

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450382

研究課題名(和文) 始原生殖細胞の移植による生殖腺系列キメラ鶏の性

研究課題名(英文) Gonadal Development in Germline Chimeric Chicken Embryos Transferred by Primordial Germ Cells

研究代表者

古田 洋樹 (FURUTA, Hiroki)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：30366794

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)：ニワトリにおいて始原生殖細胞(primordial germ cells:PGCs)の移植により生殖腺系列キメラ鶏が作出されている。ドナー胚とレシビエント胚が異性の場合(異性胚間移植)にレシビエント胚の生殖腺に卵精巣様の異常が生じる。そこで、白色レグホンジュリア系を用いて、PGCsの異性胚間移植を行い、雄特異的遺伝子SOX9、雌特異的遺伝子FOXL2遺伝子の発現量について検討を行った。PGCsの移植による生殖腺系列キメラ鶏の10日目胚で雄のPGCsを雌に移植した生殖腺系列キメラ鶏胚でのFOXL2発現量は減少傾向にあったことからPGCsは生殖腺の発達に関与しているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Primordial germ cells (PGCs) are ancestors of germ cells. Chicken PGCs originating from the epiblast, subsequently appear in the hypoblast of the germinal crescent region, circulate in the vascular system of the embryos, and finally migrate into the germinal ridge of the embryo. PGCs are transferred between embryonic blood vessels to produce germline chimeric chickens. Although the gonads of embryos in which PGCs were transferred from the donor to recipient embryo of the same sex (homosexually) developed normally at 17 days after incubation, morphologically abnormal gonads were obtained when PGCs were transferred from the donor to recipient of the antagonistic sex (heterosexually). SOX9 and FOXL2 gene expression were investigated by q-PCR. The expression of genes showed no significant difference in heterosexually transferred PGCs. However, FOXL2 gene expression tended to decrease. These results suggest that PGCs may influence gonadal development in early stage embryos.

研究分野：遺伝育種

キーワード：ニワトリ 始原生殖細胞 生殖腺系列キメラ

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の胚操作技術では単細胞時期の受精卵を容易に扱える。しかし、鳥類は卵生であり大量の卵黄があり胚操作には適さない。そこで、子孫へ遺伝子を伝達する卵子や精子の前駆細胞である始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells : PGCs) が鳥類の胚操作に着目されている。PGCs は精子・卵子を形成する過程において減数分裂を行ない、染色体の組み換えを起こすことが知られており、これが生物の多様性を維持するための重要な要因の一つとなっている。親と同一の遺伝子情報を持つクローン動物とは異なり、種特有の形質を保ちつつ、親とは違った遺伝子配列をもつ子孫を産出する利点もある。稀少鳥類あるいは産卵率の低い鳥類の遺伝子保存という観点から、稀少種である PGCs を移植した生殖腺系列キメラ鶏からドナー由来の雛を得ることに成功している。PGCs の移植による生殖腺系列キメラ鶏において、ドナーの性とレシピエントの性が異なった胚間移植した場合に生殖腺発達に影響することを明らかになっている。

2. 研究の目的

PGCs の移植により生殖腺系列キメラ鶏からドナー由来の産出に成功した。しかし、雄 PGCs が卵巢で、雌 PGCs が精巣で正常に分化するのか。この分野での基礎でありながら重要な知見が欠落している。そこで、ドナー PGCs とレシピエント胚と異なった性での移植を行ったところ、孵化した雛に卵精巣様の生殖腺が現れることが確認されている。鳥類の性分化は解明されておらず、PGCs は性分化に影響しないと考えられてきた。しかし、キメラ鶏を用いて体細胞の働きが性分化を誘導すると報告された。本研究は異性胚間移植で生じる異常生殖腺、卵精巣現象を分

子遺伝学的に解明し、PGCs と生殖腺分化の関係を明らかにするものである。

3. 研究の方法

PGCs の移植による生殖腺系列キメラ鶏作出

PGCs を発生初期 Stage12-15 の段階の胚に移植し、また、雌 PGCs を雄胚に移植する、あるいはその逆の組み合わせの異性胚間移植を行ない、生殖腺系列キメラ鶏を作出する。また、烏骨鶏の PGCs を PKH26 により染色した後白色レグホンに移植し、白色レグホンの生殖腺への烏骨鶏 PGCs の定着を観察した。

PGCs の異性胚間移植胚の生殖腺での遺伝子発現の相違

異性胚間移植を行った場合、生殖腺の発達に卵精巣様の異常が観察されている。PGCs と生殖腺との関連を調べるため、異性胚間移植をした胚の生殖腺でのサブトラクション法により遺伝子発現を比較検討する。また、DMRT1 は精巣分化に主要な働きをもつ SOX9 (SRY-box 9) と雌特異的遺伝子 CYP19 は FOXL2 の転写活性を上昇させることから SOX9 と FOXL2 の発現量を RT-PCR により定量した。PGCs の定着による生殖腺の発達や性分化に対して遺伝子発現の特異性や遺伝子発現を明らかにする。

4. 研究成果

PGCs の移植による生殖腺系列キメラ鶏の発生 10 日目までの生存率は全体の操作胚の 89%であった。ドナー胚とレシピエント胚の性であった同性間移植 (♂→♂、♀→♀) とドナー胚とレシピエント胚が異なる異性間移植 (♂→♀、♀→♂) において生存率に有意な差は認められなかった (P<0.05) (表 1)。

表1. PGCs移植による生殖腺系列キメラ鶏の10日齢胚における生存率

ドナー → レシピエント	操作胚数	生存率 (%)
♂→♂	49	82
♀→♀	31	93
♂→♀	35	91
♀→♂	30	90

異性胚間移植を行い、発生 10 日目に雌胚と雄 PGCs を雌に移植した胚の生殖腺あるいは雄胚と雌 PGCs を雄に移植した胚の生殖腺同士を比較したところ遺伝子発現の顕著な相違は確認できなかった。そこで、精巢分化に主要な働きをもつ SOX9 と雌特異的遺伝子 FOXL2 に着目した。SOX9 は雄胚と雌 PGCs を雌に移植した胚の生殖腺同士を、

FOXL2 は雄胚と雌 PGCs を雄に移植した胚の生殖腺について、その発現量を RT-PCR によって相対定量を行った。SOX9 の発現傾向はつかめなかったが、FOXL2 の発現は減

少傾向にあった ($P>0.05$) (図 1)。これは鳥類が哺乳類と違い雄から雌に性の誘導が起こるため異性胚間移植により雌への誘導を阻害されたのかもしれない。

希少鳥類の遺伝子保存・増殖という観点から烏骨鶏の PGCs を多産種である白色レグホンへと移植し、発生 10

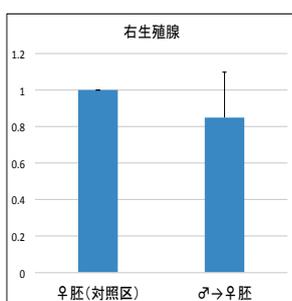
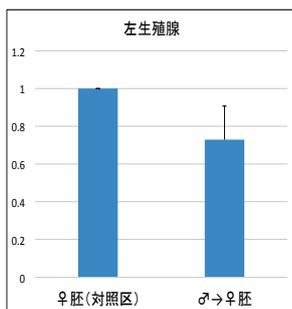


図 1. ♂→♀の異性胚間移植胚における FOXL2 の発現量

日目の生殖腺手の定着を蛍光顕微鏡により観察した。1 個体あたり約 139 個の PGCs を移植した。生殖腺系列キメラ鶏胚の生存率は 60%であった (表 2)。

表2. 烏骨鶏PGCs移植による10日胚生殖腺系列キメラの生存率

烏骨鶏 PGCs数/μl	生存率 (%)
30.8	60.0

烏骨鶏 PGCs の定着率は約 16%であった。右側生殖腺より左側生殖腺に多く定着した (表 3)。

表3. 烏骨鶏PGCsの移住・定着数

レシピエントの性別	定着した烏骨鶏PGCs数	
	右側生殖腺	左側生殖腺
♀	5.0±1.67	17.8±6.89
♂	5.0±4.17	15.5±1.08

PGCs は左側生殖腺に多く定着すると報告されているため、烏骨鶏を用いた生殖腺キメラ鶏でも同様な結果得られ、ドナー由来の子孫が得られる可能性がある。これらの研究より PGCs は生殖腺の発達への関与が示唆され、生殖腺系列キメラ鶏を介して、希少鶏種の増殖、遺伝子保存においては産出効率や発生の性分化を考慮に入れ、PGCs を受け渡すドナー胚と受け取るレシピエント胚の性を一致が重要となるかもしれない。

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 1 件)

- ① Hiroki Furuta and Tatsuyuki Yoshida. Possible reproduction of SILKY via transferred primordial germ cells (PGCs). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 16:75-77. 2017.

[学会発表] (計 3 件)

①市川裕基、金田夏歩、吉田達行、古田洋樹。生殖腺系列キメラ鶏における遺伝子発現。日本畜産学会 121 回大会 2016 年

②山田僚太、梅田成治、内藤知子、長田雅宏、古田洋樹、牛島仁、太田能之、小澤壯行。高大連携活動における教育的効果に関する一考察。日本畜産学会 121 回大会 2016 年

③ Hiroki Furuta, Yuki Ichikawa, Kaho Kaneda, Ai Kojima, Yuka Yokoi, Tatsuyuki Yoshida. Gonadal Development in Germline Chimeric Chickens Transferred by Heterosexual Primordial Germ Cells. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. 2016.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 洋樹 (FURUTA, Hiroki)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：30366794

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()