

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 24 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658093

研究課題名（和文）代理親出産を利用した希少鳥類増殖技術の開発

研究課題名（英文）Regeneration of rare birds through germline chimera.

研究代表者

鏡味 裕（KAGAMI HIROSHI）

信州大学・農学部・教授

研究者番号：80308303

研究成果の概要（和文）：始原生殖細胞を用いた鳥類遺伝資源の永久的な保存戦略の構築を試みた。天然記念物である岐阜地鶏の始原生殖細胞をドナーとし、不妊化した代理親用のニワトリ（白色レグホン）のレシピエント初期胚へ移植した。こうして生殖キメラを作出し、宿主自身の精子・卵を全く生産せずに異種由来の精子・卵のみを生産する完全な生殖細胞系列キメラ個体を効率的に作出することが可能となった。また生殖系列キメラを介した岐阜地鶏の再生が可能となった。

研究成果の概要（英文）：PGCs of Gifujidori fowl were collected from the blood of early embryos for transfer to recipients. The embryos were cultured until hatching; fertility tests indicated that they had normal reproductive abilities. White Leghorn were used as recipients for chimera production following blood removal. The PGCs were microinjected into the recipients obtaining offspring from Gifujidori. In conclusion, PGCs from the embryos was combined with the conservation of live animals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	0	1,100,000
2010 年度	1,100,000	0	1,100,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：鳥類発生工学

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：希少鳥類、生殖系列キメラ、代理親

1. 研究開始当初の背景

近年、地球環境の悪化に伴い生物多様性の保全が脅かされている。地球上の生物の多様性は、ゲノムの多様性に由来するもので、特定の生物種が絶滅してしまえば、その生物種を規定する貴重なゲノム配列も消滅してしまう。このため、絶滅危惧生物の増殖・保全は一刻の猶予も許されない極めて重要な課題である。家禽においても絶滅の危機に瀕する品種が多数存在し、効率的な繁殖・保全が切望されている。家禽の繁殖において精子の凍結保存

技術が確立されているのは、精液の採取が可能な一部の品種に限られている。家禽の胚は、巨大な卵黄上で発生し、また、卵殻によって外部と完全に遮断されているため、凍結保存法は全く樹立されいない。従って、雌由来の遺伝資源の長期保存は現時点では不可能である。こうした現状に鑑み、鳥類遺伝資源の安全かつ半永久的な保存戦略の構築が切望されている。また近年、世界中で懸念されている鳥インフルエンザ等のウイルス感染症の伝播を防止するためには、家禽生産の現

場で一般に行われている成熟個体の精子および卵の受精による後代生産、に換わる細胞レベルでの家禽繁殖方法が必要である。これらの背景に鑑み、本課題においては、生殖細胞キメラを介して効率的に家禽後代を作出することを探求した。

2. 研究の目的

ニワトリなどの家禽において、効率的な繁殖方法や保全方法の開発は極めて重要である。すなわち、これらの方法の開発は希少鳥類の再生や家禽生産の効率化に直結する。そこで、ニワトリにおいて、レシピエント胚へと移植したドナー由来の始原生殖細胞がキメラ個体の生殖腺中で、受精能を持つ機能的な精子および卵に分化することに着目した。すなわち、精子および卵に代わる細胞として、始原生殖細胞を用いた後代の生産を試みる。希少性の高い鳥類から採取した始原生殖細胞をドナーとして、不妊化した代理親用のニワトリ（白色レグホン）のレシピエント初期胚へ移植する。これらのドナーおよびレシピエントを用いて生殖キメラを作出する。これにより、宿主自身の精子・卵を全く生産せずに異種由来の精子・卵のみを生産する完全な生殖細胞系キメラ個体を効率的に作出することを目的とした。この生殖キメラの作出において、天然記念物である岐阜地鶏に注目し、その再生を試みる。これらの研究を通じて得られた知見や新たに開発した実験手法を、将来的な希少鳥類の再生や家禽育種の効率化に活用する。

3. 研究の方法

ニワトリ胚発生に伴う PGCs の発生遺伝学的解析を行った。実体顕微鏡下で、ニワトリ（白色レグホン）の受精卵内で発生する胚を観察し、胚の発生段階を厳密に同定した。この発生中の胚の周囲に付着する卵黄膜、卵黄、卵白、血液、等を PBS 溶液を用いて完全に洗浄・除去した。こうして胚体のみを眼科手術用のハサミを用いて切除し、その後の解析用のサンプルとした。これらの胚を用いた免疫組織化学的手法により、特異的に免疫染色される細胞を検出した。免疫染色には、ニワトリ特異的抗 VASA 抗体である CVH を使用した。これにより、ニワトリの PGCs を特異的に検出する実験系を開発を試みた。さらに本解析の活用によって、PGCs の排卵直後における移動様式の究明を試みた。次に、レシピエント胚をブスルファン処理することによって、レシピエント生殖腺内の PGCs の不活化を試みた。ブスルファンは発生中の胚の卵黄内に注入した。こうした処理胚を操作実験用孵卵器に入れて培養した。これらの胚の腹腔を切開し、消化器系器官および循環器系器官を取り除いた。腹腔内に存在する生殖腺を確認し、採

取した。前述と同様の免疫組織化学的手法により処理胚の生殖腺中の PGCs の増減を検定した。岐阜地鶏の受精卵を孵卵し、胚の循環血を採取した。こうして得られた血液サンプルをナイコデント溶液に混合した。密度勾配遠心によって、血球細胞層と PGCs 細胞層に分離した。顕微鏡下で分離した細胞層を確認し、PGCs のみを採取した。ニワトリ（白色レグホン）の受精卵の卵黄中にブスルファンを注入しを孵卵した。この胚をステージ 15 前後まで発生させレシピエントとした。前述の岐阜地鶏の PGCs をレシピエント胚の血管内に移植した。このキメラ胚を実験用孵卵器で培養し、キメラ雛を孵化させた。ふこれらのキメラ雛が性成熟に達するまで飼育した。これらの個体が性成熟した後に、雌雄のキメラ同士を交配した。これによりドナー PGCs 由来の後代検定を行った。これらの実験によって生殖キメラを介して岐阜地鶏を再生できるか否かを検定した。更に PGCs の凍結保存法の開発を試みた。前述のナイコデント法によりニワトリ循環血中の PGCs を採取し、液体窒素中で急速凍結した。これらの凍結 PGCs を保存し、必要に応じ融解した。この凍結・融解 PGCs をドナー細胞とし、レシピエント胚に移植しキメラを作出した。作出したキメラの後代検定によって凍結 PGCs の利用の可否を検定した。

4. 研究成果

ニワトリの初期胚における PGCs の発生分化機構を詳細に解析する免疫組織化学的解析法を確立した。免疫染色にはニワトリ CVH を抗体として利用した。この免疫組織化学的解析法によって PGCs を極めて高い精度で検出することが可能となった。本法を用いた解析結果から、ニワトリの PGC は排卵直後の胚盤葉の明域中央部に大部分が局在することを明らかにした。また、ニワトリ胚盤葉期以後の胚発生に伴い、PGCs は循環血に乗って胚体外周縁部へと移動することを明らかにした。さらに、胚の発生を進展するにつれ、PGCs は胚体内および胚体外を廻ることを確認した。これらの循環を終えた PGCs は生殖腺へ移動することを明らかにした。生殖腺へ移住した PGCs は、雄においては精巣において精子形成を、また、雌においては卵巣において卵子形成を進展することも確認した。レシピエント受精卵の卵黄へのブスルファン注入によって、レシピエント生殖腺内の PGCs をほぼ完全に不活化することに成功した。また、これらの処理胚においては、内因性の PGCs は不活化されるものの、正常な胚発生は継続され、雛として産出可能であることが明らかとなった。また、ブスルファン処理を行った胚（レシピエント）にドナーの PGCs を移植したところ、正常なキメラ胚の発生も確認された。

これらのキメラ胚を、事前に準備した他の卵殻に移入し、体外培養法によって培養を継続した。孵化したキメラを性成熟まで飼養し、生殖系列キメラの作出を試みた。これらのキメラが性成熟に達した後に後代検定を行った。この結果、ドナー配偶子由来の後代を復元することに成功した。またドナー由来後代の平均作出率も90%以上であり、これまでの生殖キメラ作出率よりも格段に高いことが確認された。さらに、循環血中からナイコデンツ法によって採取した直後の、フレッシュなPGCsを液体窒素中で急速に凍結保存する研究を行った。これらの凍結PGCsを融解し、レシピエント胚に移植し生殖系列キメラの作出に成功した。また、天然記念物である岐阜地鶏のPGCsを用いて、白色レグホンの胚に移植し、生殖系列キメラを作出した。作出されたキメラを性成熟に達するまで飼養した。これらの雌雄生殖系列キメラ同士を交配して生殖キメラの後代検定を試みた。これらの交配から、岐阜地鶏の個体復元に成功した。以上の結果から、異品種由来の精子・卵を生産する生殖細胞系列キメラニワトリの個体を効率的に作出することに成功した。これまでの家禽育種においては、主に種鶏を飼養維持し、成熟後に精子と卵子を受精させる方法によって後代を生産してきた。本研究の結果は、PGCsの操作によってニワトリ後代を効率的に生産し得ることを明らかにした。

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4件)

- ① Nakamura, Y., Usui, F., Miyahara, D., Mori, T., Watanabe, H., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Tagami, T. (2011) Viability and Functionality of Primordial Germ Cells after Freeze-thaw in Chickens. *Journal of Poultry Science*, 48: 57-63. 査読有
- ② Nakamura, Y., Usui, F., Miyahara, D., Mori, F., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Tagami, T. (2010) Efficient System for Preservation and Regeneration of Genetic Resources in Chicken: Concurrent Store of Primordial Germ Cells and Live Animals from early Embryos of A Rare Indigenous Fowl (Gifujidoro). *Reproduction, Fertility and Development*, 22: 1237-1344. 査読有
- ③ Nakamura, Y., Usui, F., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Tagami, T. (2010) Germline Replacement by Transfer of Primordial Germ Cells into Partially Sterilized Embryos in the Chicken. *Biology of Reproduction*, 83: 130-137. 査読有
- ④ Usui, F., Nakamura, Y., Yamamoto, Y.,

Tatsumi, K., Tominari, K., Ono, T. and Kagami, H. (2010) A Novel Concentration System of Chicken Stem Cells by Bone Marrow Side Population Cells. *Journal of Poultry Science*, 47: 53-56. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

- ① Watanabe, H., Usui, F., Miyahara, D., Mori, T., Ono, T., and Kagami, H. Isolation of Adipose-tissue Derived Stem Cells and the Application for Blood Vessel Regeneration in the Chicken. International Symposium on Animal Biotechnology, January 31, 2012, Minamiminowa
- ② Miyahara, D., Nakamura, Y., Mori, T., Ono, T., Nirasawa, K., IOishi, I., Tagami, T., and Kagami, H. Long Term Culture and Characterization of Chicken Primordial Germ Cells. International Symposium on Animal Biotechnology, January 31, 2012, Minamiminowa
- ③ Fujiwara, A., Mizutani, M., Nunooya, T., Hiramatsu, K., Ono, T., and Kagami, H. Avian Stem Cells for Regeneration of Muscular Dystrophy Chickens by Means of Germline Chimeras. International Symposium on Animal Biotechnology, January 31, 2012, Minamiminowa
- ④ Kagami, H., Usui, F., Nakamura, Y., Kashiwagi, M., Yamamoto, Y., Ono, T., Tagami, T., Nirasawa, K., Matsubara, Y., and Petite, J. Avian Stem Cells and the Application for Biotechnology. Japanese Society of Developmental Biologist, June 23, 2010, Kyoto
- ⑤ 宮原大地、今井一樹、森貴史、渡邊晴陽、坂田絢子、坪井友子、都築明香里、中村隼明、臼井文武、山本耕裕、田上貴寛、葦澤圭二郎、松原悠子、川口耕一郎、藤井博、小野珠乙、鏡味裕。ニワトリ幹細胞・始原生殖細胞の遺伝的特徴解析と分化制御の試み。日本分子生物学会第10回春季シンポジウム、2010年6月7日、松島
- ⑥ ニワトリ始原生殖細胞の利用：移動様式の解明と凍結保存・移植・除去技術の確立。中村隼明、宮原大地、森貴史、今井一樹、渡邊晴陽、小野珠乙、武田久美子、葦澤圭二郎、鏡味裕、田上貴寛。日本分子生物学会第10回春季シンポジウム、2010年6月7日、松島
- ⑦ 鏡味裕、柏木まや、大屋智子、臼井文武、中村隼明、山本耕裕、小野珠乙。始原生殖細胞の新規採取法の開発と生殖細胞キメラ作出への活用。日本家禽学会春季大会、2010年3月30日、東京
- ⑧ 鏡味裕、臼井文武、中村隼明、山本耕裕、大友朝子、柏木まや、田上貴寛、葦澤圭二郎、松原悠子、小野珠乙。ニワトリ幹細胞及び始原生殖細胞の発生に伴う遺伝子発現の解析

と分化制御への活用の試み. 日本畜産学会大会, 2009年9月28日, 那覇

⑨ 柏木まや、中村隼明、山本耕裕、臼井文武、川越雄太、松原和衛、小野珠乙、鏡味裕. ニワトリ幹細胞及び始原生殖細胞の発生に伴う遺伝子発現の解析と分化制御への活用の試み. 日本畜産学会大会, 2009年9月28日, 那覇

[図書] (計1件)

① 鏡味裕. (2011)鳥類の受精、発生、胚操作. 新動物生殖学 (佐藤英明編著)、朝倉書店 (ISBN978-4-254-45027-9) pp. 151-160.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

鏡味 裕 (KAGAMI HIROSHI)

信州大学・農学部・教授

研究者番号：80308303