

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05939

研究課題名（和文）発生工学を基盤とした革新的家禽生産技術の開発

研究課題名（英文）Development of avian developmental biotechnology and the application for poultry breeding

研究代表者

鏡味 裕（Kagami, Hiroshi）

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：80308303

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）：発生工学の研究は動物育種や遺伝資源保存への貢献が期待される。発生工学の研究は主に哺乳類において先導されている。しかし鳥類（主にニワトリやウズラ、等）における発生工学の研究は発展途上である。本研究課題においては、胚盤葉の明域中央部から多能性幹細胞の厳密な採取を実施した。これらの幹細胞をドナーとしてレシビエント胚に移植し効率なキメラ作出の開発に先鞭をつけた。鳥類発生工学的研究では、全胚培養技術の進展が重要である。本研究では、胚発生過程を透視できる実験系の開発も試みた。本研究課題を通じ、家禽発生工学の革新に先鞭をつけた。これらの成果は、家禽における発生学・遺伝学の研究や家禽育種に貢献し得ると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物における育種や遺伝資源保存は食料生産や環境保全に極めてじゅうようである。また、鳥インフルエンザ等の感染症の伝播は人類の持続的な生活を脅かしている。本研究課題においては未だ発展途上である鳥類発生工学の研究を進展しこれらの難題の解決に貢献を目指した。このため、ニワトリ初期胚から多能性幹細胞を採取し、効率的なキメラ作出の開発を試みた。また、全胚培養技術の改善も実施した。本研究課題を通じ、新規の知見獲得や研究技術の開発が成され、家禽発生工学の革新に先鞭をつけることができた。一連の研究成果は、家禽における発生学・遺伝学の基礎的研究や家禽育種確信に貢献し得ると思われた。

研究成果の概要（英文）：Developmental biotechnology using pluripotent stem cells is expected to contribute to animal breeding or genetic conservation. However, the knowledge and research techniques by the developmental biotechnology have been led in mammals. The progress in avian (mainly chickens, quails, etc.) are still under development.

In this research project, we carried out rigorous isolation of pluripotent stem cells from the central area of the blastoderm. The stem cells were transplanted into recipient embryos for efficient production of germline chimeras. Advances in manipulated embryo culture are important for the advancement. In this study, a novel embryo culture system are challenged. Through a series of research of this project, we pioneered the innovation of developmental biotechnology in birds. The results should contribute to avian developmental biology and genetics and poultry breeding.

研究分野：家禽発生工学

キーワード：発生工学 家禽 幹細胞 キメラ 胚培養

1. 研究開始当初の背景

幹細胞の発生分化を制御する発生工学の進展は、家畜における育種繁殖効率の改善や各種の感染症に対する抵抗性の付与による生産革新への貢献が期待されている。とりわけ、幹細胞や始原生殖細胞を用いた生殖工学の進展は動物生産性を飛躍的に改善するものと期待される。

しかし、ニワトリ等の家禽における発生工学は、ヒトやマウス等の哺乳類と比較し大きく遅れをとっている。この家禽発生工学の遅延の背景として、胚発生が卵殻内で進展し、発生過程において外部からの実験操作が困難であることや家禽生殖細胞の発生制御がほとんど成されていないことに起因する。そこで、本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、ニワトリ生殖細胞制御遺伝子に対するゲノム編集によって生殖細胞を完全に欠損させ得るか否かを究明することにある。ゲノム編集による当該遺伝子発現の欠損が確認されれば当該遺伝子が家禽生殖細胞発生分化を主導すると断定される。

更に、この生殖細胞欠損胚に、ドナーPGCsまたはcESCsを移植し完全にドナー由来配偶子と置換した上で、これらが機能的配偶子へ発生分化し得るか否かを究明する。上記が解明されれば、得られた学問的知見や新規実験手法を活用し、完全ドナー配偶子伝達生殖細胞キメラの作出を実施する。この生殖キメラニワトリを活用し革新的家禽生産の礎を築く。また、これにより経済価値の極めて高いニワトリの生産性向上が強く期待される。

2. 研究の目的

本研究課題においては前述の背景に鑑み、キメラ作出においてレシピエント内因性生殖細胞の完全な欠損と外因性生殖細胞での完全な置換を目的とする。これにより、生殖細胞キメラを介し生産される全ての後代雛を外因性ドナー配偶子受精による雛として作出することを目指す。これまで発生工学的手法を用いた家禽生産への応用は極めて競合的に内外の研究機関で実施されてきた。しかし、現状では世界の何れの研究機関においても生殖系列キメラの後代においてドナー由来雛とレシピエント由来雛の混在は免れない。このことは、レシピエントにおける内因性配偶子の完全欠損が現状では不可能(極めて困難)であることを示している。これはこれまでの方法が、生殖細胞発生抑制薬品投与、光線照射による生殖細胞不活化、等の方法のみであり対症療法であることに起因する。

本研究課題ではゲノム編集技術で生殖細胞制御遺伝子自体の欠損を実施する。このため同遺伝子が欠損した個体の生殖腺内においては生殖細胞の完全欠損(完全不妊)が期待される。この遺伝子制御による完全ドナー配偶子伝達生殖細胞キメラの作出は極めて独創的な研究課題である。キメラの生殖細胞発生分化状況を免疫組織化学的に解析する。また、品種特異的遺伝子マーカーを探索し、キメリズムの分子識別に活用する。

鳥類キメラの作出に応用される体外培養系では、孵化数日前での死籠りが多数観察される。このため人為的に死籠りを回避する実験系の開発は極めて重要である。そこでニワトリ体外培養における生殖補助技術の開発も試みた。またこの技術の活用によって体外培養ニワトリ胚の効率的な孵化を実現する。

3. 研究の方法

地上に放卵直後の受精卵中で発生する初期胚(ニワトリ胚盤葉及びStage 15胚)の発生過程を判定する。また発生中の胚盤葉において胚盤葉名明域及び胚盤葉暗域を発生学的に分別する。この胚盤葉明域から細胞塊を単離する。

細胞周辺には血液、リンパ液、卵黄、卵白、等が付着していると思われる。これらの細胞周辺付着物はレシピエントへ移植後の細胞接着を阻害すると思われる。このため、できる限り厳密に付着物を洗浄した。こうして得られた細胞塊からcESCsとPGCsを単離した。また、ニワトリ初期胚の筋肉由来およびPGCs由来のサンプルを用いたサブトラクションによって網羅的遺伝子発現解析を実施した。これにより、発生分化中のPGCsにおいてのみに強い発現を示す候補遺伝子を同定した。

また、この候補遺伝子をプローブとしたFISHによって、初期胚の生殖細胞においてのみ同遺伝子が強い発現を示すことを解析した。cESCs及びPGCsにおける遺伝子の欠損はCRISP/Cas9によるゲノム編集による。生殖腺細胞における、当該遺伝子配列を同定し欠損を確認する。RT-PCR及びFISHによって発現欠損も確認する。

当該遺伝子を欠損させた白色レグホンの受精卵を孵卵し、孵化した個体を性成熟まで飼育する。性成熟後の雌雄の個体から精巣及び卵巣を採取した。これらの生殖腺の切片を作製しHE染色を行なった。また凍結切片を作製し、cVasa抗体(ニワトリ生殖細胞検出抗体)を用いた免疫組織化学的解析を行なった。これらの解析によりゲノム編集個体の生殖腺における生殖細胞の完全欠損(完全不妊)を確認した。これにより完全不妊が確

認されればレシピエントの生殖細胞完全除去方法として活用した。
更に、ニワトリ胚盤葉に、ドナー細胞を顕微注入し胚を作製し培養した。このキメラ胚を全胚培養系で培養した。発生途中で死亡したキメラ胚を蛍光顕微鏡下で観察した。体外培養胚受の呼吸の安定性確保のために、ハサミとピンセットを使用して、血管の退縮を確認した部分の卵黄膜を開放し、クチバシを上方に確保した。さらに培養を続け、血管の退縮を確認する度に卵黄膜を除去した。血管が完全に退縮した時点で、卵殻の除去を行った。これらの操作によって、発生率や孵化率の向上を図った。

4. 研究成果

本研究課題においては、多能性幹細胞が局在すると思われる胚盤葉明域由来の細胞を用いて効率なキメラ作出戦略の開発に先鞭をつけた。これらの鳥類発生工学研究を実施する上では全胚培養技術の進展が重要である。

キメラの作出効率の向上にはレシピエントのゲノム編集による完全な不活化が重要であると思われた。加えて、ドナー幹細胞の厳密な単離が必要である。本研究を通じて、多能性を保持するニワトリ幹細胞を胚盤葉明域中央部から効率的に単離する実験系が開発された。

また、ニワトリキメラの作出において、レシピエント胚の生殖腺中の幹細胞の不活化や除去に関しては遺伝子工学的手法に加え、レシピエント幹細胞を外科的に除去するマイクロサージャリーを駆使した実験系を開発することもできた。

キメラの作出においては、ドナーとレシピエントの性の相互作用を解析することが極めて重要である。我々は本研究課題を通じてニワトリの性判別プライマー作成に先鞭をつけることができた。これらの実験手法はキメラ作成の向上に資すると思われた。

以上の通り、本研究を通じて得られた成果は発生工学を用いた家禽生産の革新に貢献し得るものと思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nihashi Y, Umezawa K, Shinji S, Hamaguchi Y, Kobayashi H, Kono T, Ono T, Kagami H, Takaya T.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Distinct cell proliferation, myogenic differentiation, and gene expression in skeletal muscle myoblasts of layer and broiler chickens.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52946-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nihashi Y, Ono T, Kagami T, Takaya T.	4. 巻 91
2. 論文標題 Toll-like receptor ligand-dependent inflammatory responses in chicken skeletal muscle myoblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental and Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 115-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dci.2018.10.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Hiroshi Kagami
2. 発表標題 Novel Strategies on Avian Stem Cell Engineering
3. 学会等名 International Meeting of the JAACT（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Kagami
2. 発表標題 Molecular Characterization of the Avian Stem Cells and the Application for Poultry Production
3. 学会等名 Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Kagami
2. 発表標題 Stem cell application for genetic conservation and breeding of native chickens.
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Native Chicken (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Kagami
2. 発表標題 Stem cell application for genetic conservation and utilization of Asian endangered or indigenous/native chickens
3. 学会等名 The e-ASIA Joint Research Program Workshop on Agriculture. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	平松 浩二 (Hiramatsu Kohzy) (80238386)	信州大学・学術研究院農学系・教授 (13601)	
研究分担者	小野 珠乙 (Ono Tamao) (10177264)	信州大学・学術研究院農学系・特任教授 (13601)	分担者辞退
研究分担者	米倉 真一 (Yonekura Shinichi) (40443113)	信州大学・学術研究院農学系・教授 (13601)	分担者辞退

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------