

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：21688020

研究課題名(和文) 絶滅した動物細胞復活のための新技術開発

研究課題名(英文) The development of new technology to reanimation for endangered species.

研究代表者

若山 清香 (WAKAYAMA, Sayaka)

山梨大学・生命環境学部・助教

研究者番号：10525918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円、(間接経費) 6,060,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は絶滅動物の凍結死体細胞からクローンをよみがえらせる手法を開発することが目標である。そこで核移植技術を中心に、絶滅動物を復活させるために解決しなければならない問題を想定しマウスを用いて実験を行った。本研究費助成期間内に新たな染色体移植の方法、死滅した動物からの細胞の採取法、ならびに半永久的にクローン動物を継続維持できることなどを証明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I tried to develop new technology to reanimate for extinct or endangered species. First, I had improved the basic nuclear transfer techniques, such as collection of intact donor nuclei from dead body, period of oocyte activation, and HDACi treatment. Second, mouse dried skin, preserved at room temperature for more than 1 year were used as the model of real animal. Although cloned blastocysts were obtained from preserved skin nucleus, those embryos failed to develop beyond blastocyst after embryo transfer. Third, I tried to repeat the nuclear transfer from somatic cell of cloned mouse to examine the possibility of infinite cloning. As the results, so far I could generate over 700 cloned mice from only one donor mouse by 30 times repeating of nuclear transfer.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・発生工学

キーワード：クローン 絶滅動物 染色体移植

1. 研究開始当初の背景

すでに絶滅してしまった動物をもし本当に復活させることに成功すれば、その遺伝子の機能や産物など生物学的なサンプルが新鮮な状態で大量に利用可能となり、その動物種についての研究を大きく発展させるだろう。また野生動物の家畜化にともなって失われてしまった耐病性や高い繁殖能など、農産業にとって重要な遺伝子資源を手に入れることもできる。現存しない生物の遺伝子資源を手に入れる試みは、これまでにいくつかの機関においてミトコンドリアの塩基配列を調べたり、マウスにそれらの遺伝子を組み込んでみた報告があるだけで (Gilbert et al., PNAS 2008,105:8327-8332; Pask et al., PLoS One 2008, 3:e2240) 本格的に復活させようとした試みはまだ何も報告されていない。

代表者は核移植技術を大きく改良することで-20℃の冷凍庫内に16年間も凍結保存されていたマウスの死体からクローン個体を作成することに成功した。この結果は細胞が生物学的に死んでいても、核あるいはDNAに損傷がなければ核移植によって元の生物を復元できることを示している。

この新しい核移植方法は、習得に時間のかかる難しい手法だが再現性が高い。そこで本研究では、この技術のさらなる改良(成功率の改善及び現実的なサンプルでの試み)と想定される問題(異種間核移植や胚移植)を解決し、最終的には絶滅動物の凍結死体細胞からクローンをよみがえらせる手法を開発することを目標としている。

2. 研究の目的

本研究では代表者が最も得意とするマイクロマニピレータを操作し行える卵子操作技術を中心に、絶滅動物を復活させるために解決しなければならない下記の5つの実験を行い、マウスを用いた基礎研究を完成させる。(1)核移植に最適なドナー細胞の種類を特定する (2)凍結と核の初期化の関係を明らかにする (3)凍結乾燥させた組織からクローン個体の作出を試みる (4)異種間核移植を試みる (5)クローン胚の異種間での胚移植実験を行う これらの実験によって、実際に絶滅動物の復活に必要な技術が開発されることを目的とする。

3. 研究の方法

研究代表者が得意とする核移植技術を中心に、絶滅動物を復活させることを目的とした技術開発実験を行う。

(1)絶滅動物を復活させるためには現存する異種動物の卵子を利用する必要があることから、マウス卵子-ラット体細胞間の異

種間核移植を行う。マウス卵子をホスター卵子として使用し、異種体細胞の核を移植する。異種間の核移植は従来の核移植法で行うと卵子細胞質と核の不一致により不可能だと思われるが、本実験では新たな試みとして除核していないマウス卵子へ GFP-Tg ラット体細胞核を移植し、単為発生させ、そこからハイブリッド ES-like 細胞株を樹立するという方法を試みた。また、異種体細胞のドナー核を丸ごと核移植してしまうのではなくドナーの染色体を一本だけマウス卵子内に移植する方法の開発を行った。本実験は目的の(4)(5)に相当する。

(2)マンモスなど永久凍土から回収した組織は凍結だけでなく乾燥もしていることから、凍結乾燥させた組織からのクローン個体作出を目指す。すでに凍結乾燥して1ヶ月間室温保存した精子からでも産仔作出が可能なこと(Wakayama et al Nature biotech 1998)、凍結乾燥した培養細胞からのクローン胚(申請者の属する研究室 Ono et al., JRD 2008)、および凍結死体からクローンマウスが作出できること(PNAS:申請者ら)から成功する可能性は高いと思われる。これまでの成果をもとに、本研究では体の組織(おもに脳など)を凍結乾燥させ、そこから核を回収しクローン個体の作出を試みる。また、絶滅危惧種のように個体数が少ない動物種の場合、主に糞や、足跡などの生活痕で生存が確認されることが多い。そこで、GFP-Tg マウスの糞を採取し、そのに付着する腸管細胞を用い、核移植を試みる。細胞採取法は糞表面を PBS で洗い、遠心にて細胞を含む沈殿物を集める。細胞はパコールなどを用い比重別に分離し、蛍光観察で細胞層だけを集め、洗い、細胞を集める。そののち核移植に用いる方法を行った。さらに、はく製やミイラ状態で保存になっている絶滅動物を想定した実験も行った。BDF1 マウスの毛皮をはぎ、デシケーター内で乾燥させ、付着している皮膚組織を PBS で水和した。水和された細胞をホモジナイザーで核を取出し、核移植に用いた。

本実験は研究の目的の(2)(3)に関連する。

(3)絶滅動物がクローン技術で蘇ってもたった数匹できただけではその世代だけでまた同じように動物種が絶滅してしまう。なぜなら現存する絶滅動物のサンプルは限られており、例えば、同じ個体から生まれたクローン同士を繁殖することは性別の関係上不可能である。絶滅動物を復活させたのち絶滅させないためにはその生き返った動物の体細胞を用い、さらに核移植クローンで維持する方法も考えられる。そこで我々は2005年ごろから継続して、クローンマウスからさらにクローンマウスを作る実験を行ってきた。再クローンマウスに限界があるのか、さらに再クローンされたマウスは一番初め

につくられたマウスと遺伝的に変化が起こるかを検討した。

本実験は直接的に目的の中の項目とは一致しないが、絶滅動物を維持するために必要な技術であることから、本研究費の使用目的として合致するものとし、実験を行った。

4. 研究成果

(1) 従来、異種間核移植は近縁種の卵子へドナー核を注入する方法が用いられてきたが、近縁種の卵子が入手困難な場合や、異種間核移植そのものが難しい場合が多く困難であった。そこで今回我々はドナーの染色体を一本だけマイクロマニピレータでつまみとり、受精卵に挿入する方法を開発した。同じ研究室内で開発されたハロゲンランプで蛍光ラベルした染色体を識別する新技术を用いることで実現した。まず挿入したい染色体をもつ体細胞を除核卵に核移植する。体細胞核が膨大化するタイミング(3時間)を見計らい、細胞骨格をばらばらにする薬剤(ノコタゾール、デメコルチンなど)で培養し、一つ一つの染色体を抜き出せる状態にする。次に同時進行で用意した別のマウス受精卵、または未受精卵に抜き出したドナー染色体を一本だけ注入する。染色体移植した卵子は胚盤胞まで培養し、ES細胞化する。すでにラット染色体1本を持つマウスES細胞の樹立に成功しており、現在ラット染色体の番号の特定とキメラマウス作製後のラット染色体由来遺伝子発現について解析中である。しかし、成功率が非常に低いことから、染色体を取り出す際の細胞骨格を壊すための薬剤の検討、及び染色体移植された卵子がその染色体を取り込むための最適な受精卵細胞周期の条件などを検討している。(投稿準備中)

(2) 絶滅動物の体は永久凍土、剥製、毛皮、ホルマリン保存した標本など過酷な悪条件下で見つかることが多い。永久凍土などで発見される試料は凍結だけでなく乾燥しダメージも大きい。しかし現時点ではどの体細胞がもっとも耐性があるのか、核移植へのDNA損傷の影響は全くわかっていない。そこで本年我々は、ホルマリン標本した体組織から核を採取し、クローン個体の作製を試みた。しかし、体細胞自体を一つ一つばらばらにするところまではできたのだが、体細胞自体がホルマリン変性を起こし、核移植用の核を採取するのが困難なため実験は失敗に終わった。次に、絶滅危惧種は直接個体を捕獲することは難しく、糞などからその生存などがあきらかにされることが多いことから、GFPMマウスの糞から採取した腸内壁細胞を使用し、核移植を試みた。糞を採取し分離したところ、体細胞数は少ないもののGFPMを発する細胞を採取することに成功した。さらにその細胞を用い核移植を試みた。核移植胚は前核を

構成し、2細胞まで分裂するものがあつたがそれ以上発生することはなかった。以上の2つの試みは失敗に終わったが、その他劣悪条件下で保存されている体細胞をさらに検討してみる必要がある。

研究目的(3)の実験として、凍結乾燥させた組織からのクローンの試みを行った。現在までにOno(J Reprod Dev. 2008

らにより、凍結乾燥した体細胞より、核移植を試み、核移植ES細胞を樹立し、それを核移植し、クローン個体を得た報告がある。しかし、この場合、凍結乾燥する資料は培養細胞の状態であるため、乾燥する前に事前に細胞培養の準備を行わなければならない。そこで代表者は直接体組織を採取し培養することなくそのまま乾燥する方法を行った。使用したサンプルはBDF1マウスの筋肉、肝臓、卵子(卵丘組織付きMII)を用いた。乾燥方法は凍結乾燥機による乾燥、スライドにガラスに組織片を貼り付けデシケータ内で乾燥させる方法を用いた。いずれも乾燥後用いた培地と同等の水で水和を行い、細胞をホモジナイザーですりつぶしたのち体細胞核を取り出した。取り出した細胞核は従来法の核移植に用いた。しかし、どの方法でも細胞自体が固く固まり核移植が大変困難であったため、できた核移植胚の数が少なかった。さらに前核形成を確認することができなかった。核移植前の細胞をトリプシンやプロKなどの酵素処理をし、細胞表面を柔らかくしてからインジェクション用ドナー核に用いたが、いずれも数%前核を形成するものの2細胞期にまで発生することはなかった。本実験は失敗に終わったがさらに良い方法を検討していきたい。

(3) クローン動物の体細胞から再びクローン動物を作り出す再クローニング技術は、核の初期化研究に役に立つだけでなく貴重な動物の維持のといった観点からも重要である。我々は以前、クローンマウスの体細胞(卵丘細胞)を用いて再クローニングを行い、何世代まで再クローンマウスを作ることが可能なのか調べたが、その結果、再クローニングは可能だが、クローンマウスの成功率は世代を経るたびに徐々に低下し、1回目の実験ではわずか4世代目まで、2回目の実験では6世代目まで成功したが1匹しか生まれず、しかもその個体は翌日死んでしまい7世代目以降のクローンマウスを作成することはできなかった。(Wakayama et al., 2000)。しかし、当時のクローンマウスの成功率は1-2%であったため再クローニングに失敗した原因が、再クローニングの限界なのか、成功率の低さが原因なのか結論できなかった。われわれの研究室ではヒストン脱アセチル化阻害剤(HDACi)の一種であるTricostatin A(TSA)を培地に加えることによってクローンマウスの成功率を劇的に改善することに成功した(Kishigami et al., 2006)。そこ

で TSA を用いて再クローニング実験を再挑戦することにした。

BD129F1 (BDF1 x 129/Sv : 三元交配) マウスを 4 匹用意し、それぞれからクローン個体(第一世代)を作出した。その中で最もクローンの作出成績の高かったドナーをオリジナルマウスとし、再クローニング実験をスタートさせた。クローンマウスが生後 3 カ月になった時点で卵丘細胞を採取し、2 世代目(G2)の作出を試み、以降同様に繰り返した。

2005 年末に実験を開始し、再クローニングを継続した結果、現時点で 19 世代目まで成功している。クローンマウスの成功率は図に示す通り、数世代ごとにばらつきは見られるが徐々に上がってきており、現在は 10.6%となっている。各世代のクローンマウスの合計数を合わせると、最初の 1 匹のドナーマウスからすでに 300 匹以上のクローンマウスが生まれている。一方クローン動物には異常が多発することが知られ、マウスの場合胎盤が巨大化することが知られている。そこですべてのクローンマウスの胎盤の重さや生後の死亡率を測ってきたが、それらはすべて通常のクローンマウスと同程度であった。

これらの結果から少なくとも現時点では、再クローニングを繰り返しても核の初期化には影響が生じないこと、クローン動物の異常は核移植で必ず生じるが世代を重ねても蓄積するものではないことが明らかとなった。また以前の報告で 6 世代までしか続けられなかったのは、当時のクローン技術の成功率が低すぎたためだと考えられた。今後クローン作成技術をより改善することで、クローン動物を無限に作り続けることができるようになるのではないだろうか。

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 7 件)

1. Wakayama S, Kohda T, Obokata H, Tokoro M, Li C, Terashita Y, Mizutani E, Nguyen VT, Kishigami S, Ishino F, Wakayama T. Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. Cell Stem Cell. Mar 7; 293-297(2013).カバー採用 論文査読あり

2. Terashita Y, Wakayama S, Yamagata K, Li C, Sato E, Wakayama T. Latrunculin a can improve the birth rate of cloned mice and simplify the nuclear transfer protocol by gently inhibiting actin polymerization. Biol Reprod. 180. (2012) 論文査読あり

3. Yamagata K, Iwamoto D, Terashita Y, Li C, Wakayama S, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Saeki K, Wakayama T. Fluorescence cell imaging and manipulation using conventional halogen

lamp microscopy. PLoS One.;7(2) (2012) 論文査読あり

4. Amarnath D, Wakayama S, Zhu J, Moawad AR, Wakayama T, Campbell KH. The novel use of modified pig zygotic medium for the efficient culture of the preimplantation mouse embryos. Theriogenology. 1639-46(2011) 論文査読あり

5. Bui HT, Wakayama S, Mizutani E, Park KK, Kim JH, Van Thuan N, Wakayama T. Essential role of paternal chromatin in the regulation of transcriptional activity during mouse preimplantation development. Reproduction. 67-77. (2011) 論文査読あり

6. Hikichi T, Ohta H, Wakayama S, Wakayama T. Functional full-term placentas formed from parthenogenetic embryos using serial nuclear transfer. Development. 2841-7(2010) 論文査読あり

7. Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, Park KK, Kim JH, Thuan NV, Wakayama T. Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. Biol Reprod. 454-63.(2010)論文査読あり

[学会発表](計 7 件)

1. 若山清香 ほか マウス精子の宇宙保存へ向けて 第 106 回 日本繁殖生物学会大会 2013 年 9 月 11-14 日

2. Sayaka Wakayama EFFECT OF SPACE ENVIRONMENT ON MAMMALIAN REPRODUCTION (SPACE PUP)

2013 Aug 19-25 10th Annual Conference of Asian Reproductive Biology Society

3. S Wakayama Production of mouse offspring from heated freeze-dried spermatozoa. The second world congress on reproductive biology 2011 Oct 9-12 Cairns Australia

4. 若山清香、河原裕美、李羽中、山縣一夫、弓削類、若山照彦 マウス初期胚の発生における微小重力の影響 宇宙利用シンポジウム(第 27 回)プログラム 2011 年 1 月 24 日~25 日 宇宙航空研究開発機構・相模原キャンパス 相模原市

5. 若山清香、若山照彦 再クローニングに限界はあるのか? 第 52 回日本哺乳動物卵子学会 2011 年 5 月 21 日~22 日 国際医療福祉大学本校(大田原市)

6. S Wakayama, Y Sakaide, K Yamanaka and T Wakayama Freeze-dried Sperm Stored for Over One Month at Room

Temperature Has Ability to Generate Offspring. 7th Annual Conference of Asian Reproductive Biology Society 2010 年 11 月 8 日 ~ 12 日 Equatorial Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia

7. 若山清香、若山照彦 卵子由来初期化因子を用いた単一細胞初期化の新しい試み 第 103 回日本繁殖生物学会大会 2010 年 9 月 2 日 ~ 4 日 北里大学獣医学部 十和田市

〔図書〕(計 10 件)

1. Kishigami S., Nguyen NV, Wakayama S. and Wakayama T. Enhancing SCNT with Chromatin Remodeling Agents. In "Principles of Cloning Second edition". (Ed. Cibelli J. Gurdon J. Wilmut I. Jaenisch R. Lanza R. West MD. Campbell KHS), Academic press, San Diego, USA, (2013), p137-p148.

2. Li C., Wakayama S. and Wakayama T. Cloned mice from embryonic stem cells. In "Advanced in Molecular Biology and Medicine: Stem cells. From Biology to Therapy" Vol. 1 (Ed. Robert A. Meyers: Wiley-Blackwell Press) (2013), 233-254.

3. 若山清香、李羽中、若山照彦「生殖工学を用いた新たな動物繁殖技術」実験医学 30: 58-64(2012) 総説

4. Hirata S, Fukasawa H, Wakayama S., Wakayama T, Hoshi K. Generation of healthy cloned mice using enucleated cryopreserved oocytes. Cell Reprogram. 7-11(2011) 論文査読あり

レビュー

5. 若山清香、若山照彦「マンモスの再現に向けて」実験医学 1148-1152(2011) 総説
レビュー

6. Wakayama S. and Wakayama T. Improvement of mouse cloning using nuclear transfer-derived embryonic stem cells and/or histone deacetylase inhibitor. Int. J. Dev Biol. 54: 1641-1648(2010). 論文査読あり

7. Wakayama S., Mizutani E, Wakayama T. Production of cloned mice from somatic cells, ES cells, and frozen bodies. Methods Enzymol. 476:151-169 (2010). 論文査読あり

8. 若山清香、河原裕美、弓削類、若山照彦「微小重力におけるマウスの受精と発生 - 人類は宇宙で繁栄できるか - 」遺伝 64 : 60-65 (2010)

9. Wakayama S. Mizutani E. and Wakayama. Nuclear transfer ES cells as a new tool for basic biology In: Stem Cells & Regenerative Medicine: From Molecular

Embryologyto Tissue Engineering. Humana Press, USA. 351-369(2010) 論文査読あり

10. Wakayama S. Thuan NV. and Wakayama T. (2010) Mouse cloning by nuclear transfer. In: Advanced protocols for animal transgenesis. (ed. Shirley Pease, Thomas L. Saunders) Springer New York, p267-290 論文査読あり

〔その他〕

山梨大学生命環境学部 附属ライフサイエンス実験施設

HP

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~twakayama/LSHP/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

若山 清香 (WAKAYAMA, Sayaka)
山梨大学・生命環境学部・助教

研究者番号 : 10525918

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

