

私の研究

動物園動物への遺伝資源保全に向けた橋渡し研究とマンモス（古生物）への応用

近畿大学 先端技術総合研究所

安齋 政幸

1. はじめに

突然ですが、皆さんは動植物園には行ったことはありますか？

我が国には動物園89園、水族館62施設が「(公社)動物園水族館協会」へ加盟しており、「種の保存」・「教育・環境教育」・「調査・研究」・「レクリエーション」4つの役割を目標として、来場者の期待に応える機関として多くの動物種および個体群が管理されている⁽¹⁾。特に2012年より新たに導入されたJAZA Collection Plan (JCP)では、動物園水族館協会の有機的な連携のもと、動物の繁殖と遺伝資源の保存に日本の動物園と水族館が一丸となって、繁殖の効率化に伴う動物の収集や繁殖スペースの改善、獣医療施設の拡充などの取組みが開始されている。一方で、この動植物たちの資源としての衰退と地球環境の悪化が懸念されており、長い地球の歴史のなかでは、生物の「誕生・繁栄・衰退・絶滅」ということが数多く何度も繰り返されている。これからの時代、現存する動物から遺伝形質の変化や繁殖効率の変化を損なわせることなく積極的に保存および保全とすること、そして、動物の絶滅の原因とは何なのか。その

歴史を探るとで、将来にわたる生態と環境さらには個体の生理と進化を探索することも必要なのかもしれない。

2. 飼育下動物を使った遺伝資源保存の研究～鳥類の実施例から学ぶ～

遺伝資源の保存方法としては、野生動物の生息域内での生息数の確保といった「域内保全」が望ましいが、我が国においては住民の生活への配慮などの観点から、生息地を指定・保護することが難しいのが現状である。生息地での保存が困難な場合には、動物園や水族館などの飼育下繁殖施設、繁殖施設などによる「生息域外保全」が試みられている。しかしな

がら、動物園や水族館における遺伝資源の保全として、国内で150以上の施設において大小を問わず約6,000種以上にのぼる動物種が飼育されているなかで、生体による遺伝資源の保存のための研究開発には、特定の機関のみで進められているのが現状であり、動物園間において自然繁殖技術にも複数の要因が重なることで障壁が生じることもある(図1)。これらの問題を解決するための配偶子や初期胚の凍結保存、人工授精や胚移植による様々な遺伝資源の保存法が開発されている。しかし、季節性による生殖細胞の成熟や加齢とともに配偶子回収の困難な場合に遭遇することも珍しくなく、そのリスクや時間と費

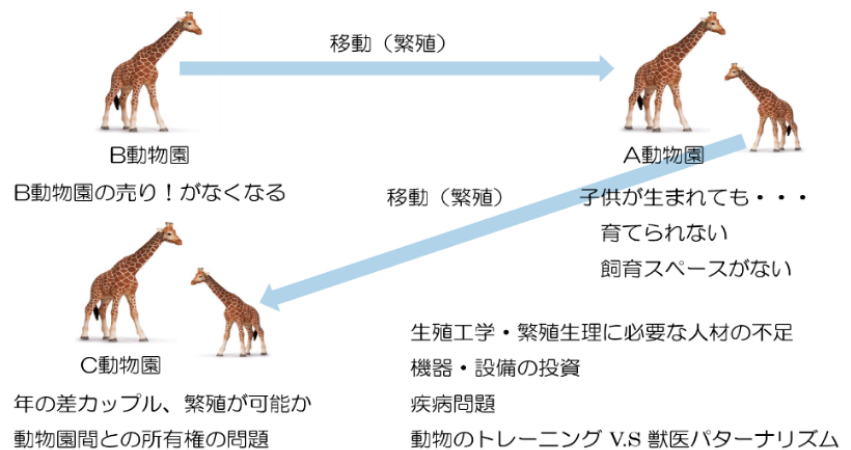


図1. 自然繁殖における諸問題



図2. マッサージによる射出精液の採取

用を要するという問題も考察されている^(2,3)。

一例として、和歌山アドベンチャーワールドの協力を得て、国内有数の飼育規模を誇るキングペンギン(*Aptenodytes patagonicus*)を例に解説する。ペンギン目における国内機関での人工繁殖の成功例は、射出精液や冷蔵保存精子を用いてミナミイワトビペンギンなどが成功している。世界的に見てもまだ4機関で成功しているにすぎない。著者らのグループでは、ハズバンダリートレーニングによりマッサージ法で回収した射出精液を希釈して運動性を確認している

(図2)。しかし、鳥類は放卵直後まで受精率が低いとされており、射出精液を精子貯留腺にて長時間運動性を保持した状態で待機する独自のシステムがある。そこで、精液希釈液の組成を見直し浸透圧を変更した独自の希釈液を調整した。ハズバンダリートレーニングが可能になった個体において、図3に示す通り夾雑物を取り除いた精液を人工授精に用いることで今年、国内2例目となるキングペンギンの産児獲得に成功した(<https://www.aws-s.com/pressrelease/pdf/200302.pdf>)。

3. クローン技術を駆使して動物園動物・絶滅動物を研究する

動物が生理的寿命を迎えると、解剖などによる所見を終え、一部の組織は剥製標本や骨格標本として回収されるものの、その殆どは、ネズミでもゾウでも等しく廃棄物として処理される場合が多い。

筋肉の源となる筋衛星細胞は

活性化されると、その後、筋芽細胞 → 筋細胞 → 筋管細胞へと分化し、最終的に多核化した細胞として遺伝情報を保存したまま一生を終える(図4)。動物園動物や野生動物から試料を採集する場合、高齢化による生殖細胞の採取が困難になる個体あるいは死後、自己融解による生殖細胞の採取が不可能になる場合がある。この場合、代替手段としてより多くの組織の回収が可能である筋肉組織は、初代培養による各培養細胞の樹立も可能である。さらに、死後動物を活用することで直接的な遺伝情報として筋肉組織から体細胞核を取り出し、個体再生に繋がる遺伝情報だけでなく生物学的特性も得られることを意味している。

著者らは、この新たな遺伝資源を回収する試みとして、筋肉組織を用いた遺伝資源保存の検討を開始した。まず、筋肉組織から網羅的データの定量的な情報取得を目的に、アジアゾウとケープハイラックスの筋肉組織を用いて、Triple TOF LC/MS/MSと配列データベースを利用してタンパク質同定を検討したところ、いずれも50種以上の動物種との類似性を認めた。さらに、同定されたタンパク質は、先行解析でも多く登録されているアフリカゾウと比較した結果、アジアゾウ50%、ケープハイラックス15%のタンパク質が一致した(図5)。さらに、興味深いことにマンモスとも類似性を示し、既に絶滅した動物組織においても生物資源情報が得られることを意味した⁽⁵⁾。

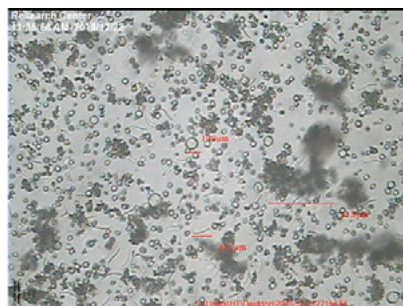


図3. ペンギン類射出精液の観察(左: 夾雑物少ない精液 右: 夾雑物多い精液)

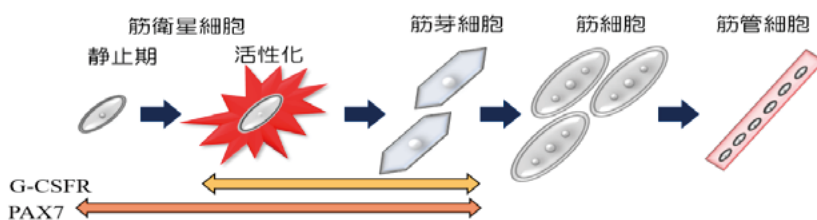


図4. 筋衛星細胞からの筋肉形成(文献4を改変)

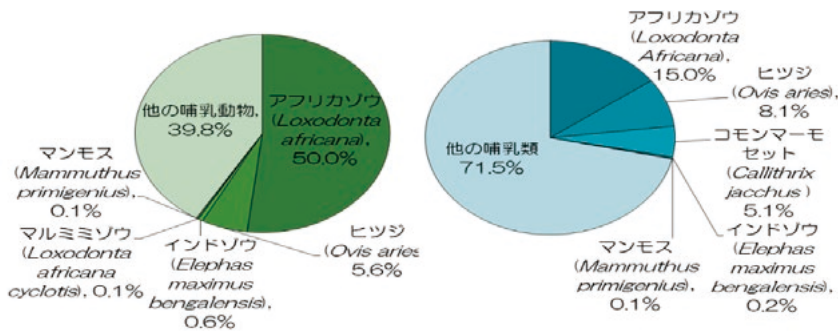


図5. 同定されたタンパク質のBlast検索結果（動物種選定）
左：アジアゾウ 右：ケープハイラックス（安齋ら、2017より引用）

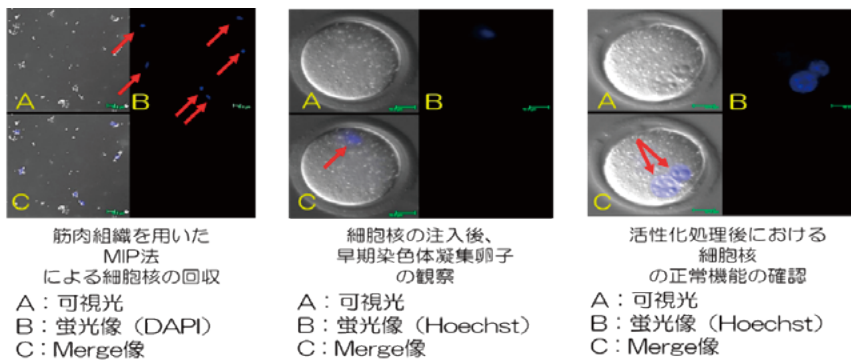


図6. アジアゾウ筋肉組織から回収した体細胞核を用いた異種間クローン技術の一例（安齋ら、2017より引用）



図7. YUKAマンモス（加藤撮影 原図）

筋肉組織の有効利用を目的に、特に生理的寿命を終えた動物個体における組織を用いて筋肉組織内にある体細胞核の機能は「どのような生物学的特性を維持しているのか?」。Greenらはウシの胎児由来筋肉組織塊から筋管細

胞を取り出して、体細胞クローン技術によって作成したクローン胚あるいは筋肉組織から線維芽細胞を作成して得られたクローン胚は、胚盤胞までの発生には悪い影響はないことを報告している⁽⁶⁾。これは、死体動物や絶滅動

物からクローン技術を用いることで生物学的特性を調べる突破口となると考えられている。著者らも、回収した体細胞核の機能を調べるためアジアゾウ筋肉由来体細胞核をマウス卵子へ体細胞核移植をおこなったところ、体細胞核には再生する機能を有していることを確認できた(図6)。では、既に絶滅した動物の生物学的特性は現代において機能するのか。同様に著者らの研究グループでは、2010年に発見され2013年に近畿大学へ提供された約2万8千年前に生存していたユカギルマンモス(図7)の組織を用いて生物学的特性を調べた⁽⁷⁾。

前述と同様にタンパク質の質量分析をおこなったところ、これまでに登録されていた126種類を大幅に上回る869種類のたんぱく質を同定することに成功した。さらに、このタンパク質のデータから核内のヒストンのタンパク質が多く含まれていることが特定され、極度に脱水された状態の筋肉組織でも細胞核が存在する可能性を示した。次に、マンモス由来細胞核がマウスの卵子内でのどのような活性を示すかを検証するため、筋肉組織から体細胞核を取り出し予め蛍光プローブを注入したマウス未受精卵へ体細胞核移植をおこない、卵子細胞質内で起こっている現象を生きのまま可視化できる「ライブセルイメージング」技術にて卵子を観察した(図8)。その結果、マウス卵子に移植したマンモス由来細胞核への「ヒストンH2B」が取り込まれ、その注入核の周辺では、紡錘

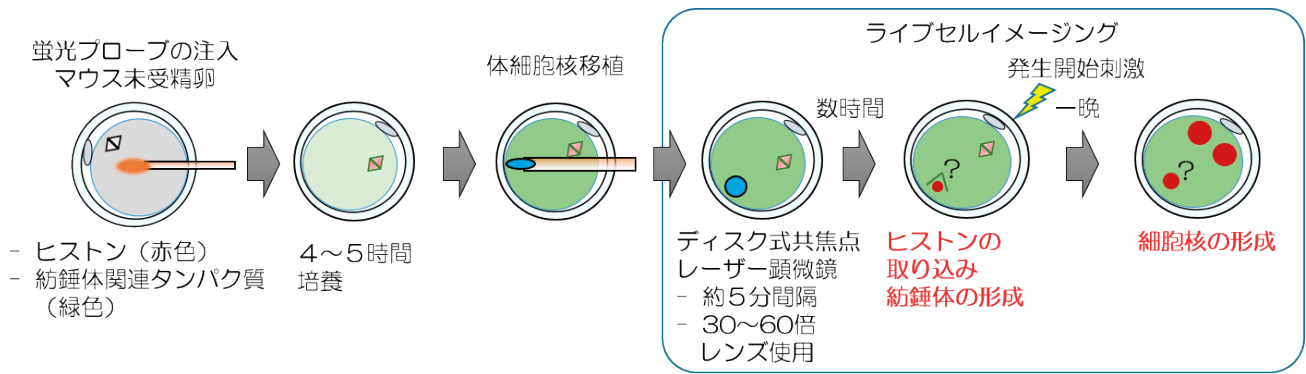


図8. 体細胞核移植とライブセルイメージング (Yamagata *et al.*, 2019を改変)

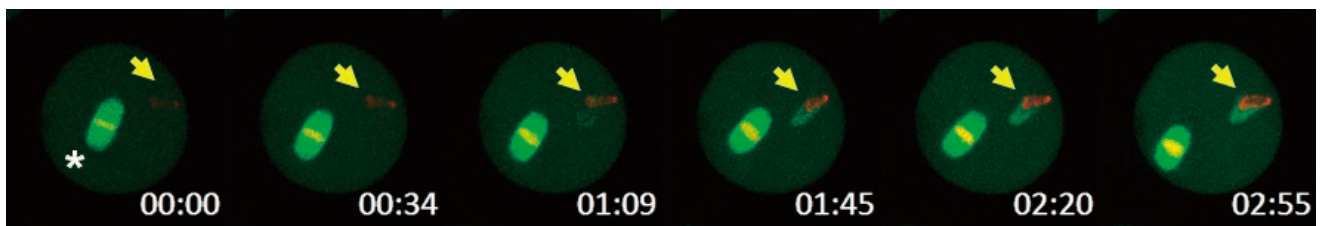


図9. マンモス由来細胞核の注入後ヒストンの取り込みと紡錘体の形成 (Yamagata *et al.*, 2019を引用)

赤色：細胞核 緑色：紡錘体 矢印は注入マンモス由来核 ☆はマウス卵子由来核

体が形成され、細胞分裂の兆候を示す初めての現象を捉えることに成功した(図9)。

4. おわりに

現在の生物が絶滅するスピードは加速度的であると言われている。恐竜の生きていた時代ではこの地球上で1年間に絶滅する種は殆どなく繁栄していた。ところが現代では4万種以上が危機に曝されている。例えば、著者らのグループでは絶滅したマンモスの生物学的特性の研究を開始して20年以上が経過して、ようやく1つの生物情報のキーワードの一端を見たに過ぎない。これからも多くの研究を重ねながら日進月歩の高度な周辺技術と共有化により、これまでに無いような「研究する動物園」や既に絶滅した「マンモス」に代表されるよう

な古生物への応用研究が期待されることでしょう。

謝辞

本研究に関して、ご協力を頂きました、近畿大学 山縣一夫先生、永井宏平先生、豊橋総合動植物公園 高見一利先生、宇部市ときわ動物園 宮下実先生、アドベンチャーワールドAWS動物病院 尾崎美樹先生、安達那央子先生に感謝申し上げます。

参考文献

- 堀秀正. (2016) 動物園の個体群管理. どうぶつと動物園. 68, 12-17.
- 大沼学. (2014) 絶滅危惧種の遺伝資源の保存. 獣医畜産新報. 67, 35-44.
- 佐藤喜和. (2004) ヘアトラップによる体毛回収とDNA個体識別を用いたクマ類の個体数推定の現状と課題. 哺乳類科学. 44, 91-96.
- P.S Zammit *et al.* (2006) The skeletal muscle cell: The stem cell that came in from the cold. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 54, 1117-1191.
- 安齋政幸ら. (2017) 動物園動物由来組織を用いた保存研究 ~動物園・水族館と

の知の共有に向けて~. 近畿大学先端技術総合研究所紀要. 22, 25-37.

- Green A.L *et al.* (2007) Cattle cloned from increasingly differentiated muscle cells. Biology. Reproduction. 77, 395-406.
- Yamagata K *et al.* (2019) Signs of biological activities of 28,000-year-old mammoth nuclei in mouse oocytes visualized by live-cell imaging. Scientific Reports. 9, 4050.

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)