

1. 緒言

1-1. ニワトリ遺伝資源とその保存の必要性

ニワトリの野生種は、インドから東南アジアにかけて、セキショクヤケイ (Red Junglefowl, *Gallus gallus*)、ハイイロヤケイ (Grey Junglefowl, *G. sonneratii*)、セイロンヤケイ (Ceylon Junglefowl, *G. lafayettii*)、およびアオエリヤケイ (Green Junglefowl, *G. varius*) の4種が現存している。このうち、現在の家禽としてのニワトリは、セキショクヤケイが約5,000年前に家畜化されたものと考えられている (田先ら, 1988; Crawford, 1995)。これらヤケイは、希少な野生動物としてだけでなく、進化系統学や育種学の研究対象として重要である。

家畜化されたニワトリは世界各地に広まり、肉や卵などの生産のほか、神事における生贄、闘鶏、愛玩用など多様な目的に用いられた。そうした中で、それぞれの環境や文化に順応し、その土地固有の品種 (在来品種) が形成された (岡本, 2001)。現在、ニワトリの品種は200を越えると言われており (岡本, 2001)、このような遺伝的多様性の大きさは、他の家畜、家禽と比べても群を抜くものである。FAOの統計によると (FAO, 2000)、現在、世界で飼育されているニワトリは約147億羽であるが、その約半分にあたる73億羽がアジア地域に集中しており、アジアはニワトリ遺伝資源の宝庫と言える。在来種の中には、生産効率は低いものの、肉質や食味の点で優れた形質を有していたり、暑熱環境や粗放な飼育環境に対する適応性、風土病などに対する耐性など、将来の品種改良において利用価値の高い性質を持つものも多く存在し、将来にわたって保存すべき重要な遺伝資源であると認識されている。また、在来品種は、その土地の文化的遺産として、教育的、

文化的、および歴史的見地から、保存する必要性がある。

ニワトリの近代的育種の歴史は浅く、1950年代までは近親交配によって数多くの特徴ある系統が作出され、それら純系による生産が主流であった。その後、品種間あるいは系統間の三元、四元交雑種が実用鶏として用いられるようになり、現在では特に経済性の高い特定の組み合わせによる交雑種が市場の大部分を占めている (Goweand Fairfull, 1995)。今日の極めて高いレベルの生産性を継続していくためには、この交雑種を作出するための原種、原々種を確実に維持・保存していく必要がある。

近年、実験室レベルでの近親交配や突然変異の利用などにより、特定の形質を持つ個体・系統が数多く作出されている。これらは、質的形質の機能解析や基礎的生命現象の機構の解明など生物学における基礎研究や、疾病モデル動物として医学の発展に寄与するものと考えられる。また、将来、発生工学的手法を用いてトランスジェニックニワトリやノックアウトニワトリなどの作出も期待されている (Delan and Pisenti, 1998)。このような研究分野における特殊な個体・系統も重要な遺伝資源である。

1-2. 始原生殖細胞(PGCs)を用いたニワトリ遺伝資源の保存法

多くの動物種では、精液 (Curry, 2000)、卵子 (Ledda *et al.*, 2001)および胚 (Massip, 2001; Dobrinsky, 2002)の凍結保存法が、確立している。これらの技術に、人工授精や胚移植などの繁殖補助技術を組み合わせることにより、効率的な遺伝資源の保存、および産子の生産が可能である。

一方、家禽類では、精液の凍結保存は可能であるが (柘田, 1991; Tajima *et al.*, 1992)、卵子および受精卵に関しては、極めて巨大な細胞であり豊富な卵黄を持っていることなどから、長期間の保存法は未だ開発されていない (内藤, 1991)。そこで、家禽独自の遺伝資源保存法として、始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells, PGCs) を用いる方法が考案された。PGCs とは、個体発生の初期段階で未分化胚細胞から分化し、将来、精祖細胞や卵祖細胞へと分化する生殖幹細胞である (片桐, 1982; 岡田・長濱 1996)。ニワトリ PGCs は、胚発生初期に胚盤葉上層から分化し (Eyal-Giladi *et al.*, 1981; Ginsburg, 1997)、ステージ 4 (Hamburger and Hamilton, 1951)において生殖三日月環で観察される (Swift, 1914; Clawson and Domm, 1969; England and Matsumura, 1993)。血管系が形成されると、PGCs は血管内に取り込まれ、血流に乗って胚体内を循環する (ステージ 12~16)。生殖領域において毛細血管が発達すると、PGCs はこの領域に集まり、アメーバ運動によって血管から抜け出し、生殖腺原基へ移住する (Kuwana, 1993; Kuwana and Rogulska, 1999)。

血管内を PGCs が循環する性質は鳥類に限られた特性であり、この特性を利用することで、PGCs の移植による生殖系列キメラの作製が可能となった。Yasuda *et al.* (1992)は、ニワトリ 2 日胚の血液から分離した PGCs をニホンウズラの 2 日胚血液中に移植し、移植後 24 時間以内に、移植されたニワトリ PGCs がウズラ胚の生殖腺に移住することを報告した。また、Tajima *et al.* (1993)は、白色レグホーン種とロードアイランドレッド種間で PGCs の移植を行った。移植された胚は孵化後性成熟まで飼育され、後代検定による移植 PGCs 由来産子の生産によって、生殖系列キメラであることが証明された。さらに、Naito *et al.* (1994)は、PGCs を液体窒素中に 4~5 ヶ月間保存し、融解後の生存率

が 94.2% であること、また、凍結融解 PGCs を用いて生殖系列キメラが作製されることを報告した。こうした一連の成果により、PGCs による家禽遺伝資源の保存が可能となった (Fig. 1-1)。

しかし、すでに個体数が少なくなった希少品種や、近親交配などにより繁殖性が低下した品種などでは、採取できる PGCs 数に限りがある。従って、このような品種の保存法としては十分とは言えず、更に効率的な遺伝資源保存法の開発が望まれている。

1-3. 体細胞核移植技術

近年、哺乳動物において体細胞核移植によるクローン動物作製の成功が相次いで報告されている。Wilmot *et al.* (1997) は、ヒツジの 9 日胚、26 日胚、および成畜の乳腺上皮細胞に由来する培養細胞の核を除核未受精卵に移植した。これを雌畜の子宮に移植したところ、いずれの体細胞を用いた場合にも正常な産子を得ることができた。以降、ウシ (Kato *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 1999)、ヤギ (Baguisi *et al.*, 1999)、マウス (Wakayama *et al.*, 1998)、ブタ (Polejaeva *et al.*, 2000)、ラ (Woods *et al.*, 2003)、ウマ (Galli *et al.*, 2003) についても同様に、体細胞由来のクローン動物が作製された。これらの報告により、一度分化してしまった体細胞の核も、脱分化し再び分化全能性を獲得できることが明らかとなった。

体細胞核移植は、遺伝資源の保存に極めて有効な技術であると考えられる。まず、培養細胞を核ドナーとして用いることにより、保存効率の飛躍的な向上が期待できる。また、一般的に、保存することが急を要する動物種はすでに個体数が減少しており、そのような集団では

近親交配や老化によって繁殖能力が低下していることが想像される。しかし、体細胞核レシピエントとして利用できる十分な数の卵子が近縁種、あるいは同種内の別の品種から準備できる場合、体細胞の利用はこのような問題の最善の解決策であると思われる。

また、体細胞核移植技術は、トランスジェニック動物の作製にも応用できる。Schnieke *et al.* (1997)は、ヒツジにおいて、ヒト血液凝固第Ⅸ因子遺伝子を導入した胎児性繊維芽細胞の核を除核未受精卵に移植し、生存産子の生産を報告した。Keefer *et al.* (2001)は、GFP (green fluorescent protein)遺伝子を導入した胎児性繊維芽細胞を核ドナーとして核移植を行い、トランスジェニック・ヤギを生産した。また、ウシおよびブタにおいて、GFP 遺伝子導入核移植胚における GFP 遺伝子の発現が確認された (Park *et al.*, 2001; Arat *et al.*, 2002)。

トランスジェニック動物は、遺伝子の機能や発現機構の解析、ヒト疾患モデルの作製など、分子生物学や医学の研究領域で応用される。また、生理活性物質などを、肉、乳、卵などの家畜生産物中に生産させることにより生産物の付加価値を高めるなど、新たな家畜の育種法としても期待される。

このように、体細胞核移植は、学術的、産業的に極めて価値の大きい技術であると言える。

1-4. 本研究の目的

このような体細胞核移植技術は、家禽への応用も期待されているが、核レシピエントとなる卵細胞は豊富な卵黄を持った極めて巨大な細胞であるため取り扱いが難しく、またその採取には鳥を屠殺し外科的に

開腹しなければならないことなどが障害となり、これまで研究が進んでいない。

しかし、PGCs を用いた生殖系列キメラの作製が開発されているニワトリでは、PGCs を核レシピエントとした核移植が可能であると考えられる (Fig. 1-2)。これまで、PGCs に核移植を行う試みは例がない。

核移植 PGCs を用いて生殖系列キメラを作成した場合、核移植 PGCs は、生殖腺において増殖し、最終的に精子あるいは卵子へ分化することが期待される。このような核移植 PGCs 由来の精子および卵子の受精によって生産された産子の遺伝情報は、理論上全て体細胞由来となる。ただし、PGCs は減数分裂時の相同染色体の交叉による遺伝子組み換え、およびそれぞれに遺伝子を組み換えられた精子・卵子による受精を経て個体へと発生するため、産子は、体細胞を供給した動物のクローン動物とはならない。しかし、このことは同時に遺伝的多様性を広げることに繋がり、遺伝資源の保存法として適していると考えられる。

そこで、本研究では、体細胞核移植ニワトリを作製するための基礎研究として、

- (1) 核レシピエントとなる除核 PGCs の作製
- (2) 体細胞核移植 PGCs の作製
- (3) 核移植 PGCs を用いた生殖系列キメラ胚の作製

の3点について検討した。

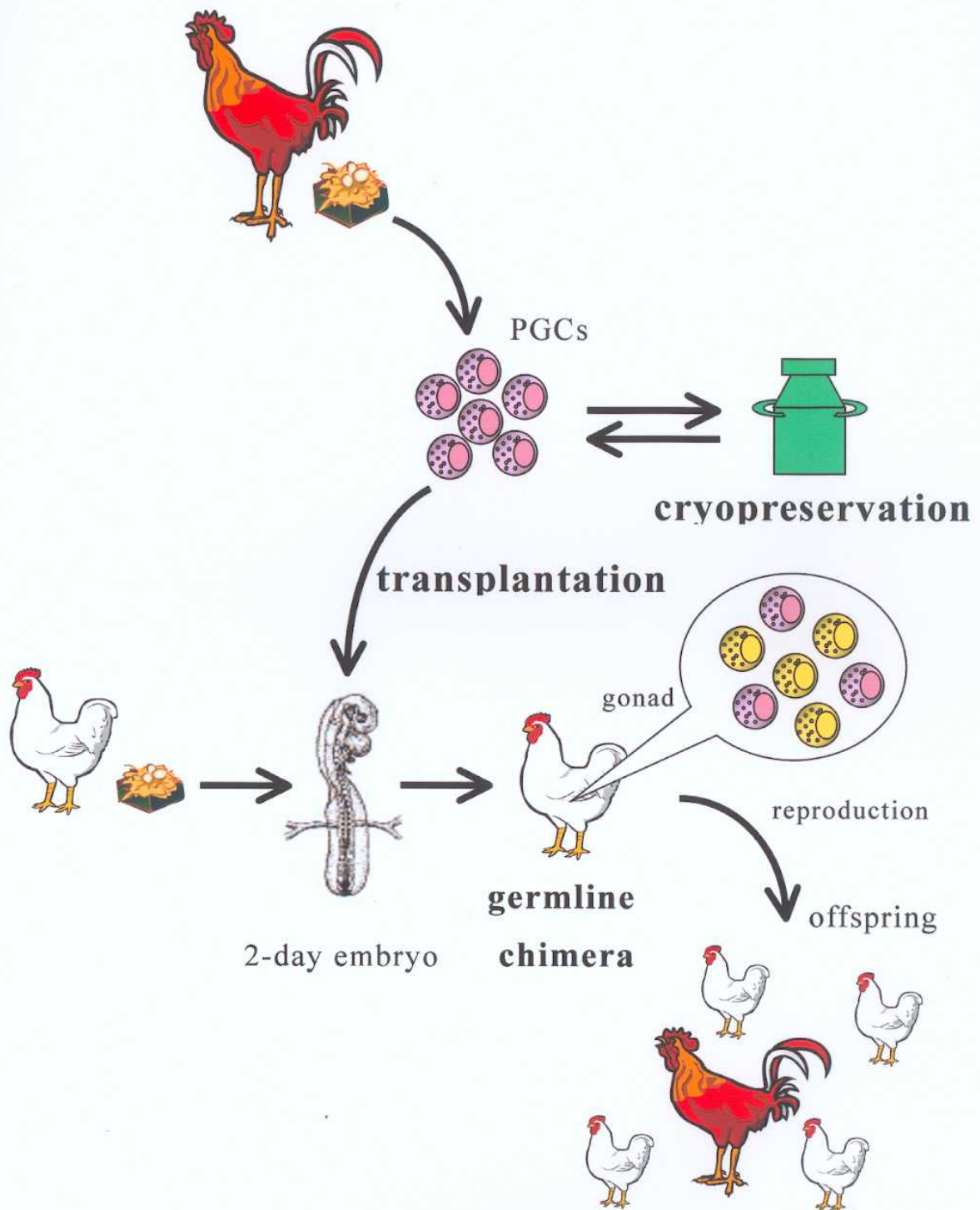


Figure 1-1 Strategy for conserving avian genetic resources by using PGCs.

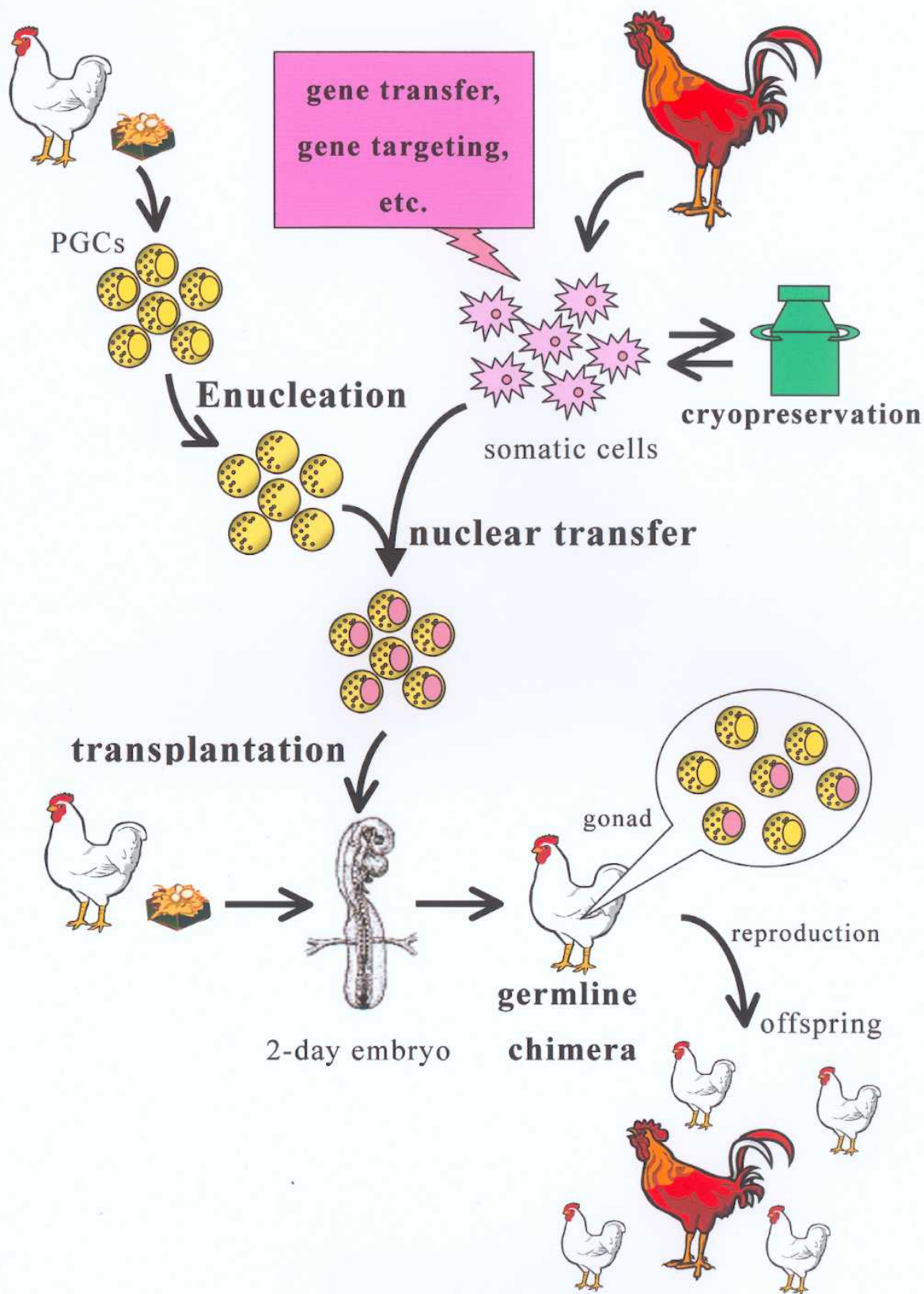


Figure 1-2 Strategy for conserving avian genetic resources by using nuclear transferred PGCs.