

ニワトリの生殖細胞をほぼ完全に置換する技術を開発

実験担当者： 農研機構 畜産草地研究所 田上貴寛
信州大学 農学部 中村隼明、鏡味裕

I. 概要

1. 当所と国立大学法人 信州大学 農学部の共同研究チームは、ニワトリにおいて自身が持つ生殖細胞を安定的に除去し、他のニワトリ由来の生殖細胞とほぼ完全に入れ替える技術を開発しました。

2. ニワトリをはじめ家禽では、発生途中の胚から精子や卵子の元となる細胞（始原生殖細胞）を採取して凍結保存することにより、遺伝資源を恒久的に保存する方法があります。保存した始原生殖細胞から個体復元するためには、細胞を宿主胚へ移植することにより代理親を作製し、移植した細胞由来の配偶子（精子または卵子）を生産させます。しかしながら、これまでの技術では、代理親には自身の生殖細胞も残存してしまうため、移植細胞からの個体復元効率は決して高くはありませんでした。私たちは今回、乳化ブスルファン液をニワトリ胚へ投与することにより、胚が内在的に持っている始原生殖細胞を安定的に除去する技術を開発しました。さらにこの方法を用いて作製した代理親が生産する配偶子は、ほぼ完全に移植した細胞由来となることを明らかにしました。

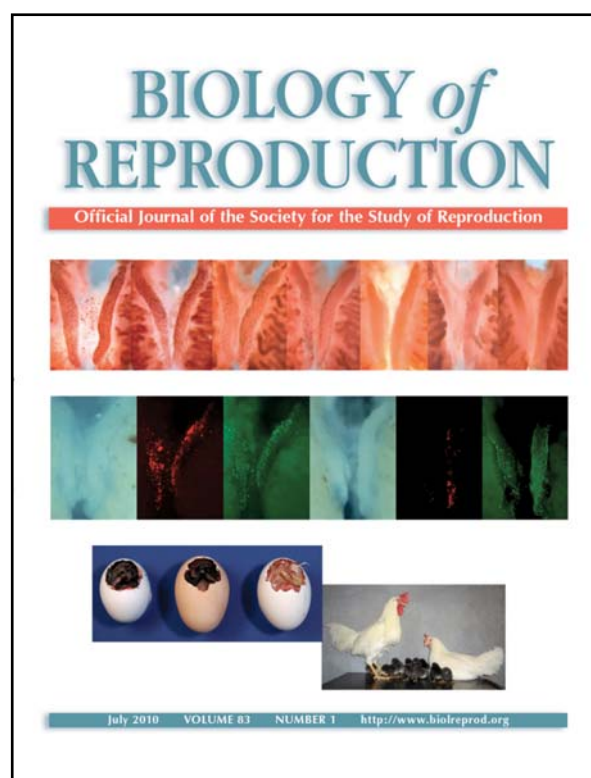


図 1. 本成果を紹介する **Biology of Reproduction** (2010年7月1日号) の表紙

3. 今回開発した方法により、代理親を用いた始原生殖細胞からのニワトリ復元効率を飛躍的に向上させることに成功しました。この方法は、遺伝資源として凍結保存した家禽始原生殖細胞から効率的に個体を復元することを可能にするだけでなく、絶滅危惧種や希少な鳥類の新規保存・増殖方法の基盤となることも期待されます。

4. 掲載論文 URL : <http://www.biolreprod.org/content/83/1/130.long>
Biology of Reproduction 83(1) 130-137(2010)

II. 研究の内容

乳化ブスルファンを投与した胚を宿主として、始原生殖細胞を移植することで代理親の配偶子をほぼ完全（平均 99.5%）に移植細胞由来の生殖細胞と入れ替えることができる技術を確認しました。乳化ブスルファン投与後の生殖細胞除去効果や代理親から復元されたひよこの写真が一連の成果を発表した学術誌（*Biology of Reproduction*（2010年7月1日号））の表紙に掲載されました（図1）。

1. ニワトリ胚からの始原生殖細胞の除去技術の開発

ブスルファンを溶解した後、等量のごま油と混合して作製した乳化液を、放卵直後の白色レグホーン種の受精卵の卵黄中へ注入しました（図2）。この胚を6日間ふ卵した後に生殖巣を採取し、始原生殖細胞数を計測したところ、ブスルファン非投与胚と比較すると平均 99.4%の始原生殖細胞が除去されていることが明らかとなりました（図3）。

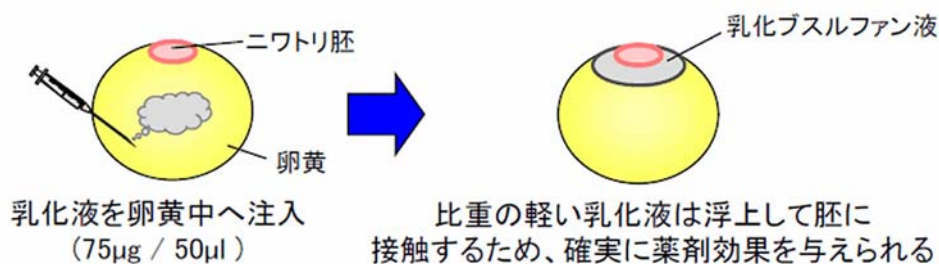


図2. 乳化ブスルファン液の卵黄内投与法およびその薬剤動態

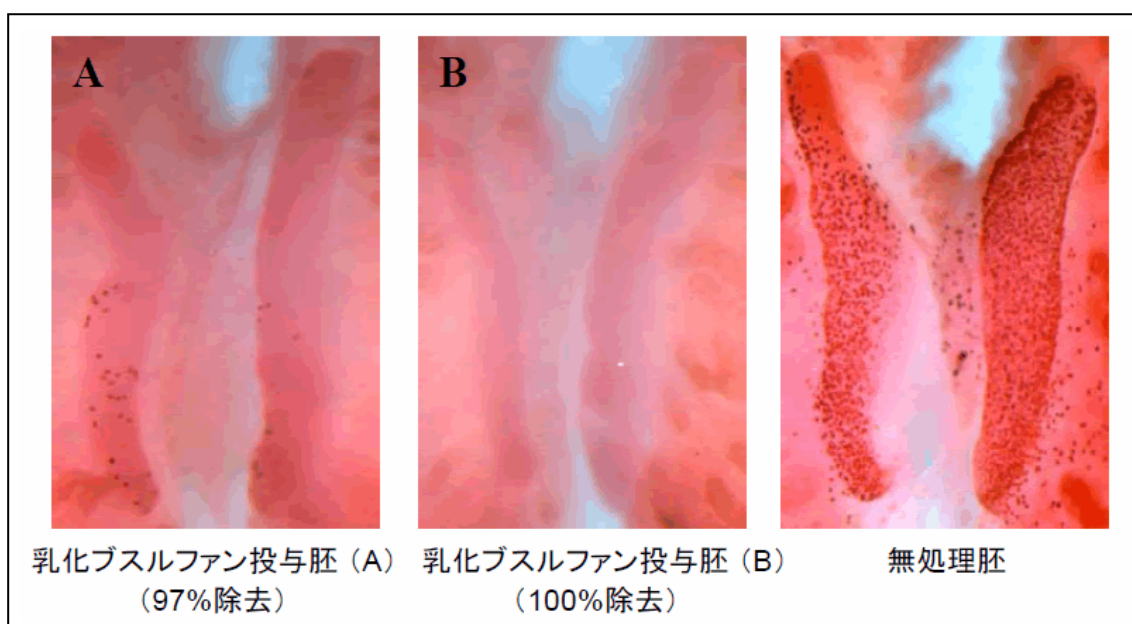


図3. 乳化ブスルファン液投与後6日目胚の生殖巣における始原生殖細胞
(赤紫の点が始原生殖細胞)

2. 乳化ブスルファン投与胚への始原生殖細胞移植による生殖細胞置換代理親の作出

乳化ブスルファンを放卵直後の白色レグホーン種受精卵の卵黄へ注入し、ふ卵 2.5 日目に達した胚を宿主胚として、横斑プリマスロック種から採取した始原生殖細胞 200 個を移植しました。移植を行った 50 個の胚から 17 個がふ化し (34%)、うち 11 羽が性成熟 (64.7%) しました (図 4)。これら 11 羽中 7 羽は、後代に純粋な横斑プリマスロック種のみを生産したことから、完全に生殖細胞が置換されたと考えられる個体(横斑プリマスロック種のみを生殖細胞を持つ白色レグホーン種)でした (図 5)。このように作製された代理親を異性の横斑プリマスロック種と交配した結果、得られた後代のうち平均 99.5%が純粋な横斑プリマスロック種でした。また、一方、従来の方法としてブスルファン非投与胚を宿主として同様の試験を行った結果、後代の中に横斑プリマスロック種が生産される割合は平均 6.0%に過ぎませんでした。従って今回開発された方法は、代理親を用いた移植細胞由来の後代産出効率を、飛躍的に向上させることが明らかとなりました。

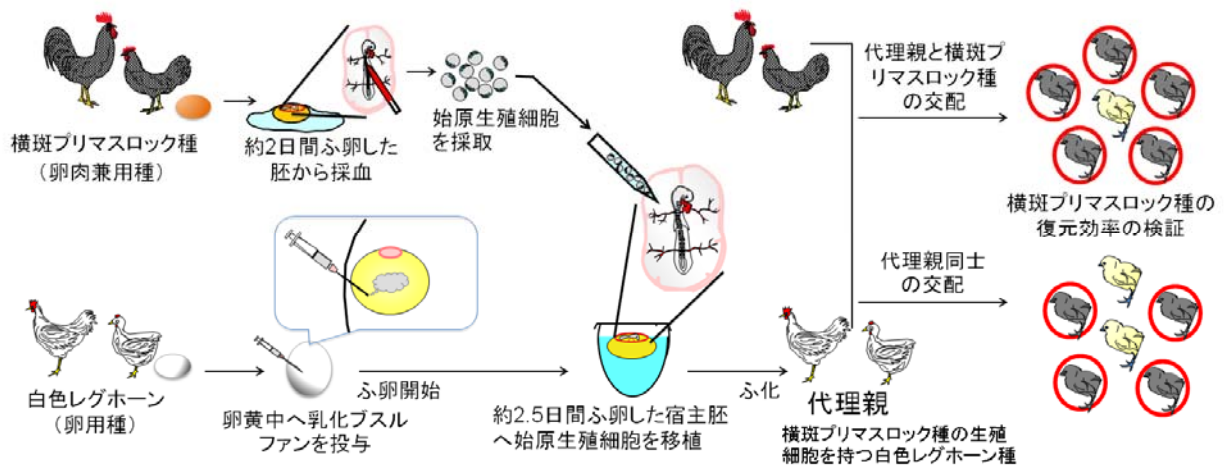


図 4. 乳化ブスルファンを投与した宿主胚へ始原生殖細胞を移植した代理親の作製法



図 5. 代理親 (白色) 同士の交配により復元された横斑プリマスロック (黒色)

Ⅲ. 用語の解説

始原生殖細胞

精子あるいは卵子の元になる細胞。胚発生の極めて初期にのみ存在し、生殖巣へ移動した後に分化を開始します。

ブスルファン

アルキル化剤の一種であり、DNA 複製を阻害する効果によりがん細胞の増殖を抑える抗悪性腫瘍薬として用いられます。また、始原生殖細胞を含む幹細胞に対して選択的毒性を有するため、マウス等のほ乳類実験動物の生殖細胞除去にも用いられます。