

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：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580325

研究課題名（和文）生殖系列細胞を可視化させる遺伝子導入ニワトリの作出に関する研究

研究課題名（英文）Generation of transgenic chicken for visualization of germ cells

研究代表者

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・畜産草地研究所・家畜育種繁殖研究領域・主任研究員

研究者番号：60355104

研究成果の概要（和文）：ニワトリ始原生殖細胞をはじめ生殖系列細胞を可視化するため、ニワトリ Vasa ホモログ遺伝子のプロモータ領域を蛍光タンパク質遺伝子に接続した DNA 配列を作製し、この配列を組み込んだ遺伝子導入ニワトリを作出した。しかしながら、得られた遺伝子導入ニワトリの生殖細胞では、蛍光タンパク質の発現は観察されなかった。

研究成果の概要（英文）：Visualization of chicken germ cells is useful to generate for transgenic chickens and critical to understanding the differentiation and proliferation of germ cells. As a first step, chicken vasa homologue (CVH) promoter sequence was searched. We tried to produce the transgenic chicken line in which the germline cells were visualized by CVH promoter-driven YFP or GFP expression. However, no germ cells in gonads of the transgenic chickens expressed the fluorescence signal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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・応用動物科学

キーワード：ニワトリ 始原生殖細胞 トランスジェニックニワトリ Vasa ホモログタンパク質 (CVH) レンチウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子導入ニワトリは、産業界および学界において有用なツールになることが期待されている。しかしながらその生産効率は極めて低い。それは生殖細胞の染色体へ導入遺伝子が組み込まれる確率の低いことが原因の一つとして挙げられていた。そのため、ニワトリ生殖細胞へ効率的に遺伝子を導入できる方法の開発が望まれていた。

(2) ニワトリでは、始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells:PGCs) を宿主胚へ移植することに

よりキメラニワトリを作製することが可能となっている。PGCs へ確実に遺伝子を導入することが出来ればキメラニワトリの作製技術を用いることにより、遺伝子導入ニワトリの作出効率は飛躍的に向上すると考えられた。しかしながら PGCs の単離には長時間かかる上、煩雑な操作が必要であった。

2. 研究の目的

PGCs を明確に他の細胞と識別することが可能になれば、セルソーター等によって、簡便かつ短時間に大量の PGCs を採取する事が

可能となる。本研究では、PGCs を可視化するため、ニワトリ Vasa ホモログ遺伝子(CVH)のプロモータ領域を蛍光タンパク質遺伝子に接続した組換え配列を導入したニワトリを作製することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ Vasa ホモログ遺伝子プロモータ領域の探索と発現ベクターの作製:

ニワトリ Vasa ホモログ(CVH) 遺伝子のプロモータ領域の探索を目的として、ニワトリ血球より抽出した DNA を用い、CVH 遺伝子 5' 末端を基点に、上流に向かってゲノムウォーキング法による配列決定を行った。

蛍光タンパク質遺伝子(GFP 遺伝子または Venus 遺伝子)を含むレンチウイルス作製用ベクタープラスミドのプロモータ部位を CVH の上流の配列と置換し、遺伝子導入用ベクター(CVHp-Venus と略す)を作製した。また、CVHp-Venus より転写される mRNA の安定化を目的として、PCR 法によりニワトリ精巣由来 cDNA より CVH 遺伝子の 3' 非翻訳領域(3' -UTR)を増幅し、CVHp-Venus に連結したベクタープラスミド(CVHp-Venus-3' UTR)を作製した。

CVHp-Venus 配列がニワトリ胚で機能し、PGCs における蛍光タンパク質の発現が正常に行われることを確認するため、リポフェクション法を用いて、ベクタープラスミドを孵卵 2.5 日目胚の血管中へ注入した。その後孵卵を継続し、孵卵 6 日目の胚の生殖巣における蛍光発現細胞の有無を観察した。

(2) レンチウイルスベクターの作製とニワトリへの遺伝子導入操作: ①において作製したベクタープラスミドと共に、ウイルスの増殖能力を司る配列を除去したウイルスパッケージングプラスミドおよびエンベローププラスミドを、ウイルス産生細胞へ形質転換することによって、レンチウイルスベクターを作製した。

レンチウイルスベクターをニワトリ 2.5 日目胚へ注入することにより、遺伝子組換え操作ニワトリ(第 0 世代:G0)を作出した。性成熟に達した雄については精液における導入 DNA 配列の有無を PCR 法により確認した。

(3) CVHp-Venus 配列導入ニワトリの作出と発現解析: 全身の細胞の染色体に CVHp-Venus 配列が組み込まれた遺伝子導入ニワトリ(第 1 世代:G1)を作出するため、精液から抽出した DNA に導入配列の存在が確認された G0 雄と非遺伝子導入雌ニワトリの交配試験を行った。さらにその後代(G2)につい

ては初期胚生殖巣を蛍光観察し、生殖細胞における蛍光タンパク質の発現の有無を観察した。

(4) X線照射による胚からのPGCの除去法の開発: 遺伝子導入した PGC から効率的に後代を得るためには、キメラニワトリ作製前にあらかじめ宿主胚から内在性 PGC を除去しておくことが望ましい。そのため、ニワトリ胚からの PGC 除去法の開発を検討した。

孵卵 52 時間目のニワトリ卵に対し、0.12Gy/min の照射速度で、3Gy、6Gy、9Gy の X 線照射を行った後、孵卵を継続して孵化率を調査した。また、X 線照射後、孵卵 5.5 日目胚の生殖巣を抗 CVH 抗体によるホルマウント免疫染色を行い、PGC の減少率を非照射胚と比較することにより評価した。さらに、3Gy 照射群に対して 100 個の PGC を移植してキメラニワトリを作製して孵化させ、性成熟後に交配試験を行い、移植 PGC 由来の後代の割合を解析した。

4. 研究成果

(1) CVH 遺伝子の上流 2.0kbp の配列および CVH 遺伝子下流 0.8kb を決定した。CVH 遺伝子の上流域を組み込んだレンチウイルス用のベクタープラスミド、さらに CVH 遺伝子下流を組み込んだベクタープラスミドをニワトリ胚へ導入し、孵卵 6 日目胚の生殖巣を観察した結果、CVHp-Venus を導入した胚では全てにおいて、また、CVHp-Venus -3' UTR については 72.7%の胚において生殖巣およびその周辺に蛍光を発する細胞が観察された(図 1)。



図 1. CVHp-Venus プラスミドを導入した 6 日目胚の生殖巣(矢印の領域に蛍光を発する細胞が観察される)

(2) CVHp-Venus 配列が組み込まれたレンチウイルスベクターを 5 個の孵卵 2.5 日目ニワトリ胚へ注入し、遺伝子導入操作を行った。これらの胚は操作後、孵卵を継続した結果、全てが孵化した(G0: 雄 3 羽、雌 2 羽)。孵化した 5 羽全てにおいて、導入遺伝子の存在が確認された。さらに、性成熟に達した雄の G0 ニワトリ 3 羽のうち 2 羽の精液由来 DNA から導入遺伝子が確認された。

(3) 精子のゲノムに CVHp-Venus が組み込まれたと推定される 2 羽の雄の遺伝子導入操作ニワトリについて非遺伝子導入雌ニワトリ

と交配させ後代を得た(G1)。得られた後代について導入遺伝子の有無をPCRにより検出した結果、全身の細胞の染色体に CVHp-Venus が組み込まれた遺伝子導入ニワトリが1羽得られた(ID:50) (表1)。

表1. CVHp-Venus導入操作鶏(G0)の交配結果

ID	性	後代産子数	CVHp-Venus導入産子 (G1) (%)
4	雄	39	1 (2.6)
5	雄	58	0 (0.0)
合計		97	1 (1.0)

さらに、G1(ID:50)についても非遺伝子導入雄との交配を行い、G2を生産した(表2)。

表2. CVHp-Venus導入鶏(G1)の交配結果

ID	性	後代産子数	CVHp-Venus導入産子 (G2) (%)
50	雌	17	6 (35.3)

G2については一部の孵化前の胚から生殖巣を採取して、生殖細胞での蛍光の発現の有無を観察した。しかしながら、導入したDNA配列が組み込まれていることが確認された胚の生殖巣を観察したが、いずれも蛍光を発する細胞は観察されなかった(図2)。



図2. CVHp-Venus が組み込まれた遺伝子導入ニワトリ胚(G2)
(右:暗視野、左:明視野)

現在、CVHp-Venus導入ニワトリにおいてVenus遺伝子の転写抑制が起こっているのか、あるいは転写はされているが翻訳抑制が起こっているのかを調査している。今後はその解析結果を踏まえて、CVH遺伝子制御部位の再調査あるいは発現ベクターの再構築を行い、生殖系細胞の可視化を可能にする遺伝子導入ニワトリの作出を試みる。

(4) X線照射後の孵化率は、3Gy照射群では非照射群と比較して同等(40.0% 対 69.6%)であったのに対し、6Gy照射群では28.6%と有意に減少した($P < 0.05$)。9Gy照射群からは孵化した個体は得られなかった。

X線照射後のPGC数は、3Gy、6Gy、9Gy照射群それぞれ非照射群と比較して、21.0%、

9.6% および 4.6%にまで減少していた。3Gy照射群を宿主胚としてPGCsを移植して作製したキメラニワトリの交配試験の結果、移植PGC由来の後代の割合は27.5%となり、非照射群(5.6%)と比較して有意に増加した。

これらの結果から、孵卵52時間のニワトリ胚に対するX線照射は内在性のPGCを減少させるために有効であり、3GyのX線照射胚を宿主としてキメラニワトリを作製することにより、移植PGCs由来の後代の割合を有意に増加させることが明らかとなった。

この技術は、PGCsを介した遺伝子導入ニワトリ作出の効率化に有用な技術となる。

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5件)

① Nakamura, Y., Kagami, H., Tagami, T. (他6名, 9番目) X-irradiation removes endogenous primordial germ cells (PGCs) and increases germline transmission of donor PGCs in chimeric chickens. *Journal of Reproduction and Development* 査読有, 58巻, 2012, 432-437

② Tagami, T., Nakamura, Y., (1番目) Improving rates of germline transmission in chimeric chickens using busulfan solubilised sustained-release emulsion, *Avian Biology Research* 査読有, 4巻, 2011, 74-77

③ Nakamura, Y., Kagami, H., Tagami, T. (他7名, 10番目) Viability and Functionality of Primordial Germ Cells after Freeze-thaw in Chickens *The Journal of Poultry Science* 査読有, 48巻, 2011, 57-63

④ Nakamura, Y., Kagami, H., Tagami, T. (他4名, 7番目) Germline Replacement by Transfer of Primordial Germ Cells into Partially Sterilized Embryos in the Chicken. *Biology of Reproduction* 査読有, 83巻, 2010, 130-137

⑤ Nakamura, Y., Kagami, H., Tagami, T. (他6名, 9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* 査読有, 22巻, 2010, 1237-1246

[学会発表] (計7件)

① 田上貴寛、生殖細胞の可視化を目的とし

た遺伝子導入ニワトリ作出の試み 日本家禽学会2013年度春季大会 50巻(春季大会)、2013年3月29日、安田女子大学、広島県

② 宮原大地、田上貴寛、長期培養したニワトリ始原生殖細胞の機能解析、日本家禽学会2013年度春季大会 50巻(春季大会)、2013年3月29日、安田女子大学、広島県

③ 田上貴寛、Sex differentiation of Chicken Germ Cells、7th International Chick Meeting、2012年11月17日、名古屋大学、愛知県

④ 宮原大地、田上貴寛、ニワトリ始原生殖細胞の培養と生殖系列カメラ作出への応用、北信越畜産学会報<第61回大会講演要旨集>、2012年11月8日、新潟大学、新潟県

⑤ 田上貴寛、Improving rates of germline transmission. International Symposium on Conservation and Propagation of Endangered Species of Birds、2011年2月11日、アブダビ、アラブ首長国連邦

⑥ 中村隼明、田上貴寛、凍結融解操作がニワトリ始原生殖細胞の生存性ならびに機能性へ及ぼす影響、日本家禽学会2010年秋季大会 2010年9月15日、信州大学、長野県

⑦ 中村隼明、田上貴寛、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、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、宮城県

〔図書〕(計1件)

田上貴寛、農林統計出版、農研機構発 農業新技術シリーズ(第2巻) 家畜の生産性向上と安全を守る新技術 [生殖細胞を効率的に入れ替えるためのニワトリ始原生殖細胞除去技術] 2011、総ページ数208、118-121

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://nilgs.naro.affrc.go.jp/press/2010/1210/idenshigenhozon_index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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 畜産草地研究所・家畜育種繁殖研究領域・主任研究員

研究者番号：60355104

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

小川 晴子 (OGAWA HARUKO)

帯広畜産大学・動物・食品衛生研究センター・准教授

研究者番号：10400079

(4) 研究協力者

大石 勲 (OISHI ISAO)

独立行政法人産業総合技術研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：50314472

鏡味 裕 (KAGAMI HIROSHI)

信州大学・農学部・食料生産科学科・教授

研究者番号：80308303