

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19580325

研究課題名（和文） 鳥類顕微授精胚の発生研究

研究課題名（英文） Studies on development of avian embryo after ICSI

研究代表者 島田 清司 (SHIMADA KIYOSHI)

名古屋大学・生命農学研究科・名誉教授

研究者番号 400065579

## 研究成果の概要：

非ウイルス法による鳥類トランスジェニック作出は、成功率が極めて低い。よって本研究は、細胞質内精子顕微注射法 (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI) による遺伝子導入法を試みた。外来遺伝子として Green Fluorescent Protein (GFP) を単一射出精子と PLCzeta cRNA と同時に注入し、ウズラ胚に GFP を発現させるた。pCX-E GFP プラスミドと PLCzeta cRNA をウズラ未受精卵に同時に顕微注入し、24 時間の体外培養 (System Q1a) と 48 時間の追加体外培養の結果、外来遺伝子 GFP を胚盤葉で発現していることが観察できた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：細胞内精子顕微注入 (ICSI)、精子由来卵子活性化因子、phospholipase PLC $\zeta$ 、cRNA、胚盤葉、外来遺伝子 GFP、トランスジェニックウズラ

## 1. 研究開始当初の背景

最近、世界で初めてウイルスによらないトランスジェニックニワトリの生産が遺伝子導入 PGC キメラニワトリによって可能となった (Nature, 2006 Etches group, 米国) がその成功率はきわめて低いため、さまざまな角度から特段の改良が求められている。したがって本研究では、鳥類では世界ではじめ

ての試みとして顕微授精 (ICSI) 法を用いてウズラ精子、PLCzeta cRNA、外来遺伝子 GFP を同時注入してトランスジェニックウズラを作出する。

## 2. 研究の目的

ウズラ ICSI では申請者らが成功している (Hrabia et al., Biol. Reprod. 2003)

が「トランスジェニックニワトリの生産」に達するまでには「遺伝子導入、ICSI、受精卵培養発生、受精卵移植、孵卵、孵化」の諸過程の効率を高めることが必須である。本研究では、精子由来の卵活性因子 PLCzeta を cRNA の形で ICSI 同時注射して受精率と発生率を飛躍的に改善することが目的である。

### 3. 研究の方法

ウズラの未受精卵採集：

飼育：6週齢雌ニホンウズラ、室温 24℃、湿度 50~60%、照明条件 14L:10D (5 時点灯、19 時消灯) 個別ケージ飼育：餌・水自由摂取、個体産卵時刻：ビデオ撮影毎日記録 (カメラ—ExwaveHAD SSC— DC430、カメラアダプター—YS-W170、VHS ビデオレコーダー—SVT-S 960 ES、ソニー)：8~16 週齢でクラッチ間隔が 5 以上の規則正しい産卵個体を使用。ウズラ未受精卵は放卵後およそ 20 分を排卵時刻と仮定し推定排卵時刻の 15 分後に断頭放血により屠殺を行い卵管より卵子を採取した。

ウズラ精子の卵子への顕微注入：

ウズラ精子をホフマンモジュレーションコントラスト倒立顕微鏡 (IX-70、オリンパス) 下で三次元ジョイスティック油圧マイクロマニピュレーター (MMO-202、ナリシゲ) とマイクロインジェクター (IM-9Bナリシゲ) を用いて精子をピペット内に吸入しておく。未受精卵は、41.5℃の Dulbecco's PBS 培養皿に置き、三眼ズーム実体顕微鏡 (SZ1145TR、オリンパス) 下で胚盤の中央に精子を注入した。

精子由来の卵活性因子 PLCzeta cDNA クローニング：

ウズラ精子から PLC $\zeta$  cDNA を RT-PCR により単離し、塩基配列の決定を行なった。

PLCzeta cRNA の ICSI：

ウズラ PLC $\zeta$  cDNA から発現ベクターを使用してウズラ PLC $\zeta$  cRNA を発現させ調整したものを 60 $\mu$ g/ml をウズラ精子の卵子内顕微授精の際に同時投与した。

外来遺伝子導入：

外来遺伝子の Green Fluorescent Protein (GFP) を単一射出精子と PLCzeta cRNA と同時に注入し、ウズラ胚に GFP を発現させる。ベクター・外来遺伝子は、pCX-E GFP プラスミドを使用し 60 $\mu$ g/ml PLCzeta cRNA をインジェクションピペットに吸入した後、

同じインジェクションピペットへ GFP-射出精子を吸入する。顕微注入した卵子は、Ono らの方法 (1994, 2001) に従って、DMEM 入り 20ml プラスチックカップ中で 41.5℃、5% CO<sub>2</sub> 条件のもと、24 時間の体外培養を行ない (System Q1a)、更に 48 時間のニワトリ水溶性卵白で満たしたウズラ宿主卵殻を用いた追加体外培養を 37.5℃ の条件で行なった。さらに System Q2 では、30 分のインターバル、90 度のアングルの条件のもとで転卵した。顕微注入後、計 72 時間体外培養したウズラ卵子は、蛍光実体顕微鏡 (Olympus SZX 12) を用いて観察した。

### 4. 研究成果

精子由来の卵活性因子 PLCzeta cDNA クローニング：

ウズラ精子から PLC $\zeta$  cDNA を RT-PCR により単離し、塩基配列の決定および推定アミノ酸配列から EF-hand、X、Y、C2 ドメインが保存されていた。ニワトリ PLCzeta cDNA とは約 92% のホモロジーの塩基配列であった。

PLCzeta cRNA のウズラ卵子内投与による受精率の向上：

PLC $\zeta$  cRNA なしで ICSI したウズラ卵子は、24 時間の体外培養後では、16% (4/25) が発生し、その胚盤葉ステージは III-VI の間を占めた。一方、PLC $\zeta$  cRNA (60 $\mu$ g/ml 濃度で 3nl 量) とともに ICSI した場合、24 時間培養後では、精子のみを注入した群に対して 2 倍以上の発生率 36.7% (7/19) を示し、その胚盤葉ステージも IV-VII の間を示した。72 時間培養を行なった場合、単一精子のみの ICSI では、15.4% (2/13) が発生し、その胚盤葉ステージは V から VII の範囲であった。一方、精子とともに PLC $\zeta$  cRNA を注入した場合、50% (9/18) が発生し、胚盤葉ステージも VI から X 以上 (胚発生ステージ 4-7) がみられ 3 例では原条もみられた。

外来遺伝子導入：

System Q1 および Q2 の体外培養 72 時間後、7 個の卵子が胚盤葉発生しそのうち 6 個が外来遺伝子 GFP を胚盤葉で発現していることが観察できた。さらに外来遺伝子が宿主ウズラ染色体に組み込まれているかを胚盤葉 DNA を用いて PCR 法で検討した結果、GFP 遺伝子は 6 個の胚盤葉 DNA の内 3 個に増幅が観察された。したがって、PLCzeta cRNA 注射と同時に本 ICSI による遺伝子導入法が新しいトランスジェニックトリの作

出に道を開くものとして期待される。

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 10 件)

- ① Ha Y, Tsukada A, Saito N, Shimada K. (2008). Identification of differentially expressed genes involved in the regression and development of Mullerian duct of chicken. *International Journal of Developmental Biology.* 52, 1135-1141. 査読有
- ② Koba N, Ohfuji T, Ha Y, Mizushima S, Tsukada A, Saito N, Shimada K. (2008). Expression of P450arom, AMH and ER $\alpha$  mRNA in gonads of turkey, duck and goose within one week of age. *Journal of Poultry Science.* 45, 215-219. 査読有
- ③ Mizushima S, Takagi S, Ono T, Atsumi Y, Tsukada A, Saito N, Shimada K. (2008) Developmental enhancement of intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-generated quail embryos by phospholipase C $\zeta$ . *Journal of Poultry Science.* 45, 152-158. 査読有
- ④ Koba N, Ohfuji T, Ha Y, Mizushima S, Tsukada A, Saito N, Shimada K. (2008). Profiles of mRNA expression of FOXL2, P450arom, DMRT1, AMH, P450c17, SF1, ER $\alpha$  and AR, in relation to gonadal sex differentiation in duck embryo. *Journal of Poultry Science.* 45, 132-138. 査読有
- ⑤ Koba N, Mori M, Ha Y, Mizushima S, Tsukada A, Saito N, Shimada K. (2008) Effects of aromatase inhibitor (Fadrozole)-induced sex-reversal on gonadal differentiation and mRNA expression of P450arom, AMH and ER $\alpha$  in quail embryos and growth in posthatching quail. *Journal of Poultry Science.* 45, 116-124. 査読有
- ⑥ Valdez Jr MB, Mizutani M, Fujihara A, Yazawa H, Yamagata T, Shimada K, Namikawa T. (2007). Histocompatible chicken inbred lines: Homogeneities in the major histocompatibility complex antigens of the GSP, GSN/1, PNP/DO and BM-C inbred lines assessed by hemagglutination, mixed lymphocyte reaction and skin transplantation. *Experimental Animals.* 56, 329-338. 査読有
- ⑦ Mizushima S, Takagi S, Ono T, Atsumi Y, Tsukada A, Saito N, Shimada K. (2007). Possible role of calcium on oocyte development after intracytoplasmic sperm injection in quail (*Coturnix japonica*). *Journal of Experimental Zoology.* 307, 647-53. 査読有
- ⑧ Takagi S, Ono T, Tsukada A, Atsumi Y, Mizushima S, Saito N, Shimada K. (2007). Z-chromosome specific primers for chicken-quail hybrid blastoderm. *Journal of Poultry Science,* 44, 209-212. 査読有
- ⑨ Takagi S, Ono T, Tsukada A, Atsumi Y, Mizushima S, Saito N, Shimada K. (2007). Fertilization and blastoderm development of quail oocytes after intracytoplasmic injection of chicken sperm bearing the W chromosome. *Poultry Science.* 86, 937-943. 査読有

- ⑩ Takagi S, Tsukada A, Saito N, Shimada K. (2007). Fertilizing ability of chicken sperm bearing W chromosome, Poultry Science. 86, 730-737. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 杉本幸甫、水島秀成、古寺敏子、島田清司、小野珠乙、木村一郎、ウズラ卵子 DNase I 活性に及ぼす精子数の効果、日本家禽学会、2009年3月28日、藤沢市
- ② 水島秀成、島田清司、顕微授精ウズラ卵 cRNA 注入の効果、日本家禽学会、2008年3月28日、水戸市
- ③ Profiles of mRNA expression of sex-differentiation-related genes in relation to gonadal sexual differentiation in duck、Naomi Koba, Shusei Mizushima, Akira Tsukada, Noboru Saito, Kiyoshi Shimada、APPC、2007年2月6日、Bangkok, Thailand

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島田清司 (SHIMADA KIYOSHI)  
名古屋大学・生命農学研究科・名誉教授・  
40065579

### (3) 連携研究者

小野珠乙 (ONO TAMAO)  
信州大学・農学部・教授  
10177264