

令和元年6月17日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06874

研究課題名(和文) 鳥類ゲノムマニピュレーションエンジニアリング技術の創製

研究課題名(英文) Development of avian genome manipulation engineering

研究代表者

河邊 佳典 (Kawabe, Yoshinori)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：30448401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゲノム操作技術を用いることで、胚レベルでダイレクトにゲノム操作可能な技術の開発と鶏卵バイオリクターをはじめとする鳥類のバイオテクノロジーへの応用を目指した、鳥類ゲノムマニピュレーションエンジニアリング技術の創製を目的とした。ニワトリ卵白タンパク質遺伝子座特異的に外来遺伝子を導入(ノックイン)した細胞において、遺伝子発現を活性化するシステムを用いて内在性の遺伝子座を活性化させることで、導入遺伝子発現の誘導に成功した。ニワトリ初期胚への遺伝子導入条件を様々検討することで最適な条件を決定し、導入遺伝子の発現を観察することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、トランスジェニックニワトリバイオリクターの創製やニワトリ細胞における部位特異的プロモーターの活性化における研究に対して新たな知見を与えるものと考えられる。また、胚へ直接遺伝子導入に用いることで、培養細胞を介することなく目的のトランスジェニックニワトリの作製が期待できる。このように、鳥類で自由なゲノムマニピュレーションの実現により、卵への医薬品タンパク質生産にとどまらず、抗卵白アレルギー卵の創製、インフルエンザ耐性ニワトリ作製といった応用性の高い分野へ展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Here, we attempted to develop avian genome manipulation technology for the generation of transgenic avian bioreactor. We designed various guide RNAs against egg white-related genes and evaluated genome editing efficiency on chicken cell genome of CEF and DF-1 cells. After constructing knock-in vector encoding reporter genes, transgene could be integrated correctly into expected locus using CRISPR/Cas9 system. We decided the condition that endogenous OVA locus was activated by dCas9 transactivation system. We optimized gene transfer condition into chicken embryos to observe the expression of transgene.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：ゲノムマニピュレーション ゲノム操作工学 胚工学 トランスジェニック鳥類 オボアルブミン dCas9転写活性化システム 鳥類バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

トランスジェニックバイオリクターは、近年の医薬品タンパク質の急激な需要に対する新しい生産プラットフォームとして注目されており、中でもニワトリやウズラといった家禽鳥類を生体バイオリクターとし、その卵中に医薬品タンパク質を生産させるシステムが期待されている。我々は、これまでにトランスジェニック鳥類を用いた次世代型生産システムの技術開発を行ってきた。組換え抗体やヒトエリスロポイエチン (hEpo) といった医薬品タンパク質を生産する遺伝子導入鳥類の作製に成功している [Kamihira ら、J. Virol. 79:10864 (2005); Penno ら、Transgenic Res. 19:187 (2010)等]。また、スギ花粉アレルゲンエピトープを含んだ卵を産む遺伝子導入ニワトリを作製し、この卵白を食べることでスギ花粉症治療ができることをマウス実験で明らかにし、経口ワクチン鶏卵というトランスジェニック鳥類の新しい可能性を示すことができた [Kawabe ら、PLoS One 7:e48512 (2012)]。

遺伝子操作個体を作成するための遺伝子導入手段として、レトロウイルスベクターが主として使用されている。レトロウイルスベクターは高効率に宿主のゲノム中へ外来遺伝子が導入できるため、トランスジェニック鳥類を簡単に作製できるという利点があるものの、大きなサイズの遺伝子を導入できないことやゲノムへの組み込み位置を制御できないことから、特定のゲノム部位へ目的遺伝子を自由にノックイン・ノックアウトすることができない。そこで、マウスなどのほ乳類同様、鳥類の多能性幹細胞を樹立し、標的遺伝子の遺伝子操作をすることで、遺伝子操作鳥類を作成する試みが、数年来多くの研究者により行われている。2005年 Etches のグループはニワトリ ES 細胞を遺伝子改変し、モノクローナル抗体を生産するニワトリを作製した [Zhu ら、Nat Biotechnol 23:1159] が、現在までに次世代へ遺伝形質を伝播可能な鳥類多能性幹細胞は樹立できていない。一方、将来ニワトリの精子や卵子になる大元の細胞 (始原生殖細胞; PGC) からのトランスジェニック作出も試みられている。カリフォルニア大学デイビス校から、PGC を用いた相同組換え遺伝子操作で、イムノグロブリン遺伝子をノックアウトしたニワトリ作出の報告があった [Schusser ら、PNAS 110:20170 (2013)] もの、有用物質生産を行うに至っていない。また、産総研大石博士らは、PGC を介したトランスジェニックニワトリの作製を報告している [Oishi ら、Sci Rep 8:10203 (2018)] が、PGC は形質を維持した状態での培養が困難であるといった課題も残っている。

近年人工制限酵素の開発と応用により標的遺伝子の改変技術、いわゆるゲノム編集技術が開発され、次々に報告されてきた [Cox ら、Nat Med 21:121 (2015)]。とりわけ、CRISPR/Cas9 システムは、標的配列に対応するガイド RNA (gRNA) を変えるだけで、標的遺伝子を変更可能である手軽さと、使い勝手のよさから爆発的に広がっている。一般的にゲノム編集技術による特定ゲノム部位へのノックインでは、目的遺伝子を数百から数千 bp なる相同配列で挟んだドナープラスミドが、編集酵素や gRNA とともに必要であることや、特定の方向性で挿入できないことから、目的どおりノックインされる効率は概して低いなど技術的な障害があった。最近我々は、非常に限られた短い相同領域のみ (~ 20 bp) を用いた標的ゲノム領域への正確な遺伝子挿入技術を動物細胞に適用し、組換え抗体遺伝子を特定ゲノム部位へ効率よくノックインすることに成功した [Kawabe ら、J Biosci Bioeng 125:599 (2018)]。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発してきたゲノム部位特異的遺伝子導入ツールや昨今革新的な技術であるゲノム編集技術を用いることで、胚レベルでダイレクトにゲノム操作可能な技術の開発と鶏卵バイオリクターをはじめとする鳥類のバイオテクノロジーへの応用を目指した、鳥類ゲノムマニピュレーションエンジニアリング技術の創製を目的とした。

3. 研究の方法

特定ゲノム部位へ効率よくノックイン可能なドナーベクターを構築し、gRNA ならびに Cas9 発現ベクターとともにニワトリ細胞へ遺伝子導入することで、培養細胞レベルで評価した。細胞でのベクターコンストラクト評価後、すぐにノックインニワトリ作製を行い、胚レベルでゲノムマニピュレーションできるかを解析した。卵白タンパク質 (オボアルブミン (OVA) やリゾチーム (LYS)) 遺伝子プロモーターで医薬品タンパク質を発現制御可能なノックイン鳥類の作製を目指した。

3.1 卵白タンパク質遺伝子座におけるゲノム編集

ニワトリ胚性繊維芽細胞 (CEF) または株化細胞 DF-1 細胞への遺伝子導入はエレクロトポレーション法またはリポフェクション法により行った。ゲノム DNA は抽出キットを用いて抽出し、ニワトリゲノム編集効率は、T7 エンドヌクレアーゼ (T7EI) アッセイで解析した。

卵白タンパク質遺伝子座へノックインするためのドナープラスミドを作製した。卵白タンパク質遺伝子としては、卵白成分の最大を占める OVA と、卵白成分としては 3.4% と最小なもの分泌シグナル部分に実績があるリゾチーム LYS を標的遺伝子とした。具体的には、OVA ま

たは LYS の内在性プロモーターで遺伝子発現を制御でき、かつノックイン後卵白タンパク質も発現可能なユニットとして、ベクター内へ組入れる。導入遺伝子の両端には、ノックイン後の方向性を保証する HITI 法を介したドナーベクターを構築した。標的とする配列に近似した配列が切断されていないか (オフターゲット) の評価を、オフターゲットになりうるサイトを PCR ならびにシークエンス解析することで行った。gRNA の設計は、gRNA 設計用ウェブサイト (CRISPRdirect) を用いて行った。

3.2 ニワトリ多能性幹細胞の樹立

これまでに選別してきたニワトリ由来初期化因子 6 因子 (Oct4、Sox2、Klf4、cMyc、Lin28、Nanog) を PiggyBac トランスポゾンベクター (PB513) に組込んだ。この際、自己切断ペプチド 2A ペプチドを介して、2 つの初期化因子ずつ (Oct4-Sox2、Klf4-cMyc、Lin28-Nanog) を人工遺伝子合成 (全合成) したのち、トランスポゾンベクター (PB513) へ組み入れた。他のニワトリ由来の因子は、全合成後、1 因子ずつ対応する因子配列と組み換えた。作製したベクターの CEF への導入は、遺伝子導入試薬 (Lipofectamine 2000 または 3000) によるリポフェクション法を用いた。導入 48 時間後 EGFP 遺伝子発現を蛍光顕微鏡で観察したのち、薬剤 Puromycin により遺伝子導入された細胞の選抜を行った。選抜後、フィーダー細胞 MEF 上に再播種、ニワトリ体細胞リプログラミング用培地 KAv-1 によりニワトリ多能性幹細胞を誘導し、細胞の形態変化を観察した。

3.3 ニワトリ胚への遺伝子導入

胚への遺伝子導入法にはマイクロインジェクション法つづいて、エレクトロポレーション法 (Nepa21) を用いた。発現ベクターとしては、LacZ 発現プラスミド (pMiwZ [You ら, J. Biochem. 125:1160 (1999)]) を用いた。電極は、各発生ステージにあわせて選択した。その後 37.8 の孵卵器で 48 時間胚培養を行い、X-gal 染色を行うことで遺伝子導入効率を評価した。ゲノム組み込み型の LacZ 発現トランスポゾンベクタープラスミド (PB513/LacZ) を作製し、blastoderm に導入した。数日間培養を行った胚を X-gal 染色し、遺伝子導入を評価した。

4. 研究成果

4.1 卵白タンパク質遺伝子座におけるゲノム編集

ニワトリオボアルブミン (OVA) 遺伝子座ならびにリゾチーム (Lys) 遺伝子座における開始コドン周辺を含む 5'UTR 領域ならびに 3'UTR 領域に対して、各 4 種類ずつ gRNA を設計した。SSA アッセイ可能な pcDNA4/EGFP ベクターを作製し、各 gRNA に対応する配列を SSA 用ベクターに組み入れた。SSA 用ベクターと各 gRNA/Cas9 発現ベクター (pX330) を 293FT 細胞へ一過的に導入後、GFP 蛍光率を FACS で解析したところ、OVA において 80% 以上、Lys に対して 70% 以上の GFP 陽性細胞が認められた。これら gRNA に対するゲノム DNA 上での評価をニワトリ初代胚性繊維芽細胞 (CEF) へ一過的導入後、T7EI アッセイすることで行った。その結果、編集が起こった際に生じるバンドを検出できなかった。動物細胞におけるクロマチン構造の状態は、SpCas9 の DNA 結合性に対する主要な障害となることが報告されており [Chen F et al., Nat. Commun., 10:1038 (2017)], SSA アッセイは、非卵管組織由来細胞では非発現である OVA ならびに Lys 遺伝子では有効でないことがわかった。

そこで、OVA 遺伝子座のエキソン領域およびイントロン領域で計 14 種類 gRNA を設計した。各 gRNA 発現ベクターを作製後、CEF および株化細胞 DF-1 において評価した。遺伝子導入後、ゲノム DNA を抽出し、T7EI アッセイを行ったところ、OVA 遺伝子座のイントロン領域において、セレクションなしで 30% 以上 (31.1%) の Indel 値を示した。このことから、OVA 遺伝子座でのゲノム編集部位を同定することができた。

次に、同部位へのノックインを試みた。ノックイン用ドナーベクターには、Pcmv/IRES-EGFP ならびに PsV40/Zeo^r 発現ユニットを組込んだ。また、HITI 法 [Suzuki ら, Nature 540:144 (2016)] を介したノックインのための gRNA サイトを付加した。OVA に対する見出した gRNA 発現ベクターとノックイン用ベクターを共導入し、対応する薬剤ならびに GFP 蛍光を指標に 20 クロオンを樹立した。ゲノム DNA を抽出後、5'ならびに 3'ジャンクション領域に対してゲノム PCR を行ったところ、解析したすべてのクローンに対して期待される増幅バンドが検出できた。FACS で蛍光強度を解析したところ、単一のピークが得られた。またオフターゲットになりうる候補サイトにおける変異は認められなかった。

非卵管由来である CEF ならびに DF-1 細胞では OVA 遺伝子の発現が認められない。近年、Cas9 エンジンアリングに対する多くの報告がある。DNA 二本鎖切断能が欠損した dead Cas9 (dCas9) と転写活性化ドメインを融合させた dCas9-VPR システムは、遺伝子発現を活性化するのに有用なツールである。OVA 遺伝子のプロモーター領域の転写開始点上流側に対して複数の gRNA を設計し、dCas9 転写活性化システムを用いて評価したところ、これら gRNA を組み合わせた場合が最も OVA 遺伝子転写産物量を増大できることがわかった。そこで、内在性の OVA

遺伝子座から導入遺伝子の発現が評価できるように、上記ノックイン用ベクターから CMV プロモーターを削除した新たなノックイン用ベクターを作製した。前述同様にノックイン操作を行い、薬剤選抜によりクローンを取得した。ゲノム PCR により適切にノックインできたクローンを選出後、クローンに対して dCas9 転写活性化システムを適用した。その結果、GFP 遺伝子の発現が認められた。これらの結果は、トランスジェニックニワトリバイオリクターの創製やニワトリ細胞における部位特異的プロモーターの活性化における研究に対して新たな知見を与えるものと考えられる。

4.2 ニワトリ多能性幹細胞樹立に関する研究

放卵直後の胚盤葉期由来の細胞は生殖系列キメラを作製可能な万能細胞である。我々はこれまでに同時期の細胞において、次世代シーケンサーやマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行い、ニワトリ初期化に関連する因子の発現解析ならびに配列を選別してきた。これらをコードするレトロウイルスベクターを作製後、CEF へ導入し、ニワトリ多能性幹細胞の誘導を試みたものの、未分化状態を維持した細胞の取得には至らなかった。そこで、自己切断型 2A ペプチドを用い、各因子をポリシストロニックに共発現可能な発現システムとして、トランスポゾンベクターに組込むことで、高効率で高品質な鳥類多能性幹細胞の樹立を目指した。

ニワトリ初期化因子の配列は、次世代シーケンサーより解析をすすめ、人工遺伝子合成(全合成)した。2A ペプチドを介して、2つの初期化因子ずつ(Oct4-Sox2, Klf4-cMyc, Lin28-Nanog)を全合成したのち、トランスポゾンベクター(PB513)へ組み入れた。他のニワトリ由来の因子は、全合成後、1因子ずつ対応する因子配列と組み換えた。また目的遺伝子導入を可視化するとともに薬剤選抜可能とするために、IRES 配列を介して EGFP-2A-Puro^R を配置した。作製したベクターは遺伝子導入試薬(Lipofectamine 2000)によるリポフェクション法を用い、CEF へ導入した。導入から 48 時間後に蛍光顕微鏡を用い観察した。そこで種々の遺伝子導入法を用いて比較検討を行った。その結果、Lipofectamine 3000 を 7.5 μL 添加時、約 2 倍の遺伝子導入効率を得られた。さらに薬剤選抜後、EGFP 発現により蛍光している細胞が生き残っていることが確認できたことから初期化因子遺伝子のゲノムへの組込みが示唆された。MEF 上へ播種したのち Day 11 で緑色蛍光の見られるコロニー状の細胞が観察された。

初期化因子に関する Sox2, Klf4, c-Myc の 3 因子に関しては、ニワトリ胚盤葉細胞でより高発現している各ファミリー因子があったため、全合成後、各因子に対応する基本初期化因子部分と組換えた。制限酵素切断のバンドパターン、及びシーケンス解析結果から目的のトランスポゾンベクターを作製できた。これらを CEF にトランスポゼース発現ベクターと共導入したところ、緑色蛍光が観察できたため、今後これら転写因子の組み合わせによる誘導効果の違いは検討に値するであろう。

4.3 ニワトリ初期胚への遺伝子導入

本研究は、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子改変で、培養細胞を介さない初期胚への直接遺伝子導入によるトランスジェニックニワトリの作製技術の開発を目指した。そのために、培養細胞を介さない鳥類初期胚への直接遺伝子導入によるトランスジェニック鳥類作製技術の開発を試みた。ゲノム編集ベクターの胚への遺伝子導入にあたり、初期検討として、レポーター遺伝子(LacZ)を用いて、ニワトリ初期胚へのマイクロインジェクションの実施に集中した。はじめに導入操作が容易な Stage10 胚の神経管を標的とした。Stage10 胚の神経管へ線電極を用いて電圧やパルス幅など変えながら遺伝子導入条件の検討を行ったところ、胚発生に影響が少なく、遺伝子導入部位へ高効率に遺伝子導入可能な条件を決定することができた。しかし blastoderm は胚発生が進んでおらず線電極では遺伝子導入を行うことができなかった。そこで電極を胚発生ステージにあわせてうまく選択したところ、blastoderm へ遺伝子導入が可能となった。LacZ 発現用トランスポゾンベクター(PB513/LacZ)を作製後、トランスポゼース発現ベクターとともに胚へ遺伝子導入した。発生を進めた胚で X-gal 染色により評価したところ、胚全体の染色を認めることができた。これらの結果から、blastoderm への LacZ 発現遺伝子の高効率なゲノムへの組込みが示唆された。今後、CRISPR/Cas9 システムを胚へ直接遺伝子導入に用いることで、培養細胞を介することなく目的のトランスジェニックニワトリの作製が期待できる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

大室 早紀、石 銘、河邊 佳典、井藤 彰、上平 正道、ニワトリ多能性幹細胞樹立のための転写因子遺伝子の体細胞への遺伝子導入、化学工学会第 84 年会、2019

前田 大樹、石 銘、河邊 佳典、井藤 彰、上平 正道、トランスジェニックニワトリ作製のための胚細胞ゲノム編集技術の開発、第 25 回 日本生物工学会九州支部 鹿児島大会、2018

Ming Shi, Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira, Targeted knock-in of transgene into

chicken cells using CRISPR/Cas9, JAACT2018 Tsukuba, 2018

大室 早紀, 河邊 佳典, 大坪 嵩征, 椎葉 温, 福丸 詩帆, 井藤 彰, 上平 正道、網羅的遺伝子解析により抽出した転写因子による鳥類多能性幹細胞樹立の検討、第 55 回化学関連支部合同九州大会 2018

Ming Shi, Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira, Evaluation of genome manipulation in egg white protein genes for generating transgenic hen, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017

前田 大樹, 河邊 佳典, 椎葉 温, 石 銘, 井藤 彰, 上平 正道、トランスジェニック鳥類作製のためのゲノム操作技術の開発、第 54 回化学関連支部合同九州大会、2017

羽田 毅, 河邊 佳典, 今西 傑, 下村 卓矢, 井藤 彰, 上平 正道、Cre 組込み型レンチウイルスベクターによる CHO 細胞への特定ゲノム部位遺伝子導入法の開発、化学工学会第 82 年会、2017

河邊 佳典, 小松 真也, 小松 将大, 井藤 彰, 佐久間 哲史, 中村 崇裕, 山本 卓, 上平 正道、CRIS-PITCh 法を用いた作製したノックイン CHO 細胞の抗体生産評価、化学工学会第 82 年会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003157/index.html>

https://researchmap.jp/kawabe_yoshinori/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。