

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03135

研究課題名（和文）生殖細胞を持たないニワトリ開発による家禽生殖工学基盤技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of basic technology for poultry reproductive engineering by developing germ cell-free chickens

研究代表者

大石 勲 (Oishi, Isao)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：50314472

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：私たちはニワトリ生殖工学技術で重要な生殖細胞を持たないニワトリの作出と活用を目指しています。生殖細胞を持たないニワトリをレシピエントにし、凍結した生殖系列細胞や遺伝子改変細胞を移植することで、ドナー寄与率の高い生殖巣キメラニワトリを作成し、遺伝資源の保全や遺伝子改変個体の作出を効率化します。これまでの研究で特定の遺伝子を誘導的に発現させる系統を作成し、生殖細胞特異的な細胞死誘導を試みました。一部の系統では成功し、妊性も確認されましたが、別の系統ではまだ改良が必要です。生殖細胞死誘導系の改善に取り組みながら、ニワトリの遺伝資源保全と遺伝子改変の効率的な作出技術実現を目指します。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニワトリは産業動物として重要であり、品種改良や遺伝育種も進んでいます。一方、鳥インフルエンザの蔓延や希少品種飼育者の高齢化などで折角の遺伝資源が失われてしまう危機も強まっています。このような状況で生殖工学を用いたニワトリ遺伝資源の保全は重要であり、生殖細胞を持たないニワトリ系統作出は大きな進歩となります。本研究で生殖細胞特異的に遺伝子を制御できる基盤が構築されました。これは生殖細胞を持たないニワトリ開発に向けた足がかりであり、得られた研究資源や知見もとに生殖工学技術に資する系統開発を進めることができます。

研究成果の概要（英文）：We aim to create and utilize germline-free chickens, an important part of chicken reproductive engineering technology. By using germline-free chickens as recipients and transplanting frozen germline cells or genetically engineered cells, we can create germline chimeric chickens with a high donor contribution rate, thereby conserving genetic resources and increasing efficiency in producing genetically engineered individuals. We have attempted to induce germline-specific cell death by creating lines that inducibly express specific genes. Some lines were successful and fertility was confirmed, but other lines still need to be improved. While working to improve the germ cell death induction system, we aim to conserve the genetic resources of chickens and realize an efficient technology for producing genetic modifications.

研究分野：分子生物学

キーワード：始原生殖細胞 ニワトリ 遺伝子ロックイン 細胞死誘導 生殖工学

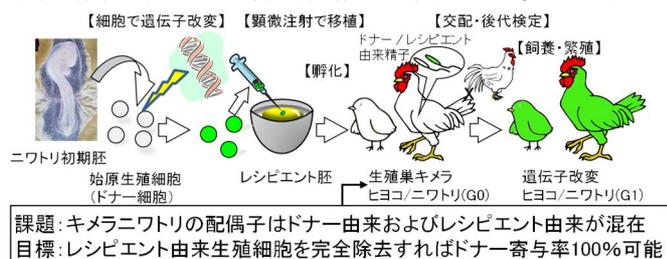
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニワトリは優れたモデル実験動物であり、世界有数の産業動物でもある。このため、学術利用や品種改良を目的としたニワトリ遺伝子改変技術や遺伝資源保存・利用を可能にする生殖工学技術の開発が強く望まれてきた。しかし、体内受精後に卵形成が起こり、固い卵殻に覆われて放卵される鳥類独特の発生様式は、遺伝子組換え技術や生殖工学技術と非常に相性が悪く研究者を悩ませていた。他の動物種で組換体を作出したり生殖工学的技法を用いる際には、一般的に卵母細胞や受精直後の初期胚を操作するが、鳥類ではこの操作が極めて困難である。より具体的には、鳥類の卵母細胞や受精直後胚は雌鶏卵管の最深部にあってアクセス困難であるだけでなく、巨大な卵黄が隣接しているため顕微注射などの作業は事実上不可能である。放卵後の卵であれば胚操作は容易であるが、ニワトリの場合放卵時に胚は既に 60,000 個を超える細胞集団に成長しており、DNA 注入や核移植などによる個体遺伝子操作も生殖工学的操作も困難であった。遺伝子改変については、2006 年に米国の Etches らのグループが将来生殖細胞に分化するニワトリ始原生殖細胞の培養技術を開発し、これを用いた新たなニワトリ遺伝子改変法を報告した。これは【図 1】のように、ニワトリ初期胚血液由来の始原生殖細胞を *in vitro* で遺伝子改変し、これをドナー細胞としてレシピエント胚に移植後キメラ個体内で配偶子分化させ、後代に遺伝子改変個体を得るという方法である。我々もこの方法に準拠し、様々な遺伝子改変ニワトリの作出を行っており、卵白の強アレルゲンであるオボムコイドを遺伝子ノックアウトしたニワトリや卵白中にヒトのサイトカインや抗体分子を生産するニワトリの開発、研究を行っている。この方法は培養細胞をもとに遺伝子改変ニワトリを作出する技術であるため、単なる遺伝子導入だけではなくゲノム編集を活用した精緻な遺伝子改変が可能な優れた方法であるが、手技の煩雑さや効率の不安定さに課題があり、熟練した技能を必要とするため、世界でも限られた研究室でしか成功していない。このような状況から、始原生殖細胞を用いたニワトリ遺伝子改変技術の汎用化のために特に求められるのは、ドナーおよびレシピエント由来細胞が混在するキメラニワトリ配偶子においてドナー寄与率を高める（できれば 100%にする）技術であった。

また、生殖工学技術の観点からも、ドナー始原生殖細胞の配偶子寄与率の向上が求められている。長年の品種改良の結果、非常に多くの品種が存在するニワトリの遺伝的保全是重要なテーマであるが、配偶子や受精卵の凍結保存技術が未完成であることは大きな問題となっている。このため、現状では継代による遺伝資源保存に頼らざるを得ないが、特に最近の鳥インフルエンザの感染拡大傾向は大きな脅威となっており、ニワトリ遺伝資源の保存において抜本的な改善が必要とされている。凍結始原生殖細胞を用いたニワトリ遺伝資源の保全是この問題を解決する可能性があるが、そのためには凍結保存されたドナー始原生殖細胞を高効率にレシピエント生殖器官内で配偶子分化させる技術の開発が求められる。このような要望から、ドナーおよびレシピエント由来細胞が混在するキメラニワトリ配偶子において、ドナー寄与率を高める技術が特に必要である。そのためには、高効率の内在性始原生殖細胞の除去技術が必要である。レシピエント胚の始原生殖細胞を移植前に減少

させたり不活化させる方法として、生殖細胞障害性の高い抗がん剤（Busulfan）の投与や電離放射線照射、採血による血液の減少（血液中の始原生殖細胞の除去）などが用いられているが、不確実性が高く、さらなる高効率化が求められていた。



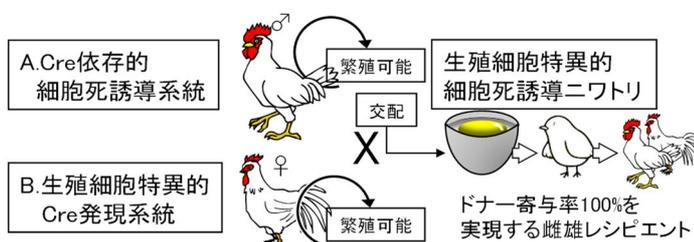
【図 1】始原生殖細胞を用いたニワトリ遺伝子改変法

2. 研究の目的

本研究では、ニワトリ遺伝子改変の高効率化やニワトリ遺伝資源保全を実現する生殖工学基盤の確立を目指し、遺伝学的手法によりレシピエントニワトリの生殖細胞の完全除去技術の開発を試みる。特に、ニワトリ遺伝子改変により生殖細胞特異的に細胞死を誘導する系統を新たに樹立することで、生殖細胞を持たないレシピエント胚を安定生産可能にすることを主な目的とする。また、樹立に成功した場合にはその後代の解析やレシピエントとしての有効性検証を目指す。

具体的な手法としては、生殖細胞を持たない個体は繁殖自体が不可能となり系統維持ができないことから、Cre-loxP 部位特異的組換え系を用いた「繁殖可能な」生殖細胞特異的細胞死誘導ニワトリの樹立を目指した。このために、A. Cre リコンビナーゼ (以下 Cre) 依存的に細胞死を誘導する系統と B. 生殖細胞特異的に Cre を発現する 2 系統のノックインニワトリを作製し、交配により後代に生殖細胞を持たないニワトリを樹立する【図 2】。A ユニットにはジフテリア毒素 A サブユニット(DTA)遺伝子を floxed stuffer の下流に配置し、上流に構成的プロモーターを挿入する。この発現系は通常 stuffer の mCherry 遺伝子を発現するが、Cre が存在すると stuffer が脱落し DTA を発現して細胞死に至る。A ユニットはマウスの ROSA26 のような Safe Harbor Site (SHS) にノックインすることが望ましいが、ニワトリ SHS は不明である。そこで、

既にホモノックアウトが可能とわかっているオボムコイド(OVM)遺伝子の3'非翻訳領域にインスレーター配列とともにノックインし、安定発現(少なくとも始原生殖細胞での発現)を目指す。Bユニットは生殖細胞特異的の遺伝子による Cre 発現誘導を目指す。ニワトリ始原生殖細胞特異的に発現する chicken Vasa homolog (CVH) 遺伝子を候補とし、CVHのC端に2A peptideで Cre を連結して発現させることで内在性の CVH に影響を与えず、始原生殖細胞特異的に Cre 発現を誘導する。あるいはよりシンプルな系として、始原生殖細胞特異的に発現する一方で、ヘテロノックアウト個体で野生型の表現型を呈する PRDM14 遺伝子のような遺伝子の翻訳開始点に Cre 遺伝子を導入し、始原生殖細胞特異的な Cre 発現を目指す。A, B 両ユニットの妥当性について培養始原生殖細胞を用いて *in vitro* で検証した後に、必要に応じて改良した上でそれぞれのノックインニワトリを樹立し、これらを交配することで生殖細胞を持たないニワトリ樹立を目指す。

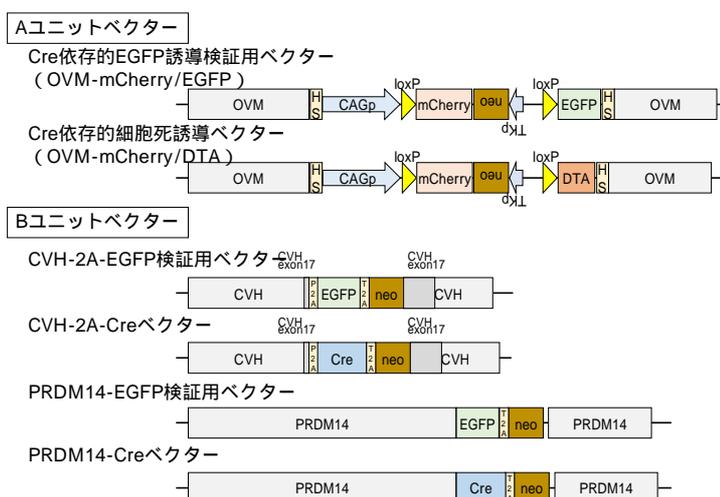


【図 2】生殖細胞特異的細胞死誘導ニワトリのデザイン

3. 研究の方法

3-1. ノックインベクターの構築

本研究では A ユニット用の Cre 依存性に細胞死を誘導するためのノックインベクターと B ユニット用の生殖細胞特異的に Cre を発現するノックインベクターを構築した。後者は CVH 遺伝子に結合して Cre を発現するデザインと、PRDM14 遺伝子の翻訳開始点に Cre 遺伝子を挿入する 2 つのデザインとした。また、それぞれの遺伝子が所期の効果を発揮することができるかどうか検討する目的で、DTA や Cre 遺伝子の代わりに EGFP 遺伝子を配置した検証用のベクターを構築した。【図 3】にこれらベクターの模式図を示す。A ユ

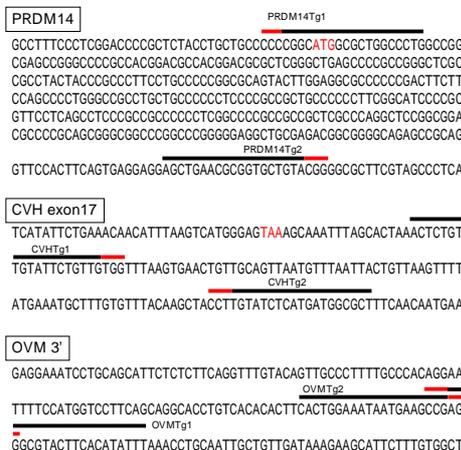


【図 3】本研究で使用した主なノックインベクターのデザイン

ニットベクターはオボムコイド 3'非翻訳領域約 2kb ずつを homology arm として両端に持ち、生殖細胞中でサイレンシングなどの発現抑制を受けにくくするために遺伝子発現ユニットを HS インスレーター配列で挟んだ。遺伝子発現ユニットには構成的プロモーターとして CAG プロモーターを配置し、下流に floxed stuffer として mCherry とノックイン細胞選択用のネオマイシン耐性遺伝子を連結した。さらに細胞死を Cre 依存的に誘導することを目的として DTA 遺伝子を配置している。また、DTA 遺伝子の代わりに EGFP 遺伝子を配置した検証用ベクターを作製し、始原生殖細胞中でこの発現誘導系が実際に機能するか検討することとした。B ユニットベクターのうち、CVH 遺伝子座に Cre をノックインするベクターは CVH 蛋白質の C 端を含む exon17 周辺領域約 2kb ずつを homology arm とし、CVH の停止コドンの直前に 2A ペプチド (P2A)、Cre、2A ペプチド (T2A)、ネオマイシン耐性蛋白質を発現するデザインとした。また、Cre の代わりに EGFP を発現する検証用ベクターもデザインした。PRDM14 翻訳開始点に Cre 遺伝子を挿入し、2A ペプチド (T2A)、ネオマイシン耐性蛋白質を発現する B ユニットベクターも別途構築した。またこれについても検証用の EGFP 発現ベクターを作製した。

3-2. 遺伝子ノックインのデザイン

ニワトリゲノムへの遺伝子ノックインは実施例が限定的であり、また導入効率が標的配列に大きく依存するとの報告もあるためデザインについても十分な検討が必要である。本研究では CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックインを試みたが、オボムコイド、CVH、PRDM14 それぞれについて複数のターゲット標的配列を設定し、HEK293T 細胞を用いた SSA アッセイに



【図 4】PRDM14、CVH、オボムコイドの標的配列 ガイド RNA 部を黒線、PAM 配列を赤線で締めず。PRDM14 の開始コドン、CVH の終止コドンを赤字で示す。

より相対的に良好なターゲット配列を選定した。

3-3. 始原生殖細胞を用いた *in vitro* での検証

遺伝子ノックインニワトリを作出するのに先立ち、各ベクターがデザインしたとおりに機能するか *in vitro* での検証を行った。3-1 に記載したそれぞれの検証用ベクターを培養始原生殖細胞に遺伝子ノックインし、蛍光蛋白質の発現を指標としてベクターの妥当性を検討した。

3-4. 遺伝子ノックインとキメラ個体、ノックイン個体の作出

白色レグホン 2.5 日胚より始原生殖細胞を調整し Cre 依存的に細胞死を誘導するためのノックインベクターと生殖細胞特異的に Cre を発現するノックインベクターをそれぞれ標的部位に相同組換えにより導入した。薬剤選択後に得られた細胞を増殖させ、ニワトリ初期胚血液に顕微注射により移植し、キメラニワトリを孵化させた。キメラニワトリを飼育して性成熟させ、配偶子におけるドナー寄与率を検定したのちに、野生型と交配し後代に遺伝子ノックインニワトリの作出を試みた。

4. 研究成果

4-1. ノックインベクターの構築

【図 3】に示した 3 種類のノックインベクターと 3 種類の *in vitro* 検証用ノックインベクターを構築した。また、SSA アッセイ用のレポーターベクターやターゲット配列を切断するガイド RNA と Cas9 を発現する一連のターゲティングベクター等も構築した。

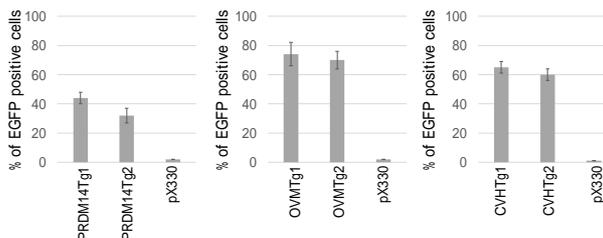
4-2. 遺伝子ノックインのデザイン

オボムコイド、CVH、PRDM14 の候補標的配列を【図 4】に HEK293T 細胞を用いた SSA アッセイの結果を【図 5】に示す。SSA アッセイは視野中の EGFP 陽性細胞の割合を%で示している。各遺伝子で相対的に良好と認められる標的配列(OVMTg1, CVHTg1, PRDMTg1)を以後遺伝子ノックインに用いることとした。

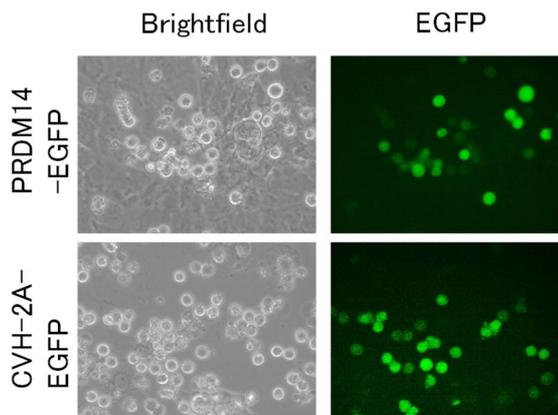
4-3. 始原生殖細胞を用いた *in vitro* での検証

まず、生殖細胞特異的に Cre を発現するノックインベクターがニワトリ始原生殖細胞内で遺伝子発現するか検証する目的で、検証用のノックインベクターPRDM-EGFPとCVH-EGFPをそれぞれ PRDMTg1、CVHTg1 を切断するガイド RNA と Cas9 とともに始原生殖細胞に導入した。ネオマイシン選択後 3 日後の写真を【図 6】に示す。いずれのノックインベクターを導入した細胞においても EGFP の発現が認められ、始原生殖細胞内で外来遺伝子を発現することができるものと考えられる。いずれの細胞も安定的に EGFP を発現し、増殖速度や形態に大きな異常は認められなかった。従って内在性の PRDM14 の発現量の低下や CVH の C 端への 2A ペプチドを介した外来蛋白質の結合が始原生殖細胞の性状に影響を与えず、移植キメラの後代にノックインニワトリが得られる可能性が期待される。次に Cre 依存的に細胞死を誘導するノックインベクターが始原生殖細胞でデザイン通り機能するか検証した。検証用のノックインベクターOVM-Cherry-EGFP ベクターを OVMTg1 を切断するガイド RNA と Cas9 とともに始原生殖細胞に導入した。ネオマイシン耐性の細胞株が得られ、この細胞は stuffer 部分の mCherry を発現する一方で、下流の EGFP は発現しない【図 7 上段】。この細胞に Cre を構成的に発現するベクター(pCAG-Cre)を一過的に導入した。導入後 3 日目【図 7 中段】と 2 週間後【図 7 下段】の蛍光像を示す。Cre の発現に伴い一部の細胞が EGFP を発現するようになり、2 週間後には多くの EGFP 陽性細胞で Stuffer 由来の mCherry の発現が低下していた。このことから、所期のデザイン通り Cre 依存的に mCherry を含む Stuffer 部分が切除され、下流の EGFP 遺伝子が発現するようになったと考えられる。このことから、EGFP の代わりに DTA を挿入した細胞死誘導ベクターでも同様に Cre 存在下で DTA が発現し、細胞死を誘導するものと考えられる。

4-4. 遺伝子ノックインとキメラ個体、ノックイン個体の作出

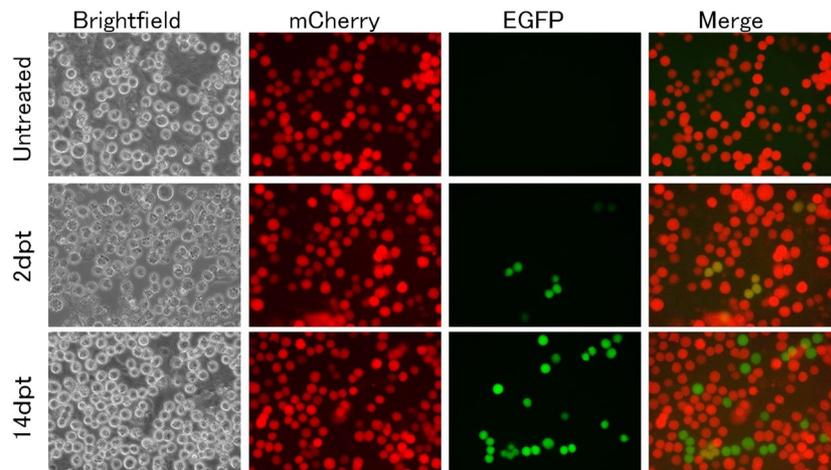


【図 5】 PRDM14、CVH、OVM の標的候補配列に対する SSA アッセイの結果。レポーターベクター(標的配列を含むニワトリゲノム 300-600bp 程度を重複する EGFP cDNA 配列に挿入した発現ベクター)と標的ガイド RNA、Cas9 を発現するターゲティングベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入し、48 時間後に EGFP 陽性細胞を計測



【図 6】 B ユニットベクターの検証。ニワトリ PGC に各ベクターをノックイン後、EGFP の発現が認められ、当該発現系を用いて始原生殖細胞特異的な Cre 発現誘導が見込まれる。

雄の白色レグホン 2.5 日胚血液から新たに始原生殖細胞株を樹立し、A ユニットならびに B ユニットベクターをノックインした。B ユニットの PRDM14-Cre に関しては、当該遺伝子が始原生殖細胞だけでなく発生過程の神経堤細胞で発現するとの報告があり、細胞死誘導により正常発生しない可能性が高いと判断されたため、キメラ個体作出は CVH-2A-Cre ベクター



【図 7】 A ユニットベクターの検証 ニワトリ PGC に検証用ベクター (OVM-mCherry/EGFP) をノックインした細胞株を樹立後、pCAG-Cre ベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入 ID:327-182 日後(2dpt 中段)と 2 週間後(14dpt 下段)の顕微鏡像を示す。Cre 導入後 2 日目には一部細胞に EGFP の発現が認められ、多くの EGFP 陽性細胞において 2 週間後には mCherry の発現が低下している。

でのみ行うこととした。pX330-OVMTg1 と OVM-mCherry-DTA ベクターならびに pX330-CVHTg1 と CVH-2A-Cre ベクターをそれぞれ始原生殖細胞に遺伝子導入しネオマイシン耐性細胞を取得した。2.5 日胚のニワトリ血液中に A ユニット、B ユニットの始原生殖細胞をそれぞれ約 2000 個/個体で顕微注射により移植し、孵化操作を行った。孵化したキメラ雄ヒヨコ 4 個体ずつを飼育し性成熟させた。精子をそれぞれの個体より採取し、ゲノム DNA を用いてノックインした遺伝子を標

| ID | PGC genotype | % of donor PGC | KI progeny(G1) | KI progeny(G2) |
|--------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| 219-23 | OVM-mCherry/DTA | <1 | NT | NT |
| 219-29 | OVM-mCherry/DTA | 1 | NT | NT |
| 326-5 | OVM-mCherry/DTA | <1 | NT | NT |
| 327-18 | OVM-mCherry/DTA | 9 | negative | NT |
| 217-2 | CVH-2A-Cre | 11 | NT | NT |
| 217-11 | CVH-2A-Cre | 20 | NT | NT |
| 218-13 | CVH-2A-Cre | 38 | positive | positive |
| 219-12 | CVH-2A-Cre | <1 | NT | NT |

【表 1】ノックインキメラ個体の解析結果

的とした定量 PCR を行なった【表 1】。A ユニットキメラの精子におけるドナー寄与率は総じて低いものの 1 個体(ID:327-18)で精子でのノックイン細胞存在が示唆された。B ユニットキメラは 4 割近いドナー寄与率を示す個体(ID:218-13)があり早期のノックイン個体取得が期待された。これらキメラ雄ニワトリを野生型雌と交配し、ノックイン後代の取得を試みた。B ユニットキメラからは健康な雌雄のノックイン後代(G1)が得られるとともに、さらにこのノックイン後代に妊性があり G2 世代にもノックイン後代が得られることが明らかとなった。一方、A ユニットは現在までノックイン後代が得られておらず、遺伝子改変により機能的な精子に分化していないなど障害が起こっている可能性が強い。始原生殖細胞樹立時の障害か導入した遺伝子の構造の問題なのかは現時点では判別できないが、A ユニットのデザインの改変も含めて後代の樹立や生殖細胞選択的除去技術の開発に向けた取り組みを引き続き実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Mukae Takehiro, Yoshii Kyoko, Watanobe Takuma, Tagami Takahiro, Oishi Isao | 4. 巻 100 |
| 2. 論文標題 Production and characterization of eggs from hens with ovomucoid gene mutation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Poultry Science | 6. 最初と最後の頁 452 ~ 460 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.psj.2020.10.026 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Mukae Takehiro, Okumura Sho, Watanobe Takuma, Yoshii Kyoko, Tagami Takahiro, Oishi Isao | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Production of Recombinant Monoclonal Antibodies in the Egg White of Gene-Targeted Transgenic Chickens | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Genes | 6. 最初と最後の頁 38 ~ 38 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12010038 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 迎 武紘 |
| 2. 発表標題 ゲノム編集ニワトリ由来IgG抗体を用いた低コスト抗原検出技術の開発 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Isao Oishi |
| 2. 発表標題 Technologies of chicken genome modification and possible applications for preservation of avian genetic resources |
| 3. 学会等名 Avian biodiversity: from developmental biology to preservation of endangered species, e-ASIA JRP workshop（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 迎 武紘、吉井 京子、大石 勲 |
| 2. 発表標題 ゲノム編集ニワトリ生産系を用いた糖鎖改変糖タンパク質生産技術 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142回年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------------|--|---|----|
| 研究 分担 者 | 迎 武紘 (MUKAE TAKEHIRO) (40803309) | 国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|