

機関番号 : 13601

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2007~2010

課題番号 : 19580308

研究課題名 (和文) 新世界ウズラ及び旧世界ウズラにおける生殖細胞の移植とその発現

研究課題名 (英文) Transfer and expression of germ cells between New and Old World quails

研究代表者

小野 珠乙 (ONO TAMAO)

信州大学・農学部・教授

研究者番号 : 10177264

研究成果の概要 (和文) : 実験動物としての新世界ウズラに分類されるコリンウズラの基礎的な生物学的情報を得た。①体外培養系を構築し、孵化に成功した。②コリンウズラとニホンウズラのゲノム識別およびコリンウズラの雌雄識別システムを実用化した。③染色体レベルでは新世界ウズラと旧世界ウズラでは大きく異なっていた。④発生段階表を作成し、ニワトリの発生段階と一対一対応させた。⑤コリンウズラとニホンウズラの間でキメラで、ドナー由来の DNA 産物が観察された。

研究成果の概要 (英文) : Basic biological information of the bobwhite quail belongs to New World quail was obtained. (1) Ex vivo culture system leading to hatching was devised. (2) PCR systems were put to practical use to identify its genome and sex. (3) New and Old world quails were different in chromosomal level. (4) Normal developmental tables were made. (5) Donor-derived DNA products were observed in chimeras between the bobwhite quail and Japanese quail embryos.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野 : 農学

科研費の分科・細目 : 畜産学・獣医学 ・ 畜産学・草地学

キーワード : 家畜生産システム, 家禽繁殖, ニホンウズラ, コリンウズラ, ニワトリ, ヒメウズラ, 新世界ウズラ, 旧世界ウズラ

1. 研究開始当初の背景

実験動物として世界各国で用いられているウズラ (quail) はニホンウズラ (*Coturnix japonica*) である。他に、サイズがニホンウズラの約半分のヒメウズラ (*Coturnix chinensis*) および約二倍のコリンウズラ (*Colinus virginianus*) もわずかながら実験に用いられている。ニホンウズラやヒメウズラは旧世界ウズラ (キジ目キジ科ウズラ

属) に属し、コリンウズラ (キジ目ナンベウズラ科コリン属) は新世界ウズラに属している。両属のウズラは外見は似ているが遺伝的には離れている。申請者はヒメウズラを1996年から実験動物化および発生工学的研究に用いてきた。コリンウズラは2006年春に入手した。ニホンウズラも卵用 (実験用) タイプに加え、肉用タイプも2002年から繁殖増産してきた。

2. 研究の目的

鳥類では受精卵に多量の卵黄があることなどから、家禽を介して鳥類における絶滅危惧種や希少種の個体復元や保全、および希少品種や付加価値の高い系統の大量生産や保存を目指す。その為に、胚発生初期、すなわち始原生殖細胞 (PGCs) が血流にあり予定生殖腺に移動中の時期及び生殖腺に定住直後の PGCs を取り出し、PGCs が血流循環中のニホンウズラ胚血流に導入して、導入 PGCs の分化および次世代での形質発現を調べる。どうしても機能的配偶子形成および後代ができない場合は、その研究過程において探索する種特異的 DNA マーカーを用いて、導入生殖細胞の系譜追跡、減数分裂、配偶子形成の分化過程を調べ、その原因を解明する。本研究は、旧世界のヒメウズラおよび新世界のコリンウズラを広くライフサイエンスのための実験動物として開発・確立することはもとより、発生工学研究用の実験動物として開発・確立することをも目的とする。実験動物の開発を行う場合、最も重要なことは、その種の全発生過程の解明、繁殖の統御、遺伝的特徴の把握、ならびに遺伝的プロファイルの明らかな系統の造成である。本研究では (1) 胚の全発生段階表を作成して、それぞれの動物種の発生段階が基準となっているニワトリ胚発生段階との対比ができるようにする。 (2) クローズドコロニーの作出、系統造成をして、広く研究者が使用できるようにする。 (3) 胚培養法の開発と確立をして、広く発生工学・遺伝子工学研究に用いることができるようにする。 (4) 始原生殖細胞の異属及び異種間移植による発現の追跡を試み、導入細胞の系譜追跡、減数分裂、配偶子形成の分化過程を調べる。

3. 研究の方法

(1) 種特異的 DNA 識別マーカーの開発：種特異的に識別可能なマイクロサテライトマーカーを探索し利用する。新旧大陸系ウズラ識別及び雌雄鑑別のための PCR システムも開発する。さらに、in situ hybridization に適用するためにゲノム DNA ライブラリーから各種ウズラのゲノムを識別可能な DNA プロブを探索し実用化する。

(2) レシピエントの生殖細胞除去：始原生殖細胞 (PGCs) は孵卵前には胚盤葉明域中央部に存在し、胚体外前方生殖弦に移動し、血管形成に伴い血中循環して、予定生殖腺に定住する。孵卵前および PGCs 血中循環期 (ドナー PGCs 導入直前) に軟 X 線照射することによりほとんど胚発生の正常な進行を阻害せずにレシピエント胚の PGCs を減少させる。

(3) ドナーの PGCs の単離、精製、導入および

導入胚の培養：胚発生初期 (PGCs 血中循環期) のドナー胚周縁静脈から血液を採取し、免疫磁気ビーズ法、フィコールおよびナイコデント濃度勾配遠心分離法で PGCs と血球を分離し、PGCs 画分を同一発生時期のニホンウズラ胚体外周縁静脈に注入する。導入胚を培養し、孵化させる。

(4) 導入生殖細胞の同定：ニホンウズラに導入したドナー PGCs は、上記種特異的 DNA 識別マーカーにより胚の生殖腺から順次成長を追って外来生殖細胞の存在を追跡する。孵化後は雄の精巣及び精子における外来 DNA の存在および占有性を調べる。

4. 研究成果

(1) コリンウズラ及びプロイラータイプのニホンウズラの成体重は類似し、雌雄それぞれ約 220 g 及び

200 g であった (図 1)。卵重は約 10.5 g 及び 11 g であった。始原生殖細胞の免疫



図1 コリンウズラ (*Colinus virsianus*)

染色においてはコリンウズラはニワトリ特異的抗体陽性、ニホンウズラ特異的抗体陰性であった。通常のコリンウズラよりサイズが大であるため、両ウズラの専用のケージを設計して、系統造成した。プロイラータイプのコリンウズラは我々の飼育環境では次世代を得ることはできなかったため、再度入手を検討しなければならない。一方、ヒメウズラは雌雄とも成体重は 50-60 g であり、始原生殖細胞はニホンウズラと同様の免疫特異性を示した。ヒメウズラの胚培養法を確立し、種特異的 PCR マーカーを開発した。それぞれのウズラの生物学的類似性、異質性の一部が明らかにされたので新規実験動物の系統として有用であることが示唆された。

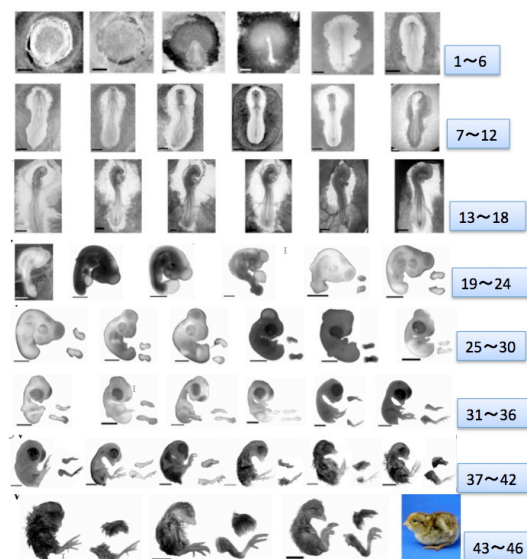


図2 ニワトリ胚に対応させたコリンウズラの胚発生段階表

(2) コリンウズラの胚発生ステージを作成した(図2)。ニホンウズラとコリンウズラの胚発生ステージを比較したところ6時間培養の段階でコリンウズラの胚発生進行がニホンウズラより遅延しはじめた。コリンウズラの体外培養系を構築し、孵化に成功した。生存率、孵化率が一番良いのはニホンウズラと同じく52時間密閉培養(システムQ2)後、開放培養(システムQ3)に移行する方法であった。この移行ステージはニホンウズラ(ステージ16)より早くステージ9~10であった。コリンウズラの種特異的PCRプライマー(For:5'-ACCCCGTCTAAGGTAAGA-3'; Rev:5'-

AAGACAAAAGAAA
AGAAAGATGATGAT
G-3')を開発した。これはコリンウズラとニホンウズラにおいて増幅するDNA産物のサイズがそれぞれ530bpと224bpと異なるので、両者間でキメラ作成を

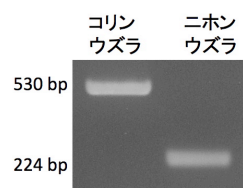


図3 コリンウズラとニホンウズラゲノムの識別

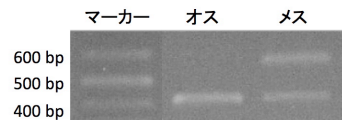


図4 コリンウズラ雌雄の識別

した場合のマーカーとなる実用的なマーカーとなりうる(図3)。コリンウズラの雌雄識別のために性特異的PCRプライマー

(For:5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'; Rev:5'-ATTGAAATGATCCAGTCTTG-3')を用いた雌雄鑑別を実用化した(図4)。

(3) 染色体レベルではニホンウズラとニワトリは構造やその特徴において類似点が多いが、コリンウズラとの間には構造変化が起こっており、染色体を構成する反復配列も大きく異なっていた。コリンウズラのゲノムDNAをHaeIIIで消化しアガロースゲル電気泳動を行い、クローニングを行い、シーケンスを決定した。コリンウズラの雌の胚から作製した染色体標本を使用してFISH解析を行ったところ224bpで、8bpのサテライト(G/A/C)CCCA(T/C)(A/T)(G/C)を14個含んでいた。これはW染色体を除く全ての染色体のセントロメア領域にシグナルが検出された。

(4) 実験動物は研究目的に応じてより多くの種が用意されていることが望ましいという見地から新世界ウズラに分類されるコリンウズラを実験動物として確立するために以下の研究を進めた。体外培養法を確立し、コリンウズラにおいて19.4%の孵化率が得られた。これにより、胚発生観察や発生工学的な胚操作を容易にした。外部形態の詳細な発生段階表を作成し、ニワトリの発生段階と一対一対応させた。これにより、コリンウズ

ラの胚発生の各段階を孵卵時間による表記ではなく標準的なニワトリの胚発生の基準で表現することができるようになった。培養6時間より前から両者に発生進度の差が生じた。コリンウズラがステージ2になる頃にニホンウズラはステージ3付近に、ニワトリとは培養1日後からコリンウズラがステージ5になる頃にニワトリがステージ8~10と顕著な差が観察された。コリンウズラと他の鳥類胚とのキメラ作成の上で細胞識別ができ、性別判別も外部形態に頼ることなくPCRにより容易に識別できることになった。コリンウズラをレシピエントに、ニホンウズラをドナーに用い、胚盤葉細胞の移植によるキメラの作出を試み、PCRによりドナー由来のDNA産物が観察された(図5)。以上により得られたコリンウズラの基礎的な生物学的情報より実験動物としての有用性が期待される。

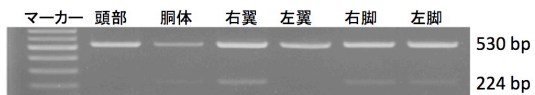


図5 コリンウズラ胚に導入したニホンウズラ胚盤葉細胞の同定(224bpがニホンウズラのDNA産物)。

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24件)

- ① Nakamura Y, Usui F, Ono T, Kagami Hand Tagami T. (他5名, 6番目) Viability and functionality of primordial germ cells after freeze-thaw in chickens. *Journal of Poultry Science*, 48 (1): 57-63, 2011, 査読有
- ② Mizushima S, Mizushima S, Takagi S, Ono T, and Shimada K. (他5名, 3番目) Novel method of gene transfer in birds: Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for green fluorescent protein (GFP) expression in quail blastoderms *Biology of Reproduction*, 83 (6): 965-969, 2010, 査読有
- ③ Nakamura Y, Usui F, Ono T, Kagami Hand Tagami T. (他4名, 5番目) Efficient system for preservation and regeneration of genetic resources in chicken: concurrent storage of primordial germ cells and live animals from early embryos of a rare indigenous fowl (Gifujidori). *Reproduction, Fertility and Development*, 22 (8): 1237-1246, 2010, 査読有
- ④ Nakamura Y, Usui F, Ono T, Kagami Hand Tagami T. (他2名, 3番目) Germline replacement by transfer of primordial

- germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biology of Reproduction*, 83 (1): 130-137, 2010, 査読有
- ⑤ Usui F, Ono T and Kagami H. (他 4 名, 6 番目) A novel concentrating system of chicken stem cells by bone marrow side population cells. *Journal of Poultry Science*, 47(1):53-56, 2010, 査読有
- ⑥ Mizushima S, Ono T and Shimada K. (他 4 名, 3 番目) Phospholipase C ζ mRNA expression and its potency during spermatogenesis for activation of quail oocyte as a sperm factor. *Molecular Reproduction and Development* 76(12):1200-1207, 2010, 査読有
- ⑦ Usui F, Ono T and Kagami H. (他 3 名, 4 番目) Analysis of developmental changes in avian DNA methylation using a novel method for quantifying genome-wide DNA methylation. *Journal of Poultry Science*, 46(4):286-290, 2009, 査読有
- ⑧ Usui F, Ono T and Kagami H. (他 2 名, 3 番目) Novel system for degeneration of blood vessels by UV irradiation and subsequent regeneration using chick bone marrow cells. *Cells Tissues Organs*, 188(5):348-355, 2009, 査読有
- ⑨ Atsumi Y, Kagami H and Ono T. (他 3 名, 6 番目) Depletion of primordial germ cells (PGCs) by X-irradiation to extraembryonic region of chicken embryos and expression of xenotransplanted quail PGCs. *Journal of Poultry Science*, 46(2):136-143, 2009, 査読有
- ⑩ Nakamura Y, Ono T, Kagami H and Tagami T. (他 6 名, 3 番目) Effects of busulfan sustained-release emulsion on depletion and repopulation of primordial germ cells in early chicken embryos. *Journal of Poultry Science*, 46(2):127-135, 2009, 査読有
- ⑪ Fujiwara A, Ono T, Hiramatsu K and Kagami H. Complete regeneration of muscular dystrophy chickens by mating of male and female offspring derived from germline chimeras. *Journal of Poultry Science*, 46(2):123-126, 2009, 査読有
- ⑫ Fujiwara A, Ono T and Kagami H. Regeneration of muscular dystrophy chickens by transplantation of early blastodermal cells into recipient embryos. *Journal of Poultry Science*, 46 (1):46-51, 2009, 査読有
- ⑬ Nakamura Y, Ono T, Kagami H and Tagami T. (他 6 名, 6 番目) Increased proportion of donor primordial germ cells in chimeric gonads by sterilisation of recipient embryos using busulfan sustained-release emulsion in chickens. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(8):900-907, 2008, 査読有
- ⑭ Atsumi Y, Tagami T, Kagami H and Ono T. Restriction of germline proliferation by soft x-ray irradiation of chicken embryos and its application to chimera production. *Journal of Poultry Science*, 45(4):292-297, 2008, 査読有
- ⑮ Mizushima S, Ono T and Shimada K. (他 4 名, 3 番目) (2008) Developmental enhancement of intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-generated quail embryos by phospholipase C ζ cRNA. *Journal of Poultry Science*, 45(2):152-158, 2008, 査読有
- ⑯ Koba N, Ono T and Shimada K. (他 5 名, 7 番目) Effects of aromatase inhibitor (fadrozole)-induced sex-reversal on gonadal differentiation and mRNA expression of P450arom, AMH and ER α in embryos and growth in posthatching quail. *Journal of Poultry Science*, 45(2):116-124, 2008, 査読有
- ⑰ Mizushima S, Ono T and Shimada K. (他 4 名, 3 番目) Possible role of calcium on oocyte development after intracytoplasmic sperm injection in quail (*Coturnix japonica*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 307A(11):647-653, 2007, 査読有
- ⑱ Nakamura Y, Ono T, Kagami H and Tagami T. (他 6 名, 5 番目) Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poultry Science*, 86(10):2182-2193, 2007, 査読有
- ⑲ Takagi S, Ono T and Shimada K. (他 4 名, 2 番目) Fertilization and blastoderm development of quail oocytes after intracytoplasmic injection of chicken sperm bearing a W chromosome. *Poultry Science*, 86(5):937-943, 2007, 査読有
- ⑳ Yamamoto Y, Ono T and Kagami H. (他 6 名, 8 番目) A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. *Biology of Reproduction*, 77(1):115-119, 2007, 査読有
- ㉑ Takagi S, Ono T and Shimada K. (他 4 名, 2 番目) Z-chromosome specific

primers for chicken-quail hybrid blastoderm. Journal of Poultry Science, 44(2):209-212., 2007, 査読有

[学会発表] (計 46 件)

- ① Nakamura Y, Ono T, Kagami H and Tagami T. (他 6 名, 6 番目) Effect of X-ray irradiation on primordial germ cell-depletion in chicken embryos. Fullpaper CD files of the 9th Asian Pacific Poultry Conference. Tue-S10-04, pp.1-4. Taipei, Republic of China 2011 年 3 月 22 日
- ② Mizushima S, Ono T and Shimada K. (他 3 名, 5 番目) Establishment of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) method for green fluorescent (GFP) expression in quail blastoderm. Fullpaper CD files of the 9th Asian Pacific Poultry Conference. Mon-S4-06, pp.1-4. Taipei, Republic of China 2011 年 3 月 22 日
- ③ Mizushima S, Ono T and Shimada K. (他 3 名, 5 番目) Down-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 (IP₃R-1) for oocyte activation in quail. Fullpaper CD files of the 9th Asian Pacific Poultry Conference. D-Tue-09, pp.1-4. Taipei, Republic of China 2011 年 3 月 21 日
- ④ Shimada K, Mizushima S, Ono T and Kimura I (他 7 名, 4 番目) Down-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 (IP₃R-1) for oocyte activation in quail. Fullpaper CD files of the 9th Asian Pacific Poultry Conference. D-Tue-09, pp.1-4. Taipei, Republic of China 2011 年 3 月 21 日
- ⑤ Ono T, Kagami H, Tsudzuki M and Matsuda Y. (他 4 名, 1 番目) Basic information on blue-breasted quail and northern bobwhite quail for germline transfer studies. 2nd International Workshop on Preservation of Avian Primordial Germ Cells and Its Usage, Naha, Okinawa 2011 年 1 月 25 日
- ⑥ Ono T. Depletion of primordial germ cells for the better xenotransplanted germline donor in avian embryos. GSR2010 Proceedings, WCU Biomodulation International Symposium on Germ Cell, Stem Cell and Reproductive Biology, Jeju, Korea pp. 13-15. 2010 年 6 月 7 日
- ⑦ Shimada K, Ono T and Mizushima S. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for avian transgenesis. GSR2010 Proceedings, WCU Biomodulation International Symposium on Germ Cell, Stem Cell and Reproductive Biology, Jeju, Korea pp. 23-24. 2010 年 6 月 7 日
- ⑧ Mizushima S, Ono T and Shimada K. (他 2 名, 4 番目) cDNA cloning, mRNA expression and oocyte-activating potential of quail phospholipase C ζ . Proceedings of the 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology p. 80. Palmerston North, New Zealand 2010 年 1 月 21 日
- ⑨ Shimada K, Mizushima S, Ono T and Saito N. (他 4 名, 5 番目) Roles of phospholipase C ζ , inositol trisphosphate and calcium in oocyte activation in quail. Proceedings of the 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology p. 63. Palmerston North, New Zealand 2010 年 1 月 21 日
- ⑩ Nakamura Y, Ono T, Kagami H, and Tagami T. (他 3 名, 4 番目) Germline replacement by transferring primordial germ cells into sterilized embryos in the chicken 2009 Annual Meeting Abstracts, Poultry Science 88(suppl. 1): 19. 2009 年 7 月 21 日
- ⑪ Atsumi Y, Tagami T, Kagami H and Ono T. (他 6 名, 8 番目) Restriction of proliferation of primordial germ cells by soft X-ray irradiation in chick embryos. 23rd World Poultry Congress, Brisbane, Australia. 2008 年 6 月 29 日
- ⑫ Nakamura Y, Ono T, Kagami H, and Tagami T. (他 5 名, 5 番目) A novel strategy for preservation of genetic resources in birds. Abstracts, Society for the Study of Reproduction 41st Annual Meeting and World Congress on Reproductive Biology, p. 203. Hawaii, USA 2008 年 5 月 28 日

[図書] (計 2 件)

- ① 白井文武・小野珠乙・鏡味裕 (2009) ニワトリ初期胚における DNA メチル化状態の変化. DNA 多型 VOL. 17 (日本 DNA 多型学会編), 東洋書店 pp. 216-218.
- ② 山本耕裕・福田靖・小野珠乙・鏡味裕 (2007) Differential Display RT-PCR を用いたニワトリ初期胚での遺伝子発現様式. DNA 多型 VOL. 15 (日本 DNA 多型学会編), 東洋書店 pp. 74-76.

[その他]

ホームページ等

http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/on_o_kagami/hasseiken.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 珠乙 (ONO TAMAO)
信州大学・農学部・教授
研究者番号：10177264

(2) 研究分担者

浅野 安信 (ASANO ANSHIN)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：70459311

(3) 連携研究者

鏡味 裕 (KAGAMI HIROSHI)
信州大学・農学部・教授
研究者番号：80308303

島田 清司 (SHIMADA KIYOSHI)
ソウル大学(韓国)・農学生命科学研究科・
教授
研究者番号：30149253

田上 貴寛 (TAGAMI TAKAHIRO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・主任研究員
研究者番号：60355104