

鶏生殖幹細胞分化制御と家禽育種への応用に関する発生工学的研究

鏡味 裕 (信州大学農学部)

kagami@gipmc.shinshu-u.ac.jp

多能性を保持する生殖幹細胞を鶏胚から初めて単離した。そして、雌性生殖幹細胞を分化制御し受精能を有する精子を作出した。また、雄性生殖幹細胞を分化制御し受精能を有する卵子を作出した。さらに生殖幹細胞を操作し3種間キメラを作出した。生殖幹細胞分化制御技術の開拓により、鶏の雌雄産み分けや新規有用家禽の作出等、次世代家禽育種戦略構築に新たな活路を拓いた。

はじめに

マウスやヒトを含めた哺乳類においては生殖細胞系譜や各種体細胞系譜に発生分化し得る胚性幹細胞 (ES 細胞) が樹立されてきた。この ES 細胞は、遺伝子導入におけるベクター細胞、希少マウスなどの遺伝資源の復元や保全、ヒトの生殖医療や再生医療、などに活用されている。しかし、鳥類においては初期胚発生が卵殻内で進行し外部から遮断されていることや、生殖細胞の発生分化を制御する遺伝子群の解析が哺乳類に比較して遅れていることなども起因し、未だ ES 細胞は樹立されていない。また、遺伝子導入鳥類の作出、雌雄産み分け、希少鳥類の再生、なども完全には達成されていない。そこで哺乳類の ES 細胞に近似する鳥類生殖幹細胞を樹立し、この細胞の分化制御を行い家禽育種に貢献することを目的として研究を行った。

生殖幹細胞の単離

動物初期胚において生殖幹細胞の発生起源を同定し、その細胞を単離することは発生遺伝学における最重要課題の1つである。鳥類においてもこれまで発生工学や遺伝子工学など様々な研究手法を駆使して生殖幹細胞の単離が試みられてきた。しかしこれらの様々な試みによっても鶏生殖幹細胞の単離をするには至らなかった。

そこで我々は発生工学や遺伝子工学の手法を総合的に駆使し、新たな研究戦略を構築した¹⁾。放卵直後の鶏受精卵の卵黄上で発生する胚盤葉の、明域中央部、明域周辺部、暗域、から微細操作によってそれぞれの領域の細胞塊を除去した。これらの操作胚を全胚培養し、胚体内および胚体外の血中を循環する始原生殖細胞の平均数を測定し対照群と比較した。この結果、胚盤葉明域中央部から細胞塊を除去した実験群のみで平均始原生殖細胞数が有意に減少した。また、この実験群の操作胚を孵化させ性成熟後に生殖腺の組織学的解析をおこなったところ、生殖系列細胞の欠落する例や、セルトリ細胞や間細胞のみが存在する例が確認された。これらの結果から鳥類生殖幹細胞の発生起源は、胚盤葉明域中央部に存在することが *in vivo* および *in vitro* の両方で初めて明らかにされた¹⁾。そこで我々は、鶏胚盤葉明域中央部の細胞塊を選択的に採取し、この細胞を更に精製することによって鶏生殖幹細胞を単離することに成功した。この生殖幹細胞をドナーとしてレシピント胚盤葉に顕微注射しキメラ鶏を作出した。キメラにおいて、ドナーの生殖幹細胞はレシピエント胚盤葉内に効率的に定着した。またキメラ胚の発生が進行するにつれドナー細胞はキメラの生殖細胞系譜および各種体細胞系譜として分化することが確認された。このことから単離した鶏生殖幹細胞は多分化能を保持することが明らかになった²⁾。

異性細胞混在キメラの作出

生殖幹細胞の発生分化を人為的に制御し、雌生殖幹細胞由来の機能的精子、あるいは雄生殖幹細胞由来の機能的卵子が作出されれば家禽の雌雄産み分けへの道を拓くことになる。家禽における雌雄産み分けの実現は経済的に多大な利益をもたらすことになる。そこで、1個体内に雌雄の細胞が混在する異性キメラを作出し、生殖幹細胞の異性配偶子への分化制御を試みた³⁾。放卵直後の受精卵中で発生する胚盤葉自体を採取した。採取した胚盤葉の明域中央部から生殖幹細胞を採取し、完全な単一細胞へと解離しドナーとした。放卵直後の胚盤葉明域中央部から細胞を除去した受精卵をレシピエントとした。解離したドナー細胞と除去したレシピエント胚由来の細胞をそれぞれ性判別に使用した。ドナーおよびレシピエント細胞をPBSで洗浄した。SDSとプロテインネースKを用いて細胞の蛋白を溶解した。これらのサンプルを用いてさらにゲノムDNAを精製しテンプレートDNAとして使用した。鶏における雌特異的(W染色体特異的)DNAプライマーを用いてPCRを行った。これによって雌特異的なDNA断片が増幅されたものを雌、また、DNA断片が増幅されなかったものを雄とそれぞれ性判別した。このPCRによる性判別の結果、キメラ作出に用いたドナーとレシピエントの性が異なった場合に1個体内に雌雄の細胞が混在する異性細胞混在キメラであると判定した。これらのキメラの生殖腺内では異性の生殖細胞が混在し発生分化を継続しているものと思われた。

雌生殖幹細胞由来の精子作出

雌胚盤葉由来(ZW)の生殖幹細胞を雄胚盤葉(ZZ)に顕微注入し、異性細胞混在キメラ(ZW/ZZ)を作出した。このキメラの精巣中で、雌生殖幹細胞は雄細胞(生殖系列細胞やセルトリ細胞)に包囲され、胚発生初期から孵化後・性成熟に至るまで発生分化を継続した。そして性成熟後、この異性キメラの精巣中で雌生殖幹細胞由来のZ-精子および少数のW-精子が分化誘導されることを初めて明らかにした³⁾。またこのZ-精子は授精能を持ち、このZ-精子を用いた人工授精によって後代が作出された。W-精子^{3),4),5),6)}の授精能の有無は現在確認中である。もしこのW-精子に授精能が存在すれば、この精子を人工授精に用いることにより雌雛の選択的作出が可能になるものと期待される⁷⁾。

雄生殖幹細胞由来の卵子作出

雄胚盤葉由来(ZZ)の生殖幹細胞を雌胚盤葉(ZW)に顕微注入し異性細胞混在キメラ(ZZ/ZW)を作出した。このキメラの卵巣中で雄生殖幹細胞は雌細胞(生殖系列細胞や各種体細胞)に包囲され、胚発生初期から孵化後・性成熟に至るまで発生分化を継続した。そして性成熟後、この異性キメラの卵巣中で雄生殖幹細胞由来のZ-卵子が分化誘導されることを初めて明らかにした³⁾。またこのZ-卵子は授精能を持ち、このZ-卵子の受精によって後代が作出された^{3),6)}。このZ-卵子を用いた受精によって雄雛の選択的作出に応用し得るものと期待される。

3種間キメラ鶏の創出

これまで発生工学的手法を用いて作出されたキメラ鶏^{7),8)}はドナーおよびレシピエントがそれぞれ1種類ずつから成る2種間キメラに限定されていた。そこで我々は2種類の生殖幹細胞を事前に混合しドナー細胞としてキメラ個体の作出に利用した。ドナー細胞の1つとして、薬理効果が期待され市販価格が極めて高い烏骨鶏の生殖幹細胞を使用した。また2つめのドナー細胞として、肉質に優れるロードアイランドレッドの生殖幹細胞を使用した。レシピエントとしては多産系の白色レグホンを使用した。白色レグホンの胚盤葉明域中央部から生殖幹細胞を除去した。このレシピエント胚に事前に調整済みの混合生殖幹細胞を顕微注入した。操作胚を体外培養系で培養した。こうして1個体中に、烏骨鶏、ロードアイランドレッド、

白色レグホン、の3種の鶏由来の細胞が混在するキメラの作出に初めて成功した。

次世代家禽育種への活用

現在、家禽育種において最重要課題は雛の雌雄産み分けである。産卵鶏種においては卵を産出する雌のみが有用であり、雄初生雛の大半は孵化直後に淘汰されている。またブロイラーにおいては肉質に優れた雄が雌より有用である。そこで初生雛の雌雄産み分け技術の開発は家禽生産の改善に多大な貢献をもたらす。また最近ヨーロッパ諸国を中心に懸念される雄雛淘汰の動物福祉への抵触も雌雄産み分け技術の開発によって解決され得るものと期待される。しかし、現在に至るも家禽の雌雄産み分け技術の開発は世界的にも全く成し遂げられていない。前述の通り既に我々は、雌生殖幹細胞の異性キメラの生殖腺内での分化制御によって、授精能をもつ Z-精子および少数の W-精子の作出に世界で初めて成功した。この W-精子が授精能を持てば、人工授精による雌雛の選択的生産に直結する。従ってこれらの研究成果の獲得によって、これまでその実現が不可能であろうと考えられてきた家禽雌雄産み分けへ新たな活路を拓いたものと思われる。また3種間キメラ鶏作出の成功によって、1羽の種鶏から烏骨鶏（極めて高い卵質）およびロードアイランドレッド（極めて高い肉質）を効率的に作出し得るものと思われる。今後、消費者のニーズに合わせより市場価値の高い鶏品種（肉質に極めて優れた名古屋種等）の生殖幹細胞をドナーとしてブレンドした多種キメラ鶏が作出されれば、これまでに無い極めて有用な種鶏となるものと期待される。

以上のことから、我々が本研究を通じこれまでに確立した鶏生殖幹細胞分化制御技術の活用によって、雌雄産み分けや新規有用種鶏の作出、等、次世代家禽育種戦略の構築に新たな活路が拓かれるものと思われる^{9),10)}。

謝辞

信州大学農学部長・唐澤豊教授には本研究を遂行するにあたり多大なご指導ご高配を賜り深謝致します。また本研究を進展するにあたり様々なご配慮ご指導を頂いた信州大学農学部・小野珠乙教授に心よりお礼申し上げます。鳥類発生遺伝子工学に関する様々なご指導ご鞭撻を頂いた農業生物資源研究所発生制御研究チーム長・内藤充博士、同研究所生体防御研究グループ上席研究官・櫻井通陽博士に厚くお礼申し上げます。共同研究者としてこれまで様々なご支援を頂いた、畜産草地研究所育種素材開発研究室研究官・田上貴寛氏、農業生物資源研究所発生制御研究チーム主任研究官・松原悠子博士、春海隆博士に深謝致します。本研究につき日頃から共に研鑽を積む信州大学農学部動物発生遺伝学研究室の学生諸君に感謝致します。鶏における発生工学の研究を初めて私にご紹介頂き、また、本研究の遂行において常に有益なご指導を頂いた前ゲルフ大学農学部・Etches 教授に心よりお礼申し上げます。研究本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（基盤研究（B）萌芽研究、奨励研究（A））、畜産技術協会研究奨励費（新技術開発活用事業）科学技術振興調整費、の交付を受け行いました。

業績リスト

- 1) Kagami H., Tagami T., Matsubara Y., Hanada H., Maruyama K., Sakurai M., Kuwana T. and Naito M. (1997) The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. *Molecular Reproduction and Development* 48: 501-510.
- 2) Kagami H., Iwata J., Nakata A., Tagami T., Matsubara Y., Harumi T., Tachi C., Okabayashi H., Kashiwazaki N., Shino M. and Naito M. (2000) Substantial evidence to localize the developmental origin of primordial germ cells in the chicken. *Animal Science Journal* 71: 38-41.

- 3) Kagami H., Clark M., Gibbins A. and Etches R. (1995) Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ & ZW cells in the germline. *Molecular Reproduction and Development* 42: 379-387.
- 4) Etches R. and Kagami H. (1997) Genotypic and phenotypic sex reversal. In: *Perspectives in Avian Endocrinology*. Journal of Endocrinology Ltd., Bristol (UK) 57-67.
- 5) Tagami T. and Kagami H. (1998) Developmental origin of avian primordial germ cells and its unique differentiation in the gonads of mixed-sex chimeras. *Molecular Reproduction and Development* 50: 370-376.
- 6) Naito M., Matsubara Y., Harumi T., Tagami T., Kagami H., Sakurai M. and Kuwana T. (1999) Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *Journal of Reproduction and Fertility* 117: 291-298.
- 7) Kagami H., Iwata J., Yasuda J. and Ono T. (2002) Strain preference in donor and recipient for production of w-bearing sperm in mixed-sex germline chimeric chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 131: 287-292.
- 8) Kagami H., Yasuda J., Tagami T., Naito M., Matsubara Y., Harumi T., Noguchi T., Yamamoto Y., Matsuyama J., Komatsu H. and Ono T. (2002) Effect of the strain combination in donor and recipient for production efficiency of the w-bearing sperm in mixed-sex germline chimeric chickens. *Animal Science Journal* 73: 453-456.
- 9) Kagami H. (2003) Sex reversal in chickens. *World's Poultry Science Journal* 59: 15-18.
- 10) Kagami H. (2003) Genetic regulation of avian germ cell differentiation and the application for poultry biotechnology. In: *Animal Frontier Sciences*. Hokuto Shobo Ltd, Kyoto 237-242.

Developmental Genetic Regulation of Chicken Pluripotent Cells and the Application for Poultry Breeding

Hiroshi Kagami (Faculty of Agriculture, Shinshu University)

kagami@gipmc.shinshu-u.ac.jp