

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660262

研究課題名（和文）キメラ作出技術を用いた鳥類近交退化現象の新規解析系の開発

研究課題名（英文）New analysis of the avian inbreeding depression phenomenon using a technique of chimera production

研究代表者

川嶋 貴治（Kawashima, Takaharu）

国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員

研究者番号：90360362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、近交退化現象が顕著に現れるウズラをモデル動物として用いて、近親交配に起因する障害を解析するための新たな実験系を提唱することを試みた。ウズラの長期閉鎖集団（NIES-L系）に強度近親交配を行ったところ、胚の発育遅延や孵化率の低下が観察された。また、NIES-L系ウズラの雄の攻撃行動回数は他系統と比較して有意に低下していた。近交種 雑種間の胚盤葉キメラの作出することで、標識した近交種細胞の胚への寄与を可視化することに成功した。今後、近親交配による胚死亡や胚発生異常の原因追究が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to propose a new experimental system for analyzing disorders caused by inbreeding by using Japanese quail as a model organism, in which the inbreeding depression phenomenon appears conspicuously. Strong inbreeding to the long-term closed colony of Japanese quails (NIES-L strain) resulted in delayed embryonic development and decreased hatching rate. In addition, the number of aggressive behaviors of males of NIES-L quail was significantly lower than that of other strains. We succeeded in visualizing the contribution of biologically labeled inbred quail cells to embryos by producing inbred-hybrid blastoderm chimeras. In the future, it is expected to investigate the causes of embryonic death and embryonic development abnormality by inbreeding.

研究分野：鳥類発生工学

キーワード：近交退化 キメラ ウズラ 鳥類

1. 研究開始当初の背景

ウズラ (*Coturnix japonica*) は、性成熟に達するまで孵化後約 6 週間と短く、小型で、産卵能力が高く、体質が強健のため密飼いにも耐えるなど、実験動物としてマウス・ラットに匹敵する特性が認められる。しかしながら、近親交配の連続によって近交係数が上昇してくると、近交退化現象が強く発現し、胚発育、成長、産卵、生存、抗病性ならびに環境適応などの様々な生産的諸能力の低下を引き起こす (Sittmann et al., 1966; 佐藤, 1986)。他方、マウスに代表される一部の哺乳動物では、近親交配によって多くの近交系が樹立されていることから、近親交配が必ずしもいつも近交退化現象を顕在化するとは限らない。野生動物においても、ボトルネックから個体数の回復に成功した例があり、近交退化現象に種差があるのか全く不明である。近交退化の原因追究は、実験動物の系統維持だけでなく、家畜 (家禽) の育種、さらには絶滅危惧種の保全においても重要な課題となっている。

鳥類で顕著に発現する近交退化現象の原因については、次のような説が挙げられている (猪, 1991)。(1) 有害な劣性因子の集積: 近親交配によって有益な遺伝子が集積される反面、有害な劣性因子も集積される。(2) 対立遺伝子のホモ性の増加: 有害な劣性因子が不在であっても、近親交配の連続によって対立遺伝子のホモ性が増加することにより生存に不利益をもたらす。(3) ポリジーン (polygene) のバランス崩壊: 量的形質を支配するポリジーンは、個々の状態では非常に小さい遺伝的効果しかもっていないが、近親交配はポリジーンの相互の組合せのバランスを破壊して適応度が低下する。これら 3 つの主要な仮説が唱えられているが、現在までにどれも完全な証明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、近交退化現象が顕著に現れるウズラをモデル動物として用いて、近交種 雑種間キメラの作出などの発生工学技術を導入することにより、近親交配に起因する障害を解析するための新たな実験系を提唱することを目的としている。同一個体内に近交種細胞と雑種細胞を実験的に共存・競合させ、胚の形態形成や発生速度に及ぼす影響を解明することが目標である。近交退化現象の原因追究は、遺伝学や育種学上の課題でありながら、その発現機構は現在でもほとんど解明されていない。本研究によって、近交退化現象を緩和・回避するための糸口が見つかれば、優良形質をもつ家畜の維持、鳥類近交系の樹立、さらには絶滅危惧鳥類種の繁殖への応用が期待される。本研究では、鳥類で著明に発現する近交退化現象の本質的理解に挑む。

本研究では、まず、ウズラ初期胚における死亡、奇形、発生速度、細胞分裂、細胞分化、成長率ならびに孵化率等に及ぼす近交退化現象の発現を調べる。次に、雄ウズラの敵対行動は、つつき、くわえ、乗駕、総排泄腔接合という定型的な行動様式に分類されることから、雄ウズラの攻撃行動や繁殖行動に及ぼす近親交配の影響についても調べる。さらに、近交種 雑種キメラの作出という新たな手法を導入することで、同一個体内で遺伝的な近交種細胞と雑種細胞とを実験的に混在・競合させることで、鳥類近交退化現象を解析する新しい実験系の確立を目指す。

3. 研究の方法

国立環境研究所では、1980 年以来、ウズラの実験動物化に着手し、世界的にも類のない高度に近交化したウズラ (NIES-L) 集団を維持している (Kawahara-Miki et al., 2013)。これまでに、ウズラの近交系の作出に挑戦してきたが、強度の近親交配 (兄妹交配) では 3~4 世代で簡単に系統は絶滅してしまう。そのため、近交退化を回避しつつ、遺伝的均一

性を高めるために、経験的に雌雄の交配組合せを循環させながら、近交化を促進して系統を維持してきた。

本研究では、この NIES-L ウズラに強度近親交配を行うことで、その表現型における変異について調べた。特に、胚発生期の異常に焦点をあて、近交化に伴う発生異常や孵化率等を調べた。これまでに研究代表者は、人工容器を用いて鳥類初期胚の卵殻外での培養と胚発生のリアルタイムかつ連続観察を可能にする手法を考案している (Kawashima et al., 2005)。本研究では、このような胚培養法を用いて、近交退化に起因する発生初期での胚死亡、形態異常および発生遅延等について表現型レベルでの詳細な解析を行った。近親交配によって発生段階のどの時期に、どの器官に形態形成異常が見られるのかを調べ、形態形成異常について時間スケールと異常発生を軸にして近交退化現象の類型化を試みた。

次いで、性成熟に達した 9~10 週齢の雄ウズラを用いて、攻撃行動あるいは繁殖行動に及ぼす近親交配の影響について調べた。行動実験は、飼育室の照明点灯後 4 時間以内に、雄ウズラを 2 羽あるいは雄ウズラと雌ウズラを 1 羽ずつの計 2 羽を、ケージ (縦 30 cm、横 40 cm、高さ 20 cm) に 5 分間同居させ、デジタルビデオカメラで行動を録画し、ビデオ映像を解析することで、雄ウズラのつつき、くわえ、乗駕、総排泄腔接合のそれぞれの回数をカウントした。なお、行動実験は 1 羽の雄ウズラに着目して、1 回のみ行った。

最後に、鳥類近交退化現象を解析する新しい実験系を開発するために、ウズラの近交種雑種の胚盤葉キメラを作出し、同一個体内で遺伝的な近交種細胞と雑種細胞とを実験的に混在・競合させ、近交種細胞の胚体への寄与等について調べた。胚盤葉キメラ作出にあたり、ドナー細胞の蛍光色素による細胞標識法や移植方法について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 国立環境研究所で維持しているウズラの長期閉鎖集団 (NIES-L 系) を用いて、鳥類における近交退化現象の解析を行った。NIES-L 系ウズラに、実験的に強度近親交配 (兄妹交配) を行うことで顕在化する有害形質に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、世代が進むとともに卵重が低下する傾向が見られたものの、10 世代を超えて繁殖能を維持している雌雄個体が現れた。さらに、胚発生の連続観察を可能にするために、ウズラ胚の卵殻外での培養法の改良を試みた結果、強度の近親交配は胚の発育遅延や形態形成の異常を発生させることが明らかとなった。

(2) NIES-L 系を用いて、雄ウズラの攻撃行動や繁殖行動における近交退化現象の解析を試みた。その結果、NIES-L 系ウズラは、攻撃行動 (雄一羽と雄一羽の同居) と繁殖行動 (雄一羽と雌一羽の同居) のどちらの場合においても、つつき、くわえ、乗駕、総排泄腔接合というウズラに定型的な行動指標を示すことが確認できた (図 1)。

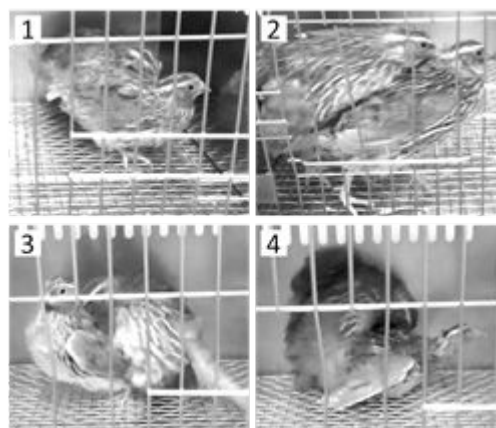


図 1 攻撃行動と繁殖行動の分類

(1) つつき (2) くわえ (3) 乗駕 (4) 総排泄腔接合

これらの 4 つの行動指標を用いて定量したところ、NIES-L 系雄ウズラの攻撃行動回数は他系統と比較して有意に低下していた。他方、

繁殖行動に関しては、NIES-L系雄ウズラは他系統と比較して乗駕や総排泄腔接合の回数に大きな差は認められず、NIES-L系は近交化が進行しているにも関わらず正常な繁殖力を維持していることが明らかとなった。

(3) 鳥類発生工学技術を用いて、ウズラの近交種 雑種間の胚盤葉キメラの作出を試みた。移植したドナー細胞を追跡するために、生細胞標識条件を確立した。また、いかなる発生段階においても胚発生の観察を可能にするウズラ発育卵の培養技術を改良した。鳥類近交退化現象を解析するために、近交種 雑種間キメラの作出という新たな手法を導入することで、近交種細胞の発生運命を解析するための実験基盤を整備した。今後、近親交配による胚死亡や胚発生異常の原因追究が期待される。

<引用文献>

Sittmann et al. (1966) Genetics 54: 371-379.

佐藤勝紀 (1986) 岡山実験動物研究会報 4: 18-23.

猪貴義 (1991) 岡山実験動物研究会報 79: 75-88.

Kawahara-Miki et al. (2013) Genomics 101: 345-353.

Kawashima et al. (2005) Zoo Biol 24: 519-529.

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)

[学会発表](計3件)

坪野航輝, 楊家欣, 産賀崇由, 筒井和義, 前川文彦, 川嶋貴治, ウズラ2系統間の攻撃性の違いとその違いが生じるメカニズムの解析. 第40回鳥類内分泌研究会, 2016年11月4日, ホテルメルパルク松山(愛媛県・松

山市)

Nagino K., Ubuka T., Tsutsui K., Maekawa F., Kawashima T., Male aggressive and reproductive behaviors in long-term breeding closed colony NIES-L of Japanese quail. Avian Model Systems 9: A New Integrative Platform, 2016年3月28日~31日, 台北(台湾)

坪野航輝, 産賀崇由, 筒井和義, 前川文彦, 川嶋貴治, 高度近交化ウズラ(NIES-L系)の攻撃・繁殖行動の定量化, 日仏生物学会第183回例会, 2015年12月19日, キャンパスプラザ京都(京都府・京都市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nies.go.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川嶋 貴治 (Kawashima, Takaharu)

国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員

研究者番号: 90360362

(2) 研究協力者

坪野 航輝 (Nagino, Koki)

早稲田大学大学院・先進理工学研究科・生命理工学専攻