

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18186

研究課題名（和文）デザイン型育種プロセスの創成とインフルエンザ抵抗性ニワトリ作製への展開

研究課題名（英文）Creation of a design-based breeding process and its application to the production of influenza-resistant chickens

研究代表者

西島 謙一（Nishijima, Ken-ichi）

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：10262891

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：鶏がもともと持つ高病原性鳥インフルエンザ抵抗性遺伝子の同定を目指した。抵抗性系統と感受性系統を交配して得た第2世代を感染実験に供し、ゲノム配列を決定した。連鎖解析によりインフルエンザ抵抗性と相関を示すゲノム領域を推定できた。インフルエンザ抵抗性候補遺伝子を破壊することで原因遺伝子の証明をすることが必要となるが、推定領域に存在する遺伝子の数は非常に多いので解析効率を大幅に上昇させる必要がある。このために、ガイドRNA発現用の小さなベクターを導入するだけでゲノム編集が可能となるCas9発現トランスジェニックニワトリを作製した。モデル実験によりin vivoで遺伝子破壊が可能であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作製したCrispr/Cas9発現トランスジェニックニワトリを用いて多くの遺伝子の役割を個体レベルで調べることが可能となった。インフルエンザ耐性の遺伝子候補を確認する上で有効であると考えられた。また、今後例えば肉付きの良さや飼育時のおとなしさなど家禽として望ましい形質を持たせるために遺伝子ノックアウトによる育種法が開発されていく際に、発生に悪影響があるかどうかを迅速に調べることができる。様々な遺伝形質をデザインしてニワトリを改変する育種法への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to pick up the naturally occurred gene that confer resistance to avian influenza. Linkage analysis enabled us to estimate the genomic region correlating with influenza resistance. To prove the causative gene by the knockout of the resistance candidate gene, it is necessary to increase the analytical efficiency significantly. For this purpose, we created Cas9-expressing transgenic chickens, which enable genome editing by introducing a small vector to express guide RNAs. We confirmed that a model gene can be knocked-out in vivo by the injection of a virus vector.

研究分野：ニワトリ生殖工学

キーワード：ニワトリ インフルエンザ ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

近代養鶏業は高い生産性を指標に育種を進めてきた。現在飼育されている系統は圧倒的な生産性・コストパフォーマンスを持つ一方、衛生管理された環境下での飼育が前提のため病原菌に対する抵抗性はむしろ弱い系統が多い。インフルエンザ特に鳥インフルエンザは世界中に蔓延している状況が続き、依然として危険な状況である。特に、高病原性鳥インフルエンザは高い致死性と強い伝播性から、家畜伝染病予防法において、発生農場の全家禽の殺処分等の防疫措置をとることが定められている。鳥インフルエンザは

- ① 畜産業の経済的脅威（農場全体の鶏を淘汰する）
- ② ヒト公衆衛生上の脅威（鳥で蔓延したウイルスが変異して繰り返しヒトインフルエンザのパンデミックウイルスの供給源となってきた）

であるため喫緊の対処が必要である。

インフルエンザ抵抗性鶏が開発・普及されれば、防疫対応としての家禽の大量淘汰や移動制限などが見直される可能性がある。さらに、海外企業に独占されている種鶏の国産開発及び養鶏産業の発展に大きく寄与することが期待される。名古屋大学生命農学研究科附属鳥類バイオサイエンス研究センターで維持されている鶏から高病原性鳥インフルエンザ抵抗性の遺伝背景を持つ個体が含まれる系統が見つかった。インフルエンザ耐性遺伝子をコマーシャル品種に導入することができれば、鳥インフルエンザ蔓延防止と食糧の安定供給にも大きく貢献できる。このためには、遺伝子座位の同定が必要である。

現在行われている育種は全て経験則に基づくトライアンドエラーによるものである。多くの品種を試作し有用なものを不断に選択し続けることで、生産性向上に大きく貢献してきた。しかし、これまで顧みられてこなかった形質についてはむしろ劣っている。また、交配前の原種・育種途上の鶏が全く保存されず、有事に育種前の性質に戻ってやり直せる「セーブポイント」が存在しない。少数の海外コマーシャルブリーダー由来のヒナが世界市場を寡占している現在の状況下では、特に感染症の広がり早く、耐病性など目的の性質を短期間にデザインして行える育種法の開発が必須である。トランスジェニック鶏が我が国で食用の家畜として受け入れられる可能性は低く、新たな方策が必要である。そこで、本申請では「他品種の鶏に由来する遺伝子のみでゲノム編集を行う技術」の開発にも挑戦する。今後様々な野生種・世界の地鶏の豊富な遺伝子資源の解析データの増大と急激に発展するゲノム編集技術を利用することで、異なる鶏由来の遺伝子をデザインして移植する新たな育種プロセスを提供することを目指す。この手法が開発できれば、迅速に新品种をデザインして開発できる育種法を遺伝子組換え動物の枠外で構築することができる。

2. 研究の目的

本研究では、名古屋大学生命農学研究科附属鳥類バイオサイエンス研究センターで維持されている鶏を利用して高病原性鳥インフルエンザ抵抗性の遺伝背景を持つ個体が含まれる品種について原因遺伝子の同定を目指す。同定した遺伝子を商業用品種に導入できれば、トリインフルエンザに感染しない新たな品種を作出することが可能となる。

また、ゲノム編集技術の発展を利用することで、鶏以外の生物に由来する遺伝子を持たない品種をデザインして作製する新たな育種プロセスの基盤開発を進める。

3. 研究の方法

ウイルス抵抗性を試験した個体は、たとえ生存したとしても子孫を取る交配には使用できない。このため、抵抗性の子孫が確認されたペアから産まれた別の個体から育種を進める必要があり、目的遺伝子の同定前に育種するためには膨大な感染実験が必要となる。そこで、次世代シーケンサーを用いてインフルエンザ抵抗性遺伝子の存在部位を推定し、その情報をもとに目的遺伝子の同定を進める。得られた遺伝子情報を元に、将来精子・卵子になる胚細胞である始原生殖細胞 (PGC) に *in vitro* でゲノム編集を行うことにより、天然に存在する鶏以外の遺伝子を持たない非遺伝子組換え型の鶏を育種することを目指す。

4. 研究成果

抵抗性系統と、感受性系統を交配して得た第1世代同士を交配して作出した第2世代を感染実験に供し、高病原性鳥インフルエンザ感受性を調べた。抵抗性個体を得られた第1世代ペアから生まれた個体群を維持すると同時に、感染実験に用いた抵抗性個体・感受性個体ともにゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーによりゲノム配列を決定した。

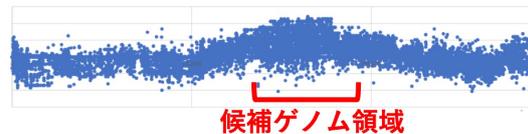


図 1. トリインフルエンザ耐性ゲノム領域の推定。遺伝子マーカーが抵抗性個体で検出される割合を示した。

連鎖解析により高病原性鳥インフルエンザ抵抗性と高い相関を示すゲノム領域を推定することができた (図 1)。このゲノム領域について DNA 配列を比較したところ、当初想定していた潜在性ホモ単一遺伝子による抵抗性という条件に該当する配列は見出されなかった。ゲノム解析に供した抵抗性個体数が少なく、マイナーな遺伝子が最終的な高病原性トリインフルエンザに対する生存/死亡に影響を与えている可能性も想定されたため、解析個体を増やすために、新たに作製した第2世代について、インフルエンザ強毒株に対する感染抵抗性を検討した。現在さらに解析を進めている。

推定領域に存在する遺伝子の数は非常に多い。最終的には想定されるインフルエンザ抵抗性遺伝子を破壊することで原因遺伝子の証明をすることが必要となるが、遺伝子の数の多さのために解析効率を大幅に上昇させることが必要である。そこで、ガイド RNA 発現用の小さなベクターを導入するだけでゲノム編集が可能となる CRISPR/Cas9 発現トランスジェニックニワトリの作製を進めた (図 2)。効率の良いトランスポゾン法により CRISPR/Cas9 遺伝子を導入した始原生殖細胞 (primordial germ cell, PGC) を孵卵 2.5 日レシピエント胚の血管に移植し生殖腺キメラニワトリ個体を作製した。成熟後に精子中で導入遺伝子コピー数の高いオス個体を野生型のメスと交配することで得たヒヨコをス

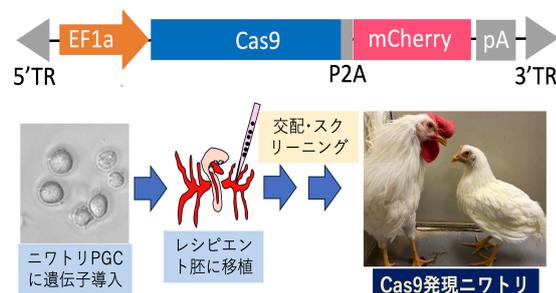


図 2. Cas9 発現トランスジェニックニワトリの作製。EF1 プロモーターの制御下 Cas9 を発現するコンストラクトを Piggybac トランスポゾンシステムにより PGC に遺伝子導入しレシピエント胚に移植した。得られた生殖腺キメラニワトリ個体を交配することでトランスジェニックニワトリ後代を得た。

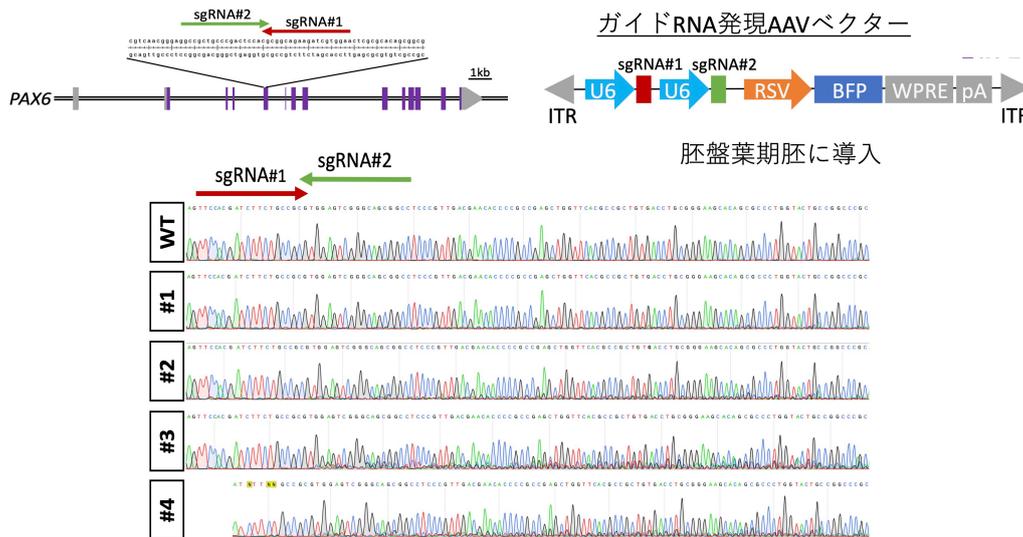


図 3. Cas9 発現トランスジェニックニワトリにおける *in vivo* 遺伝子破壊。Cas9 発現トランスジェニックニワトリ胚盤葉期胚にアデノ随伴ウイルスベクターにより *PAX6* のガイド RNA を導入した。発生後の胚からゲノム DNA を抽出して確認したところ、遺伝子ノックアウトを示すシーケンス波形の乱れが確認された。上左：*PAX6* 遺伝子に設計したガイド RNA。上右：ガイド RNA を発現するアデノ随伴ウイルスベクターの構造。下：胚ゲノムの解析結果。

クリーニングした。その結果、96羽のヒヨコのうち1羽がトランスジェニックニワトリであり、この個体の子孫を増やすことにより全身でCRISPR/Cas9を発現可能なニワトリ系統の樹立に成功した。トランスジェニックニワトリの受精卵を得て、ガイド RNA を発現可能なトリアデノ随伴ウイルスベクターを胚盤葉期の胚に導入した。モデルとして目の初期発生に必要な転写因子のガイド RNA を発現させたところ、*in vivo* で遺伝子破壊が可能であることが確認された (図 3)。

さらに、ウイルスベクターのインジェクションにより、目の発達に異常を生じる胚が観察された (図 4)。これらの結果から、作製したトランスジェニックニワトリ系統を用いて多くの遺伝子の役割を個体内で調べることで目的遺伝子の同定が可能であると考えられた。家禽として望ましい形質を持たせるために遺伝子をノックアウトする際に発生に悪影響があるかどうかを迅速に調べることができるため、今後様々な遺伝形質をデザインしてニワトリを改変する育種法への展開が期待される。



図 4. アデノ随伴ウイルスベクターによりガイド RNA を発現させた Cas9 発現トランスジェニックニワトリ胚の様子。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Yukiko Kondo, Yuya Okuzaki, Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Development of the transgenic chicken constitutively-expressing Streptococcus pyogenes Cas9
3. 学会等名 36th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuya Okuzaki, Yuki Kondo, Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Development of the SpCas9 constitutively expressing transgenic chicken
3. 学会等名 11th Avian Model Systems Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuya Okuzaki, Mitsuo Nunome, Takayuki Suzuki, Yoichi Matsuda, Yumi Ozaki, Takeo Uemura, Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Cultivation of chicken primordial germ cells from the chickens at Avian Bioscience Research Sciences Center, Nagoya University
3. 学会等名 11th Avian Model Systems Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kohei Fujiwara, Yuya Okuzaki, Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Knockout of Chicken Fucosyltransferase 8 Towards The Production System of Pharmaceutical Antibodies
3. 学会等名 36th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西島謙一
2. 発表標題 ニワトリ・ウズラ:発生異常を示す家禽リソース
3. 学会等名 第63回日本先天異常学会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西島謙一
2. 発表標題 NBRPニワトリ・ウズラ ~TGリソース~
3. 学会等名 第56回日本発生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤有希子, 奥寄雄也, 西島謙一
2. 発表標題 SpCas9 を発現する遺伝子組換えニワトリの作製
3. 学会等名 第47回 鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西島謙一, 塚田光, 奥寄雄也
2. 発表標題 NBRP ニワトリ・ウズラ - 研究を推進するリソース
3. 学会等名 第47回 鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Transgenesis of chicken and quail towards designed-type breeding
3. 学会等名 2023 International Symposium on Animal Stem Cells & Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西島謙一
2. 発表標題 NBRP ニワトリ・ウズラリソース事業とデザイン型ゲノム育種への夢
3. 学会等名 令和5年度東海畜産学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Nishijima
2. 発表標題 Transgenesis of chicken and quail towards designed-type breeding
3. 学会等名 Joint SBJ Meeting with Indonesia, Philippines, and Thailand (招待講演) (国際学会)
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	西藤 岳彦 (Saito Takehiko) (00263393)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・部長 (82111)	2022年度まで

6. 研究組織（つづき）

	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	内田 裕子 (Uchida Yuko) (80442797)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・グループ長 (82111)	
研究分担者	佐久間 咲希 (Sakuma Daki) (00849747)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・研究員 (82111)	

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