

世界初 体外授精法を用いた有用な鳥類の創出

Production of valuable chicken
using intracytoplasmic sperm injection

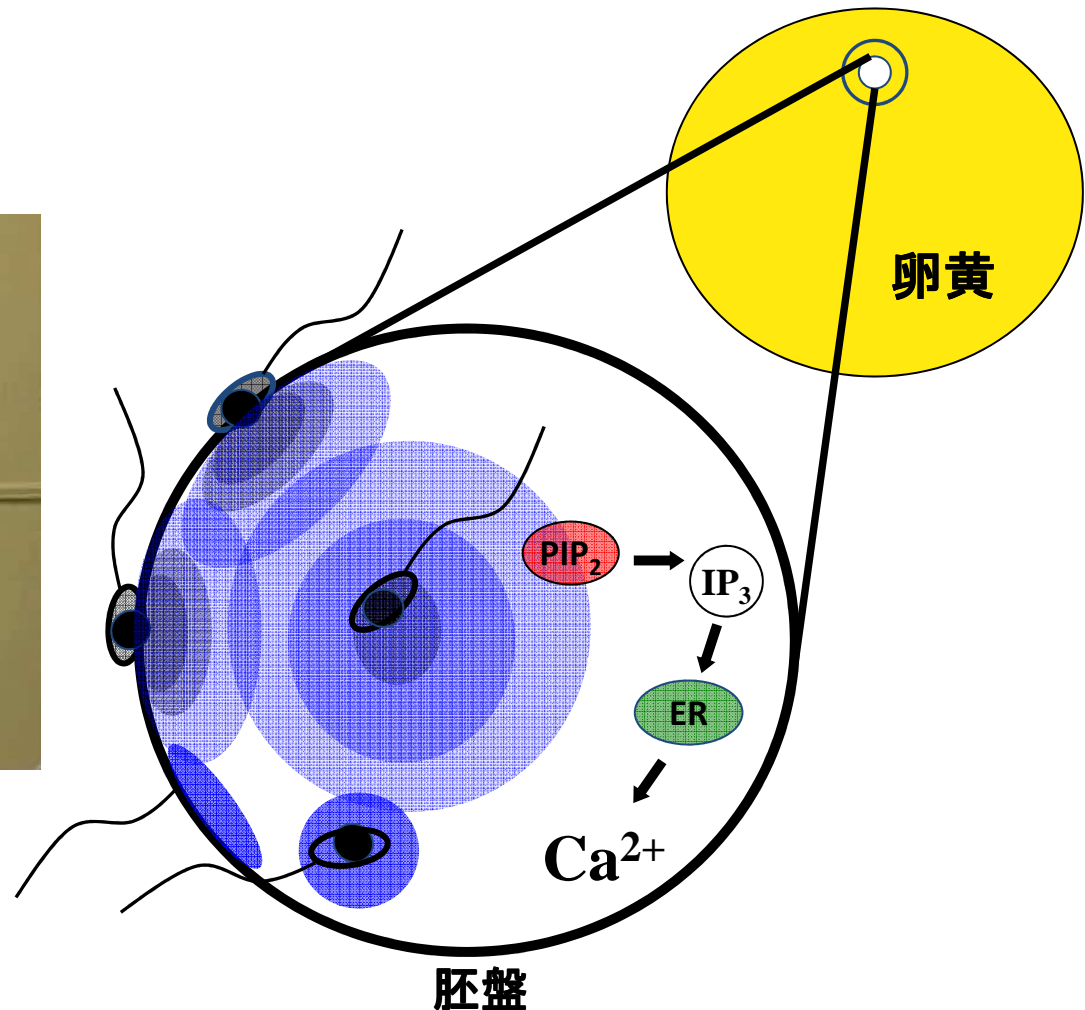
静岡大学総合科学技術研究科 農学専攻
准教授 笹浪 知宏



国立大学法人
静岡大学
National University
Corporation Shizuoka
University

<これまでの課題>

鳥類で体外受精による孵化に成功した例がない。
⇒鳥類に特徴的な受精形態（多精子受精）を再現する方法がなかった。



＜本技術のポイント＞

- 1) 鳥類（ウズラ）のヒナを顕微授精法で孵化させることに世界で始めて成功。
- 2) 鳥類の卵を活性化するのに必要十分な3因子を同定。
 - ①ホスホリパーゼCゼータ又はイノシトール三リン酸
 - ②クエン酸シンターゼ (CS)
 - ③アコニット酸ヒドラターゼ (AH)
- 3) クローン鳥類の作出、外来遺伝子を有する鳥類の作製を可能とする。

本技術は、鳥類における唯一の体外受精システムである

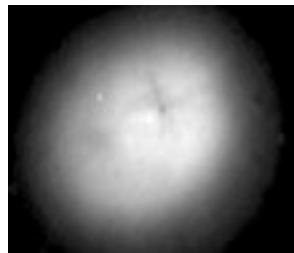
鳥類の受精卵の卵殻培養法

oviduct

(Site of fertilization)



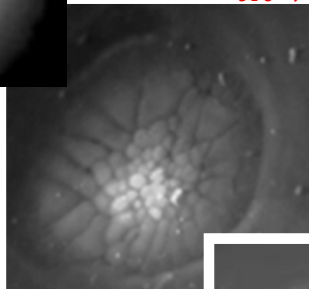
3.5 hr after fertilization



7 hr

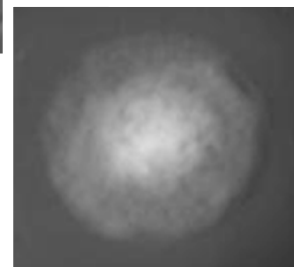


in vivo fertilized egg



24 hr

Blastoderm formation
(around 24 hr)



Stage X



Chicken; Perry et al., *Nature*. 1988

Quail; Ono et al., *Dev. Biol.* 1994



System I

1cell → stage X



System III

52h incubation

→ hatch



System II

stage X →

52h incubation



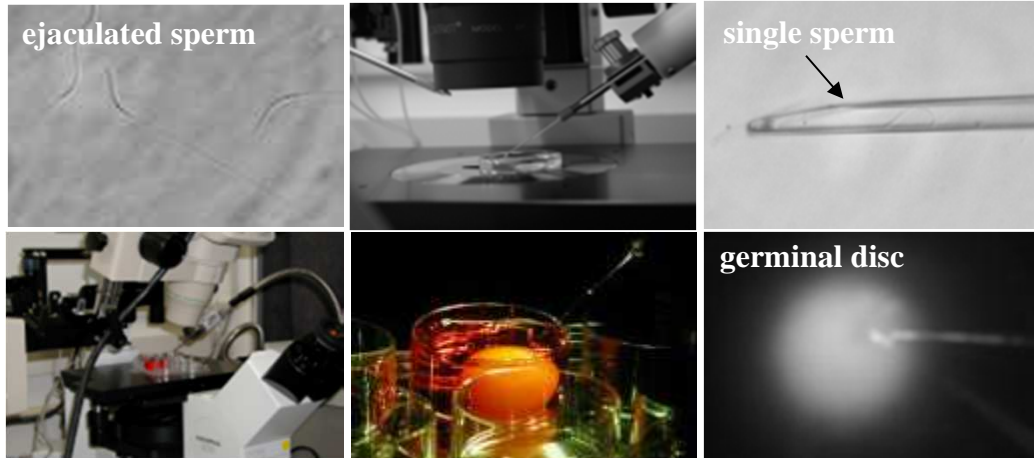
Hatch

Total 18 days incubation

(quail)

体外受精により得られた受精卵の孵化は報告されていない

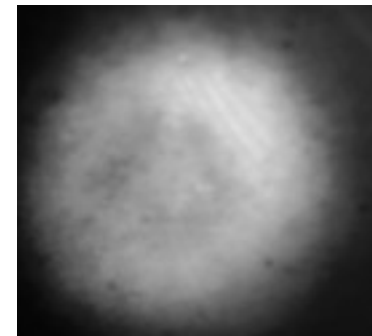
鳥類の顕微授精(ICSI)システム



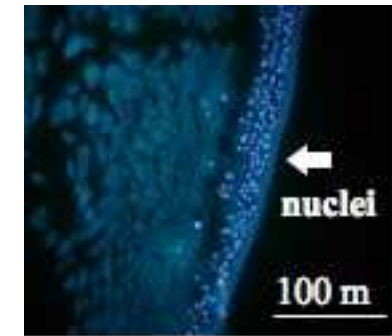
(Hrabia et al., *Biol Reprod.*, 2003)

ICSI卵の24時間培養後の発生状況

No. of oocytes		stages				
injected	Developed (%)	II	IV	V	VI	X
30	5 (16.6)	1	1	2	1	0

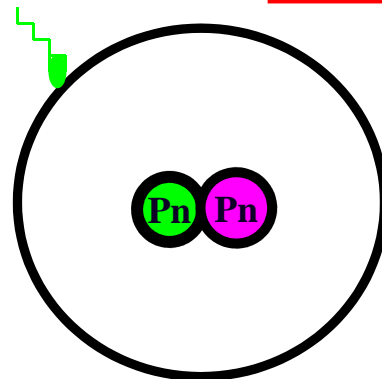


Under stereomicroscope



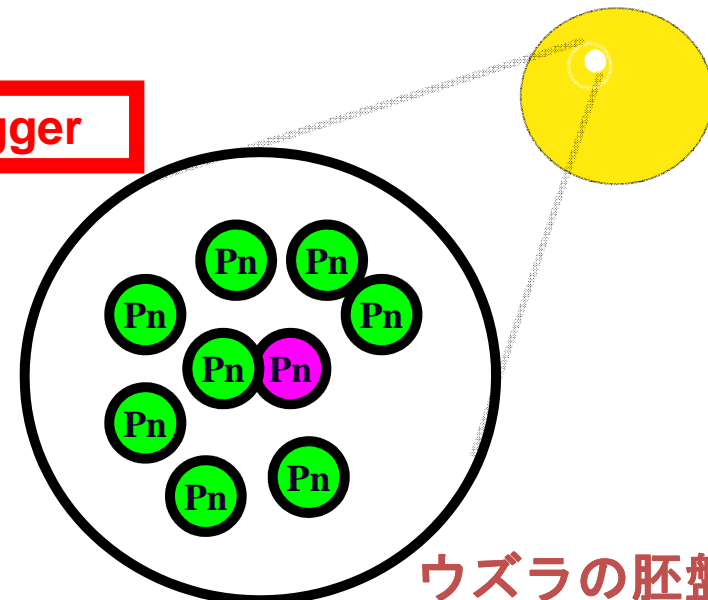
DAPI staining
← nuclei
100 μm

5,000 times bigger



マウス卵

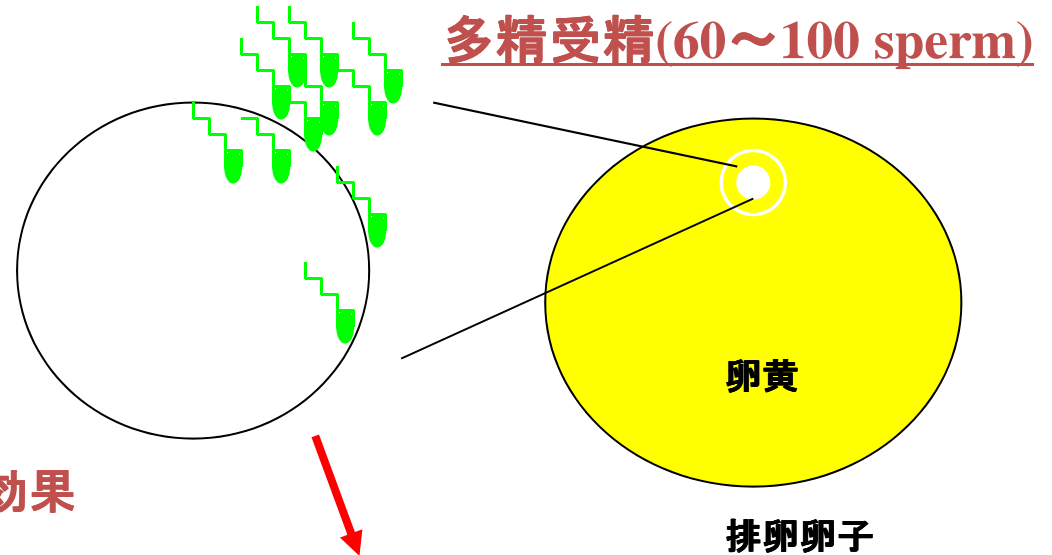
VS



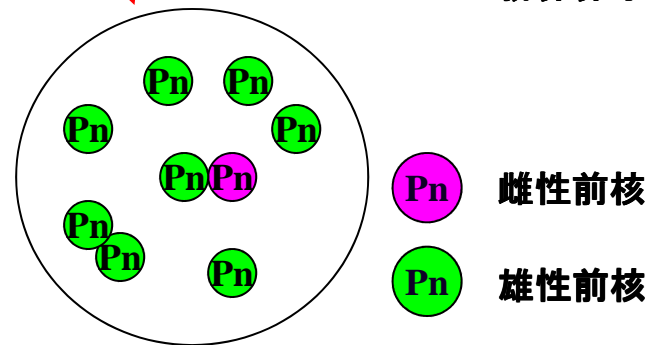
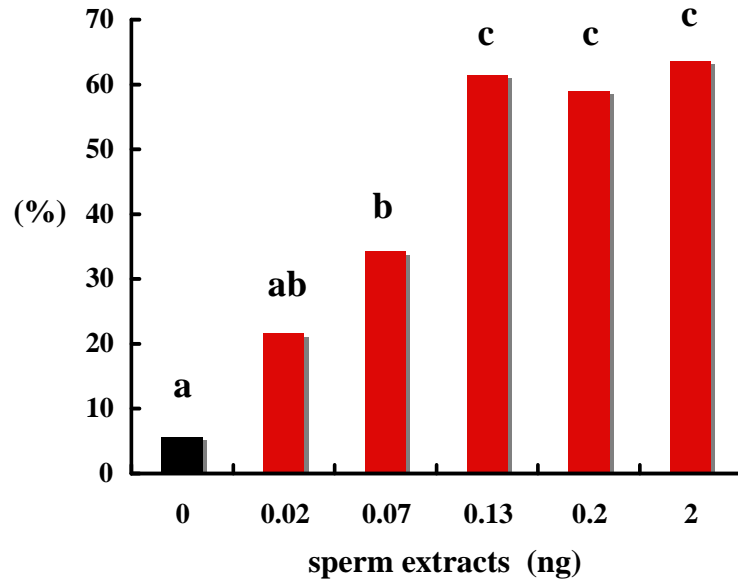
ウズラの胚盤

鳥類の受精：生理的多精

1つの卵子に受精する2個の精子



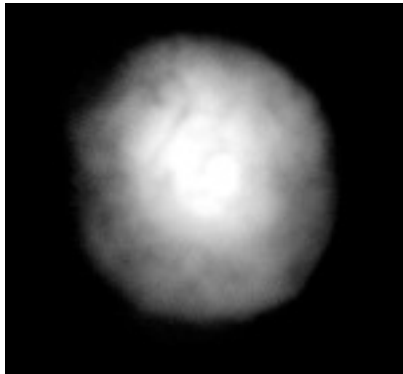
雌性前核形成に及ぼす精子抽出物の効果



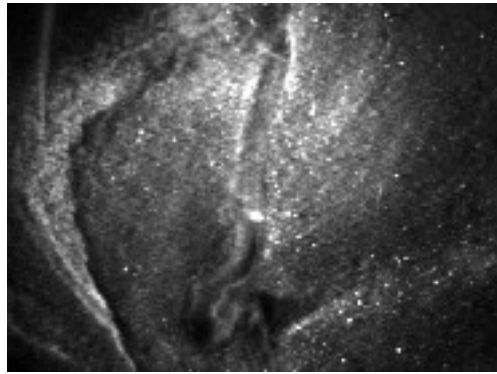
(Mizushima et al, *Mol Reprod Dev*, 2009)

ICSI卵の発生に及ぼす精子抽出物の効果

精子のみ
Stage VII



1 ng 精子抽出物
Stage 6



2 ng の精子抽出物
hatch



Hatched quail and
her offspring



Mizushima et al., Development, 2014

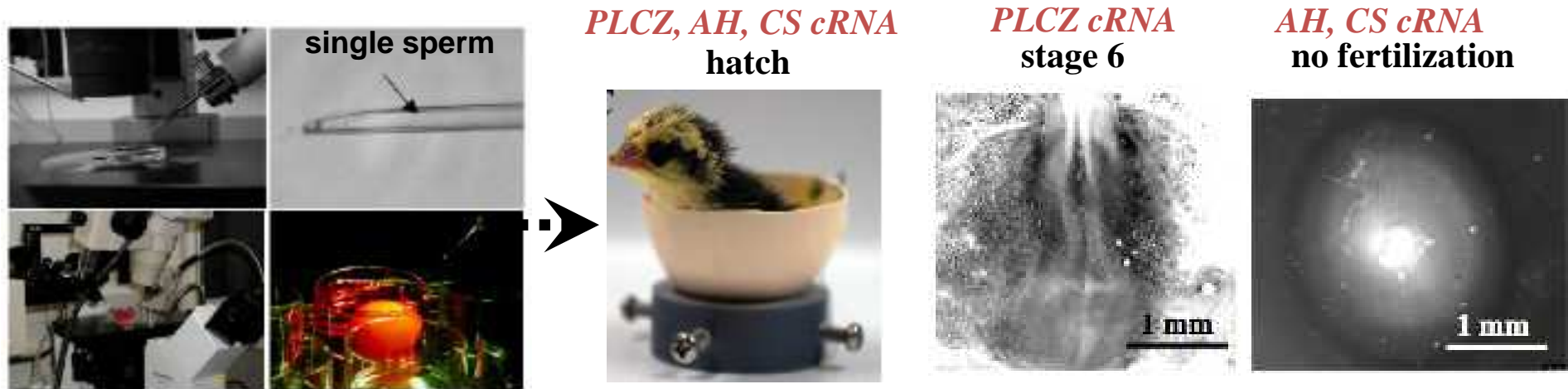
Injecting sample	No. of eggs		No. of embryos:															
	injected	Developed (%)	IV	V	VI	VII	VIII	X	XII	3	4	6	8	16	25	30	43	hatch (%)
Sp	26	5 (19)	2	2	1													
Sp+ 10 pg SE (1 sperm)	6	2 (33)		1	1													
Sp+ 50 pg SE (50 sperm)	11	6 (55)		1	1	1	3											
Sp+ 1 ng SE (100 sperm)	18	13 (72)	2			2	1	2	4			2						
Sp+ 2 ng SE (200 sperm)	19	15 (79)	1	2			3				2	2		1	1	1	1	1 (7)
Sp+ 2 ng SE + BAPTA	5	0 (0)																

ICSIにより初めてヒナの孵化に成功した

Live birth offspring, “Megumi”, the grace of God in Japanese



ヒナの孵化にはPLCz, CS, AHの3種類の因子が必須である



(Mizushima et al., Development, 2014)

Injecting sample	No. of eggs		No. of embryos:																	
	injected	Developed (%)	Developed to the stage of																	
			IV	V	VI	VII	X	XIII	3	4	5	6	8	16	25	30	43	hatch (%)		
Sp	26	5 (19)	2	2	1															
Sp+SE	19	15 (79)	1	2			3			2	2				1	1	1	1	1 (7)	
Sp+60ng PLCZ cRNA	13	6 (46)	2	1	1			1					1							
Sp+AH and CS cRNAs	3	0 (0)																		
Sp+PLCZ and AH cRNAs	9	5 (56)		2	1					1	1									
Sp+PLCZ and CS cRNAs	8	5 (63)	1	1			1			1				1						
Sp+PLCZ, AH and CS cRNAs	24	17 (71)	3	3	1		3	1			1		1	1		2		1	1 (6)	

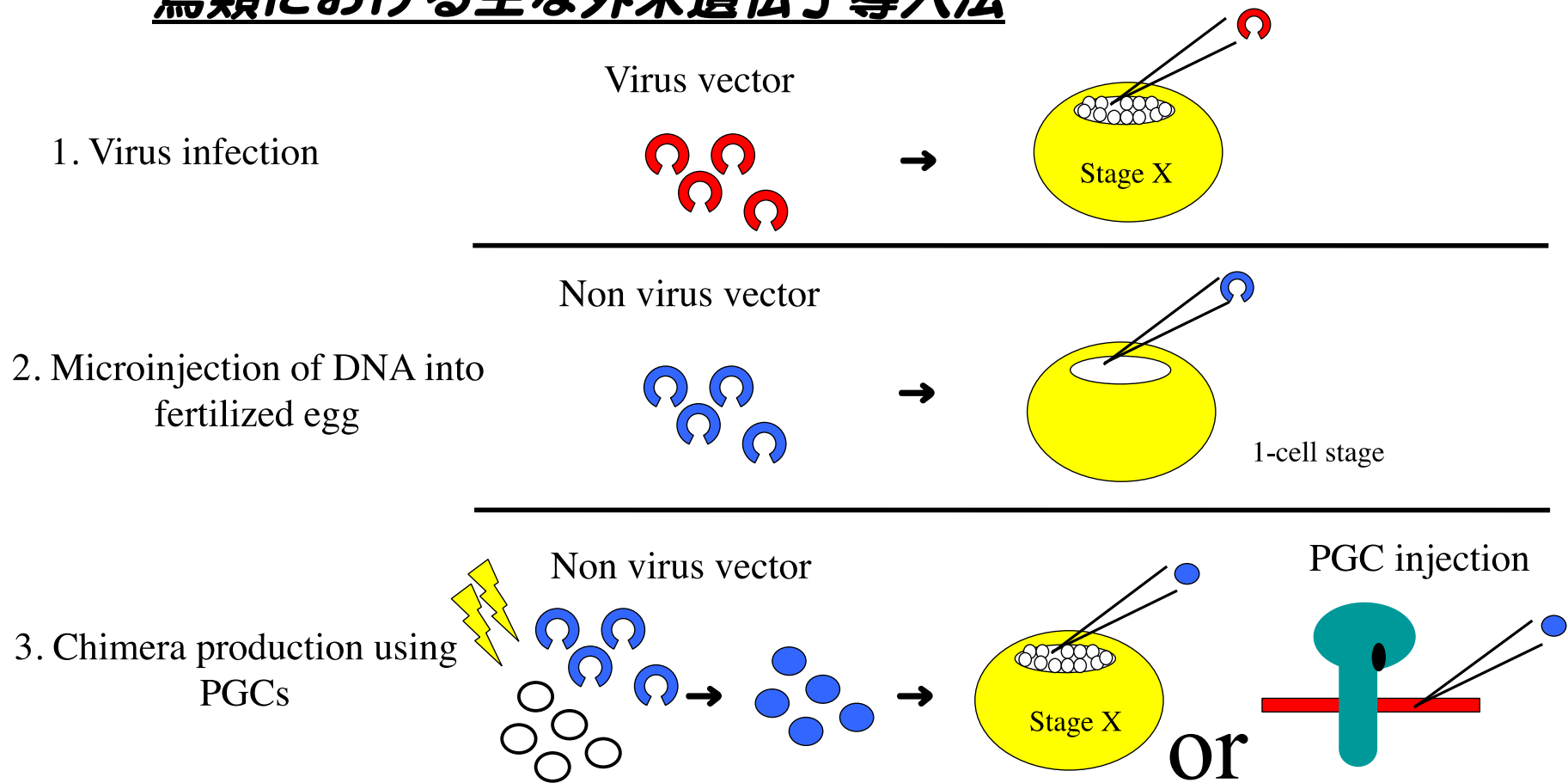
顕微授精法の応用 1

遺伝子組み換え鳥類の作出

ICSI法を応用して、

1. 外来遺伝子導入ウズラを作成する
2. 核移植ウズラを作成する

鳥類における主な外来遺伝子導入法



PGC法とICSI法との比較

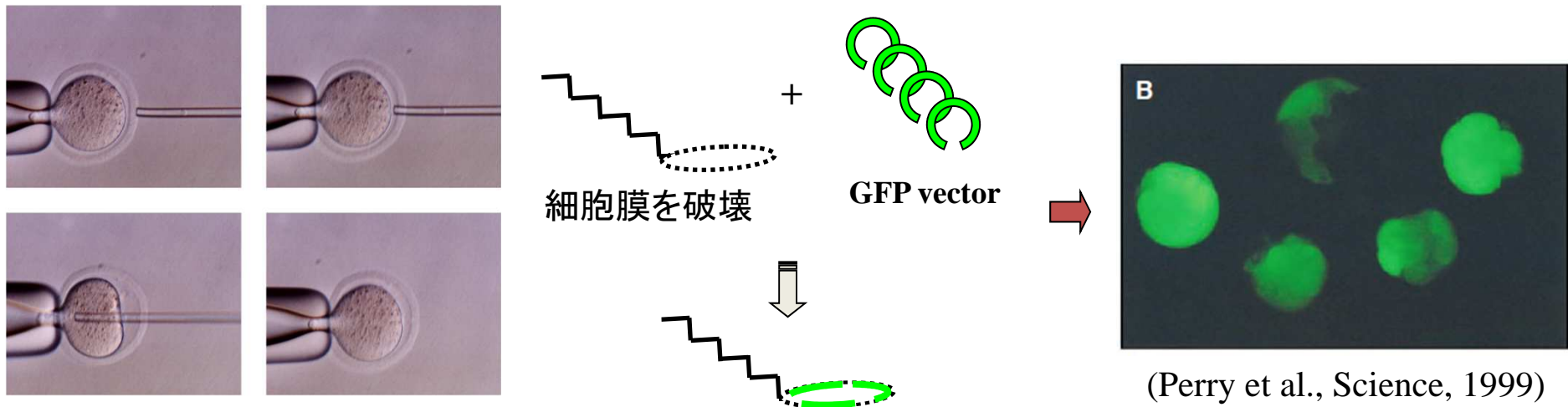
	PGC法	ICSI法
トランスジェニックまたはゲノム編集ニワトリの作出に要する期間	<ul style="list-style-type: none"> ・1.5-2年 * 培養PGCの株化(3-4ヶ月) * 遺伝子組換えおよび組換えPGCの培養(1-2ヶ月) * PGC細胞移植個体の性成熟およびF1作出(6ヶ月) * F1の性成熟およびF2の作出(6ヶ月) 	<ul style="list-style-type: none"> ・6-12ヶ月 * KOを含めたゲノム編集家禽の作出(1世代で可能:6ヶ月) * トランスジェニックニワトリの作出(遺伝子導入個体の性成熟およびF1作出が必要(6ヶ月))
ジーンターゲッティング	<ul style="list-style-type: none"> ・挿入、欠損可能 * 遺伝的に雌型(性染色体:ZW)のPGCは培養が困難 	<ul style="list-style-type: none"> ・欠損のみ可能 * ジーンターゲッティングによる遺伝子挿入は困難(ランダムインサージョンのみ可)
外来遺伝子導入効率	<ul style="list-style-type: none"> ・低い * 培養PGCの相同組換え率(0.0001-33.3%) * 遺伝的に雌型(性染色体:ZW)のPGC培養が困難 * 培養PGC細胞の生殖腺への定着率が個体により変動(≦1~86%)→ブスルフアンによる内在性PGCを死滅させることにより改善 	<ul style="list-style-type: none"> ・高い * ランダム挿入率(40-50%) * 遺伝的に雌型(性染色体:ZW)の個体へも導入が可能 * モザイク発現になる可能性が高い(遺伝子導入個体)
遺伝子発現	<ul style="list-style-type: none"> ・安定 	<ul style="list-style-type: none"> ・安定

ICSI法を応用して、

1. 外来遺伝子導入ウズラを作成する
2. 核移植ウズラを作成する

外来遺伝子導入ウズラの作出

ICSI-sperm-mediated gene transfer: ICSI-SMGT) 精子ベクター法



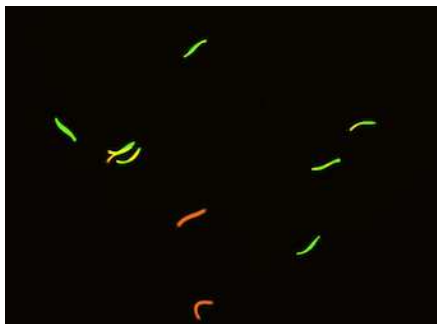
精子細胞膜の破壊：Triton X-100 (TX-100)または凍結・融解 (FT) 処理

ICSI-SMGT：EGFPベクターとインキュベートした細胞膜破壊処理精子を50 μ M IP₃および1mg/ml SEとともに排卵直後の卵に顕微注入

精子と外来遺伝子との結合に対するTX-100またはFT処理の効果

LIVE/DEAD staining

Control



TX-100処理



FT処理



精子のGFP vectorとの結合試験(PCR解析)

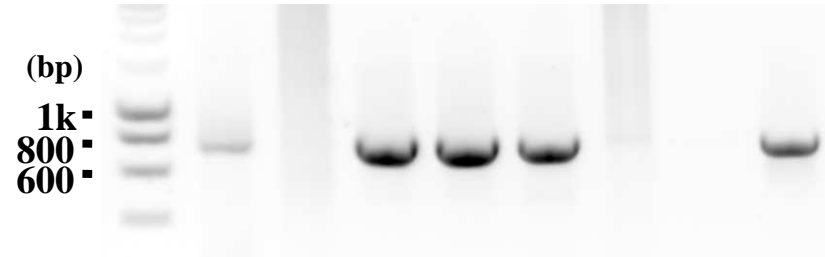
1Sp 1Sp 1Sp 1Sp 1Sp 1Sp B MSp



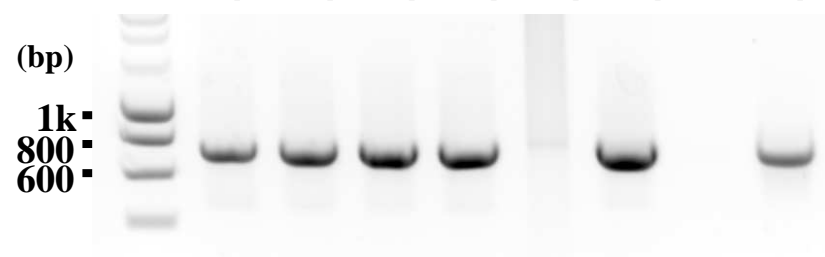
MSp:
Multiple Sperm

B: Buffer

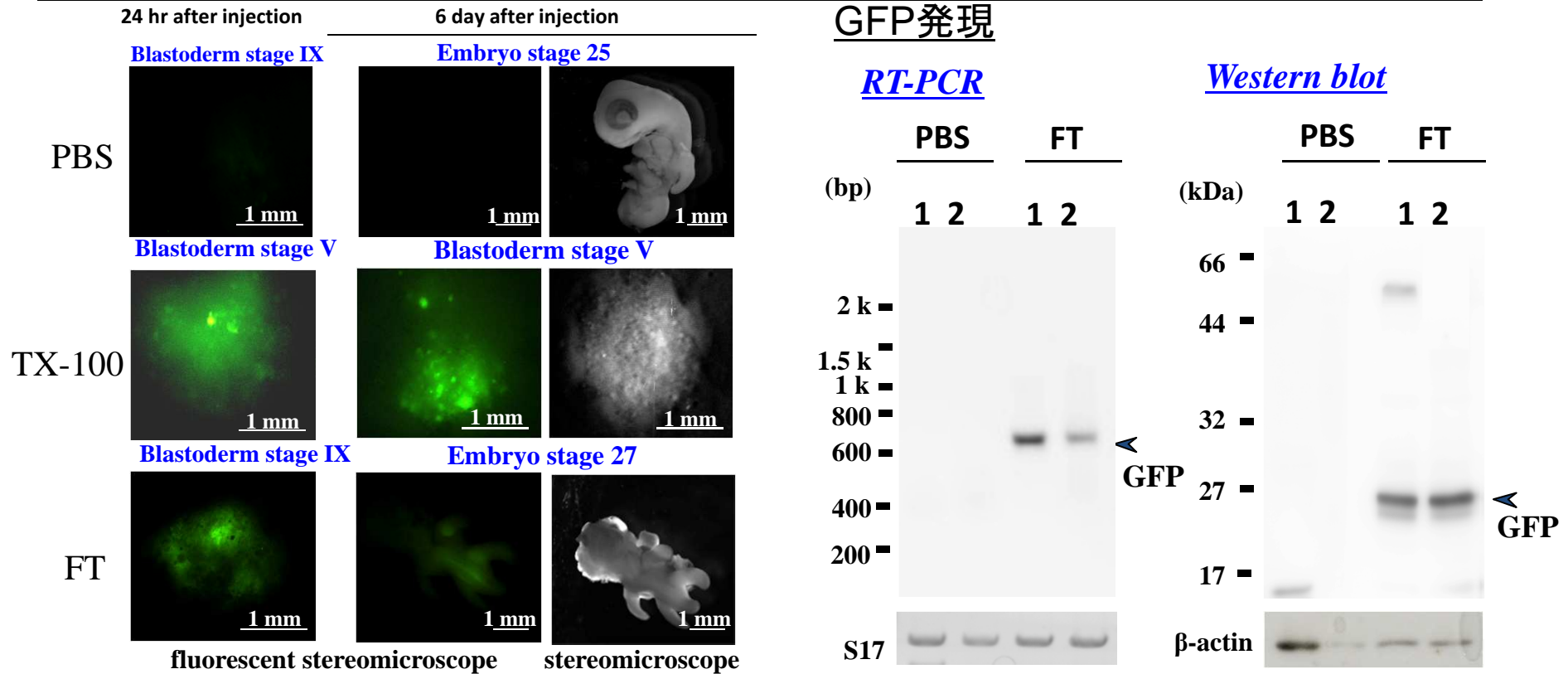
1Sp 1Sp 1Sp 1Sp 1Sp 1Sp B MSp



1Sp 1Sp 1Sp 1Sp 1Sp 1Sp B MSp



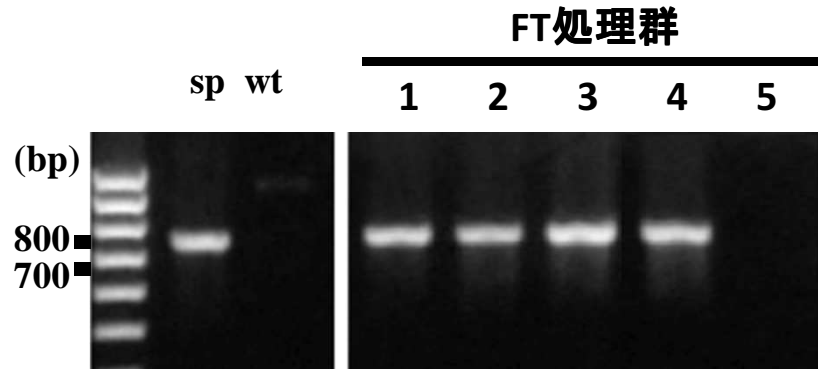
ウズラ胚の発生率とGFP発現に対するTX-100またはFT処理の効果



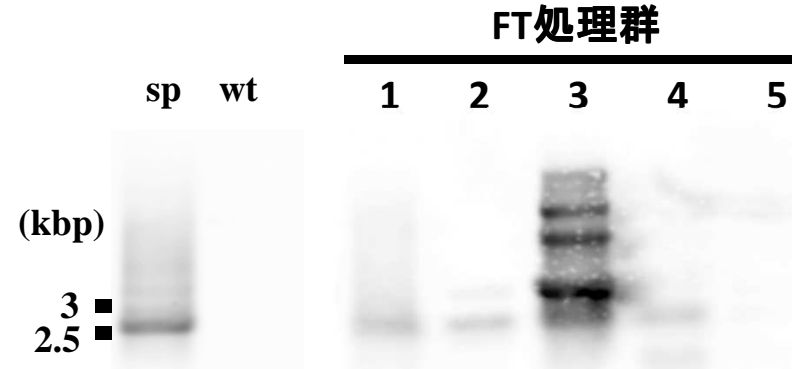
Sperm treatment	No. of oocytes		Expressing GFP (%)	No. of embryos:											
	injected	Developed (%)		Developed to the stage of											
				III	IV	V	VI	VII	VIII	XI	4	6	25	27	
Control	17	15 (88.2)	2 (14.4)		3	5	1			1	2	2	1		
TX-100	15	11 (73.3)	6 (72.8)	1	2	7			1						
FT	20	17 (85.0)	14 (82.3)	1	4	3	5	1	1		1			1	

GFP発現ウズラ胚のGFP遺伝子の検出

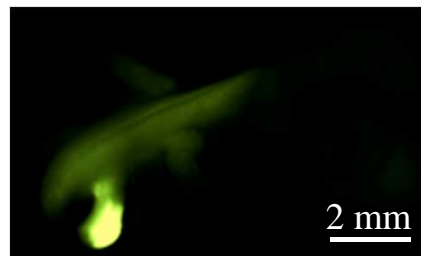
PCR



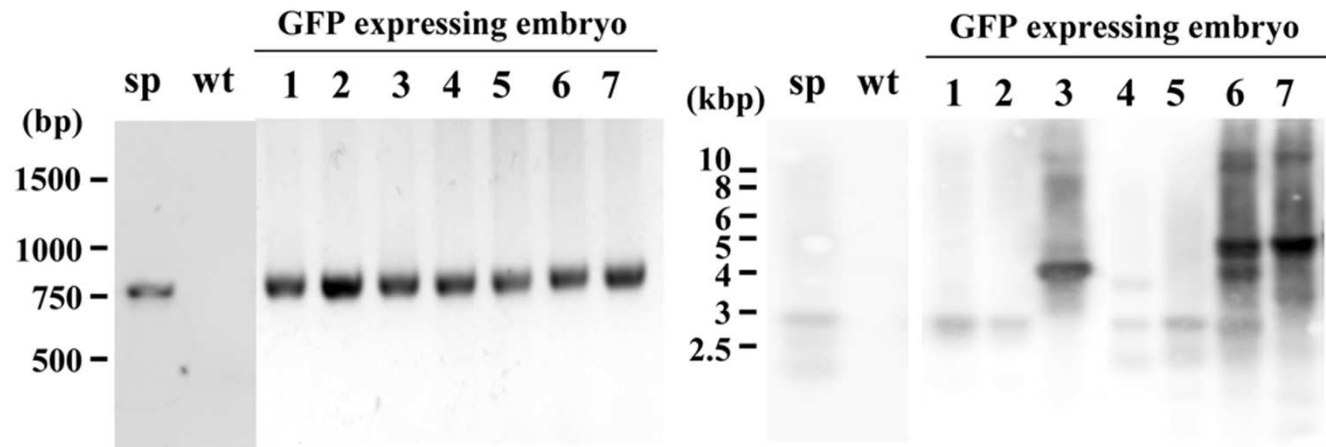
Southern blot



Sperm factorを用いたICSI-GFP発現ウズラ胚とGFP遺伝子の検出



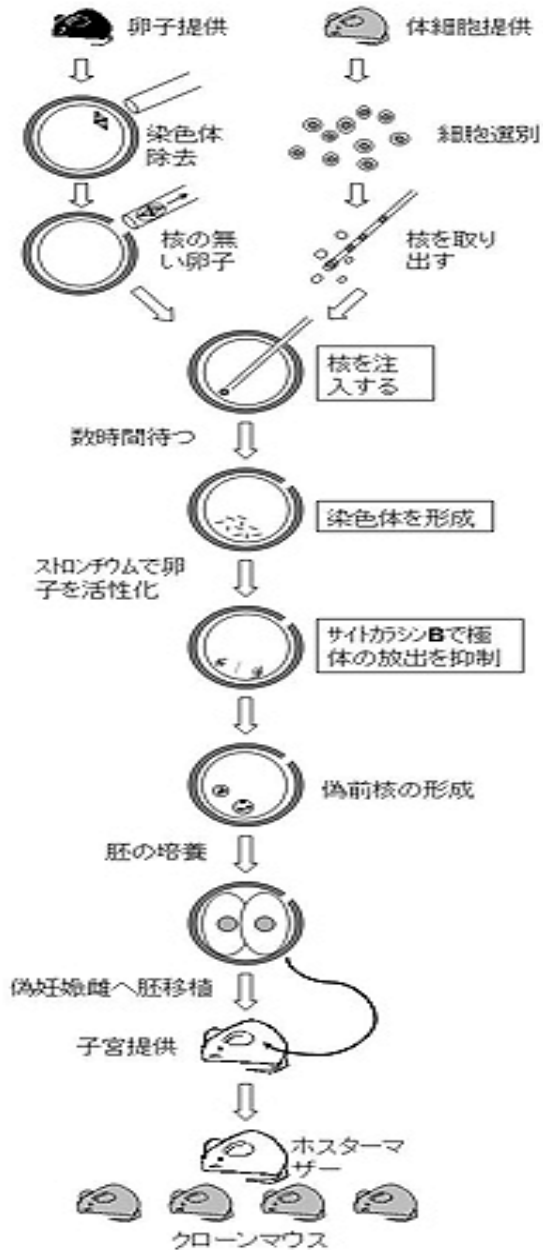
fluorescent stereomicroscope



顕微授精法の応用2

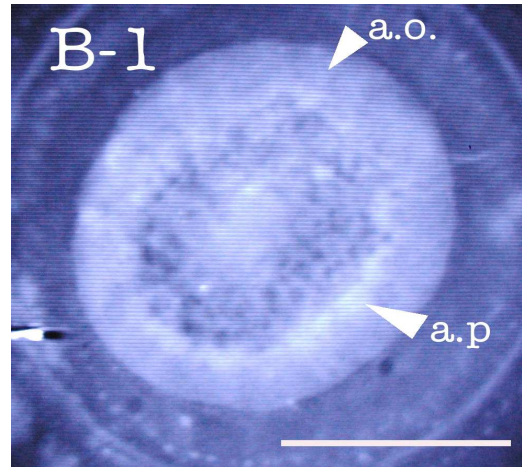
クローン鳥類の作出

哺乳類のクローン動物作製法

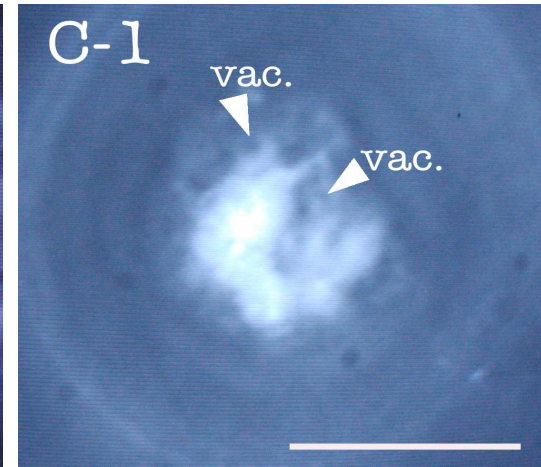


鳥類ではクローン動物作出の報告はない

受精卵



未受精卵

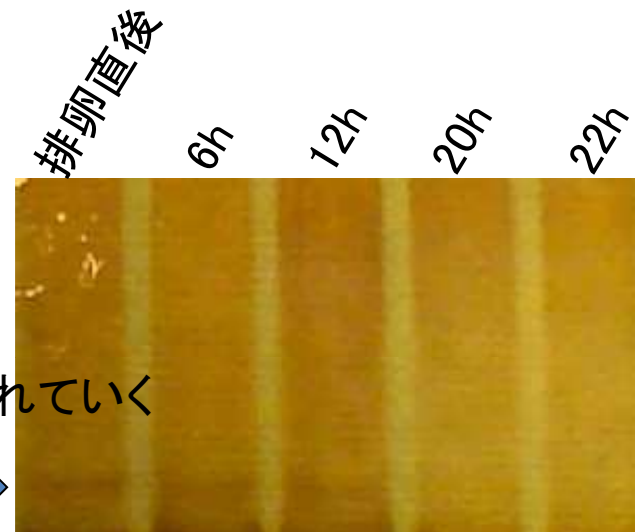


卵の除核操作が要らない



卵子の核は受精しないと壊れていく

卵のDNA →



体細胞核移植によるクローンウズラの作製

ドナー細胞

* 受精卵 (stage X) から得た胚盤葉細胞

卵子

* 放卵卵子または UV照射した排卵卵子

核移植

* 胚盤葉細胞とともに50 μ M IP₃, 1mg/ml 精子抽出物または3つの因子を顕微注入

* 5 μ g/mlのサイトカラシンBを添加した培養液で4時間培養

卵殻培養

* システムI~システムIII培養

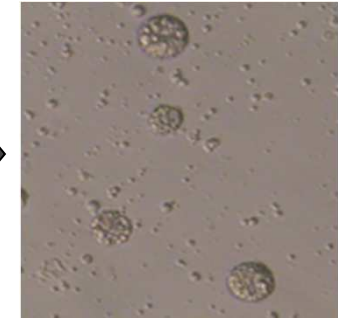
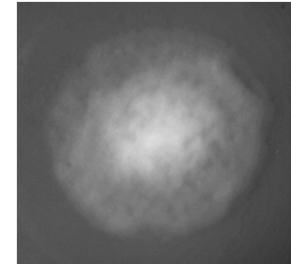
ICSI卵の発生率と発生ステージ

UV Irradiation	No. of oocytes		No. of embryos					
	injected	Developed (%)	Developed to the stage of					
			V	VI	VII	VIII	IX	X
-	25	19 (76)	3	1	6	3	6	
+	10	0 (0)						

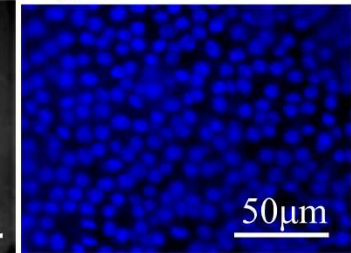
ドナー細胞

stage X

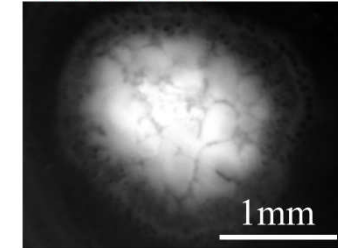
Single blastderm cell



UV照射していない卵



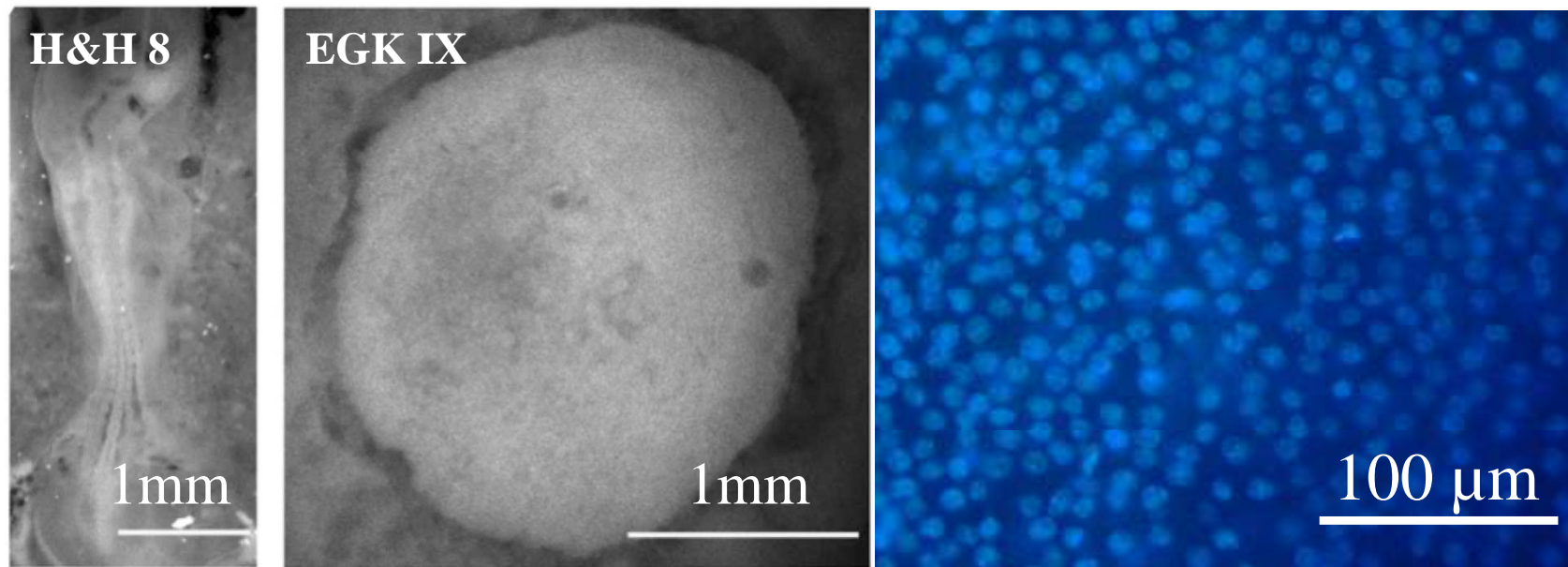
UV照射卵



stereomicroscope

DAPI staining

核移植によるクローンウズラ胚の作出



クローンウズラ胚の発生率と発生ステージ

No. of oocytes		No. of embryos									
Injected	Developed (%)	Developed to the stage of									
		II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	8
21	4 (19.0)		1				1		1		1

本技術は、クローン鳥類を作出可能な唯一のシステムである

想定される用途

家禽育種、食品、農医薬品産業への応用が可能

- ◇ 肉質の良いニワトリの創生
- ◇ 産卵成績の良いニワトリの創生
- ◇ 割れにくい卵の創生

- ◇ 鶏肉、鶏卵の高付加価値化
 - ・ 医薬品を含む卵を産むニワトリの創生
 - ・ アレルゲンを除去した鶏卵や鶏肉の創生

- ◇ 遺伝資源の保存技術の開発

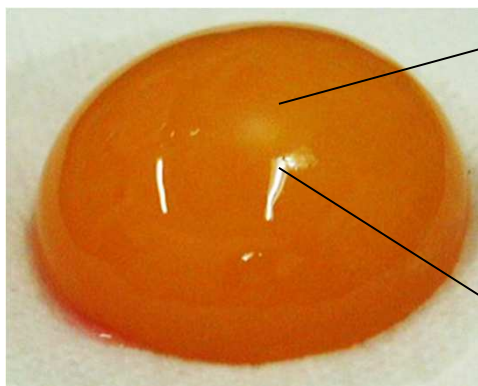
- ◇ 絶滅鳥類の復活

実用化への課題

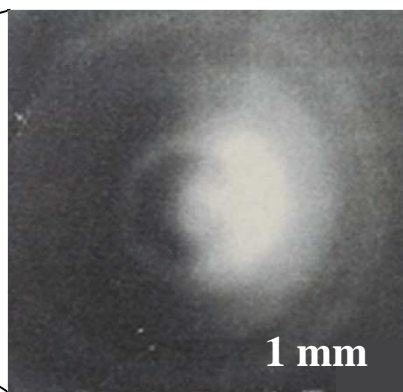
低い孵化率(8-10%)

顕微授精の精度の問題: 胚盤が不透明であり、注入した精子が可視化できない

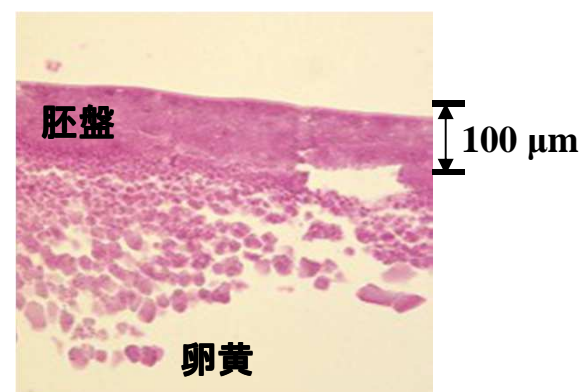
排卵直後のウズラ卵



胚盤の拡大図



胚盤の切片 (HE染色)

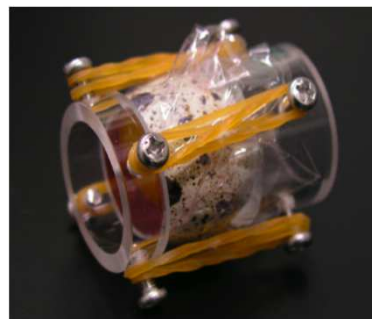


卵殻培養法の問題: in vivo受精卵の卵殻培養での孵化率が19-25%
System IIIの培養2日で約50%の胚が死亡



System I

(1細胞→Stage X)



System II

(Stage X→孵卵52h)



System III

(孵卵52h→hatch)



Hatch

計17日培養

知的財産情報

◇特許等出願状況（未公開）：

- 発明の名称：鳥類の体外受精方法及びクローン細胞又はクローン個体の作製方法、並びにそれらの方法に使用するキット
- 出願番号：PCT/JP2015/076142
(出願日：2015年9月15日)
- 出願人：国立大学法人 静岡大学
- 発明者：笹浪 知宏、水島 秀成

お問い合わせ先

静岡大学

イノベーション社会連携推進機構

コーディネータ 橋詰 俊彦

TEL 054-238-4630

FAX 054-238-3018

e-mail : sangakucd@cjr.shizuoka.ac.jp