

令和元年5月13日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08083

研究課題名(和文) 受精システムを介したゲノム編集家禽の作出

研究課題名(英文) Production of genome-edited poultry via fertilization system

研究代表者

水島 秀成 (Mizushima, Shusei)

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：20515382

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)：本課題では、研究代表者が確立してきた顕微授精技術(ICSI)を基盤にゲノム編集家禽の作出を目指した。1個の精子と精子由来卵賦活化因子(PLCZ、CSおよびAH)を投与することにより作出した1細胞期のウズラ受精卵にCRISPR/Cas9システムを導入することにより、常染色体、ZおよびW性染色体上の遺伝子を効率良く編集できることが明らかとなった。また重要にもほぼ全ての個体において、ホモでの遺伝子編集が確認され、すなわち、1世代でのノックアウト個体の作出が可能であることも見出した。さらにこの結果はこれまでに不可能であった雌ゲノムの直接的な改変をも可能にすることを示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者が確立してきたICSI法を基盤としたゲノム編集技術は、全ての鳥種に適用可能であるだけでなく、養鶏産業に高い経済効果が見込まれる雌家禽ゲノムへの直接的なアプローチも可能にする唯一の技術になりうる可能性がある。すなわち、鶏卵アレルギー除去卵の大量生産をはじめとして、低アレルギー卵でのインフルエンザワクチンの生産事業にも展開が可能になる。さらなるノックイン技術の応用は、卵白への有用タンパク質(ヒト臨床用抗体など)の大量分泌(鶏卵バイオリクター)にも対応可能であり、医薬、飲食料品産業における新技術・新分野の構築に対しても多大な貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Programmable genome editing tool was successfully adopted to establish genome-edited chicken lines. However, this method is dependent on germline-mediated chimerism mediated by primordial germ cells (PGCs), so that its practical applications have been hampered because of genetic limitation in the culture of PGCs. Thus, the aim of this study is to establish the novel method to modify avian genome. Here, I show that microinjection of CRISPR/Cas9 RNAs into 1-cell stage egg microinjected with a single sperm together with sperm-borne egg-activating factors (ICSI) is able to introduce genomic mutations on the female-specific W sex chromosome as well as autosomes and Z sex chromosomes in Japanese quail. These results indicate that combination of ICSI and CRISPR/Cas9 system could open new window for rapid generation of genome modification models in poultry.

研究分野：鳥類発生工学

キーワード：ウズラ受精卵 CRISPR/Cas9 システム 雌ゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集家畜の作出には、始原生殖細胞 (primordial germ cell: PGC) の培養を介した人工制限酵素システム (clustered regularly interspersed short palindromic repeats/Cas: CRISPR/Cas や transcription activator-like effector nucleases : TALEN) の適用とその後の生殖系列キメラ個体の作出が一般的に用いられている (Schusser *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014; Oishi *et al.*, 2016; Taylor *et al.*, 2017)。しかしながら、本方法は性染色体が雄型 (ZZ) の PGC のみの培養が可能であることから、雌型 (ZW) の W 性染色体に変異を加えられないことや、ホモノックアウト個体の作出には次世代を繰り返し取る必要があるため、時間的なロスが課題視されていた。

哺乳類では、顕微授精技術を含めた体外受精技術がラボレベルでもルーチンワークとして稼働しており、近年に至っては人工制限酵素の RNA や DNA を 1 細胞期受精卵に注入することで、ダイレクトに遺伝子変異させたマウス個体を得る手法が確立された (Mashiko *et al.*, 2013)。本手法は従来の胚性幹細胞の培養を介したゲノム改変に代わる技術として注目されている。鳥類発生工学においても、哺乳類のような人為的に受精卵を創る、そして 1 細胞期で遺伝子に変異を加える技術は、養鶏産業に高い経済効果が見込まれる鶏卵アレルゲンノックアウト個体や鶏卵バイオリクター個体の作出を“1 世代”で行う上で理想的な技術である。さらには、雌ゲノムへの直接的なアプローチだけでなく、W 性染色体のゲノム編集も対応可能になるなど、上述の課題解決に光明を見出す技術になると考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者は、鳥類卵の受精と胚発生を全て体外で操作できるように、これまでにブラックボックスであった鳥類多精受精機構の一端を解明し、具体的にこの多精侵入が、卵賦活化に伴う減数分裂の再開と、その後の体細胞分裂 (卵割) の進行に必須であることや、卵賦活化と正常な卵割の開始には、3 つの精子に特異的な因子 (精子ファクター; phospholipase C ζ : PLCZ, aconitate hydratase: AH および citrate synthase: CS) が必要であることを突き止めた。更に、顕微授精法 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) を駆使して、単一精子のみと精子 100 個分量に相当する精子抽出物あるいは 3 つの精子ファクターをウズラ排卵直後の卵に投与・培養することにより、ウズラ雛の孵化育成に世界で始めて成功してきた (Mizushima *et al.*, 2014)。

そこで本研究では、鳥類 ICSI 法を基盤に、CRISPR/Cas9 システムを用いてゲノム編集ウズラの作出が可能であるか検討した。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 DNA および RNA 発現ベクターの構築: DNA ベクターは trans-activating crRNA (tracrRNA) と Cas9 の両方が発現する pX330 ベクターの *BbsI* 制限酵素サイトにターゲット遺伝子に特異的な配列を組み込んだ (crRNA)。また RNA 発現用ベクターは、pUC19 ベクターに T7 プロモーター配列、*BbsI* 制限酵素サイトおよび tracrRNA 配列を、pTNT ベクターに Cas9 配列をそれぞれ組み込むことで構築した

(図 1)。pUC19 ベクターの *BbsI* サイトにターゲット遺伝子に特異的な配列を組み込んだ後、*in vitro* 転写キットを用いて sgRNA (crRNA+tracrRNA) と Cas9 mRNA の合成を行った。

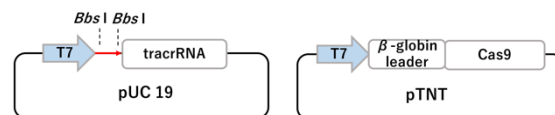


図1. sgRNA および Cas9 発現ベクターの構築

ICSI と CRISPR/Cas9 システムの導入: ニホンウズラの雌の卵管膨大部から取り出した未受精卵の胚盤に、射出精子 1 個とウズラの精子ファクター (PLCZ, AH および CS) の cRNA を投与し、Ono ら (1994) による方法に従って、2 時間の体外培養を行った。培養後のウズラ卵に、CRISPR/Cas9 の pX330 DNA ベクターまたは sgRNA と Cas9 の RNA を投与し、再度体外培養を行った (図 2)。得られた胚からタンパク質や DNA を抽出し、ウェスタンブロッティングやシーケンス反応により、ターゲット遺伝子の塩基配列の改変やタンパク質欠損等の評価を行った。

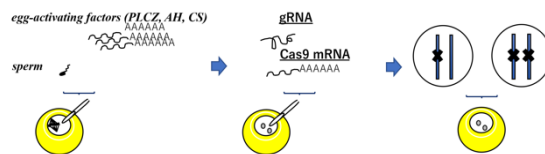


図2. 1細胞期受精卵ゲノムの編集誘導実験フロー

4. 研究成果

ゲノム編集効率における CRISPR/Cas9 DNA または RNA 投与の比較検討: 1 細胞期のウズラ受精卵に crRNA を含まない pX330 や RNAs (sgRNA と Cas9 mRNA) を投与しても、胚発生や器官形成に与える影響は確認されなかった。次いで表現系解析に容易なチロシナーゼ遺伝子をターゲットに、標的配列を含んだ pX330 やその RNAs を投与し、24 時間培養胚におけるゲノム配列の改変を確認したところ、RNAs 投与群では非常に高い割合で塩基配列の欠損が確認されたが、そのような欠損は pX330 の投与では認められなかった。また投与後 2 時間の胚盤における

Cas9 のタンパク質発現を確認したところ、RNAs 投与群では推定サイズでのバンドが確認されたのに対して、pX330 ベクター投与群ではその発現が確認されなかった。しかしながら、ニトリ由来の DF-1 細胞株を用いて single strand annealing (SSA) アッセイを行ったところ (Mashiko et al., 2013)、pX330 ベクターのトランスフェクションによる塩基配列の切断や Cas9 タンパク質の発現が確認された。以上のことから、1 細胞期のウズラ卵ゲノムに編集を施すためには、CRISPR/Cas システムを DNA ではなく RNA で投与することが望ましいことが分かった。

常染色体、Z および W 性染色体のゲノム編集効率：上述の RNA 注入法をベースに、Cyclin (常染色体遺伝子)、DDX4 (Z 性染色体遺伝子) および WPKCI (W 性染色体遺伝子) をターゲットに crRNA 配列を設計し、1 細胞期受精卵への投与を行った。Cyclin 遺伝子に対する sgRNA を投与した場合には、ほぼ全ての胚において発生が胚盤葉ステージで停止することが分かった。また DNA 解析を行った結果、胚盤葉で停止した全ての胚ゲノムにおいて、ホモで 1-2 塩基のインデルが確認され、正常なタンパク質発現も確認されなかった。また DDX4 遺伝子においても同様に、投与したほぼ全ての胚において塩基配列のホモ欠損が確認され、PGC の減少が確認された。また本方法は、重要にも WPKCI 遺伝子のゲノム編集も可能であることが分かった。

まとめ：1 細胞期受精卵への CRISPR/Cas9 システムを RNA で導入することにより、ほぼ全てのウズラ胚においてホモでの遺伝子編集が確認されたことから、この結果は G0 世代でのノックアウト個体の作出が可能であることを示すものである。また本技術は、従来の 3 ヶ月以上かかる PGC の培養等が一切必要ないため、経費や作成時間の大幅な削減に繋がり、極めて有用性の高いものである。さらに従来の技術では不可能であった雌家禽ゲノムへの直接的な編集も可能になったことから、性染色体遺伝子が寄与する性分化機構の解析にも着手が可能になると考えられる。

<引用文献>

- Mashiko D. et al. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Scientific Reports* 3: 3355 (2013).
- Mizushima S. et al. The birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. *Development* 141: 3799-1806 (2014).
- Oishi I. et al. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 6: 23980 (2016).
- Ono T. et al. A complete culture system for avian transgenesis, supporting quail embryos from the single-cell stage to hatching. *Developmental Biology* 161: 126-130 (1994).
- Park TS. et al. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 12716-12721 (2014).
- Schusser B. et al. Immuglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 20170-20175 (2013).
- Taylor L. Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. *Development* 144: 928-934 (2017).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件) (研究代表者下線)

- ① Aduma N, Izumi H, Mizushima S, Kuroiwa A. Knockdown of DEAD-box helicase 4 (DDX4) decreases the number of germ cells in male and female chicken embryonic gonads. *Reproduction, Fertility and Development*, 査読有, 2018, RD18266, in press. DOI: 10.1071/RD18266.
- ② Hiyama G, Mizushima S, Matsuzaki M, Tobar Y, Choi JH, Ono T, Sugita S, Sasanami T. Female Japanese quail visually differentiate testosterone-dependent male attractiveness for mating preferences. *Scientific Reports*, 8, 査読有, 2018, 10012. DOI: 10.1038/s41598-018-28368-z.
- ③ Zhushi H, Murata C, Mizushima S, Nishida C, Kuroiwa A. Unique XCI evolution in *Tokudaia*: Initial XCI of the neo-X chromosome in *Tokudaia muenninki* and function loss of *XIST* in *Tokudaia osimensis*. *Chromosoma*, 126, 査読有, 2017, 741-751. DOI: 10.1007/s00412-017-0639-4.
- ④ Mizushima S, Matsuzaki M, Sasanami T. Handling of gametes for in vitro insemination in birds. *Methods in Molecular Biology*, 1650, 査読無, 2017, 243-257. DOI: 10.1007/978-1-4939-7216-6_16.
- ⑤ Mizushima S. Fertilization 2: Polyspermic fertilization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1001, 査読有, 2017, 105-123. DOI: 10.1007/978-981-10-3975-1_7.
- ⑥ Ichikawa Y, Matsuzaki M, Mizushima S, Sasanami T. Egg envelope glycoproteins ZP1 and ZP3 mediate sperm-egg interaction in the Japanese quail. *Journal of Poultry Science*, 査読有, 54, 2017, 80-86. DOI: 10.2141/jpsa.0160088.
- ⑦ Matsuzaki M, Mizushima S, Ichikawa Y, Shiba K, Inaba K, Sasanami T. Effects of a protein kinase inhibitor on sperm motility in the Japanese quail. *Journal of Poultry Science*, 査読有, 54, 2017, 73-79. DOI: 10.2141/jpsa.0160079.

〔学会発表〕(計 36 件)

- ① 水島秀成, 笹浪知宏, 小野珠乙, 黒岩麻里, ウズラの配偶子に発現する DNase I の受精における機能, 2019 年日本家禽学会春季大会, 2019 年 3 月 30 日.
- ② 水島秀成, 黒岩麻里. 鳥類の受精成立に関する核分解酵素の役割, 日本動物学会北海道支部第 63 回大会, 2019 年 3 月 23 日.
- ③ 水島秀成. 鳥類多精受精機構の解明と顕微授精、遺伝子導入、体細胞核移植技術の確立, コネクトサッポロ in MeCCS フォーラム, 2018 年 12 月 10 日.
- ④ 水島秀成. ウズラ卵の受精成立に関する分子機構 (招待講演), 第 3 回日本畜産学会若手企画シンポジウム, 2018 年 8 月 8 日.
- ⑤ 水島秀成. 受精システムを介したゲノム改変家禽の作出 (招待講演), 第 21 回日本鶏資源開発プロジェクト研究センター特別講演, 2018 年 4 月 18 日.
- ⑥ 水島秀成, 黒岩麻里, 須田千晶, 小野珠乙, 笹浪知宏. ウズラ初期胚におけるゲノム活性化のタイミングと細胞周期関連遺伝子の発現解析, 2018 年日本家禽学会春季大会, 2018 年 3 月 30 日.
- ⑦ 水島秀成. 鳥類における遺伝子操作 (招待講演), 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月 15-18 日.
- ⑧ Mizushima S. Application of intracytoplasmic sperm injection technique for avian genome modification technologies (invited speaker). International Forum on Avian Germplasm and Genome Editing 2017, Oct. 25-27, 2017.
- ⑨ 水島秀成, 小野珠乙, 黒岩麻里, 笹浪知宏. ウズラ体細胞核移植胚の作出効率に及ぼす卵紫外線照射の影響, 2017 年日本家禽学会秋季大会, 2017 年 9 月 5 日.
- ⑩ 水島秀成, 小野珠乙, 笹浪知宏. ウズラ体細胞核移植胚の発生能, 日本家禽学会 2016 年度秋季大会, 2016 年 9 月 15-16 日.
- ⑪ 水島秀成. 今後の鳥類顕微授精法-産業への応用に向けて- (招待講演), 日本家禽学会 2016 年度秋季大会シンポジウム, 2016 年 9 月 15-16 日.
- ⑫ Mizushima S., Ono T, Sasanami T. Attempt on the establishment of somatic cell nuclear transfer method in Japanese quail, 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress, Aug. 22-25, 2016.

他 24 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学 理学部 生物科学科(生物) 水島秀成

https://www.sci.hokudai.ac.jp/bio/teacher/mizushima_shusei/

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 黒岩 麻里(北海道大学)

ローマ字氏名: Asato Kuroiwa

研究協力者氏名: 笹浪 知宏(静岡大学)

ローマ字氏名: Tomohiro Sasanami

研究協力者氏名: 小野 珠乙(信州大学)

ローマ字氏名: Tamao Ono

※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。