

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780269

研究課題名(和文) piggyBac トランスポゾンを用いた次世代型遺伝子改変ニワトリ作成法の開発

研究課題名(英文) Efficiency of chicken transgenesis injected PiggyBac transposase plasmids into blastoderm

研究代表者

山城 秀昭 (Yamashiro, Hideaki)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：60612710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：外来遺伝子導入により新しいニワトリ品種の作製は、有用タンパク質、鶏卵抗体やバイオ医薬品を卵黄や卵白で生産する技術に繋がり、次世代の新たな切り口を見出す基盤生産技術として期待されている。本研究は、ニワトリ生体の組織や器官とその生産物である鶏卵中に効率的に安定して、外来遺伝子であるEGFPが導入された piggyBac トランスポゾンを用いたプラスミドDNAと個体作成法を開発することを目的とした。その結果、濃度2.5 ng/ μ lの piggyBac トランスポゾンプラスミドを胚盤葉に注入した場合、生存率は低いながらも、孵化直前の鶏胎児に外来遺伝子を導入することが可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The creation of an efficient technique for producing transgenic chicks may lead to industrial applications in agriculture and biopharmacy; moreover, it will advance our understanding of avian biology itself. The objective of this study was to investigate the method for producing transgenic avian species by injected piggyBac transposon constructs into blastoderm after laying the egg. Consequently, when 2.5ng/ μ l piggyBac transposase plasmid was injected into the egg blastoderm, it could be introduced for gene transferred transgenic chicks.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：ニワトリ piggyBac トランスポゾン 遺伝子改変

1. 研究開始当初の背景

畜産における遺伝子改変家畜作出の目的は、卵・肉・乳などの食糧や羊毛など畜産物の生産性の向上など従来の畜産をベースとしたものと、有用物質の生産、家畜への抗病性の付与や病態モデルなど獣医学・医学領域や新しい動物産業に区分されるものに大別される。特に、優れたタンパク質合成器官であるヤギやウシの乳腺などを利用した有用生体物質の生産に関する研究は、その生産物を利用した臨床試験段階にある (Takahashi, 2005, Bioindustry)。しかし、大・中型畜産動物は、成長速度が遅いこと、飼育コストが高いこと、大規模な飼育スペースが必要なこと、また、有用物質の工業的生産に必要な個体数を確保するために非常に長い期間がかかることなどの問題点がある。一方、ニワトリは、安定した卵と肉の生産供給を可能としている小型畜産動物であり、その鶏卵は高タンパク性で栄養価に豊み、安価で、短期間で安定かつ大量に生産供給されるという特徴を有している。しかし、養鶏産業としては付加価値が少なく、業界としての発展性は頭打ち状態となっており、鶏卵中において有用遺伝子産物を安定と生産させることが可能になれば、安価に、かつ、多量に安定して有用物質を供給できることとなり、養鶏産業全般に大きな革命をもたらす可能性がある。

遺伝子改変ニワトリの作成法には、主にウイルス (Bosselman et al., 1989, Science) が用いられ、その他にプラスミド (Kwon et al., 2010, BBRC)、始原生殖細胞 (PGC) (Van de Lavoie et al., 2006, Nature) に外来遺伝子を導入し、受精約 24 時間後に放卵された受精鶏卵の卵殻に穴をあけ卵黄を取り出し胚盤あるいは胚盤葉のステージの核に直接遺伝子を注入し、再度、卵殻に戻し孵化させる方法が報告されている。

しかし、ニワトリの受精卵は、雌ニワトリの輸卵管の中に存在し、受精後まもなく多量の卵黄、卵白と卵殻が形成され、放卵後に継続して卵殻内で発生・孵化するため、他の哺乳動物と同様に体外にて受精卵を人為的に操作し、その産子を得るといった技術が適用することは極めて困難である。加えて、ウイルスを用いて遺伝子改変ニワトリの作成に成功した場合においても、(1)それら技術の低い作成効率、(2)ウイルスベクターで導入した遺伝子は一般的にサイレンシングされるため目的の遺伝子産物がほとんど生産されない、(3)約 10kb のサイズのため導入可能な外来遺伝子の数と種類が制限される、(4)導入された遺伝子はモザイク状に分布され鶏卵および次世代への伝達効率が低い、(5)ウイルスを用いて作成したニワトリを産業に利用する際の安全性など、効率的に遺伝子改変ニワトリを作成する技術の確立までには多くの問題がある。このような背景の中、効率的に大型の外来遺伝子がプラスミドおよび個体とその生産物に導入可能で、かつ、安

全であるトランスポゾンシステムと個体作成法の開発は、それら問題点を解決する一つの新しい技術と知見となる。

以上、外来遺伝子導入により新しいニワトリ品種を安定かつ効率的に作成する大型のプラスミドの改良・開発と基盤生殖工学技術の構築は、有用タンパク質、鶏卵抗体やバイオ医薬品を卵黄や卵白で生産する技術に繋がりが、次世代の新たな切り口を見出す基盤生産技術として期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、国内外の養鶏産業における革命的な次世代型動物産業の創出に実用可能な遺伝子改変ニワトリ作成の基盤生殖工学技術を構築するため、ニワトリ生体の組織や器官とその生産物である鶏卵中に効率的に安定して、外来遺伝子である Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) が導入された piggyBac トランスポゾンを用いたプラスミド DNA と個体作成法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. EGFP-ハイパーアクティブ piggyBac トランスポゾンプラスミド DNA の開発

EGFP 遺伝子が導入されたハイパーアクティブ piggyBac トランスポゾンプラスミド DNA の構造図は、図 1 に示す。

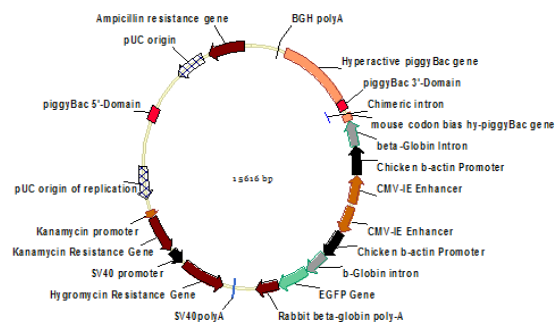


図1 EGFP-プラスミドの構造図

3-2. プラスミドの調整

GFP 遺伝子濃度が $10\text{pg}/\mu\text{l}=0.01\text{ng}/\mu\text{l}$ になるようにプラスミド DNA を 2 段階希釈した。次に大腸菌を用意する。通常、氷上融解したバイアル $50\mu\text{l}$ (大腸菌) に $10\text{pg}/\mu\text{l}$ のプラスミド DNA を $1\mu\text{l}$ 加え、穏やかに混和する。ただし、今回は GFP で bp の大きなものを導入するので (15kb 以上)、プラスミド DNA を $7\mu\text{l}$ と多めに加えた。その後、10 分間氷上でインキュベートし 42 のウォーターバスで 30 秒ヒートショックした。この時、ヒートショックの時間は正確になるように注意する。すぐに氷上に移し、S.O.C Medium (室温に戻したものを) $250\mu\text{l}$ バイアルへ加える (S.O.C の瓶およびピペットを使用前に消毒)。チューブの蓋をしめテープで固定し、振とう培養機に入れ $37\cdot 200\text{rpm}$ という条件で 1 時間

培養した。培養後 50 μ l、100 μ l、150 μ l に分け各々を 38 で予熱しておいた寒天培地に塗った。この際用いるコンラージ棒はアルコール消毒し、使うときは加熱滅菌してから培地で冷やして用いる。その後、37 で1時間培養し、一晩 37 で培養した。

大腸菌のコロニーを寒天培地から液体培地に移した。まず、L.B.broth をオートクレーブで液化させ、30ml チューブに入れた。カナマイシン 150 μ l を入れ、転倒混和し、FALCON Tube にカナマイシンを含む L.B.broth を 3ml ずつ入れた。次に、オートクレーブ済みつまようじを用いて寒天を剥がさないように Tube1 本にコロニー1つを落とす入れた。その後、予熱したインキュベーターで 37、225rpm という条件のもとで Tube を一晩培養した。

2日目の液体培養 3ml から、2ml を 2ml Tube に移した。8000rpm、室温(22-23)で3分間遠心分離にかけ、上澄みを捨てた。次に BufferP1 を加え、細胞ペレットを再懸濁し、BufferP2 を加えて、穏やかに転倒混和した。その後、BufferN3 を加え、穏やかに混和した。13000rpm で 10 分間遠心分離すると白い塊状のペレットが得られる。上記で得られた上澄みを Q1 Aprep スピнкаラムに入れた。13000rpm で 1 分間遠心分離し、フロースル液を捨てた。スピнкаラムの洗浄のため、BufferPB を加えて 13000rpm で 1 分間遠心分離し、液を捨てた。1.5ml Tube を用意し、スピнкаラムをセットする。蒸留水をカラム内に入れ、1 分間放置する。その後、1 分間遠心分離し、カラムを捨てて増幅プラスミドを冷凍保存した。抽出したプラスミドは分光光度計を用いて評価した。

3-3. プラスミド DNA の注入

レシピエントとなる受精後 1 日のジュリア種卵は、70%エタノールを用いて消毒した。プラスミドをインジェクションするための穴は、受精卵の中心から鈍端部寄り、約 2cm の部分に、電動カッターを用いて、三角形の形で一辺約 1-1.5cm 開けた。この際、殻を内部に残さず綺麗に取り除くこと、なるべく空気が入らないようにすることに注意した。また、プラスミドは、染色液フェノールレッドを微量加えた Opti-Mem で調整した。調整されたプラスミドは、直径 10-20 μ m のキャピラリーを用いて、0.5-1 μ l ずつ胚盤葉に注入した。プラスミドの濃度は、コントロール、2.5ng/ μ l、5ng/ μ l、10ng/ μ l、15ng/ μ l の 5 処理区とした。供試したレシピエント卵の個数は、それぞれ 114、108、106、109、および 110 個、計 550 個である。穴は、サージカルドレーブを用いて塞いだ。

3-4. 卵の培養および開封

穴を塞いだ卵は、孵卵器に移し、温度 38.5、湿度 60 度、1 時間ごとの 90° の転卵という条件で 20 日間培養した。その間、明らかに発生が停止していると分かる卵は孵卵 10-11 日目に開封し、胚の確認後に処分した。20 日目には胚の生存に関わらず、残った全ての卵を開封した。

3-5. DNA の抽出

開封した卵の内、生存が確認できた胎児のみ、脳、心臓、肝臓、大腿部筋肉および生殖腺片を採取し、Dneasy blood and tissue kit(QIAGEN)を用いて DNA 抽出を行った。抽出方法は、QIAGEN の「プロトコール：動物組織からのトータル DNA 精製」に従った。

3-6. PCR

開封時に生存が確認できた胎児における EGFP 遺伝子導入の検出は、脳、心臓、肝臓、筋肉および生殖巣から DNA を抽出し、PCR 法により遺伝子の増幅を行い、電気泳動により確認した。EGFP(561bp)配列の検出用プライマー設計は以下の通りである。Forward primer:5`-ACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG-3` Reverse primer:5`-CACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATG-3` EGFP 配列の確認のための PCR 反応液の組成は、1PCR Tube あたりに distilled water 6.7 μ l、10 \times buffer 1 μ l、forward primer 0.2 μ l、reverse primer 0.2 μ l、dNTPs 0.8 μ l、Ex taq 0.1 μ l、sample 1 μ l、DNA 1 μ l であり、全量 10 μ l で行った。PCR 反応は、サーマルサイクラー(BIO-RAD、T100TM Thermal Cycler)を用い、まず 95 で 3min 熱変性した後、95 で 10sec 熱変性を、63 で 20sec アニリングを、68 で 30sec 伸長反応をし、これを 30 サイクル行なった。1%アガロースゲルを作成し、Mupid(ADVANCE Mupid-2Plus)に 1 \times TAE Buffer 及びエチプロ 2 μ l を入れた。ゲルを Mupid(ADVANCE Mupid-2Plus)内に入れ、サンプルを投入する。今回は、PCR 産物 10 μ l を 1 μ l の 10 \times Loading buffer と混ぜ合わせたものをサンプルとして用いた。電気泳動にかけ、EGFP 遺伝子の導入を確認した。

4. 研究成果

コントロールにおける 1 日齢から 20 日齢までの胚発生の過程を示している。この図の 1 日齢の胚盤葉に外来遺伝子の注入を行った。3 日齢から血管が形成され、4 日齢から 5 日齢にかけて胎児の形が形成されていくことがわかる。6 日齢ごろから、眼胞が黒く鮮明になりはじめ、8-9 日齢では前・後肢の指の分化が判別可能になる。また、鳥肌が目視できるようになる。12 日齢頃には後肢の鱗がはっきりと識別できるようになる。18 日齢では腹腔に直径 2cm 程の開口部がみられ、卵黄のうの一部が吸収される。

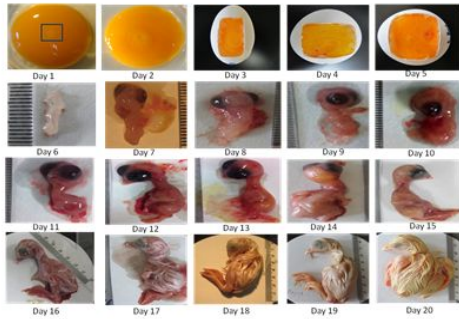


Fig.1 胚卵1日目～20日目までの胚発生過程

各濃度における 20 日齢時点での胚生存率は、コントロールで 2.6%、2.5ng/μl で 2.8%、5.0ng/μl で 1.9%、10ng/μl で 0.9%、15ng/μl で 0.9%であった。胚発生率は、コントロールで 42.9%、2.5ng/μl で 37.9%、5.0ng/μl で 38.6%、10ng/μl で 35.7%、15ng/μl で 36.3%であり、有意差はみられなかった。しかし、10 日齢以降の発生率を比べると、2.5 および 5.0ng/μl では 10%程であったが、10 および 15ng/μl では 5%程と、少し差がみられた。

異なる濃度における胎児の各発生段階における個体数を示している。EGFP 遺伝子を注入した処理区では、いずれにおいても 10-12 日齢までに胚発生が止まっている個体数が多かった。

鶏組織(脳、心臓、肝臓、大腿部筋肉および生殖巣)の電気泳動の結果、生存胎児の 5 組織の遺伝子導入を確認したところ、バンドの濃淡および組織による差はあるものの全ての処理区・個体で検出された。特に、濃度 2.5ng/μl の処理区では肝臓と筋肉のみに強いバンドがみられるモザイク個体が、濃度 10ng/μl の処理区では全ての組織で強いバンドが確認された。以上の結果より、遺伝子濃度 10ng/μl で piggyBac トランスポゾンプラスミドを胚盤葉に注入した場合、生存率は低い、孵化直前の鶏胎児の各組織に外来遺伝子を導入することが可能であった。

胚生存率がコントロールにおいても、2.6%と低い値であった。主な原因として考えられるのは、受精卵にインジェクションの穴を開けることだと考える。Speksnijder らによる実験での、窓開けのみで孵卵培養した場合のハッチング率は、ホワイトレグホン種で 8.7%、プリマスロック種で 6.1%であった (Speksnijder et al., 1999)。また、Petitte らがホワイトレグホン種を用いて同様の実験を行ったところ、ハッチング率は 9.1%であった (Petitte et al., 1990)。このように、いずれも 10%前後と、低い値になっている。これらの報告により、窓開けが胚発生およびハッチングに大きな影響を及ぼしていることがうかがえる。影響を少しでも減らすために、開ける窓の大きさを極力小さくすること

が必要であると考えられる。これに関しては、2012 年、田原豊らが、卵殻から胚を出して、殻外での培養を行い、66.7%という発生率を残している。この方法を取り入れることで、胚発生率およびハッチング率を改善できると考える。

また、プラスミド DNA の注入量やインジェクションに用いるキャピラリの太さも胚発生、生存率に影響を与えるひとつの要因になると思われる。今回、キャピラリの直径を 10-20 μl、注入量 1 μl 以下とした結果、トータルでの発生率では、有意差は無いものの、キャピラリの太さやインジェクション量もできるだけ細く、少なくするべきであると考えられる。

2.5ng/μl の処理区から得られた 3 個体全てで導入が確認できた。さらに、注入量を少なくしても確認できたことから、さらに少ない濃度及び注入量でも十分に導入は可能であると考えられる。また、10ng/μl の処理区から得られた 1 個体では全ての組織で EGFP 遺伝子の導入が確認できたため、安定した EGFP 遺伝子の発現を得るには DNA 濃度 10ng/μl が最も適しているかと考える。しかし、導入が確認できた組織は個体ごとに様々であり、目的とする組織に導入するのは困難である。また、生殖細胞に導入させることができれば遺伝子改変した次代を容易に作出できるため、PGC (始原生殖細胞) への導入についても検討するべきである。そのためにも、今後は鶏胎児をハッチングさせることが重要である。

本研究において、外来 DNA のゲノムへの導入までは確認できたが、EGFP による蛍光は確認できなかった。原因として、遺伝子サイレンシングにより EGFP の合成が行われていなかった可能性が考えられる。そこで、今後は RT-PCR により mRNA への EGFP 遺伝子の転写が行われたかどうか、次にサザンブロット法により EGFP の合成が行われたかどうかを確認する必要がある。

以上、遺伝子濃度 10ng/μl に調整した piggyBac トランスポゾンプラスミドを、胚盤葉注入法を用いて胚盤葉に注入した場合、生存率は低い、孵化直前の鶏胎児の組織に外来遺伝子を導入することは可能であることが明らかにされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 胚盤葉注入法による鶏トランスジェニック個体作出の検討. 菅野有晃, 瀧野祥生, 岩島玲奈, 柳沼日佳里, 山城秀昭. 第 52 回北信越畜産学会新潟県分会. 口頭. 新潟大学. 2014 年 3 月 19 日.

2. *piggyBac* トランスポゾンを用いた遺伝子
改変ニワトリ作成の試み. 高橋陽平, トウ
ビン, 山下舞, 植松恵美, 金子小雪, 杉山
稔恵, 山田宜永, 山城秀昭. 日本家禽学会
2013 春季大会. 口頭. 安田女子大学. 2013
年 3 月 29 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山城 秀昭 (YAMASHIRO HIDEAKI)
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号: 60612710