

課題名	ニワトリ PGC の凍結保存に関する技術開発
課題管理者	松田 洋一 名古屋大学 大学院生命農学研究科 附属鳥類バイオサイエンス研究センター
実施期間	2018 - 2019 年度
概要・実施体制	<p>昨年度から連携を開始した広島大学との共同研究を進めて行く中で、NBRP リソース系統の凍結保存等における現状と具体的な課題が明らかとなった。その中で、最も重要な点として、名古屋大学 NBRP が保持するニワトリの系統において PGC の増殖率の系統差が極めて大きいことが明らかとなった。本年度はこれらの課題を克服すべく 1NBRP の主要な系統における血中 PGC 数の測定、2 非培養 PGC の凍結保存と凍結融解後の PGC を用いた生殖腺キメラ個体の作製、3PGC の培養の効率化、4 培養 PGC を用いたキメラ個体の作製と後代検定、5 生殖腺由来 PGC を用いたキメラ個体の作製と後代検定、を行い、NBRP リソース保存事業において系統ごとの具体的な凍結保存方法のロードマップを作成することを目的とする。</p>
成果	<p>平成 30 年度の研究計画に基づき、名古屋大学 NBRP が保有するニワトリの系統の中で長期閉鎖系のブラウンレグホン (BL-E)、ヨーロッパ系を代表するポーリッシュ (PB)、高度近交系の GSP、GSN1、ブラックミノルカ (BM-C) およびアルビノの CAL 系統の胚から採取した血液を培養することによって、PGC の培養効率の系統間差を比較した。その結果、増殖効率は BL-E 系統が最も高く、次いで PB、BM-C、CAL 系統の順に高く、そして GSP と GSN1 系統では PGC の増殖がほとんど確認出来なかった。これらの結果から、名古屋大学 NBRP が保有するニワトリの系統において、PGC の増殖率に大きな差があることが明らかとなった。また広島大学との共同研究により、分与された KO-DMEM を用いて、PGC の培養を行ったところ、増殖効率の改善が見られた。その結果 BL-E、BM-C 系統の PGC を凍結保存することに成功した。また凍結した BL-E 系統の PGC を融解し、再培養した結果凍結前の細胞増殖率を示すことが判明した。このことから、凍結方法として 10%DMSO 存在下の緩慢法が有効であることが示唆された。さらに白色レグホン M/O 系統の培養 PGC をレシピエント胚に戻した実験においては、外来 PGC の生殖腺への定着の確認と、性成熟後に外来 PGC 由来の精子形成が確認された。 PGC を移植するレシピエントとして PGC を持たないニワトリ個体を利用することができれば、PGC 由来の個体を効率良く作出することが可能となる。そこで PGC の分化に関連することを見出した遺伝子のノックアウトニワトリを作出し、ホモ個体における PGC 数を検討しようとした結果、予想外にホモ個体は胚性致死であった。この結果から、このノックアウトニワトリをレシピエントに用いることは出来ず、レシピエントには NBRP が保持する系統の中で内在性の PGC 数が少ない系統を用いることが有効であることが示唆された。</p>