

ヒトテロメア逆転写酵素遺伝子導入した鯨類細胞の性状解析

中田章史(北海道薬科大学)、落合真理、岩田久人(愛媛大学)

【研究目的】

野生動物は、実験動物と異なり、遺伝情報が少なく新鮮な試料の入手が困難であるため、細胞学的な知見が乏しいのが現状である。しかしながら、野生動物でも適切に組織の処理を行えば、細胞学的研究につながると考えている。しかしながら、鯨類は、実験動物化に不適、新鮮な試料の入手が困難、倫理的な問題等で細胞学的な研究が立ち遅れているのが現状である。そのため、鯨類の細胞培養法の確立および培養細胞を得ることで、様々な分野で再現性のある解析が可能となる。一方で、初代培養細胞は細胞分裂回数が有限であり、継代を繰り返すことでゲノムに変化が生じ、再現性のある結果を得ることができない可能性がある。これを回避するために、ヒトまたは実験動物では、TERT, p53/RB, SV40 T 抗原遺伝子等を組み込んだ発現ベクターを利用して細胞の不老化が行われている。我々は、安定した鯨類細胞資源を供するために、鯨類の初代培養細胞に対して、細胞の不老化で用いられているヒトテロメア逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子の導入し、hTERT 遺伝子導入オウギハクジラ細胞を樹立した。

本研究では、この得られたヒトテロメア逆転写酵素遺伝子が導入された鯨類細胞株の特徴を明らかにするために、染色体解析および定量 PCR 法によるテロメア長の測定を試みた。

【研究内容】

・染色体標本の作成

新鮮な死亡漂着個体から組織を採取後、培養液中に浸漬して研究室に冷蔵で運搬した。組織は抗生物質を含む培養液で洗浄し、細切した。細切した組織片は培養フラスコに静置して、適切な培養液を用いて培養を行った。第4継代のオウギハクジラ培養細胞および第31継代の hTERT 導入オウギハクジラ細胞を 0.25% trypsin/EDTA 液で解離した後、コルセミドを最終濃度 0.02 μ g/ml となるように medium に加えた。37 °C で2時間 incubate し、これを 1200rpm で5分間遠心し、上清を捨て、0.075M KCl を加えて 37 °C、30分間の低張処理を行った。遠心後、上清を捨て 4° C のカルノア固定液を加え細胞浮遊液とした。細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、染色体標本を作成した。染色体標本は、ギムザ染色を行ない、顕微鏡観察した。

・定量 PCR 法によるテロメア長の測定

遺伝子導入前と後のオウギハクジラ細胞および対照としてテロメラーゼ活性の高いことが知られているヒト白血病由来の Jurkat 細胞のゲノム DNA を抽出した。テロメア領

域の長さを測定するために Absolute human telomere length quantification qPCR assay kit (Sciencell Research Laboratories)を用いて、そのプロトコルに従って PCR 反応液を調整した。また、Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR system (Life Technologies) で反応および検出を行なった。

【研究成果】

hTERT 遺伝子導入におけるゲノムへの影響を調べるために、hTERT 遺伝子導入前と導入後におけるオウギハクジラ細胞の染色体解析を行った。その結果、遺伝子導入前の細胞は染色体数 $2n = 42$ で、過去の報告と一致していた (Kurihara et al., 2017) が、遺伝子導入後の細胞では染色体数が 130 前後であることが明らかとなった (図 1)。そのため hTERT 遺伝子導入によって染色体の倍数化が生じていると考えられる。また、倍数化のメカニズムとして、細胞分裂時の中心体分離異常、細胞質分裂異常、細胞周期チェックポイントの不全等が考えられているが、詳細については不明である。

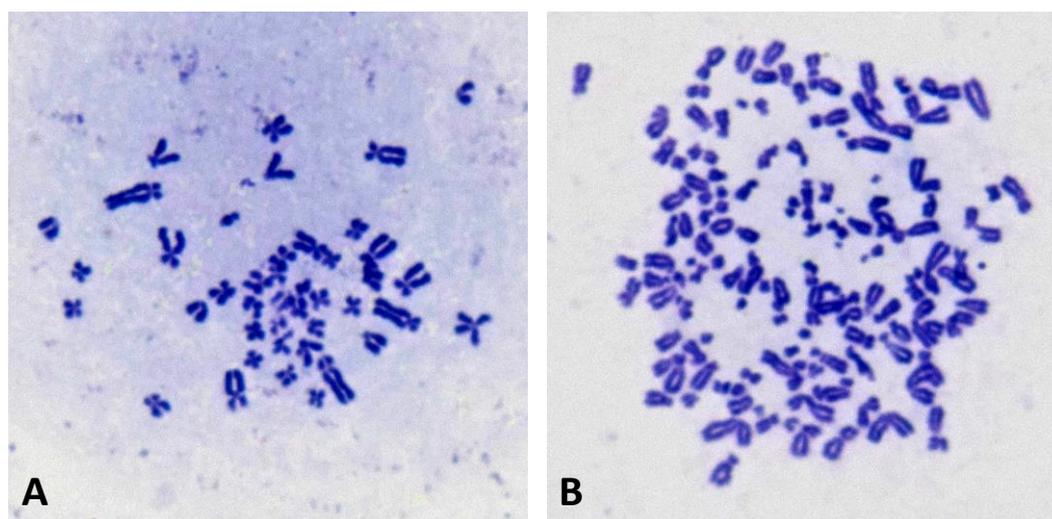


図 1 A) hTERT 遺伝子導入前のオウギハクジラの細胞分裂中期像。 B) hTERT 遺伝子導入後のオウギハクジラの細胞分裂中期像

また、hTERT 遺伝子導入前後のオウギハクジラ細胞におけるテロメア長の測定も試みた。ヒト用の Absolute Telomere Length Quantification qPCR Assay kit を用いることで、オウギハクジラのテロメア領域およびシングルコピー遺伝子の増幅が確認できた (図 2)。テロメア領域の増幅曲線では、Jurkat 細胞よりもオウギハクジラ細胞の方がテロメア領域の立ち上がり早いことからコピー数が多い可能性がある。一方、原因は不明であるがシングルコピー遺伝子の増幅において、オウギハクジラはヒトのシングルコピー遺伝子を保持していないにも関わらず hTERT 遺伝子導入前後の細胞でゲノム中のコピー数の違いが示された。

この原因を確認するために融解曲線を確認した (図 3)。テロメア領域のプライマー

は、全てのサンプルにおいてほぼ同じ位置にピークが観察された(図 3A)。一方、シングルコピー遺伝子のプライマーは、hTERT 遺伝子導入前のオウギハクジラ細胞においてピーク的位置が異なっていることが判明した(図 3B)。hTERT 遺伝子導入前後のオウギハクジラ細胞における融解温度の違いが何に起因するのか不明であるが、ヒト用プライマーを用いているため、非特異的なアニーリングが生じた可能性が考えられる。

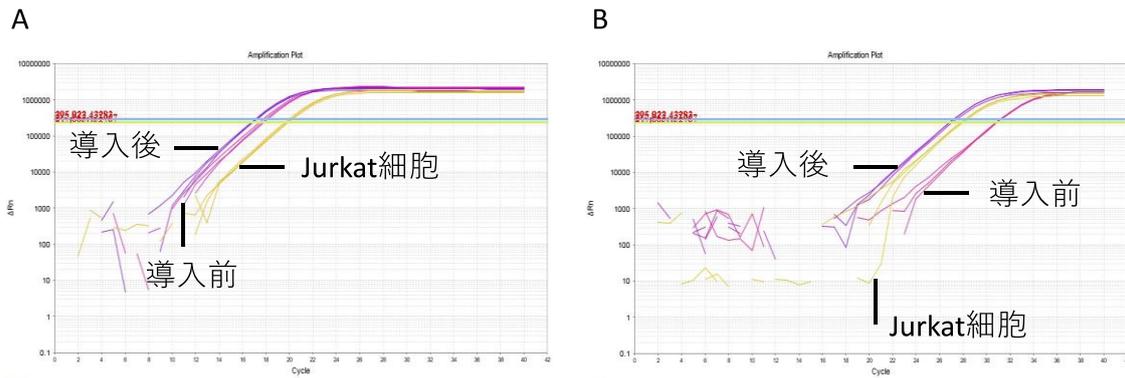


図 2 A) テロメア領域の増幅曲線。B) シングルコピー遺伝子領域の増幅曲線

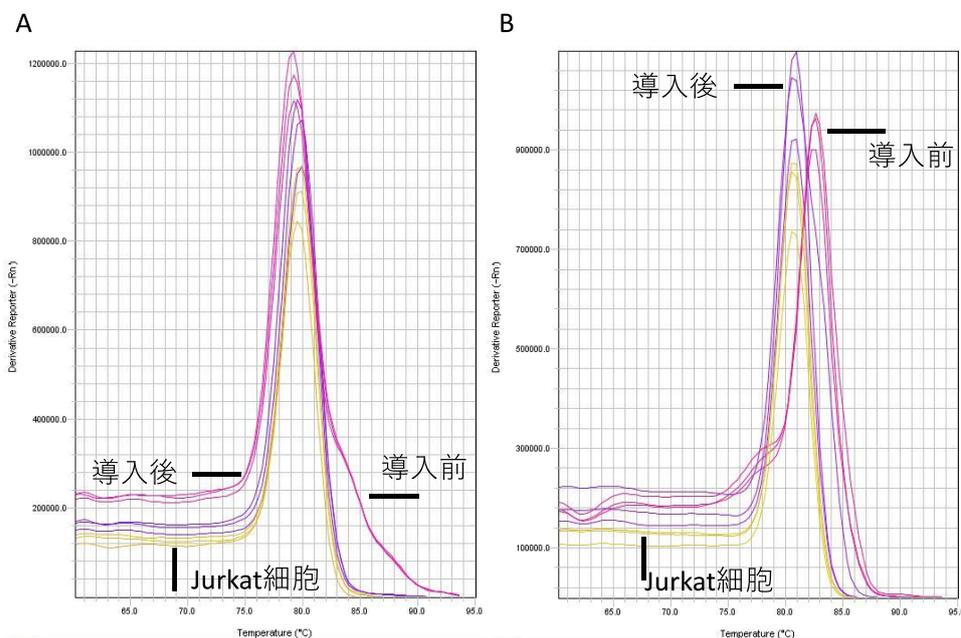


図 3 A) テロメア領域の融解曲線。B) シングルコピー領域の融解曲線。

【今後の問題点】

鯨類においてヒトテロメア逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子の導入が染色体の倍数化を誘導しているのかを確認するために、複数種の鯨類細胞に対しても hTERT

遺伝子の導入を行い不死化細胞の樹立する条件を検討する必要がある。また、正確なテロメア長の測定のために、鯨類における最適なシングルコピー遺伝子の探索が必要である。

愛媛大学化学汚染・沿岸環境研究拠点 共同研究報告書作成要領

1 報告書の 3 研究内容（別紙）は、「共同研究報告書」として印刷する予定ですので、作成にあたっては次の事項に留意してください。

- (1) 用紙サイズは A4 判として、37 字×30 行（12 ポイント）。
- (2) 提出枚数は、図、表等を含めて 5 枚以内にしてください。
- (3) 研究課題名、共同研究者名（所属を含む）、研究目的、研究内容、研究成果、成果発表、今後の問題点の順で簡潔かつ具体的に書いてください。共同研究に関する資料（プログラム、要旨集など）がありましたら添付してください。

2 報告書提出先および連絡先

報告書提出先: lamer@stu.ehime-u.ac.jp

連絡先: 〒790-8577 愛媛県松山市文京町 2-5

化学汚染・沿岸環境研究拠点事務室

Tel: 089-927-8187