゼ活性は陰性であった。Figure3A では細胞周期を検出したが、K4D および K4DT 細胞とも 2 倍体を維持していた。これらのことから、我々の樹立に成功したアマミノクロウサギ由来の細胞は無限分裂し、元の初代培養細胞の性質をある程度保持していると考えられた。また、オス 17 番の高分子 DNA をショートリードシーケンサーである HiSeqX、擬似的ロングリードシーケンサーである 10XGenomics、Sequel シーケンサーを用い

て全ゲノム解析を進行中である。現在 95%を超えるカバレッジの配列を得ており、公表準備中である。

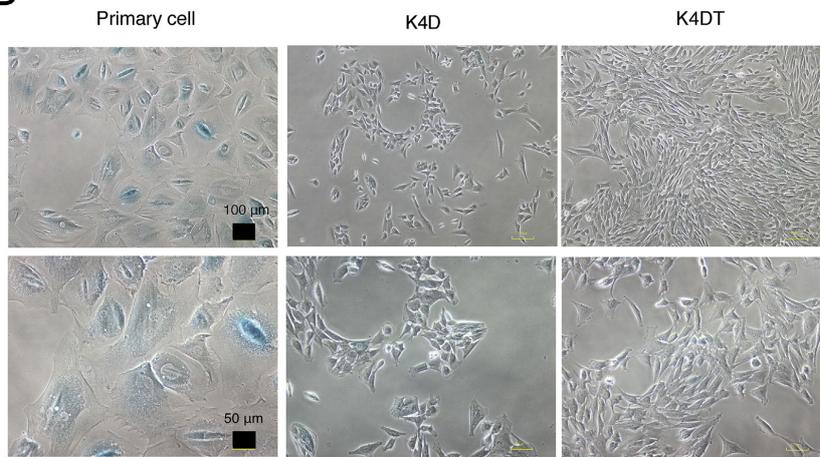


**Fig. 1.** Establishment of primary cell line from Amami rabbits. (A) Detection of EGFP fluorescence in cells transduced with EGFP-expressing lentiviral vector in Amami rabbit-derived cells are shown. Left panels, cell morphology of differential interference contrast (DIC). Middle panels, expression of fluorescence protein detected by fluorescence microscopy. Right panels, merged images of DIC and fluorescence. White bar, 50  $\mu$ m. (B) Detection of integration of the expression cassette into genomes of Amami rabbit-derived cells. PCR detection

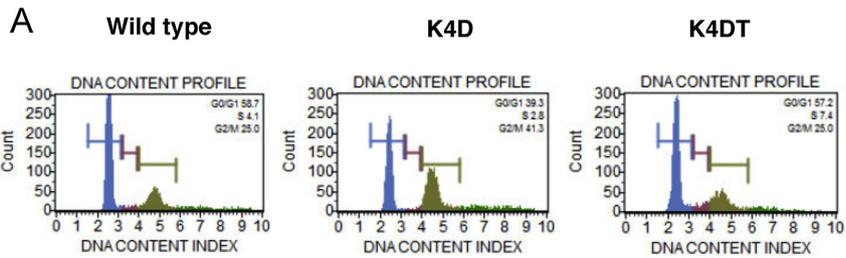
**A**



**B**



**Fig. 2.** Growth curve of the cell proliferation of wild type, K4D, K4DT cells. (A) Cell growth and sequential passing of wild type, K4D, and K4DT cells in three individuals of Amami rabbits. Cell growth is represented by the cumulative population doubling value. (B) Detection of senescent cells of the Amami rabbit 1 derived-primary cell, K4D, and K4DT cells in at passage 11 by SA-beta-Gal staining.



**B**

Cell Name	Phase of cell cycle (% ± SE)		
	G0/G1	S	G2/M
Wild type	57.8 ± 6.9	3.2 ± 0.4	28.4 ± 5.3
K4D	43.9 ± 1.5	9.0 ± 2.1	31.4 ± 2.9
K4DT	58.6 ± 1.1	10.4 ± 2.4*	20.6 ± 1.9

**Fig. 3.** Cell cycle analysis of wild type, K4D, K4DT cells. (A) Cell cycle histogram of representative results obtained from wild type, K4D, and K4DT cells by using the Muse Cell Cycle kit and the Muse Cell Analyzer. (B) The percentages of wild type, K4D, and K4DT cells at each cell cycle phase were listed. Data are presented as the mean ± standard error of the ratio of each cell cycle stage (n = 6). We used the Steel-Dwass method. \*p < 0.05.

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〕

-

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	村山 美穂  (Murayama Miho)  (60293552)	京都大学・野生動物研究センター・教授    (14301)	

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