

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03470

研究課題名(和文) バイオ医薬品生産のための次世代型トランスジェニックニワトリプラットフォームの開発

研究課題名(英文) Development of a next generation transgenic chicken platform for biopharmaceutical production

研究代表者

上平 正道 (Kamihira, Masamichi)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：40202022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：低コストでバイオ医薬品を生産するために、トランスジェニックニワトリを生体バイオリアクターとして利用するための新しい技術を開発することを目的として研究を行う。申請者はこれまで独自に、鳥類胚培養法、ウイルスベクターを用いた高効率遺伝子導入、卵管特異的な遺伝子発現システムの開発を行い、抗体などの組換えタンパク質を卵や体組織に生産するニワトリやウズラの作出に成功した。本研究では、近年進展が著しいゲノム編集技術と申請者が開発してきたセル・エンジニアリング技術を融合し、トランスジェニックニワトリによるバイオ医薬品生産のためのプラットフォーム技術の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬に代表されるバイオ医薬品は、遺伝子組換えされたチャイニーズハムスター卵巣細胞などの細胞培養によって生産されているが、高い生産コストや対象の多様化にともなう生産能力の限界といった問題が指摘されるようになり、細胞培養にかかわるバイオ医薬品生産のためのプラットフォームの開発が望まれている。近年、バイオ医薬品生産の新たなプラットフォームとして、トランスジェニック動植物による生体バイオリアクターが注目されており、特にトランスジェニックニワトリの卵への生産が期待されている。本研究の成果は、先進的な技術を取り入れたトランスジェニックニワトリによる生体バイオリアクターの実現に資するものである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a new technology for utilizing transgenic chickens as a bioreactor for the production of biopharmaceuticals at low cost. Previously, we developed avian embryo culture method, high-efficiency gene transfer using viral vector, and oviduct-specific gene expression system, and successfully generated transgenic chickens and quails that produce recombinant proteins such as antibodies in eggs and body tissues. In this research, we have developed a platform technology for biopharmaceutical production using transgenic chickens by fusing the genome editing technology, which has made remarkable progress in recent years, with the cell engineering technology we developed.

研究分野：生物・生体工学

キーワード：バイオテクノロジー トランスジェニックニワトリ バイオ医薬品生産 ゲノム操作技術

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬などのバイオ医薬品は、遺伝子組換えされたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞などの細胞培養によって生産されているが、高い生産コストや対象の多様化にともなう生産能力の限界といった問題が指摘されるようになり、細胞培養にかかわるバイオ医薬品生産のためのプラットフォームの開発が望まれている。近年、バイオ医薬品生産の新たなプラットフォームとして、トランスジェニック動植物による生体バイオリクターが注目されてきた (Houdebine, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009, 32, 107-121)。ヤギ・ヒツジといった大型哺乳動物の乳汁中に生産させるシステムは技術的にはほぼ確立されており、実用化例もみられるようになってきている。哺乳類乳汁中での生産よりさらに安価に生産するシステムとして、ニワトリの卵への生産が 1990 年代より検討されており (Dove, *Nat Biotechnol* 2002, 20, 777-779)、哺乳類のシステムと比べて実用化が遅れていたが、2015 年にウォルマン病治療薬としてトランスジェニックニワトリにより生産されたセベリパーゼ α (Kanuma) がアメリカ FDA により初めて認可され (Sheridan, *Nat Biotechnol* 2016, 34, 117-119)、今後の生産品目の拡大が期待されている。申請者らは、1995 年頃より独自にトランスジェニックニワトリの卵中に医薬品タンパク質を生産させるための技術開発を行ってきた。申請者らの方法は、胚への遺伝子導入にヒトの遺伝子治療に使われているものと同タイプのレトロウイルスベクター (MoMLV) を用いるもので、超遠心により濃縮したウイルス溶液を胚へ微量注入することによって、100% の効率で導入遺伝子を体組織に有しており、さらに 80% 以上の頻度で導入遺伝子を子に伝播可能な方法である (Mizuarai et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 286, 456-463)。さらに、導入遺伝子発現を最大化するためにウイルス注入する胚発生段階の最適時期の決定を行い、ニワトリ胚では孵卵 55 時間目、ウズラ胚では孵卵 48 時間目が最適であることを見出した (Kamihira et al., *J Virol* 2005, 79, 10864-10874; Kawabe et al., *J Biosci Bioeng* 2006, 102, 297-303)。実用タンパク質生産の例として、Fc 融合型一本鎖抗体 (scFv-Fc) の生産を試み、胚操作して誕生させた全てのニワトリにおいて、血清中で g/L オーダーでの高発現に成功した (Kamihira et al., *J Virol* 2005, 79, 10864-10874)。また卵中での高発現も見られ、卵白中で平均 5.6 mg/mL での生産 (卵 1 個当たり約 0.2g) が可能であり、導入遺伝子は子孫への伝播もみとめられた。

申請者らが開発したトランスジェニック鳥類作製技術は、高発現・高頻度であり、はじめてニワトリが生体バイオリクターとして実用レベルに到達した。他にも全抗体や EPO などの医薬品を生産するニワトリの作製にも成功している (Kamihira et al., *J Biotechnol* 2009, 141, 18-25; Penno et al., *Transgenic Res* 2010, 19, 187-195)。また、新たな適用のために、食べる医薬品としてスギ花粉症治療のためのアレルゲン T 細胞エピトープを卵に生産するニワトリの作製に成功し、この卵の食餌によって花粉症の治療が行えることを明らかにした (Kawabe et al., *Plos One* 2012, 7, e48512)。申請者らのトランスジェニックニワトリ作製技術は、カネカ㈱により動物薬生産での実用化が試みられている。現在までに、実用的な医薬品タンパク質生産のためのトランスジェニック鳥類作製法は、先に示した FDA に認可されたものも含めて、レトロウイルスベクターを用いる方法に限られている。ニワトリ ES 細胞の樹立も試みられているが、生殖系列に伝播可能な ES 細胞の報告はない (Zhu et al., *Nat Biotechnol* 2005, 23, 1159-1169; Horiuchi et al., *Methods Mol Biol* 2006, 329, 17-34)。また、培養した始原生殖細胞 (PGC) を使って生殖系列への伝播が可能なトランスジェニック鳥類作製が報告されている (van de Lavoie et al., *Nature* 2006, 441, 766-769) が、増殖速度が非常に遅く、培養によって形質が変化しやすいため、扱いが困難であることが問題となっている。

2. 研究の目的

レトロウイルスベクターを使ったトランスジェニック鳥類作製は比較的簡便な方法であるが、大きな遺伝子の導入や特定染色体部位への遺伝子のノックアウト・ノックインには不向きである。こういった場合、ES/iPS 細胞、PGC のような多能性幹細胞を用いたトランスジェニック個体作製がウイルスベクター法に代わりうるが、細胞の培養維持やトランスジェニック個体作製の手間を考慮すると実用性で大きく劣っている。最近ゲノム編集技術が急速な進歩を遂げている。ゲノム編集技術を用いる染色体操作は高効率なため、ES 細胞などの培養細胞を用いない、直接的な胚操作での部位特異的な遺伝子改変を可能とする。本研究では、ゲノム編集技術を活用し、かつ申請者がこれまで開発してきたトランスジェニック鳥類作製技術とセル・エンジニアリング技術を駆使することによって、鳥類胚を用いた染色体操作 (特に遺伝子ノックイン) のための技術基盤を確立する。実際の応用として、バイオ医薬品を生産するトランスジェニックニワトリを簡便かつ確実に作製するための技術開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、鳥類において生殖系列を含む多能性が証明されている放卵直後の胚盤葉期の胚細胞にエレクトロポレーションによって CRISPR/Cas9 システムにより卵白タンパク質 (オボアルブミン、リゾチーム) をコードしている染色体部位特異的に目的遺伝子と AGIS の起点となる変異 *loxP* 配列を導入する。エレクトロポレーションによる胚細胞への遺伝子導入条件の最適化や、目的染色体部位へのターゲティングのための gRNA の設計を行い、胚性繊維芽細胞を用いたターゲティング効率の評価により有効な gRNA を選択する。胚盤葉期胚へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入処理した胚を胚培養により人工孵化させ個体を得る。得られた個体の血液細胞や体細胞からゲノム DNA を抽出して導入遺伝子の挿入位置や構造を確認する。成鳥になったら輸卵管組織や卵白中での導入遺伝子発現を評価する。同時に遺伝子導入個体由来の細胞を用いて、AGIS による標的部位への遺伝子ノックインが可能であ

るかを検討する。

(1) CRISPR/Cas9 ベクター作製

CRISPR/Cas9 システムによる特異的な染色体部位のターゲティングでは、ターゲティングのためのガイド RNA (gRNA) の設計(ターゲティング部位の選定)が必要となる。本研究では、ニワトリ卵白タンパク質であるオボアルブミン(OVA)とリゾチームのゲノム遺伝子領域におけるイントロンあるいは3'UTRに目的遺伝子をノックインしてこれらのタンパク質と同時に生産させることを試みる。ターゲティングのためのgRNAを常法によりPAM配列を考慮して設計した。

設計したgRNAは、CRISPR/Cas9 システムを発現させるベクターpX330(gRNA発現ユニットおよびCas9発現ユニットが搭載されている)に導入し、SSA(single-strand annealing)アッセイにより活性を評価し、最適なものを選択する。

CRISPR/Cas9 システムは、基本的にgRNAによって規定されたゲノム部位での2本鎖DNA切断を誘発する人工酵素システムであり、細胞には2本鎖DNA切断に対する修復機構が備わっているため、この修復におけるエラーを利用して遺伝子を効率的に改変するものである。こういった原理に基づくため標的遺伝子のノックアウト(数塩基の欠失や挿入エラーによる)と比較して、特定のDNA断片を標的部位にノックイン(遺伝子導入)するには、目的遺伝子を数百から数千bpの相同配列で挟んだドナーベクターが、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もあり、目的どおりにノックインされる効率は必ずしも高くない。Suzukiらは、ゲノム編集技術として繁用されているCRISPR/Cas9を用いた遺伝子ノックインにおいて、非同相組込みでの標的ゲノム領域への正確な遺伝子挿入技術(HITI法)を開発した(Suzuki et al., *Natures* 2016, 540, 144-149)。この方法では、長い相同領域を用いないため、ノックインベクター作製をより簡便にできるとともにベクターサイズが小さくなるため、細胞へのベクターの導入効率を向上させる。本研究ではこの方法(CRIS-HITI法)をニワトリ胚ゲノムへの部位特異的な目的遺伝子の導入に用いる。OVAと目的遺伝子が共発現するようにCRIS-HITI用ノックインベクターを作製した。目的遺伝子としては、組織特異的な発現を可視化できるように蛍光タンパク質をレポーター遺伝子とするものと卵白への分泌能を評価するためにモデル抗体(scFv-Fc)遺伝子を利用した。その際に、同じ染色体部位へ申請者が開発したAGISを用いて遺伝子交換や逐次遺伝子組込みといった改変ができるように、AGISの起点となりうる変異loxP配列をノックインする遺伝子配列中に入れておくことよりAGISによる部位特異的な改変が可能となるように設計した。

(2) CRIS-HITI法によるターゲットノックインの細胞レベルでの評価系の構築および評価

ニワトリ細胞ゲノム上のOVA遺伝子座への遺伝子ノックインのために作製したCRIS-HITIベクターの機能評価を行った。CRIS-HITI法では、CRISPR/Cas9システムを機能させるベクター(pX330)とHITIノックインベクターの2つのベクターを細胞に共導入する必要があり、遺伝子導入時の2つのベクターの量比がノックインの効率に大きく影響することが予想される。胚を使った評価は、結果を得るまでに多大な時間を要するため、細胞培養でCRIS-HITIベクターの有効性(標的ゲノム部位への遺伝子導入効率および導入後の遺伝子構造)を確認するための評価系を構築した。評価用の細胞としては、ニワトリDF-1細胞や孵卵5~10日目のニワトリ発生胚から採取した胚性繊維芽細胞(CEF)を用いた。CEFは、初代細胞であるが5継代程度であれば旺盛な増殖能を有しており、細胞培養での有効性を評価するために最も適していると考えられる。CEFへの遺伝子導入法にはエレクトロポレーション法やリポフェクション法を用いた。レポーター遺伝子を用いて、ニワトリ胚性繊維芽細胞への最適な遺伝子導入条件(プラスミド濃度、パルス強度、印加時間など)を決定した。遺伝子導入処理後、数継代培養した細胞においてゲノムDNAを採取してPCR法および塩基配列解析によって標的ゲノム部位への遺伝子導入効率および導入後の遺伝子構造の評価を行った。

(3) ニワトリ胚への遺伝子導入条件の検討

通常、哺乳類での胚操作によるトランスジェニック動物作製の場合、1細胞期の受精卵が使われており、CRISPR/Cas9システムを使ったゲノム編集技術によるマウスの改変でも1細胞期受精卵へのベクター導入が行われている。しかしニワトリの場合は、雌鶏体内の1細胞期の受精卵の採取および核への遺伝子導入は作業効率が悪く、技術的にも容易ではない。卵白や卵殻が形成した後ではあるが放卵後の有精卵を胚操作に用いるのが現実的である。しかしこの場合、受精から放卵までの過程(24時間程度)で細胞分裂が起こっており、放卵時には胚盤葉期(stageX)と呼ばれる約6万個にまで細胞が増えた状態となっている。申請者はかつて胚盤葉期胚へリポフェクション法によりプラスミドDNAを微量注入して遺伝子導入を試みたことがあるが(Oguchi et al., *J Ferment Bioeng* 1998, 86, 118-120)、あまり高い導入効率が得られなかった。ニワトリ胚への遺伝子導入技術も種々試みられてきており、プラスミドDNAのトランスフェクションの場合、胚の限られた領域の細胞への遺伝子導入ではエレクトロポレーション法が有効であるため、本研究ではCRIS-HITIベクターのニワトリ胚への導入にエレクトロポレーション法を用いることとした。胚内での遺伝子導入のターゲット細胞としては、将来生殖細胞に分化する始原生殖細胞(PGC)が望ましいと考えている。PGCでの遺伝子ノックインができれば、次の世代でトランスジェニックニワトリの作製が可能である。胚盤葉期胚では、85%以上のPGCが胚の明域中心部にいることがわかっており(Naito et al., *Reproduction* 2001, 121, 547-552)、この領域にプラスミドDNAを微量注入し、エレクトロポレーションを行った。CRIS-HITIベクターのニワトリ胚への導入に先立って、レポーター遺伝子を有するプラスミドを使って最適な遺伝子導入条件を決定した。導入効率の評価は、遺伝子導入処理胚を2週間胚培養して体組織や生殖巣での導入遺伝子の保持率およびレポーター遺伝子発現量で評価した。

細胞培養レベルでの評価により有効であることが確かめられたベクターを用いて、胚盤葉期のニワトリ胚への適用で最適化されたエレクトロポレーション条件によって遺伝子導入を行い、遺伝子導入胚を胚

培養によって人工孵化させた。今後は、成鳥になったら輸卵管組織や卵白中での導入遺伝子発現を評価する。また、得られた個体の組織や精子からゲノム DNA を抽出して導入遺伝子の挿入位置や構造を確認する。1つのノックインベクターにつき、雌雄それぞれ 10 羽以上の遺伝子導入個体を得る。遺伝子導入個体は、交配によって次の世代のトランスジェニックニワトリ個体を得る。交配によって得られた個体における遺伝子改変の有無は、孵化時に残された漿尿膜組織や血液からゲノム DNA を採取して PCR 法により検定する。遺伝子改変が伝播された個体に関しては、性成熟後に輸卵管組織や卵白中での導入遺伝子発現を評価する。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 ベクターによるノックイン細胞の作製

内因性 OVA プロモーターの制御下での導入遺伝子発現のために、OVA 3'UTR 領域の周りに CRISPR/Cas9 の 4 つの gRNA 配列を設計し、導入遺伝子が IRES または 2A ペプチドを介して内因性 OVA と共発現されるようにした。CRISPR/Cas9 によって媒介される高い切断効率を得るために、OVA 遺伝子のイントロン全体とエクソン全体の gRNA 配列を再設計した。合計 13 個の gRNA 配列を CRISPR ベクターに組み込み、CEF 細胞に遺伝子導入した。48 時間のトランスフェクション後、細胞を回収し、細胞からゲノム DNA を抽出して T7E1 アッセイを適用し、各 gRNA の切断効率を測定した。イントロン 1 用に設計された gRNA は、最大突然変異効率 31.1%を示したことから、以降の実験ではこの gRNA (OVA_i1)を使用した。

HITI を介した導入遺伝子ノックインシステムを評価するために、レポーターおよび薬物選択マーカーとして、それぞれ EGFP および Zeocin 発現カセットを含み、導入遺伝子カセットの上流に相補的な gRNA 配列を配置したドナーベクター (pHITI/CMV-IRES-EGFP) を構築した。DF-1 細胞に対して、pX330/OVA_i1 とドナーベクターをエレクトロポレーション法で共導入した。トランスフェクションの 2 日後、ゼオシンを培地に加え、細胞を 15 日間培養した。ゼオシン耐性と EGFP 発現を示す細胞クローンを分離した後、ノックイン領域の 5'および 3'接合部を確認するために、細胞のゲノム PCR 分析を行った。20 クローンのうち 11 クローン (55%) は、5'接合部に予想される配列を示し、20 クローンすべてが 3'接合部に変異を示したものの、細胞クローンの EGFP 発現は、フローサイトメトリー分析によって発現レベルが均一であることがわかった。これらの結果は、OVA 遺伝子座への導入遺伝子の標的化ノックインが、HITI を介した導入遺伝子ノックインシステムを使用して正常に達成されたことを示していた。

(2) CRIS-HITI 法によるターゲットノックインの細胞レベルでの評価系の構築および評価

OVA 遺伝子座へのターゲットノックインした細胞で、正常にノックインした遺伝子が機能するかについて評価するために、内因性 OVA 遺伝子を活性化するための評価系を構築した。そのための方法として、dCas9-VPR トランス活性化システムを利用することとした。最初に、OVA プロモーターの TATA ボックスの周りの 5 つの gRNA 配列を設計した。DF-1 細胞および CEF に、dCas9-VPR 発現ベクターと、それぞれの gRNA 配列をコードする gRNA 発現ベクターをトランスフェクトした。トランスフェクション後 3 日目に細胞から RNA を抽出し、特定のプライマーを使用した RT-PCR で OVA 遺伝子発現を評価した。アンプリコンのシーケンス分析により、内因性 OVA 遺伝子発現が DF-1 細胞と CEF の両方で誘導されたことが明らかになった。使用する gRNA により誘導レベルは異なっており、5 つの gRNA をすべて使用すると、OVA 遺伝子発現がさらに強化されることがわかった。

DF-1 細胞と CEF において、5 つの gRNA で高い誘導を示した 2 つの gRNA の組み合わせが OVA 発現の最大レベルを誘導するのに十分であることを確認するために、dCas9-VPR トランス活性化システムによる内因性 OVA 遺伝子誘導に関して、5 つの gRNA すべてを使用したものと比較して評価した。トランスフェクションの 3 日後に細胞から抽出された mRNA の合計を RT-PCR および qRT-PCR に適用したところ、内因性 OVA 遺伝子の誘導レベルは、5 つすべての gRNA を使用した際により高くなることが明らかになった。dCas9-VPR トランス活性化システムを使用した内因性 OVA 遺伝子の誘導をタンパク質レベルで評価するために、OVA タンパク質をウエスタンブロット分析で検出した。これらの結果は、OVA プロモーターの TATA ボックスの近くにある 5 つの gRNA を使用した dCas9-VPR トランス活性化システムが、卵管以外の細胞で内因性 OVA 遺伝子発現を効果的に誘導できることを示していた。

内因性 OVA プロモーターが HITI を介した導入遺伝子ノックインシステムを使用して組み込まれた外因性遺伝子の発現が開始できるかどうかを評価するために、内因性 OVA へのターゲットノックインのために、CMV プロモーターなしで EGFP 発現カセットをコードするドナーベクターを構築した。DF-1 細胞をドナーベクターと Cas9/gRNA ベクター (pX330/OVA_i1) で共導入し、薬剤選択を使用してノックイン細胞をスクリーニングした。続いて、導入遺伝子の標的組込みを、特定のプライマーペアを使用したゲノム PCR で評価した。樹立した 18 個のクローンに対して、5'および 3'接合領域で PCR 分析にかけたところ、予想されたサイズの DNA 断片がすべてのクローンで確認できた。アンプリコンの配列分析により、18 クローンのうち 12 クローンからのサンプルが 5'接合部に完全な統合 (67%) を示し、すべてのサンプルが 3'接合部に変異を示した。

内因性 OVA プロモーターによる EGFP 発現を誘導するために、OVA 発現に有効な 5 つの gRNA を使用した dCas9-VPR トランス活性化システムをノックイン細胞クローンに導入した。dCas9-VPR および gRNA ベクターのトランスフェクションの 3 日後、細胞を蛍光顕微鏡で観察し、フローサイトメトリーで分析したところ、緑色の蛍光細胞がクローンから検出されました。すべてのベクターが細胞に導入される必要があるため、緑色蛍光細胞の割合は低く、それはベクターのトランスフェクション効率を反映していた。しかしながら、これらの結果は、内因性 OVA プロモーターが dCas9-VPR トランス活性化システムを使用してノックイン細胞の外因性遺伝子発現を誘導できることを示しており、ノックイン細胞で OVA 遺伝

子座に組み込んだ外来遺伝子が OVA プロモーターの制御下で発現可能であることが明らかになった。

(3) ニワトリ胚への遺伝子導入条件の検討

本研究では培養細胞を介さないトランスジェニックニワトリ作製法の確立を目指し、エレクトロポレーション法による胚盤葉期胚細胞への遺伝子導入を試みた。エレクトロポレーション法を用いてニワトリ初期胚細胞への遺伝子導入を行うにあたって、はじめに導入操作が容易なステージ 10 胚の神経管を標的とすることにした。そして、この時期の胚を用いて決定できた最適な導入条件を用いて胚盤葉期胚細胞へ遺伝子導入を試みることにした。LacZ 発現プラスミドを用いて各条件でエレクトロポレーションを行い、この 48 時間後に胚の発生率および X-gal 染色による遺伝子導入効率を評価した。初めに電圧における検討を行い 15 V と 10 V でパルス幅、パルス回数を固定して遺伝子導入を行った。その結果、電圧は 15 V が適切であると決定した。その後、電気パルス回数を多くすることでさらに遺伝子導入効率を高めることができるのではないかと考え、新たに条件を設定し遺伝子導入を行ったが、与える電気パルス回数を多くすると、胚へのダメージから発生率が低下する傾向があった。このためステージ 10 胚への遺伝子導入においては決定した最適条件で胚盤葉期胚への遺伝子導入を試みた。

胚盤葉期胚細胞にマイクロインジェクションおよび従来型の線電極を用いたエレクトロポレーションを行い、遺伝子導入から 4 日間胚培養を行った後、X-gal 染色によって導入効率を評価した。ステージ 10 胚では高効率に遺伝子導入が行っていた条件にもかかわらず、胚盤葉期胚ではほとんど効果が認められなかった。この原因としてはエレクトロポレーションに用いた電極にあると考えた。ステージ 10 胚へのエレクトロポレーションでは、一般的に *in ovo* の操作で用いられる線電極を使用したが、胚盤葉期胚は胚発生が進んでおらず卵黄膜表面に存在しているため効果的に電極を当てるのが困難であることが原因であると考え、新たに形状の異なる電極を採用することにした。

胚盤葉期胚へ遺伝子導入するためには電極で胚全体を挟む必要があるため平板電極を用いることにした。この時、円形平板電極と正方形平板電極の2種類の電極を用意し検討を行った。電極形状を変更したことで線電極を用いた時と胚への電気パルスのかかり方に違いが生じていると考えられたため、ステージ 10 胚で決定した遺伝子導入条件を参考にして、新たに条件を設定して遺伝子導入を試みた。ステージ 10 胚で決定した遺伝子導入条件は効果的な遺伝子導入が確認できなかったが、平板電極を用いたことで確実に胚全体を電極で挟むことが可能となった。2種類の電極のうち正方形平板電極では胚をつまむ際、角で卵黄膜を傷つけやすかったため今後は円形平板電極を用いることにした。

円形平板電極を採用したことで胚全体を電極間で挟むことができるようになったが遺伝子導入効率はあまり向上しなかった。この原因として、胚を電極で挟む際に電極の一部が空気中に露呈してしまって電気パルスがかかっていたのではないかと考え、通電を促す目的で胚盤葉期胚を電極でつまんだ後、電極間に水溶性卵白を注入しながらエレクトロポレーションを行った。ある条件の下でエレクトロポレーションを行ったところ、電極間に卵白を垂れ流さずにエレクトロポレーションを行うと遺伝子導入が確認されず、一方で卵白を注入した状態でエレクトロポレーションを行うと遺伝子導入が確認できた。しかし、この時は電極間に卵白を注入すると遺伝子導入が認められた一方で、同じ条件にもかかわらず全く遺伝子が導入されていない胚も見られた。そこで、この方法を用いてより安定的な遺伝子導入が行えるエレクトロポレーションの条件の決定を目指し、様々な条件で遺伝子導入を試みた。その結果、比較的安定して胚盤葉期胚細胞へ遺伝子導入を行うことができる条件を決定した。

次に、決定した条件を用いて胚盤葉期胚細胞にトランスポゾンベクタープラスミドの導入を行い、長時間の胚培養後に胚のどの組織に遺伝子が導入されているかを評価した。トランスポゾンを用いてゲノム組込みを行うためには、トランスポザターゼ酵素が必要である。このため、この実験ではトランスポゾンベクタープラスミドとトランスポザターゼ発現プラスミドであるの共導入を試みた。この時、プラスミド混合液は濃度が 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように質量比 4:1 で混合したものをを用いた。そして、先に決定した円形平板電極を用いたエレクトロポレーションによる胚盤葉期胚細胞への遺伝子導入を行った。その後、遺伝子導入処理胚は胚培養を行い遺伝子導入後から2日目、4日目、7日目の胚を X-gal 染色を行うことで遺伝子の導入評価をした。4日間胚培養を行った胚で胚全体が青く染まるものが確認できた。プラスミドの一過性発現では、4日間の胚培養の間に導入された遺伝子が希釈され染色が見られなかったことから、トランスポゾンベクターを用いて胚全体の染色が確認できたことから胚盤葉期胚細胞に高効率に遺伝子導入が行え、さらに導入遺伝子をゲノム上に組込むことに成功したと考えられる。また7日間胚培養を行った胚の染色においても、X-gal 染色による染色が確認できた。これらの結果から、エレクトロポレーション法による胚盤葉期胚への直接遺伝子導入によって、ゲノム編集されたトランスジェニックニワトリ作製のための基盤的な遺伝子導入技術が開発できたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shi M, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M	4. 巻 129
2. 論文標題 Targeted knock-in into the OVA locus of chicken cells using CRISPR/Cas9 system with homology-independent targeted integration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 363-370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2019.09.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yonglong Cai, Ming Shi, Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Activation of OVA gene expression in non-oviduct chicken cells using dCas9-mediated transactivation system
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大室 早紀, 河邊 佳典, 石 銘, 井藤 彰, 上平 正道
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第26回日本生物工学会九州支部 長崎大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上平 正道, 石 銘, 河邊 佳典
2. 発表標題 dCas9トランスアクチベーターシステムを用いたニワトリオボアルブミン遺伝子座の活性化
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shi M, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M
2. 発表標題 Targeted knock-in of transgene into chicken cells using CRISPR/Cas9
3. 学会等名 第31回日本動物細胞工学会国際大会 (JAACT2018 Tsukuba) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田 大樹, 石 銘, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第25回日本生物工学会九州支部 鹿児島大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大室 早紀, 石 銘, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道
2. 発表標題 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
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上平 正道, 大坪 嵩征, 小畑 玲奈, 河邊 佳典, 井藤 彰
2. 発表標題 遺伝子導入ニワトリによるTGF- β 1の卵白生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林 猛, 田谷 正仁, 本多 裕之, 上平 正道, 中島田 豊, 境 慎司, 清水 一憲	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 149
3. 書名 生物化学工学 : バイオプロセスの基礎と応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者情報 九州大学 上平正道 http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002690/index.html 研究室ホームページ http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab3/ 研究者情報 http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002690/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	河邊 佳典 (Kawabe Yoshinori) (30448401)	九州大学・工学研究院・助教 (17102)	