

## 自己評価報告書

平成 23年 5月 17日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2012

課題番号：20380156

研究課題名 (和文) ニワトリ始原生殖細胞操作法の開発と形質転換ニワトリ作出への応用に関する研究

研究課題名 (英文) Development of chicken primordial germ cell manipulation methods and its application to production of transgenic chickens

研究代表者

内藤 充 (NAITO MITSURU)

独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え家畜研究センター・上級研究員

研究者番号：70355733

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：始原生殖細胞、外来遺伝子、トランスフェクション、GFP 遺伝子、ニワトリ初期胚、生殖系列キメラ、品種識別、体外培養

## 1. 研究計画の概要

形質転換ニワトリ作出技術の開発は、卵白中への医薬品等の有用物質の生産、遺伝子機能の解析、さらにはニワトリ集団の遺伝的改良など、多方面への応用が期待されている。本研究では、始原生殖細胞の培養条件を開発・改良するため、フィーダー細胞の調整法の検討、フィーダー細胞上での始原生殖細胞の維持・増殖のための培養液の組成の改良、始原生殖細胞への遺伝子導入法の検討、遺伝子導入された始原生殖細胞の薬剤による選択条件の解明、等を行う。そして、外来遺伝子が導入された始原生殖細胞をレシピエント胚に移植して、生殖系列キメラニワトリを介して個体に再生するシステムを構築する。以上のシステムを用いて、ニワトリ個体への外来遺伝子導入技術を開発する。

## 2. 研究の進捗状況

(1)ニワトリ初期胚より採取した始原生殖細胞を、ニワトリ初期胚およびマウス初期胚由来線維芽細胞をフィーダー細胞として培養する方法と、浮遊培養による方法について検討した。いずれの方法においても始原生殖細胞は増殖し、コロニーを形成した。これらの培養始原生殖細胞は、生殖細胞を認識する抗体である抗 CVH 抗体で染色され、生殖系列細胞としての性質を有していたことが示された。これらの培養始原生殖細胞をレシピエント胚へ移植したところ、一部の細胞で生殖隆起への移住が認められたものの、他の多くの細胞では移住能を失ってしまっていた。

(2)始原生殖細胞の移植により作製した生殖系列キメラニワトリにおける生殖細胞の置き換え率を向上させるため、レシピエント

胚のもつ内在性始原生殖細胞の除去を試みた。放卵直後の受精卵に生殖細胞の増殖性を抑制する薬剤である「ブスルファン」を投与したところ、始原生殖細胞の移植により作出した生殖系列キメラニワトリにおけるドナー細胞由来の後代の割合が向上した。今後さらに成績を安定させるため、投与量等の検討を行う必要がある。

(3)培養始原生殖細胞に GFP 遺伝子導入処理を行った結果、50%以上の効率で導入することができた。さらに、薬剤選択により GFP 遺伝子を発現する培養始原生殖細胞の集団を作出することができた。これらの細胞をさらに培養した結果、GFP 遺伝子陽性細胞のコロニーが形成された。GFP 遺伝子を発現する培養始原生殖細胞をレシピエント胚へ移植した結果、一部の細胞ではあるが、生殖巣への導入が認められた。

## 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

始原生殖細胞の培養、遺伝子導入、さらに遺伝子導入された細胞の選択とレシピエント胚生殖巣への導入、という一連の手法はほぼ確立することができた。ただし、始原生殖細胞の培養に関しては更なる改良が必要と思われる。

## 4. 今後の研究の推進方策

始原生殖細胞の培養に関し、未分化状態を維持できる培養条件の検討がさらに必要であるため、今後重点的に取り組む必要がある。そして、改良された培養法を用いて、始原生殖細胞を利用したニワトリへの遺伝子導入技術を完成させる予定である。

5. 代表的な研究成果

(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 10 件)

(1) Naito M, Harumi T, Kuwana T (2011) In vitro culture of testicular and ovarian gonocytes obtained from 19-day incubated chicken embryos and subsequent colonization into gonads of recipient embryos. Journal of Poultry Science, 48:112-118. 査読有

(2) Naito M, Harumi T, Kuwana T (2010) Long term in vitro culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood and incorporation into germline of recipient embryo. Journal of Poultry Science, 47:57-64. 査読有

(3) Naito M, Minematsu T, Harumi T, Kuwana T (2009) Preferential migration of transferred primordial germ cells to left germinal ridge of recipient embryos in chickens. Journal of Poultry Science, 46:40-45. 査読有

(4) Minematsu T, Harumi T, Naito M (2008) Quantitative genotyping by amplifying the polymorphic sequences of Pre-Melanosomal Protein (PMEL17) gene using real-time polymerase chain reaction in chickens. British Poultry Science, 49:542-549. 査読有

(5) Minematsu T, Harumi T, Naito M (2008) Germ cell-specific expression of GFP gene induced by chicken vasa homologue (Cvh) promoter in early chicken embryos. Molecular Reproduction and Development, 75:1515-1522. 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

(1) Naito M Spermatogonial stem cells. First International Symposium on Propagation of Endangered Species of Birds. 8-10 February, 2011, Abu Dhabi, United Arab Emirates.

(2) Naito M, Harumi T, Kuwana T. In vitro culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood. XIIIth European Poultry Conference, 23-27 August, 2010, Tours, France.

(3) 内藤 充・春海 隆・桑名 貴、ニワトリ初期胚血液より採取した始原生殖細胞培養の試み、日本家禽学会 2010 年度春季大会、2010 年 3 月 30 日、明治大学駿河台キャンパス、東京都千代田区

(4) Naito M. Basic studies for transgenic chickens. International Workshop on Preservation of Avian Primordial Germ Cells and Its Usage. 26-28 January, 2010, Okinawa, Japan.

(5) 内藤 充、始原生殖細胞を利用した鳥類の生殖制御法、第 102 回日本繁殖生物学会大会、2009 年 9 月 26-27 日、近畿大学農学部、奈良県奈良市

〔図書〕(計 3 件)

(1) 内藤 充、畜産技術発達史 12. 鶏の人工孵化と雌雄鑑別技術(分担執筆)、pp.106-113、畜産技術協会、東京、2011 年

(2) 内藤 充、畜産技術発達史 35. 採卵鶏の光線管理技術(分担執筆)、pp.240-245、畜産技術協会、東京、2011 年

(3) 内藤 充、日本農学 80 年史 第 33 章 家禽学 3. 発生工学(分担執筆)、pp.238、養賢堂、東京、2009 年

〔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〕