

《様式B》

研究テーマ 「 東海家禽産業を支えるニワトリ凍結保存技術の開発」

研究責任者 所属機関名 名古屋大学大学院生命農学研究科鳥類バイオサイエンス研究室

官職又は役職 助教

氏 名 奥寄雄也

メールアドレス yo0619@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp

共同研究者 所属機関名 愛知県農業総合試験場

官職又は役職 技師 主任

氏 名 舟橋水優、 宮川博充

（令和5年度募集）第36回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

東海地域は家禽産業が盛んであり、特に愛知県においてブランド化に成功した名古屋種(名古屋コーチン)は高級食材の代名詞的な知名度で肉・卵とも広く使用されている。しかしこの隆盛を持続する上で、世界中で慢性的な流行を見せる鳥インフルエンザは大きなリスク因子である。こうした感染事故とその後の淘汰に対する対策で最も重要なことは、系統のもとを凍結保存しておき、いざというときに個体を復元することである。例えば、様々なブランド牛などは精子、受精卵で半永久的に凍結保存する技術が確立されている。鳥類においても凍結保護材の工夫により、ニワトリ精子の効率よい凍結保存技術が実用化され、オスの遺伝資源が保存可能となった。一方、鳥類ではメスにのみW性染色体が存在するため、完全な遺伝資源の保存にはメスの保存が必要であるが、巨大な卵黄を含む卵子や受精卵の凍結はニワトリでは非常に難しい。これらの課題を解決するための方法として近年、将来精子・卵子へと分化する能力を持った生殖幹細胞である始原生殖細胞 (PGCs)の凍結保存が注目されている。さらにニワトリでは、培養方法の検討により *in vitro* で PGCs を培養することが可能になってきたため、PGCs の凍結保存は現在最も確実なニワトリの遺伝資源保存法であると考えられる。しかしながら *in vitro* PGCs 培養の成否は、ニワトリの系統や性別により大きな差が存在する。したがってこの技術の一般化のためには、様々な遺伝的背景を持ったニワトリ PGCs の培養をさらに進めると同時に、系統差を生む原因を知るための基礎解析が必要である。

本研究では、PGCs の *in vitro* 培養の成否がニワトリの系統や性別で異なるメカニズムを明らかにするため、名古屋大学生命農学研究科附属鳥類バイオサイエンス研究セ

ンターで飼育されている近交系のニワトリを用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、キジ目特異的な内在性レトロウイルス様遺伝子 *ENS-1/ERNI* の発現量と PGCs 株化効率に正の相関関係があることが明らかとなった。加えて、愛知県農業総合試験場と共同で名古屋種の PGCs 培養および凍結保存の検討および技術移転の推進を行った。その結果、作業者および実験箇所を農業試験場に移行した場合においても約 3 割程度と現実的な効率で名古屋種の PGCs を株化し、凍結保存することに成功した。

本研究を通して、PGCs の培養の成否を判断するための新たなマーカー遺伝子 *ENS-1/ERNI* を同定できた。今後は *ENS-1/ERNI* の発現量を指標として、培養時の添加物として用いる薬剤をスクリーニングすることで PGCs 培養のさらなる効率化が図れると期待される。さらに本研究では培養 PGCs の凍結保存技術をアカデミアレベルから官公庁の技術者が実用できる段階まで一般化することに成功した。今後も産学官での連携を推進することで、本技術が東海地区のみならず日本各地の貴重なブランド鶏および地鶏を保全するための基盤技術となることが期待できる。

## 2. 実施内容および成果の説明

本研究では

- (i) ニワトリ *in vitro* 培養 PGCs の樹立効率が系統および性別により異なるメカニズムを明らかにするためのトランスクリプトーム解析
  - (ii) 名古屋種 PGCs の培養・凍結保存
- の二項目について研究を実施した。以下にその内容および成果を記述した。

(i) ニワトリ *in vitro* 培養 PGCs の樹立効率が系統および性別により異なるメカニズムを明らかにするためのトランスクリプトーム解析

### 【材料及び方法】

名古屋大学生命農学研究科附属鳥類バイオサイエンス研究センターが保有する近交系ニワトリのうち、*in vitro* 培養 PGCs の樹立効率が 100%と高効率で PGCs の株化が可能である白色レグホン M/O 系統および PGCs の株化効率がそれぞれ 4%、42%、9%と全体的に低い系統であるファヨウミ GSP 系統、GSN/1 系統、PNP 系統について、合計 4 系統の種卵より樹立した雌雄それぞれの培養 PGCs を材料とし、トランスクリプトーム解析に供試した。

### 【結果及び考察】

RNAseq 解析により得られたリードをニワトリゲノム上にマッピングし、雌雄および系統間で発現に差異が見られた遺伝子を解析した。

ニワトリ PGCs は一般にオスよりメスにおいて PGCs の株化が困難であることが知られているが、意外なことに系統間によらない雌雄で発現に差異が見られた遺伝子の数は少数であった (図 1A)。これらの遺伝子の大部分は性染色体 (Z もしくは W 染色体) に座位しており、常染色体上に存在し雌雄で発現に差が見られた遺伝子はごく僅かであった (図 1B)。また、ニワトリを含む鳥類では哺乳類とは異なり性染色体上の遺伝子について染色体量補正がほとんど存在しないことが報告されているが、本研究の結果においても Z 染色体上の遺伝子の大多数は Z 染色体をホモで持つオスにおいておおよそ 2 倍発現していることが確認された(図 1C)。これらの結果から、培養 PGCs の雌雄における株化効率を決定する遺伝子は性染色体上の遺伝子である可能性が高いことが推測された。例えば、W 染色体に存在し、雌のみで発現が確認された *SMAD7B* は抑制型

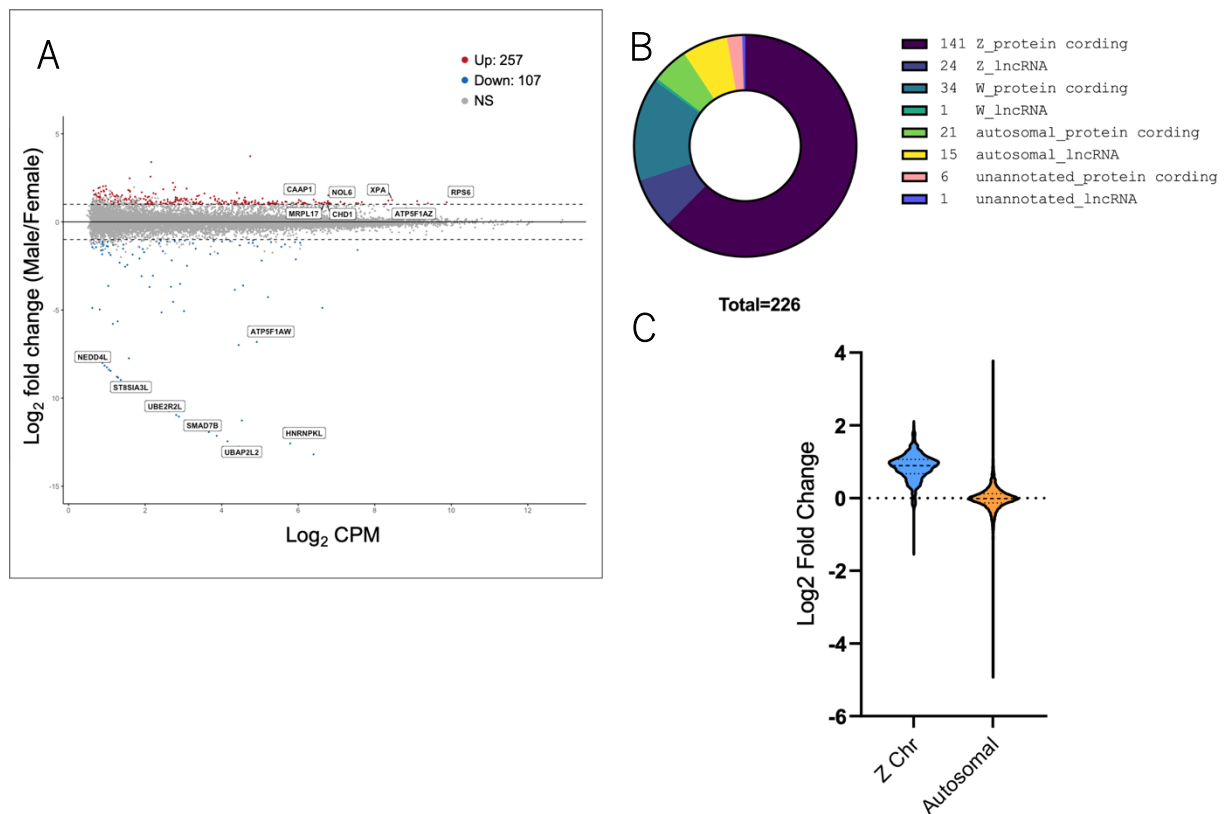
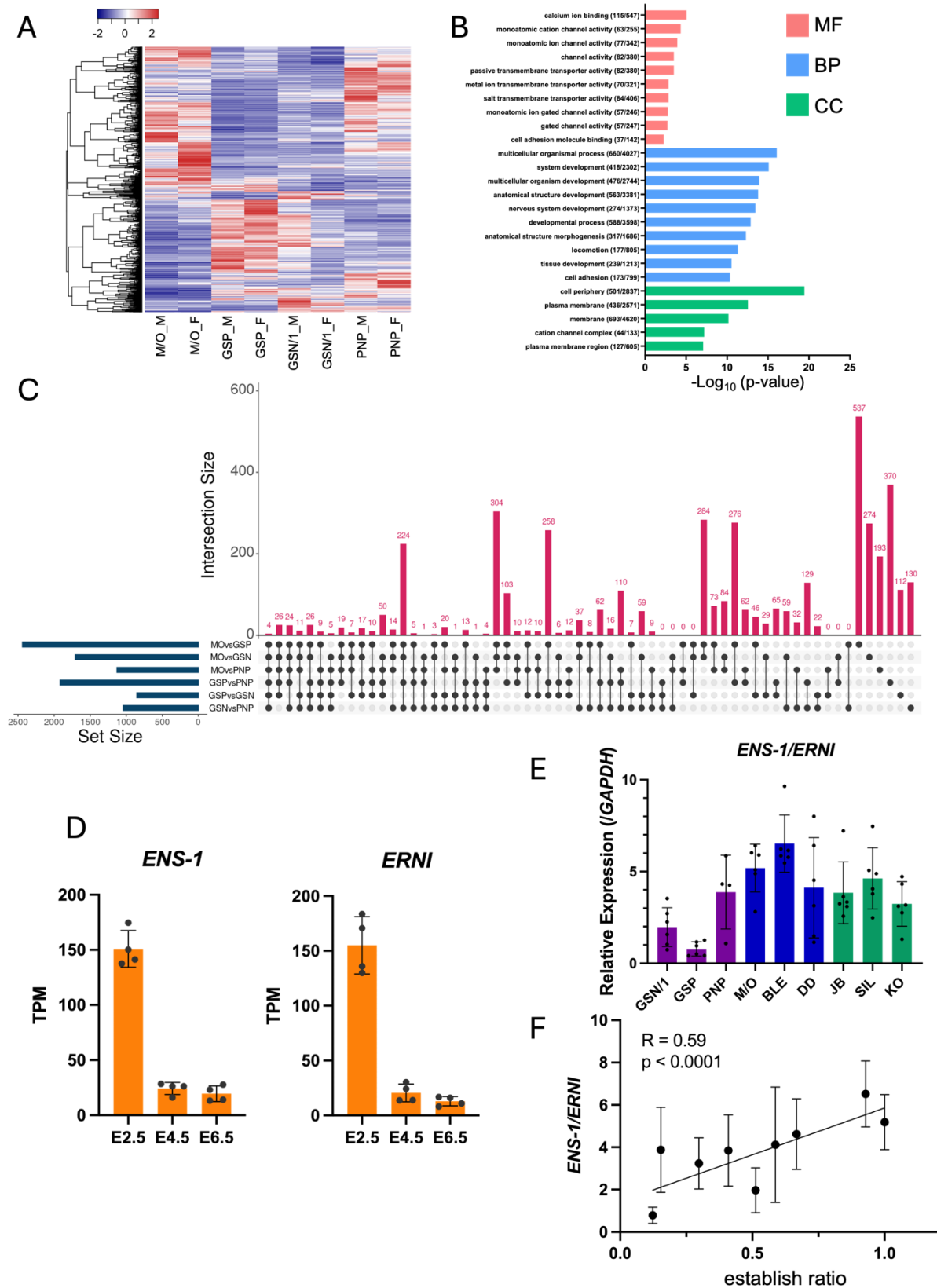


図 1: 培養 PGCs の系統によらない雌雄間での発現変動遺伝子についての解析

の SMAD であり、ニワトリ PGCs の主要な増殖シグナルのひとつである ActivinA シグナルを阻害することで、メスにおいて PGCs の株化効率を低下させる可能性が示唆された。

雌雄間での遺伝子発現の差とは対症的に、培養 PGCs の系統間における遺伝子発現には大きな違いが見られた (図 2A)。系統間で差が見られた遺伝子について GO エンリッチメント解析を行ったところ、molecular function (MF) の項目ではカルシウムイオンをはじめとしたイオンチャンネルに関連したタームが複数抽出された (図 2B)。ニワトリ PGCs は培地中のカルシウムイオン濃度に敏感であり、これに応答して細胞間の凝集が起こることが報告されている。本研究に用いたファヨウミ系統 PGCs は M/O 系統の PGCs と比べて培養時に細胞間での凝集が起こりやすく、GO 解析の結果はこの観察結果とよく一致していると考えられた。biological process (BP) の項目でも同様に、細胞運動や細胞接着に関わるタームが抽出された。加えて BP の項目では胚発生に関わるタームが複数観察された。また、cellular component (CC) の項目においても、これらの結果と矛盾しない細胞膜関連のタームの集積が見られた。一方で、これら結果からは系統間で PGCs 樹立効率が異なることの理由は、はっきりとしなかった。そこで培養 PGCs の樹立効率が高い M/O 系統と樹立効率が低いファヨウミ 3 系統のトランスクリプ



トームを比較した際に、共通して変動していた遺伝子について解析を行った (図 2C)。その結果、409 遺伝子が M/O 系統とファヨウミ系統 PGCs で発現に差異がある遺伝子として抽出された。これら遺伝子の中、PGCs において特異的な発現が見られる遺伝子に

ついて注目し解析した結果、最上位の遺伝子としてキジ目特異的な内在性レトロウイルス様遺伝子である *ENS-1/ERNI* 遺伝子が選抜された。*ENS-1/ERNI* 遺伝子は、ニワトリ胚において発生初期の胚盤葉下層および上層、また胚盤葉上層から樹立された胚性幹細胞で発現することが報告されており、神経板の発生にも関与することが知られている。また本研究の結果を受け、未培養の胚性 PGCs について RNAseq を行った公開データの再解析を行ったところ、*ENS-1/ERNI* 遺伝子は E2.5 の血中循環期 PGCs において発現が高く、一方で E4.5 以降の予定生殖腺領域に定着した後のステージでは発現が低下しており、早いステージの PGCs において特に高発現している遺伝子であることが明らかとなった (図 2D)。さらに様々な系統のニワトリ胚より樹立した培養 PGCs について *ENS-1/ERNI* の発現量を qRT-PCR により定量したところ、培養 PGCs の樹立効率と *ENS-1/ERNI* の発現量には正の相関関係があることが明らかとなった (図 2E,F)。これらの結果より *ENS-1/ERNI* 遺伝子は、ニワトリ PGCs の培養の成否を図るための新たなマーカー遺伝子として使用できると考えられた。

## (ii) 名古屋種 PGCs の培養・凍結保存

### 【材料及び方法】

愛知県農業総合試験場で保有している名古屋種のうち NGY1 系統および NGY3 系統の種卵を供試した。名古屋種 PGCs を得るため、種卵を 52~54 時間ふ卵し、ハンバーガーハミルトンの発生段階 14~15 の胚から PGCs が含まれる血液を採取した。血液中の PGCs は数が少ないため、採取した血液を個体ごとにマルチウェルプレートへ播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。なお、培養には Whyte ら(2015)が開発した培地を一部改変したものをを用い、2~3 日おきに培地交換を行った。その後、株化した PGCs は遠心分離機を用いて回収し、細胞凍結保存液 500  $\mu$ L 中に懸濁してからクライオチューブで保存した。クライオチューブは、凍結処理容器を用いて -80°C フリーザーで緩慢凍結させた後、液体窒素素内で保存した。なお、PGCs の培養・凍結保存の流れを図 3 に示した。

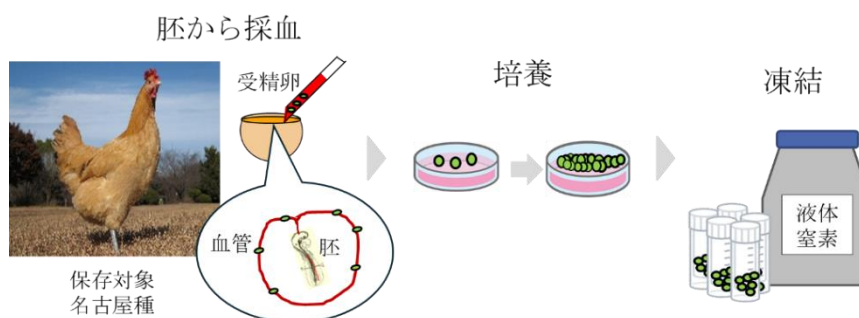


図3 名古屋種 PGCs の培養・凍結保存の流れ

### 【結果及びまとめ】

農業総合試験場における名古屋種 PGCs 培養の結果を表 1 に示した。培養した 15 個体のうち PGCs の増殖がみられたのは 9 個体 (60%) であった。また、9 個体のうち株化した個体は 5 個体で、全体の 33.3% であった。PGCs が増殖したものの株化しなかった 4 個体は培養 10 日目以降でコロニーが観察されたが途中で消失した。株化まで至らなかった理由の一つとしては、培養時の温度管理が不安定だった可能性が考えられた。ニワトリ PGCs は温度変化に弱いことが知られている。農業総合試験場では、倒立顕微鏡下での PGCs 観察及び培地交換で長時間 CO<sub>2</sub> インキュベーターから取り出したことで、培地の温度が低下し増殖が止まったと考えられた。試験の後半では作業時の室温を一定に保ち作業時間を短縮したことで株化率が上昇した。

以上のことから、培地の温度が低下しないよう実験室内等の温度管理に特に注意することで、農業総合試験場でも名古屋種 PGCs の培養・凍結保存が可能であることが明らかとなり、5 個体分の名古屋種 PGCs を保存することができた。

今後は PGCs の凍結保存数を増やすとともに、名古屋種についても(i)で明らかとなった *ENS-1/ERNI* 遺伝子の発現量を調べ培養の効率化を目指したい。

表 1 名古屋種 PGCs の培養・凍結保存

|           | 増殖した<br>個体割合 (%) | 株化率<br>(%) |
|-----------|------------------|------------|
| 名古屋種 PGCs | 60.0             | 33.3       |

n=15