

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21377

研究課題名(和文) ウズラはニワトリの代理親になれるか？異種始原生殖細胞移植による配偶子分化制御

研究課題名(英文) Can quails be the surrogate parents for chickens? Control of gamete differentiation by heterologous primordial germ cell transplantation

研究代表者

大石 勲(Oishi, Isao)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：50314472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ始原生殖細胞の迅速な配偶子分化の可能性について検討する目的で、ニワトリ始原生殖細胞をウズラに移植しその動態の解析を行った。まず、ニワトリ始原生殖細胞の挙動を可視化するためのEGFP発現ニワトリ始原生殖細胞株の樹立に成功した。さらに同細胞をウズラ胚血液中に移植したところEGFP発現ニワトリ始原生殖細胞はウズラ生殖巣に生着した。これら結果は、ニワトリ始原生殖細胞がウズラ胚中においても保存された動態を呈することを示しており、移植ウズラ胚内での迅速な分化可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニワトリ始原生殖細胞を用いた生殖工学は、新育種技術による品種改良や遺伝子組換えによる有用タンパク質の鶏卵内大量生産などさまざまな社会課題の解決に繋がる重要な技術である。解決すべき重要な課題はニワトリ配偶子分化に半年以上の長い期間が必要なことである。ニワトリ始原生殖細胞の配偶子分化を性成熟期間が極めて短いウズラの体内で実現できればニワトリ遺伝子操作や生殖工学技術の飛躍的な改良への発展が見込まれるが、本研究により実現の可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the possibility of rapid gamete differentiation of chicken primordial germ cells (PGCs), we transplanted chicken PGCs into quail embryos and analyzed their dynamics. First, to visualize the behavior of chicken PGCs in quail embryos, we established EGFP-expressing cells. The cells were transplanted into the blood stream of quail embryos, after that they were migrated to genital ridges and observed in the quail gonads. These results suggest the conserved cellular dynamics of chicken PGCs in quail embryos and the possibility that the rapid differentiation of chicken PGCs in the transplanted quails.

研究分野：分子生物学

キーワード：始原生殖細胞 ニワトリ ウズラ 異種移植 配偶子分化

1. 研究開始当初の背景

組換えタンパク質を利用した製品は、バイオ医薬品や抗原検査キットなど医薬・医療技術の発展に大いに貢献してきた。一般に組換えタンパク質生産は培養動物細胞や微生物細胞を用いた培養細胞生産系を用いて行われる。しかしながら、培養プラント設備費用や管理費用、さらには知財使用量など多額の費用が必要となるため、現行の組換えタンパク質生産系は高コスト性が指摘されている。医療費負担の増大による社会保険料の増加が社会課題となる現在、持続可能な医薬産業発展の実現には、既存技術に依存しない新たな組換えタンパク質生産技術の開発が急務である。

1990年代より高等動物の外分泌能を利用した組換えタンパク質の低コスト生産系開発が注目される。特にニワトリは、ウシやヒツジ等の大型哺乳動物に比べ遺伝子組換え個体を得るまでの樹立期間が短く、又、産業動物として蓄積されたノウハウを活かすことで飼育コスト抑制が可能であるため、優れた動物生産系として有望視される。これまでにウイルスベクターを用いた遺伝子組換えニワトリ樹立技術が開発され、遺伝性希少疾病であるリソソーム酸性リパーゼ欠損症治療薬カヌマ®生産にも利用されている。すなわちニワトリ生産系は、培養細胞系によらない新しい組換えタンパク質生産技術として、社会実装のための高い技術力が開発され、さらに制度設計も進む最も優れた代替生産系といえる。だが従来技術は組換えタンパク質の発現量が少なく、又、個体間でのばらつきが大きい、さらに生産能力が1世代に限定されるなど、高発現かつ安定的な組換えタンパク質生産を実現するニワトリ生産系開発が課題であった。

我々は、ゲノム編集技術を利用したニワトリ生産系である鶏卵バイオリアクターを開発した。当該技術はオボアルブミンなど主要な卵白タンパク質の遺伝子座に外来遺伝子をノックインすることにより卵白内への外来遺伝子産物の効率的な生産を実現する技術である。これまでに世界トップクラスの8種類20系統以上の鶏卵バイオリアクターの樹立実績を持つ。旧来技術に比べ100倍近い組換えタンパク質生産量や安定した発現能力、さらに次世代への生産能伝播などを実証し、これまでの課題を一掃する成果を挙げた。だが本質的課題として、鶏卵バイオリアクターの樹立には8ヶ月以上の性成熟期間を含め約1年半の準備期間が必要であり、さらなる技術高度化には樹立までの期間の迅速化が課題である。

この課題解決のために我々は、異種間生殖系列キメラを用いた配偶子誘導に関わる生殖工学技術である代理親技術に注目した。これは希少性の高い種の精子や卵を、一般的に入手可能な別の種の発生胚を用いて得る技術で、既に一部の魚類や鳥類等で実証される。ニワトリに関しては、ニワトリよりライフサイクルが短いウズラが代理親技術のレシピエントとして開発可能性が高い動物種であることが期待されている。本研究を開始するにあたり、ニワトリ始原生殖細胞の培養、遺伝子操作、及びニワトリ胚への移植技術の確立に成功した。しかしながら、ニワトリ由来始原生殖細胞のウズラ胚への移植可否やウズラ生殖巣における挙動、及び生殖系列への分化可能性については未解明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、ゲノム編集ニワトリ生産系樹立の迅速化を可能とする新技術について検討し、ウズラを代理親とするニワトリ生殖細胞の分化技術の開発を目指す。当該研究期間内に、EGFPを発現するニワトリ生殖細胞株を樹立し、これをウズラ胚へ移植し、ウズラ生殖巣におけるEGFP発現細胞の正着の可否を評価する。また、ニワトリ生殖胚への移植を行い、EGFP発現細胞の正着性を示す。さらにウズラ生殖巣におけるEGFP発現細胞の挙動について免疫組織学的手法により詳細に解析し、ウズラを代理親技術の実現可能性や課題点について明らかにする。

3. 研究の方法

3-1. EGFP発現ニワトリ始原生殖細胞株の樹立

EGFPを発現するプラスミドを構築し、雄性ニワトリ3日胚の血液より樹立された始原生殖細胞株に対し、PiggyBac法により遺伝子導入を行なった。プラスミドはEGFP遺伝子と選択マーカー（ネオマイシン）発現遺伝子を含んでいる（図1）。ニワトリ雄性始原生殖細胞に遺伝子導入し薬剤選択により遺伝子導入細胞を選択、樹立した。樹立細胞におけるEGFP発現は蛍光顕微鏡および蛍光自動セルカウンターを用いて確認した。

3-2. ウズラ胚への移植とウズラ生殖巣における正着評価

樹立した細胞を培養し、ウズラ2.5日胚（HH14）の血液中にマイクロマニピレーターを用いて移植した。ウズラ胚の発生を進め、8, 12, 15日目においてウズラ胚を解剖し生殖巣を観察した。ウズラ生殖巣における正着評価は実体蛍光顕微鏡を用いて評価した。

3-3. ニワトリ胚への移植とニワトリ生殖巣における正着評価

樹立した細胞を培養し、ニワトリ2.5日胚（HH14）の血液中にマイクロマニピレーターを用いて移植した。ニワトリ胚の発生を進め12, 15, 18日目においてニワトリ胚を解剖し生殖巣を観察した。ニワトリ生殖巣における正着評価は実体蛍光顕微鏡を用いて評価した。

3-4. ウズラ生殖巣におけるEGFP発現細胞の挙動

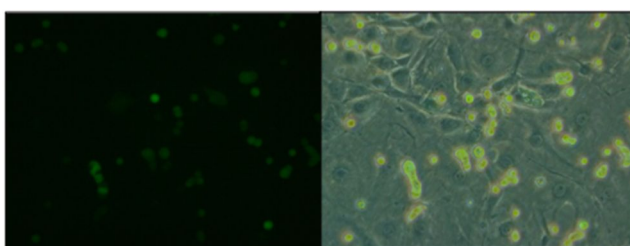
観察したウズラ生殖巣を4%PFAで固定し30%スクロース溶液で置換、OTCコンパウンドを

用いて包埋、クライオスタットを用いて凍結薄切片を作成しスライドガラスに固定した切片スライドを作成した。詳細な EGFP 発現細胞の挙動について抗 EGFP 抗体を用いた免疫組織染色法により解析した。

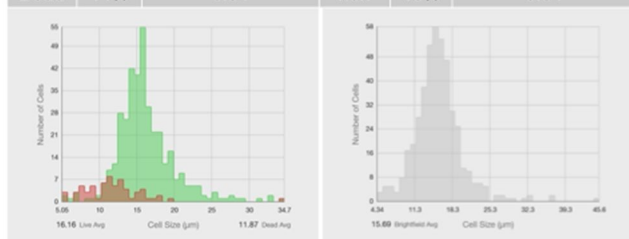
4. 研究成果

4-1. EGFP 発現ニワトリ PGC 細胞株の樹立

トランスポゾン特異性末端逆位配列を有するベクター pB530A-2 (System Bioscience) の EF1 プロモーター下流に EGFP を発現するプラスミドを作成した。これを PiggyBac 法により遺伝子導入した処置翌日のニワトリ始原生殖細胞の蛍光顕微鏡像を【図 1】に示す。このようにニワトリ始原生殖細胞の中に緑色蛍光を有する細胞が観察されることが見出された。さらに、さらに当該細胞をネオマイシン含有培地で培養し薬剤選択を行い、さらにネオマイシン不含有培地で増殖させることで EGFP 発現ニワトリ始原生殖細胞株を樹立した。さらに増殖後、蛍光自動セルカOUNTERを用いて Trypan blue 染色による生細胞数測定及び蛍光観察による GFP 発現細胞数をそれぞれ評価したところ、樹立細胞における生細胞のほぼ全てが緑色蛍光を有することを見出した。これをドナー細胞として以降のウズラおよびニワトリ胚への移植実験に用いた。



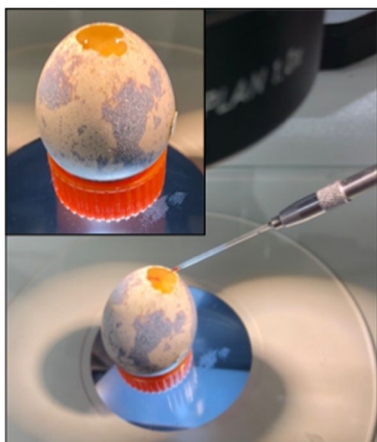
Trypan blue	Conc.(x10 ⁶ /mL)	GFP	Conc.(x10 ⁶ /mL)
Total	2.31	Total	2.32
Live 86%	1.98	GFP 86%	1.98
Dead 14%	0.34	non 15%	0.34



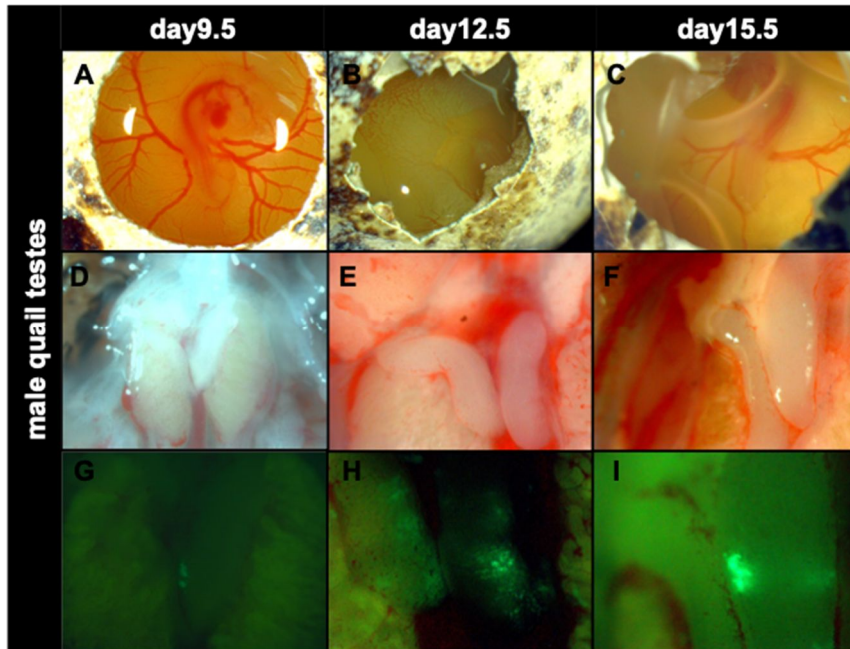
【図 1】EGFP 発現ニワトリ始原生殖細胞の樹立。PiggyBac 法によるプラスミド導入後、薬剤選択により選択後の細胞の様子。緑色蛍光を有する細胞が観察された。さらに蛍光自動セルカOUNTERを用いて生細胞数および GFP 陽性細胞数をそれぞれ定量した。

4-2. EGFP 発現ニワトリ始原生殖細胞のウズラ胚への移植とウズラ生殖巣における正着評価

樹立した EGFP 発現始原生殖細胞を約 1×10^5 個/embryo にてウズラ初期胚血液中に顕微注射により移植した【図 2】。移植には孵卵約 2.5 日目のウズラ有精卵を用いた。また細胞溶液は自動セルカOUNTERを用いて細胞数を測定した後、フェノールレッド溶液により呈色した。さらに、移植は研磨したマイクロガラスニードルを用いてウズラ胚血管中に直接投与した。移植後、開けた殻の部分テープで塞いだ後、孵卵器に戻し、9, 12, または 15 日目まで再度孵卵を続けた。続いて各時点においてウズラ胚を解剖し、実体蛍光顕微鏡を用いて生殖巣を観察したところ、生殖巣の一部に EGFP 陽性細胞の存在を確認した【図 3】。始原生殖細胞の正着には、移植する胚発生時期が重要であることが示唆されている。そこで移植時の胚発生の様子を示す。いずれのウズラ胚も移植可能な発生時期であることが示された。また本研究ではいずれも雄性ウズラ生殖巣の観察結果を示す。雌雄判定は解剖時に生殖巣の様子を観察し、オス特有の左右ほぼ均一に発達した生殖巣の形態学的特徴をもって行った。正着の評価は、ウズラ生殖巣における GFP 発現細胞の存在を持って評価した。本研究において GFP 発現ニワトリ始原生殖細胞はウズラ生殖巣に存在するが、その寄与率は高くはないことが示唆された。その理由として、ニワトリ-ウズラ間の生物学的な差異及び、GFP 発現ニワトリ始原生殖細胞の機能性があげられる。そこでこの要因を明らかにすべく、GFP 発現ニワトリ始原生殖細胞のニワトリ胚への移植を試みた。



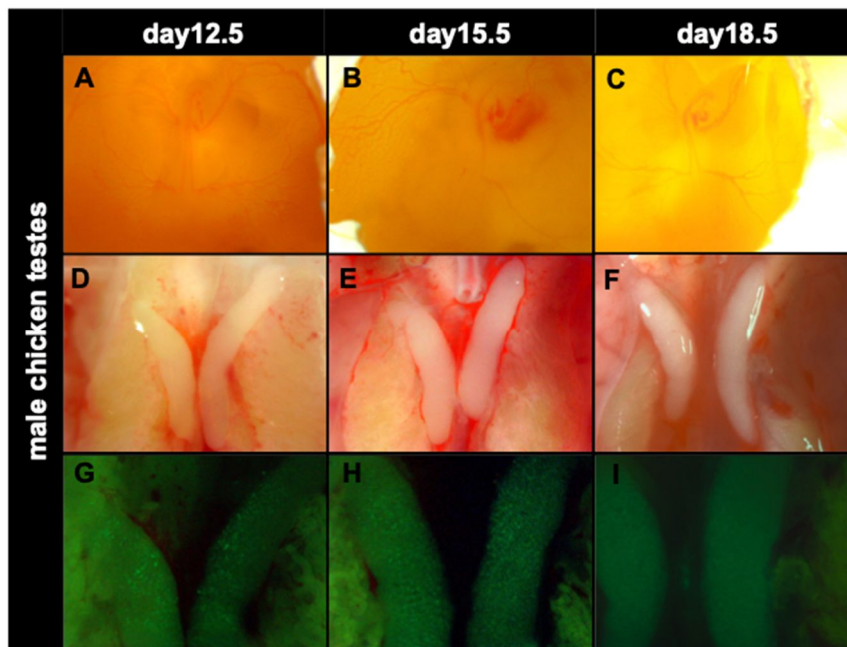
【図 2】移植のためからの一部を取り除いたウズラ有精卵と顕微注射の様子。



【図 3】移植するウズラ胚の様子と 9,12,または 15 日目における EGFP 発現ニワトリ PGC 移植ウズラ生殖巣の様子。

4-3. ニワトリ胚への移植とニワトリ生殖巣における正着評価

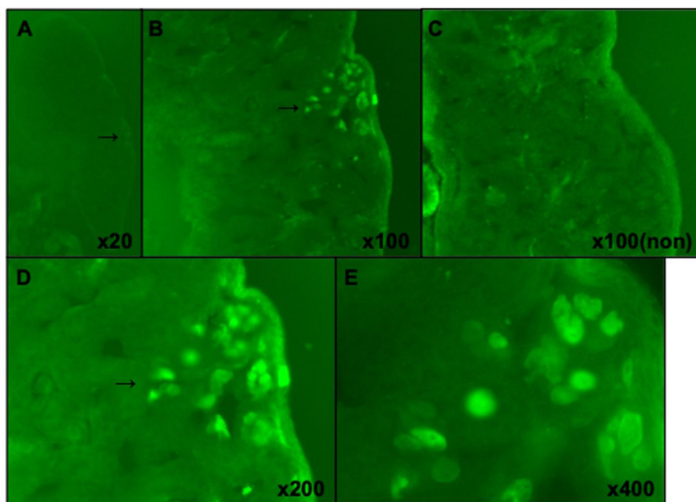
同様に樹立した EGFP 発現始原生殖細胞を約 2×10^5 個/embryo にてニワトリ初期胚血液中に顕微注射により移植した。移植には孵卵約 2.5 日目のニワトリ有精卵を用いた。また細胞溶液はウズラ胚移植時と同様に、細胞数測定した後、フェノールレッド溶液により呈色、マイクロガラスニードルを用いてニワトリ胚血管中に移植、殻の部分テープで塞ぎ、孵卵器に戻し、12, 15, または 18 日目まで再度孵卵を続けた。各時点においてニワトリ胚を解剖し、実体蛍光顕微鏡を用いて生殖巣を観察したところ、生殖巣の一部に EGFP 陽性細胞の存在を確認した【図 4】。また移植するニワトリ胚の様子を示す。いずれのニワトリ胚も移植可能な発生時期であることが示された。また生殖巣の形態学的特徴から雌雄判定を行い、本研究ではいずれも雄性ウズラ生殖巣の観察結果を示す。正着の評価は、ニワトリ生殖巣における GFP 発現細胞の存在を持って評価した。本研究において GFP 発現ニワトリ始原生殖細胞はニワトリ生殖巣に広範囲に存在し、高い寄与率が示された。この結果より、ウズラ生殖巣における EGFP 発現ニワトリ始原生殖細胞の寄与率の低さは、ニワトリ-ウズラ間の生物学的な差異に依存する可能性が示唆された。



【図 4】移植するニワトリ胚の様子と 12,15 または 18 日目における EGFP 発現ニワトリ PGC 移植ニワトリ生殖巣の様子。

4-4. ウズラ生殖巣における EGFP 発現細胞の挙動

発生 12.5 日ウズラ生殖巣から切片スライド得た後、EGFP 発現細胞の挙動について抗 EGFP 抗体を用いた免疫組織染色法により解析したところ、ウズラ生殖巣の一部領域において EGFP 陽性細胞が生着していることを見出した【図 5】。矢印が示すように、EGFP 発現陽性細胞はウズラ生殖巣の外側の部分に局在していた。これは実体蛍光顕微鏡で得られた結果と一致する。また、今回移植したいずれのウズラ胚でも限局的ではあるが、細胞移入が観察されており（データ未表示）、この寄与率の低さには分子生物学的なメカニズムが背景に存在する可能性がある。寄与率や正着細胞の分化能、さらには将来的な機能性精子への分化可能性については更なる検討を進める予定である。まとめると、本研究では可視化始原生殖細胞を用いた異種間細胞の正着可否について新たな知見が得られた。得られた知見は、生殖工学技術の発展に大いに寄与し、ニワトリ新育種技術の開発に貢献するものである。



【図 5】免疫組織染色による発生 12 日目移植ウズラ生殖巣の評価

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 2件）

1. 著者名 Mukae Takehiro, Yoshii Kyoko, Watanobe Takuma, Tagami Takahiro, Oishi Isao	4. 巻 100
2. 論文標題 Production and characterization of eggs from hens with ovomucoid gene mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 452 ~ 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psj.2020.10.026	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 Mukae Takehiro, Okumura Sho, Watanobe Takuma, Yoshii Kyoko, Tagami Takahiro, Oishi Isao	4. 巻 12
2. 論文標題 Production of Recombinant Monoclonal Antibodies in the Egg White of Gene-Targeted Transgenic Chickens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 38 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12010038	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Isao Oishi
2. 発表標題 Technologies of chicken genome modification and possible applications for preservation of avian genetic resources
3. 学会等名 Avian biodiversity: from developmental biology to preservation of endangered species, e-ASIA JRP workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 迎 武紘、吉井 京子、大石 勲
2. 発表標題 ゲノム編集ニワトリ生産系を用いた糖鎖改変糖タンパク質生産技術
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022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	迎 武紘 (MUKAE TAKEHIRO) (40803309)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

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
---------	---------