

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08039

研究課題名(和文)ニワトリ生殖細胞の移住能および性分化に関する研究

研究課題名(英文)Study on the germ cell migration and sex differentiation in domestic chicken

研究代表者

田島 淳史(TAJIMA, Atsushi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：40207030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：孵卵2日～9日ニワトリ胚由来の生殖系列幹細胞(gSCs)を用いて生殖系列キメラの(GLC)作製を試みた場合、孵卵9日の雌胚由来のgSCsを用いた場合にGLCの作製報告が無い。そこで本研究は、雌雄の孵卵2.5日、5日、7日および9日胚由来のgSCsからRNAを抽出し、RNA-seq法を用いて遺伝子群の発現量解析を行った。その結果、1) 多能性関連遺伝子群の発現量は、雌雄いずれの場合にも2.5日胚から5日胚にかけて低下する事、2) 生殖細胞特異的遺伝子群の発現量は経時的に低下する事、3) 減数分裂関連遺伝子群および生殖細胞特異的遺伝子群においては雌雄差が認められない事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥類においては、受精卵の長期保存ができないことから、生殖幹細胞(gSCs)を利用した遺伝資源の保存方法の開発が進められてきた。これまでに、孵卵2日～9日ニワトリ胚由来の生殖系列幹細胞(gSCs)を用いて生殖系列キメラの(GLC)作製を試みた結果、孵卵9日の雌胚由来のgSCsを用いた場合を除きGLCが作製された。これは、胚の発生が進むに伴い生殖細胞の分化が進むためであると考え、生殖細胞からRNAを抽出してRNA-seqを行った結果、胚の発生に伴いgSCsにおけるmRNAの発現パターンに変化が生じることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Attempts have been made to produce germ line chimera (GLC) by transferring germline stem cells (gSCs) from 2-9 days-old chick embryos. GLC was produced in all cases except when gSCs from female 9 days-old embryos have been transferred to the recipients. In the present study, therefore, RNA was extracted from gSCs and RNA-seq was conducted to examine the temporal changes of mRNA pattern of gSCs associated with early embryonic development. The results indicate that 1) expression of genes related to pluripotency have been down-regulated by 5 days in both sexes. 2) expression of genes related to germ cells were down-regulated throughout the examination periods 3) No significant differences in the expression of genes related to meiosis in both sexes.

研究分野：家禽学

キーワード：ニワトリ 始原生殖細胞 分化 RNA-seq 多能性 減数分裂

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで一貫して鳥類遺伝資源の保存に関する技術開発、特に生殖系列キメラ作製技術の開発と改良に取り組んできた。その結果、ニワトリ 2 日胚の血液から回収される始原生殖細胞(PGCs: Primordial Germ Cells) および ニワトリ 5, 7 および 9 日胚の生殖巣から回収された生殖巣生殖細胞(GGCs: Gonadal Germ Cells) を回収・保存・培養したのち、ニワトリ 2 日胚の血液中に移植することにより生殖系列キメラを作成することが可能になった(図 1)。

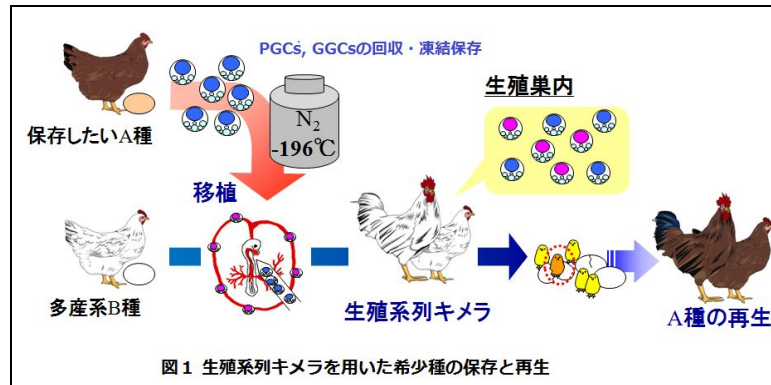


図1 生殖系列キメラを用いた希少種の保存と再生

ところが、生殖系列キメラを実際に作製した場合、

- (1) 生殖系列キメラの作成効率は PGCs > 5 日胚 GGCs > 7 日胚 GGCs > 9 日胚 GGCs の順に高いこと(Tajima *et al.* 2004)
- (2) 同性間移植の方が異性間移植より生殖系キメラの作成効率が高いこと
- (3) 野生動物の GGCs をニワトリ 2 日胚の血液中に移植すると、生殖巣には移住するが生殖細胞の分化には大きな制約があることが明らかになった(Nakajima *et al.* 2016)。

これは、胚の発生段階が進むとともに PGCs としての多能性が失われる一方、雄胚においては精子への、雌胚においては卵子への分化が始まっていること可能性がある事、ならびに PGCs の生殖巣への移住能力には種間差がないが、精子・卵子への分化には種の壁が存在している事を示唆している。

## 2. 研究の目的

生殖系列キメラの作成効率が PGCs > 5 日胚 GGCs > 7 日胚 GGCs > 9 日胚 GGCs の順に高いこと、ならびに同性間移植の方が異性間移植より生殖系キメラの作成効率が高いことから、最も未分化な生殖細胞である血液中を循環する PGCs は生殖巣に移住した後、孵卵 9 日目までの間に雄の生殖巣においては精祖細胞に、雌の生殖巣においては卵祖細胞さらには卵母細胞への分化を開始していることが想定される。そこで、本研究においては、雌雄の 2 日胚血液中 PGC および 5 日胚, 7 日胚および 9 日胚の生殖巣と生殖巣中 GGCs から mRNA を回収し、RNA-seq 解析を行うことにより生殖細胞および生殖巣の転写産物の発現量の定量、RNA 配列からの新規転写産物およびや新規プライスジャンクションを探索および微量転写産物を検出することを通して、胚の発生および性分化に伴う生殖細胞と生殖巣における遺伝子発現の変化を検討する。発現量に変化が認められた遺伝子については、RNAi 法を用いて PGCs/GGCs/生殖巣における候補遺伝子の発現を抑制することにより、生殖細胞の移住能および性分化、さらには生殖巣と生殖細胞における性分化の交互作用について検討を加える。

### 3 . 研究の方法

2 日胚 PGCs および 5 日胚, 7 日胚および 9 日胚 GGCs/生殖巣から mRNA を回収し、RNA-seq 法を用いて生殖細胞および生殖巣における転写産物のライブラリーを作製し、生殖細胞の移住・増殖・性分化に対する生殖巣と腎臓の影響に注目して 胚の成長に伴う生殖巣、生殖細胞および腎臓の生理・形態学的変化とそれらに伴う遺伝子の発現を網羅的に解析する。

### 4 . 研究成果

雌雄の孵卵 2.5 日、5 日、7 日および 9 日胚由来の gSCs から RNA を抽出し、RNA-seq 法を用いて遺伝子群の発現量解析を行った。その結果、(1) 多能性関連遺伝子群の発現量は、雌雄いずれの場合にも 2.5 日胚から 5 日胚にかけて低下する事、(2) 生殖細胞特異的遺伝子群の発現量は経時的に低下する事、(3) 減数分裂関連遺伝子群および生殖細胞特異的遺伝子群においては雌雄差が認められない事が明らかになった。

#### <引用文献>

貴志雅哉・竹原稔・浅野敦之・石川尚人・田島淳史(優秀発表賞)

免疫磁気細胞分離法(MACS 法)を用いたニワトリ GGCs の単離

日本家禽学会秋季大会 東北大学 2018/9/6

竹原稔・貴志雅哉・浅野敦之・石川尚人・田島淳史

ニワトリ初期胚の発生に伴う形態的变化と生理的变化の関係

日本家禽学会秋季大会 東北大学 2018/9/6

竹原稔・貴志雅哉・浅野敦之・田島淳史

ニワトリ初期胚の発生に伴う血液成分の変化

日本家禽学会秋季大会 岩手大学 2019/9/19

Kishi M, Takehara M, Onuma M, Nakajima N, Asano A, Tajima A.

Gene expression of gonadal germ cells (GGCs) in domestic chicken.

World Poultry Congress, Aug 16-20, 2020, Paris (suspended).

Takehara M, Kishi M, Asano A, Tajima A.

Potentials of physiological parameters to elucidate the internal development of early chick embryos.

Poultry Science Meeting, July 20-22, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 竹原稔、貴志雅哉、浅野敦之、石川尚人、田島淳史
2. 発表標題 ニワトリ初期胚の発生に伴う形態的变化と生理的变化の関係
3. 学会等名 日本家禽学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 貴志雅哉、竹原稔、浅野敦之、石川尚人、田島淳史
2. 発表標題 免疫磁気細胞分離法(MACS法)を用いたニワトリGGCsの単離
3. 学会等名 日本家禽学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹原稔・貴志雅哉・浅野敦之・田島淳史
2. 発表標題 ニワトリ初期胚の発生に伴う血液成分の変化
3. 学会等名 日本家禽学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehara M, Kishi M, Asano A, Tajima A.
2. 発表標題 Potentials of physiological parameters to elucidate the internal development of early chick embryos
3. 学会等名 Poultry Science Annual Meeting, July 20-22, 2020. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kishi M, Takehara M, Onuma M, Nakajima N, Asano A, Tajima A.
2. 発表標題 Gene expression of gonadal germ cells (GGCs) in domestic chicken.
3. 学会等名 World Poultry Science Congress Aug 16-20,2020. Paris (Suspended) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----