

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450481

研究課題名(和文) 外来遺伝子の安定発現を可能にするニワトリ遺伝子組み換え技術の開発

研究課題名(英文) Methods for the establishment of genetically modified chicken which stably express foreign genes.

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・バイオメディカル研究部門・総括主幹

研究者番号：50314472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリは重要な産業動物であり、遺伝子改変技術が求められている。例えば卵管細胞にバイオ医薬品を安定発現するニワトリは、有用物質を白身に大量に含む卵を産むと考えられる。本研究で外来遺伝子を安定的かつ大量に生産するニワトリを作製するための幾つかの手法開発を試みた。ニワトリ始原生殖細胞を用いてマウス人工染色体を導入し、生殖巣キメラニワトリを樹立した。また、トランスポゾン系を用いて始原生殖細胞に外来遺伝子を導入し、これを用いて組換えニワトリを樹立した。さらに、ゲノム編集によりノックインやノックアウトニワトリを作製した。これら技術は有用な遺伝子改変ニワトリ作製に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chicken is a commercially important animal and its genetic modification is expected for agricultural, industrial, and scientific applications. There are various possible and beneficial applications of genetically modified (GM) chicken. For example, stable expression of recombinant protein such as biopharmaceutical in oviduct gland cells will result in the production of chicken eggs which contain the valuable protein abundantly in the egg albumen. In this study, we tried to develop several methods for generation of GM chicken which stably and abundantly express foreign genes. Using chicken primordial germ cells (PGCs), we succeeded to introduce mouse artificial chromosome into the cells and establish germline chimera. We also established GM chickens via PGCs which introduced foreign genes by transposon system. Furthermore, we generated gene knockin and knockout chickens by genome editing. These method will open new avenues to generate valuable GM chickens.

研究分野：分子生物学

キーワード：ニワトリ 遺伝子改変 染色体 始原生殖細胞 トランスジェニックニワトリ ゲノム編集 ノックイン ノックアウト 人工

1. 研究開始当初の背景

ニワトリは、哺乳動物と比較して胚操作や経時的な観察に適しており、発生生物学を中心に優れたモデル動物として用いられている。また、世界有数の産業動物でもあり、食用をはじめ様々な産業に用いられている。近年では特に基礎生物学や産業応用の観点からニワトリの遺伝子操作技術が強く求められている。発生生物学では特定の細胞種での蛍光分子発現や発生関連遺伝子の発現等が必要とされており、産業分野においては遺伝子組換えにより鶏卵内にバイオ医薬品等の有用蛋白質を安価に生産する技術(鶏卵バイオリアクター化技術)に大きな期待が寄せられている。

一方、受精直後の胚操作が困難なことに起因し、ニワトリの遺伝子組換え技術は哺乳動物に比べて著しく遅れていた。ウイルスベクターや始原生殖細胞の使用によりニワトリゲノムへの外来遺伝子導入が可能になりつつあるが、一方で宿主ゲノムの影響と考えられる外来遺伝子発現の不安定性(サイレンシングや発現の不均一性)が大きな問題になっている。同様の問題は哺乳動物にもあるが、哺乳動物では宿主ゲノムに挿入されず独立に維持可能な人工染色体を用いることで遺伝子の挿入部位やコピー数に影響を受けない安定した遺伝子発現が可能である。哺乳動物と同様ニワトリ細胞や個体に人工染色体技術が適用できれば、外来遺伝子の安定発現がニワトリにおいても可能になると強く期待された。

2. 研究の目的

本研究課題では、人工染色体のニワトリ始原生殖細胞への適用可能性を検討し、これを用いて人工染色体を有するニワトリ個体の樹立を目指すとともに、外来遺伝子の安定発現を可能にするニワトリ遺伝子組換え技術の開発を試みた。また、人工染色体技術に留まらず、トランスポゾン発現系を用いたマルチコピー遺伝子導入による外来遺伝子安定発現系の開発ならびに、ゲノム編集技術のニワトリ個体への適用による染色体操作、安定遺伝子発現技術の開発を試みた。

3. 研究の方法

3-1.人工染色体のニワトリへの適用

雄ホワイトレグホン3日胚の血液より樹立された始原生殖細胞株を用いて、微小核融合法によるマウス人工染色体の安定導入を試みた。始原生殖細胞への微小核導入は前例が無いため、初めに導入法の検討を行った。A9細胞よりマウス人工染色体を含む微小核を抽出し、始原生殖細胞へ融合する方法としてポリエチレングリコールを用いた従来法に加え、センダイウイルスエンベローブを用いた融合法を検討した。

微小核融合によりマウス人工染色体が導入されたニワトリ始原生殖細胞を培養し、2.5

日胚(HH14)の血液中に移植した。レシピエント胚の解析を行い、人工染色体が導入された細胞が生殖巣に移住、増殖することを確認するとともに、孵化・性成熟させ、ドナー始原生殖細胞の機能性精子への分化能を後代検定により検討した。

3-2.トランスポゾン発現系を用いた外来遺伝子発現系の開発

また、外来遺伝子安定発現の別の試みとして、従来行われていないニワトリ染色体の複数箇所に外来遺伝子を導入する技術の開発を行った。トランスポゾンシステムを用いて外来遺伝子複数コピーを始原生殖細胞へ導入を試みた。この細胞を上述と同様にニワトリ初期胚に移植し、生殖巣キメラニワトリを樹立後、後代検定を行った。

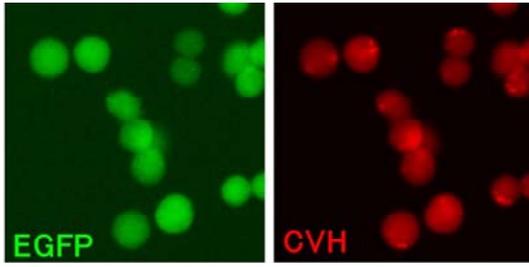
3-3.ゲノム編集技術のニワトリ個体への適用

更に我々は、ニワトリ始原生殖細胞にゲノム編集を用いて外来遺伝子を導入する技術の開発を試みた。特に、外来遺伝子を鶏卵内に特異的かつ大量に発現させることを目的として卵白蛋白質遺伝子座へのゲノム編集による遺伝子ノックイン技術の開発を行った。オボアルブミンならびにオボムコイド遺伝子を標的としてニワトリ始原生殖細胞内でこれら遺伝子の操作がCRISPR/Cas9で可能か検討するとともに、オボアルブミン遺伝子座への外来遺伝子のノックインならびにこれを用いたノックインニワトリの樹立を試みた。また、ノックアウトニワトリの樹立も合わせて実施した。

4. 研究成果

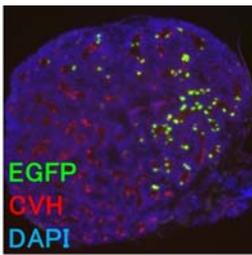
4-1.人工染色体のニワトリへの適用

マウス人工染色体を保持するA9細胞をコルセミド/サイトカラシンB処理により微小核細胞とし、ニワトリ始原生殖細胞にポリエチレングリコールならびにセンダイウイルスエンベローブを用いて融合操作を行ない、ネオマイシン耐性細胞のクローニングを行った。いずれの方法でもマウス人工染色体を安定的に保持する始原生殖細胞株が樹立可能であったが、センダイウイルスエンベローブを用いた融合法の方が従来法に比べて効率が10倍程度高く、 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞に1クローンの頻度で人工染色体の導入を認めた。人工染色体を導入した始原生殖細胞株は親株と同様の形態を保持し、BRL(buffalo rat liver)フィーダー細胞の存在下で安定的に増殖した。また、始原生殖細胞マーカーであるCVH(chicken vasa homolog)も親株と同程度発現することを免疫蛍光染色により確認した【図1】。続いて、人工染色体を導入したニワトリ始原生殖細胞を移植したキメラニワトリの樹立と解析を行った。ニワトリ初期胚(2.5日胚)血液中に約2000個の人工染色体導入始原生殖細胞を移植し、18-20日胚の生殖巣を解析した。移植細胞の生殖巣寄与率を



【図 1】人工染色体を導入し、EGFP を発現するニワトリ始原生殖細胞

人工染色体上の EGFP 遺伝子発現を指標として解析した所、推定寄与率は 5-20%以下と高くはないもののドナー由来細胞は精細管内に定着し、生殖細胞分化が期待された【図 2】。さらに移植胚を孵化させ、人工染色体を導入した生殖巣キメラニワトリを樹立した。2 系統のキメラ雄ニワトリを得て性成熟の後に後代検定を行ったが組み換え後代は得られず、また精子細胞の中にも明瞭な EGFP の蛍光シグナルを持つものも認められなかった。これらのことから、樹立した人工染色体導入始原生殖細胞が効率よく機能性の精子に分化しなかったと考えられる。



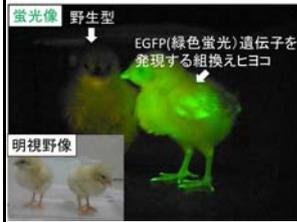
【図 2】人工染色体を導入した始原生殖細胞を移植したキメラヒヨコ生殖巣 (E18)。精細管に EGFP 陽性の移植細胞と陰性のレシピエント由来細胞が認められる

4-2. トランスポゾン発現系を用いた外来遺伝子発現系の開発

Piggybac トランスポゾンベクターシステムを用いて、ニワトリ始原生殖細胞に EGFP ならびにネオマイシン耐性遺伝子を導入し、薬剤選択により安定遺伝子導入細胞群を樹立した。この細胞をレシピエント胚に移植したが、移植に先立ちレシピエント胚を放射線処理することによって内在性の始原生殖細胞の大部分を不活化した。3 羽のキメラ雄を孵化後性成熟させ、q-PCR により精液由来ゲノムにおける導入遺伝子が最大の個体を用いて後代の検定を行った。始原生殖細胞を白色のハイライン系 (I/I)、レシピエントを黒色の横斑プリマスロック種 (i/i) としたため、野生型の横斑プリマスロック種の雌と交配することでドナー由来 (白色 I/i) とレシピエント由来 (黒色 i/i) の個体判別が可能となるようにした。検定の結果、103 羽の後代のうち移植細胞由来後代が 32 羽、うち外来遺伝子を有する組換え後代が 21 羽得られた【図 3】。得られた後代は胚発生期から全身で EGFP を発現し、孵化個体も励起光照射に伴い緑色蛍光が認められた【図 4】。組換え後代の有する外来遺伝子コピー数を複数羽の個体において検定したところ 1-8 コピーの外來遺伝子



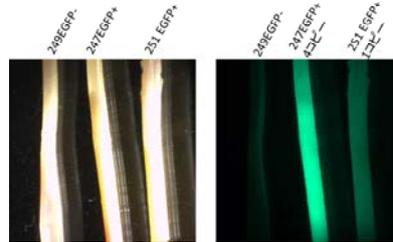
【図 3】培養始原生殖細胞を移植したキメラニワトリの後代検定。黒ヒヨコ (i/i) はレシピエント由来だが、白ヒヨコ (I/i) はドナー細胞由来である。



【図 4】EGFP を全身で発現する遺伝子組換えヒヨコ

が染色体上の複数部位に存在することが明らかとなった。また、コピー数と羽軸における蛍光強度には明瞭な相関が認められた。

【図 5】さらにトランスジェニック個体の後代にも得られ、強い EGFP 発現が継続している。これらのことから、piggybac トランスポゾンベクターによる染色体上の複数箇所への遺伝子導入という技術は組換えニワトリにおける外来遺伝子の安定発現技術に繋がると大いに期待される。

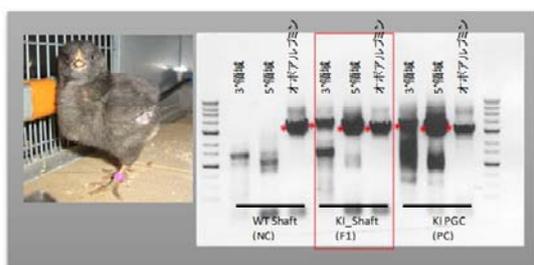


【図 5】導入遺伝子コピー数と羽軸蛍光強度の違い。

4-3. ゲノム編集技術のニワトリ個体への適用

オボアルブミンは卵白蛋白質の 55% オボムコイドは 10% をそれぞれ占める卵管特異的な蛋白質である。これら遺伝子座にゲノム編集が適用可能か CRISPR/Cas9 システムを用いて検討を行った。ゲノム編集に先立ちオボアルブミン、オボムコイドの翻訳開始点近傍にそれぞれ 4ヶ所の標的配列を設定し、EGFP を用いた SSA アッセイを行ない標的配列を決定した。ニワトリ始原生殖細胞に標的配列を認識する gRNA と Cas9 スクレアーゼ、薬剤耐性遺伝子を発現するベクターを導入し、遺伝子導入後 48-96 時間の間薬剤選択を一過的に行った。残存した細胞を薬剤非存在下で増殖させ、オボアルブミンやオボムコイドの変異を解析した所、薬剤-薬剤耐性遺伝子をピューロマイシンやゼオシンで行ったものでは 90% 以上の遺伝子で変異を認めた。極めて高い効率でゲノム編集が可能と分かったため、ドナーベクターを用いてオボアルブミン遺伝子座への遺伝子ノックインを試みた。変異挿入部位上流 2.8k、下流 3.0k の間にヒトインターフェロン β およびピューロマイシン耐性遺伝子を挿入したドナーベクターを

構築し、オボアルブミンを標的とする gRNA と Cas9 スクレアーゼを発現するベクターとともに始原生殖細胞に遺伝子導入した。ピューロマイシン耐性の細胞を増殖させ、レシピエント胚に移植した。前述と同様に雄キメラニワトリを樹立し、精液中の導入遺伝子を q-PCR で検定後、ドナー寄与率の高い個体の後代を樹立した。羽毛色を基準にドナー細胞由来個体を選別し、オボアルブミン遺伝子座へのヒトインターフェロン β 遺伝子導入について解析を行った。【図 6】に示すようにノックイン個体が得られており、目標とした遺伝子ノックインは達成したと考えられる。ノックイン個体は雄、雌共に野生型と同様に成長し健康状態にも明瞭な異常が認められないことから、性成熟後にヒトインターフェロン β を鶏卵中に大量に分泌することが強く期待される。

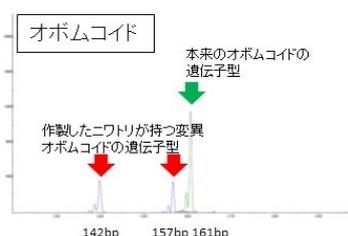


【図 6】オボアルブミン遺伝子座にヒトインターフェロン β 遺伝子をノックインしたニワトリとゲノム PCR の結果

オボムコイドを標的とした遺伝子ノックインは行わなかったが、オボムコイドに変異を含む始原生殖細胞をレシピエント胚に移植し、生殖巣キメラ個体 (G0) を得ることで遺伝子ノックアウト個体の樹立を試みた。G0 生殖巣キメラ個体を性成熟させ、その精子のゲノムにおいて遺伝子欠損を確認した後に、野生型個体と交配することで後代 (G1) にほぼ 50% 程度の高い効率で雌雄の変異個体 (ヘテロ個体) を得た。これらの中からヘテロノックアウト個体を選抜、交配し後代 (G2) にオボムコイドホモノックアウト個体を複数得ている【図 7, 8】。



【図 7】オボムコイドノックアウトニワトリ雌 (左) 雄 (右)



【図 8】ノックアウトニワトリゲノムのフラグメント解析結果。4b と 19b の欠損が認められる。

これらノックアウトニワトリも野生型と同様に健常な発育をしており、内在性のオボムコイドが発生過程において必須の分子ではないと考えられる。現在 G2 世代の性成熟を待っている段階であるが、オボムコイドの無い卵が産まれるのか、また卵の性状はどのようなかといった点に興味を持たれる。特に、オボムコイドは加熱やプロテアーゼ処理によっても殆ど減弱しない強いアレルゲン性が知られており、食品やワクチン製造産業を中心に除去技術の開発が求められてきた。今回のノックアウト鶏卵がこれら産業界の要請に応えるのか解析が待たれる。また、将来鶏卵に有用蛋白質を大量生産するノックインニワトリをオボムコイドノックアウトニワトリをベースとして樹立することで有用蛋白質の精製を容易にするといった技術への応用が見込まれる。

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 2 件)

Oishi I*, Yoshii K, Miyahara D, Kagami H, Tagami T*: Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. Sci. Rep. 6, Article number: 23980, 2016 (*corresponding author)

Miyahara D, Oishi I, Makino R, Kurumisawa N, Nakaya R, Ono T, Kagami H, Tagami T: Chicken stem cell factor enhances primordial germ cell proliferation cooperatively with fibroblast growth factor 2. J Reprod Dev. 62, 143-149, 2016

〔学会発表〕(計 10 件)

ゲノム編集技術による卵白アレルゲン「オボムコイド」ノックアウトニワトリの作出 H28 日本家禽学会春期大会 大石 勲、吉井京子、宮原大地、鏡味裕、田上 貴寛 (2016. 3. 30)

ニワトリ始原生殖細胞の無血清培養のための条件検討 H28 日本家禽学会春期大会 宮原大地、鏡味 裕、小野珠乙、大石 勲、田上 貴寛 (2016. 3. 30)

始原生殖細胞を用いたニワトリゲノム編集 第 38 回分子生物学会年会 大石 勲、吉井京子、宮原大地、鏡味裕、田上 貴寛 (2015. 12. 4)

ニワトリ始原生殖細胞における幹細胞因子の機能解析 第 38 回分子生物学会年会 宮原大地、大石 勲、仲谷隆馬、胡桃澤希未、小野珠乙、鏡味裕、田上 貴寛 (2015. 12. 1)

外来遺伝子を安定発現する組換えニワトリ

樹立の試み H28 日本家禽学会春期大会 大石勲、吉井京子、宮原大地、鏡味裕、田上貴寛 (2015. 3. 30)

鶏卵バイオリアクター：バイオ医薬品・組換え蛋白質の超低コスト生産技術第 14 回 LS-BT 合同研究発表会 大石勲 (2015. 2. 3)

始原生殖細胞由来遺伝子改変ニワトリの樹立 H26 日本家禽学会秋期大会 大石勲、吉井京子、宮原大地、鏡味裕、田上貴寛 (2014. 9. 28)

ガンマ線照射による内在性始原生殖細胞の不活化と移植始原生殖細胞株の生殖巣キメラ率向上 H26 日本家禽学会春期大会 大石勲、吉井京子、宮原大地、鏡味裕、田上貴寛 (2014. 3. 29)

組換えニワトリ卵を用いた抗体医薬生産技術の開発 第13回 LS-BT 合同研究発表会 大石勲、吉井京子、小島正己 (2014. 2. 19)

Development of technologies for protein mass production using transgenic chicken eggs. 第 36 回分子生物学会年会 大石勲、吉井京子、田上貴寛 (2013. 12. 3)

〔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：
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

大石 勲 (OISHI Isao)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイ

オメディカル研究部門・総括主幹

研究者番号：50314472

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大林 徹也 (OHBAYASHI Tetsuya)

鳥取大学・生命機能研究支援センター動物資源開発分野・分野長 (准教授)

研究者番号：80348804

田上貴寛 (TAGAMI Takahiro)

農研機構 畜産研究部門 家畜育種繁殖研究領域・上級研究員

研究者番号：60355104