

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08053

研究課題名(和文) HSP90によるニワトリ胚発生の人為的制御と機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the HSP90 during development of the chick embryo.

研究代表者

中尾 暢宏 (NAKAO, NOBUHIRO)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：60377794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ胚発生の人為的な制御をHeat shock protein 90 (HSP90)に着目し解析を行った。HSP90のmRNAおよびタンパク質の発現は、ともに発生の制御が可能である8日齢の胚全体で発現しており、HSP90は胚全体で発生の制御に関与していることが推察された。さらにニワトリ胚由来の肝臓初代培養細胞は、HSP90により細胞周期を制御できることを明らかにした。しかしながら、HSP90およびHSP90の阻害剤のin ovo投与の結果より、個体における発生の制御にはHSP90のみならず、HSP90と相互作用を示す因子による発生の制御の検討を行う必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニワトリ胚はある程度発生していても発生の停止と再開できる機構が存在する。発生を制御できると推察されたHSP90は、ニワトリ胚全体で発現していること、ニワトリ胚由来初代培養細胞における細胞周期の制御に関与していることが明らかとなった。さらにHSP90のみでは個体レベルの発生を制御できないが、偶然にも他の発生促進因子の存在が推察された。ニワトリの発生過程は哺乳類に類似し分子レベルでは本質的に脊椎動物と同じ基本過程が生じていることから、本研究成果の発展は養鶏業への応用のみならず、発生生物学、組織工学、将来必要とされるiPS細胞由来組織や器官の保存技術の開発においても応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The analysis of the artificial regulation of chicken embryo development was carried out with a focus on heat shock protein 90 (HSP90). Both HSP90 mRNA and protein were expressed in throughout the embryo suggested that HSP90 was be involved in the regulation of development throughout the embryo. Furthermore, we found that HSP90 was able to regulate the cell cycle in the primary cultured chick embryos hepatocytes. However, the results of in ovo administration of HSP90 and HSP90 inhibitors shown that regulation of embryonic development by HSP90 and factors interacting with HSP90 should be investigated.

研究分野：分子生物学、時間生物学

キーワード：ニワトリ 発生・分化 HSP90

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鶏卵が市場から消えることなく人類が食すことの出来る背景には、人類が長い期間を費やし品種改良した家禽の歴史がある。すなわち、ニワトリなどの家禽は、繁殖期に関係なく毎日卵を産む品種の改良が行われた。その結果、多くのニワトリの品種では、就巢性を欠いているため人為的な孵化と育雛が必要になった。そのため、孵卵場では雛の生産効率から種卵(受精卵)を集めて冷蔵貯蔵(貯卵)し、数が揃ったところで孵卵させている。人為的な貯卵期間は、孵化率は落ちるものの35日間以上の長期貯卵(保存)も可能である。この条件下では、放卵時点で約6万個の細胞からなる胚盤葉は、発生が停止している。これらのことは、長期間の胚の発生を止めることができることを意味している。さらに本研究者は、発生の進行した孵卵開始9日目(ステージ35)までの各種卵を24時間~48時間冷蔵処理することにより孵化日を1日~2日間延長できることを発見した。すなわち、ニワトリ種卵はある程度発生していても発生の停止と再開できるメカニズムが存在し、発生を自由に制御できる。動物が多くの子孫を残すために取ってきた種卵の長期保存機構は、よく分かっていないとても興味深い生命現象である。そこで、本研究者は種卵の発生停止と再開を制御する分子について、次世代シーケンサーを用いた高精度なホールトランスクリプトーム解析を行いその結果、Heat shock protein 90 (HSP90)は発生の停止と再開を制御する分子である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

多くの鳥類の種卵は、適切な温度管理により胚の発生を停止、再開できる長期保存機構を備えている。本研究者は、この長期保存機構をニワトリ胚の発生の停止と再開機構に着目し、発生の制御に關する148個の分子の抽出に成功した。さらにこれらの分子の解析からHeat shock protein 90 (HSP90)は、発生を制御する候補分子であることを見出した。ニワトリの発生過程は哺乳類に類似し分子レベルでは本質的に脊椎動物と同じ基本過程が生じていることから、ニワトリ胚の発生を操作できれば、養鶏業への応用のみならず、発生生物学、組織工学、将来必要とされるiPS細胞由来組織や器官の保存技術に応用できる可能性がある。本研究では、HSP90による発生制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 孵卵刺激下におけるHSP90の各組織の発現様式の解析

発生中のE8のニワトリ胚を15度、湿度75%で24時間低温保存し発生を停止させたのちに37.5度、湿度75%の孵卵温度に移行し発生を再開させた際の0時間、6時間におけるHSP90の各組織の発現様式をDIG標識ニワトリHSP90 cRNAを用いたホールマウント *in situ*ハイブリダイゼーションおよびanti HSP90を用いたホールマウント免疫染色により調べた。

(2) HSP90による細胞周期の制御

HSP90のノックダウンによる細胞周期停滞の制御

ニワトリ胚(E8)の肝臓をコラゲナーゼで分散、M199培地、10%FBS、37度、5%CO₂で培養した初代培養細胞にHSP90の阻害剤17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-AAG)を0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.5M, 1.0M/DMSO添加し、15度、湿度75%で24時間低温保存したのちに37.5度、湿度75%の孵卵温度に移行した際の0時間、6時間における細胞周期をフローサイトメーター(CytoFLEX BECKMAN COULTER)を用いて解析を行った。

HSP90による細胞周期進行の制御

ニワトリHSP90に緑色蛍光タンパク質ZsGreen1をIRESで連結したレンチウイルスベクター(TAKARA)を構築しリポフェクション法により上記と同様のニワトリ胚由来の肝臓初代培養細胞にHSP90遺伝子を一過性に過剰発現させた。24時間の培養後に15度、湿度75%で24時間低温保存したのちに37.5度、湿度75%の孵卵温度に移行した際の0時間、6時間における細胞周期をフローサイトメーターを用いて解析を行った。

(3) *in ovo*投与を用いたHSP90による発生制御の機能解析

HSP90による発生の進行制御

(2)と同様のHSP90を発現するレンチウイルスベクターをニワトリ胚(E8)に*in ovo*投与を行った。*in ovo*投与後、ニワトリ胚を低温条件下(15度、湿度75%)で24時間孵卵させたのち再び37.5度、湿度75%の孵卵温度に移行し孵化日の延長日数を検討した。比較として、無処理の低温刺激無し、無処理の低温刺激あり、および遺伝子導入効率の検討のため緑色蛍光タンパク質ZsGreen1のみを導入したコントロール群を用いた。

HSP90のノックダウンによる発生の延長制御

0.5Mの17AAGをニワトリ胚(E8)に*in ovo*投与を行った。*in ovo*投与後、ニワトリ胚を低温条件下(15度、湿度75%)で24時間孵卵させたのち再び37.5度、湿度75%の孵卵温度に移行し孵化日の延長日数を検討した。比較として、無処理の低温刺激無し、無処理の低温刺激あり、17AAGの溶媒のみを*in ovo*投与した。

4. 研究成果

(1) 孵卵刺激下における HSP90 の各組織の発現様式

HSP90 の mRNA およびタンパク質は、ともに胚全体で発現していた (図 1. 2) さらに心臓や肝臓、翼、脚における詳細な HSP90 の発現を確認したところ、HSP90 の発現は温度刺激の経過時間とともに増加する傾向があった。これらのことより HSP90 は、胚全体で発生の制御に関与していることが推察された。

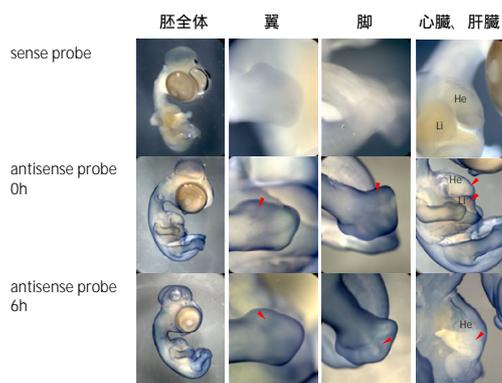


図 1. 発生の再開時における HSP90 mRNA の発現様式
He:心臓、Li: 肝臓

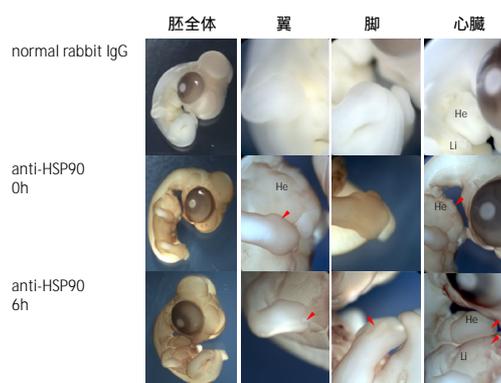


図 2. 発生の再開時における HSP90 タンパク質の発現様式
He:心臓、Li: 肝臓

(2) HSP90 による細胞周期の制御

HSP90 のノックダウンによる細胞周期停滞の制御

ニワトリ胚肝臓より調製した初代培養細胞を用いて HSP90 の阻害剤 17AAG による細胞周期の制御を検討したところ、0.5M の 17AAG までは濃度依存的に細胞周期を G2/M 期で停止させ、1M で横ばいになることが明らかになった (図 3)。

HSP90 による細胞周期進行の制御

HSP90 発現ベクターの細胞内導入は低温条件下で S 期への進入を促進した ($P=0.006$) (図 4)。すなわち、HSP90 は細胞周期が停止、遅延している低温刺激で細胞周期を進行させた。

これらのことから、HSP90 は G2/M 期チェックポイントと S 期の進入に関与していると考えられた。

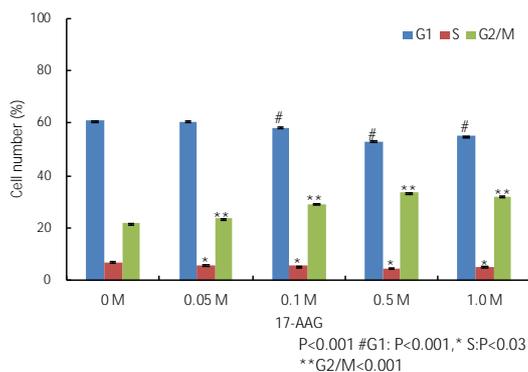


図 3. ニワトリ初代肝細胞における 17AAG による細胞周期の影響

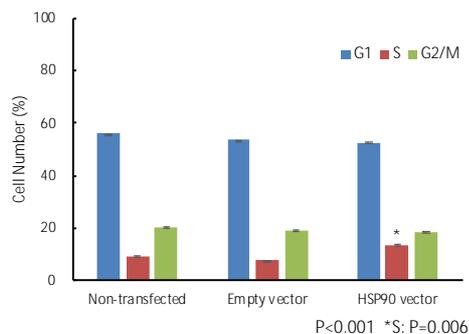


図 4. ニワトリ初代肝細胞におけるニワトリ HSP90 による細胞周期の影響

(3) *in ovo* 投与を用いた HSP90 による発生制御の機能解析

HSP90 による発生の進行制御

HSP90 発現ベクターまたは Empty ベクターの *in ovo* 投与を行い、24 時間低温条件下で発生を停止・遅延させた後、孵卵条件で孵卵させたところ、24 時間低温刺激無しの無処理区と比較し HSP90 および Empty ベクターの *in ovo* 投与は、孵化日が無処理区よりも約 24 時間遅延したものの、HSP90 (93%) および Empty ベクター (93%) の両者における孵化日の違いは見られなかった。このため、さらに遺伝子導入効率の良いと考えられるステージ 10 および E4 の胚を用いて HSP90 発現ベクターを *in ovo* 投与したところ、発現部位の局所化および発生ステージにより遺伝子導入効率の違いがあり、本方法における *in ovo* 投与は特に E4 の発生ステージの心臓に局所化されていた。以上のことより、HSP90 による発生の進行制御を検討するためには、さらなる遺伝子導入方法の確立が必要である。

HSP90 のノックダウンによる発生の延長制御

(2)の結果より 0.5M の 17AAG で HSP90 の阻害作用が検討できたことから、ニワトリ胚に 0.5M の 17AA を *in ovo* 投与し 24 時間低温条件下で発生を停止・遅延させた後、孵卵条件で孵卵させたところ、孵卵日は 17AAG の溶媒のみの区、17AAG 区でそれぞれ、68%、58%と 24 時間の低温処理を行ったコントロール区と同様に 24 時間遅延したが、17AAG 投与区特異的に孵化日が遅延していることはなかった。一方で、興味深いことに残りの 17AAG の溶媒のみの区、17AAG 区のそれぞれ 32%および 42%は、約 24 時間の遅延することなく孵化した。本結果より、17AAG を用いた HSP90 のノックダウンによる発生の制御はできなかったが、17AAG を *in ovo* 投与した際に用いた溶媒中に発生を促進する因子が含まれている可能性が示唆された。

今後の展望

本研究より HSP90 は胚の全体で発現し、*in vitro* においては G2/M 期チェックポイントと S 期の進入に関与し細胞周期を制御していることが明らかとなった。しかしながら、個体の発生の人為的制御には、HSP90 を胚全体で時期特異的に発現制御するシステムの構築が必要であること、さらに 17AAG のみで発生を人為的に制御できなかったことから、ホールトランスクリプトーム解析で得られている 148 個の遺伝群の中より HSP90 と相互作用を示す因子による発生の制御、および偶然にも示唆された溶媒中の発生促進因子の詳細について検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Nobuhiro Nakao, Kei Nakagawa, Asuna Sasaki, Arisa Yamaguchi, Nobumichi Tsushima and Minoru Tanaka | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 Photoperiod-Specific Expression of Eyes Absent 3 Splice Variant in the Pars Tuberalis of the Japanese Quail | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.2141/jpsa.0190135 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Shimmura Tsuyoshi, Tamura Mai, Ohashi Shosei, Sasaki Asuka, Yamanaka Takamichi, Nakao Nobuhiro, Ihara Kunio, Okamura Shinsaku, Yoshimura Takashi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Cholecystokinin induces crowing in chickens | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 3978 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41598-019-40746-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Habara Makoto, Mori Nobuko, Okada Yuki, Kawasumi Koh, Nakao Nobuhiro, Tanaka Yoshikazu, Arai Toshiro, Yamamoto Ichiro | 4. 巻 261 |
| 2. 論文標題 Molecular characterization of feline melanocortin 4 receptor and melanocortin 2 receptor accessory protein 2 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 31～39 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kato Yuiko, Ochiai Kazuhiko, Kawakami Shota, Nakao Nobuhiro, Azakami Daigo, Bonkobara Makoto, Michishita Masaki, Morimatsu Masami, Watanabe Masami, Omi Toshinori | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Canine REIC/Dkk-3 interacts with SGTA and restores androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer cell lines | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 BMC Veterinary Research | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1186/s12917-017-1094-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Habara Makoto, Mori Nobuko, Okada Yuki, Kawasumi Koh, Nakao Nobuhiro, Tanaka Yoshikazu, Arai Toshio, Yamamoto Ichiro | 4. 巻 261 |
| 2. 論文標題 Molecular characterization of feline melanocortin 4 receptor and melanocortin 2 receptor accessory protein 2 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 31 ~ 39 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2018.01.020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Hiromi Kaneda, Nobuhiro Nakao, Nobumichi Tsushima, Minoru Tanaka | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 Expression of Prolactin Receptor mRNA in Lactotrophs and Somatotrophs of the Chicken Anterior Pituitary Gland | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science | 6. 最初と最後の頁 150-154 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2141/jpsa.0170082 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 中尾暢宏、中島えりな、三好紗加、田中実、對馬宣道 |
| 2. 発表標題 ニワトリ胚の人為的な発生制御下におけるHeat shock protein 90の発現 |
| 3. 学会等名 日本比較内分泌学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中尾暢宏、武内友里恵、深澤祐実佳、田中友子、白石純一、小林那美香、藤村洋子、松下浩一、對馬宣道、太田能之 |
| 2. 発表標題 肉用鶏初生雛の松果体における緑色LEDを受容する光受容器の探索 |
| 3. 学会等名 鳥類内分泌研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中尾暢宏, 對馬宣道 |
| 2. 発表標題 Heat shock protein 90によるニワトリ胚の発生制御に関する検討 |
| 3. 学会等名 鳥類内分泌研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 白石純一, 羽田佳織, 槌田愛美, 小林那美香, 松下浩一, 中尾暢宏, 太田能之 |
| 2. 発表標題 LED単波長の照度および照射期間がブロイラーの初期成長に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本家禽学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 LED単波長照射が給餌制限下におけるブロイラーの初期成長および血液性状に及ぼす影響 |
| 2. 発表標題 羽田佳織, 白石純一, 槌田愛美, 小林那美香, 松下浩一, 中尾暢宏, 太田能之 |
| 3. 学会等名 日本家禽学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 LED単波長照射がブロイラー初生雛の光受容と初期成長に及ぼす影響 |
| 2. 発表標題 槌田愛美, 中尾暢宏, 羽田佳織, 白石純一, 小林那美香, 松下浩一, 對馬宣道, 太田能之 |
| 3. 学会等名 日本家禽学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 白石純一, 渡邊敬裕, 小林那美香, 松下浩一, 中尾暢宏, 太田能之 |
| 2. 発表標題 プロイラーヒナにおけるLED照射が分岐鎖アミノ酸異化酵素の遺伝子発現に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本畜産学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 齋藤那美香, 松下浩一, 白石純一, 中尾暢宏, 太田能之 |
| 2. 発表標題 LED単波長照射がプロイラーの発育性に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本家禽学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 田中 実、齋藤 徹、中尾 暢宏 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 アドスリー | 5. 総ページ数 120 |
| 3. 書名 体内リズムをめぐる生物学 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 連携研究者 | 白石 純一 (SHIRAISHI Jun-ichi) (50632345) | 日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・講師 (32669) | |