

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292193

研究課題名(和文) 鳥類におけるゲノム編集技術の確立

研究課題名(英文) Development of genome editing technology in birds

研究代表者

堀内 浩幸 (Horiuchi, Hiroyuki)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：80243608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：1細胞期受精卵操作が可能な動物では、TALENやCRISPR/Cas9といったゲノム編集の適応が進展している。ニワトリでは、1細胞期受精卵操作が困難であり、ゲノム編集ニワトリの作出研究が遅れている。そこで本研究では、生殖細胞に分化可能なニワトリ胚性幹細胞(ESC)や始原生殖細胞(PGC)を標的に、ニワトリの雄化関連遺伝子であるcHEMGN遺伝子のノックアウト(KO)を試みた。その結果、TALENとCRISPR/Cas9の両方の系から、cHEMGN-KO ESCやPGCを樹立し、cHEMGN-KO PGCの移植実験から、cHEMGNノックアウト・キメラニワトリを15羽作出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Genome editing technology is important for research of gene function. TALEN and CRISPR/ Cas9 system have been developed rapidly, and genome-modified animals have been reported in many species. Although genome-editing tool microinjections are mainly performed at one-cell stage using fertilized eggs, these procedures and in vitro fertilization are extremely difficult to perform in chickens. Therefore, the investigations of genetically modified chickens have been focused on the genetic modifications of germ cells, and the methods of gene transfer using ESCs and PGCs have been especially studied. Then, we try to create cHEMGN-knock out chickens that can keep germ line competency and genome editing tools for example, TALEN or CRISPR/Cas9. As a result, some cHEMGN knock-out ESC and PGC clones were obtained by using both TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated methods, and fifteen germline chimeric chickens were created from transplantation experiments of cHEMGN-knock out PGC clones.

研究分野：動物細胞工学

キーワード：鳥類 ゲノム編集 性決定 多能性幹細胞 始原生殖細胞 HEMGEN ノックアウト

1. 研究開始当初の背景

遺伝子破壊（ノックアウト）技術は、遺伝子とその翻訳産物（タンパク質）の生体での機能を明らかにする上で、欠かすことの出来ない技術となっている。しかし鳥類では、本技術が完全に確立されていないため、発生生物学分野で格好の研究対象であるにも関わらず、この領域の研究が進んでいない。鳥類でこの技術が完全に確立できれば、基礎研究分野での活用はもちろんのこと、アレルゲンや雄化遺伝子の破壊などで応用研究や産業利用まで幅広い利用が可能となる。近年、この分野にゲノム編集技術というブレイクスルーが起こり、これまで遺伝子ノックアウトが不可能であった生物種でも、遺伝子ノックアウト生物の作出が可能となってきた。一方、鳥類であるニワトリは、ゲノム編集の標的となる1細胞期受精卵の操作が困難であり、他の動物種に比べゲノム編集技術の適応が遅れていた。

2. 研究の目的

本研究では、鳥類におけるゲノム編集技術を確立することを目的に、鳥類の雄化に関わる HEMGEN 遺伝子を標的に TALEN と CRISPR/Cas9 を用いて、ニワトリ多能性幹細胞（ESC）や始原生殖細胞（PGC）から HEMGEN ノックアウトニワトリを作出し、その表現型により本技術導入の可否を判断するものである。本研究を行なうことで、鳥類におけるゲノム編集技術を確立するとともに、鳥類における雄化の性決定機構を解明するためのモデルニワトリを提供可能とする。

3. 研究の方法

(1) TALEN と CRISPR/Cas9 ベクターの構築

連携研究者である北海道大学・黒岩麻里教授から HEMGEN の遺伝子・ゲノム情報並びに cDNA の提供を受け、TALEN と CRISPR/Cas9 ベクターの構築を行なった。TALEN は、同じく連携研究者である広島大学・山本卓教授の研究室で開発された platinum TALEN (ptTALEN) を使用した。また、CRISPR/Cas9 は AddGene から pX330-U6-chimeric_BB-CBh-hSPCas9 ベクターを導入して使用した。標的領域は、HEMGEN のエクソン 1 の開始コドン下流に設定し、ptTALEN で 3 箇所、CRISPR/Cas9 で 4 箇所を設定し、それぞれベクターを構築した。構築したベクターはニワトリ細胞内で切断活性が高いものを選抜するために、ニワトリ ESC の候補細胞であるエピプラスト培養細胞を用い、SSA アッセイにより試験した。

(2) 新規 PGC 培養方法の構築

本研究で変異導入に使用する細胞は、ニワトリ ESC と PGC である。既に報告者の研究室では、ニワトリ ESC の培養方法は開発済

みであったため、本研究では新たに PGC の培養方法の開発に取り組んだ。PGC の培養は国内外のいくつかのグループが成功し報告しているが汎用性が低く、論文通りに培養してもうまく培養できない。そこで、本研究では細胞内情報伝達系の阻害剤を活用することで新規の培養方法の構築に取り組んだ。なお、その手法は、特許出願中並びに論文作成中のため、詳細は省略する。

(3) 培養 PGC の評価

新規培養方法で培養した PGC は初期胚への移植実験により、生殖巣への移動能、定着率及び G1 の作出効率の面から評価した。定着率では、ZsGreen 遺伝子を培養 PGC に導入しクローン化したものを用いて、移植後の孵卵 6 日胚から生殖巣を摘出し、蛍光観察を行なった。また定着率では、移植実験後、孵卵中に死亡した胚から生殖巣を摘出し、ドナー由来のゲノム DNA を検出して行なった。また、G1 の作出効率では、移植実験により誕生した 4 羽の生殖細胞キメラニワトリの交配実験により、G1 の作出効率を算定した。

(4) ESC 及び PGC での変異導入試験

構築した ptTALEN と CRISPR/Cas9 ベクターは、ESC と PGC に導入し、Cel-1 アッセイにより変異導入を確認した。

(5) ノックアウト細胞の取得とオフターゲット評価

変異導入 ESC と PGC は、限界希釈法により細胞クローニングを行い、クローン化した細胞は、ベクターの挿入の有無、及び CRISPR/Cas9 の場合は、オフターゲット候補配列を調べ、その周辺のゲノム DNA の配列を調査し、オフターゲットの有無を評価した。

(6) 生殖系列キメラニワトリの作出

オフターゲットがなく、HEMGEN 遺伝子にフレームシフトが誘導されたものをノックアウト細胞とし、初期胚への移植実験を行なった。ノックアウト ESC は放卵直後の胚盤葉下腔内に、ノックアウト PGC は同じく胚盤葉下腔内と孵卵 50 時間の胚の背側大動脈中に移植した。またレシピエント胚は、ガンマ線処理と未処理のものを用い、孵卵中に死亡した胚は、(3) の実験に活用した。

4. 研究成果

(1) TALEN と CRISPR/Cas9 ベクター

3 種の ptTALEN ベクターと 4 種の CRISPR/Cas9 ベクターは、エピプラスト培養細胞に導入し SSA アッセイを行なった。その結果、それぞれ 1 種の高切断活性を有するベクターを選抜した。

(2) 新規 PGC 培養方法の構築

新規に開発した培養方法は、極めて安定的

にかつ汎用性の高いPGCの培養方法であり、種々のニワトリ種、雌雄の違いもなく確実に培養できることがわかった。そのため、本手法は、特許出願を行い、また論文作成を行った。

(3) 培養 PGC の評価

新規の培養方法により培養した PGC を用いて ZsGreen 発現 PGC クローンを樹立した。ZsGreen 発現 PGC を初期胚の胚盤葉下腔内に移植し、孵卵 6 日目の生殖巣を観察したところ生殖巣で多数の ZsGreen 発現 PGC が移動していることがわかった。異動率については、移動した PGC が多数のため、また生殖巣全体をカウントすることが困難であったため算出できなかった。そこで孵卵中に死亡した移植胚生殖巣を用いて、ドナーPGC 由来ゲノム配列を解析したところ、ガンマ線未処理の胚では最大で 50%、ガンマ線処理の胚では 90-100%の割合でドナーPGC 由来ゲノム配列が確認された。またこの割合は、移植場所（胚盤葉下腔内か背側大動脈か）による違いは認められなかった。培養 PGC を移植して誕生した雄 2 羽、雌 2 羽のキメラニワトリを用いて交配試験により G1 の作出効率を検査したところ、1 羽の雄キメラニワトリからは、75%の割合で、1 羽の雌キメラニワトリからは、20%の割合で G1 が作出できることがわかった。以上の結果は、本研究で開発した新規培養方法により培養された PGC が極めて高い生殖細胞分化能を保持していること、また今後のニワトリでのゲノム編集などの遺伝子改変技術の適応に極めて有用であることを示している。

(4) ESC 及び PGC での変異導入試験

培養した ESC 及び PGC と構築したベクターを用いて、変異導入試験を行なった。その結果、いずれの細胞への変異導入においても、ベクター内に組込んだ薬剤耐性遺伝子による一過性の発現と薬剤選抜が、これらの細胞の変異導入に極めて有効であることがわかった。

(5) ノックアウト細胞の取得とオフターゲット評価

変異導入細胞は、限界希釈法により細胞クローニングを行い、それぞれノックアウトクローンの取得と CRISPR/Cas9 ベクターを用いて変異導入した PGC に関しては、オフターゲットの評価を行なった。その結果、変異導入 ESC では、2 種の HEMGEN ノックアウトクローンの樹立に成功した。CRISPR/Cas9 ベクターを用いて変異導入した PGC では、クローン化した 4 種の PGC でオフターゲットと思われる塩基の変異が HEMGEN 以外の領域で検出されたが、得られた 3 種のノックアウトクローンでは、当該領域に変異は認められなかった。また全てのノックアウトクローンでベクター配列の挿

入は認められなかった。

(6) 生殖系列キメラニワトリの作出

クローン化したノックアウト細胞は、それぞれ初期胚へ移植し、生殖系列キメラニワトリの作出を行なった。その結果、ノックアウト ESC から 3 羽、ノックアウト PGC から 13 羽の生殖系列キメラニワトリの作出に成功した。今後は、キメラニワトリから HEMGEN ノックアウトニワトリの作出を行い、その表現型を解析する予定である。本系の成功は、鳥類におけるゲノム編集技術の進展に寄与できるとともに鳥類の性決定機構解明に利用可能なモデルニワトリを提供できると考えられる。

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 4 件)

1. 江崎僚, 堀内浩幸. ニワトリでのゲノム編集. 実験医学増刊号 vol.34 All About ゲノム編集, 羊土社 ISBN978-4-7581-0359-6, 171-174, 2016. (査読無)

2. Abou Elazab Mohamed Fahmy, Horiuchi Hiroyuki, Furusawa Shuichi. Induction of non-specific suppression in chicks by specific combination of maternal antibody and related antigen. J Vet Med Sci, 77: 1363-1369, 10.1292/jvms.14-0525, 2015. (査読有)

3. Nakada Kojin, Fujisawa Kuniyasu, Horiuchi Hiroyuki, Furusawa Shuichi. Studies on Morphology and Cytochemistry in Blood Cells of Ayu Plecoglossus altivelis altivelis. J Vet Med Sci, 76: 693-704, 10.1292/jvms.13-0584, 2014. (査読有)

4. Cantas Alev, Mikiharu Nakano, Yuping Wu, Horiuchi Hiroyuki, Guojun Sheng. Manipulating the avian epiblast and epiblast-derived stem cells. Methods Mol. Biol. 1074: 151-173, 10.1007/978-1-62703-628_12, 2013. (査読有)

[学会発表](計 14 件)

1. 堀内浩幸. ゲノム編集を用いた家禽の品種改良技術の開発. JST 産学共創プラットフォーム共同研究推進プログラム (OPERA) 研究領域「ゲノム編集による革新的な有用細胞・生物作成技術の創出」キックオフ・シンポジウム, 3月17日, 広島市, 2017. (招待)

2. 江崎 僚, 廣瀬文哉, 古澤修一, 堀内浩幸. アポトーシス阻害剤を活用したニワトリ始原生殖細胞の新規培養方法. 第 39 回日本分子生物学会年会, 11月30日 横浜市 2016.

3. 市川健之助, 江崎 僚, 古澤修一, 堀内浩幸. ニワトリ FoxL3 遺伝子のクローニングおよび発現解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 11 月 30 日, 横浜市, 2016.

4. 平野朝子, 江崎 僚, 古澤修一, 堀内浩幸. ニワトリエピブラスト幹細胞はナイーブ型かプライム型か?. 第 39 回日本分子生物学会年会, 11 月 30 日, 横浜市, 2016.

5. 亀山文子, 江崎僚, 古澤修一, 堀内浩幸. ニワトリ多能性幹細胞に対する CRISPR/Cas9 によるゲノム編集. 第 1 回日本ゲノム編集学会, 09 月 06 日, 広島市, 2016.

6. 中川祐樹, 江崎僚, 廣瀬文哉, 古澤修一, 佐久間哲史, 黒岩麻里, 山本卓, 堀内浩幸. ニワトリ始原生殖細胞への効果的なゲノム編集. 第 1 回日本ゲノム編集学会, 09 月 06 日, 広島市, 2016.

7. Ryo Ezaki, Fumiya Hirose, Shuichi Furusawa, Hiroyuki Horiuchi. Stable and simple culture protocol for chicken primordial germ cells using apoptosis inhibitor. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. Aug 22. Fukuoka, JAPAN, 2016.

8. Teruo Maeda, Qian Sun, Ryo Ezaki, Hiroyuki Horiuchi. Establishment and preservation of embryonic stem cells from Onagadori. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. Aug 22. Fukuoka, JAPAN, 2016.

9. Mikiharu Nakano, Saki Soeda, Hiroyuki Horiuchi, Yoichi Matsuda. Establishment of quail ES-like cells. 2016 PSA Annual Meeting. July 11-14. Louisiana, USA, 2016.

10. Mikiharu Nakano, Saki Soeda, Hiroyuki Horiuchi, Yoichi Matsuda. Establishment of quail ES-like cells. Avian Model Systems 9. March 28-31. Taipei, TAIWAN, 2016.

11. Yuki Nakagawa, Ryo Ezaki, Tetsushi Sakuma, Asato Kuroiwa, Takashi Yamamoto, Hiroyuki Horiuchi. Study on male sex determination gene in the bird using genome editing technology. Biochemistry and Molecular Biology 2015. December 01-04. Kobe, JAPAN, 2015.

12. 枅岡久子, 中川祐樹, 江崎僚, 廣瀬文哉, 古澤修一, 佐久間哲史, 黒岩麻里, 山本卓, 堀内浩幸. ゲノム編集技術を用いた鳥類性決

定関連遺伝子の解析. 第 4 回ゲノム編集研究会, 10 月 6-7 日, 広島市, 2014.

13. 堀内浩幸. 鳥類多能性幹細胞の遺伝子改変技術の現状とこれから. 第 2 回実験動物科学シンポジウム, 12 月 9 日, 名古屋市, 2013 (招待)

14. 堀内浩幸. 鳥類多能性幹細胞を用いた鶏卵の低アレルゲン化. 第 1 回タマゴシンポジウム, 5 月 20 日, 東京, 2013. (招待)

〔図書〕(計 1 件)

1. 堀内浩幸 他. ニワトリの胚性幹細胞研究と培養技術. 技術情報協会出版. 《最新》動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, ニワトリの胚性幹細胞研究と培養技術, 2014, 584.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 始原生殖細胞の培養方法及び始原生殖細胞の培養用培地添加物

発明者: 堀内浩幸, 他 1 名

権利者: 広島大学

種類: 特許

番号: 特許願 2016-033905 号

出願年月日: 2016 年 2 月 25 日

国内外の別: 国内

名称: 鳥類、鳥類の作出方法および鳥類の卵

発明者: 堀内浩幸, 他 4 名

権利者: 広島大学

種類: 特許

番号: 特許願 2015-168372 号

出願年月日: 2015 年 8 月 27 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/gsbstop/interview/ja/horiuchi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 浩幸 (HIROYUKI HORIUCHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
研究者番号: 80243608

(2) 連携研究者

山本 卓 (TAKASHI YAMAMOTO)

広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 90244102

黒岩 麻里 (ASATO KUROIWA)

北海道大学・理学研究院・教授
研究者番号: 20372261