

農業生物資源ジーンバンク事業  
動物遺伝資源部門  
平成 20 年度完了委託課題報告集  
(2010 年 1 月)

目次

A. 新規特性

1. 牛属のプリオン遺伝子構造の多様性解析とその育種への応用 (平成 18~20 年度)  
鹿児島大学 農学部生物生産学科 家畜育種研究室
2. 家畜・家禽の行動特性に関与する遺伝子の解析 (平成 18~20 年度)  
岐阜大学 応用生産科学部応用動物科学コース 動物遺伝学研究室

B. 長期保存

1. 日本鶏の始原生殖細胞による超低温保存と再生技術の効率化 (平成 18~20 年度)  
農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所 家畜育種増殖研究チーム
2. カイコ遺伝資源の凍結保存法の開発 (平成 18~20 年度)  
大日本蚕糸会 蚕業技術研究所人工飼料チーム

## A. 新規特性

### 1. 牛属のプリオン遺伝子構造の多様性解析とその育種への応用

鹿児島大学農学部家畜育種学研究室 前田芳實

BSE(牛海綿状脳症)とは、TSE(伝達性海綿状脳症：Transmissible Spongiform Encephalopathy)とよばれる病気の1つであり、未だ十分に解明されていない伝達因子が関係する。本疾病は、ウシの脳にスポンジ状の変化を起し、起立不能等の症状を示す遅発性かつ悪性の中樞神経系の疾病であり、2年から8年の潜伏期間を経て発症し、発症後2週間から6ヶ月で死に至らしめる。BSEは1986年にイギリスで最初に報告され、その後、表1-1に示すように、イギリスを中心にヨーロッパで広く発生した。わが国でも2001年に初めて発症牛が発見され、2009年10月現在で合計35頭の発生報告がある(<http://niah.naro.affrc.go.jp/disease/bse/count.html>)。本疾病は、ヒトの変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)との関連性がある点で問題である。

BSEは世界の肉牛生産と消費にとって大きな脅威であるが、BSE問題を根本から解決する方法は見いだされていない。しかし、その基本的解決の糸口になると思われるいくつかの発見がある。トランスジェニックマウスを使った実験でプリオン遺伝子(*PRNP*)の第3エクソンにあるオクタペプタイドリピートの反復回数はBSE発症との間に重要な関係があることが知られている(Brun *et al.*, 2007)。他方、Sander *et al.* (2004)やSeabury *et al.* (2004)はBSEの感受性と*PRNP*の遺伝子発現制御領域(プロモーター)中に見られる2箇所(挿入/欠失(indel)多型の頻度分布との間に有意な関連を報告した。これら多型が遺伝子発現に与える影響が、培養細胞とレポーター遺伝子を用いたプロモーター解析により明らかにされた(Sander *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2008)。以上、これらの遺伝子構造の多様性はBSE抵抗性牛の選抜育種の可能性を示すものである。

わが鹿児島県を含む南九州地域は、全国一の畜産地帯であり、家畜遺伝資源が豊富な地域である。例えば、和牛では鹿児島県で黒毛和種、熊本県で褐毛和種が、在来牛では鹿児島県で口之島野生化牛が飼養されており、平成21年2月1日現在の畜産統計によると、その飼養頭数は黒毛和種で鹿児島県が、褐毛和種で熊本県が全国一である([http://www.maff.go.jp/toukei/sokuhou/data/siyou\\_doukou09/siyou\\_doukou09.pdf](http://www.maff.go.jp/toukei/sokuhou/data/siyou_doukou09/siyou_doukou09.pdf))。さらに、平成19年度の肉用牛生産額は鹿児島県が全国一の816億円(全国シェアで14.7%)であり、肉用牛生産が最も盛んな地域である(平成19年農業産出額；<http://www.maff.go.jp/www/info/bunrui/bun03.html>)。黒毛和種は、見島牛や口之島野生化牛のような日本の各地域の在来牛を基礎に外国品種のデボン、ショートホーン、ブラウンスイス等を交雑し、選抜改良され、1944年に認定された品種である(橋口、2006a)。褐毛和種は、熊本県と高知県で飼養されていた在来の朝鮮牛を基礎とした赤牛に外国品種のシンメンタルと朝鮮牛とを交雑、改良して成立した品種である。とくに、熊本県の褐毛和種

は上記に加え、デボンも成立に関与したとされ、1944年に品種として認定され、現在に至る(橋口、2006b)。

そこで、本研究では、南九州の動物遺伝資源である黒毛和種と褐毛和種を中心にわが国の肉牛、乳牛等の品種および在来牛、ミャンマー国のミタン(*Bos frontalis*) 集団について、6か所の *PRNP* 多型部位の遺伝子型を決定し、ハプロタイプの推定を行い、これら集団のプリオン遺伝子多様性の調査を行った。さらに BSE と有意な関係がある *PRNP* の発現調節に関わる領域の変異が遺伝子発現量にどう影響するのかを検討するために、黒毛和種と褐毛和種の健常牛の延髄を用いてリアルタイム PCR により解析を行った。以上より、牛属の *PRNP* に関する基礎情報の集積とその機能解析を目的とした。

## 材料および方法

### 1. *PRNP* 遺伝子型の判定

供試牛は、褐毛和種 58 頭、口之島野生化牛 52 頭、見島牛 2 頭、ホルスタイン 65 頭、日本短角種 1 頭、ミタン 6 頭、ミタンと在来牛との交雑個体 6 頭であった。ゲノム DNA は血液もしくは精液から常法により抽出精製した。今回供試した *PRNP* 多型は、プロモーター領域の 23bp の indel、イントロン 1 上の 12bp の indel、翻訳領域中のオクタペプチドリピートの繰り返し数、プリオンタンパク質の 3 残基目のリシン⇒トレオニン(K3T)、154 残基目のセリン⇒アスパラギン(S154N)に変わる非同義的置換、3'非翻訳領域中の indel の 6 か所を調査した。遺伝子型の判定法は、Msalya *et al.* (2009)に従った。得られた遺伝子型から対立遺伝子頻度を推定した。また、集団中のハプロタイプの構成と頻度は Arlequin v.3.11 ソフトウェア(Excoffier *et al.* 2007)を用いて解析した。

### 2. 延髄検体における *PRNP* 遺伝子型と発現量の比較

本研究で供試した材料は、鹿児島市保健所食肉衛生検査所から黒毛和種 120 頭、熊本県食肉衛生検査所から褐毛和種 98 頭である。鹿児島県、熊本県の知事の承認の元、それらから延髄を採材し、エライザ法と呼ばれる方法で異常プリオンの有無を調べる BSE 検査(スクリーニング検査)を行い、陰性と認められたものを本研究に用いた。なお、解体処理の段階で、異常プリオンが蓄積されやすいとされる特定部位(脳、眼球、脊髄、回腸遠位部)は、すべての牛について他の部位を汚染しないよう取り除き、焼却処分している。BSE 検査後、得られた延髄は、液体窒素で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーで保存した。

延髄からのゲノム DNA 抽出は、Genomic DNA Purification Kit (Gentra systems, USA)を用いた。抽出されたゲノム DNA から *PRNP* の 23bp の indel と 12bp の indel の遺伝子型を解析し、diplotype としてまとめた。

得られた diplotype のうち、両品種で多数観察された----型と+-+-型を持つ黒毛和種 19 頭、褐毛和種 19 頭の合計 38 頭の延髄を遺伝子発現解析に用いた。遺伝子発現解析には、リアルタイム PCR を行った。内部標準遺伝子には、全ての細胞に普遍的に発現するベータアクチン遺伝子 (*ACTB*) を用いた。

RNA 抽出には、TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, USA)を用いた。RNeasy-Free DNase Set(50) (QIAGEN, JAPAN)を用いて、抽出した RNA 中に含まれる不要なゲノム DNA を取り除き、全 RNA を精製した。逆転写反応は、AMV Reverse Transcriptase (Promega M5008, USA)とランダム 6mer プライマー(TAKARA, Otsu)で行った。リアルタイム PCRには、SYBR Green Realtime PCR Master Mixキット(QPK-201T, TOKOBO, JAPAN)を使用した。PCR 反応は、7300 Real Time PCR System(Applied Biosystems, JAPAN)を用いて、*PRNP*と *ACTB*を両方行った。反応は各検体 2 回行った。リアルタイム PCR 後、解析ソフトウェア(Sequence Detection Software Ver 1.4, Applied Biosystems, JAPAN)で増幅曲線と検量線を作成し、定量結果から発現量をサンプル間で比較した。リアルタイム PCR で得られた *PRNP*の増幅量は、内部標準として用いた *ACTB*の増幅量の値で割った数値を *PRNP*の遺伝子発現量( $E_x$ )とし、サンプル間の正確な比較を行った。統計解析には、SAS ソフトウェアの GLM プロシジャを用いて、diplotype (D)、品種(B)、性(S)、月齢(A)、diplotype と品種の交互作用(D×B)の効果を検定した。その統計モデルは、下記のとおりである。

$$\text{発現量}(E_x) = \text{全平均}(\mu) + \text{品種}(B) + \text{diplotype}(D) + \text{性}(S) + \text{月齢}(A) + \text{交互作用}(B \times D) + \text{誤差}(E)$$

## 結果と考察

### 1. 各集団の遺伝子構成

本研究で得られた各集団の遺伝子型と対立遺伝子頻度を Table1~6 に示した。また、推定されたハプロタイプとその頻度を Table7 に示した。

Table 1 プロモーターの 23bp の indel による遺伝子型と対立遺伝子頻度

集 団	n	遺伝子型			対立遺伝子頻度	
		++	+-	--	+	-
ホルスタイン	65	12	34	19	0.45	0.55
日本短角種	1	0	1	0	0.50	0.50
褐毛和種	58	7	20	31	0.29	0.71
見島牛	2	0	0	2	0.00	1.00
口之島野生化牛	52	0	0	52	0.00	1.00
ミタン	6	3	3	0	0.75	0.25
ミタン雑種	6	1	1	4	0.25	0.75

Table 2 イントロン 1 の 12bp の indel による遺伝子型と対立遺伝子頻度

集 団	n	遺伝子型			対立遺伝子頻度	
		++	+-	--	+	-
ホルスタイン	65	27	22	16	0.58	0.42
日本短角種	1	0	1	0	0.50	0.50
褐毛和種	58	9	20	29	0.33	0.67
見島牛	2	1	0	1	0.50	0.50
口之島野生化牛	52	0	0	52	0.00	1.00
ミタン	6	3	2	1	0.67	0.33
ミタン雑種	6	5	0	1	0.83	0.17

Table 3 オクタペプチドリピートによる遺伝子型と対立遺伝子頻度

集 団	n	遺伝子型観察数				対立遺伝子頻度		
		66	65	55	64	6	5	4
ホルスタイン	65	57	8	0	0	0.94	0.06	0.00
日本短角種	1	1	0	0	0	1.00	0.00	0.00
褐毛和種	58	58	0	0	0	1.00	0.00	0.00
見島牛	2	2	0	0	0	1.00	0.00	0.00
口之島野生化牛	52	52	0	0	0	1.00	0.00	0.00
ミタン	6	3	2	0	1	0.75	0.17	0.08
ミタン雑種	6	4	2	0	0	0.83	0.17	0.00

Table 4 3'非翻訳領域の14bpのindelによる遺伝子型と対立遺伝子頻度

集 団	n	遺伝子型			対立遺伝子頻度	
		++	+-	--	+	-
ホルスタイン	65	40	23	2	0.79	0.21
日本短角種	1	1	0	0	1.00	0.00
褐毛和種	64	28	18	18	0.58	0.42
見島牛	2	1	0	1	0.50	0.50
口之島野生化牛	52	52	0	0	1.00	0.00
ミタン	6	6	0	0	1.00	0.00
ミタン雑種	6	6	0	0	1.00	0.00

Table 5 K3Tによる遺伝子型と対立遺伝子頻度

集 団	n	遺伝子型			対立遺伝子頻度	
		KK	KT	TT	K	T
ホルスタイン	65	65	0	0	1.00	0.00
日本短角種	1	1	0	0	1.00	0.00
褐毛和種	58	58	0	0	1.00	0.00
見島牛	2	2	0	0	1.00	0.00
口之島野生化牛	52	52	0	0	1.00	0.00

Table 6 S154Nによる遺伝子型と対立遺伝子頻度

集 団	n	遺伝子型			対立遺伝子頻度	
		KK	KT	TT	K	T
ホルスタイン	65	65	0	0	1.00	0.00
日本短角種	1	1	0	0	1.00	0.00
褐毛和種	58	58	0	0	1.00	0.00
見島牛	2	2	0	0	1.00	0.00
口之島野生化牛	52	52	0	0	1.00	0.00

Table 7 各ウシ集団の *PRNP* ハプロタイプとその頻度

ハプロタイプ	ホルスタイン (65)	日本短角種 (1)	褐毛和種 (58)	見島牛 (2)	口之島牛 (52)
23+ 12+ K 6 S 14+	0.28	0.50	0.12	-	-
23+ 12+ K 6 S 14-	0.10	-	0.03	-	-
23+ 12+ K 5 S 14+	0.03	-	-	-	-
23+ 12- K 6 S 14+	0.02	-	0.05	-	-
23+ 12- K 6 S 14-	0.02	-	0.13	-	-
23+ 12+ K 5 S 14-	0.01	-	-	-	-
23- 12+ K 6 S 14+	0.10	-	0.11	0.50	-
23- 12+ K 6 S 14-	0.04	-	0.09	-	-
23- 12+ K 5 S 14+	0.03	-	-	-	-
23- 12- K 6 S 14+	0.32	0.50	0.24	-	1.00
23- 12- K 5 S 14+	-	-	-	-	-
23- 12- K 6 S 14-	0.06	-	0.23	0.50	-
ハプロタイプ数	11	2	8	2	1

1) 4 か所の部位(23-bp, 12-bp, 14-bp indels、オクタペプチドリピートの繰り返し数)が多型的であり、K3T と S154N は多型が観察されなかった。2) 褐毛和種で 3 か所、ホルスタインで 4 か所、見島牛で 2 か所多型が観察されたが、口之島野生化牛はすべての部位で多型が観察されなかった。これは、口之島野生化牛の遺伝的変異性が低いという以前の報告(下桐ら、2006)と一致した。3) ミタンにおいてオクタペプチドの繰り返し数が 4 回の個体が発見された。オクタペプチドリピートの繰り返し数が 5 回のホモ型で BSE 牛がない(Hunter ら、1994)という報告があり、また、形質転換マウスを用いた実験で繰り返し数と BSE 潜伏期間との間に関係を見出している(Brun *et al.*, 2007)ため、ミタンは遺伝資源として貴重であると思われる。4) ハプロタイプ解析の結果、ハプロタイプ A 23- 12- K 6 S 14+ が共通に最も頻繁に観察されることが分かった。また、集団におけるハプロタイプの数、ホルスタインで 11 種類観察されたが、口之島野生化牛は、ハプロタイプ 23- 12- K 6 S 14+ で固定されていた。

## 2. 延髄検体における *PRNP* 遺伝子型と発現量の比較

各 indel 領域(23bp と 12bp)で得られる遺伝子型を黒毛和種 120 頭と褐毛和種 98 頭で決定した。その結果、23bp の indel の遺伝子型では黒毛和種で ++ 型 10 頭、+- 型 36 頭、-- 型 74 頭となり、褐毛和種で ++ 型 19 頭、+- 型 49 頭、-- 型 30 頭となった。12bp の indel の遺伝子型では、黒毛和種で ++ 型 28 頭、+- 型 45 頭、-- 型 47 頭となり、褐毛和種で ++ 型 23 頭、+- 型 46 頭、-- 型 29 頭となった。これら 2 種類の indel を用いた遺伝子型判定の結果を diplotype としてまとめた(Table 8)。

Table 8 黒毛和種と褐毛和種における diplotype の種類と観察数

diplotype 23bp 12bp	黒毛和種	褐毛和種	合計
++ ++	6	16	22
++ +-	0	3	3
++ --	4	0	4
+- ++	12	7	19
+- +-	21	38	59
+- --	3	4	7
-- ++	10	0	10
-- +-	24	5	29
-- --	40	25	65
合計	120	98	218

黒毛和種と褐毛和種の間でそれら diplotype の構成を比較すると、ほとんどの diplotype において差が見られることが分かった。例えば、+++型では、黒毛和種が 0 頭であるのに対し、褐毛和種で 3 頭となった。また、++-型と--++型では、褐毛和種が 0 頭であるのに対し、黒毛和種で 4 頭と 10 頭となった。また、両品種でともに多数観察されたのは、----型 65 頭と+-+-型 59 頭であった。----型では、その保有頭数が黒毛和種で 40 頭、褐毛和種で 25 頭であり、+-+-型では、その保有頭数が黒毛和種で 21 頭、褐毛和種で 38 頭であった。以上、本研究で用いた 2 種類の indel 領域による diplotype 構成は、黒毛和種と褐毛和種の間で品種間差が認められることが分かった。

黒毛和種と褐毛和種でともに多数観察された diplotype----型と+-+-型との間で PRNP の遺伝子発現量を比較した。PRNP の遺伝子発現量を、集団(B)、性(S)、月齢(A)、diplotype (D)ごとにまとめたものを Table 9 に示した。最も PRNP の発現量が多かったのは、diplotype----型、雄、24 ヶ月齢の褐毛和種の  $0.291 \pm 0.090$  で、最も少なかったのは、diplotype+-+-型、雌、27 ヶ月齢の黒毛和種の  $0.061 \pm 0.002$  であった。また、diplotype に関係なく、どの個体においても褐毛和種の方が黒毛和種に比べ高い発現量を示した。得られたデータから各項目の効果を統計解析により検討した。

Table 9 PRNP の遺伝子発現量

品種	性	月齢	diplotype	n	平均	標準誤差
黒毛和種	♀	27	+ - + -	4	0.061	0.002
黒毛和種	♂	30	+ - + -	5	0.084	0.014
褐毛和種	♀	24	+ - + -	3	0.181	0.018
褐毛和種	♂	24	+ - + -	3	0.213	0.016
褐毛和種	♂	25	+ - + -	3	0.218	0.019
黒毛和種	♀	27	- - - -	5	0.105	0.028
黒毛和種	♂	30	- - - -	5	0.083	0.009
褐毛和種	♀	24	- - - -	3	0.240	0.026
褐毛和種	♂	24	- - - -	3	0.291	0.090
褐毛和種	♂	25	- - - -	4	0.263	0.043

SAS の GLM Procedure を用いて、diplotype (D)、品種(B)、性(S)、月齢(A)、diplotype と品種の交互作用(D×B)の効果を検定した。その結果、PRNP の遺伝子発現量は diplotype 間で 5%水準、品種間で 0.1%水準の有意差が認められたが、性(S)、月齢(A)、交互作用(D×B)の要因では有意差は認められなかった。そこで有意差の得られた diplotype 間と品種間で、それぞれ PRNP の発現量の違いを Figure1 に図示した。

diplotype 間では、----型の PRNP 遺伝子発現量が+-+-型よりも 5%水準で有意に高かった。すなわち、黒毛和種で----型が  $0.094 \pm 0.046$ 、+-+-型が  $0.074 \pm 0.025$  であり、褐毛和種で----型が  $0.265 \pm 0.093$ 、+-+-型が  $0.204 \pm 0.032$  であり、どちらの品種でも diplotype 間で 20%程の発現量の違いが認められた。これらの結果は、Sander

*et al.* (2005) や *Xue et al.*(2008)によって報告された培養細胞とレポーター遺伝子を用いたプロモーター解析の結果と同じ傾向を示した。つまり、プロモーター領域とイントロン領域のindelが、欠失型(-)の方が挿入型(+)よりも *PRNP* 遺伝子発現量が多いことが *in vivo* で示された。しかし、プロモーター領域(23bp)とイントロン領域(12bp)のどちらか一方の挿入の変異(+)

が遺伝子発現に効果を与えるのか、もしくはプロモーター領域(23bp)とイントロン領域(12bp)の挿入の変異(+)が共同で遺伝子発現に効果を与えるのかを特定できなかったため今後検討する必要がある。

品種間では、褐毛和種の *PRNP* 遺伝子発現量は  $0.236 \pm 0.076$  で、黒毛和種の  $0.085 \pm 0.038$  より 0.1%水準で有意に高く、約 2 倍の発現量の違いが認められた。しかしながら、得られた品種間差については、採材した延髄の場所の違いなどが原因で生じた可能性が考えられ、今後検討する必要がある。そのためには、他の遺伝子で発現量を定量し、同様な品種間差が得られないことを確認することが有効であると思われる。その後、品種間で *PRNP* の遺伝子発現量に違いをもたらす原因を調査すると同時に、ホルスタインなどの他の品種で同様の研究を行い、発現量の品種間差を検討することが重要である。ただ、これまでに発現量が黒毛和種より高かった褐毛和種で BSE 発症牛が得られていないことから、この 2 倍の差は発症期間に大きな影響は与えないと予想される。

以上、我々の研究は、1)ミタンで *PRNP* のオクタペプチドリピート 4 回の個体がいること、2) 延髄での *PRNP* 遺伝子発現量が遺伝変異によって影響することなど、BSE に遺伝的になりにくい牛を構築する上で基礎的かつ重要な知見が得られたと考えられる。家畜の遺伝的多様性を維持することは、プリオン遺伝子の変異性にも影響する。動物遺伝資源の保存は、BSE 等の疾病対策等にも有効になるとと思われる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴重なサンプルを提供して下さいました独立行政法人農業生物資源研究所、鹿児島県大口育成牧場、鹿児島市保健所食肉衛生検査所、熊本県食肉衛生検査所の皆様に深く感謝致します。

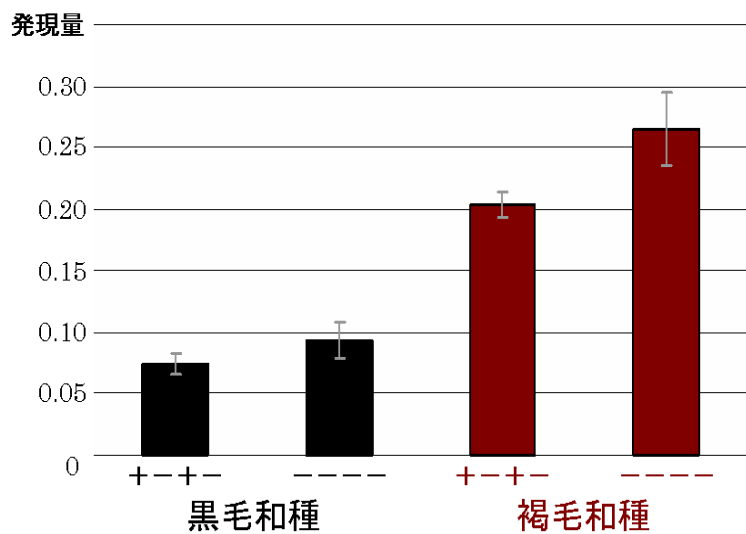


Figure 1 diplotype 間と品種間での *PRNP* 遺伝子発現量の比較

## 参考文献

- Brun A, Gutiérrez-Adán A, Castilla J, Pintado B, Díaz-San Segundo F, Cano MJ, Alamillo E, Espinosa JC, Torres JM. 2007. Reduced susceptibility to bovine spongiform encephalopathy prions in transgenic mice expressing a bovine PrP with five octapeptide repeats. *Journal of General Virology* **88**:1842-1849.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2007. Arlequin ver 3.11: An Integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary bioinformatics online; [cited 28 February 2008] Available from URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>
- 橋口 勉 (2006a) I ウシ 003 褐毛和種. 正田陽一編集, 世界家畜品種事典, pp. 3. 東洋書林, 東京都新宿区.
- 橋口 勉 (2006b) I ウシ 054 黒毛和種. 正田陽一編集, 世界家畜品種事典, pp. 20-21. 東洋書林, 東京都新宿区.
- Msalya G, Shimogiri T, Okamoto S, Kawabe K, Minezawa M, Namikawa T, Maeda Y. 2009. Gene and haplotypes polymorphisms of the Prion gene (*PRNP*) in Japanese Brown, Japanese native and Holstein cattle, *Animal Science Journal* **80**: 520-527.
- Sander P, Hamann H, Pfeiffer I, Wemheuer W, Brenig B, Groschup MH, Ziegler U, Distl O, Leeb T. 2004. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (*PRNP*) in German cattle breeds. *Neurogenetics* **5**: 19-25
- Seabury CM, Womack JE, Piedrahita J, Derr JN. 2004. Comparative *PRNP* genotyping of U.S. cattle sires for potential association with BSE. *Mammalian Genome* **15**: 828-833.
- 下桐 猛, 奥村史彦, 龍野巳代, 花田博之, 伊村嘉美, 河邊弘太郎, 岡本 新, 前田芳實. 2006. AFLP を用いた口之島野生化牛の遺伝的特異性. 鹿児島大学農学部附属農場研究報告 **29**: 13-15.
- Xue G, Sakudo A, Kim CK, Onodera T. 2008. Coordinate regulation of bovine prion protein gene promoter activity by two Sp1 binding site polymorphisms. *Biochemical Biophysical Research Communication* **372**: 530-535.

## A. 新規特性

### 2. 家畜・家禽の行動特性に関与する遺伝子の解析

岐阜大学応用生物科学部動物遺伝学研究室 伊藤慎一（／\*村山美穂）  
（\*平成 20 年度より、京都大学野生動物研究センターに所属）

#### 事業の成果

本研究では、家畜・家禽などの動物遺伝資源の血液、精液、体毛、羽根から DNA を抽出し、マイクロサテライトマーカーや、行動特性に関与する遺伝子などの多様性を解析した。

#### ・DNA 抽出

家畜では、(独) 農業生物資源研究所、(独) 畜産草地研究所で維持保存されている動物遺伝資源から、血液、精液、体毛、分与を受けた。ウシ 7 品種／総計 154 頭、ブタ 10 品種／総計 106 頭、スイギュウ 1 品種／計 1 頭、ヒツジ 1 品種／計 2 頭、ウサギ 1 品種／計 4 匹が分与され、DNA を抽出した。また天然記念物柴犬保存会、山陰柴犬育成会、日本スピッツ協会、奥州市牛の博物館の協力を得て、イヌおよびネコの性格アンケートを実施するとともに、口内細胞または体毛を採集した。イヌでは、柴犬の内種である山陰柴 23 頭と信州柴 10 頭、および家庭犬の 19 品種合計 100 頭、また、ネコでは、岩手県奥羽市で飼われている 158 匹の性格アンケートを実施するとともに、試料を採集し、DNA を抽出した。また、長野県飯田市内では、ネコ 68 個体とイヌ 120 個体について同様の性格アンケートの実施と、試料を採取し、DNA を抽出した。さらに、ガーナ大学からの日本学術振興会特別研究員 Kayang 博士の協力も得て、ガーナ国内の 3 地域からイヌ 76 個体の試料を採取した。

家禽では、ダチョウ処理場（岐阜県揖斐川町）、日本オーストリッチ事業協同組合（東京都）、(有) オーステックジャパン（北海道網走郡大空町）、蓋井島エミュー牧場（山口県下関市蓋井島）、稲富エミューふれあい牧場（北海道網走市）、愛知県農業総合試験場、(独) 畜産草地研究所、(独) 農業生物資源研究所、(株) 飛騨高山オーストリッチ（岐阜県高山市）、(有) 石黒農場（岩手県花巻市）、掛川花鳥園（静岡県掛川市）、日本きじ牧場（福島県いわき市）の協力を得て、ダチョウ計 96 羽、エミュー計 117 羽、ニワトリ計 280 羽、ウズラ計 200 羽、ホロホロチョウ 100 羽、キジ 63 羽の血液または羽根の試料を採集し、DNA を抽出した。またガーナ国内のホロホロチョウ 100 羽、ダチョウ 80 羽の、試料を採取し、DNA を抽出した。

#### ・遺伝的多様性の解析

柴犬の内種間での遺伝的距離、および内種内での遺伝的多様性を、マイクロサテライトマーカーを指標として解析したところ、遺伝的距離および遺伝的多様性のいずれも、品種とほぼ同レベルであることがわかった。性格評価と遺伝子型の関連性については、ネコについては、アンドロゲン受容体の遺伝子型と「外向性」に弱い関連性が見出された。また、

イヌについては、セロトニントランスポーターの遺伝子型と「しつけのしやすさ」に弱い関連性が見出された。

ニワトリでは、モノアミノオキシダーゼ A 遺伝子 2 領域で、多型が見出され、調査した 5 品種間でアレル頻度間で統計的に高度な有意差が認められ、品種特有のアレルも見出された。静岡大学の竹内准教授との共同で、ヒヨコの衝動性との関連性を解析したが、有意な関連性は見出されていない。他の鳥類種でも、これらの領域の多型を、解析中である。ダチョウでは、マイクロサテライトマーカーを用いて、親子判定および集団の多様性解析を行ったところ、多様性が極めて高く、遺伝指標としてのマーカーの有効性が示された。エミューについては、6 マイクロサテライトマーカーを調査し、遺伝標識としては多型性の高い有効な 3 マーカーを見出した。キジについては、ニワトリ由来の 6 マイクロサテライトマーカーを調査し、遺伝標識としては多型性の高い有効な 1 マーカーを見出した。ガーナのイヌ、ニワトリ、ホロホロチョウ、ダチョウについて、マイクロサテライトマーカーを指標として、遺伝的多様性を解析したところ、地域集団間の遺伝的分化は小さいことが判明し、他方、日本の品種と比較すると大きな差があることがわかった。

#### オ 事業成果報告書の配布実績等

これまでに公表済の論文および総説・報告については、関係研究機関に、配布済である。

#### 【論文】

- 1) Maejima, M., Inoue-Murayama, M., Tonosaki, K., Matsuura, N., Kato, S., Saito, Y., Weiss, A., Murayama, Y. & Ito, S.: Traits and genotypes may predict the successful training of drug detection dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 107: 287-298, 2007.
- 2) 渡部あずさ、加藤佑美子、井上-村山美穂、唐澤豊、伊藤慎一：ダチョウにおける性別と遺伝的多様性。日本ダチョウ・走鳥類研究会誌 8:23-39,2007.
- 3) Minvielle, F., Gourichon, D., Ito, S., Inoue-Murayama, M. & Rivière, S.: Effects of the dominant lethal yellow mutation on reproduction, growth, feed consumption, body temperature, and body composition of the Japanese quail. *Poult. Sci.* 86: 1646-1650, 2007.
- 4) 村山美穂：オオカミからイヌへー行動に関与する遺伝子の変化。遺伝 61:66-69,2007.
- 5) 村山美穂：鳥類の羽毛色を制御する遺伝子。動物遺伝育種研究 35:77-82,2007.
- 6) 加藤佑美子、井上-村山美穂、川本芳、野澤謙、黒澤弥悦、北川均、佐々木榮英、伊藤慎一：ネコにおけるアンドロゲン受容体遺伝子 (AR) exon1 領域の多型。DNA 多型 15: 59-62, 2007.
- 7) 井上英治、井上-村山美穂、西田利貞、VIGILANT Linda、竹中修：野生チンパンジーの父子判定。DNA 多型 15: 54-58, 2007.
- 8) 村山美穂：イヌの行動を遺伝子から解明する。生物科学 58:148-156,2007.
- 9) Nishii, N., Takasu, M., Soe, O.K., Maeda, S., Ohba, Y., Inoue-Murayama, M. & Kitagawa, H.: Cloning, expression and investigation for polymorphisms of canine peroxisome proliferator-activated receptors. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 147: 690-697, 2007.

- 10) Miwa, M., Inoue-Murayama, M., Aoki, H., Kunisada, T., Hiragaki, T., Mizutani, M. & Ito, S.: *Endothelin receptor B2 (EDNRB2)* is associated with the *panda* plumage colour mutation in Japanese quail. *Anim. Genet.* 38: 103-108, 2007.
- 11) Gunnarsson, U., Hellström A.R., Tixier-Boichard, M., Minvielle, F., Bed'hom, B., Ito, S., Jensen, P., Rattink, A., Vereijken, A. & Andersson, L.: Mutations in *SLC45A2* cause plumage color variation in chicken and Japanese quail. *Genetics* 175:867-877,2007.
- 12) Hong, K.-W., Sugawara, Y., Hasegawa, H., Hayasaka, I., Hashimoto, R., Ito, S. & Inoue-Murayama, M.: A new gain-of-function allele in chimpanzee tryptophan hydroxylase 2 and the comparison of its enzyme activity with that in humans and rats. *Neurosci. Lett.* 412: 195-200, 2007.
- 13) Inoue, E., Inoue-Murayama, M., Takenaka, O. & Nishida, T.: Wild chimpanzee infant urine and saliva sampled noninvasively usable for DNA analyses. *Primates* 48: 156-159, 2007.
- 14) Hong, K.-W., Iwatsuki, H., Takenaka, O., Hayasaka, I., Murayama, Y., Ito, S. & Inoue-Murayama, M.: Comparative analysis of estrogen receptor gene polymorphisms in apes. *Primates* 48: 151-155, 2007.
- 15) Hiragaki, T., Inoue-Murayama, M., Miwa, M., Fujiwara, A., Mizutani, M., Minvielle, F. & Ito, S.: *Recessive black* is allelic to the *yellow* plumage locus in Japanese quail and associated with a frameshift deletion in the *ASIP* gene. *Genetics* 178: 171-175, 2008.
- 16) Nadeau, N., Minvielle, F., Ito, S., Inoue-Murayama, M., Gourichon, D., Follett, S., Burke, T. & Mundy, N.: Characterization of Japanese quail *yellow* as a genomic deletion upstream of the avian homologue of the mammalian *ASIP (agouti)* gene. *Genetics* 178: 177-186, 2008.
- 17) Inoue-Murayama, M., Hibino, E., Iwatsuki, H., Inoue, E., Hong, K.-W., Nishida, T., Hayasaka, I., Ito, S. & Murayama, Y.: Interspecies and intraspecies variations in the serotonin transporter gene intron 3 VNTR in nonhuman primates. *Primates* 49: 139-142, 2008.
- 18) 井上英治、井上一村山美穂、西田利貞、VIGILANT Linda、竹中修：野生チンパンジー集団における Y-STR 多型。DNA 多型 16: 21-24, 2008.
- 19) Hong, K.-W., Hayasaka, I., Murayama, Y., Ito, S. & Inoue-Murayama, M.: Comparative analysis of monoamine oxidase intronic polymorphisms in primates. *Gene* 418: 9-14, 2008.
- 20) Inoue, E., Inoue-Murayama, M., Vigilant, L., Takenaka, O. & Nishida, T.: Relatedness in wild chimpanzees: the influence of paternity, male philopatry and demographic factors *Am. J. Phys. Anthropol.* 70: 62-68, 2008.
- 21) Hong, K.-W., Inoue-Murayama, M., Nakamura, A., Nagao, K., & Ito, S.: Characterization of two microsatellites in chicken monoamine oxidase A. *Anim. Sci. J.* 79: 641-643, 2008.
- 22) 牧拓也、井上一村山美穂、HONG Kyung-Won、井上英治、前島雅美、神作宜男、田名部雄一、伊藤慎一：マイクロサテライトマーカーによる柴犬3内種の遺伝的多様性と類縁関係。動物遺伝育種研究 36: 95-104, 2008.
- 23) Weiss, A., Inoue-Murayama, M., Hong, K.-W., Inoue, E., Udono, T., Ochiai, T., Matsuzawa, T., Hirata, S., King, J. E.: Assessing chimpanzee personality and subjective well-being in Japan. *Am. J. Primatol.* 71: 283-292, 2008.
- 24) Inoue-Murayama, M.: Genetic polymorphism as a background of animal behavior (review). *Anim. Sci. J.* 80: 113-120, 2009.

- 25) Takeuchi, Y., Hashizume, C., Arata, S., Inoue-Murayama, M., Maki, T., Hart, B. L. & Mori, Y.: An approach to canine behavioural genetics employing guide dogs for the blind. Anim. Genet. 40: 217-224, 2009.
- 26) Takeuchi, Y., Kaneko, F., Hashizume, C., Masuda, K., Ogata, N., Maki, T., Inoue-Murayama, M., Hart, B. L. & Mori Y.: Association analysis between canine behavioural traits in the Shiba Inu breed and genetic polymorphisms. Anim. Genet. 40: 616-622, 2009.
- 27) Kayang, B. B., Inoue, E., Maki, T., Ito, S., Kansaku, N., Tanabe, Y. & Inoue-Murayama, M.: Genetic analyses of Ghanaian dogs: diversity and relationships with other breeds. DNA Polymorphism 17: 55-62, 2009.

【総説・報告】

- 1) 村山美穂：遺伝子を通じた動物との対話。『ナチュラルヒストリーの時間』。大学出版部協会（編）、大学出版部協会（東京）(ISBN978-4-903943-00-8), pp.112-115, 2007（共著）。
- 2) 村山美穂：フィールドワークとゲノム科学をつなぐ。科学 79: 796, 2008.
- 3) 村山美穂：個性と普遍性。生物科学 60 (1): 19-20, 2008.
- 4) 村山美穂：大型類人猿の遺伝的多様性。第 52 回プリマーテス研究会記録 28-31, 2008.
- 5) 村山美穂：ネコの性格を，遺伝子から探る。牛のはくぶつかん 32: 4, 2008.

## B. 長期保存

### 1. 日本鶏の始原生殖細胞による超低温保存と再生技術の効率化

田上貴寛<sup>1</sup> 中村隼明<sup>1,2</sup> 武田久美子<sup>3</sup> 葦澤圭二郎<sup>1</sup>

1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所 家畜育種増殖研究チーム(育種素材グループ)

2 信州大学大学院総合工学系研究科

3 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所 高度繁殖技術研究チーム(育種素材グループ)

#### 要約

受精卵の凍結保存が困難である鳥類では、細胞レベルで遺伝資源を長期保存する方法として、始原生殖細胞(primordial germ cells: PGC)凍結技術およびキメラ世代を介した個体再生技術が開発されている。本課題では日本の生きた文化財であり様々な用途に利用されている日本鶏のうち熊本種、原種天草大王、会津地鶏、声良および岐阜地鶏を対象に PGC の収集および凍結保存を行なった。また、PGC からの遺伝資源再生効率を上昇させるため、キメラニワトリ作製時における宿主胚のもつ内在性 PGC を減少させる方法を開発した。PGC が血管中を循環している培養 2.5 日胚の血液を除去した場合は、6 日胚における PGC 数は有意に少なくなり、無処置区の約半数までニワトリ胚の内在性 PGC を除去する効果が認められた。さらに効果的な方法として、ブスルファン徐放性乳化液を卵黄内へ投与することにより、無処置区の 3%未満にまで PGC を減少させることが出来ることが明らかとなった。また、ブスルファン投与時期を培養 0 時間目と 24 時間目で比較した場合、ドナー PGC への生存性に影響が少ない投与時期は培養 0 時間目であった。

#### 緒言

日本において古代より飼養され、食用および愛玩用となっている日本鶏(17 種類が天然記念物)の品種の多くは飼養規模が小さく、また飼養数も減少しており、全国で 1000 羽以下となっているものがほとんどで、絶滅のおそれのある品種もある。このままでは食資源としての貴重な遺伝資源が失われるだけでなく、我が国の大切な文化が損なわれてしまう危険がある。さらに現在、高病原性鳥インフルエンザの発生した輸入相手国に対しては輸入停止の措置が執られ、国内の発生地域においては大規模な淘汰が行われている状況である。食料としての鶏肉・鶏卵の確保のためには、国内の優良な原種鶏や遺伝資源を確実に保存しておく必要がある。

家禽の品種・系統の維持は、これまで主として生体保存により行われてきた。しかしこの方法は施設が必要であるなど高コストであり、重大疾病発生等による喪失の危険がある。また、ほ乳類のような卵子や受精卵の凍結保存を行うことは、鳥類では巨大な卵黄の存在により困難である。

私たちはこれまでの研究から、凍結保存した始原生殖細胞 (primordial germ cells: PGC) からキメラ世代を介して遺伝資源を再生できることを示してきた<sup>1)</sup>。PGC とは卵子や精子の起源となる細胞であり、ニワトリでは発生のごく初期からその分化が始まっていると考えられている。私たちは、PGC の発生分化機構についても研究を行っており、受精後 24 時間の産卵直後の胚においては、その中央部に PGC が集中して存在することを明らかにした<sup>2),3)</sup>。そして血管系が発達する孵卵開始後約 40-70 時間目に PGC は血流中を循環しながら徐々に生殖巣の前駆組織である生殖隆起への移動を行い、孵卵 4 日目までには生殖隆起への PGC の移動は完了する。孵卵 8 日目からは雌雄それぞれの性に従って、卵子や精子への分化を開始する。

配偶子の保存が難しい鳥類において卵子や精子の起源となる PGC の保存は、種の保存を行うために有用であるが、キメラ世代を介するため必ずしも保存した PGC 由来の後代が効率的に得られないことが課題である。保存 PGC からの遺伝資源再生効率を上昇させるためには、移植される宿主胚の内在性 PGC を除去する方法が有効であると考えられる。これまで、ニワトリ胚に対する $\gamma$ 線および軟 X 線の照射<sup>4),5)</sup>、またはコンカナバリン A やほ乳類で生殖細胞を除去する効果を有するブスルファン等の薬剤投与<sup>6),7)</sup>により、ニワトリ胚の PGC を除去する方法が試みられてきたが、効率的な方法は確立されていなかった。

本研究課題では、ジーンバンクにおける家禽の細胞レベルでの保存事業推進に資するため、希少品種である日本鶏を対象に PGC の収集を行い、凍結保存を試みた。また、保存した PGC から効率的に個体再生を行うために、キメラニワトリ作製に用いる宿主胚の内在性 PGC 除去法の開発を試みた。そのために、PGC の局在する胚の一部を除去する外科的手法による PGC 除去効果を検討した。さらに、ブスルファンの乳化液を卵黄中へ投与する方法により、ニワトリ胚の PGC の除去効果ならびにその適切な投与時期を検討した。

## 方法

### 1) 日本鶏 PGC の収集保存

熊本種および原種天草大王(熊本県農業研究センター 畜産研究所 中小家畜研究室)、会津地鶏(福島県農業総合研究センター畜産研究所)および日本の天然記念物である声良鶏(青森県産業技術センター畜産研究所)、岐阜地鶏(茨城県畜産センター 養鶏研究室)について受精卵を収集した。これら受精卵は、孵卵器を用いて 38℃、湿度 60%および転卵角 90° で培養し、発生段階で stage 14-16<sup>8)</sup> となった 2.5 日目胚より血液を採取した。血液採取後の胚からは、簡易 DNA 抽出法<sup>9)</sup>を用いて DNA を抽出し、PCR 法を用いた性判別を行った。採取した血液は雌雄別に集合させ、Nycodenz を用いた PGC の分離を行った<sup>10)</sup>。分離した雌雄の PGC はそれぞれ凍結保護溶液中に移した後、緩慢凍結法により -80℃ に凍結し、液体窒素中に凍結保存した。異性の宿主に移植して作製されたキメラニワトリにおいては、ドナー PGC が受精可能な配偶子へ分化することは困難であることがわかっている<sup>11)</sup>。ドナー PGC から後代を得るためには、同性の宿主胚へ移植する必要がある。従って、本課題では PGC は雌雄に分けて凍結保存することとした。

## 2. 外科的手法による宿主胚からの PGC 除去技術の検討

0 日胚(stage X)<sup>12)</sup>において PGC が局在している明域中央部から 27G 注射針を用いて一部の組織を除去した(胚盤葉細胞明域中央部除去区)。また、PGC が血管内を循環している stage 14-15 の 2.5 日胚から全採血することにより血液中の PGC を除去することを試みた(血液除去区)。各処理胚は、体外培養法<sup>13)</sup>により培養を継続した後、6 日目胚の生殖巣に対して、生殖系列細胞特異的抗体である抗ニワトリ Vasa ホモログ(Cvh)抗体を用いたホルマウント免疫染色を行い、生殖巣における PGC 数を調べた。

## 3. 乳化ブスルファンによるレシピエント胚の内在性 PGC 除去法の検討

ニワトリ胚へ確実に薬剤効果を与えることを目的として、ブスルファンをジメチルホルムアミドに溶解した後に PBS で希釈し、等量のごま油と混合することで作製したブスルファンの徐放性乳化液 (busulfan sustained-release emulsion : BSRE) (75  $\mu$ g / 50  $\mu$ l)を 24 時間培養したニワトリ胚の卵黄中へ投与した<sup>14)</sup> (図 1)。BSRE 投与胚は、体外培養法により培養を継続した後、6 日目胚の生殖巣に対して、生殖系列細胞特異的抗体である抗 Cvh 抗体を用いたホルマウント免疫染色を行い、生殖巣における PGC 数を調べた。また BSRE 投与時間がドナー PGC の移動能や生存性に影響を与えるかを解析するため、BSRE を培養 0 時間目胚(stage X)および培養 24 時間目の胚に投与し、それぞれ培養 2.5 日目に赤色蛍光色素を付着させたドナー PGC を移植した。処理胚の 6 日目胚の生殖巣に対して Cvh 抗体を用いたホルマウント蛍光免疫染色を行い、生殖巣における赤色蛍光色素をもつドナー PGC 由来の細胞数および緑色蛍光色素を持つ全 PGC を比較することによって、生殖巣中の PGC におけるドナー PGC の割合を調べた。

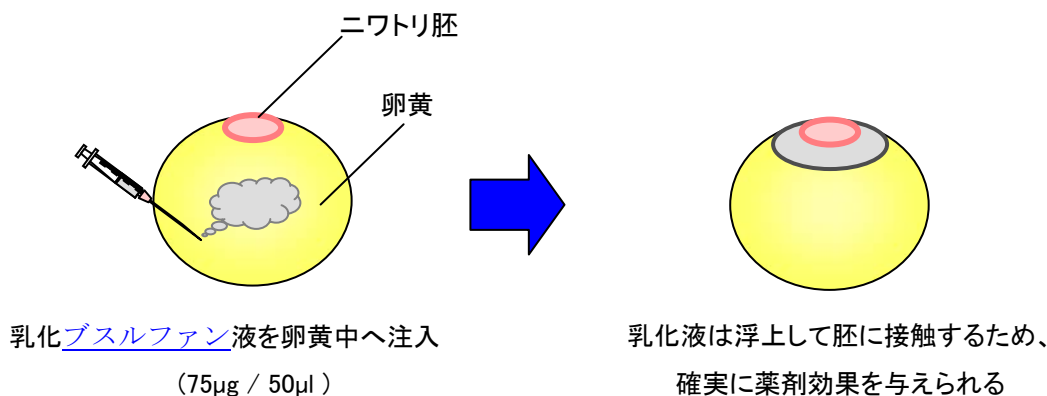


図1. 乳化ブスルファン液の卵黄内投与法およびその薬剤動態

平成 20 年度 畜産草地研究成果情報より引用

## 結果

### 1) 日本鶏 PGC の収集保存

熊本種 34 個、原種天草大王 32 個、会津地鶏 39 個、声良鶏 18 個および岐阜地鶏 64 個

の胚から PGC を収集した。収集した PGC は、品種、性別ごとに凍結保護溶液へ移した後、液体窒素中で凍結保存した。

## 2. 外科的手法による宿主胚からの PGC 除去技術の開発

各処理後の 6 日目生殖巣中における PGC 数は、無処理区(平均 1496 個)に対して、血液除去区(平均 760.9 個)では有意に少なく ( $P<0.05$ )、ニワトリ胚の内在性 PGC を除去する効果が認められた。一方、胚盤葉細胞明域中央部除去法(平均 1069.6 個)では、無処理区に比較して有意差はなく、効果は認められなかった。

## 3. 乳化ブスルファンによるレシピエント胚の内在性 PGC 除去法の検討

ブスルファン徐放性乳化液 (BSRE) を投与したニワトリ胚の生殖巣を解析した結果、無処理胚の PGC 数(平均 1307 個)に比較して BSRE 処理胚における PGC 数は平均 37.3 個であり、BSRE は、6 日目胚における生殖巣の PGC 数を無処置区の 3% 未満にまで減少させる効果があることが明らかとなった<sup>10)</sup> (図 2)。

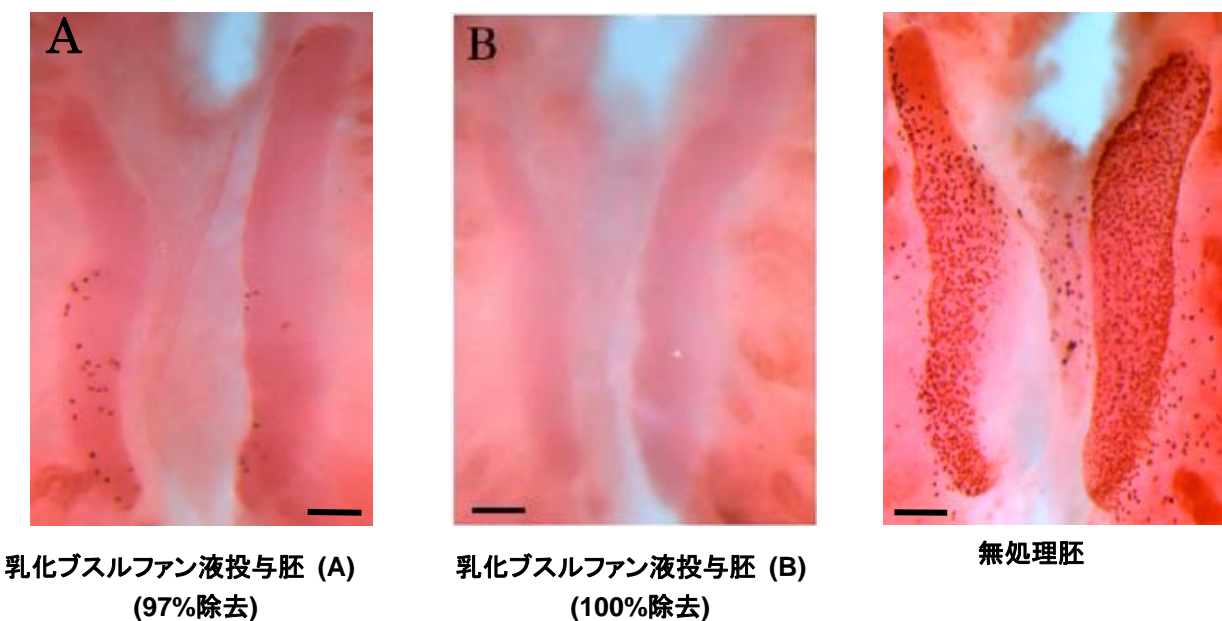


図 2. 乳化ブスルファン液を投与した 6 日目胚の生殖巣における始原生殖細胞  
(赤紫の点が始原生殖細胞)

平成 20 年度 畜産草地研究成果情報より引用

また BSRE 投与時間がドナー PGC の移動能や生存性に影響を与えるかを解析した。その結果、6 日目胚におけるドナー PGC が総 PGC 数に占める割合は無処理胚(平均 3.2%)に比較して、放卵直後に BSRE を投与した胚では平均 92.4%、培養 24 時間目投与胚平均 76.5% と両投与区とも有意に高かった。6 日目胚におけるドナー PGC 数について放卵直後投与区と培養 24 時間目投与区を比較した結果、培養 24 時間目投与区が平均 32.9 個であるのに対

して放卵直後投与区では平均 151.1 個と有意に多かった。

以上より、ブスルファンは徐放性乳化液にして卵黄内へ投与することにより内在性 PGC を安定的に除去する効果があることが明らかとなった。また、ドナーPGC 由来の後代の割合が高い生殖系列キメラの作出するためには、レシピエントとなる胚へ放卵直後に BSRE を投与することが最も有効であることが明らかとなった。

## 考察

私たちは、鳥類の遺伝資源を保存する手段として PGC の凍結保存が有効であることを実証してきた。それをふまえ、平成 15 年度より平成 20 年度までの農業生物資源ジーンバンク事業課題において尾長鶏、烏骨鶏等の天然記念物 9 品種を含む 12 品種の PGC を収集および保存した。今後も継続して品種および凍結保存細胞数を増加させていく予定である。しかし、鳥類遺伝資源の保存において、細胞による保存法はまだ補助的なものにとどまっている。これは本法が遺伝資源の保存・再生技術としては未熟であると考えられていることも一因である<sup>15)</sup>。凍結 PGC による遺伝資源の保存法を普及させるには、PGC の凍結保存技術およびキメラニワトリ作製技術の高度化と簡便化を図らねばならない。具体的には凍結融解後の細胞数の減少を防ぐ細胞凍結法の開発を行うこと、そして移植する PGC 由来の産子を効率的に得るため、キメラニワトリ作製において、宿主胚のもつ内在性 PGC を減少させることが重要である。

ほ乳類において生殖細胞を除去する効果を持つブスルファンは、ニワトリにおいても PGC 除去効果があると考えられ、古くから研究が行われてきた。しかしながら、これまでブスルファン投与したニワトリ胚で安定的に PGC が除去される胚や個体は得られてこなかった。今までの方法では卵黄内または卵白内に投与したブスルファンは直ちに分散してしまい、胚へ確実に効果を与えることは困難であった。私たちは本課題においてブスルファンをジメチルホルムアミドに溶解した後 PBS で希釈し、ごま油と混合することで作製した溶液を卵黄中へ投与するという簡便な方法により、安定的にニワトリ胚から除去する技術を開発した。これは乳化することによりブスルファン溶液の比重が軽くなり、卵黄頂部に存在する胚へ確実に薬剤を接触させて効果を与えることができることになったこと、また、乳化により徐放性を持たせることで比較的長く効果を持続させることができるようになったためであると考えられる。さらに本課題では、移植する PGC の生存性への影響が少ない BSRE の投与時期も決定することができた。従って、本課題で開発したブスルファン徐放性乳化液 (BSRE)卵黄内投与法は、キメラニワトリから移植した PGC 由来の後代を効率的に得るために非常に有用な方法として利用されることが期待される。

日本のニワトリのみならず、世界的にも食や羽毛の供給源または愛玩用として飼養されているニワトリ、ウズラ、アヒルといった家禽において、多くの種が絶滅の危機に瀕していることがわかってきた。2000 年に国連食糧農業機関(FAO)より発表された世界の農業動物遺伝資源の動向によると、世界中で家禽として利用される鳥類(1049 品種)の半分以上が絶滅または絶滅危惧種とされている<sup>16)</sup>。特に 1995 年から 1999 年までの間にその割合は

51%から 63%に増加した。食資源としての家禽品種の画一化が進んでしまうと、将来的に疾病や地球環境の変化に対応できなくなってくることが懸念されるため、家禽の遺伝的多様性を維持する必要性が高まってきた。本研究課題で開発された技術は、家禽の効率的な細胞レベルでの遺伝資源の保存を行う上で非常に有用となることが考えられる。今後は、この技術を基礎として、ウズラ、アヒル等の他の家禽における技術開発を行い、世界の家禽の遺伝資源保存に貢献していきたいと考える。

- 1) 田上貴寛、武田久美子、葦澤圭二郎 凍結保存したニワトリ始原生殖細胞からの遺伝資源再生法 畜産草地研究成果情報 No.5 p9-10. 2006.
- 2) Kagami H, Tagami T, Matsubara Y, Harumi T, Hanada H, Maruyama K, Sakurai M, Kuwana T and Naito M. 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. 1997.
- 3) Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko AR, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H and Tagami T. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poultry Science*, 86: 2182-2193. 2007.
- 4) Carsience RS, Clark ME, Gibbins AM, and Etches RJ. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117:669-675. 1993.
- 5) Atsumi Y, Tagami T, Kagami H and Ono T. Restriction of germline proliferation by soft X-ray irradiation of chicken embryos and its application to chimera production. *Journal of Poultry Science*. 45: 292-297, 2008.
- 6) Al-Thani R and Simkiss K. Effects of an acute in vivo application of concanavalin A on the migration of avian primordial germ cells. *Protoplasma* 161:52–57. 1991.
- 7) Song Y, D'Costa S, Pardue SL and Petite JN. Production of germline chimeric chickens following the administration of a busulfan emulsion. *Molecular Reproduction and Development*, 70: 438-444. 2005.
- 8) Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88: 49–92. 1951.
- 9) 田上貴寛、武田久美子、葦澤圭二郎、長嶺慶隆 ニワトリ組織からの簡便な DNA 抽出法 畜産草地研究成果情報 No.3 p7-8. 2004.
- 10) Zhao DF and Kuwana T. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *British Poultry Science*, 44: 30-35. 2003.
- 11) Tagami T, Kagami H, Matsubara Y, Harumi T, Naito M, Takeda K, Hanada H and Nirasawa K. Differentiation of female primordial germ cells in the male testes of chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Molecular Reproduction and Development*, 74: 68-75. 2007.
- 12) Eyal-Giladi H and Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: a

complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev Biol* 49:321-337. 1976.

- 13) Perry MM. A complete culture system for the chicken embryo. *Nature*, 331: 70-72. 1988.
- 14) Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Atsumi Y, Ito Y, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H and Tagami T. Increased proportion of donor primordial germ cells in chimeric gonads by sterilisation of recipient embryos using busulfan sustained-release emulsion in chicken. *Reproduction, Fertility and Development*, 20: 900-907. 2008.
- 15) Fulton JE and Delany ME. Poultry Genetic Resources--Operation Rescue Needed *Science* 300: 1667-1668. 2000
- 16) FAO. World Watch List for Domestic Animal Diversity. 3rd edition (Scherf BD ed.). Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome. 2000.

## B. 長期保存

### 2. カイコ遺伝資源の凍結保存法の開発

大日本蚕糸会蚕業技術研究所人工飼料チーム  
持田裕司

#### 研究の目的

カイコ遺伝資源の生殖質の凍結保存を目的として、保存技術の向上を図る

#### 結果概要

##### 無凍結の場合の卵巣移植

3齢卵巣を3齢幼虫に移植すると50%の産下蛾率が得られ、4齢卵巣を、3齢幼虫に移植した場合でも産下卵率は44.9%で、3齢卵巣を3齢幼虫に移植した場合に高い値が得られた。

##### 卵巣の液体窒素による凍結

ジメチルスルホキシド（グレース昆虫培地中）1.5Mを使用し、液体窒素の蒸気中に30分間、その後液体窒素に浸漬して30分間凍結した。最適凍結速度は1~2°C/分であった。

3 齢卵巣を 3 齢幼虫に移植すると 5.6%産下卵率が得られた。4 齢卵巣を 4 齢幼虫に移植した場合に 8.7%、5 齢卵巣を 5 齢幼虫に移植した場合に 1.8%、4 齢卵巣を 3 齢幼虫に移植した場合には 20%の産下卵が得られた。凍結卵巣移植の場合には 4 齢卵巣を 3 齢幼虫に移植した場合に高い値が得られた。

##### 精子の液体窒素による凍結

農業生物資源研究所のpndと特支2号の雄蛾の貯精嚢から精子を採取し、液体窒素により凍結した。その精子を融解し、雌蛾に人工授精したところ、19年度は受精卵は得られなかった。

##### 卵巣と精子を液体窒素で凍結した両生殖質から受精卵の作成

「ひたち×にしき」の 4 齢幼虫の卵巣を採取し液体窒素中に 24 時間凍結保存した卵巣を、凍結融解後に 3 齢宿主（w-2）に移植したカイコを人工飼料で飼育して、羽化した雌蛾に凍結精液を人工授精した。用いた精液は、w-2の雄蛾から採取し、液体窒素中で凍結し、37°Cで融解し精液を活性化処理した。また通常の「ひたち×にしき」の雌蛾に凍結融解精液を人工授精したところ、ほぼ自然交尾と変わらない受精卵が得られた（表-1:対照）。

3 回の反復試験では、羽化した雌蛾総数 88 蛾に凍結精液を人工授精して得られた産卵蛾数 8 蛾（9%）で、平均産下卵数 35 粒、受精率 60.4%であった（表-1）。産下された受精卵は正常卵色（黒卵）を示しており、移植卵巣の由来する卵であることが確認された。

#### 6. 研究成果の公表

竹村洋子・持田裕司 (2008) : カイコ遺伝資源の凍結保存 : カイコの生殖質凍結保存技術の現状と応用の可能性. 蚕糸・昆虫バイオテック, 77, (1) 9-16.

表-1 凍結卵巣移植した雌蛾に凍結精子を人工授精した産卵成績

実験区	移植頭数 (A)	発蛾頭数		受精卵産卵蛾数		平均産卵成績		
		(B)	(%)	(C)	(C/B) %	産下卵数 (粒)	受精卵数 (粒)	受精率 (%)
対照	10	10	100	10	100	516	503	97.5
1	27	25	92.6	2	8.0	54	47	88.0
2	36	34	94.4	3	8.8	25	11	40.3
3	29	29	100	3	10.3	27	14	53.0
平均	31	29	95.7	3	9.0	35	24	60.4

4 齢の凍結卵巣を液体窒素中に 24 時間凍結保存した; 融解後 3 齢幼虫に移植し, 羽化した雌蛾に凍結精子を人工授精した. 対照は, 通常の雌蛾に凍結精子を人工授精した.