

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：	14101
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23658159
研究課題名（和文）	腹びれイルカを用いた鯨類後肢消失機構の分子生物学的解明
研究課題名（英文）	Molelucar Biological Analysis for the mechanism of the hind limb formation of the dolphin with fin-shaped hind limbs
研究代表者	
	吉岡 基 (YOSHIOKA MOTOI)
	三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
研究者番号：	30262992

研究成果の概要（和文）：

腹びれをもつ世界で唯一飼育されている雌ハンドウイルカ *Tursiops truncatus* 1 頭を対象に鯨類における後肢発現機構を遺伝学的手法を用いて明らかにするため、次世代シーケンサを用いて遺伝子解析を行った。その結果、あるホメオボックス遺伝子にミスセンス変異を見出した。同遺伝子は哺乳類において後肢の発生・形成を制御していることから、腹びれ形成の有力な候補遺伝子である。腹びれイルカのゲノム DNA ソースを安定的に得るための培養細胞株と iPS 細胞を樹立するため、血液細胞・骨髄細胞の採取および皮膚片より線維芽細胞の培養・凍結保存を行った。またそれらの組換えウイルスによる遺伝子導入を試みている。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate the genetic mechanism of the hind limb formation of the unique female bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) with fin-shaped hind limbs, we performed genome analysis of the dolphin using a next generation sequencer. We found a missense mutation in a homeobox gene, which is known to regulate development and formation of the hind limbs in mammals, therefore the gene is a strong candidate responsible for the hind limb formation in the dolphin. For the DNA source and future developmental biological experiments of her genome, we are trying to establish her immortal cell lines and iPS cells by recombinant viruses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：海生哺乳動物学，繁殖生理学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：遺伝・育種，イルカ，形態，後肢，ゲノム解析，不死化，iPS 細胞，*Tursiops*

1. 研究開始当初の背景

鯨類は、5000 万年の時を経て地球上の水域に広く適応放散してきた。この過程において、四肢歩行してきた鯨類の祖先は、体型を紡錘型に、前肢をひれ状に変化させ、尾びれを発達させた一方、現生鯨類では外形上完全

に後肢が消失した。しかし、鯨類はもとより、後肢の消失は進化の過程において種々の動物で繰り返し起きているが、その機構は未解明である。魚類では、完全な腹びれをもつ個体と腹びれが消失した個体間で遺伝的交雑を行った研究が行われ、*Pitx1* の転写制御領域の変異が関わっていることが明らかにさ

れている (Shapiro et al. 2004). マウスやニワトリでは、その四肢形成の過程は3つのステップ、Positioning (Hoxc6, Hoxd9 が関与), Initiation (Pitx1, Tbx4, Tbx5 等が関与), Outgrowth (shh や fgf 等が関与)から成り、前肢と後肢の差は Hox と Pitx1 の発現に依存し、Tbx5, Tbx4 はそれぞれ前肢、後肢特異的に発現するものの、決定因子ではないとされている。これらからすると、現生鯨類でも胎児期において後肢芽が形成され、それに対応した骨が存在することなどから、Initiation までは四肢動物と同様に進行していると考えられる。また、Outgrowth に関しては、fgf8 中心に fgf10 や shh などが正負のフィードバックループを形成しながら四肢が形成されるというモデルが有力であるが定説はない。

こうした背景の中、2006年10月、和歌山県太地町において、完全なひれ状の後肢を持つハンドウイルカが捕獲され、現在まで太地町立くじらの博物館で飼育されている(飼育名「はるか」)(Ohsumi & Kato 2008)。過去に8例、後肢の痕跡を示す個体が鯨類で発見されているが、「はるか」のような完全な後肢を持つ生体の発見は未だ例がない。

2. 研究の目的

2006年に和歌山県でイルカ追い込み漁によって発見され、世界的に注目を集めた「腹びれ」(後肢に相当)をもつメスのハンドウイルカ *Tursiops truncatus* を対象に、①同イルカのゲノムを解析し、特に鯨類の後肢の形成と消失との関連が予想される遺伝子を中心に正常個体や近縁の哺乳類等と比較することにより、腹びれ形成の有力候補遺伝子を絞る；②当該個体を繁殖させ、得られた仔イルカの遺伝的解析により、その「腹びれ」候補遺伝子の是非を検証する；③同イルカのiPS細胞を樹立・分化誘導し、四肢発生に関する細胞生物学的研究への活用と将来のクローン作製に備えることも視野に入れる。それらにより鯨類における後肢消失機構と腹びれイルカにおける再獲得の機構を解明する。

なお、この個体は研究期間終了直後の2013年4月に死亡した。

3. 研究の方法

(1) 腹びれイルカのゲノム DNA ソースを安定的に得るための培養細胞株の樹立：水族館で採血された通常イルカおよび腹

びれイルカの血液からリンパ球を分離し、組換えレンチウイルスベクターの感染により不死化遺伝子の導入を試みた。なお、用いた遺伝子は SV40LargeT 抗原遺伝子、ヒト由来 hTERT (テロメラーゼ) 遺伝子、ヒト由来 L-myc 遺伝子、ヒト由来 Hras 遺伝子および不死化を促進する Bmi1 遺伝子である。これらレンチウイルスベクターは blastcidinS や puromycin に対する耐性遺伝子も共発現するため、薬剤耐性を指標に遺伝子導入細胞を選択可能である。ヒト B リンパ球細胞の不死化に汎用される EB ウィルスのがん遺伝子 EBNA-1 等も試みる予定である。また、死亡した腹びれイルカ皮膚片より線維芽細胞の採取にも成功したのでこれも材料として併用する。

- (2) 腹びれイルカ iPS 細胞樹立と性状解析:(1)と同様であるが、iPS 樹立に向けて以下のヒト由来遺伝子を CMV エンハンサー + EF2 融合プロモーターで強力に発現する組換えレンチウイルスベクターを独自に作製した。具体的には Oct4-(T2A ペプチド)-SOX2-(T2A ペプチド)-Klf4, Nanog-(F2A ペプチド)-LMyc-(T2A ペプチド)-Lin28, Glis1 遺伝子である。T2A ペプチド、F2A ペプチドは、細胞内酵素で消化切断され、その結果一分子のペプチド(タンパク)から複数の目的タンパクを生成する。また、DNAVEC 社の山中4因子(Oct4, SOX2, cMyc, Klf4)を発現する組換えセンダイウイルスによる iPS 細胞樹立も試みる。組換えセンダイウイルスは導入遺伝子がゲノム DNA に組み込まれない点が優れている。
- (3) 次世代シーケンサーシーケンシングデータの解析と特定遺伝子完成シーケンスの作成：腹びれイルカから採取した血液からゲノム DNA の抽出を行い、次世代シーケンサー HiSeq2000 により解読した。解読データを Ensembl に登録されているハンドウイルカのドラフトゲノムと照合した結果、有力な変異が見いだされた。そこで飼育および漁業で捕獲された鯨類(ハンドウイルカ、他)200個体以上からゲノム DNA を採取、同変異領域を PCR 法によって増幅、直接シーケンシング法によって解読し、同変異の有無を調べた。
- (4) 子孫への影響をみるための繁殖に関する研究：腹びれイルカを訓練し、受診動作により定期的採血を行い、血液中の2種の性ステロイド、すなわちエストラジオールとプロゲステロン濃度を RIA 法により測定し、排卵の季節性や周期を調べ、その結果を踏まえて、雄とのペアリ

ングを 2011 年 9 月および 2013 年 1 月に実施した。

4. 研究成果

- (1) 腹びれイルカのゲノム DNA ソースを安定的に得るための培養細胞株の樹立：まず，EGFP を発現するレンチウイルスベクターで感染効率を検討した。しかし，低張液法，比重分離法どちらで調製したリンパ球細胞でも常法では非常に低いことが判明した。また T 細胞を増殖させウイルス感染効率を向上させるため，ConA 刺激や固相化抗ヒト CD3 抗体＋組換えヒト IL2 含有培地を用いたが持続的な細胞増殖は観られなかった。そのため血液細胞へのレンチウイルスの感染効率を向上させる Retronectin の併用を試みているが未だ不死化細胞は得られていない。これは血液採取から白血球細胞分離まで試料送付のため約 1 日経ているためかもしれない。この影響を軽減するため ROCK 阻害剤を採血直後に添加することを試みている。
- (2) 腹びれイルカ iPS 細胞樹立と性状解析：
(1)と同様の問題で未だ成功していない。しかし，死亡した腹びれイルカより，血液の他，骨髓液も採取し，リンパ球を分収，凍結保存した。また，ROCK 阻害剤を添加した培地に浸漬し輸送した皮膚片を細断し，シャーレで培養したところ，線維芽細胞の増殖が観察された。これをさらに増殖させ，凍結保存した。線維芽細胞は iPS 細胞樹立に汎用されている。しかし他個体由来の線維芽細胞を用いた予備実験では，レンチウイルスの感染効率が非常に低かった。原因は不明であるがマイコプラズマ除去剤処理が有効そうな手応えを得ている。今後は，増殖性がよく遺伝子導入に都合が良い骨髓由来リンパ球や上記線維芽細胞を材料に，組換えレンチウイルスまたは組換えセンダイウイルスを用いて遺伝子導入を行い，iPS 細胞の樹立を試みる。
- (3) 次世代シーケンサーによるシーケンシング解析と特定遺伝子変異の検索：次世代シーケンサー HiSeq2000 で腹びれイルカゲノム DNA を解読した結果，後肢の発生・形成において決定的に重要な制御を行っているホメオボックス遺伝子中にミスセンス変異が存在することを見いだした。このミスセンス変異は，魚類を含む脊椎動物で共通に保存されているホメオドメイン中の 1 アミノ酸残基を他のアミノ酸に置換させることなどから同タンパク質の特性を大きく変化させる可能性があり，腹びれ形成の極めて有力な原因変異候補であると考え

た。しかし，もし同様の変異が他のバンドウイルカや鯨類にも存在すれば，同変異が原因である根拠は乏しくなる。そこで飼育および漁業で捕獲されたバンドウイルカ・他鯨類，のべ 200 個体以上からゲノム DNA を採取，同変異領域を PCR 法によって増幅し，直接シーケンシング法によって解読し，変異の有無を調べたが，同ミスセンス変異は見いだされなかった。このことから，同ミスセンス変異は腹びれイルカの特有の変異であると考えられ，同ミスセンス変異は腹びれ形成の原因であることを支持する結果となった。

- (4) 子孫への影響をみるための繁殖に関する研究：腹びれイルカは，研究開始以前に性ホルモン濃度の変化からすでに成熟していると考えられていたが，研究期間中の初年度（2011 年）には，夏から秋にかけて，また翌年度以降は春以降連続的にプロゲステロンの周期的な上昇が観察され，その周期は通常のバンドウイルカと同じほぼ 1 ヶ月周期であることが明らかになった。また，2 回の雄とのペアリング時には，いずれも交尾姿勢が観察されるなどの繁殖行動が観察された（このときの交尾姿勢については，通常個体同士の交尾姿勢とは異なる姿勢をとることが明らかになった）。しかし，最終的には受胎には至らず，その後，2013 年 3 月より体調不良に陥り，研究期間終了直後の 4 月 4 日に死亡した。なお，死後に今後の繁殖研究に資するため，卵巣および子宮を採取した。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

- (1) Ito, H., Koizumi, K., Ichishima, H., Uchida, S., Hayashi, K., Ueda, K., Uezu, Y., Shirouzu, H., Kirihata, T., Yoshioka, M., Ohsumi, S. and Kato, H. Inner structure of the fin-shaped hind limbs of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). 19th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, Tampa, Florida, November 26-December 2, 2011.

〔図書〕（計 1 件）

- (1) 太地町立くじらの博物館（編），太地町立くらの博物館，腹びれのあるバンドウイルカ「はるか」，2013，8pp.（印刷中）。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 基 (YOSHIOKA MOTOI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授

研究者番号： 30262992

(2) 研究分担者

浅川 修一 (ASAKAWA SHUICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・

教授

研究者番号： 30231872

高柳 淳 (TAKAYANAGI ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号： 80245464

(3) 連携研究者

加藤 秀弘 (KATO HIDEHIRO)

東京海洋大学・海洋科学部・教授

研究者番号： 30371917

小泉 憲司 (KOIZUMI KENJI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号： 40053342