

## 学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 始原生殖細胞を用いたゲノム編集ニワトリ作製方法に関する研究

氏 名 江 崎 僚

野生動物の家畜化は、人類の文明の発達における主要なマイルストーンの一つである。中でもニワトリは、世界中で広く飼育される家禽であり、食品のみならず医薬品製造など様々な分野で利用されている。ニワトリの利用は、遺伝子改変技術を適用させることにより、その利用価値を高めることが試みられてきたが、高度な遺伝子改変は困難であった。一方、clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /CRISPR associated proteins (Cas) に代表されるゲノム編集技術は、遺伝子操作ができなかった生物種においても、その成功例が続々と報告されている。ニワトリにおいても、ゲノム編集技術が適用できれば、元来産業的に有用であったニワトリのさらなる有効活用が可能になると考えられる。そこで本研究では、ニワトリのゲノム編集技術に関する以下の研究を行った。

### 【第 1 章】低分子阻害剤を用いたニワトリ始原生殖細胞の培養系の開発

#### 序論

ゲノム編集技術の特徴の一つは、多くの生物種に適用できるという汎用性であり、一細胞期受精卵にゲノム編集を施すことで、個体レベルでの均一なゲノム編集が可能である。一方、ゲノム編集ニワトリの作製には、生殖細胞への分化能を持つ primordial germ cell (PGC) が利用されている。安定したニワトリ PGC の培養技術の開発は、ゲノム編集技術のニワトリへの利用を促進する可能性がある。培養系の開発にあたり、ニワトリ PGC がその移動経路およびニッチから脱落した際に生じる、アポトーシス経路の活性化に着目した。そこで本研究では、アポトーシス関連因子の低分子阻害剤を用いたニワトリ PGC 培養系の開発を行った。

#### 材料と方法

##### (1) ニワトリ PGC への低分子阻害剤処理

使用した低分子阻害剤は、blebbistatin, H1152, および Z-VAD の 3 種類である。ニワトリ胚から回収した PGC は、各低分子阻害剤を含む培養培地にて培養し、その細胞数をモニタリングした。

##### (2) ニワトリ PGC への遺伝子導入とキメラニワトリの作出

PGC への ZsGreen1 遺伝子の導入は、Takara 社の Lenti-X システムを用いて行った。生殖細胞キメラニワトリの作製は、ステージ X のレシピエント胚 (White Leghorn, WL 由来) の胚盤葉下腔に、培養 PGC (Barred Plymouth Rock, BPR 由来) を注入し行った。胚操作したレシピエント胚は、ニワトリ胚の卵殻外培養法を用いて孵化させた。作製したキメラニワトリは、人工授精により野生型の BPR 雌鶏と交配させ、得られた後代の由来する PGC は、羽毛色により判定した。

#### 結果と考察

##### (1) ニワトリ PGC 培養系における低分子阻害剤の効果

3 種の各低分子阻害剤を添加して培養した雄 PGC は、10 日間の培養で、低分子阻害剤を添加せず

に培養した細胞数と比較して増殖を亢進し、中でも blebbistatin は 3.84 倍に増殖を亢進した。

## (2) 培養ニワトリ PGC の特性評価

blebbistatin を添加した PGC 培養用培地を用いて長期培養した PGC は、典型的な PGC の特徴を有していた。また、作製した ZsGreen1 発現ベクターにより PGC への形質転換を行ったところ、その PGC クローンは、chicken vasa homolog (CVH) および NANOG を発現していた。さらに、ZsGreen1 を発現する PGC クローンは、キメラニワトリの生殖腺への移動能を有していた。

## (3) 移植実験における培養ニワトリ PGC の生殖系列伝播の確認

キメラニワトリによる後代の作出を行った結果、ドナーPGC 由来の子孫が得られ、長期間 (177 日) 培養された PGC を使用した場合でも、その効率は高かった (93%)。これらの結果は、blebbistatin が安定したニワトリ PGC 培養の維持に有用であることを示している。

## 【第 2 章】ニワトリ始原生殖細胞への遺伝導入条件検討および遺伝子ノックアウト法の検討

### 序論

ニワトリでは、*in vitro* での編集効率に加え、移植によるキメラ体の作出を経なければならず、これが遺伝子のノックイン効率の低さに繋がっている。そこで本研究では、ノックイン効率の改善を目指し、PGC におけるゲノム編集ツール導入方法を、陽イオン性リポソームに焦点を絞りその効果を検討した。

### 材料と方法

#### (1) 培養ニワトリ PGC への遺伝子導入

遺伝子導入試薬は、Lipofectamine 2000, Lipofectamine 3000, および Viromer RED を用い、PGC への ZsGreen1 発現ベクターの遺伝子導入は、各試薬のマニュアルに従い行った。また、もう一つの条件として DNA/遺伝子導入試薬複合体溶液を、上清を除去した PGC に加えて懸濁し、インキュベートする条件も設定した (以下ダイレクト添加法とする)。

#### (2) CRISPR/Cas9 を用いた培養ニワトリ PGC のゲノム編集

本研究では、ピューロマシ耐性遺伝子を付加した CRISPR/Cas9 発現ベクターを使用し、single guide RNA (sgRNA) の標的とした遺伝子は *ovomuroid (OVM)*, *hemogen (HEMGN)*, *doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1)* の 3 種類である。PGC への遺伝子導入は、Viromer RED を用い、その変異の有無は、ゲノミック PCR, Cel-I アッセイおよび塩基配列の解析により確認した。

### 結果と考察

#### (1) ZsGreen1 発現ベクターを用いた遺伝子導入

PGC における 3 種の遺伝子導入試薬の有効性を検討した結果、Viromer RED を用いたダイレクト添加法により 1.5  $\mu$ g の DNA 量で、DNA/遺伝子導入試薬複合体溶液を 60 分間作用させた条件が最も効果的にニワトリ PGC へ遺伝子導入できることがわかった。

#### (2) CRISPR/Cas9 によるニワトリ PGC のゲノム編集および Cel-I アッセイ

培養 PGC へ CRISPR/Cas9 発現ベクターを導入した結果、すべての標的遺伝子で変異導入が確認された。これらの PGC では、sgRNA の認識領域を中心に欠失、挿入、および置換が確認され、その変異導入効率は、最大で 95.12% であった。導入された変異は、ノックアウト変異を含んでおり、本手法を用いた遺伝子ノックアウトが可能であることが実証された。

## 【第 3 章】ニワトリへの CRIS-PITCh 法の適用および生殖細胞特異的遺伝子を標的とした生殖細胞追跡系モデルニワトリの作製へ向けた研究

### 序論

Precise integration into the target chromosome (PITCh) 法は、遺伝子ノックインの新しい技術

である。この方法では、遺伝子ノックインは、5-25 bp の短い相同配列で組換えを起こすことができ、その効率は homology-directed repair (HDR) 法と比較して格段に高くなっている。そこで本研究では、ニワトリで CRISPR を介した PITCh (CRIS-PITCh) 法を使用し、生殖細胞マーカーである *CVH* 遺伝子座へ蛍光タンパク質をノックインし、生殖細胞追跡系モデルニワトリの作製へ向けた研究を行った。

## 材料と方法

### (1) ベクター構築

*CVH* 遺伝子を標的とした PITCh システムの構築は、標的遺伝子座の終止コドン周辺で二本鎖切断を誘導し、PITCh ドナーベクターが有する *AcGFP1* 遺伝子が *CVH* とインフレームになるように設計した。

### (2) 培養ニワトリ PGC への遺伝子導入、薬剤選択、およびクローニング

Viromer RED による遺伝子導入は、第 2 章の材料と方法 (1) のダイレクト添加法により行い、その後ピューロマイシンによる一過的な薬剤選択を行った。遺伝子導入 PGC のクローニングは、限界希釈法により行った。遺伝子導入した PGC は、PCR ジェノタイピングおよび塩基配列の解析により解析した。

### (3) キメラニワトリの作出

キメラニワトリの作出は、第 1 章の材料と方法 (2) に従って行った。蛍光実体顕微鏡による観察は、培養開始から 10 日後の生殖腺を回収して行った。

## 結果と考察

### (1) PITCh システムを使用したニワトリ PGC の *CVH* 遺伝子座への遺伝子ノックイン

構築した PITCh 用ベクターを導入した PGC は、*AcGFP1* を発現しており、検出された *AcGFP1* は、*CVH* と同様に細胞質に局在していた。

### (2) ニワトリ PGC クローンの遺伝子型の確認

得られた 17 個のクローンはすべて、ノックインアレルを持っていた。非ノックイン対立遺伝子の増幅は、3 個のクローンでのみ確認され、他の 14 個のクローンは、両方の対立遺伝子にノックインされている可能性が示唆された。

### (3) ニワトリ PGC の生殖腺への移動能の確認

ノックインニワトリ PGC の移植実験を行った 10 日胚の生殖腺では、多くの *AcGFP1* 陽性細胞が観察され、生殖細胞追跡システムが機能しうることが示された。

## 総括

本研究では、ニワトリ PGC の新規培養系を構築した。本手法で培養した PGC は長期において自己複製でき、長期培養後も高い生殖系列伝播効率を維持していた。また、PGC の培養技術と合わせて PGC への遺伝子導入法も検討し、本手法を用いて、複数の遺伝子において遺伝子ノックアウトが可能であり、CRIS-PITCh 法を用いて遺伝子のノックインが可能であることも実証した。

本研究で得られた成果は、ゲノム編集技術による商業的に有用なニワトリの品種改良や、モデルニワトリの作製による基礎研究を促進させることに貢献できると考えられ、本研究により、ニワトリの遺伝子工学、ゲノム編集工学がよりスタンダードな技術になることが期待される。