

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 農 学 ）	氏名	江 崎 僚
学位授与の要件	学位規則第4条第1・2項該当		
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			
論文審査担当者			
主 査	教 授	堀 内	浩 幸
審査委員	教 授	山 本	卓
審査委員	教 授	矢 中	規 之
審査委員	准教授	船 戸	耕 一
〔論文審査の要旨〕			
<p>本研究は、他の生物種に比べて遅れているニワトリでのゲノム編集技術を、基礎研究から応用展開（産業利用）へ幅広く適用させるために、ニワトリでのゲノム編集の標的細胞である始原生殖細胞（PGC）の新規培養方法の開発、ノックアウト技術の適用、さらに高度なノックイン技術を適用させた結果を学位論文としてまとめたものであり、その成果は以下の3章から構成されている。</p>			
<p>第1章 低分子阻害剤を用いた始原生殖細胞の培養系の開発</p> <p>動物でのゲノム編集は、一般的に1細胞期受精卵を標的に行われる。しかし、ニワトリでは1細胞期受精卵の操作が困難なため、生殖細胞に分化可能なPGCが標的細胞として利用されている。一方、ニワトリのPGCは初期胚から100個前後しか得られないことから <i>in vitro</i> での培養が必須となる。しかしながら、これまで報告されている既存の培養方法では、再現性に乏しく、広く活用されることはなかった。そこで本研究では、面倒な支持細胞を使わず、誰でも容易に培養できる技術開発に取り組み、培養系に有効な添加剤としてアポトーシス関連因子の低分子阻害剤（blebbistatin, H1152 および Z-VAD）の有効性を確認し、特に blebbistatin が最も増殖促進効果が高いことを突き止めた。さらに決定した条件で培養した PGC は、遺伝子組換え後も安定して生殖細胞分化能を有していること、本条件で長期間培養（177日）した PGC でも高効率（93%）に培養した PGC 由来の子孫が得られることを明らかにした。</p>			
<p>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</p> <p>第2章では、実際に CRISPR/Cas9 を用いて培養 PGC に対して、変異導入の効果を検証した。まず、遺伝子導入試薬の効果を検証するために、ZsGreen 発現ベクターを用い、導入試薬の Lipofectamine 2000, Lipofectamine 3000 および Viromer RED に関して ZsGreen の発現を基に、導入効率の高い条件を検討した。その結果、PGC への遺伝子導入には、Viromer RED を用いたダイレクト添加法（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方法）により 1.5 μg 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 PGC へ遺</p>			

伝子導入できることがわかった。そこで次に、*ovomuroid* (*OVM*: 卵白中のアレルゲン遺伝子), *hemgn* (*HEMGN*: ニワトリの造血細胞分化と雄化関連遺伝子), *doublesex and mab-3 related transcription factor 1* (*DMRT1*: 性決定関連遺伝子) の3種類を標的に CRISPR/Cas9 ベクターを構築し, Viromer RED を用いたダイレクト添加法により PGC へ遺伝子導入した。変異導入活性は, Cel-1 アッセイにより評価し, 変異導入効率は塩基配列を解析することで数値化した。その結果, 変異導入効率は, 最大で約 95% であり, 導入された変異には, ノックアウト変異が含まれており, 本手法により効果的に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追跡系モデルニワトリの作製へ向けた研究

第2章において, 新規に開発した PGC の培養方法と Viromer RED を用いた遺伝子導入法により, 効率良く培養 PGC に対してゲノム編集によるノックアウトが可能であることが明らかとなった。そこで次の課題として, ゲノム編集を用いたノックイン技術に焦点を絞った。これまでのノックイン技術は, 相同遺伝子組換え (HR) の原理に基づいた細胞内での極めて稀な現象を利用していたが, 最近, マイクロホモロジー末端結合 (MMEJ) を活用した CRIS-PITCh 法が開発され, 高効率に目的遺伝子をノックインする技術が報告された。そこで本章では, この技術を PGC へ応用し, 生殖細胞特異的に発現する *CVH* 遺伝子に蛍光タンパク質遺伝子 (*AcGFP*) がノックイン可能かどうかを検証した。その結果, *CVH* の発現とともに *AcGFP* の発現が観察され, CRIS-PITCh 法による PGC に対するノックインが可能であることがわかった。また, *AcGFP* 発現 PGC をクローニングし, 遺伝子型を解析したところ, クローニングできた 17 クローンのうち 14 クローンで両方の対立遺伝子に *AcGFP* がノックインされていることがわかった。さらに *AcGFP* ノックイン PGC を初期胚に移植したところ, 10 日胚の生殖腺で *AcGFP* 陽性細胞が観察され, 生殖細胞の追跡系に利用可能であることが示された。

以上の本申請博士論文の成果は, 当初の目的であった「ニワトリでのゲノム編集技術を, 基礎研究から応用展開 (産業利用) へ幅広く適用させる」を実現させるために極めて重要な成果を多く含んでおり, 基礎生物学から農学分野において大きく貢献するものであり, 審査の結果, 本論文の著者は博士 (農学) の学位を授与されるに十分な資格があるものと認められる。