

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580367

研究課題名(和文)新旧両世界のウズラの遺伝資源の保存と活用

研究課題名(英文)Conservation and practical use of genetic resource of New and Old World quail

研究代表者

小野 珠乙(ONO, Tamao)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：10177264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：新世界ウズラと旧世界ウズラについて以下のことを明らかにした。 コリンウズラ(成体重約250g)と肉用系ニホンウズラ(成体重約300g)の繁殖用飼育ケージを新規開発した。 代理卵殻を用いたコリンウズラ胚の培養法を樹立した。 コリンウズラとニホンウズラの異科間キメラの作出をした。 ウロコウズラ(新世界ウズラ)とイワシャコ(旧世界ウズラ類縁)の動原体特異的の反復配列を単離し、ニワトリ、ニホンウズラ、ヒメウズラ、コリンウズラおよびカムリウズラと核型を比較した。 白色変異体コリンウズラの新規系統を造成した。 実験動物として扱いやすい肉用系のアルビノ系統と黒色羽装白色卵系統を造成した。

研究成果の概要(英文)：Several aspects on New world quail and old world quail were studied. (1) Breeding cages for large sized quail were newly designed. (2) Embryo culture system for the bobwhite quail was developed. (3) Intergenera chimera embryo between bobwhite quail and Japanese quail was produced. (4) Centromere specific repeat sequence of scaled quail (New world quail) and chukar (allied species of Old world quail) was isolated and compared with that of chicken, Japanese quail, blue-breasted quail, bobwhite quail and California quail. (5) New strain of white plumage bobwhite quail (non albino) was established. (6) Two strains useful for laboratory animal were established such as large size (broiler type) albino and black plumage with white eggshell Japanese quail.

研究分野：動物発生遺伝学

キーワード：コリンウズラ ニホンウズラ 遺伝資源 実験動物化 胚培養 新世界ウズラ 旧世界ウズラ 染色体

1. 研究開始当初の背景

(1) 国際的動向：鳥類約 9600 種の代表的研究モデルはニワトリであるが、ニホンウズラ (*Coturnix japonica*) もその特異性 (小型, 短い繁殖周期, 産卵性, 等) によりパイロットアニマルとして利用されている。しかし, ドラフトゲノム配列が公表されたニワトリ同様ニホンウズラでも研究機関における各種特異的系統が淘汰されている。産業用のニホンウズラ以外の遺伝資源は激減している。コリンウズラ (*Colinus virginianus*) は米国において数系統保有されているが実験動物としては確立されているとは言い難い。

(2) 国内動向：鳥類の実験動物, ニワトリのパイロットアニマルとして有用であるため, ニホンウズラは種卵を含め, 広く利用されている。しかし, ほとんどが, 産業用の転用である。我が国でも遺伝的に標準化された系統や突然変異系統の占める割合はきわめて低く, 農学部系の研究機関以外では皆無に近い。50 年前に米国でニホンウズラの研究利用が評価されて以来我が国でも多くの研究成果があるが, 系統維持が若手研究者につながらず, 残念ながら多くの系統が淘汰され絶滅してしまった。現時点でニホンウズラの突然変異系統の維持をしている研究機関は, 申請者が把握している限りでは農水省生物研・畜草研, 環境研, 名大, 静岡大, 信州大, 広島大のみとなり, 研究者の退職に伴う淘汰絶滅が現状である。申請者は依頼に応じて各種研究機関にニホンウズラやコリンウズラの系統を譲渡してきたが潜在的研究者は多いと実感している。

(3) 着想に至った経緯：実験動物として世界各国で用いられているウズラ (quail) はニホンウズラ (*Coturnix japonica*) である。和名はウズラであるが混同を避けるためこ

こではニホンウズラと表記し, ウズラあるいはウズラ類と表記する場合は広く新旧両世界のウズラを指すことにする。他に, サイズがニホンウズラの約半分のヒメウズラ (*Coturnix chinensis*) および約 2 倍のコリンウズラ (*Colinus virginianus*) もわずかながら実験に用いられている。ニホンウズラやヒメウズラは旧世界ウズラ (キジ目キジ科ウズラ属) に属し, コリンウズラ (キジ目ナンベイウズラ科コリン属) は新世界ウズラに属している。両属のウズラは外見は似ているが遺伝的には離れている。申請者はコリンウズラを 2006 年春に入手して, 系統造成中である。ニホンウズラも卵用 (実験用) タイプに加え, 肉用 (大型) タイプも 2002 年から系統造成してきた。

2. 研究の目的

(1) 哺乳類では凍結保存した受精卵からの個体復元, 核移植によるクローン技術, 卵細胞質内精子注入法 (ICSI) 等が確立されている。絶滅したマンモスでさえも, 凍結状態の体細胞や生殖細胞が得られれば, これらの技術で個体復元も実現性がある。ところが, 鳥類では受精卵に多量の卵黄があることなどから, 生殖細胞を別個体にいったん移植することにより新旧両世界のウズラ類の遺伝資源の保存, 個体復元を目指す。すなわち, 新旧両世界のウズラ類の各種系統, 突然変異遺伝子を始原生殖細胞 (PGCs) のかたちで凍結保存し個体復元をする。このようにすれば, それぞれのウズラ類の遺伝資源を, 研究室の世代交代, ウズラ個体の絶滅, 病原菌感染という危機にも対処し保存できる。家禽の PGCs 移植研究は申請者らの研究を含めて最近約 10 年に多くの報告がある。現在, 農水省, 環境省, 筑波大, 米国ノースカロライナ州立大, 韓国ソウル大および我々の研究グループが競合的および研究協力により研究実績をあげている。英国ロスリン研究所, ベンチャー

企業 (Cristal Bioscience) 等も、競合している。

(2) 本課題は、新旧両世界のウズラ類を広くライフサイエンスのための実験動物として開発・確立することはもとより、発生工学研究用の実験動物として開発・確立することをも目的とする。実験動物の開発を行う場合、最も重要なことは、その種の繁殖の統御、遺伝的特製の把握、ならびに遺伝的プロファイルの明らかな系統の造成である。本研究では第一に、新旧両世界ウズラの生物学的特性を明らかにして実験動物化をするために、小規模研究室における飼育体制を開発する。すなわち、クローズドコロニーの作出、系統造成をして、広く研究者が使用できるようにする。第二に、各種系統、突然変異遺伝子の生殖細胞を凍結保存して、別個体に移植することにより個体復元ができるようにする。すなわち、卵用ニホンウズラ、肉用ニホンウズラおよびコリンウズラの新鮮および凍結融解した生殖細胞の移植と個体発現を目指す。そして第三に、始原生殖細胞の異属及び異種間移植による発現の追跡を試み、導入細胞の系譜追跡、減数分裂、配偶子形成の分化過程を調べる。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：旧世界ウズラに属する卵用ニホンウズラ (成体重 100-150 g)、肉用ニホンウズラ (成体重 250-300 g)、及び新世界ウズラに属するコリンウズラ (成体重 200-250 g) の発生過程の比較、増殖をする。卵用ニホンウズラは野生型羽装 (TY) および伴性アルビノ羽装 (AL) 系統を用いる。肉用ニホンウズラは野生型羽装 (JW) および淡色羽装系統 (JP) 系統を用いる。

(2) 種特異的 DNA 識別マーカーの開発:ニホンウズラとコリンウズラのゲノム識別およ

び雌雄識別できる PCR プライマーは開発済みである。ただし、感度を更に鋭敏にする技術開発および系統識別可能な PCR プライマーは必要であるので開発する。

(3) PGCs の単離、精製:胚発生初期 (PGCs 血中循環期) の胚周縁静脈から血液を採取し、免疫磁気ビーズ法 (Ono and Machida, 1999)、ナイコデンツ濃度勾配遠心分離法 (Nakamura et al., 2010) ACK 赤血球溶血除去法 (Yamamoto et al., 2007) で PGCs と血球を分離し、PGCs 画分を液体窒素下で凍結保存する。また、PGCs を含む孵卵前の胚盤葉細胞も同様に研究室常用の手法 (Fujiwara et al., 2009ab; Atsumi et al., 2008) で単離し凍結保存する。

(4) レシピエントの生殖細胞除去:PGCs は孵卵前には胚盤葉明域中央部に存在し、胚体外前方生殖弦に移動し、血管形成に伴い血中循環して、予定生殖腺に定住する。孵卵前にブスルファン投与、孵卵前および PGCs 血中循環期 (ドナーPGCs 導入直前) に軟 X 線照射することによりほとんど胚発生の正常な進行を阻害せずにレシピエント胚の PGCs を減少させる方法をウズラに適用する。

4. 研究成果

(1) 新世界ウズラに属するコリンウズラ (成体重約 250 g) と新たに導入したプロイラータイプニホンウズラ (成体重約 300 g) の繁殖用飼育ケージを新規開発した。これにより省スペースで効率よく継代育成が可能となった。

(2) 代理卵殻を用いたコリンウズラ胚の培養法を樹立した。コリンウズラ胚の培養は、ニホンウズラ胚の二段階培養法を一部改変し、第一段階の培養時間 (51 ~ 53, 63 ~ 65 時間)、培養液 (ニワトリ、ニホンウズラ、コリンウズラ水溶性卵白)、第二段階の代理卵殻 (ニワ

トリ約45g卵重, ニワトリ約38g, ニワトリ約25g, プロイラータイプニホンウズラ約15g), 第一段階の代理卵殻(プロイラータイプニホンウズラ約15g)を孵化まで用いる培養法の簡略化について比較した。その結果, ニワトリの水溶性卵白を培養液に用い, 第一段階培養期間は63~65時間, 代理卵殻はニワトリ38g卵殻(孵化率39%)あるいはウズラ15g卵殻(孵化率37%)が推奨された。但し, ニワトリ38gおよび25g卵殻は入手が困難であった。第一段階から代理卵殻を15gのウズラ卵殻で行い, 移植をしない簡略化法では孵化率31%であったので簡略化しても有意差のない程度の孵化率が得られることが明らかになった。

(3) コリンウズラとニホンウズラの異科間キメラの作出をした。前述のコリンウズラ胚培養法を活用して, 伴性劣性アルビノウズラ(AL)胚盤葉解離細胞をコリンウズラ胚に導入した。キメラ胚においてドナー由来の羽装が確認され, ドナー由来のゲノムDNAの増幅産物が検出された。コリンウズラ, ニホンウズラそれぞれ530bpおよび224bpを増幅するコリンウズラ Marker-3b 配列 (GenBank#EU054812) から5' -ACCCCGGTCCTAAGGTAAGAA-3' および5' -AAGACAAAAGAAAAGAAAGATGATG-3' のプライマーを設計して種識別をした。

(4) 新世界ウズラに属するウロコウズラと旧世界ウズラ類縁のイワシャコの動原体特異的の反復配列を単離し, すでに明らかになっているニワトリ, 旧世界ウズラのニホンウズラおよびヒメウズラ, 新世界ウズラのコリンウズラおよびカンムリウズラと核型を比較した。ウロコウズラの染色体DNA反復配(CSQ-BamHI)は, カンムリウズラおよびコリンウズラの反復配列(CCA-BamHI, CVI-MspI)と高い相同性を示した。また, CSQ-BamHIの染色体上の分布は, 同じ属のカンムリウズラにおける分布と類似していた。イワシャコの反復配列分布

は染色体サイズと相関があったが, ウロコウズラを含む新世界ウズラでは, 動原体反復配列の染色体サイズと相関する分布と相関しない分布があった。

(5) コリンウズラの白色変異体を新たに導入し実験動物の新規系統(RW)として系統造成した。交配実験からこの形質は非アルビノ形質で常染色体劣性であることが明らかとなった。この形質を「Recessive White: 劣性白色羽毛」, 遺伝子を「*rw*」と命名した。性成熟まで8ヶ月以上必要であるので, 旧世界のウズラに比べて, 世代交代に時間がかかることと, 雌雄において毛色, 外部生殖器の形態からは性判別ができず性的二形性は観察されなかったため, PCRによる雌雄鑑別が必要であることが弱点である。

(6) ニホンウズラにおける系統造成
実験動物は目的に応じて多くの種が用意されることが望ましいので, コリンウズラ, ウロコウズラ, ニホンウズラ(産卵用タイプと肉用タイプ)について比較検討した。肉用タイプのニホンウズラメスと産卵用タイプの系統から性染色体性劣性アルビノ系統オスを交配して, 肉用タイプのニホンウズラにアルビノ遺伝子を導入した。これをさらに累進交雑して, 性判定が容易で, 扱いやすい大型サイズのアアルビノ羽装の系統を造成した。野生型羽装産卵タイプのウズラ始原生殖細胞を造成した肉用タイプアルビノウズラに導入したところドナー由来の羽装を示す次世代が1個体(1/39)産出された。また, ニホンウズラにおいては胚発生中の検卵が容易な白色卵殻形質(常染色体性劣性遺伝子:*we*)を黒色羽装ウズラ(常染色体不完全優性遺伝子:*D*)に導入して, 実験動物として扱いやすい系統(*Dwe*)を造成した。

< 参考文献 >

1. Atsumi Y, Tagami T, Kagami H and Ono T (2008) J Poult Sci 45(4):292-297.
2. Fujiwara A, Ono T, Hiramatsu K and Kagami H (2009a) J Poult Sci. 46(2):123-126.
3. Fujiwara A, Ono T and Kagami H (2009b) J Poult Sci 46 (1):46-51.
4. Nakamura Y, Usui F, Miyahara D, Mori T, Ono T, Takeda, K, Nirasawa K, Kagami H and Tagami T (2010) Reprod Fertil Dev. 22 (8): 1237-1246.
5. Ono T and Machida Y (1999) Comp Biochem Physiol A. 122(2): 255-259.
6. Yamamoto Y, Usui F, Nakamura Y, Ito Y, Tagami T, Nirasawa K, Matsubara Y, Ono T and Kagami H. (2007) Biol Reprod. 77(1):115-119.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

Mizushima S, Hiyama G, Shiba K, Inaba K, Dohra H, Ono T Shimada K and Sasanami T (2014) The birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. Development, 141 (19):3799-3806. (査読有)「In this issue: 特選論文に選定」DOI: 10.1242/dev.111765
 Kato A, Mizushima S, Shimada K, Kagami H and Ono T (2014) Simple Culture System for Bobwhite Quail and Japanese Quail Embryos from the Blastoderm Stage to Hatching using a Single Surrogate Eggshell. Journal of Poultry Science, 51(2):202-205. (査読有) https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpsa/51/2/51_013018/

_article1

Ishishita S, Tsuruta Y, Uno Y, Nakamura A, Nishida C, Griffin DK, Tsudzuki M, Ono T and Matsuda Y (2014) Chromosome size-correlated and chromosome size-uncorrelated homogenization of centromeric repetitive sequences in New World quails. Chromosome Research, 22(1):15-34. (査読有)DOI: 10.1007/s10577-014-9402-3

Miyahara D, Mori T, Makino R, Nakamura Y, Oishi I, Ono T, Nirasawa K, Tagami T and Kagami H (2014) Culture conditions for maintain propagation, long-term survival and germline transmission of chicken primordial germ cell-like cells. Journal of Poultry Science, 51 (1): 87-95. (査読有) https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpsa/51/1/51_0130077/_article/-char/ja/

Shimada K, Ono T and Mizushima S. (2014) Application of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for fertilization and development in birds. General and Comparative Endocrinology, 196 (6):100-105. (査読有) DOI: 10.1016/j.ygcen.2013.11.001

Kato A, Miyahara D, Kagami H Atsumi Y, Mizushima S, Shimada K and Ono T (2013) Culture system for bobwhite quail embryos from the blastoderm stage to hatching. Journal of Poultry Science, 50 (2):155-158. (査読有) <http://doi.org/10.2141/jpsa.0120131>
 Nakamura Y, Usui F, Miyahara D, Mori T, Ono T, Kagami H, Takeda K, Nirasawa K and Tagami T (2012) X-irradiation

removes endogenous primordial germ cells (PGCs) and increases germline transmission of donor PGCs in chimeric chickens. Journal of Reproduction and Development, 58(4):432-437. (査読有) <http://doi.org/10.1262/jrd.2012-045>

〔学会発表〕(計 3 件)

Ono T, Kato A, Kato R, Hayashi K, Mizushima S, Shimada K and Kagami H (2014) Embryo culture of new and old world quail for germline transfer studies. 10th Asia Pacific Poultry Conference, Jeju, Korea (10月19-23 日, 韓国済州道 済州国際コンベンションセンター). (招待講演)

Ono T, Mizushima S, Tsuruta Y, Kato R and Kagami H (2013) New world quail and old world quail for germline transfer studies. International Forum on Avian Germplasm 2013, Seoul National University, Seoul, Korea pp. 28-29 (10月25-28日 韓国ソウル特別市 ソウル大学). (招待講演)

Ono T. (2011) Usefulness of avian embryos as a research model. Biomodulation Symposium, Seoul National University, Seoul, Korea p. 67(5月26-27日 韓国ソウル特別市 ソウル大学). (招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

小野珠乙 (2014) ニワトリの発生と遺伝子工学(第 7 章 pp. 116-125)キメラ(第14章 pp. 189-191.)ニワトリの科学(古瀬充弘編)朝倉書店.

小野珠乙 (2012) 家畜の改良技術(第 6 章 4 節). 畜産学入門(唐澤豊, 大谷元, 菅原邦生 編) 文永堂出版 pp.

203-208.

〔その他〕

ホームページ等

http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/ono_kagami/hasseiken.htm

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/agriculture/overview/labo/a-resources/post-20.php>

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.WFfCPpkh.html>

6 . 研究組織

((1)研究代表者

小野 珠乙 (ONO, Tamao)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号 : 10177264

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

鏡味 裕 (KAGAMI, Hiroshi)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号 : 80308303

松田 洋一 (MATSUDA, Yoichi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号 : 70165835

水島 秀成 (MIZUSHIMA, Shusei)

富山大学・理工学研究部・特命助教

研究者番号 : 20515382