

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32669

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658250

研究課題名(和文)ニワトリ種卵の発生停止と再開機構の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Studies on the molecular mechanism of arrest and resumption of embryonic development in chicken hatching eggs

研究代表者

中尾 暢宏 (NAKAO, Nobuhiro)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・講師

研究者番号：60377794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：動物が多くの子孫を残すために獲得した種卵の保存機構(貯卵)は、よく分かっていない生命現象でその詳細な分子メカニズムは不明である。本研究では、ニワトリ種卵の貯卵機構に着目しステージ35までのニワトリ種卵における胚発生の停止と再開は、種卵を低温保存することにより人工的にコントロール可能であることを示した。さらに、網羅的な遺伝子発現解析によりニワトリ種卵の胚発生の停止と再開時に関与すると推察される148個の遺伝子の抽出を行った。このうち細胞周期に関与する遺伝子について検討し、1遺伝子が種卵の胚発生の停止と再開に関与している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of storage of avian hatching eggs is unclear. This study was focused on storage of chicken hatching eggs on developmental stage. Exposing chicken hatching eggs at all each stage of 35 to 15 degree, leading to a delay in hatching as compared to controls at 37.5 degree. This observation suggested that chicken hatching eggs could arrest embryonic development until stage of 35. Whole-transcriptome analysis of the embryonic heart incubated at 15 or 37.5 degrees showed that expression of 148 genes varied between arrest and resumption of embryonic development. Furthermore, in vitro and in vivo using quantitative PCR analysis of gene expression was associated with the cell cycle activation out of 148 genes indicated that one gene may be relevant to the mechanism of storage of avian hatching eggs.

研究分野：時間生物学

キーワード：ニワトリ種卵 貯卵 発生停止

1. 研究開始当初の背景

我々は、日々ニワトリの卵を食している。卵が市場から消えることなく食することの出来る背景には、人類が長い時間を費やして品種改良した家禽の歴史がある。ニワトリなどの家禽は、繁殖期に関係なく毎日卵を産む品種の改良が行われてきた。その結果、多くのニワトリの品種で子孫を残すための就巢性を欠いている。そのため、人工的な孵化と育雛が必要である。孵卵場では、雛の生産効率から種卵(受精卵)を集めて冷蔵貯蔵(貯卵)し、数が揃ったところで孵化させている。一方、ニワトリの原種であるヤケイ(*Gallus*)においてもその繁殖期には、数が揃うまで1日1個の卵を産み続け貯卵し抱卵する。この様にニワトリの種卵は、長期間の胚の発生を止めることが可能である。動物が多くの子孫を残すために取ってきた貯卵時における種卵の長期保存機構は、よく分かっていないとても興味深い生命現象である。

2. 研究の目的

多くの卵を産み就巢する鳥類は、抱卵時の危険性やエネルギー供給から同時期に孵化させている。これは種卵が長期間保存できる事を意味する。そのために種卵は、適切な管理により胚の発生を停止、再開できる高度に分化した機構を備えている。この胚の発生停止と再開機構は、細胞周期や細胞分化の停止が考えられるが詳細な分子メカニズムは不明である。ニワトリの発生過程は哺乳類に類似し分子レベルでは本質的に脊椎動物と同じ基本過程が生じている事から、鳥類の生殖細胞のもつ発育停止と再開に関与する分子の発見は、発生生物学のみならず組織あるいは臓器保存技術における組織工学の分野にも大きな波及効果が期待できる。そこで、ニワトリ種卵の発生停止と再開機構をホールトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 人工的にコントロール可能なニワトリ種卵の発生停止と再開ステージの同定
①15°C、湿度75%(低温刺激)で4日間保存した産卵鶏(ジュリアライト)の種卵を37.5°C、湿度75%(孵卵温度)に移行した4日目から9日目(ステージ35)までの各孵卵日齢に低温刺激を24時間与えた後、再び孵卵温度に移行し、孵化率からニワトリ種卵における胚の発生停止と再開がどのステージまで人為的にコントロールできるのか検討を行った。

(2) ニワトリ種卵における発生停止と再開に関わる遺伝子の抽出

①種卵を4日間15°C、湿度75%で貯卵後、37.5°C、湿度75%で8日間の孵卵を行った後、低温刺激を24時間与えた(Time-0h)。再び3

時間(Time-3h)、6時間(Time-6)の孵卵温度刺激を与えた。その後、さらに低温刺激を24時間(Time-30h)与えた。この低温および孵卵刺激に移行した際のTime-0h、Time-3h、Time-6hおよびTime-30hの4ポイントの種卵の心臓からtotal RNAを抽出し、イルミナ社TruSeq RNA Sample Prep Kitの標準プロトコルに従いシーケンシングライブラリーを製作しIllumina HiSeqを使用してシーケンシングを行った。

②Tophatとリファレンス配列(ニワトリ全ゲノム配列、Ensemble Galgal 4 release 75)およびアノテーションファイル(*Gallus_gallus.galgal4.75.gtf*)を用いてマッピングを行った。マッピング結果を元に検体間比較用プログラムCuffdiffを用いて遺伝子発現量の数値化(FPKM値)および検体間比較を行った。各検体間においてFRKM値に有意差(P<0.05)を示した遺伝子を孵卵温度の変化によって発現変動する遺伝子、つまり発生停止と再開に関与する可能性のある遺伝子として抽出を行った。

③②により抽出された遺伝子において、MetaCore(THOMSON REUTERS社)データベースを用いてオンロジー解析を行った。

(3) ニワトリ肝臓初代培養細胞における細胞周期の観察

(2)-①と同様に8日間孵卵させた種卵の肝臓を採取しコラゲナーゼを用いて細胞を分散させた。細胞は、10%FBSを含むM199培地、37°C5%CO₂で3日間培養を行った後、15°Cの低温刺激を24時間与えた(Time-0h)。再度37°Cで6時間培養を行った(Time-6h)。この際のTime-0hおよびTime-6hの細胞とCell-Clock Cell Cycle Assay (biocolor)を用いて低温刺激が細胞周期に与える影響について検討を行った。

(4) 孵卵中の温度変化により発現変動する遺伝子の抽出

①(2)-①と同様に8日間孵卵させた種卵に低温刺激と孵卵刺激を与えた際のTime-0h、Time-3h、Time-6hおよびTime-30hの4ポイントの種卵の胚心臓と肝臓からtotal RNAを抽出し、Real-time PCRを用いて孵卵中の温度変化により心臓と肝臓で同様の発現変動を示す遺伝子の抽出を行った。

②(3)と同様に種卵の胚肝臓の初代培養を行い細胞に24時間の低温刺激を与えた後37°C5%CO₂に移行した際のTime-0h、Time-3h、Time-6hおよびTime-30hの4ポイントの細胞からtotal RNAを抽出し、*in vitro*においても*in vivo*と同様に孵卵温度の変化による発現様式を示す遺伝子の抽出を行った。

(5) ニワトリ種卵における発生停止と再開における修飾タンパク質の解析

①2) -①と同様に 8 日間孵卵させた種卵に低温刺激と孵卵刺激を与えた際の Time-0h、Time-0.5h、Time-1h、Time-2h、Time-3h、Time-6、Time-30h の 7 ポイントの種卵から心臓を採取し、タンパク質の抽出を行い SDS-PAGE および二次元電気泳動法によりタンパク質を分離後、ProQ Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Molecular Probes) を用いてリン酸化タンパク質について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 人工的にコントロール可能な種卵の発生停止と再開ステージの同定

各孵卵ステージに低温刺激を与えた際の孵化率を検討した結果、検討した全てのステージ 35 (E10) まで発生停止と再開の人工的コントロールが可能であった。さらに、24 時間の低温刺激により孵化日の延長がみられた。このことから、低温刺激により一時的に発生を停止できていると考えられた (表 1)。

表 1. 24 時間の低温刺激が孵化率と孵化日数におよぼす影響

低温刺激を与えた孵卵日齢*	孵化率 (N=4~5)	孵化日の延長日数(日)
-	5/5	+0
E4	5/5	+2
E5	4/5	+1~+2
E6	5/5	+2~+3
E7	4/5	+1~+3
E8	5/5	+2~+3
E9	3/4	+1
E10	5/5	+1

*孵卵開始日をE1とした。-: 低温刺激無し

(2) ホールトランスクリプトームによる発生停止と再開に関わる遺伝子の抽出

(1) の結果より孵卵 8 日目の種卵に 24 時間の低温刺激を与えた後、再び孵卵刺激と低温刺激を与えた際に心臓で発現変動する遺伝子についてホールトランスクリプトーム解析を行った結果、発現様式から 6 つのグループに分類できる 148 個の遺伝子が孵卵温度変化により発現変動していることが明らかになった (図 1)。さらにこれらの遺伝子について、オントロジー解析を行い機能ごとに分類した結果、細胞周期に関わる遺伝子 13 個、細胞分化に関わる遺伝子 50 個、組織発達に関わる遺伝子 53 個、器官発達に関わる遺伝子 72 個、発生過程に関わる遺伝子 101 個に分類できた。

(3) ニワトリ肝臓初代培養細胞における細胞周期の観察

ニワトリ種卵における発生停止と再開に関わる遺伝子には、細胞周期に関わる遺伝子が含まれていたこと (4-(2))、発生は、細胞周期が正常に回ることによって細胞分裂と DNA の複製を繰り返し進行することから、

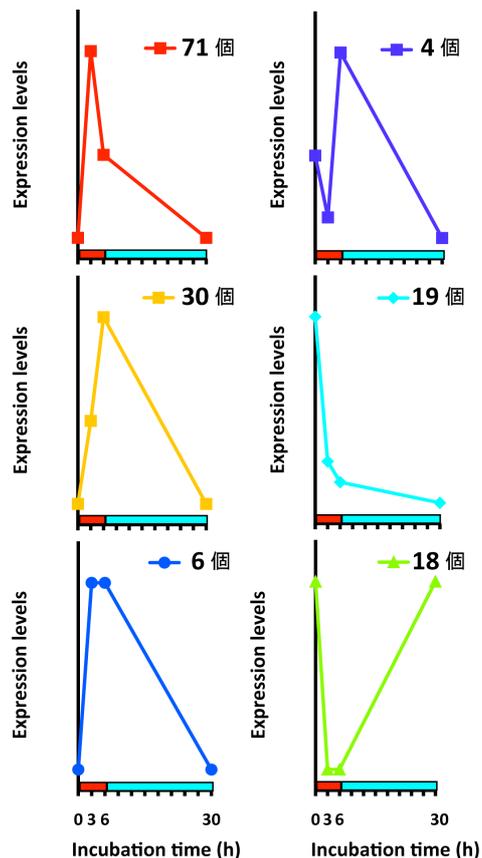


図 1. 孵卵温度により心臓で発現変動する遺伝子群の模式図

■ : 37.5°C, ■ : 15°C

孵卵を 8 日間行った種卵の肝臓を初代培養し 24 時間の低温刺激と 6 時間の孵卵刺激を与えた際の細胞周期を調べたところ、細胞に低温刺激を与えることにより G₀ 期/G₁ 期の細胞が増加し、これに孵卵刺激を 6 時間与えることで細胞周期が S 期および G₂ 後期/M 期に移行した細胞が増加した (表 2)。これらの事から、低温刺激は、細胞の増殖を停止させ、それに対して孵卵刺激は、細胞の増殖を再開させていると考えられた。

表 2. 温度条件により変化する肝臓初代培養細胞の細胞周期

細胞周期	前細胞に対する割合 (%)		
	0h (37.5°C)	0h (15°C)	6h (15°C→37.5°C)
G ₀ 期/G ₁ 期	14.1	100	12.2
S期	20.5	0	35.6
G ₂ 後期/M期	23.3	0	52.2

(4) 孵卵温度の変化により発現変動する遺伝子の抽出

4-(2) の結果より、低温刺激により発現が増加する 22 遺伝子および細胞周期に関する遺伝子 13 個について心臓特異的な遺伝子を除外するために肝臓においても孵卵温度により心臓と同様の発現様式を示す遺伝子を抽出したところ、細胞周期に関わる 2 遺伝子を抽出することができた (図 2、3)。そこで、さらにこれらの遺伝子についてニワトリ胚肝臓由来の初代培養細胞に低温刺激と孵卵刺激を与えた際の遺伝子発現様式を検

討したところ、1遺伝子のHSP90AA1が*in vivo*と同様の発現を示した(図4)。すなわち、この遺伝子は温度変化によって発現変動し、かつ器官間の相互作用を受けない遺伝子であると考えられる。一方でHSP90AA1阻害剤は、ガン細胞の細胞増殖抑制性の働きを示すことから、HSP90AA1は細胞増殖に関与していると考えられる。これらのことより、HSP90AA1は、ニワトリ種卵における発生停止と再開に関わる分子に含まれると推察された。今後、この遺伝子の機能解析を行う必要がある。

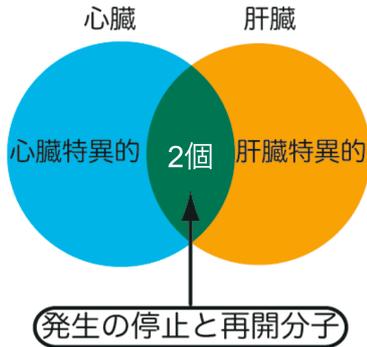


図2. ニワトリ胚における発生停止と再開に関わる可能性のある分子

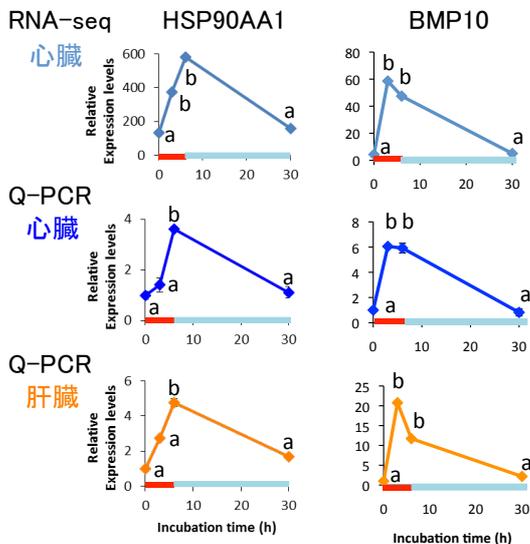


図3. ニワトリ胚の心臓と肝臓で孵卵温度により発現変動する遺伝子

a,b: 異符号間で有意差有り($p < 0.05$)

(5) ニワトリ種卵における発生停止と再開に関わる修飾タンパク質

ニワトリ種卵の発生停止と再開には、温度変化が鍵となっていること、細胞周期の制御の中心となっているのは、Cyclin-depend kinaseによるタンパク質リン酸化酵素による活性制御が関与していることから、種卵に低温刺激と孵卵刺激を与えた際のリン酸化タンパク質について SDS-PAGE および二次元電気泳動法を用いて検討したところ、経時的に

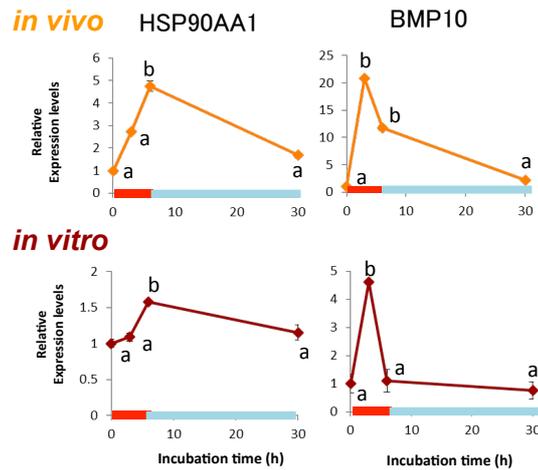


図4. ニワトリ肝臓初代培養細胞における発生停止と再開に関わる遺伝子の発現様式

a,b: 異符号間で有意差有り($p < 0.05$)

リン酸化されるタンパク質が存在していた。これらのことから、ニワトリ種卵の発生停止と再開機構には、細胞周期に関わる遺伝子の発現調節と孵卵期間初期の修飾タンパク質が関与している可能性が示唆されたが、タンパク質の同定には至らなかった。今後、さらにタンパク質の同定を行う必要がある。

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 6 件)

- ① Nobuhio Nakao, Hiromi Kaneda, Nobumichi Tsushima, Yoshiyuki Ohta, Minoru Tanaka, Characterization of primary structure and tissue expression profile of the chicken apical sodium-dependent bile acid transporter mRNA, *Poultry Science*, 査読有り、94、2015、722-727 DDI:10.3383/ps/pev027
- ② Minoru Tanaka, Nobuhiro Nakao, Ichiro Yamamoto, Nobumichi Tsushima, Yoshiyuki Ohta, Changes in expression levels of neurotensin precursor and receptor mRNA in chicken intestinal tissues and liver during late embryonic and early posthatching development, *Poultry Science*, 査読有り、92、2013、2765-2771 DDI:10.3382/ps.2012-02939
- ③ Wirasak Fungfuang, Tomoaki Nakada, Nobuhiro Nakao, Misao Terada, Makoto Yokosuka, Sveinbjorn Gizurarson, Jann Hau, Changjong Moon, Toru R. Saito, Serum leptin concentrations, leptin mRNA expression, and food intake during the estrous cycle in rat, *Laboratory animal research*, 査読有り、29、2013、1-6 DOI:

- org/10.5625/lar.2013.29.1.1
- ④ Wirasak Fungfuang, Nobuhiro Nakao, Tomoaki Nakada, Makoto Yokosuka and Toru R. Saito、Early Onset of Reproductive Function in Female Rats Treated with a High-Fat Diet、The Japanese Society of Veterinary Science、査読有り、75、2013、523-526 doi: 10.1292/jvms.12--0276
- ⑤ Junko Hirai, Masahiro Nishita, Nobuhiro Nakao, Torur. saito, and Minoru Tanaka, Regulation of Prolactin Receptor Gene Expression in the Rat Choroid Plexus via Transcriptional Activation of Multiple First Exons during Postnatal Development and Lactation、Experimental Animal、査読有り、62、2013、49-56 DOI:doi.org/10.1538/expanim.62.49
- ⑥ Ichiro Yamamoto, Shingo Ishikawa, Li Gebin, Hiroshi Takemitsu, Megumi Fujiwara, Nobuko Mori, Yutaka Hatano, Tomoko Suzuki, Akihiro Mori, Nobuhiro Nakao, Koh Kawasumi, Toshinori Sako, Toshiro Arai, cDNA cloning and mRNA expression of cat and dog *Cdkal1*、査読有り Veterinary Medicine: Research and Reports、3、2012、65 - 69 doi.org/10.2147/VMRR.S32540

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中島えりな、三好紗加、對馬宣道、田中実、中尾暢宏、ニワトリ胚における発生停止と再開機構に関する研究、第 38 回日本鳥類内分泌研究会、2014 年 12 月 13 日、紀州鉄道熱海ホテル (静岡県熱海市)
- ② 中尾暢宏、對馬宣道、田中実、ニワトリ腸管における胆汁酸輸送タンパク質遺伝子 (SLC10A2) の構造と発育に伴う発現変動、日本家禽学会、2014 年 3 月 29 日、筑波大学中地区第 3 エリア (茨城県つくば市)
- ③ 西田匡宏・中尾暢宏・對馬宣道・田中 実、ニワトリのコレステロールエステル合成および分解酵素の構造と孵化前後の肝臓における発現変動、日本家禽学会、2013 年 3 月 29 日、安田女子大学 (広島県広島市)
- ④ 對馬宣道、蛭名良充、西館亮一、向後克哉、坂本誠、吉田達行、中尾暢宏、田中実、アロウカナ交雑種の卵殻色素について、関東畜産学会、関東畜産学会、2012 年 11 月 10 日、茨城大学 (茨城県 稲敷郡阿見町)

[図書] (計 0 件)

[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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾暢宏 (NAKAO, Nobuhiro)
日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・
講師
研究者番号：60377794

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：