

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660291

研究課題名(和文) 培養始原生殖細胞を用いたニワトリ突然変異ライブラリーの構築

研究課題名(英文) Construction of chicken mutant library using primordial germ cells

研究代表者

飯島 信司 (IIJIMA, Shinji)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00168056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ突然変異ライブラリー構築のため、始原生殖細胞をニワトリLIF (leukemia inhibitory factor) 分泌STO細胞上で各種サイトカインを添加しての培養したが、細胞増殖という観点からは期待された効果はなかった。そこで視点を変え、ニワトリPGCの分化能と増殖能を支配している遺伝子を探し、prdm14を候補遺伝子として見出した。

研究成果の概要(英文)：In order to establish chicken-mutant library, we tried to culture chicken primordial germ cells using STO cells expressing chicken LIF as feeder cells. By using this feeder cells, certain level of PGC-growth and expression of PGC-marker was observed but reproducibility was very low. Then, we analyzed a key regulator gene that governs and sustains PGC-differentiation and growth, in order to facilitate the PGC-culture experiments. We chose prdm 14 as a candidate, and cloned the gene. By the functional analyses, we found that prdm 14 up-regulated PGC-specific gene expression.

研究分野：生物工学

キーワード：トランスジェニックニワトリ 始原生殖細胞 PRDM14 不均衡突然変異

1. 研究開始当初の背景

治療用抗体の実用化や血液製剤の安全性確保などの観点から、バイオ医薬品の重要性和その生産手段の改良が大きな問題となっている。現在バイオ医薬品は動物培養細胞を用いて生産されることが多いが、それにかわる方法として、遺伝子導入した昆虫、植物、動物などの利用の可能性が検討されている。我々は、人類との共存の歴史が長くかつ小型で扱いやすい動物であることからニワトリを選択し、遺伝子治療にも使われる安全な複製能欠損レトロウイルスベクターを、ニワトリ胚の心臓に注入することで全身への効率的デリバリーを可能としてトランスジェニックニワトリを作製する技術を開発し、チャンピオンデータではあるが、抗プリオン一本鎖抗体を 0.2g/卵、卵白に生産するシステムを開発した (Iijima et al. *J. Virol.* 79, 10864-10874, 2005)。さらに、将来生殖細胞に分化する始原生殖細胞(PGC)を分離し、レンチウイルスベクターを用いて遺伝子を導入した後宿主胚に移植する技術を確立し、トランスジェニック子孫獲得の効率を大幅アップした (3~5%)。しかしこれらの技術は遺伝子組換えを用い、特にガンウイルスを用いるため、将来このようにして作製したニワトリや鶏卵を食用に用いるには大きな問題がある。

始原生殖細胞は、将来精子や卵子に分化する生殖系列の細胞で放卵後すぐ出現し、孵卵 60 時間~70 時間くらいまで血中を循環、その後 **germinal ridge** に定着し、分化をはじめ。始原生殖細胞の培養は困難で再現性がある一般的な方法はないが、我々は独自に始原生殖細胞を培養する方法を開発している。これを応用し、細胞に突然変異を誘発した後培養し、さらに胚に移植、突然変異ニワトリを得る技術を開発する。これにより遺伝子組換えをほどこさない変異ニワトリライブラリーを構築するための基礎を確立する。

2. 研究の目的

(1) 我々は PGC を培養する方法を開発しているが、再現性、増殖マーカーや生殖系列マーカーの維持に問題があった。そこでなるべく安定に長期間培養する事を試みる。また、PGC の長期安定培養の基礎として、PGC の分化と増殖能の維持についてキーとなる遺伝子を同定し遺伝子発現という観点から解析する。

(2) PGC に効率的に変異を導入するためニワトリ DNA ポリメラーゼ δ の突然変異体の作製を行なう。

3. 研究の方法

(1) PGC の培養

フィーダー細胞 SNL76/7 細胞は、STO 細胞にネオマイシン耐性遺伝子およびマウス LIF(mLIF)発現カセットを導入することによって樹立されたセルラインであり、恒常的に mLIF が分泌されている。SNL76/7 細胞は、DMEM-high glucose (Invitrogen)を用いて培養した。また、フィーダー細胞として性能の良い細胞を取得するため、SNL76/7 細胞を 96 well plate に 2 cells/well となるように限界希釈し、G418 によるセレクションをかけながらクローンを取得した。取得したクローンから、繊維芽細胞の形状である長く伸びた形状と強い接着能を持ち、かつ、マイトマイシン C (Wako)処理後にも上記の性質が保持されるものを良いクローンと評価し、選抜した。こうして得たクローンがコンフルエントになった状態で、10 $\mu\text{g/ml}$ のマイトマイシン C を含む培地で 2 時間処理した後、フィーダー細胞として使用した。フィーダー細胞の密度は、 $1\sim 1.5 \times 10^4$ cells/cm² で用いた。

一方、chLIF 分泌 STO 細胞を作製した。出来る限り多量の chLIF を分泌させるために、chLIF を CMV プロモーターにより発現するレトロウイルスベクターを高 MOI でインフェクションすることによって取得した。この

ウイルスベクターには、発現確認用の FLAG タグおよび chLIF の内在性分泌シグナルが弱いため、Lysozyme の分泌シグナルを付加した。

chLIF 分泌 STO 細胞は、DMEM-high glucose (Invitrogen)を用いて培養した。細胞がコンフルエントになった段階で、10 µg/ml のマイトマイシン C を含む培地で 2 時間処理した後、フィーダー細胞として使用した。フィーダー細胞の密度は、 $1\sim 1.5 \times 10^4$ cells/cm² で用いた。

血中循環 PGC(cPGC)を取得するために、ニワトリ種卵を転卵角度 90 度、転卵間隔 1 時間、転卵温度 37.5 度の条件で、2.5 日胚(HHSt14-16)まで発生を進行させた。この胚体より針径 40-60 µm の針を用いて血液を採取した。採取した血液は、PGC 培養用培地に懸濁し、セルカウントした後、予め用意したフィーダー細胞上へ播種することにより cPGC を取得した。

生殖腺 PGC(gPGC)取得のために、ニワトリ種卵を転卵角度 90 度、転卵間隔 1 時間、転卵温度 37.5°C の条件で、5.5 日胚(HHSt27-29)まで発生を進行させた。胚体は実態顕微鏡下で解剖し、生殖腺を回収した。生殖腺は、0.1 % トリプシン/0.02 % EDTA/PBS 200 µl により 10 分程度処理し、分散させた。培地を加え反応を止めた後、遠心分離(1000 rpm, 5 分, 4°C)で細胞を回収し、1%FCS/PBS(-)に懸濁した。次いで懸濁細胞に一次抗体 anti SSEA-1 Mouse-IgM(Santa Cruz Biotechnology, 200 µg/ml)を×50 で加え、氷上で 30 分反応させた。遠心分離(1000 rpm, 5 分, 4°C)により細胞を回収し、1 ml の 1%FCS/PBS(-)で洗浄後、MACS(Miltenyi Biotec)を用いて SSEA-1 陽性細胞および SSEA-1 陰性細胞に分離した。詳細な条件等はマーカーのプロトコルに従った。こうして得た SSEA-1 陽性細胞をセルカウントした後、フィーダー細胞上へ播種し gPGC を取得した。

PGC の培養には、Kav-1 培地もしくは PGC culture medium を用いた。また、これに各種

サイトカインおよび BRL 細胞の培養上清を加えた培地で全量 200 µl、37°C、CO₂ 0% の条件で培養を行い、毎日半量ずつ培地を交換した。フィーダー細胞の状態を見ながら、剥がれてくる直前の一週間前後で回収し、染色等の操作を行った。継代培養する場合は、PGC をピペッティングにより回収した後、新しいフィーダー細胞へ播種した。BRL 細胞培養上清の調製のために、この細胞を、DMEM-high glucose を用いて培養した。細胞が 80%程度コンフルエントになった段階で培地交換をし、3 日間培養した。その後、培養上清を回収し、DISMIC-25cs(ADVANTEC, 0.45µ)を用いてごみ等を取り除き、1 ml ずつエッペンドルフチューブに分注した。これを液体窒素にて瞬間凍結させた後、-20°Cにて保存した。PGC 培養の際には、PGC culture medium に対し、40%の割合で BRL 培養上清を加えた。その他の添加物として bFGF 10 ng/ml (リプロセル)、huSCF 10 ng/ml (Wako)、mLIF 103 unit/ml (Wako)を用いた。

未分化細胞特異的なマーカーとして細胞表面に発現する糖鎖抗原である SSEA-1/CD15/LewisX により PGC の分化状態を評価した。まず、ピペッティングによりフィーダー細胞上の培養 PGC を回収し、遠心分離(1000 rpm, 5 分, 4°C)した後上清を除き、1%FCS/PBS(-)に懸濁した。懸濁細胞に一次抗体 anti SSEA-1 mouse-IgM (Santa Cruz Biotechnology, 200 µg/ml)を×50 で加え、氷上で 30 分~1 時間反応させた。次いで、遠心分離(1000 rpm, 5 分, 4°C)により細胞を回収し、1%FCS/PBS(-)に懸濁した後、二次抗体 goat anti mouse-IgM-PE (Santa Cruz Biotechnology, 400 µg/ml)を×100 で加え、氷上で 1 時間反応させた。その後、遠心分離(1000 rpm, 5 分, 4°C)により細胞を回収し、1%FCS/PBS(-)に懸濁した。染色した細胞は蛍光顕微鏡(Biozero : KEYENCE)による蛍光観察を行った。

chicken vasa homologue (CVH)に対する免疫

染色では、ピペッティングによりフィーダー細胞上の培養 PGC を回収し、遠心分離(1000 rpm, 5 分, 4 °C)した後、上清を除き 1%FCS/PBS(-)に懸濁した。細胞懸濁液を 35mm dish へ滴下し、細胞を沈めた。細胞が沈降後、ゆっくりと Cell Cover(フナコシ)を 100 μ l 加え、5 分程度室温で固定化した。その後、200 μ l の 1% Triton X-100(MERCK)にて 10 分間反応させ細胞を透過処理し、1%FCS/PBS(-)で洗浄した。次いで一次抗体 anti-CVH mouse antiserum (\times 100)を加え、室温で 1 時間反応し、その後一次抗体を 1%FCS/PBS(-)で洗浄し、二次抗体 goat anti mouse-IgG PE(ROCKLAND)(\times 200)を加え、室温で 1 時間反応させた。細胞は 1%FCS/PBS(-)で洗浄した後、蛍光顕微鏡 (Biozero : KEYENCE)を用いて観察した。

(2)変異型 DNA Polymerase δ の作製

過去に本研究室で作製された変異型 DNA Polymerase δ は、哺乳類 DNA Polymerase δ の活性中心を構成する配列、DFSSLYPSI 中のロイシン(L)をリジン(K)に変異させることで複製エラーが起こり、高い変異誘導能を持つという報告にもとずき作製されたものである。これを用いた機能解析では、変異型 DNA Polymerase δ を導入した細胞の致死率が低く、また細胞数が少ないことから増殖が遅くなっているという可能性が示唆された。その後、DNA Polymerase δ の変異箇所について、ロイシン(L)をグリシン(G)に変異させる方がリジン(K)に変異させるよりも効果的であることや、二か所に変異を入れるとさらに効率的である事が報告された。そこで本研究では、新たな変異型 DNA Polymerase δ の作製を試みた。pBlue-gPol δ -L605K を鋳型とし inverse PCR を用いて全長を増幅した。

作製した pBlue-gPol δ -L605G に対し、さらに二つ目の変異を加えた D402A を得た。このためプラスミド全長を増幅させる inverse

PCR を行った。

(3)その他

クローン化およびレポーターアッセイは常法に従った。シアル酸転移酵素活性測定は 14 C ラベルシアル酸と糖鎖基質を用い、酵素反応生成物を薄層クロマトグラフィーで分離し同定した。

4. 研究成果

(1) PGC の培養

IL-6 super family に属する LIF は、ナイーブな胚性幹細胞の未分化性を維持するサイトカインとして広く知られている。ニワトリ PGC の培養においても LIF は必須とされているが、哺乳類の LIF とニワトリの LIF は相同性が低く、うまくシグナルカスケードを活性化できないと報告されている。一方 chLIF については既にクローニングされており、chESC の未分化性維持に働くといった報告もある。こうした背景から、chLIF をクローニングし、フィーダー細胞である STO 細胞にこの遺伝子を導入して chLIF 分泌 STO 細胞を作製した。chLIF は内在性の分泌シグナルが弱く、上清への分泌が見られなかったため、chLIF の前にリゾチームの分泌シグナル配列を追加し、分泌量の増加を試みた。また、出来る限り多量の chLIF を分泌させるため、レトロウイルスを高 MOI でインフェクションすることによって chLIF 分泌 STO 細胞を取得した。

フィーダー細胞として、SNL76/7 細胞と chLIF 分泌 STO 細胞の二種類を用いたが、どちらの細胞もマイトマイシン C 処理後一週間程度は良く接着し、フィーダー細胞としての機能を十分に果たすと判断した。また、マイトマイシン C 処理後の細胞を凍結し、保存しておくことも可能であった。再融解した場合も細胞の生存率は極めて高く、接着性にも問題はなかった。

cPGC の培養では、フィーダー細胞を

SNL76/7 細胞とし、培地は Kav-1 培地に 40% の BRL 細胞の培養上清を加え、bFGF、huSCF、mLIF を添加した。また、培養に用いた cPGC は、Etches RJ らの論文を参考に、全血を用いた培養法を試みた。培養 4,5 日目には赤血球等は消え観察し易くなったが、再現性よく PGC を増殖させる事はできなかった。

gPGC の培養では、SNL76/7 細胞をフィーダー細胞として用い、培地は、KO-DMEM を基本培地とした PGC culture medium に 40% の BRL 細胞培養上清を加え、bFGF、huSCF、mLIF を加えたものを使用した。培養 4 日目までは PGC の存在を確認でき、ある程度の増殖が観察された。

一方、ckLIF 分泌 STO 細胞を用いた場合、生殖マーカーの発現はよくなったものの再現性に問題があり、また、増殖に関しては大きな改善効果はなかった。しかしながら、分泌されている LIF の量等が不明であり今後解析する必要がある。

(2) L605G-D402A 変異型ニワトリ Polymerase δ 遺伝子の作製

得られたサンプルの DNA シーケンスを読み取った結果 DNA Polymerase δ L605K 変異型に加えて、DNA Polymerase δ L605G 変異型、DNA Polymerase δ L605G-D402A 変異型の三種類の変異型 DNA Polymerase δ が作製できていることを確認した。

(3) Prdm14 のクローン化と機能解析

近年、PGC への分化を制御する転写因子としてマウスでは Prdm14、Blimp、Tcfac2 が報告されている。そこでニワトリ PGC についてこれら転写因子の働きを解析する事とし、まず、Prdm14 について研究を進めた。ニワトリ Prdm14 の cDNA 塩基配列は NCBI データベースに公表されているが、その N 末端については未確定であった。そこで 5'RACE 法により 5'末端部分を取得し cDNA 全長を得た。ニワトリ Prdm14 は 486 アミノ酸よりなり中央部にヒストンアセチルトランスフェラーゼに

特有な SETdomain、また、C 末端に Zn-finger を有していた。これらのドメイン構造は哺乳類の Prdm14 と類似していた。しかしながら N 末端アミノ酸配列は哺乳類のものと大きく違っていた。次にニワトリ初期胚における発現を調べたところ、胚盤葉の細胞と PGC で発現が見られた。PGC での発現は、血中循環 PGC に比べ生殖腺に定着した PGC では半減し、発現レベルは PGC の分化に伴って減少すると考えられる。次に胚盤葉細胞を分離して培養しその生理機能を調べた。Prdm14 の発現はごく短期間の培養でも 1/100 に低下した。次にこの細胞に PGC 遺伝子を強制発現し、PGC に特異的に検出されるマーカーの発現を調べたところ、cvh, dazl 等の発現量が増加した。一方、dnmt など DNA メチル化関連酵素の発現に変化は見られなかった。さらに、eGFP 融合 Prdm14 を 293FT 細胞に導入したところ核への局在が確認された。次に Prdm14 が cvh 遺伝子の活性化に関与している事を示すためにレポーターアッセイを行なった。293FT 細胞に、cvh 遺伝子の制御領域の断片とヒト Epo 発現カセットを連結したベクター、さらに eGFP-Prdm14 ベクターを同時に導入した。Cvh 制御領域を含む -1 から -557 では活性化が見られなかったが、-1 から -1600bp では顕著な活性化が見られ、-560 から -1600 に Prdm14 の結合部位があると想定された。

(4) ニワトリシアル酸転移酵素のクローン化
ニワトリシアル酸転移酵素 cDNA 8 種をクローン化した。Gal β 1,4GlcNAc Gal β 1,3GalNAc などの糖鎖基質を用い酵素活性を測定したところ、 α 2-3 結合特異的な ST3Gal1、ST3Gal3、ST3Gal 6、 α 2-6 結合特異的な ST6Gal1 の酵素活性を検出できた。今後まだ酵素活性を調べていない酵素について解析し、SSEA-1 生合成に関与するシアル酸転移酵素を同定する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 小島佑介、奥寄雄也、水谷昭文、笹本貴子、金岡英徳、西島謙一、三宅克英、飯島信司
Analysis of chicken Sialyltransferases for pharmaceutical protein production in egg white by transgenic chicken, 第 27 回日本動物細胞工学会 2014 年国際大会、2014 年 11 月 11 日から 11 月 14 日、北九州国際会議場、福岡
- ② 金岡英徳、奥寄雄也、村瀬佑介、西島謙一、飯島信司、ニワトリ始原生殖細胞における Prdm14 の機能解析、2015 年 3 月 26 日から 3 月 29 日、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学、岡山

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 信司 (IIJIMA, Shinji)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：00168056

(2) 研究協力者

金岡 英徳 (KANEOKA Hidenori)
名古屋大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：30631973