

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08000

研究課題名(和文) 家禽生殖工学の次世代技術開発

研究課題名(英文) Development of next-generation technology for poultry reproductive engineering

研究代表者

田上 貴寛 (Tagami, Takahiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員

研究者番号：60355104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞を有しないニワトリを作出するために、2種類の遺伝子組換えニワトリを作出した。1種は生殖細胞特異的発現遺伝子の発現制御領域の下流にテトラサイクリン調節性トランス活性化因子(tTA)を連結した制御ベクターを導入した遺伝子組換えニワトリである。もう1種は、tTAで誘導されるテトラサイクリン応答因子の下流に細胞死を誘導するジフテリアトキシンA遺伝子を連結した応答ベクターを導入した遺伝子組換えニワトリである。性成熟後にこれら2種類の遺伝子組換えニワトリを交配して得られる両ベクター配列を有するニワトリは、始原生殖細胞が特異的に死滅し、生殖細胞を形成しないことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宿主胚に始原生殖細胞(PGC)を移植する生殖系列キメラニワトリ作出技術は、ゲノム編集ニワトリ等の作製や貴重な遺伝資源の再生技術に必須となっている。しかしながら現在の作出技術は、宿主胚由来のヒナも生産されるため効率は高いとは言えない。本研究で作出された2種類の遺伝子組換えニワトリを交配して得られるニワトリ胚には生殖細胞が形成されないため、このニワトリ胚を宿主としてPGCを移植すると、その産子は全て移植したPGC由来となる。そのため、本技術は移植したPGC由来のニワトリ生産効率を究極に引き上げることが期待でき、今後の遺伝子組換えニワトリ等の生産に欠かすことの出来ない技術となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to produce a transgenic chicken that does not have the ability to form germ cells, we tried to establish two kinds of transgenic chickens. One transgenic chicken was introduced with a vector designed to express the tetracycline transactivator (tTA) in germ cells. The other type was a transgenic chicken that introduced a sequence designed to induce cell death in response to tTA. It is expected that transgenic chickens carrying both vector sequences resulting from the crossing of these two transgenics are not able to form germ cells.

研究分野：家禽発生工学

キーワード：ニワトリ トランスジェニックニワトリ 始原生殖細胞 細胞培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、鳥インフルエンザ等の脅威等によるニワトリ系統断絶の危機が問題となっており、家禽遺伝資源を効率的に保存・再生する技術を開発する必要がでてきた。また我が国の家禽産業を成長産業化するには、遺伝子組換えニワトリ(以下 GM (genetically modified)ニワトリと表記)を実用化し、卵白内に有用タンパク質素材を生産するなど新需要を創出するイノベーションが求められる。これらの実現には、家禽生殖工学技術の充実、特に始原生殖細胞(Primordial Germ Cells: PGC)を用いた効率的なキメラニワトリ作出技術が不可欠である。

(2) これまでのキメラニワトリは、移植したドナーPGC 由来のヒナのみならず、宿主の持つ内在性 PGC 由来のヒナも産まれてきてしまう。このような非効率性のため、PGC を用いた家禽生殖工学はいまだに研究室レベルに留まっている。

2. 研究の目的

キメラニワトリからドナーPGC 由来の個体を 100%の効率で生産することを可能にするためには、宿主胚の内在性 PGC を欠損するニワトリ胚を作出しなければならない。そこで本研究では、Tet off システムおよびジフテリアトキシン(DTA)を用いて初期胚における PGC の細胞死を誘導するための 2 種類の GM ニワトリを作出することを目的とする。

これにより PGC を用いた家禽生殖工学の次世代技術基盤を構築し、家禽遺伝資源の活用や有用家禽作出の実用化技術確立を目指す。

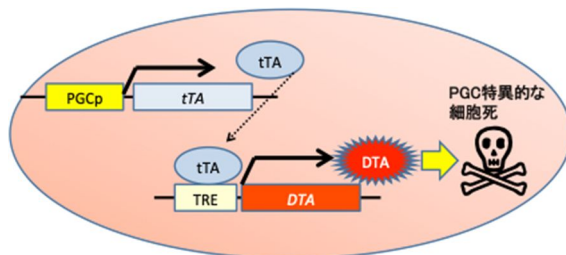
3. 研究の方法

(1) PGC の細胞死を誘導する制御ベクターおよび応答ベクターの作製

本研究におけるニワトリゲノムへの遺伝子導入には PiggyBac Transposon Vector System (SBI 社)を用いた。制御ベクター(CVHp-tTA-UTR)は、PiggyBac ベクタープラスミドのプロモーター部位をニワトリ Vasa ホモログ(CVH)遺伝子の発現制御領域(CVHp)配列と置換し、さらにその下流に原核生物由来の転写因子 tTA(テトラサイクリン調節性トランス活性化因子)および CVH 遺伝子の 3'非翻訳領域(untranslated region: UTR)を連結させて作製した。また、薬剤耐性遺伝子として、ネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだ。

応答ベクター(TRE-DTA)は、TRE(テトラサイクリン応答因子)の下流に細胞死誘導遺伝子 Diphtheria toxin A (DTA)遺伝子を連結した配列およびネオマイシン耐性遺伝子を PiggyBac ベクタープラスミドに組み込んだ。

これら 2 種類のベクターが 1 つの PGC で機能すると、tTA タンパク質が発現し、tTA タンパク質によって TRE が誘導され、Tet-Off システムが発動する。TRE は DTA の発現を誘導する。このシステムがニワトリ初期胚の PGC において良好に作動させることができれば、PGC は初期発生中に細胞死に至る(図 1)。



【PGC特異的な細胞死誘導系】

図 1. PGC 特異的な細胞死誘導系の原理

(2) PGC への導入

横斑プリマスロック(BPR)の孵卵 2.5 日雄胚から採取した PGC を培養液に加えて培養し、細胞株を樹立した。続いて、樹立した PGC 培養株に制御ベクターと PiggyBac Transposase Expression Vector (SBI 社)をリポフェクション法あるいは電気穿孔法による遺伝子導入を行い、PGC のゲノム中に CVHp-tTA-UTR 配列を組み込む操作を行った。また応答ベクターについても同様に、PGC のニワトリゲノム中へ TRE-DTA 配列の組み込む操作を行った。遺伝子導入操作を行った細胞は、G418 を含む培養液中で培養することにより遺伝子が導入された細胞のみを選択できるようにした。

培養 PGC に目的の配列が導入されたかどうかは細胞から DNA を抽出し、PCR により確認した。また細胞での遺伝子発現を確認するため、培養 PGC から total RNA を抽出し、cDNA を合成した後に RT-PCR を行った。

(3) 生殖系列キメラニワトリの作出

ゲノム中に制御ベクターまたは応答ベクターが組み込まれた PGC は、白色レグホンの孵卵 2.5 日雄胚を宿主胚として移植し、合計 21 日間孵卵することにより孵化させた。

これらのニワトリでは、生殖巣中で移植した PGC が生殖細胞として分化していることが期待されるため、以下において生殖系列キメラニワトリと称することとする。

(4) GM ニワトリの生産

(3) において作出された生殖系列キメラニワトリは性成熟に達した後、BPR の雌成鶏と人工授精により交配させることにより後代を得た。得られた後代のうち黒色羽装の後代は移植したドナーPGC 由来であり、白色羽装の後代は宿主由来の後代である。黒色羽装の後代については羽軸あるいは血液から DNA を抽出し、PCR により導入した配列を有するかどうかを解析した。

4. 研究成果

(1) 制御ベクターは、PiggyBac ベクタープラスミドにプロモーター配列となる CVHp 配列および tTA を In-fusion HD cloning Kit を用いて組み込んだ後、CVH 遺伝子の 3'UTR 制限酵素サイトを用いて組み込んだ。また、応答ベクターは PiggyBac ベクタープラスミドに In-fusion HD cloning Kit を用いて TRE 配列および DTA 配列を同時に組み込んだ。作製した両プラスミドに正確に配列が組み込まれたことはシーケンスおよび PCR により確認した(図 2)。

(2) 作出した制御ベクターおよび応答ベクターはそれぞれ、トランスポゼース遺伝子を組み込んだベクターと共に BPR 由来の培養 PGC に導入し、G418 を含む培養液中で培養した。増殖した培養 PGC から DNA を抽出し PCR を行った結果、2 種類のベクターはそれぞれ培養 PGC に組み込まれていることが確認された(図 2)。また、制御ベクターが組み込まれた培養 PGC では tTA 遺伝子が転写されていることを RT-PCR により確認した(図 3)。一方、応答ベクターが組み込まれた培養 PGC においては DTA が転写されておらず、非特異的な DTA タンパク質の発現は起こっていないことを確認した。

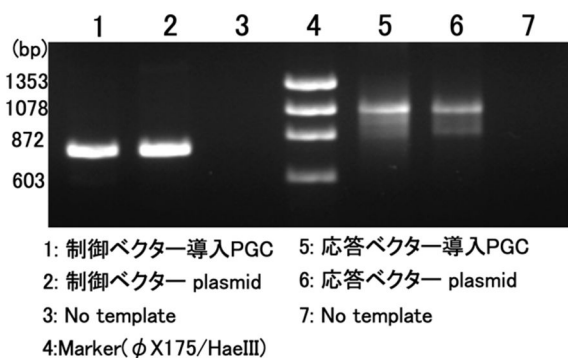


図 2. 制御ベクターまたは応答ベクターが導入された PGC における目的配列の検出

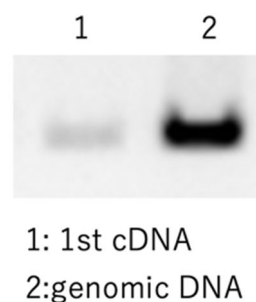


図 3. CVH-tTA-UTR 導入培養 PGC における tTA 遺伝子の発現 (白黒反転)

(3) 制御ベクターが組み込まれた細胞株は 10 個の宿主胚に移植して 3 羽(30.0%)の生殖系列キメラニワトリが孵化した。応答ベクターが組み込まれた細胞株は 12 個の宿主胚に移植して 4 羽(33.3%)の生殖系列キメラニワトリが孵化した。

(4) 制御ベクターまたは応答ベクター導入の PGC を移植した生殖系列雄キメラニワトリのうち性成熟に達した各 1 羽は、野生型 BPR 雌ニワトリと交配させた。その結果、ドナー由来の黒色羽装を持つヒナがそれぞれ 49 羽(84.5%)および 118 羽(70.7%)得られた。これらについて導入遺伝子の存在を PCR により確認した結果、制御ベクター配列が組み込まれた GM ニワトリが 27 羽(55.1%)および応答ベクターが組み込まれた GM ニワトリ 9 羽(7.6%)得られた。

性成熟後に達した後にこれら 2 種類の GM ニワトリ同士を交配して得られる予定の両ベクターを持つニワトリにおいては、生殖細胞が形成されないことが期待される。

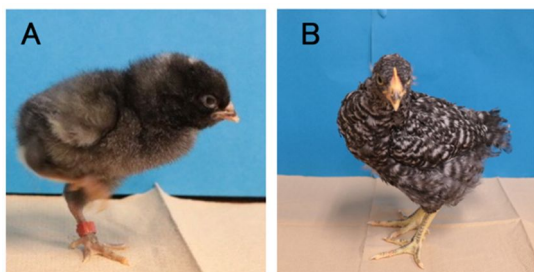


図 4. 制御ベクター(A)および応答ベクター(B)が導入された GM ニワトリヒナ

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 1件）

1. 著者名 Oishi Isao, Yoshii Kyoko, Miyahara Daichi, Tagami Takahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-28438-2	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田上貴寛、宮原大地、大石勲、松原悠子
2. 発表標題 異性始原生殖細胞移植キメラニワトリにおける受精可能な配偶子形成能
3. 学会等名 日本家禽学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 田上貴寛、松原悠子、梶原英之、大石勲
2. 発表標題 オボムコイドノックアウトニワトリ由来卵における卵白性状
3. 学会等名 日本家禽学会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tagami, T, Miyahara, D, Nakamura, Y	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 214
3. 書名 Avian Reproduction	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 遺伝子改変鳥類の作出方法および遺伝子改変鳥類	発明者 田上貴寛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-221019	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

https://sciencechannel.jst.go.jp/M170001/detail/M160001013.html シリーズ・ゲノム編集 (1)日本独自の展開 科学技術振興機構 サイエンスチャンネル サイエンスニュース2017

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------