

《総 説》

ニワトリにおける始原生殖細胞を用いた体細胞核移植の試み

峰 松 健 夫^{1,2}

¹ 独立行政法人農業生物資源研究所遺伝子組換え家畜研究センター, 茨城県つくば市池の台 305-8602

² 株式会社バイオマスター, 東京都文京区本郷 113-0033

鳥類の卵細胞は, 哺乳類とは大きく異なった形態的・生理学的特徴を持っていることから, ニワトリの繁殖工学の分野は, 生殖幹細胞である始原生殖細胞 (PGC) を中心とした独自の発展を遂げてきた。

ニワトリの胚発生において, 胚体外で発生した PGC は血流を循環した後に生殖腺原基へと移住する。この性質を利用して, 2 日胚の血流中に PGC を移植することで生殖系列キメラ動物を作製することができる。この技術は, 家禽繁殖工学の基盤技術として遺伝資源の保存や遺伝子改変動物の作製に応用されている。

一方, マウスを中心とした哺乳類では, 近年, 胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞の樹立, 遺伝子ターゲティング法の開発, 体細胞クローン動物の作製など重要な発見が相次いでいる。今後の家禽繁殖工学の発展には, これらの新しい技術を取り入れ, これまでの研究成果と統合していく必要があるものと思われる。

本稿では, 体細胞核移植技術を家禽繁殖工学へ導入することを目的とした, PGC を核レシピエントとした体細胞核移植の取り組みを紹介する。

キーワード: 体細胞核移植, 始原生殖細胞, 生殖系列キメラ, ニワトリ

はじめに

卵生動物であるニワトリの卵細胞は, 哺乳類であるマウスやウシ, ブタなどとは大きく異なった形態的・生理学的特徴を持っている。

まず, ニワトリは季節に関らず 1 年を通じて産卵することができ, 卵用鶏では年間 200 個以上もの卵を生産することができる。受精卵は, 放卵されたとき既に約 60,000 細胞からなる胚盤葉を形成しているが, 10~25°C で数日間発生を停止させたまま保存することができる。また, 母体外で孵卵することで胚発生が進行するため, 胚盤葉期以降のいかなる発生段階の胚を得ることも可能である。更に, 受精直後以降の胚の体外培養法も開発されており (Naito and Perry, 1989; Naito *et al.*, 1990, 1995, 2005), 顕微鏡下における胚発生過程の観察や, 顕微操作を容易に行うことができる。これらの特徴から, ニワトリは発生学や繁殖学における優れた実験動物として重用されてきた。

一方, 卵細胞内に大量に蓄積された卵黄は, 卵細胞や胚の凍結保存を困難にしており, 家禽繁殖工学の発展の妨げとなっている。しかし, Yasuda *et al.* (1992) により, 生殖幹細胞である始原生殖細胞 (Primordial Germ Cell, 以下 PGC) を用いた生殖系

列キメラの作製が報告されて以降, この技術を基礎として, 家禽独自の繁殖工学的戦略が考案され, 数多くの研究成果が発表されてきた (Tajima, 2002; Naito and Kuwana, 2004)。

本稿では, PGC を用いた生殖系列キメラニワトリについて概説し, PGC を用いた体細胞核移植動物作製に向けた試みを紹介する。

I. 始原生殖細胞

始原生殖細胞 (PGC) とは, 精粗細胞および卵祖細胞への分化能を有する生殖幹細胞である。

ニワトリ PGC は, 胚発生初期に明域中央部の胚盤葉上層から分化し (Eyal-Giladi *et al.*, 1976, 1981; Ginsburg and Eyal-Giladi, 1987; Ginsburg, 1997; Kagami *et al.*, 1997; Naito *et al.*, 2001), 発生ステージ 4 (Hamburger and Hamilton, 1951) においては生殖三日月環で観察される (Clawson and Domm, 1969; Swift, 1914; England and Matsumura, 1993)。発生が進み血管系が形成されると, PGC は血管内に取り込まれ血流に乗って循環し, その後アメラバ運動によって血管から抜け出し生殖腺原基へと移住する (Meyer, 1964; Kuwana, 1993; Kuwana and Rogulska, 1999)。その後, PGC は精祖細胞または卵祖細胞へと分化していく。

II. 始原生殖細胞を用いた生殖系列キメラ

Yasuda *et al.* (1992) は, 胚体外で発生した PGC が生殖腺原基へと移住する過程で血流中を循環する性質を利用して, 生殖系列キメラ動物の作出が可能であることを初めて示した。彼らは, ニワトリ 2 日胚の血液から濃度勾配遠心分離法を用いて分離した

2008 年 5 月 19 日受付, 2008 年 6 月 2 日受理

連絡者: 峰松健夫

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学アントレプレナープラザ 704

Tel: 03-5844-1533

Fax: 03-5844-1534

E-mail: minematsu@biomaster.jp

PGC をニホンウズラの 2 日胚の血流中に注入すると、24 時間後以内にニワトリ PGC がウズラ胚の生殖腺原基へ移住することを報告した。その後、同様の手法を用いて、異なる品種間で PGC の移植を行った生殖系列キメラニワトリが、移植 PGC 由来の産子を生産することが証明された (Tajima *et al.*, 1993; Naito *et al.*, 1994b, 1998b)。更に、2 日胚の血流中を循環している PGC だけではなく、生殖腺へ移住後の生殖細胞も、孵卵 2 日目のレシピエント胚の血管内へ移植された後生殖腺原基へ移住し、生殖系列キメラ動物の作製が可能であることが示された (Tajima *et al.*, 1998, 2004; Minematsu *et al.*, 2004b; Naito *et al.*, 2007a; Kohara *et al.*, 2008)。こうした成果によって、家禽独自の遺伝資源の保存や、繁殖工学の方法論が議論されるようになった (図 1)。

ウシやブタ、マウスなど多くの動物種では、精子や卵子、受精卵の凍結保存が可能であり、遺伝資源保存法として確立している。一方、ニワトリでは、精子の凍結保存は可能であるものの (Wishart, 2007)、卵子や受精卵には大量の卵黄が含まれていることなどから、長期間の保存は実現していない。生殖系列キメラの作出は、PGC の凍結保存による新たな遺伝資源保存法を可能にした (Naito *et al.*, 1994a; Tajima *et al.*, 1998, 2003, 2004; Kohara *et al.*, 2008)。

また、生殖系列キメラは遺伝子改変動物の作製に有効である。これまで数多くの試みがなされ (Watanabe *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1998; Naito *et al.*, 1998a, 1999, 2007b)、2006 年には、ついに PGC を用いたトランスジェニック・ニワトリの作製に成功したことが報告された (van de Lavoie *et al.*, 2006)。今後、ノックアウトやノックインニワトリの作製技術の開発や、遺伝子改変ニワトリの実用的応用への取り組みが活発化することを期待したい。

一方、生殖系列キメラは、生殖細胞の移住や分化を研究する上で、重要な実験材料となり得る。特に興味深いのは、PGC を採取するドナー動物と、移植されるレシピエント胚の性が一致しない場合でも、生殖系列キメラ動物が作製され、移植された PGC 由来の産子が生産されることである (Tagami *et al.*, 1997, 2007; Naito *et al.*, 1999)。このことは、PGC が精祖細胞および卵祖細胞のいずれにも分化できる多分化能を保有していることを示しており、生殖細胞の分化を理解するうえで重要な知見である。更に、雌雄産み分け技術に繋がる可能性を秘めている。

このように家禽繁殖工学の分野では、PGC を利用した独自の発展を遂げてきた。一方で、マウスなど哺乳類では、体細胞核移植によるクローン動物の作製をはじめとした新たな技術が開発されており、これらの技術を家禽へ応用する試みも始まっている。

III. 体細胞核移植 PGC を用いた生殖系列キメラ胚の作製

近年、体細胞核移植によるクローン動物作製が相次いで報告された。Wilmut *et al.*, (1997) は、乳腺上皮細胞を用いて体細胞核移植ヒツジの作製に成功した。以降、ウシ (Kato *et al.*, 1998)、マウス (Wakayama *et al.*, 1998)、ヤギ (Baguishi *et al.*, 1999)、ブタ (Polejaeva *et al.*, 2000)、ネコ (Shin *et al.*, 2002)、ラ (Woods *et al.*, 2003)、ウマ (Galli *et al.*, 2003)、イヌ (Lee *et al.*, 2005) などにおいて体細胞クローンの報告がなされた。これらの研究成果は、一度分化した体細胞核も分化全能性を獲得させることができるという新たな知見と、発生・分化に関する分子メカニズムを解明するための新たな方法論を提示した。また、体細胞クローン技術は、優良家畜の増産や、遺伝資源の保存、遺伝子改変動物の効率的な生産、家畜生産物への付加価値の付与など、学術的にも産業的にも極めて価値の大きい技術であると考えられる。

そこで私たちは、体細胞核移植技術と、PGC を用いた生殖系列キメラ作製技術とを融合し、体細胞核移植ニワトリを作製する試みに着手した。図 2 に示したように、PGC を体細胞核のレシピエントとして用いることで、生殖系列キメラ動物を介して体細胞核由来の産子が得られるものと考えられる。ただし、PGC を核レシピエントとした場合、減数分裂時の相同染色体の交叉、および受精という過程を経るため、産子は体細胞ドナーのクローン動物とはならない。

PGC の機能的除核

体細胞核移植 PGC の作製の第一歩として取り組まなければならないのは、PGC の除核である。

細胞の除核法として一般的に用いられているのは、マイクロマニピュレーターを用いて核を吸引除去する方法 (McGrath and Solter, 1983) や、サイトカラシンなどの薬品を用いて細胞骨格を

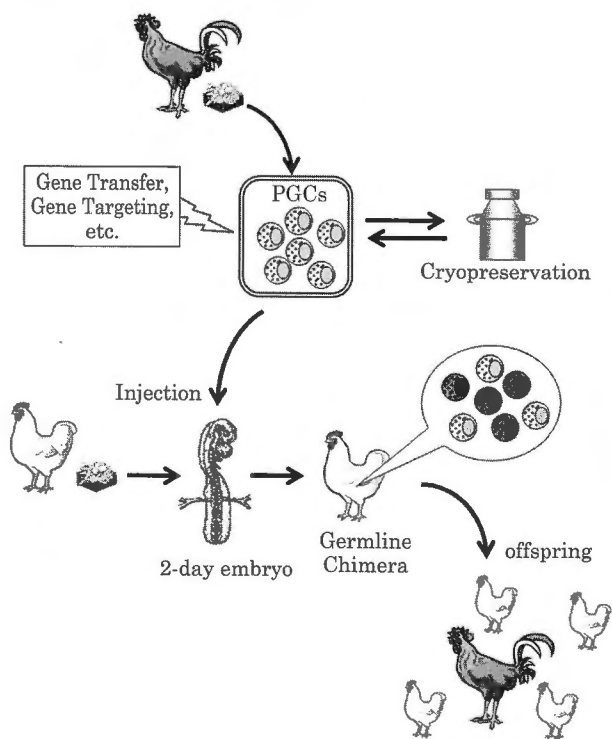


図 1. PGC を用いた生殖系列キメラの作製
始原生殖細胞 (PGC) は、孵卵 2 日目の胚の血流中を循環して生殖腺原基へ移住する。そこで、目的とする品種・個体の PGC を汎用品種の 2 日胚血管内に移植すると、移植された PGC 由来の生殖細胞と自らの生殖細胞を併せ持つ生殖系列キメラニワトリが作製される。従って、PGC をターゲットとした遺伝子改変や遺伝資源の保存が可能である。

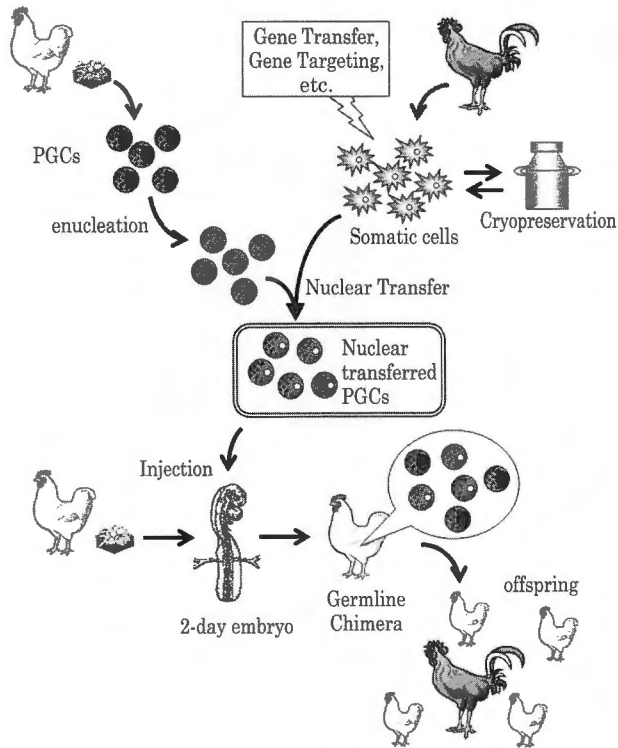


図 2. PGC を用いた体細胞核移植ニワトリの作製目的とする体細胞の核を除核した始原生殖細胞 (PGC) に移植した体細胞核移植 PGC を用いて、生殖系列キメラニワトリの作製に取り組んでいる。このような試みは、希少動物の効果的な増産や保存、遺伝子改変動物の効率的生産を可能にするものと期待される。

一時的に崩壊させた後、超高速遠心分離によって核のみを細胞外へ分離する方法 (Prescott and Kirkpatrick, 1973) など、物理的に核を取り除く方法である。当初、私たちもこれらの方法を試みたが、ニワトリ PGC は細胞の大部分を核が占めていることから、十分な大きさの細胞質体を作製することができなかった。そこで、私たちは短波長紫外線の照射により核酸にダメージを与え、機能的に核を不活化することを試みた (Minematsu *et al.*, 2004a)。紫外線を照射された細胞の DNA では、隣り合ったピリミジン塩基が結合し Cyclobutane Pyrimidine Dimers (CPDs) や, Prymidine-(6-4)-Pyrimidone Photoproducts (6-4PPs) を形成する (Setlow and Carrier, 1966; Mori *et al.*, 1991; Moné *et al.*, 2001)。CPDs や 6-4 PPs が DNA 上に存在する細胞では、DNA の複製 (Rupp and Howard-Flanders, 1968; Radman, 1971) や転写 (Herrlich *et al.*, 1994; van Hoffen *et al.*, 1999; Moné *et al.*, 2001) が抑制される。

紫外線照射により機能的に除核した卵子を用いた核移植は、両生類において古くから試みられている (Gurdon *et al.*, 1975)。また、マウス (Tsunoda *et al.*, 1988) や、ウサギ (Yang *et al.*, 1990)、ウシ (Bradshaw *et al.*, 1995)、ブタ (Leal *et al.*, 1999) などの哺乳類での有効性も検討されている。

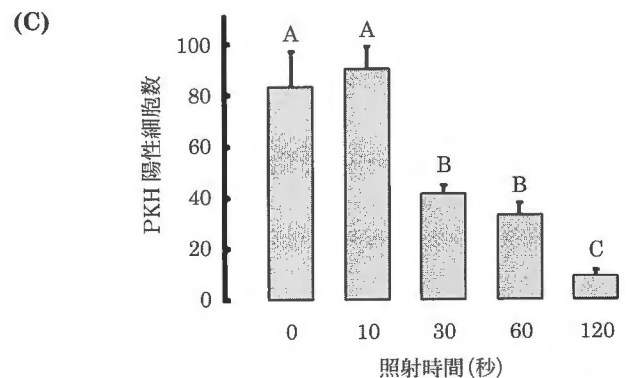
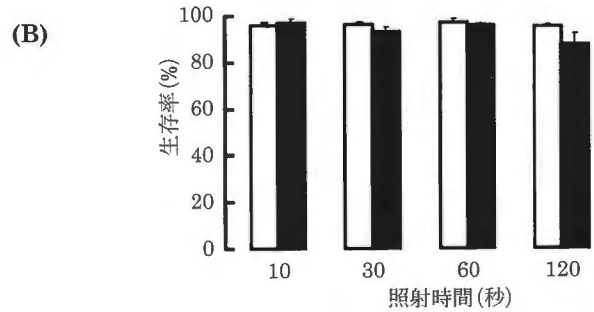
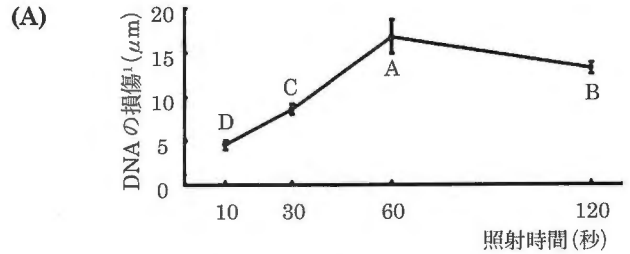


図 3. PGC における紫外線照射の影響
 (A) コメットアッセイ法による DNA 損傷の定量解析。DNA の損傷¹: 対照区および紫外線照射区において泳動象の長さを測定し、その差を DNA の損傷とみなした。0.9±0.1 μW/cm の紫外線を照射した時、60 秒までは照射時間に比例して損傷が増加する。値は平均値±標準誤差を示し、Duncan の多重検定法を用いて解析した。A-D: 異なる文字間で有意差あり (P<0.05)。
 (B) PI・FDA 二重染色による紫外線照射 PGC の生存率。値は平均値±標準誤差を表す。生存率の平方根を逆正弦変換した後に対応のある T 検定で比較したところ、対象区 (□) および照射区 (■) に有意差は認められなかった。
 (C) 紫外線照射 PGC の生殖腺への移行能。紫外線照射 PGC を蛍光色素 PKH-26 で染色した後、20 個の PGC を 2 日胚血流中に注入し、5 日後に生殖腺に移住した PKH 陽性細胞数を計測した。紫外線を 30~60 秒間照射された場合、生殖腺に存在する PKH 陽性 PGC 数は半減しており、PGC の増殖能が抑制されているのではないかと考えられる。値は平均値±標準誤差を示し、Duncan の多重検定法を用いて解析した。A-C: 異なる文字間で有意差あり (P<0.05)。



図 4. 体細胞核移植 PGC の作製

紫外線照射 PGC を核レシピエント、胚性血球細胞を核ドナーとして、電気融合法により体細胞核移植 PGC を作製した。電気融合法では、融合に先んじて微弱な交流電流により細胞を整列させ、多数の細胞が一つに融合するのを防ぐことができる (A)。その後、直流パルスにより、接する細胞間で膜融合が起きる。胚性血球細胞と融合した PGC は、PGC 由来の巨大な核と、胚性血球細胞由来の小さな核を併せ持っている (B: 明視野, C: ヘキスト染色)。あらかじめ、胚性血球細胞を蛍光色素 PKH-26 で標識して用いた場合、融合後に色素が PGC の細胞膜にも拡散し、両者の細胞膜が確かに融合していることが確認できる (D)。

私たちは、紫外線照射 PGC の DNA 損傷をコメットアッセイ法を用いて、細胞膜および細胞質の損傷を PI・FDA 二重染色にて解析したところ、 $0.9 \pm 0.1 \mu\text{W}/\text{cm}$ の紫外線を 30~60 秒間照射された PGC は、核にのみ損傷を受けていることが明らかとなった (図 3-A, B)。また、これらの紫外線照射 PGC を蛍光色素 PKH-26 で標識した後、2 日胚の血流中に移植し、5 日後に生殖腺に存在する PKH 陽性 PGC を観察したところ、紫外線照射 PGC は生殖腺への移住能は保持しており、また増殖能が抑制されていることが示唆された (図 3-C)。これらの結果から、紫外線の照射は、PGC の機能的除核法として有効であろうと考え、体細胞核移植における核レシピエントとしての利用を試みた。

体細胞核移植 PGC を用いた生殖系列キメラの作製

紫外線照射 PGC を核レシピエント、胚性血球細胞を体細胞核ドナーとした場合、電気融合法により約 15% の効率で核移植 PGC を作製することができる (Minematsu *et al.*, 2004c; 図 4)。これらの核移植 PGC を標識して、2 日胚の血流中に移植してみると、5 日後の生殖腺にはわずかではあるものの標識細胞が検出された。また標識細胞を含む生殖腺から DNA を抽出し解析すると、核ドナーにのみ存在する配列も検出できることから、胚性血球細胞が紫外線照射 PGC との細胞融合によって、生殖腺への移住能を獲得したことが示された (未発表データ)。これらの結果は、体細胞核移植 PGC を用いた生殖系列キメラ動物の作製が可能であることを強く示唆している。現在のところ、核移植 PGC の作製効率や生殖腺への移住効率が低いため、生殖腺で観察される核移植 PGC の十分な解析には至っておらず、改善が必要である。

最近では、ニワトリ繊維芽細胞から作製した核体と PGC との融合 (Kohara *et al.*, 2008) や、ニワトリとウズラ間での体細胞核移植 PGC の作製 (Ishiguro *et al.*, 2008) など、家禽遺伝資源保存や遺伝子組換えニワトリの作製などへの応用を念頭にした試みにも取り組まれている。

今後は、核移植 PGC が生殖腺に移住した後の動態 (増殖や周囲の細胞との相互作用など) や体細胞核のリプログラミング、正常な精子あるいは卵子への分化能などについても研究が必要であり、最終的には核移植 PGC 由来の産子の生産を試みる予定である。

これまで体細胞核移植は、一部の家畜や実験動物、ペットなどでしか試みられていないが、PGC を用いた体細胞核移植動物の作製法の確立は、野生動物や鳥類、爬虫類など、多くの動物種における繁殖工学の新たな基盤技術となりえるものと思われる。また、生殖細胞の発生や分化に関する基礎研究においても重要な実験モデルとして注目される。

おわりに

本稿でも述べたように、これまで家禽繁殖工学分野では PGC を中心とした独自の発展を遂げてきた。このことは、生殖細胞の発生や分化に関するメカニズムの理解に大きく貢献した他、新たな遺伝資源保存法や遺伝子改変動物の作製法などを提案し、家禽以外の動物種の研究にも影響を与えてきた。

一方で、マウスやラットなどの実験動物を用いた研究では、胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞の樹立、遺伝子ターゲット法の開発、体細胞クローン動物の作製など重要な発

見が相次いでいる。今後の家禽繁殖工学の発展には、これらの新しい技術を取り入れ、これまでの研究成果と統合していく必要があるものと思われる。今回の『PGCを用いた体細胞核移植』も、そうした流れの中での試みである。昨年末には、ついにニワトリのES細胞株の樹立に成功したという報告もなされた（中野ら、2007）。近い将来、こうした努力の末に、家禽繁殖工学における大きなブレイクスルーが起きることを期待してやまない。

謝 辞

本稿は、平成17年度日本家禽学会奨励賞受賞課題である「始原生殖細胞を用いた体細胞核移植ニワトリの作製の試み」の内容の一部をまとめたものです。本稿の執筆の機会を与えて頂きました日本家禽学会事務局、奨励賞選考委員会、ならびに編集委員会の諸先生方に感謝いたします。

本研究は、私が筑波大学大学院在籍時に執り行った内容であり、終始懇切丁寧な御指導を賜りました田島淳史先生に深謝いたします。また、本稿執筆にあたり御指導くださいました内藤充先生に心から謝意を表します。

なお、本稿で紹介された研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金（16380184）の補助を受けて行われました。

引用文献

- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW and Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*, 17 : 456-461. 1999.
- Bradshaw J, Jung T, Fulka JJ and Moor RM. UV irradiation of chromosomal DNA and its effect upon MPF and meiosis in mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 41 : 503-512. 1995.
- Clawson RC and Domm LV. Origin and early migration of primordial germ cells in the chick embryo : a study of the stages definitive primitive streak through eight somites. *American Journal of Anatomy*, 125 : 87-111. 1969.
- England MA and Matsumura G. Primordial germ cells in the primitive streak stages chick embryo as studied by scanning electron microscopy. *Journal of Anatomy*, 183 : 67-73. 1993.
- Eyal-Giladi H, Kochav S and Menashi MK. On the origin of primordial germ cells in the chick embryo. *Differentiation*, 6 : 13-16. 1976.
- Eyal-Giladi H, Ginsburg M and Farbarov A. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 65 : 139-147. 1981.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R and Lazzari G. Pregnancy : a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 424 : 635. 2003.
- Ginsburg M and Eyal-Giladi H. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development*, 101 : 209-219. 1987.
- Ginsburg M. Primordial germ cell development in avians. *Poultry Science*, 76 : 91-95. 1997.
- Gurdon JB, Laskey RA and Reeves OR. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 34 : 93-112. 1975.
- Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stage in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88 : 49-92. 1951.
- Herrlich P, Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Gebel S, Blattner C and Rahmsdorf HJ. The mammalian UV response : Mechanism of DNA damage induced gene expression. *Advances in Enzyme Regulation*, 34 : 381-395. 1994.
- Hong YH, Moon YK, Jeong DK and Han JY. Improved transfection efficiency of chicken gonadal primordial germ cells for the production of transgenic poultry. *Transgenic Research*, 7 : 247-252. 1998.
- Ishiguro S, Kanai Y and Tajima A. Production of inter-genus somatic nuclear transferred gonadal germ cells (snt-GGCs) in Avian species. *Journal of Poultry Science*, 45 : 143-146. 2008.
- 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.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H and Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282 : 2095-2098. 1998.
- Kohara Y, Kanai Y and Tajima A. Cryopreservation of gonadal germ cells (GGCs) from the domestic chicken using vitrification. *Journal of Poultry Science*, 45 : 57-61. 2008.
- Kohara Y, Minematsu T, Aikawa T, Kanai Y and Tajima A. Conditioning of karyoplasts for producing somatic nuclear transferred gonadal germ cells in domestic chickens. *Journal of Reproduction and Development*, 54 : 221-224. 2008.
- Kuwana T. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Development, Growth and Differentiation*, 35 : 237-243. 1993.
- Kuwana T and Rogulska T. Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage. *Cellular and Molecular Biology*, 45 : 725-736. 1999.
- Leal CL, Lee C and Moor RM. UV irradiation of pig metaphase chromosomes : maturation-promoting factor degradation, nuclear cytology and cell cycle progression. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116 : 363-371. 1999.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 436 : 641. 2005.
- McGrath J and Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220 : 1300-1302. 1983.
- Meyer DB. Migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Developmental Biology*, 10 : 154-190. 1964.
- Minematsu T, Kanai Y and Tajima A. Effects of ultraviolet irradiation on the migratory ability of primordial germ cells (PGCs) in the domestic chicken. *Journal of Poultry Science*, 41 : 110-119. 2004a.
- Minematsu T, Tajima A and Kanai Y. The migratory ability of gonadal germ cells in the domestic chicken. *Journal of*

- Poultry Science, 41 : 178-185. 2004b.
- Minematsu T, Tajima A and Kanai Y. Attempt to produce nuclear transferred primordial germ cells using electrofusion in domestic chicken. *Animal Science Journal*, 75 : 271-274. 2004.
- Moné MJ, Volker M, Nikaido O, Mullenders LH, van Zeeland AA, Verschure PJ, Manders EM, van Driel R. Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Reports*, 2 : 1013-1017. 2001.
- Mori T, Nakane M, Hattori T, Matsunaga T, Ihara M and Nikaido O. Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA. *Photochemistry and Photobiology*, 54 : 225-232. 1991.
- Naito M and Perry MM. Development in culture of the chick embryo from cleavage to hatch. *British Poultry Science*, 30 : 251-256. 1989.
- Naito M, Nirasawa K and Oishi T. Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *Journal of Experimental Zoology*, 254 : 322-326. 1990.
- Naito M, Tajima A, Tagami T, Yasuda Y and Kuwana T. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102 : 321-325. 1994a.
- Naito M, Tajima A, Yasuda Y and Kuwana T. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, 39 : 153-161. 1994b.
- Naito M, Nirasawa K and Oishi T. An *in vitro* culture method for chick embryos obtained from the anterior portion of the magnum of oviduct. *British Poultry Science*, 36 : 161-164. 1995.
- Naito M, Sakurai M and Kuwana T. Expression of exogenous DNA in the gonads of chimaeric chicken embryos produced by transfer of primordial germ cell transfected *in vitro* and subsequent fate of the introduced DNA. *Journal of Reproduction and Fertility*, 113 : 137-143. 1998a.
- Naito M, Tajima A, Yasuda Y and Kuwana T. Donor primordial germ cell-derived offspring from recipient germline chimaeric chickens : absence of long-term immune rejection and effects on sex ratios. *British Poultry Science*, 39 : 20-23. 1998b.
- Naito M, Matsubara Y, Harumi T, Tagami T, Kagami H, Sakurai M and Kuwana T. Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117 : 291-298. 1999.
- Naito M, Sano A, Matsubara Y, Harumi T, Tagami T, Sakurai M and Kuwana T. Localization of primordial germ cells or their precursors in stage X blastoderm of chickens and their ability to differentiate into functional gametes in opposite-sex recipient gonads. *Reproduction*, 121 : 547-552. 2001.
- Naito M and Kuwana T. Production of chimeric chickens. *Methods in Molecular Biology*, 254 : 245-254. 2004.
- Naito M, Sano A, Kawashima T, Nakamichi H, Harumi T, Matsubara Y and Kuwana T. Culture of chicken embryos obtained from the anterior region of the magnum of the oviduct after removing a thin layer of dense albumen capsule from the ovum. *Journal of Poultry Science*, 42 : 140-144. 2005.
- Naito M, Minematsu T, Harumi T and Kuwana T. Testicular and ovarian gonocytes from 20-day incubated chicken embryos contribute to germline lineage after transfer into bloodstream of recipient embryos. *Reproduction*, 134 : 577-584. 2007a.
- Naito M, Minematsu T, Harumi T and Kuwana T. Intense expression of GFP gene in gonads of chicken embryos by transfecting circulating primordial germ cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Poultry Science*, 44 : 416-425. 2007b.
- 中野幹治, 西本真樹, 鎌田 綾, 西田憲正, 有澤謙二郎, 田村篤彦, 山下裕輔, 坂下真耶, 横山聡美, 古澤修一, 松田治男, 堀内浩幸. (2P-1181) 新規ニワトリ胚性幹細胞の樹立とその特徴. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会講演要旨集, 507. 2007.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407 : 86-90. 2000.
- Prescott DM and Kirkpatrick JB. Mass enucleation of cultured animal cells. *Methods in Cell Biology*, 7 : 189-202. 1973.
- Radman M. Target size of DNA in ultraviolet irradiation. *Nature New Biology*, 230 : 277-278. 1971.
- Rupp WD and Howard-Flanders P. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *Journal of Molecular Biology*, 31 : 291-304. 1968.
- Setlow RB and Carrier WL. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *Journal of Molecular Biology*, 17 : 237-254. 1966.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L and Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 415 : 859. 2002.
- Swift CH. Origin and early history of the primordial germ-cells in the chick. *American Journal of Anatomy*, 15 : 483-516. 1914.
- Tagami T, Matsubara Y, Hanada H and Naito M. Differentiation of female chicken primordial germ cells into spermatozoa in male gonads. *Development, Growth and Differentiation*, 39 : 267-271. 1997.
- 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.
- Tajima A, Naito M, Yasuda Y and Kuwana T. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology*, 40 : 509-519. 1993.
- Tajima A, Naito M, Yasuda Y and Kuwana T. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *Journal of Experimental Zoology*, 280 : 265-267. 1998.
- Tajima A. Production of germ-line chimeras and their applications in domestic chicken. *Avian and Poultry Biology*

- Review, 13 : 15-30. 2002.
- Tajima A, Barbato GF, Kuwana T and Hammerstedt RH. Conservation of a geneticaly selected broiler line (42L) using cryopreserved circulating primordial germ cells (PGCs) isolated by filtration method. *Journal of Poultry Science*, 40 : 53-61. 2003.
- Tajima A, Minematsu T and Ohara M. Production of germ-line chimeras by the transfer of cryopreserved gonadal germ cells (GGCs) collected from 7- and 9-day-old chick embryos. *Animal Science Journal*, 75 : 85-88. 2004.
- Tsunoda Y, Shioda Y, Onodera M, Nakamura K and Uchida T. Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82 : 173-178. 1988.
- van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME and Etches RJ. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 441 : 766-769. 2006.
- van Hoffen A, Kalle WHJ, de Jong-Versteeg A, Lehmann AR, van Zeeland AA and Mullenders LHF. Cells from XP-D and XP-D-CS patients exhibit equally inefficient repair of UV-induced damage in transcribed genes but different capacity to recover UV-inhibited transcription. *Nucleic Acid Research*, 27 : 2898-2904. 1999.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394 : 369-374. 1998.
- Watanabe M, Naito M, Sasaki E, Sakurai M, Kuwana T and Oishi T. Liposome-mediated DNA transfer into chicken primordial germ cells *in vivo*. *Molecular Reproduction and Development*, 38 : 268-274. 1994.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385 : 810-813. 1997.
- Wishart GJ. Cryopreservation of avian spermatozoa. *Methods in Molecular Biology*, 368 : 219-225. 2007.
- Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN and Pate BJ. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 301 : 1063. 2003.
- Yang X, Zang L, Kovacs A, Tobbyack C and Foote RH. Potential of hypertonic medium treatment for embryo micro-manipulation : II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, subzona insertion, and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated oocytes in rabbits. *Molecular Reproduction and Development*, 27 : 118-129. 1990.
- Yasuda Y, Tajima A, Fujimoto T and Kuwana T. A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96 : 521-528. 1992.

Attempt at Somatic Nuclear Transfer Using Primordial Germ Cells in Domestic Chicken

Takeo Minematsu^{1,2}

¹ Transgenic Animal Research Center, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8602

² Research and Development Division, Biomaster Inc., Hongo, Tokyo 113-0033

Primordial germ cell (PGC) is an essential tool for the progress of the avian reproductive biotechnology, because of the differences in morphological and physiological characteristics of ova from mammalian species.

PGCs, which are germline stem cells and capable of differentiating to both spermatogonium and oogonium, originate from the central zone of the area pellucida of a blastoderm and migrate toward the genital ridge via the germinal crescent and bloodstream in avian. Taking advantage of the circulating nature of PGCs at their early embryonic stage, germline chimeric chickens could be produced by transferring PGCs into the bloodstream of 2-day incubated recipient embryos. This technology is applied to the preservation of genetic resources and producing the genetically modified birds as a basic technology of avian reproductive biotechnology.

On the other hand, recently, a lot of innovative discoveries have been reported in mammals, such as establishment of embryonic stem cells and induced-pluripotent stem cells, gene targeting, and production of cloned animals by somatic nuclear transfer. The integration of these novel technologies is required for further progress of avian reproductive biotechnology.

In this review, the progression of the studies on germline chimeric chickens produced by PGC transfer was summarized and our approaches of the somatic nuclear transfer using PGCs as nuclear recipients in chicken were introduced.

(Japanese Journal of Poultry Science, 45 : J53-J60, 2008)

Key words : somatic nuclear transfer, primordial germ cell, germline chimera, chicken