

RF-0908 南西諸島のマンガースの水銀濃縮解明に関する研究

(1) 水銀濃縮機序解析ツールとして不可欠なマンガース由来細胞の安定供給をめざす戦略

琉球大学大学院 医学研究科 遺伝医学分野 柳 久美子

<研究協力者>

琉球大学大学院 医学研究科 遺伝医学分野	要 匡
医学研究科大学院生	田中 一宏
琉球大学 医学部 2年次	花房 宏昭
琉球大学 農学部 生産環境学科 亜熱帯動物学講座	小倉 剛
愛媛大学 沿岸環境科学研究センター	平田佐和子

平成21～22年度累計予算額：7,215千円（うち、平成22年度予算額：3,315千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 沖縄に生息するジャワマンガースは生体内、とりわけ肝臓に水銀を高濃度に蓄積することが知られており、マンガース由来細胞は*in vitro*で水銀代謝機序を解析するために有用なツールの一つと考えられる。本研究ではマンガース由来細胞を他機関に供与できるシステムの確立をめざし、初代培養肝細胞および線維芽細胞の培養限界、凍結保存、輸送について検討を行った。また、細胞寿命に限界の無い不死化細胞作製をめざし、機能的なマンガース不死化関連遺伝子 (*Tert*) 発現ベクターを構築した。

マンガース肝組織より回収した肝細胞は1週間程度、*in vitro*で培養することが可能で、短期の水銀代謝機序解析を目的とする実験に有用であると考えられた。また、皮膚組織より回収した線維芽細胞は*in vitro*での増殖が良好で、継代、凍結保存、凍結輸送が可能であり、短中期（約2ヶ月）の実験系にも使用しうることが判明した。水銀の蓄積には暴露する水銀濃度とともに、「暴露する時間（期間）」が重要な要因となるが、時間軸を考慮した長期の実験には不死化細胞の樹立が不可欠である。そこで、不死化細胞樹立に向けてマンガース *Tert* 遺伝子のクローニングを試み、活性領域を含む2種類の遺伝子断片を得た。得られた遺伝子断片を哺乳類細胞内で発現させるためのベクターに組換え発現ベクターを構築した。本ベクターをマンガース細胞の染色体に導入したところ、*Tert* 遺伝子が持続的に再発現することが確認された。これらの結果から本ベクターを用いて、マンガースの各種組織から不死化細胞を樹立できる可能性が示された。

本研究成果は、*in vitro*での水銀代謝機序解析を目的とした実験を可能にすることのみならず、薬物（毒物）耐性試験への応用が可能で、やんばるの生態系にとって外来動物であるマンガースの選択的駆除に貢献すると期待される。

[キーワード] マンダース、初代培養細胞、不死化細胞、不死化関連遺伝子 (*Tert*)、遺伝子発現

1. はじめに

自然界での水銀濃縮は生物に甚大な影響を与える。水銀濃縮解明へのアプローチとして、こ

れまでに生態系における個体間での水銀分布比較解析が精力的に行われた。しかしながら、個体内、とりわけ野生生物での水銀代謝機序（分解・蓄積・排泄・耐性など）に関しては解析が困難なこともあり、あまりなされていない。そのため、自然界での水銀濃縮機序の全体像は依然不明な点が多い。

そこで我々は、*in vivo*あるいは細胞を使った*in vitro*での解析など革新的な視点からの研究を加えることにより、水銀濃縮機序解明の突破口にしたいと考え、本研究に着手した。昨年度までに、生体内、とりわけ肝臓に水銀を蓄積することが報告されているマングース^{1,2)}を用い、水銀代謝機序解析のツールとしてマングース由来細胞が有用であることを示してきた（H20年度地球環境研究総合推進費・革新型研究課題（RF-085））。

*In vitro*実験に供給する細胞は個体から直接単離した初代培養細胞と正常な細胞機能を保持したまま増殖限界（細胞寿命）のみ消失した不死化細胞を考えている。初代培養細胞は、生体内での機能を良く反映し、細胞の単離プロトコルを確立すれば比較的簡単に入手可能である。しかし、個体に起因する被験細胞のばらつき（特に野生動物を用いる際には生息環境、年齢、栄養状態等が影響する）、細胞数や実験期間の制限といった欠点を持ち合わせている。

一方、不死化細胞は、樹立するまでに時間と費用、労力がかかるが、ひとたび樹立されれば均質な細胞を用いた実験が可能となり、使用する細胞数や実験の時期、期間、場所的な制約から解放され、解析の幅を広げることができる（表1）。*In vitro*の実験では両細胞ともに有用で、目的に応じて選択することになる。

本研究では、マングース由来細胞を他機関に供与するシステムの確立をめざし、初代培養細胞の培養限界、凍結保存、輸送について検討する。また、不死化細胞作製をめざし、マングース不死化関連遺伝子（*Tert*）をマングース細胞に発現させるためのベクター構築を行う。

表1 初代培養細胞と不死化細胞の特徴

	初代培養細胞	不死化細胞
利点	生体内での生理代謝機構を最も反映する。	いつでも、誰でも、どこでも解析が可能となる。 均質な細胞集団を用いた解析が可能となる。 →多面的な解析が迅速に推進される。
欠点	個体の捕獲状況に影響される（実験期間の制限）。 細胞数、継代回数に限界がある（実験内容の制限）。 個体差による影響を受けやすい（再現実験の制限）。 細胞により凍結保存不可（実験場所の制限）。	樹立が難しい（野生生物）。

2. 研究目的

- （1）マングース由来初代培養細胞を他機関に供与できるシステムを確立する。
- （2）マングース各種組織由来細胞の不死化細胞樹立にむけて、マングース不死化遺伝子（*Tert*）発現ベクターを構築し、その機能を検証する。

3. 研究方法

本研究課題を推進するにあたり、研究方針のフローチャートを図1に示す。

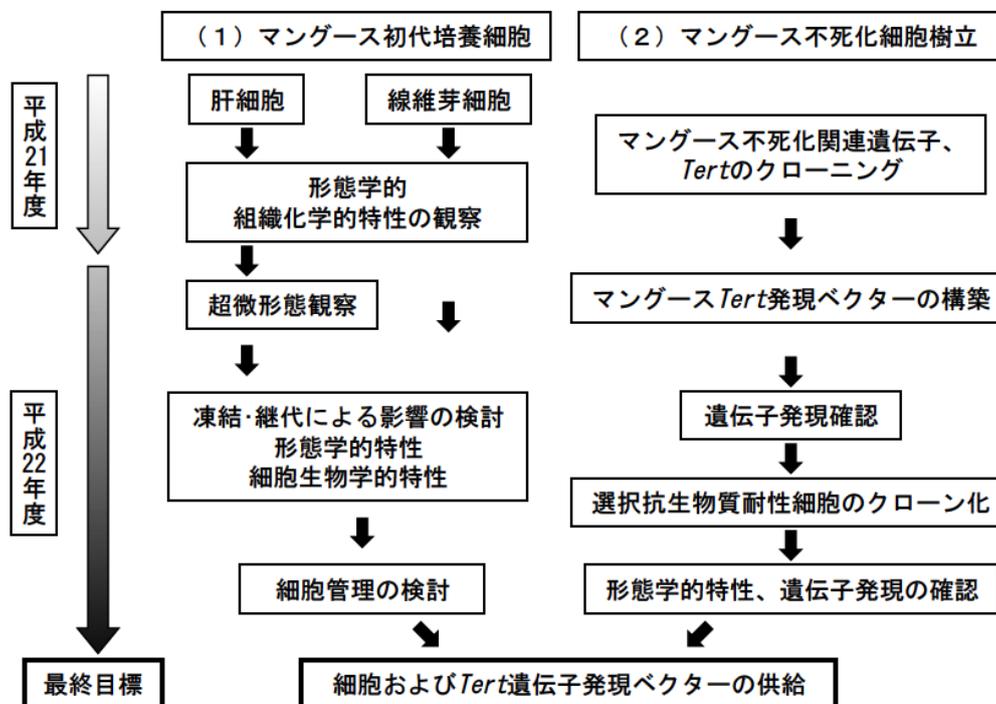


図1 研究方針

(1) 初代培養細胞に関して、*in vitro*の実験に供することが可能な期間、凍結保存による影響を検討する。初代培養肝細胞については、電子顕微鏡による超微形態観察を加える。

(2) マングース由来細胞の不死化に向けて、マングース不死化関連遺伝子 (*Tert*) 発現ベクターを構築し、マングース細胞内で *Tert* 遺伝子が発現することを確認する。選択抗生物質を含む培地中でも生存、増殖してくる細胞を選択的に培養することにより、持続的に *Tert* 遺伝子を発現する細胞をクローン化する。最終的に、細胞および *Tert* 遺伝子発現ベクターの供与態勢を整える。

(1) 初代培養細胞

1) 初代培養肝細胞

a 回収プロトコルの確立と回収細胞の確認

ラットで報告された肝細胞を単離する方法³⁾を参考に、マングース肝組織から生存率の高い肝細胞を回収するためのプロトコル確立を目指した。肝臓器は多様な細胞で構成されるため、初代培養細胞を扱う際には目的の細胞が回収されているかどうか、確認することが重要である。証明方法としては一般的に免疫組織化学を用いるが、マングースに対する抗体が市販されていないことから、今回はPAS染色によるグリコーゲン顆粒の証明、電子顕微鏡による超微形態観察を行った。

PAS染色によるグリコーゲン顆粒の証明には、肝臓から回収した細胞を通法に従い20%ホルマリ

ンで固定した後、シッフ試薬にて染色した。超微形態観察には、2%グルタルアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液および2%四酸化オスミウム/0.1Mリン酸緩衝液で固定した細胞を供した。固定細胞をエポキシ樹脂に包埋、超薄切切片を作製し、酢酸ウラニル/鉛染色液で染色した。比較対象として、肝組織細切片に同様の処理を施した。撮影機種はJEOL JEM1200EX (80kV) を使用した。

b 初代培養肝細胞の継代および培養限界、凍結保存の検討

回収した初代培養肝細胞が生物学的特性を保存したまま培養しうる期間について、PAS染色性をもとに検討した。また継代、凍結保存による影響を観察し、細胞供与の可能性について考察した。

2) 初代培養線維芽細胞

a 回収方法

肝臓摘出後のジャワマングースの耳朶を切除し、組織片を鋭利なメスで細切した。細切組織片に1.2 mg/mlコラゲナーゼ/0.5%BSA/10%FCS含有DMEMを加え、CO₂インキュベータ内で(37°C、5%CO₂)一晩反応させた。さらに、1/10容量の0.25%トリプシン-0.02%EDTA溶液を添加し2~3時間反応させた。反応後の溶液は100 μmのナイロンメッシュに通した後、抗生物質を添加した10%FCS含有DMEMに細胞を懸濁し、コラーゲンコート径10 cmシャーレに播種した。

b 細胞継代法

マングース耳部より回収した細胞をP0 (passage 0) 細胞とした。P0細胞を10 cmプレート (Nunc #150350) に播種、70%コンフルエントになった時点で0.25%トリプシン-EDTA (GIBCO #25200) で処理し、細胞数を計測、約1~2x10⁵細胞を新しい10 cmプレートに継代した。P0細胞を継代して増えてきた細胞をP1、P1細胞を継代して増えてきた細胞をP2とし、細胞継代をP6まで約2ヶ月間継続した。至適培地は10%FCS含有DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; SIGMA #D5796) である。

c 凍結保存法および解凍法

トリプシン-EDTA処理細胞を、細胞密度が1x10⁷細胞/mlになるように細胞凍結保存液 (Cell Reserver One; Nacalai #07485-44) に再懸濁、クライオチューブ (Nunc #377267) に1 mlずつ分注した。クライオチューブをBiCell (日本フリーザー) に入れ、-80°Cに一晩置いて凍結させ、最終的に液体窒素タンクに収納、保存した。

解凍にあたっては、クライオチューブに保存された細胞を37°C温浴槽であたため、10%FCS含有DMEMにて1回洗浄した後、10 cmプレート4~5枚に播種した。対数増殖期細胞 (~80%コンフルエント) を細胞形態観察、細胞増殖試験に供した。

d 細胞形態観察

顕微鏡下で形態観察を行い、比較した。

e 細胞増殖試験

1x10⁴細胞/mlあるいは5x10³細胞/mlになるよう細胞を至適培地に懸濁、平底96ウェルプレート (Nunc #167008) に100 μl/ウェルで播種、CO₂インキュベータ内で培養を開始した。細胞増殖能は、培養開始後24時間毎に7日間、CellTiter 96 AQ Non-Radioactive Cell Proliferation assay (Promega #G3581) を用いて測定した。各試技は6ウェルで行い、それぞれの平均値、標準偏差を求めた。

(2) マングース *Tert* 遺伝子のクローニングと遺伝子導入条件の検討

1) テンプレートの調製

Total RNAはTri Reagent (SIGMA)あるいはRNeasy Plus Mini kit (Qiagen)を用いて、マングース精巢から抽出した。オリゴdTプライマーを用いてtotal RNAからcDNAを合成、RT-PCRのテンプレートとした。

2) マングース *Tert* 遺伝子配列解析

これまでにマングース不死化遺伝子 (*Tert*) はクローニングされていないため、塩基配列は不明である。そこで、すでにクローニングされている動物種 (ヒト、マウス、ネコ) の *Tert* 遺伝子配列をデータベース上で検索、保存性が高い領域にプライマーを設定し、RT-PCR法にて得られた幾つかの遺伝子断片の塩基配列を解析することにした (図2A、B)。RT-PCR反応は全量10 μ lで行った。各試薬の終濃度は次のとおりである。テンプレートcDNA (15 ng)、Taq DNA polymerase (TAKARA) (0.25 unit)、添付のPCR反応緩衝液 (1x)、forward primer (0.1 μ M)、reverse primer (0.1 μ M)、dNTP's (0.25 mM)。マグネシウムの終濃度は2.5、1.875、1.25 mMの3通りで行った。DNA変性温度と時間はそれぞれ94 $^{\circ}$ C、40秒、アニーリング温度と時間は60 $^{\circ}$ C、40秒、DNA伸長反応温度と時間は72 $^{\circ}$ C、60秒、サイクル数は34サイクルとした。

RT-PCR産物1~2 μ lをpGEM-T Easy Vector (Promega)にサブクローニングし、大腸菌を形質転換した。形質転換大腸菌を1.4%LB plate (80 μ g/mlアンピシリン含有、X-gal、IPTG塗布)に播種、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。白色コロニーを1.5 mlのLB培養液で培養、通常のアルカリ法にてミニプレップを行いplasmid DNAを回収した。制限酵素 *EcoRI* で消化し、目的とするRT-PCR産物の挿入が確認されたクローンのみをシーケンス解析に供した。シーケンスに用いたプライマーはT7及びSp6、シーケンス反応はBig Dye TERTminator (ABI)で行い、ABI310 Analyzer (ABI)で塩基配列を解析した。

3) マングース *Tert* 遺伝子のクローニング

解析したマングース *Tert* 遺伝子配列をもとに、テロメアーゼ活性領域を含む遺伝子断片をクローニングするためのプライマーを設定した (図2C)。クローニングにあたっては増幅効率の良いKOD DNA polymeraseを用い、全量10 μ lで反応を行った。反応液の組成は次のとおりである。テンプレートcDNA (15 ng)、KOD DNA polymerase (0.2 unit)、添付のマグネシウム含有PCR反応緩衝液 (1x)、forward primer (0.2 μ M)、reverse primer (0.2 μ M)、dNTP's (0.2 mM)。DNA変性温度と時間はそれぞれ98 $^{\circ}$ C、10秒、アニーリングおよびDNA伸長反応の温度と時間は68 $^{\circ}$ C、120秒、サイクル数は35サイクルとした。RT-PCR産物はpGEM-T Easy Vectorにサブクローニングして、塩基配列をシーケンス法にて確認した。シーケンスプライマーは、我々がすでに明らかにしたマングース *Tert* 遺伝子配列をもとに、クローニングした全領域をカバーするように設定した。

得られたマングース *Tert* 遺伝子配列をオープンリーディング解析に供し、翻訳されるアミノ酸配列を予測した。マングース *Tert* 遺伝子配列および予測されたアミノ酸を、既にクローニングされている動物種 (ヒト、マウス、ネコ) のTERTと詳細に比較、動物種間での配列の保存性を検討することにより遺伝子構造を解析した。

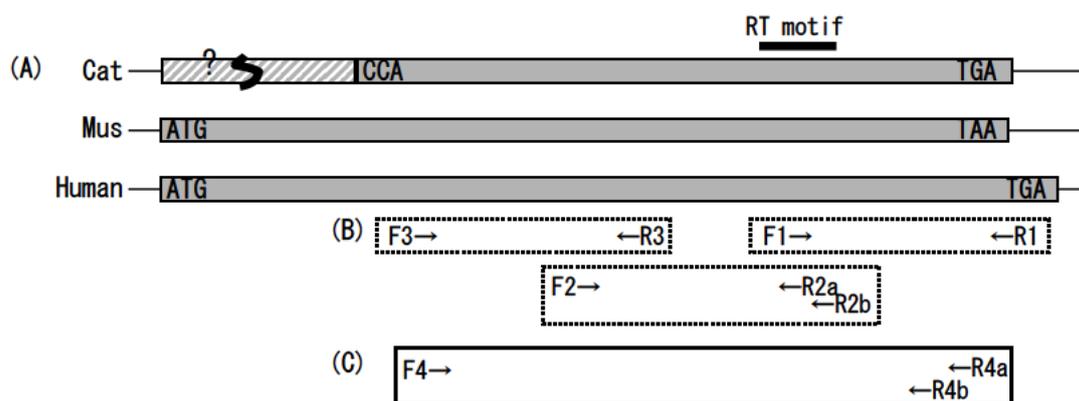


図 2 (A) *TERT* cDNAの模式的図。転写領域はヒト (Human) では4018 bp、マウス (Mus) では4273 bp、ネコ (Cat) では一部のみクローニングされており2625 bp。Closed boxはコード領域を示す。RTモチーフを含む領域を最上段に示す。(B) マングース *Tert* 遺伝子配列解析に用いたプライマーセットの位置。Fはforward primer、Rはreverse primerを示す。(C) マングース *Tert* 遺伝子クローニングに用いたプライマーセットの位置。

4) 遺伝子導入条件の検討

我々がすでに作製したGFP発現ベクター (Acrosin SS EGFP-GPI/pcDNA) を用いてマングース線維芽細胞への遺伝子導入効率を詳細に解析した。遺伝子導入には細胞数が少なくても遺伝子導入効率が良いとされるマイクロポレーション法(電気穿孔法)を用いた。

24ウェルプレートに抗生物質を含まない20%FCS含有DMEM、0.5 mlを分注しておく。対数増殖期の培養細胞を分散、 3×10^6 個の細胞を285 μ lのSolution R (マイクロポレーターに添付)、ベクター15 μ gを添加し混和する。1条件あたり10 μ lの細胞懸濁液を使用、表1に示す条件で遺伝子を導入、24ウェルプレートの各ウェルに播種した。24時間、48時間後に細胞の生存率、遺伝子導入効率を観察した。生存率は光学顕微鏡下で観察、遺伝子導入効率はGFPの発現を蛍光顕微鏡下で観察することで至適条件を判定した。引き続き遺伝子導入から2日後に抗生物質G418による選択を行った。

(3) マングース不死化関連遺伝子 (*Tert*) 発現ベクターの構築

1) 発現ベクターの構築

遺伝子構造解析を行った2種類のマングース *Tert* 遺伝子断片 (a#2およびa#5) をテンプレートとし、制限酵素部位を付加したプライマー (*Not* I部位付加forward primer;

5'-gagcggccgcgagatgagagtgctgctggact -3'、*Bst* BI部位付加reverse primer;

5'-ggttcgaattggagcacacacgcgtgg-3') を用いてPCRを行った。目的とする長さのPCR産物の増幅を確認した後に、PCR産物の末端を制限酵素*Not* Iおよび*Bst* BIで消化、フェノール/クロロホルム処理した。これら2つの遺伝子断片を、同様に*Not* Iおよび*Bst* BIで消化したpEF/GW-51/lacZ

(Invitrogen; 8904 bp) ベクターにそれぞれ挿入、サブクローニングした。構築した発現ベクターをアルカリ法にて回収、シーケンス解析に供し、マングース *Tert* 遺伝子断片がベクターにイ

ンフレームで挿入されていること、塩基配列に変異が入っていないことを確認した。

確認できた発現ベクターは発現実験解析および他機関への供与に備えて大量に精製、保存した。なお、pEF/GW-51/lacZベクターにはHuman elongation factor 1由来プロモーター、哺乳類細胞内で発現する抗生物質耐性遺伝子としてBlasticidin耐性遺伝子が組み込まれている。

2) マングース不死化関連遺伝子 (*Tert*) 発現ベクターの構築

構築したマングース *Tert* 遺伝子発現ベクターをマングース線維芽細胞に一過性に導入し、実際に *Tert* 遺伝子が発現するかどうか確認した。

構築したベクターを制限酵素 *Sca* I で直鎖状に消化し、雄成獣由来マングース線維芽細胞 (P3) にマイクロポレーション (電気穿孔) 法にて導入した。1回の導入に用いた直鎖状ベクターは $0.5 \mu\text{g}$ 、細胞数は 1.0×10^5 細胞である。マイクロポレーションはMicroporator Mini (Digital Bio社、MP-100) を用い、方法 (2) -4) で検討した至適条件 (1300V、20 msec 間隔で2パルス) で行った。

遺伝子導入細胞を抗生物質不含培地 (20% FCS 含有 DMEM) に懸濁、6 ウェルプレート (Nunc #140675) に播種した。コントロールとして遺伝子を導入していない細胞を同数播種した。細胞を24時間、48時間、72時間で回収、TRI -Reagent (SIGMA #T9424) に溶解、プロトコールに従って total RNA を回収した。total RNA はオリゴdTプライマー、Super Script III (Invitrogen #18080-400) を用いてcDNAに逆転写、RT-PCRのテンプレートとした。

マングース *Tert* 遺伝子発現解析に用いたプライマーの配列は、forward primer; 5'-tcagacagctcttcgatagcg-3'、reverse primer; 5'-gtaagttggctgtgcagccg-3'である。RT-PCRは全量10 μl 、2ステップで行った (DNA変性; 98°C、10秒、アニーリング/伸長反応; 68°C、60秒、サイクル数; 33サイクル)。各試薬の終濃度を以下に示す。テンプレートcDNA (15 ng)、KOD DNA polymerase (TOYOBO; 0.2 μl)、添付のPCR反応緩衝液 (マグネシウム含有、終濃度1x)、forward primer (終濃度0.2 μM)、reverse primer (終濃度0.2 μM)、dNTP's (終濃度0.2 mM)。内部コントロールとして *GAPDH* 遺伝子 (forward primer; 5'-aatcccatcaccatcttcca-3'、reverse primer 5'-ccaggggtcttactccttg-3') 発現を指標にした。RT-PCR産物は1%アガロースゲルに泳動し、エチジウムブロマイドにて染色、発現を確認した。

(4) マングース細胞内への持続的な *Tert* 遺伝子導入

構築したマングース *Tert* 遺伝子発現ベクターを、対数増殖期のP3マングース線維芽細胞 1.0×10^5 細胞に導入、抗生物質不含培地 (20% FCS 含有 DMEM) に懸濁、10 cmプレート1枚に播種した。培養開始2日後に選択培地 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin/10% FCS/DMEM) に交換、以後3日おきに選択培地の交換を行った。約2週間後、コロニーを形成した細胞集団を、クローニングリング (内径3.5 mm) にて単離、24ウェルプレート (内径1.6 cm、Nunc #143982) に移植した。24ウェルプレートで約70%コンフルエントになった時点で6ウェルプレート (内径3.5 cm、Nunc #140675) に移植、Blasticidin耐性細胞の形態観察を顕微鏡で行った。またクローニングした細胞各々から、total RNAを抽出、方法 (3) -2) に従って、cDNAを合成、RT-PCR法にて遺伝子発現の有無を確認した。

4. 結果・考察

(1) 初代培養細胞

1) 初代培養肝細胞

細胞の回収率、生存率を向上させるために工夫した点、留意すべき点は次のとおりである。a)

翼状針は個体の大きさに応じて21G、19Gを用い、門脈に3mm程度余裕をもたせて挿入する、b)脱血のための灌流で肝臓の色調が暗赤色から黄茶色に変化するのを確認する、c)コラゲナーゼ含有緩衝液の灌流では肝臓の辺縁が丸味を帯びてくることを確認する、d)肝臓をホモジナイズする際には、脱血、コラゲナーゼが十分効いていない部分は切除する。

回収した細胞をPAS染色したところ、ほぼ全ての細胞胞体内で赤紫色に染色されたグリコーゲン顆粒（肝細胞の証明とされる）が豊富に存在することが示され、肝細胞であることが示された（図3）。本手法によって回収された細胞は肝細胞として*in vitro*での水銀代謝実験に供することができると結論づけた。但し、初代培養肝細胞は培養開始後1週間頃よりPAS染色性が低下する。グリコーゲン合成は肝細胞の代謝機能を示すひとつの重要な指標であるので、初代培養肝細胞では早期にグリコーゲン合成能が低下していくと推定される。従って、初代培養肝細胞は短期間の実験に用いるのが適当と考えられる。

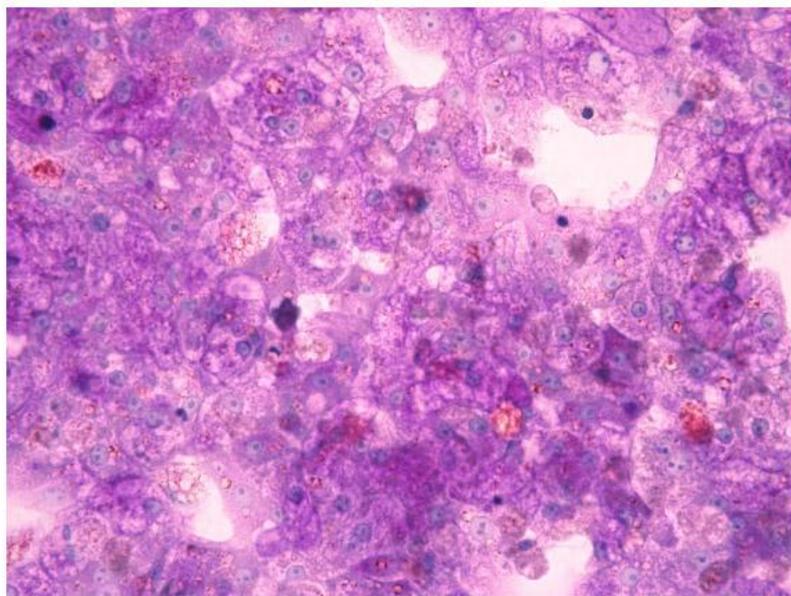


図3 マングース肝から単離した細胞のPAS染色像。細胞質全体にPAS陽性反応を認める(x200)。

マングース肝臓より回収した細胞の超微形態を観察したところ、回収細胞は核小体が明瞭な円形の核を1~2個有し、細胞胞体内に消耗色素を含んでいることが判明した。また微絨毛を備え、豊富なミトコンドリアや小胞体を有していた。これらの超微形態的特徴は肝組織の肝細胞超微形態と一致し、回収した細胞は肝細胞と考えて矛盾のない結果が得られた。また、ミトコンドリアの変性、ライソゾームの増加が認められないことから、Viabilityは高いと判断される（図4）。これらの結果から、本法を用いて回収した初代培養細胞は肝細胞であり、*in vitro*実験に有用であると結論づけた。

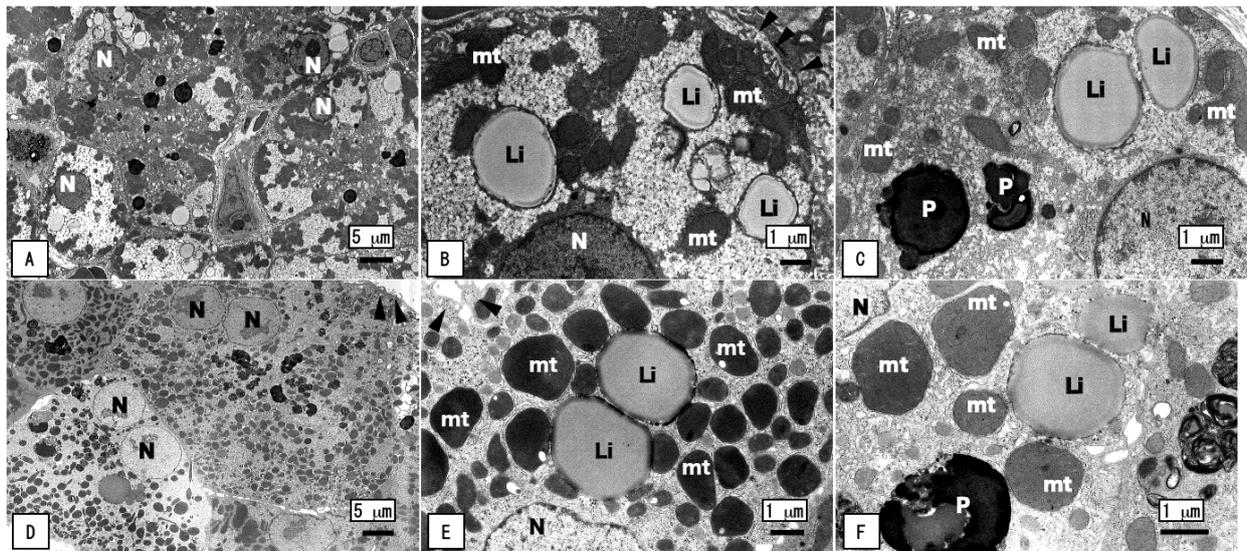


図4 肝組織肝細胞と初代培養肝細胞の超微形態の比較観察

A~C) 肝組織肝細胞の電子顕微鏡像。肝細胞は多角形で辺縁に微絨毛(黒三角)を認める。核(N)は円形で明瞭な核小体を有する。細胞質にはミトコンドリア(mt)、ライソゾーム(Li)、肝細胞の特徴のひとつである不整形の消耗色素(P)を認める。細胞質内の小胞体は豊富である。

D~F) 初代培養肝細胞の電子顕微鏡像。初代培養肝細胞は肝組織肝細胞と同様の形態学的特徴を備える。ミトコンドリア変性、ライソゾームの増加は認められず、本法で回収された初代培養肝細胞はViabilityが保たれている。観察倍率以下の通り。A; x1000、B; x5000、C; x5000、D; x1000、E; x5000、F; x8000。

2) 初代培養線維芽細胞

a 凍結前の線維芽細胞

マンゴースの耳朶皮膚から単離した細胞は、長紡錘形の細胞を主体とし、形態学的に線維芽細胞であることが示された(図5A)。*In vitro*で増殖させたP2細胞までを凍結保存した。一部の細胞は継代を繰り返し、これまで8回までの継代(約2ヶ月)で形態学的な特徴が保たれていることを確認している。雌雄のP2細胞の細胞増殖試験を行った結果を図5Bに示す。線維芽細胞は*in vitro*での増殖が良好で、短~中期の実験に供することができることが示され、後述の遺伝子導入条件設定にも用いた。なお、増殖速度に雌雄差はみられない(図5B)。

b 凍結後の線維芽細胞

凍結したP2細胞を解凍し、約2ヶ月間、6回の継代を行ったが、細胞形態は線維芽細胞の形態を保持していた(図6)。

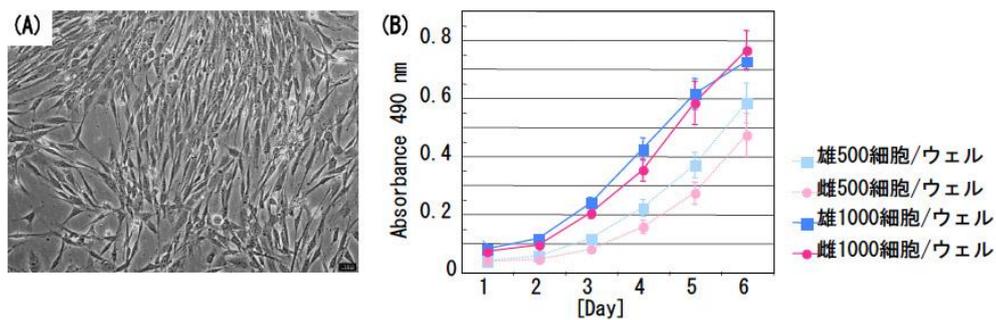


図5 (A) マングース耳皮膚組織より単離したP0細胞。細長い紡錘形を呈し、線維芽細胞を示唆する(x100)。(B) P2細胞の細胞増殖試験。線維芽細胞は *in vitro*での増殖が良好である。雌雄差は認められない。

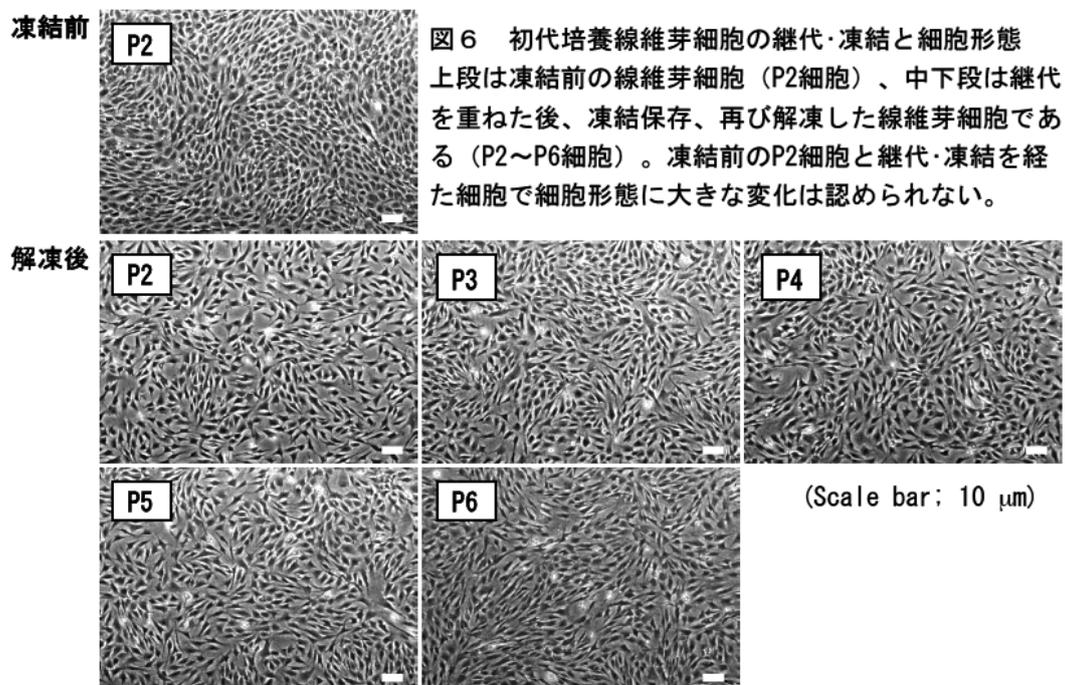
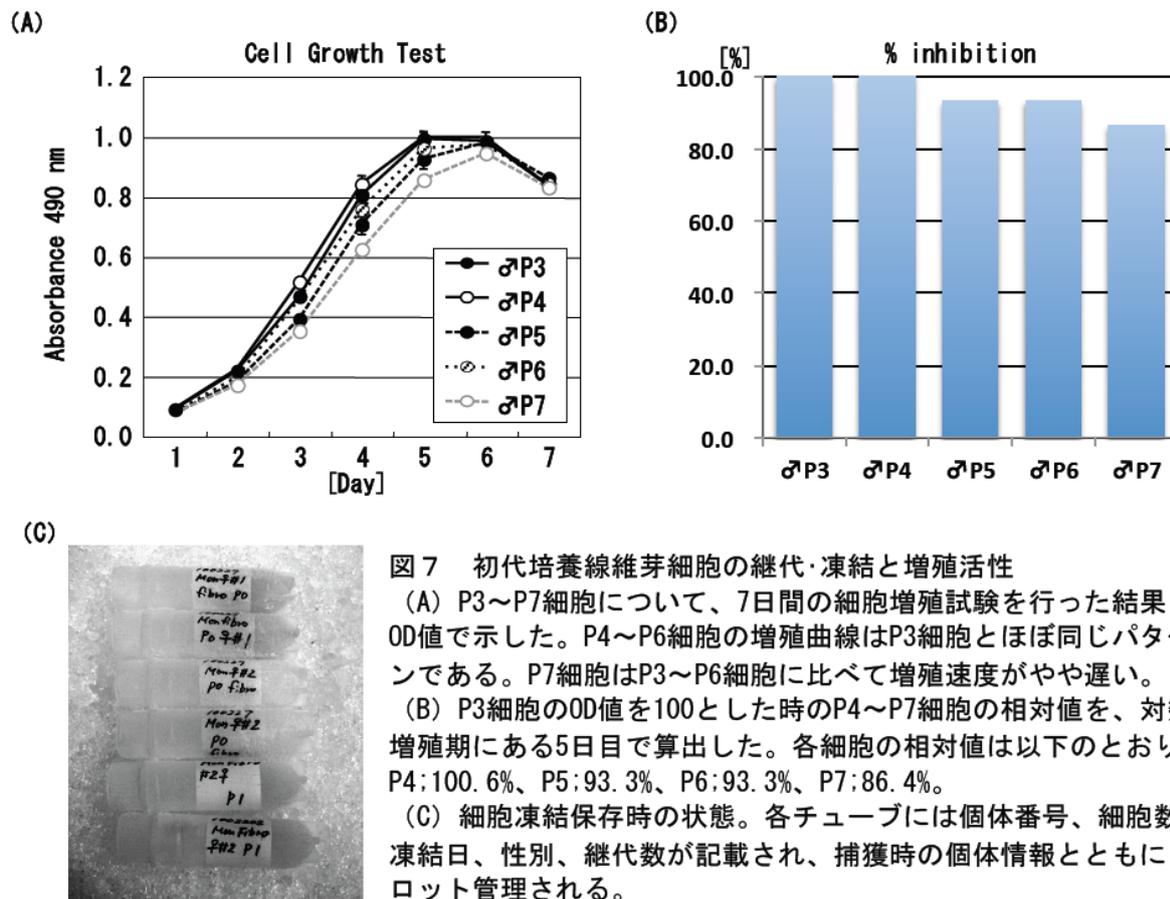


図6 初代培養線維芽細胞の継代・凍結と細胞形態
上段は凍結前の線維芽細胞 (P2細胞)、中下段は継代を重ねた後、凍結保存、再び解凍した線維芽細胞である (P2~P6細胞)。凍結前のP2細胞と継代・凍結を経た細胞で細胞形態に大きな変化は認められない。

また、各継代細胞の細胞増殖試験を行った結果、P3~P6細胞はほぼ同等の増殖活性を有することが判明した (図7A)。P7細胞はP3細胞に比較し、MTSアッセイの吸光度値で約12%の減少が認められた (図7B)。

凍結細胞の管理状態を図7Cに示す。1頭あたりP1細胞17チューブ (1.7×10^7 細胞)、P2細胞15チューブ (1.5×10^7 細胞) 保存が可能であった。また凍結輸送も問題ないことが確認されている。凍結細胞はロット管理され、凍結日、性別、継代数、細胞数 ($\sim 1.0 \times 10^6$ 細胞) とともにマングース個体を捕獲した時の情報とともに供与できる状態で管理した。以上よりマングース耳部より回収した初代培養線維芽細胞は中期間 (約2ヶ月) にわたる培養実験を可能とすることが明らかとなった。同時に、*in vitro*で細胞を増やすことができること、凍結保存および輸送可能なことから、実験

内容に関する制約、空間的制約、時間的制約等（表1）が緩和されると想定された。



(2) マングース *Tert* 遺伝子のクローニングおよび至適遺伝子導入条件の検討

1) マングース *Tert* 遺伝子の遺伝子構造

酵素等の蛋白質は、異なる種の細胞内では活性特異性が低下し十分機能しないことがあることはよく知られており、テロメラーゼについても同種の遺伝子をクローニングすることは重要である。得られた約1700塩基対からなる4種類の遺伝子断片について、予想されるアミノ酸配列から構造解析を行い、ヒト *TERT* 遺伝子と比較した結果を図8Aに示す。Clone2-7-2#a2はヒト *TERT* 遺伝子のエクソン2からエクソン14を含む領域からなる。Clone2-7-2#a5はエクソン6とエクソン7の間に87塩基対からなる新たなエクソンが挿入されたアイソフォームで、アミノ酸翻訳に際してフレームにずれを生じない。Clone1-9-1#a9および1-9-1#b3は選択的スプライシングによりテロメラーゼ活性領域が欠失していた。加えてclone1-9-1#a9では、エクソン6とエクソン7間に挿入された285塩基対からなる新たなエクソン内に終止コドン（図8*印）を含むため、アミノ酸への翻訳は途中で終了すると予想された。

ヒト、マウス、ネコのテロメラーゼ活性領域には、アミノ酸配列の保存性が非常に高い6つのテロメラーゼモチーフ（RTモチーフ）が含まれる。得られた遺伝子断片のRTモチーフを比較したところテロメラーゼ活性発現に重要なアミノ酸は高度に保存されていることが判明した（図8B）。

これらのことより、テロメラーゼ活性領域を含む2つのクローン、Clone2-7-2#a2および2-7-2#a5は細胞内でテロメラーゼ活性を発現すると推察された。

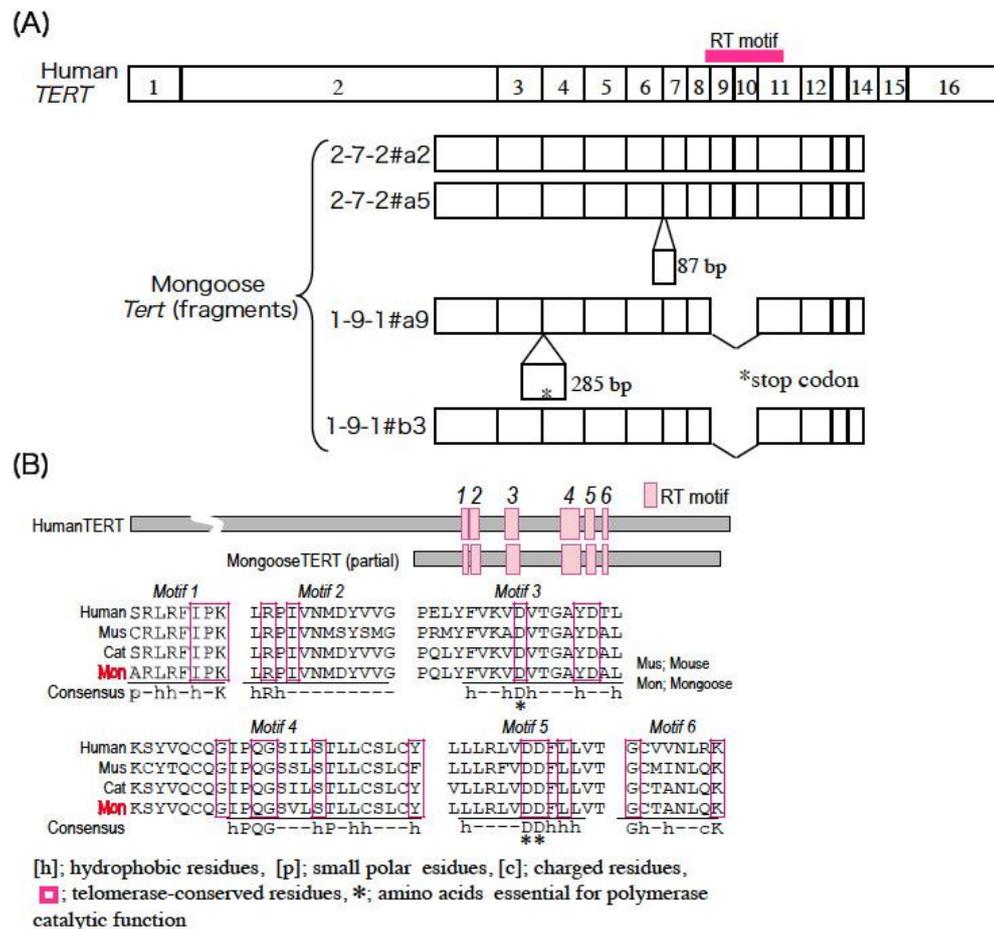


図8 (A) クローニングされたマングース *Tert* 遺伝子断片のエクソン構造をヒト *TERT* 遺伝子と比較した。クローニングされた領域はヒト *TERT* エクソン2-14を含む領域に相当する。Clone 2-7-2#a2および2-7-2#a5はテロメラーゼ活性発現に必要な領域 (RT motif) を含んでいた。(B) 6つのRT motifのアミノ酸配列をヒト (Human)、マウス (Mus)、ネコ (Cat)、マングース (Mon) 間で比較した。テロメラーゼ活性に重要なRTモチーフのアミノ酸配列は高度に保存されていた。

2) 遺伝子導入条件の検討

マイクロポレーション法にてGFP発現ベクターをマングース線維芽細胞に導入した条件とその結果を表2に示す。導入条件4、8、13でGFP蛋白を発現する細胞が多く、かつ生存する細胞の割合が高いことが判明した。この条件下では抗生物質G418を添加した選択培地中でもGFP蛋白発現細胞の増殖が確認された (図9A、B)。これらのことより、マングース *Tert* 遺伝子を安定的にマングース由来細胞に導入することが可能であることが示された。

表2 マイクロレーターによる遺伝子導入の条件設定

条件	パルスの設定			24時間後		48時間後		薬剤選択後20日後
	電圧 (V)	間隔 (msec)	回数	GFP発現細胞の割合;強度	生存率	GFP発現細胞の割合;強度	細胞増殖	生存細胞;GFP発現強度
1	non	non	non	無し;無し	~100%	無し;無し	growth	~100%;無し
2	1050	20	1	<10%;弱	>90%	<10%;弱	growth	~100%;弱
3	1600	20	1	40~50%;強	#2よりは劣る	40~50%;強	growth	>90%;弱
4*	1650	20	1	40~50%;強	#3よりは劣る	40~50%;強	growth	>90%;中~強
5	1700	20	1	40~50%;弱	<50%, #4よりは劣る	40~50%;強	growth	>90%;一部のみ強
6	1200	30	1	20~30%;弱	>70~80%, まあよい	20~30%	growth	>90%;弱
7	1300	30	1	~40%;弱~強	~50%	~40%;弱~強	growth	>90%;中
8*	1350	30	1	>50%;弱~強	60~70%, まあよい	>50%;弱~強	growth	>90%;中~強
9	1400	30	1	~70%;弱~強	20~30%	~70%;弱	growth	>90%;無
10	1000	40	1	10~20%;弱	80~90%	少ない	growth	~100%;弱
11	1100	40	1	20~30%;弱	80~90%, #10より劣る	~30%;弱	growth	>90%;微弱
12	1200	40	1	~30%;弱~強	50%	40~50%;弱	growth	>90%;無し
13	1300	20	2	40~50%;弱~強	70~80%	40~50%;弱~強	growth	>90%;微弱
14*	1350	20	2	30~40%;弱	20~30%, 細胞が少ない	~40%;弱	増えていない	形態変化/弱~強
15*	1400	20	2	~60%;強が多い	50%	~60%;強が多い	growth	>90%;微弱
16	1450	20	2	>80%;弱	10%	>80%;弱	ほとんど死んでる	>90%;無し
17	850	20	3	~10%;弱	80~90%	<10%;弱	growth	~100%;弱
18	1100	20	3	30~40%;強	80%	40~50%	growth	>90%;微弱
19*	1200	20	3	>50%;強が多い	70~80%	>50%;弱	growth	>90%;弱
20	1300	20	3	80~90%;弱	10%, ほとんど死んでる	80~90%	随分死んでる	>90%;一部のみ強
21	1300	10	3	~20%;弱	80%	<10%;弱	growth	>90%;微弱
22	1400	10	3	20~30%;弱	70~80%	~30%;弱	growth	>90%;無し
23	1500	10	3	30~40%;弱~強	70%	40~50%;弱	growth	>90%;微弱
24	1600	10	3	~40%;弱~中	60%	~50%;弱	growth	>90%;微弱

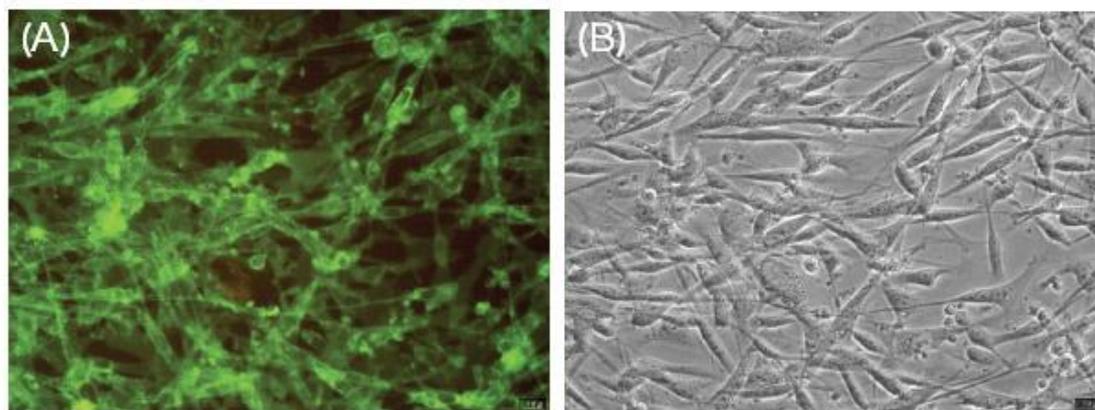


図9 薬剤選択培地添加後14日目のマンガース線維芽細胞。遺伝子導入は表2、条件4で行った。

(A) GFP蛋白の発現状態 (蛍光顕微鏡、x200) (B) 同一視野の明視野像 (x200)

(3) マングース *Tert* 遺伝子発現ベクターの構築

1) マングース不死化関連遺伝子 (*Tert*) 発現ベクターマップ

構築したマンガース *Tert* 遺伝子発現ベクターマップを示す (図10A)。マンガース不死化関連遺伝子 a#2 および a#5 は alternative splicing により生じるものと推定され、a#5 は 87 bp のインフレ

ーム挿入が確認されている（図10B）。これら2つの *Tert* 遺伝子断片は pEF/GW-51/lacZ ベクターの lacZ 遺伝子とインフレームで置換、挿入された（図10A）。

2) マングース不死化関連遺伝子 (*Tert*) 発現の確認

マングース *Tert* 遺伝子発現に用いたプライマーの位置関係を図10Bに示す。構築した2種類のマングース *Tert* 遺伝子発現ベクターを一過性にマングース線維芽細胞に導入したところ、導入24時間後から *Tert* 遺伝子の発現が RT-PCR 法により確認された（図10C）。遺伝子導入を行わなかったマングース線維芽細胞では *Tert* 遺伝子の発現は見られなかった。このことから、すでに *Tert* 遺伝子発現が失われている体細胞に構築したベクターを導入することで、不死化できる可能性が示唆された。

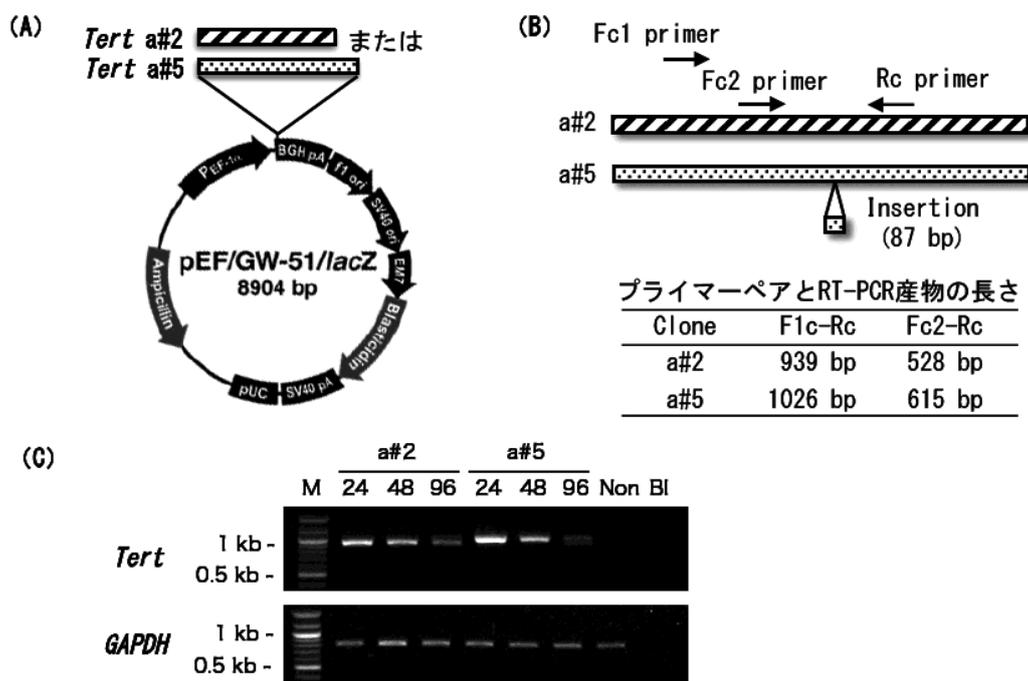


図10 マングース線維芽細胞でのマングース不死化関連遺伝子 (*Tert*) 発現

(A) マングース *Tert* 遺伝子発現ベクターマップ。2種類のマングース *Tert* 遺伝子断片 (a#2、a#5) はそれぞれ、pEF/GW-51/lacZ ベクターの lacZ とインフレームで置換、挿入された。pEF/GW-51/lacZ ベクターは耐性抗生物質遺伝子として Brasticidin を有する。

(B) マングース *Tert* 遺伝子断片の模式図と検出に用いたプライマーの位置。遺伝子断片 a#5 では alternative splicing により 87 bp のインフレーム挿入が確認されている。プライマーペアと予想される RT-PCR 産物の大きさは図内に示した通りである。

(C) マングース細胞内での *Tert* 遺伝子発現。プライマーペア Fc1 および Rc で RT-PCR を行った結果を示す。*Tert* 遺伝子は 38 サイクル、*GAPDH* は 22 サイクルで検出した。M ; 100 bp ladder DNA marker、24 ; マイクロポレーション 24 時間後、48 ; マイクロポレーション 48 時間後、96 ; マイクロポレーション 96 時間後、Non ; マイクロポレーションしていない細胞、BI ; negative control (dH₂O)

(4) マングース細胞への持続的な *Tert* 遺伝子導入

1) Blasticidin耐性細胞のクローニング

Blasticidin耐性細胞のクローニングステップを図11に示す。

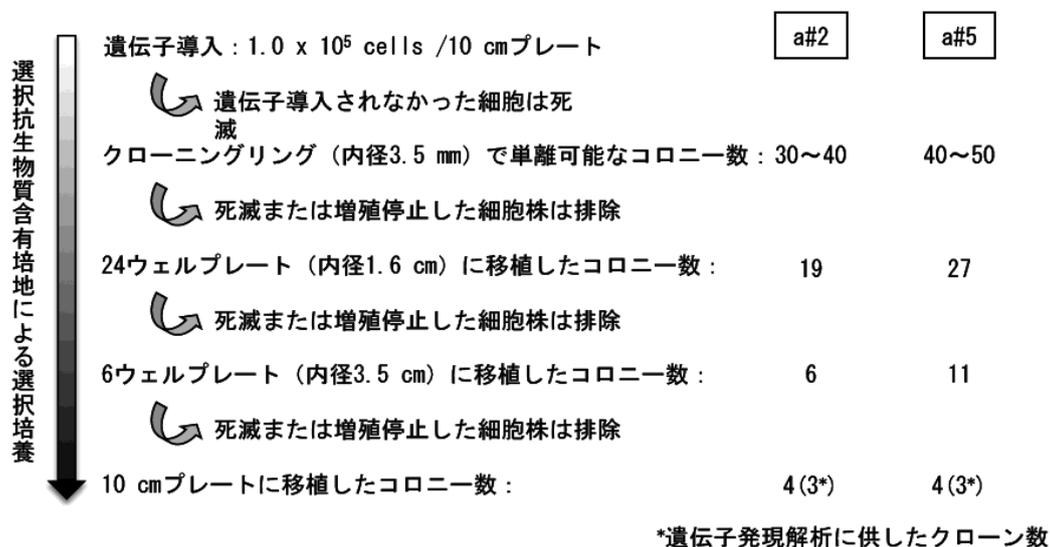


図 1 1 Blasticidin耐性細胞のクローニング過程

2種類のマングース *Tert* 遺伝子発現ベクター (a#2、a#5) を、それぞれP3マングース線維芽細胞に導入した。約2週間の選択培養 (5 mg/ml Blasticidin/10% FCS/DMEM) 後、クローニングリングで単離可能なコロニー (細胞集団) 数は両ベクター導入細胞ともに40コロニー程度であった。最終的に10 cmプレートまで増殖できたクローンは両ベクター導入細胞ともに4クローンであった。

マングース *Tert* 遺伝子発現ベクター (a#2およびa#5) を導入して得られたBlasticidin耐性細胞の形態を示す (図12)。2種類のマングース *Tert* 遺伝子発現ベクターを、それぞれP3マングース線維芽細胞 1.0×10^5 cellsに導入、約2週間、選択培養 (5 μ g/ml Blasticidin/10% FCS/DMEM) した後、クローニングリングで単離可能なコロニー (細胞集団) が40コロニー程度得られた。10 cmプレートまで順次増幅できた細胞クローンはa#2ベクター、a#5ベクター共に4クローンであった。経験上、クローニングリングで単離可能なコロニー数は、他の遺伝子/細胞を使用した場合と比較して同程度であったが、増幅過程で死滅、または増殖停止に至る細胞クローンが多く見られた。

得られたBlasticidin耐性細胞8クローンのうち、7クローンの細胞形態は紡錘形で、線維芽細胞と矛盾のない形態を呈していた。1クローンは複数の細胞突起を伸長しており形態学的に線維芽細胞に類似していなかった (図12)。形態変化が著しい細胞の由来を明らかにするためには追加解析を要するが、線維芽細胞は耳部より回収しているため、少数ながら線維芽細胞以外の細胞も含まれる。線維芽細胞以外の細胞がBlasticidin耐性になった可能性、あるいは発現ベクターが導入された場所により、形態変化が誘導された可能性が考えられる。

増幅過程で死滅、または増殖停止に至る細胞クローンが多く見られたことも考慮すると、*Tert*

遺伝子で不死化細胞を作製する際には、遺伝子導入時点での細胞数を他の遺伝子/細胞で行う時よりも多く用いた方がよいと考えられた（図11）。

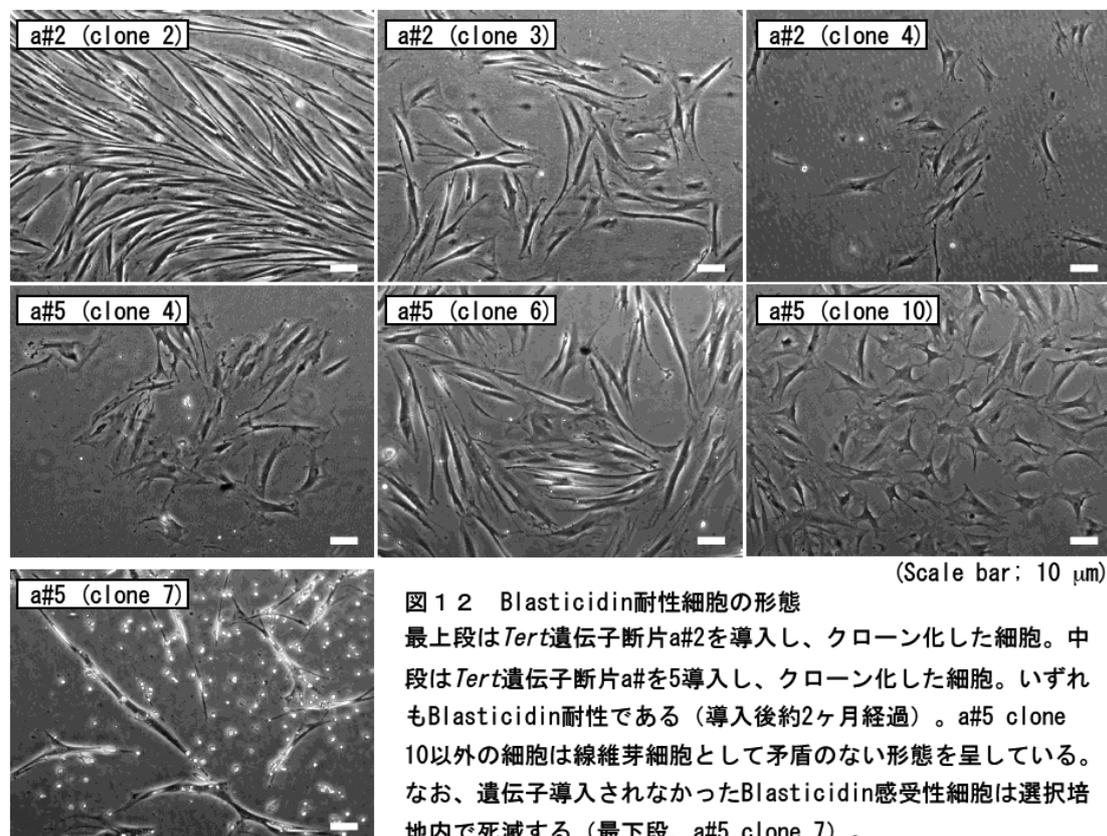


図12 Blastcidin耐性細胞の形態
最上段は*Tert*遺伝子断片a#2を導入し、クローン化した細胞。中段は*Tert*遺伝子断片a#5を導入し、クローン化した細胞。いずれもBlasticidin耐性である（導入後約2ヶ月経過）。a#5 clone 10以外の細胞は線維芽細胞として矛盾のない形態を呈している。なお、遺伝子導入されなかったBlasticidin感受性細胞は選択培地内で死滅する（最下段、a#5 clone 7）。

2) Blastcidin耐性細胞における *Tert* 遺伝子の発現

Blasticidin耐性細胞6クローン中、5クローンについてRT-PCR法にて*Tert*遺伝子の発現が確認された（図13上、中段）。GAPDHの発現量（図13下段）と比較しても明らかなように、Blasticidin耐性細胞での*Tert*遺伝子発現は一過性発現に比較してかなり弱いことが判明した。クローニング、増殖させる過程で死滅、あるいは増殖停止に至る細胞クローンが多かったことを合わせて考えると、結果的に*Tert*遺伝子の発現が低いレベルで保持された細胞が選択的に残ったと推測される。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

水銀蓄積が報告されているマングース肝細胞を使って生体内環境を反映する *in vitro* 実験が可能であることが示された。実験期間、細胞数、場所などの制限はあるものの、本細胞は水銀濃縮機序解析に有用なツールになりうる。個体内での水銀代謝動態の解析が進めば、自然界の水銀濃縮機序解明に貢献することが期待できる。

マングース線維芽細胞は実験の立案・遂行にあたってのさまざまな制約を緩和しうることが判明した。凍結細胞を個体情報とともにロット管理することで、マングース生息地以外の研究者で

も解析可能になったことは、より迅速に多面的な解析を遂行するという目標に向けて大きく前進したと言える。また、マングース線維芽細胞は例えば2ヶ月といった、比較的長い期間にわたる実験や再現実験が可能な点でも優れた細胞といえる。

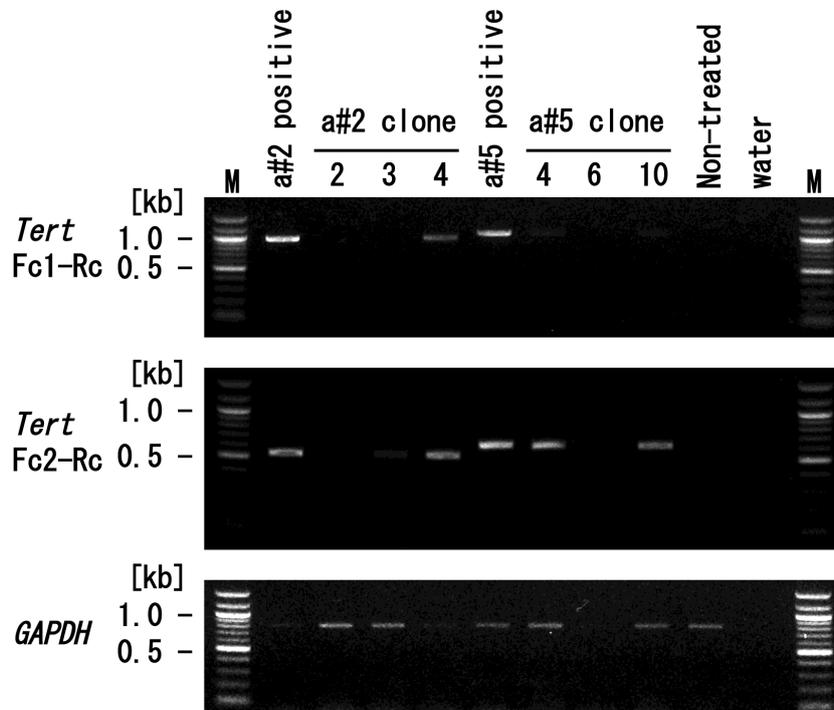


図13 Blasticidin耐性細胞における *Tert* 遺伝子の発現

クローン化したBlasticidin耐性細胞よりtotal RNAを抽出、RT-PCR法により *Tert* 遺伝子の発現を検討した。上段はプライマーペアFc1-Rc、中段はFc2-Rcで検出した。内部コントロールとして、*GAPDH* (下段)、陽性コントロールとしてa#2およびa#5を一過性に発現させた細胞を用いた(a#2 positive、a#5 positive)。*Tert* 遺伝子は45サイクル、*GAPDH*は20サイクルで検出した。各レーン1反応あたりのcDNA量は以下のとおり。

a#2 positive; 15 ng	a#5 positive; 15 ng
a#2 clone 2; 100 ng	a#5 clone 4; 100 ng
a#2 clone 3; 100 ng	a#5 clone 6; 22 ng
a#2 clone 4; 50 ng	a#5 clone 10; 100 ng
Non-treated cells; 50 ng	

不死化関連遺伝子を発現させることで、すでに不死化関連遺伝子発現が失われてしまった多種の体細胞を不死化することができる。本研究で構築したマングース不死化関連遺伝子 (*Tert*) 発現ベクターは、マングース細胞内で *Tert* 遺伝子を恒常的に発現しうることが確認された。このことは、本ベクターを用いて、さまざまな不死化細胞が樹立されうることを意味する。本ベクター

の供与により、各種臓器から不死化細胞株が作製されれば、水銀濃縮機序解明研究の拡充に繋がる。なお、本ベクターは供与可能な状態で保存している。

(2) 環境政策への貢献

マンガースはやんばるの生態系を破壊する外来動物であり、その選択的駆除法の開発が期待される。初代培養線維芽細胞および不死化細胞はマンガースに特異的に作用する毒物、薬物の種類や有効濃度などをスクリーニングする手段として活用が見込まれ、政策への貢献が期待される。

6. 引用文献

- 1) S. Horai, M. Minagawa, H. Ozaki, I. Watanabe, Y. Takeda, K. Yamada, T. Ando, S. Akiba, S. Abe & K. Kuno (2006) Accumulation of Hg and other heavy metals in the Javan mongoose (*Herpestes javanicus*) captured on Amamioshima Island, Japan. *Chemosphere*, 65, 657-665.
- 2) S. Horai, T. Furukawa, T. Ando, S. Akiba, Y. Takeda, K. Yamada, K. Kuno, S. Abe & I. Watanabe (2008) Subcellular distribution and potential detoxification mechanisms of mercury in the liver of the Javan mongoose (*Herpestes javanicus*) in Amamioshima Island, Japan. *Environ Toxicol Chem*, 27, 1354-1360.
- 3) M. N. Berry & D. S. Friend (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol*, 43, 506-520.

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 柳 久美子、花房宏昭、宝来佐和子、山本雅達、古川龍彦、渡邊 泉、平野昂規、小倉 剛、要 匡：第32回日本分子生物学会 (2009) 「マンガース *Tert* 遺伝子のクローニングと発現解析」
- 2) 花房宏昭、柳 久美子、森田この美、宝来佐和子、山本雅達、古川龍彦、渡邊 泉、小倉 剛、要 匡：第33回日本分子生物学会 (2010) 「Cellular biological analysis of mongoose fibroblast immortalized with mongoose *Tert* gene.」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。