

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06387

研究課題名(和文)ニワトリ生殖細胞の雌雄分化に関する研究

研究課題名(英文)Research on sexual differentiation of chicken germ cells

研究代表者

田上 貴寛 (Tagami, Takahiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員

研究者番号：60355104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：雄に移植された雌始原生殖細胞(PGCs)は雌特異的性染色体であるW染色体を有する運動能を有する精子は生産されるが、受精は困難であると考えられた。一方、雌に移植された雄PGCsは卵巣において正常卵胞へは分化できず、変性した白色の組織を形成していた。孵化前の異性胚中のPGCsにおける発現遺伝子を解析した結果、孵卵9日目および19日目の雄生殖巣内の雄PGCsにおいて高発現するA遺伝子は、雌胚に移植された雄PGCsにおいてはほとんど発現が無いことがわかった。A遺伝子が孵化前の生殖巣内生殖細胞で発現するためには、個体と生殖細胞の性が一致して雄であることが重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞の分化における細胞自身の性(性染色体)の影響についてはほとんど解っていない。本研究によるPGCsが同性または異性の生殖巣内で発現する遺伝子の網羅的解析は、生殖細胞自身の性が配偶子形成に与える影響を明らかにする上で学術的に重要な基礎的知見となる。また性の組み合わせにより発現が変化する遺伝子が配偶子形成に重要である場合、ゲノム編集技術等でその遺伝子発現量をコントロールすることにより、異性由来のPGCsを受精可能な配偶子に分化誘導できる可能性がある。家禽は産業形態により必要な性が異なるため、ニワトリの性をコントロールする技術への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Female primordial germ cells (PGCs) transplanted into males differentiate into motile spermatozoa with the W chromosome, a female-specific sex chromosome, however fertilization was considered difficult. On the other hand, male PGCs transplanted into females failed to differentiate into normal follicles in the ovary, forming degenerated white tissue. Analysis of genes expressed in PGCs in opposite-sex embryos revealed that the A gene, which was highly expressed in male PGCs in the male gonad on days 9 and 19 of incubation, was hardly expressed in male PGCs transplanted into female embryos. It was considered important that the sex of the individual and the germ cells match and be male in order for the A gene to be expressed in the gonadal germ cells before hatching.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ニワトリ 始原生殖細胞 性分化 配偶子分化

## 1. 研究開始当初の背景

性染色体により性決定される脊椎動物では、胚発生のある時期に性(性染色体型)に特徴的なホルモンが分泌された後、その影響を受けた細胞が雌雄それぞれに特徴的な形態・機能を持つ組織へと分化し、やがて雌雄に特徴的な形態・機能を持つ個体になっていく。その際、細胞の分化の方向性に細胞自身の性染色体型が影響する場合と、細胞自身の性に関係なく、細胞周囲の影響のみで分化する場合がある。鳥類はZおよびWの性染色体が存在し、雌ではヘテロのZW型、雄ではホモのZZ型を示す。ニワトリでは受精可能な配偶子形成のためには生殖巣と生殖細胞の性が一致している必要があり(Naito *et al.*, J. Reprod. Fertil. 117, 291-298. 1999)、異性の生殖巣の中に入ったPGCsは受精可能な配偶子になることは困難であることがわかっている(Tagami *et al.*, Mol. Reprod. Dev. 74, 68-75. 2007)。鳥類の配偶子形成における生殖細胞の性がどのような役割を持つのかについてはほとんど解っていない。

## 2. 研究の目的

生殖系列キメラニワトリの作出技術を利用して同性または異性の生殖細胞を持つニワトリを作出し、異性の生殖巣中で発生・増殖する生殖細胞における遺伝子発現を比較することで生殖細胞の性(染色体型)の配偶子形成に対する役割を明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. 同性または異性のPGCsを移植したキメラニワトリの作出

緑色蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子が組み込まれたニワトリから受精卵を採取し、2.5日間孵卵した胚の血管より採血を行った。採血液の一部からDNAを抽出し、PCRによりW染色体特異的配列の有無を指標として性別判定を行った。雌雄ごとに採血液から密度勾配遠心法を用いて始原生殖細胞(PGCs)を単離した。キメラニワトリを作出する際の宿主は野生型ニワトリを用いた。EGFP発現PGCsは2.5日孵卵した同性または異性の宿主胚へ移植した。移植胚は継続して孵卵し、孵化させた。この方法で孵化したニワトリは、同性または異性由来のPGCsを持つ生殖系列キメラニワトリとなっていると推定される。孵化後性成熟まで飼養し、移植したPGC由来の細胞の分化様式を解析すると共に一部は後代検定による移植生殖細胞の受精能を調べた。

### 2. 同性および異性生殖巣におけるPGCs由来生殖系列細胞の発現遺伝子解析

EGFP遺伝子が組み込まれた孵卵2.5日目のニワトリ胚から採取したPGCsを異性胚へ移植した。その後、孵卵9日目または19日目に胚から生殖巣を採取し、EGFP発現を指標としてセルソーターを用いて移植PGCs由来の細胞を採取した。孵卵2.5日胚、9日胚および19日胚から採取したPGCsについてはRNAを抽出し、同性または異性の生殖巣中における発現遺伝子についてトランスクリプトーム解析により網羅的に解析した。

また、1で作成した雄または雌PGCsを移植して得られた雄成鶏については、緑色蛍光を発現する領域の組織を採取してRNAを抽出し、トランスクリプトーム解析を行い、精巣内における雌PGCs由来の細胞と雄PGC由来の生殖細胞の発現遺伝子の違いを調査した(図1)。これらの結果を総合して、異性PGCからの生殖系列細胞分化様式および受精可能な配偶子形成を阻害している因子の選定を試みた

## 4. 研究成果

### 1. 同性または異性のPGCsを移植したキメラニワトリの作出と移植PGC由来生殖細胞の発生分化

EGFPを発現する雌PGCsをドナーとして雄胚へ移植し、異性生殖系列雄キメラニワトリ(以降、異性雄キメラ)を4羽作出した。また、EGFPを発現する雄PGCsを雄胚へ移植して同性生殖系列キメラニワトリ(以降、同性雄キメラ)を3羽作出した。これら同性および異性雄キメラは性成熟に達した後、野生型雌ニワトリとの交配試験を行った。その結果、同性雄キメラについては3羽全てからドナー雄PGCs由来のEGFPを発現する産子が得られた(EGFP発現産子率: 20%-96.4%)。一方、異性雄キメラの4羽からはドナー雌PGCs由来のEGFPを発現する産子は得られなかった。異性雄キメラの精液中には雌特異的性染色体であるW染色体を持つ細胞が存在することがPCRにより明らかとなっており、swim up法で採取した運動性を有する精子のDNAにもW染色体の存在が確認されたことから、雌PGCからは運動性を有する精子も生産されるが受精可能な配偶子へは分化困難である可能性が高いと考えられた。

EGFP発現雄PGCを雌胚へ移植することで5羽の異性雌キメラを作出した。雌PGCを雌胚へ移植することで2羽の同性雌キメラを作出した。野生型雄ニワトリとの交配試験を行った同性雌キメラ1羽からは移植したPGC由来の産子が得られたが(EGFP発現産子率: 10%)、2羽の雌キメ

ラからは産子が得られなかった。同性・異性雌キメラの卵巢を観察した結果、同性キメラにおいてはEGFPを発現する卵胞が観察されたが、異性キメラにおいては、EGFPを発現する卵胞は見られず、白色に変性した組織の形成が観察された(図2)。

## 2. 同性および異性生殖巣におけるPGCs由来生殖系細胞の発現遺伝子解析

### (1) ニワトリ胚の異性生殖巣におけるPGCs由来生殖系細胞の遺伝子発現

孵卵中の異性および同性のニワトリ胚生殖巣内で増殖したPGCs由来の生殖細胞において発現しているRNAの発現量をTPM(transcripts per million)を指標に比較した。孵卵9日目の雄生殖巣中における雄および雌由来のPGCs間で発現に差違のあるRNAは8828個、雌生殖巣中の同性・異性PGCs由来の生殖細胞間で発現に差違のあるRNAは7626個あるなど、ニワトリPGCは異性の生殖巣中において遺伝子発現に多くの変化が起こることが解った。受精可能な配偶子形成に影響する候補遺伝子の選定を試みた結果、孵卵9日目および19日目の雄生殖巣内の雄PGCsにおいて高発現するA遺伝子が、雌胚に移植された雄PGCsにおいてはほとんど発現しないことがわかった。一方、雄胚へ移植された雌PGCでもA遺伝子の発現量は低かった。この傾向は19日胚においても同様であった。A遺伝子が孵卵中のPGCsで発現するためには、個体とPGCsの性が一致して雄であることが重要であると考えられた(図3)。

### (2) ニワトリ精巣における雄または雌由来生殖系細胞の遺伝子発現

性成熟後の精巣内の雄PGCs由来の生殖細胞集団において発現している16個のタンパク質遺伝子が精巣内の雌PGC由来の細胞集団においては全く発現していなかった。一方、精巣内の雄PGC由来の生殖細胞集団においては全く発現していない42個のタンパク質遺伝子が雌PGC由来の細胞集団において発現していた。このうち雌特異的性染色体であるW染色体上の遺伝子は14個であった。なお、成熟雄の精巣内の雌PGCs由来の細胞集団におけるA遺伝子の発現量は、雄PGC由来生殖細胞の45%であった。

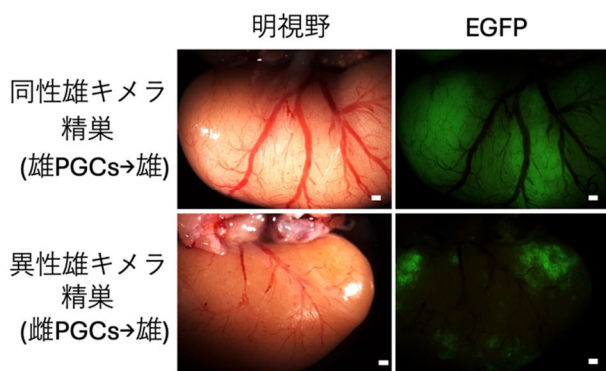


図1. EGFP 発現 PGC を移植したキメラニワトリ精巣におけるEGFPの発現 (Bar = 1mm)

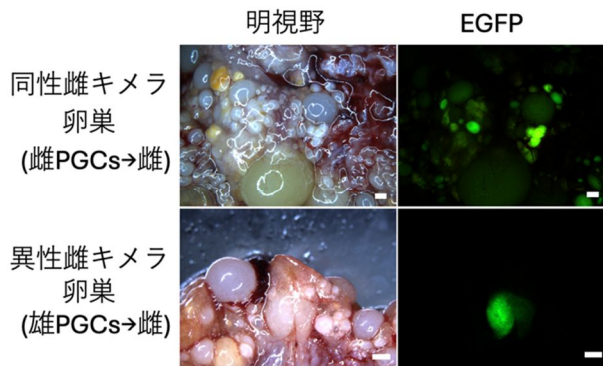


図2. EGFP 発現 PGC を移植したキメラニワトリ卵巢におけるEGFPの発現 (Bar = 1mm)

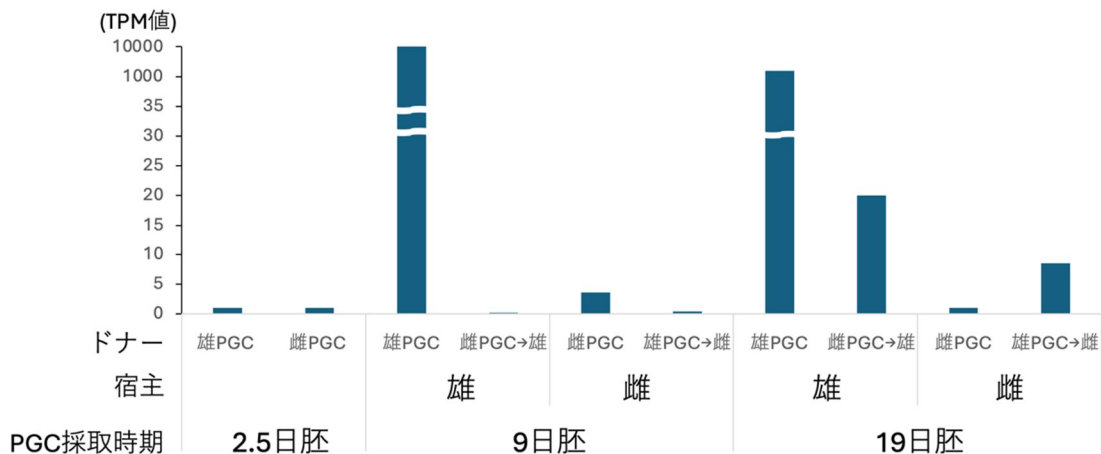


図3. 始原生殖細胞(PGC)の各発生段階におけるA遺伝子の発現量(TPM)

## 5. 考察

本研究により雄ニワトリへ移植した雌 PGC からは「運動性を持つ」精子が分化することが明らかとなった。しかしながら W 染色体を持つ精子のみならず、Z 染色体を持つ精子も受精能は確認されなかった。過去の研究から、W 染色体を持つ精子の生産性は非常に低いことが明らかになっているため、受精能の有無について確実に判断するためにはさらに多数の後代検定を必要とする。精巣内では雄 PGC 由来の細胞集団と雌 PGC 由来の細胞集団で遺伝子発現が大きく異なっており、W 染色体由来の遺伝子も 14 個発現していた。この中には発現量の高い TPM 値 10 以上の遺伝子も 2 個あることから、W 染色体由来のこれらの遺伝子が受精能の獲得を阻害している可能性も考えられる。今後これらの遺伝子機能についても明らかにする必要がある。

成鶏の卵巣においては、雄 PGCs 由来の細胞は卵胞を形成せずに野生型では観察されない白色の組織を形成していた。これらがどのような経緯で形成されるのか明らかにするため、今後この組織について組織学的および分子生物学的に調査する予定である。その結果は、卵子形成に必要な因子の解明に資する可能性がある。

A 遺伝子が欠失した PGCs を宿主胚に移植して発生分化様式を解析することにより、配偶子形成における A 遺伝子の機能を明らかにできることが期待される。そのため、今後ゲノム編集により A 遺伝子が欠失した PGCs を作成し、配偶子形成における A 遺伝子の機能を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tagami Takahiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Chicken genome editing technology and its application to the food industry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi	6. 最初と最後の頁 493 ~ 498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/nskkk.69.493	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 Nakajima Yuki, Tagami Takahiro, Tajima Atsushi	4. 巻 60
2. 論文標題 Gonadal Germ Cell Migration and Proliferation after Transfer in Developing Chicken Embryos	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.2023028	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神田亜樹奈、中島友紀、田上貴寛
2. 発表標題 窓開け卵の作製条件が孵化率に与える影響
3. 学会等名 日本家禽学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田上貴寛
2. 発表標題 ニワトリを守り、活用する ~ 生殖細胞とゲノム編集による家禽の次世代活用戦略 ~
3. 学会等名 AREC 第244回リレー講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田上 貴寛, 菊地 愛, 中島 友紀
2. 発表標題 赤色蛍光を発現するニワトリの作出
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 友紀, 田上 貴寛
2. 発表標題 ニワトリ始原生殖細胞における電気穿孔法を用いた遺伝子導入の検討
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 立川雅司、畑田出穂、藤井涉 田上貴寛	4. 発行年 2023年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 315
3. 書名 ゲノム編集技術～実験上のポイント/産業利用に向けた研究開発動向と安全性周知	

〔出願〕 計7件

産業財産権の名称 始原生殖細胞の保存方法	発明者 中島友紀、田上貴寛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-069033	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 雌雄判定装置及び雌雄判定方法	発明者 田上貴寛、上出真治、芝修、小澤佳子、中矢雄志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-163035	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 始原生殖細胞の保存方法	発明者 中島友紀、田上貴寛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-069033	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 近赤外光を用いる孵化前における鶏卵の雌雄判定方法及び雌雄判定装置	発明者 田島清、田上貴寛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-121201	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 雌雄判定装置及び雌雄判定方法	発明者 上出真治、芝修、小澤佳子、中矢雄志、田上貴寛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-048231	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 雌雄判定サービス提供システム及び雌雄判定サービス提供方法	発明者 上出真治、芝修、小澤佳子、中矢雄志、田上貴寛、田島清、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、願2022-048237	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 アニマルウェルフェア管理支援システム及びアニマルウェルフェア管理支援方法	発明者 上出真治、芝修、小澤佳子、中矢雄志、田上貴寛、窪田宜之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-048242	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------