

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2012

課題番号：20380156

研究課題名（和文） ニワトリ始原生殖細胞操作法の開発と形質転換ニワトリ作出への応用に関する研究

研究課題名（英文） Manipulation of chicken primordial germ cells and its application to producing transgenic chickens

研究代表者

内藤 充 (NAITO MITSURU)

独立行政法人農業生物資源研究所・動物発生分化研究ユニット・上級研究員

研究者番号：70355733

研究成果の概要（和文）：本研究では、形質転換ニワトリ作出法の開発を目的として、初期胚より採取した始原生殖細胞をインビトロで長期に培養する方法を開発した。培養始原生殖細胞は、レシピエント胚生殖巣への移住能を有するとともに、正常な配偶子への分化能を保持していることが確認できた。また、培養始原生殖細胞への GFP 遺伝子の導入は可能で、GFP 遺伝子を発現する培養始原生殖細胞をレシピエント胚生殖巣へ導入することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a technique producing transgenic chickens, we attempted to culture primordial germ cells isolated from early-stage embryos in vitro for long-term. The cultured primordial germ cells retained the ability to migrate to gonads after transfer into recipient embryos and also confirmed the ability of differentiating to functional gametes in recipient gonads. Introduction of GFP gene into the cultured primordial germ cells was performed and cultured primordial germ cells expressing GFP gene were successfully entered gonads of recipient embryos.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学、獣医学・応用動物科学

キーワード：始原生殖細胞・外来遺伝子・トランスフェクション・GFP 遺伝子・ニワトリ初期胚・生殖系列キメラ・品種識別・体外培養

1. 研究開始当初の背景

(1) 形質転換ニワトリ作出技術の開発は、卵白中への医薬品等の有用物質の生産、遺伝子機能の解析、さらにはニワトリ集団の遺伝的

改良など、多方面への応用が期待されている。

1個の鶏卵の卵白中には約4gのタンパク質が含まれているが、このことはニワトリの卵管が極めて高いタンパク質合成能力を備えてい

ることを示している。卵白タンパク質の約半分はオボアルブミンより構成されており、これを有用タンパク質に置き換えることにより、医薬品等の有用物質の大量生産が可能になると期待される。特に、ニワトリ個体を利用してタンパク質を生産した場合、生産されたタンパク質に付与される糖鎖がヒト型に極めて近く、ヒトに対して極めて活性のあるタンパク質生産が可能になると考えられている。加えて、ニワトリは繁殖効率が高く、大量飼育システムが実用化されていることから、有用タンパク質の生産コストが他の大型動物種を利用する場合に比べて、極めて低く抑えられるという特徴がある。形質転換ニワトリを利用して有用物質の大量生産システムが構築できれば、従来の産業とは異なる新産業の創出につながるものと期待されている。

(2) ニワトリ胚は、初期発生は雌鶏の体内で進み、体外に放出（放卵）された後は卵殻内での体外発生となる性質を有している。したがって、発生に必要な栄養分を卵黄や卵白として卵殻内に蓄えているが、この多量の卵黄の存在が一方で胚操作を困難にしてきた。最近におけるニワトリ胚の体外培養法の開発と改良により、発生の初期から孵化までのあらゆるステージにおける胚へのアプローチが可能になった。一方、ニワトリ個体への外来遺伝子導入技術の開発は、当初は胚操作が困難なこともあってレトロウイルスベクターを利用する方法で開発が進められてきた。しかし、遺伝子導入には成功したものの、導入できる遺伝子のサイズの制限や、導入遺伝子の発現の問題、さらにはウイルスを用いることによる安全性への懸念などから、レトロウイルスを用いた研究はその後あまり行われなくなった。しかし、非ウイルス法によるニワトリ個体への遺伝子導入法の開発が困難を極めたため最近再び注目を集め、レンチウイルス（レ

トロウイルスの一種）等の利用による効率的な遺伝子導入法の開発が進められているが、ウイルス利用による問題点についてはほとんど解決されていないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) このような状況の中で、私たちの研究グループでは、発生に伴い卵子や精子に分化する細胞である始原生殖細胞に着目し、初期胚からの採取、レシピエント胚への移植による生殖系列キメラニワトリの作出、生殖系列キメラニワトリからの移植した始原生殖細胞由来の後代の作出、ドナー細胞とレシピエント胚の性の組合せによる始原生殖細胞の発生・分化能の解明、始原生殖細胞の凍結保存技術の開発と個体への再生、といった一連の解析や技術の開発を行い、始原生殖細胞操作に関連する基本的な技術を確認するに至っている。この中で唯一残された問題が、始原生殖細胞の染色体への効率的な遺伝子導入法の開発である。そこで、ニワトリ初期胚血流中を循環中の始原生殖細胞をインビトロおよびインビボでリポフェクション法によりトランスフェクションを試みた結果、効率的に外来遺伝子（GFP遺伝子）を導入できる条件が明らかになり、レシピエント胚生殖巣においてGFP遺伝子を非常に強く発現させることが可能になった。さらに、エレクトロポレーション法の一つであるnucleofection法についても条件検討を行い、始原生殖細胞にダメージを与えることなく効率的に外来遺伝子を導入できる条件を見出すことができた。特に、このnucleofection法では外来遺伝子を直接細胞核にまで導入できる特徴があることから、外来遺伝子を始原生殖細胞の染色体に効率的に組み込む技術の開発に繋がると期待されている。

(2) 始原生殖細胞操作に関連した技術、すなわち、初期胚血液からの始原生殖細胞の採取、レシピエント胚に存在する始原生殖細胞の一

部除去、始原生殖細胞のレシピエント胚への移植、作出した生殖系列キメラニワトリからの後代の作出、といった一連の技術は既に完成している。形質転換ニワトリ作出に関して残された問題は、外来遺伝子が染色体に組み込まれた始原生殖細胞を作出することである。そのためには、始原生殖細胞を体外で培養・増殖させ、遺伝子導入処理用に大量に供給することが必要である。既に私たちの研究グループでは、ニワトリ初期胚生殖巣を構成する体細胞をフィーダー細胞として用いることにより、1か月以上始原生殖細胞を維持することが可能であり、これらの培養始原生殖細胞が生殖隆起への移住能を保持することを品種特異的DNAマーカーを用いて確認している。そこで、本研究では、始原生殖細胞の培養条件をさらに改良するため、フィーダー細胞の調整法の検討、フィーダー細胞上での始原生殖細胞の維持・増殖のための培養液の組成の改良、遺伝子導入された始原生殖細胞の薬剤による選択条件の解明、等を行う。そして、外来遺伝子が導入された始原生殖細胞をレシピエント胚に移植して、生殖系列キメラニワトリを介して個体に再生するシステムを構築する。さらに、研究年度の後半においては始原生殖細胞をさらに長期に培養し、生殖細胞特異的に分化する能力を有する生殖幹細胞の作出を試みる。

3. 研究の方法

(1) ドナー細胞とレシピエント胚のニワトリ品種の選択

ドナー細胞とレシピエント胚由来細胞の識別を可能にするため、実験に使用するニワトリ品種として白色レグホーン種と横斑プリマスロック種を用いた。

(2) 始原生殖細胞培養のためのフィーダー細胞の作出と培養液の組成の検討

ニワトリ初期胚由来線維芽細胞がフィーダー細胞として有用であると考えられることから、フィーダー細胞として使用できる線維芽細胞の作出を行った。始原生殖細胞培養のための培養液としては、鳥類の細胞を長期に培養するために開発されたKA_v-1培養液を用いた。この培養液を基本培地とし、細胞の増殖に必要と考えられる様々な増殖因子を加えて、始原生殖細胞の増殖性に及ぼす影響を調べた。

(3) 培養始原生殖細胞の個体への発生能の検討

これまで培養法の改良を試みてきた結果、ニワトリ初期胚血液由来始原生殖細胞は、インビトロで1か月間は維持できるようになってきた。そこで、これら培養始原生殖細胞の増殖能や正常な配偶子への分化能、さらには個体への発生能を明らかにするため、レシピエント胚へ移植し、生殖系列キメラニワトリを介して個体に再生させることを試みた。

(4) ニワトリ初期胚血液より採取した始原生殖細胞の操作

ニワトリ初期胚血液より採取した始原生殖細胞をフィーダー細胞上で培養し、大量増殖を試みる。そして、大量に増殖された始原生殖細胞に対し、リポフェクション法あるいはnucleofection法を用いてGFP遺伝子の導入を行った。遺伝子導入処理された始原生殖細胞を再びフィーダー細胞上で培養し、GFP遺伝子が染色体に組み込まれた始原生殖細胞のみを薬剤選択等により選別し、これら始原生殖細胞をフィーダー細胞上で培養・増殖させた。

(5) 始原生殖細胞の培養法の改良と幹細胞の作出

始原生殖細胞の培養のポイントは、フィーダー細胞の選択と、培養液に添加する細胞増殖因子の種類を選択によるところが大きい

と考えられる。そこで、フィーダー細胞の種類や調整法、さらに添加する細胞増殖因子について詳細な検討を継続して行い、始原生殖細胞の維持・増殖に適した培養条件を検討した。さらに、始原生殖細胞の長期培養を試みて、レシピエント胚へ移植した場合、生殖細胞特異的に分化する生殖幹細胞の作出を目指した。

(6)生殖系列キメラニワトリの作出と後代の解析

GFP遺伝子を導入された始原生殖細胞をレシピエント胚へ移植した。この際、ドナー細胞は初期胚(発生ステージ14-15)の血流中に移植した。始原生殖細胞を移植されたレシピエント胚は、体外培養法により発生を進めさせた。

4. 研究成果

(1) ニワトリ始原生殖細胞の新規培養法の開発

ニワトリ始原生殖細胞培養のためのフィーダー細胞として、初期胚生殖巣由来間質細胞と初期胚由来繊維芽細胞を作出した。初期胚生殖巣由来間質細胞をフィーダー細胞とした場合、始原生殖細胞の増殖は確認されたが、始原生殖細胞は分化し、培養過程で生殖巣への移住能を消失してしまう傾向にあった。一方、初期胚繊維芽細胞をフィーダー細胞とした場合、始原生殖細胞の増殖は同様に確認されたが、未分化状態の維持に効果が認められ、培養始原生殖細胞の生殖隆起への移住が確認された。そこで、始原生殖細胞培養のためのフィーダー細胞としては、初期胚由来繊維芽細胞を用いることとした。次いで培養液の検討を行った。始原生殖細胞培養のための培養液としてKAv-1培養液を用いていたが、始原生殖細胞の増殖性や未分化状態の維持に関して十分ではなかったことから、培養液の組成を一部変更した修正KAv-1培養液を開発した。

この培養液を用いることにより、培養始原生殖細胞の形態が著しく改善され、生殖隆起への移住能についても大幅な改善効果が認められた。約3,000個の始原生殖細胞から培養を開始した場合、1か月後には約100万個にまで増殖させることが可能になり、形態的にも始原生殖細胞の特徴を有していた。

(2) 培養始原生殖細胞の生殖隆起への移住能および個体への発生能の検討

培養始原生殖細胞を効率的にレシピエント胚生殖隆起へ導入するためには、レシピエント胚のもつ内在性始原生殖細胞を効率的に除去する必要がある。そのための方法として、生殖細胞特異的に作用する薬剤であるブスルファンの利用が効果的であることが明らかにされており、本研究ではニワトリ胚の体外培養法に適した方法の開発に取り組んだ。その結果、ブスルファンとゴマ油の乳化剤を受精卵直後のニワトリ受精卵の胚盤葉直下の卵黄中へ微量注入する方法を開発した。この方法を用いることにより、ドナー始原生殖細胞由来の後代を効率的に生産する生殖系列キメラニワトリの作出に成功した。

次いで、培養始原生殖細胞のレシピエント胚生殖隆起への移住能について調べた。蛍光ラベルした培養始原生殖細胞を、ブスルファン処理した孵卵2.5日目のレシピエント胚血流中へ移植した後、処理胚を体外培養法により5日間培養した。そして、生殖巣へ移住した培養始原生殖細胞の存在を調べた。その結果、左右の生殖層に多くの蛍光ラベルされた培養始原生殖細胞が観察され、培養始原生殖細胞の生殖隆起への移住能を確認することができた。また、白色レグホーン種と横斑プリマスロック種を区別するPCR法によっても、培養始原生殖細胞のレシピエント胚生殖巣での存在を確認することができた。

さらに、培養始原生殖細胞のレシピエント

胚生殖巣における正常な配偶子への分化能を調べた。培養始原生殖細胞を孵卵2.5日目のレシピエント胚血流中へ移植した後、処理胚を体外培養法により孵化させた。孵化した雛を育成し、性成熟後に交配実験を行った。その結果、2羽の雌から移植した培養始原生殖細胞由来の後代が100%および70%の割合で得られたことから、移植した培養始原生殖細胞の正常な配偶子への分化能が確認できた。しかし、雄については精液中において移植した始原生殖細胞由来の精子の存在がPCR法により確認されたものの、これまでのところ後代は得られていない。現在、交配実験を継続中である。

(3) 培養始原生殖細胞へのGFP遺伝子の導入

培養始原生殖細胞へのGFP遺伝子の導入のために、リポフェクション法およびnucleofection法を試みた。通常のプラスミドベクターを環状にして遺伝子導入処理をしたところ、約30%の細胞でGFP遺伝子の発現が観察された。しかし、プラスミドを直鎖状にして処理したところ、GFP遺伝子の発現は極めて低い効率で観察されたのみであった。また、GFP遺伝子が導入された培養始原生殖細胞は増殖性が低いことから、培養法の検討をさらに行う必要があるように思われた。培養始原生殖細胞は生殖系列細胞であり、この場合導入遺伝子の発現が抑制されると一般的に考えられている。今回のGFP遺伝子の発現の低さは、このことに由来している可能性が考えられる。そこで、生殖系列細胞において導入遺伝子の発現抑制が起こりにくいとされているトランスポゾンを利用した遺伝子導入法の検討を行った。トランスポゾンは、市販のPiggy Bacシステムを利用することとし、GFP遺伝子の発現プロモータとして、ニワトリ β -アクチンプロモータとニワトリCVHプロモータを用いることとし、これらのプロモータを導入したプラスミドベクターの構築を行った。今後

遺伝子導入実験を行う予定である。

(4) 始原生殖細胞の培養による幹細胞の作出
ニワトリ初期胚血液より採取した始原生殖細胞は、今回開発した方法で半年以上にわたる長期の培養が可能であった。培養開始当初は、始原生殖細胞はコロニーを形成しながら増殖していたが、培養4か月頃よりコロニー形成が少なくなり、個々の細胞が分散した状態で増殖するようになった。これらの培養始原生殖細胞は活発に増殖し、レシピエント胚生殖巣への移住能を有していることが確認できた。今回樹立できた培養始原生殖細胞のラインが、生殖幹細胞として機能するかどうかは今後の検討課題である。

(5) 今後の展望

本研究では、ニワトリ個体への外来遺伝子導入法の開発を目的として、始原生殖細胞操作法の開発に重点を置いて研究を行ってきた。始原生殖細胞の操作のためには、培養法の開発は必須であり、本研究で開発した培養法は今後始原生殖細胞操作の基本になる技術である。さらに、生殖系列細胞への遺伝子導入の際に一般的に観察される導入遺伝子のサイレンシングを回避するため、本研究ではトランスポゾンを利用したベクターの開発も行った。その際、ニワトリにおいて十分な発現が得られるよう、プロモータを改変したトランスポゾンシステムを構築した。今後は、このシステムを利用して培養始原生殖細胞へのGFP遺伝子の導入を行い、GFP遺伝子を発現するニワトリ個体の作出に取り組む予定である。これにより、ニワトリ個体を利用した有用物質の生産等、新たな分野に研究を進めることができると期待される。

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12件)

- ① Naito M, Harumi T and Kuwana T. Expression of GFP gene in cultured PGCs isolated from embryonic blood and incorporation into gonads of recipient embryos. *Journal of Poultry Science*, 査読有, 49(2):116-123, 2012.
DOI:10.2141/jpsa.011094
- ② Naito M, Harumi T and Kuwana T. Long term in vitro culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood and incorporation into germline of recipient embryo. *Journal of Poultry Science*, 査読有, 47(1):57-64, 2010.
DOI:10.2141/jpsa.009058
- ③ Naito M, Minematsu T, Harumi T and Kuwana T. Preferential migration of transferred primordial germ cells to left germinal ridge of recipient embryos in chickens. *Journal of Poultry Science*, 査読有, 46(1):40-45, 2009.
DOI:10.2141/jpsa.46.40
- ④ Minematsu T, Harumi T and Naito M. Quantitative genotyping by amplifying the polymorphic sequences of Pre-Melanosomal Protein (PMEL17) gene using real-time polymerase chain reaction in chickens. *British Poultry Science*, 査読有, 49(5):542-549, 2008.
DOI:10.1080/00071660802298310
- ⑤ Minematsu T, Harumi T and Naito M. Germ cell-specific expression of GFP gene induced by chicken vasa homologue (Cvh) promoter in early chicken embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 査読有, 75(10):1515-1522, 2008.
DOI:10.1002/mrd.20894

[学会発表] (計23件)

- ① 内藤 充・春海 隆・桑名 貴：GFP遺伝子を発現するニワトリ始原生殖細胞の作出とレシピエント胚生殖巣への導入、日本家禽学会 2011 年度秋季大会、十和田、2011 年 8 月 24-25 日
- ② 内藤 充・春海 隆・桑名 貴：*PMEL17* 遺伝子を利用したニワトリ品種識別と生殖系列キメラ判別への応用、日本家禽学会 2011 年度春季大会、厚木、2011 年 3 月 28 日
- ③ Naito M, Harumi T and Kuwana T (2010) In vitro culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood. XIIIth European Poultry Conference, Tours, France, 23-27 August, 2010.
- ④ Naito M. Basic studies for transgenic chickens. International Workshop on Preservation of Avian Primordial Germ Cells and Its Usage, Okinawa, Japan, 26-28 January, 2010.
- ⑤ 内藤 充：始原生殖細胞を利用した鳥類の生殖制御法、第 102 回日本繁殖生物学会大会、奈良、2009 年 9 月 9-12 日

[図書] (計5件)

- ① 内藤 充：発生工学 日本農学 80 年史 (分担) 養賢堂、33.2(3):238、2009 年 3 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 充 (NAITO MITSURU)

独立行政法人農業生物資源研究所・動物発生分化研究ユニット・上級研究員

研究者番号：70355733