

博士論文

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

令和3年9月

江崎 僚

目次

	頁
略語一覧	1
緒言	3
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	
1-1 序論	11
1-2 材料と方法	14
1-3 成績	19
1-4 考察	31
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 CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子ノックアウト法の検討	
2-1 序論	36
2-2 材料と方法	38
2-3 成績	42
2-4 考察	49
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	
3-1 序論	52
3-2 材料と方法	55
3-3 成績	59
3-4 考察	67
総合考察	70

総括	72
謝辞	75
文献	76

略語一覽

Bcl-2:	B-cell lymphoma 2
blebbistatin:	(-)-blebbistatin
BSA:	bovine serum albumin
BPR:	Barred Plymouth Rock
Cas:	CRISPR associated proteins
CRISPR:	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CVH:	chicken vasa homolog
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMRT1:	doublesex and mab-3 related transcription factor 1
DNA:	deoxyribonucleic acid
ECC:	embryonic carcinoma cell
EGF:	epidermal growth factor
EGK:	Eyal-Giladi and Kochav
EpiSC:	epiblast stem cell
ERK:	extracellular signal-regulated kinase
ES:	embryonic stem
FGF2:	fibroblast growth factor 2
GABA:	gamma amino butyric acid
GFP:	green fluorescent protein
H1152:	H1152 dihydrochloride
HDR:	homology-directed repair
HH:	Hamburger and Hamilton
HMEJ:	homology-mediated end joining
HR:	homologous recombination
IGF1:	insulin-like growth factor 1
iPS:	induced pluripotent stem

IRES:	internal ribosome entry site
LIF:	leukemia inhibitory factor
MEK:	mitogen-activated protein kinase kinase
mRNA:	messenger RNA
NHEJ:	non-homologous end-joining
ORF:	open reading frame
OVM:	ovomucoid
PAM:	protospacer adjacent motif
PBS:	phosphatebuffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PGC:	primordial germ cell
PITCh:	precise integration into target chromosome
PTEN:	phosphatase and tensin homolog
RNA:	ribonucleic acid
RNP:	ribonucleoprotein
ROCK:	Rho-associated protein kinase
SCF:	stem cell factor
sgRNA:	single guide RNA
TALEN:	transcription activator-like effector nuclease
WL:	White Leghorn
Z-VAD:	Z-VAD(OMe)-FMK (mixture of isomers)
ZFN:	zinc finger nucleases

緒言

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1つである [1]。人類史を通じて、約 40 種の動物が家畜化されており、そのほとんどは、今日でも家畜として農業および食料生産に貢献している。中でもニワトリは卵用と肉用の両方で飼育されており、セキショクヤケイを順化したと言われている紀元前 6000 年前から今日まで、最も広く利用されている家禽の1つである [2, 3]。鶏卵は、主要栄養素であるタンパク質、炭水化物、脂質をバランス良く含んでおり、ビタミンやミネラルも豊富な数少ない完全栄養食品と呼ばれている。ニワトリの利用は、卵や肉を食品として利用するだけでなく、その鶏卵成分が食品添加物や医薬品含有成分としての産業利用されている。また、発育鶏卵は、インフルエンザや黄熱のワクチン生産 [4] に利用されるなど、食品から医薬品まで様々な分野で利用されている。このように産業的に有用なニワトリの利用は、遺伝子改変技術により、さらにその利用価値を高められると考えられる。

遺伝子改変技術は、人工的に外来遺伝子を導入する、もしくは内在性遺伝子に変異導入する技術である。遺伝子改変技術には、外来遺伝子をゲノム deoxyribonucleic acid (DNA) に挿入するトランスジェニックと交雑や突然変異などの自然現象で作りに出される可能性のある変異を人為的に導入するナチュラルオカレンスに大別される。トランスジェニック動物の作製は、レトロウイルスを用いて 1974 年にマウスで初めて作製された [5, 6]。この手法は、ウイルスが自身の遺伝子を宿主細胞のゲノム DNA に挿入する性質を利用した方法であり、ウイルスベクター法という [7]。利用するウイルスは、複製能を欠失させたレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、および単純ヘルペスウイルスなど複数ある。ウイルスベクター法は、極小のウイルス粒子に導入遺伝子をパッケージングしなければいけないため、その導入可能な遺伝子のサイズに制限があることや、導入コピー数、ゲノム上の挿入箇所に導入遺伝子の発現が左右され、また、導入遺伝子がサイレンシングを受けやす

いなどの問題点がある[8, 9]。しかし、ウイルスベクター法は、他の遺伝子導入方法と比べ極めて導入効率が高いことから、トランスジェニック動物の作製だけでなく、遺伝子治療やワクチンへも応用されている有効な遺伝子導入技術である。

1980年には、マイクロインジェクション法 [10] によるトランスジェニック動物の作製法が報告された。Gordon らによってマウスで初めて報告されたこの方法は、微小ガラスキャピラリーを用いて DNA などを直接、受精卵の前核や細胞質へ注入する方法であり、その後、ヒツジやブタなどの種々の動物へ応用された汎用性の高い手法である [11]。この手法は、特別な装置と高度な技術が必要とされるため、一度に多数の細胞に対しては行えず、また、導入遺伝子が染色体中に組み込まれる割合も極めて低いという問題点はあったが、一つ一つの細胞に導入遺伝子を確実に注入できるため、トランスジェニック体の作出に汎用された。1982年には、マイクロインジェクション法により作製されたラットの成長因子を導入したトランスジェニックマウスが、その体重が2倍程度になり、人工的に導入した外来遺伝子が生体で機能することが示された [12]。外来遺伝子が表現型に影響を及ぼすことを実証した意義は、科学的にも社会的にも大きく、遺伝子組換え技術により導入された外来遺伝子の機能を解析できるばかりでなく、産業的にも家畜、家禽、農作物などの品種改良や、生物を利用して有用な遺伝子産物を生産できる可能性が示された。

ウイルスベクター法やマイクロインジェクション法は、外来遺伝子が対象生物の染色体中にランダムに挿入されるランダムインテグレーションに基づいた手法である。これらに対して、目的の遺伝子を特定の染色体上で欠失（ノックアウト）もしくは付加（ノックイン）するジーンターゲティング法も開発されてきた。ジーンターゲティング法によるトランスジェニック動物の作製では、多能性幹細胞である胚性幹（embryonic stem, ES）細胞の培養技術の発展が重要な役割を果たしてきた。多能性幹細胞とは、*in vitro* で自己複製能と多分化能を保持したまま長期継代培養が可能な細胞であり、この細胞からトランスジェニック動物を作製するためには、利用する多能性幹細胞が生殖細胞へと分化

し、その細胞由来の子孫を得られること（生殖系列伝播）が必要である。生殖系列伝播が可能な多能性幹細胞の最初の報告は、*in vitro* で長期培養したマウスのテラトカルシノーマ細胞（embryonic carcinoma cell, ECC）から正常な個体を作製することができ、その後代を作出できる[13]というものであったが、その後の解析から ECC の生殖細胞分化能は確認されていない。しかし、胚細胞由来培養細胞が多分化能を有することが明らかとなり、ES 細胞研究が進展していった。その後、1981 年に Evans らは、マウスの正常な胚盤胞に由来する内部細胞塊から多能性を維持したまま培養できる ES 細胞株の樹立に成功し、さらに培養 ES 細胞由来の個体を作製することを可能にした [14]。一方、ジーンターゲティング法によりトランスジェニックマウスを作製するためには、マウス ES 細胞の培養技術の発展と合わせて相同組換え（homologous recombination, HR）法の開発も重要な役割を果たした。HR 法は、DNA の塩基配列が類似した相同配列で起こる相同組換え修復（homology-directed repair, HDR）を利用した手法である。HDR は鋳型 DNA を利用した DNA 修復機構であり、HR 法は、遺伝子導入により標的の遺伝子と相同配列を持つドナーベクターを鋳型 DNA として導入し、ドナーベクターと標的遺伝子間で HDR を誘導する方法である [15]。この時にドナーベクターが持つ変異や外来遺伝子が標的遺伝子領域へ取り込まれる。この方法の優れたところは、薬剤耐性遺伝子やジフテリアトキシン A サブユニットのような毒素遺伝子等を組み合わせることで HR を起こした細胞のみを選抜し、目的の遺伝子組換えからその配列の確認までを *in vitro* で完了できるところにある [16]。現在のところ、ES 細胞株が樹立されている動物種はマウス [14] およびラット [17, 18] のみであり種々の動物へ適用できる汎用性はないが、生殖系列伝播能を持ちその細胞由来の個体を作製できる ES 細胞法と、標的遺伝子を目的の形に組換えることができる HR 法を用いることで、ノックアウト、ノックインマウスの作製が可能となった。これにより、個体レベルで特定遺伝子の機能を解析できるようになり、このジーンターゲティング法は、哺乳動物における分子生物学のブレイクスルーといっても過言ではない。

一方、トランスジェニック動物と同様に、自然現象である突然変異を人為的に導入するナチュラルオカレンスに相当する技術開発も行われてきた。例えば、細胞内の DNA が放射線や紫外線、化学物質などにより切断を受けると、これが原因となって突然変異が誘導されることが知られていた。これを応用し農作物や微生物等において、標的の遺伝子に切断・修復を起こさせ、変異（欠失、挿入、および置換）を導入する品種改良が行われてきた [19]。しかし、この方法では、切断・修復は基本的にはランダムに起こるため、標的以外のゲノム領域に複数の変異が起きてしまう。そのため、突然変異により目的の表現型を得るためには膨大な時間を要してきた。近年、分子生物学的なナチュラルオカレンスには、新たな技術が加わった。その技術は、細菌の持つ防御システムに利用されるタンパク質の一つである制限酵素（ヌクレアーゼ）を応用した人工ヌクレアーゼ、いわゆるゲノム編集ツールである。1996年に報告されたジンクフィンガーヌクレアーゼ（zinc finger nucleases, ZFN）は、DNA を切断するヌクレアーゼドメインと DNA への認識・結合を行うドメインを連結した第一世代のゲノム編集ツールである [20]。ZFN に利用されるヌクレアーゼは真正細菌 *Flavobacterium okeanokoites* 由来の制限酵素 *Fok I* の DNA 切断ドメインである。*Fok I* の DNA 切断ドメインは、特定の認識配列を持たず、その DNA 切断活性を発揮するためには、二量体形成が必要である。また、ジンクフィンガーとは、多くの生物で転写因子の DNA 結合に用いられているドメインであり、1フィンガーが3塩基の配列を認識・結合する。これを複数連結することにより比較的長い配列に特異的に結合させることができる。しかも、*Fok I* は二量体で働くため、近接した2つの標的配列に対して ZFN をペアで作製し、その間に *Fok I* の二量体を形成させることで、特異性高く二本鎖 DNA を切断することができる。ZFN は分子サイズが比較的小さいというメリットがある一方で、その設計や作製が難しいというデメリットも存在する。

2010年に報告された transcription activator-like effector nuclease (TALEN) は、植物病原菌 *Xanthomonas* 由来の転写因子様エフェクターを利用した第二世代のゲノム編集ツールである [21]。転写因子様エフェクターには、33-35 アミノ酸

からなる繰り返し構造 (TALE リピート) があり, この TALE リピートの 12 番目と 13 番目の可変領域のアミノ酸の並びが結合する塩基を決定している [22, 23]。この転写因子様エフェクターに ZFN と同様に *FokI* の DNA 切断ドメインを連結させた人工ヌクレアーゼが TALEN である。TALE リピートの繰り返し数は, TALEN では 15-20 と長いため, ZFN と同様にペアで作用させる場合, 30-40 塩基の標的配列を認識して切断させることが可能であり, 非常に高い特異性を持つ。また, TALEN のアミノ酸配列を改変することによって活性を高めた高活性型 TALEN (platinum TALEN) も開発されており, 種々の生物種での高効率のゲノム編集が報告されている [24]。また, ZFN に比べると格段に多様な標的配列を設定できることも TALEN を利用するうえで重要なメリットである。

TALEN の開発によりゲノム編集技術は, 多くの生物種への応用が始まったが, 依然としてツールの作製には煩雑な過程が必要であった。しかし, 2012 年に報告された第三世代のゲノム編集ツールである clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /CRISPR associated proteins (Cas) の開発 [25] によってこの状況は一変した。CRISPR/ Cas は, 細菌が持つ獲得免疫系を利用した技術である。真正細菌や古細菌は, ファージなどの外来 DNA が侵入すると, それを断片化し, 自らのゲノムの CRISPR 領域に取り込む。再び同様の外来 DNA が細菌に侵入すると, その CRISPR 領域が転写, 断片化され, 外来 DNA と相同配列を有する短鎖 ribo-nucleic acid (RNA) が生成される。短鎖 RNA は, ヌクレアーゼ活性を持つ Cas タンパク質と複合体を形成し, この複合体は, 新たに侵入してきた外来 DNA に結合し, その外来 DNA を切断する。この細菌が備えている外来 DNA を排除するシステムの短鎖 RNA (single guide RNA, sgRNA) と化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来の Cas9 ヌクレアーゼを利用して, 標的遺伝子を切断する技術が CRISPR/ Cas9 システムである。2013 年には CRISPR/Cas9 は, 哺乳動物細胞に利用できることが報告され [26, 27], 急速にその利用が広まった。このシステムは一般的な分子生物学的手法により構築が可能であるため, これまでの ZFN や TALEN に比べ格段に簡便に扱えるようになった。また, CRISPR/Cas9 を利用する形態は, プラスミド

DNA, メッセンジャーRNA (messenger RNA, mRNA), Cas タンパク質と sgRNA 複合体 (ribonucleoprotein, RNP) などの選択肢が豊富であり, 編集したい標的に合わせてその導入形態を選択することができる。

さて, ここまではゲノム DNA を切断する人工ヌクレアーゼ, いわゆるゲノム編集ツールについて説明してきたが, 実際にゲノムが書き換えられるのは, ゲノム DNA の切断後の修復過程で起こる。切断されたゲノム DNA は, そのままでは遺伝子が分断された状態となり致命的であるため, 細胞内では切断されたゲノム DNA は速やかに修復される。高確率で正確に修復される一方で, 修復のエラーが起こる場合がある。修復経路は, 主として非相同末端結合 (non-homologous end-joining, NHEJ) と HDR が存在する [28]。NHEJ は, 鋳型になる DNA に依存せず切断されたゲノム DNA 末端を結合するため, 修復箇所に微細な変異 (欠失や挿入および置換) が生じる。この変異によるフレームシフトやナンセンス変異が, タンパク質をコードする領域に生じれば, 元々コードされているタンパク質は正常に翻訳されず, 機能的に遺伝子が破壊される。そして複数の遺伝子を標的としてゲノム編集ツールを作製すれば, 複数遺伝子の同時破壊も可能である [29]。また, 外来遺伝子の挿入なしに標的遺伝子の機能を破壊できる点は, 品種改良を行う上でも大きな利点である。一方, トランスジェニック動物作製法でも前述した通り, HDR は鋳型 DNA を利用した DNA 修復機構である。標的遺伝子の配列と相同配列を持つドナーベクターを鋳型 DNA として導入することで, ドナーベクターが持つ変異や外来遺伝子を標的遺伝子領域へ取り込ませることができる。ゲノム編集ツールを利用したゲノム DNA の切断を伴う HR 法は, 前述したトランスジェニック動物作製における HR 法に比べて, DNA 修復機構を利用している特性上, 格段にドナーベクターを取り込む効率が高い。

これまでに示した通り, ゲノム編集ツールの特異性や効率は注目に値するが, 特筆すべきはその汎用性である。ゲノム編集ツールは, ゲノム配列情報が明らかにされている生物種であれば適用でき, これまでゲノムの改変が難しかった生物種でもゲノム編集が可能となった。また, ゲノム編集動物を作製する

上でも、前述したトランスジェニック動物を作製する技術である、マイクロインジェクション法、ウイルスベクター法およびES細胞法と組み合わせることにより様々な動物種を個体レベルでゲノム編集することができる。これまで、遺伝子改変が難しかったニワトリでもゲノム編集技術が利用されてきており、その利用が広まれば、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となると考えられる。

以上の観点から本研究では、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章ではゲノム編集技術をニワトリに適用する際の標的細胞として始原生殖細胞 (primordial germ cell, PGC) の培養法を検討し、低分子阻害剤を用いたニワトリ PGC の培養系を開発した。第2章では、ニワトリ PGC への遺伝子導入方法を検討し、いくつかの遺伝子を標的に CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子ノックアウト法の検討を行った。そして第3章では、CRISPR/Cas9 と共に新たに開発されたジーンターゲット法である precise integration into target chromosome (PITCh) 法をニワトリへ適用し、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

1-1 序論

近年、TALEN [21] や CRISPR/Cas9 [25]をはじめとしたゲノム編集技術が開発され、様々な動物種においてゲノム情報を自在に編集できるようになった。多くの生物種では、プラスミド DNA, mRNA, または RNP を一細胞期受精卵へマイクロインジェクション法により導入することでゲノム編集生物の作製が可能となった。しかし、ニワトリにおいては、体外受精法の報告は少なく [30, 31], 一細胞期受精卵を十分に準備するのが難しい。また、ニワトリの受精様式は、多精子受精であり、受精卵には複数の前核が形成されるため、前核へのゲノム編集ツールの注入は効率的ではなく、さらにニワトリの一細胞期受精卵の細胞質は、すでに豊富に卵黄を含んでおり、細胞質へのゲノム編集ツールの注入も効果的ではないため、マイクロインジェクション法によりゲノム編集ニワトリを作製するのは困難である。そこで、遺伝子改変ニワトリの研究は、生殖細胞の遺伝子改変に焦点が合わされており、*in vitro* および *in vivo* において、PGC を標的とした遺伝子導入法が研究されてきた [32]。遺伝子改変ニワトリの最初の報告は、レトロウイルスベクターを使用したものである。この報告は、ニワトリ胚から PGC を回収した後、*in vitro* でレトロウイルスベクターにより遺伝子導入し、それをレシピエント胚へ注入し、子孫を得るといったものだった [33]。続いて、培養 PGC を使用した遺伝子改変ニワトリの作製法が報告された。これらの報告は、トランスポゾン [34-36] や相同遺伝子組換え法 [37] を利用した非ウイルス性の遺伝子改変法である。最近では、オボアルブミンのノックアウトニワトリ [38] や、*chicken vasa homolog* (CVH) 遺伝子座に大きな欠失を含む緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) ノックインニワトリ [39] など、培養 PGC を標的細胞として TALEN を用い、ゲノム編集ニワトリを作製した報告がなされている。さらに、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集ニワトリの報告においても培養 PGC が用いられており、オボアルブミンおよびオボムコイドノックアウトニワトリ [40] や、免疫グロブリン重鎖遺伝子座に loxP 配列をノックインし、Cre リコンビナーゼを働かせて 20 kbp もの大き

な欠失を起こさせる研究 [41] など複数の報告がなされている。このように、培養 PGC を標的としたゲノム編集が基礎研究や応用研究で広く利用されるようになっており、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を示している。

ニワトリ PGC の培養技術は、2006 年に、leukemia inhibitory factor (LIF), fibroblast growth factor 2 (FGF2), そして stem cell factor (SCF) を用いて、*in vitro* で正常に増殖することが報告されたが [42], ニワトリ PGC の未分化状態を維持し、生殖細胞への分化能を保持したまま培養することは、困難であった [43]。2015 年には、ニワトリ PGC は、FGF2, インスリンおよび SMAD シグナルを活性化することにより *in vitro* で生殖系列への分化能を保持したまま培養できることが報告された [44]。

マウスでは、PGC は、発生過程の胚体外外胚葉で最初に観察され、胚発生に伴い、腸壁に沿って将来生殖腺になる生殖隆起へ移動する。生殖隆起へ到達した PGC は、生殖腺のストローマ細胞と相互作用することにより、PGC の特性を維持しながら増殖する。ニワトリにおいて PGC は、初期胚発生時に CVH 陽性細胞として胚盤葉の中心に観察され、原始線条の形成に伴い胚体外組織である生殖三日月環へ移動する [45]。続いて、PGC は生殖三日月環から背部大動脈へ入り、血流を循環して生殖隆起へ到達する。このように、移動経路に違いはあるものの、生殖細胞の移動はマウスおよびニワトリにおいて共通な現象である。マウス PGC は、この移動経路から脱落してしまった場合、速やかにアポトーシスを引き起こすことが知られており [46], また、*in vitro* の培養系においても急速なアポトーシスを引き起こすという報告がある [47]。さらに、培養ニワトリ PGC は、カスパーゼ 3 やカスパーゼ 9 などのアポトーシス関連タンパク質が活性化されており、その活性化が epidermal growth factor (EGF) により部分的に阻害されることが報告されている [48]。

これらのことから、ニワトリ PGC 培養系においてアポトーシスシグナルの関連因子を阻害することで、その増殖が亢進され、培養系が安定すると仮定した。そこで本研究では、アポトーシスシグナル関連因子を阻害する低分子阻害

剤の添加が *in vitro* でニワトリ PGC の増殖に寄与し、培養系が安定するかどうかを調査した。

1-2 材料と方法

(1) 供試動物

本研究で使用した受精卵およびニワトリは、産卵直後の未培養の受精卵を、黄斑プリマスロック種 (Barred Plymouth Rock, BPR) は祓川エッグファーム (Fukuoka, Japan), 白色レグホーン種 (White Leghorn, WL) は株式会社アキタ (Fukuyama, Japan) より購入し、広島大学大学院統合生命科学研究科附属瀬戸内圏フィールド科学教育研究センター西条ステーション (農場) の隔離された施設で維持した。また、本研究の実験方法は、広島大学の動物管理委員会により承認された (承認番号 C16-23-3)。

(2) ニワトリ PGC の分離と培養

PGC を含むニワトリの胚全血サンプルは、Hamburger and Hamilton (HH) のステージ 13-15 [49] の BPR 胚より回収した。各個体の胚血液は個別に扱い、回収した胚血液は、500 μ L の後述する PGC 培養用培地に分散させた。PGC 培養用培地は、Whyte らの PGC 培養用培地 [44] にいくつかの変更点を加えて用いた。PGC 培養用培地は、1 \times B-27 supplement, minus vitamin A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% chicken serum (Thermo Fisher Scientific), 1 \times EmbryoMax nucleosides (Merck, Darmstadt, Germany), 1 \times GlutaMAX supplement (Thermo Fisher Scientific), 1 \times MEM non-essential amino acid solution (Thermo Fisher Scientific), 0.5 mM StemSure モノチオグリセロール溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), 1 \times antibiotic-antimycotic mixed stock solution (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), 10 ng/mL human FGF2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), 1 unit/mL heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (Merck), そして 25 ng/mL human/mouse/rat activin A (PeproTech) 含 KnockOut DMEM (Thermo Fisher Scientific) を用いた。PGC を含む全血サンプルは、支持細胞を含まない 24 ウェルプレートに播種し、38 度, 5% CO₂, および 3% O₂ 条件下で培養した。PGC を含む培養胚全血は、2-4 日おきに、PGC の増殖に合わせて継

代し、凍結保存は、STEM-CELLBANKER (Nippon Zenyaku Kogyo, Fukushima, Japan) を用いて-80 度で保存した。安定的に増殖した PGC は、その一部を用いて、Fridolfsson らの手法 [50] を用いて性染色体の識別を行った。

(3) 培養ニワトリ PGC への低分子阻害剤処理

第 1 章の材料と方法 (2) の方法で培養し、安定的に増殖した PGC は、0.0-2.0 μM の (-)-blebbistatin (以下 blebbistatin), H1152 dihydrochloride (以下 H1152), そして Z-VAD(OMe)-FMK (mixture of isomers) (以下 Z-VAD) (すべて Wako Pure Chemical Industries) を添加した培地にて培養した。培養開始時の PGC 数は、96 ウェルプレート 1 ウェルあたり 250 cells に調整し播種した ($n=3$)。低分子阻害剤を添加し培養した PGC の生細胞数は、代謝活性のある細胞に由来する ATP を定量することで、培養中の生存細胞数を決定できる CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega, Madison, WI, USA) を使用した。本キットをマニュアルに従い使用し、その発光シグナルは、マルチラベルリーダー 2030 ARVO X4 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて測定し、PGC 数を決定した。培養した PGC の倍化時間は、オンラインで入手可能なアルゴリズムを使用して算出した (www.doubling-time.com)。

(4) flowcytometry (FCM) 解析によるカスパーゼ活性化の検出

ニワトリ PGC 培養培地におけるサイトカインおよび低分子阻害剤の PGC 培養系において起こるアポトーシスに与える影響を確認するために、FAM-FLICA caspase 3 & 7 assay kit (ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, MN, USA) を用いて FCM 解析を行った。各培養条件にて 4 時間培養したニワトリ PGC を 1×10^6 cells 準備し、また、コントロールとして紫外線照射によりアポトーシスを誘導した PGC も同様に準備した。方法は、キット添付マニュアルに従い、活性化したカスパーゼ 3/7 を蛍光染色した。染色した細胞は、FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて測定し、得られた測定結果は、CellQuest (Becton Dickinson) 解析ソフトを用いて解析した。

(5) ZsGreen1 遺伝子発現レンチウイルスベクターの作製

pLV5IN-EF1alpha-IRES-ZsGreen1 ベクター (Takara Bio, Shiga, Japan) より, In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio) をマニュアルに従い使用し, internal ribosome entry site (IRES) 配列を除去した。この様にして作製した pLV5IN-EF1alpha-ZsGreen1 ベクターは, Competent Quick DH5 α (Toyobo, Osaka, Japan) へ形質転換し, EndoFree plasmid maxi kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製した。レンチウイルス粒子の作製は, Lenti-X packaging single shots system (Takara Bio) を使用し, Lenti-X 293T 細胞 (Takara Bio) へ精製した pLV5IN-EF1alpha-ZsGreen1 ベクターを遺伝子導入して作製した。簡単に説明すると, Lenti-X 293T 細胞は, 8 mL の FreeStyle293 expression medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞培養ディッシュ (直径 100 mm) に約 80%コンフルエントになるまで培養した。また, プラスミドベクターと遺伝子導入試薬混合物の調整は, 30 μ g の pLV5IN-EF1alpha-ZsGreen1 ベクターを含む 600 μ L の蒸留水を Lenti-X packaging single shots system の 1 ウェルに添加し, 室温 (20~25 度) で 10 分間, 静置した。そして, Lenti-X 293T 細胞への遺伝子導入は, この混合物を細胞培養ディッシュに滴下し, 穏やかに揺り動かして混合し行い, 遺伝子導入した Lenti-X 293T 細胞は, 37 度, 5% CO₂ 条件下で 6 時間インキュベートした後, 新しい FreeStyle293 expression medium へ培地交換した。続いて, レンチウイルス粒子を含む培養上清の回収は, 遺伝子導入した Lenti-X 293T 細胞をさらに 72 時間インキュベートし, その培養上清を回収し, 培地中のレンチウイルス粒子の有無の確認は, Lenti-X GoStix (Takara Bio) を用いて確認した。回収したレンチウイルス粒子を含む培養上清は, Lenti-X concentrator (Takara Bio) を用いて 100 倍に濃縮しレンチウイルス溶液とし, 濃縮したレンチウイルス溶液は, 分注し, 使用するまで -80 度で保存した。

(6) レンチウイルスベクターを用いたニワトリ PGC への遺伝子導入

ニワトリ PGC への遺伝子導入は, 第 1 章の材料と方法(4)で作製した ZsGreen1

発現レンチウイルス溶液を使用して行った。簡単に説明すると、まず、 1×10^6 cells の PGC を $0.25 \mu\text{M}$ blebbistatin を添加した PGC 培養用培地を用いて、細胞培養ディッシュ（直径 100 mm）で培養した。Polybrene 溶液（Merck）は、最終濃度 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるようにこの細胞培養ディッシュに加え、穏やかに混合した。PGC へのレンチウイルス溶液の添加は、解凍したレンチウイルス溶液（力価 100 multiplicity of infection）を、同細胞培養ディッシュに $200 \mu\text{L}$ 滴下し、穏やかに揺り動かし均質にした。ウイルスを感染させた PGC は、一晚培養した後、培地を新しい PGC 培養用培地に交換し、続けて 1 週間培養した。ZsGreen1 陽性 PGC クローニングは、レンチウイルスにより遺伝子導入した PGC のうち ZsGreen1 陽性のものを、ガラスキャピラリーによりピックアップし、ピックアップした PGC を限界希釈によりクローニングした。そして、クローニングした PGC は、免疫蛍光染色により分析し、生殖細胞特異的マーカーである CVH および多能性マーカーである NANOG の発現を維持していることを確認した。

(7) 免疫蛍光染色

培養した PGC を収集およびペレット化し、1%ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin, BSA; Thermo Fisher Scientific）を含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（phosphatebuffered saline, PBS; Nissui-Pharmaceutical, Tokyo, Japan）で 3 回洗浄した。洗浄は、緩衝液で細胞を懸濁後、毎回 $100 \times g$ で 5 分間遠心分離し、細胞と緩衝液を分離した。細胞の固定は、4%パラホルムアルデヒド含有 PBS を洗浄した細胞へ添加し、室温（20-25 度）で 30 分間静置し行った。次に、細胞の透過処理は、固定処理した細胞を、1 mM グリシン（Wako Pure Chemical Industries）/1%BSA-PBS で洗浄し、洗浄した細胞へ 0.1% Triton-X 100（Nacalai Tesque）/PBS を添加および懸濁し、室温（20-25 度）で 5 分間静置し行った。透過処理後、一次抗体反応は、細胞を 1%BSA/PBS で再度 3 回洗浄し、洗浄後の細胞へ抗 CVH マウスモノクローナル抗体（ハイブリドーマ上清）[51] または抗ニワトリ NANOG ウサギポリクローナル抗体（1:50）[51]を含む 1%BSA-PBS を添加し、37 度で 1 時間静置し行った。二次抗体反応後は、一次抗体反応後、細胞を 1%

BSA/PBS で 3 回洗浄し、洗浄後の細胞へ Alexa 594 標識抗ウサギ IgG (H+L) ヤギ抗体 (1:100; Thermo Fisher Scientific) または Alexa 594 標識抗マウス IgG (H+L) ヤギ抗体 (Thermo Fisher Scientific) を含む 1%BSA-PBS を添加し、37 度で 1 時間静置し行い、その後、1%BSA/PBS で再び 3 回洗浄した。染色された細胞は、VECTASHIELD mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を添加し懸濁後、倒立蛍光顕微鏡 (BX51; Olympus, Tokyo, Japan) によりその蛍光を観察した。

(8) キメラニワトリの作出

キメラニワトリの作出用 PGC は、2% chicken serum を含む KnockOut DMEM を使用して 2500 cells/ μ L に調製した。レシピエント胚への PGC の打ち込みは、2500 cells/ μ L に調整した PGC (2 μ L) を、3 Gy のガンマ線を照射した Eyal-Giladi and Kochav (EGK) ステージ X [52] の WL レシピエント胚の胚盤葉下腔に注入し行った。PGC を注入した EGK ステージ X のレシピエント胚は、Perry により報告されたニワトリ胚の卵殻外培養法 [53] を用いて孵化させた。簡単に説明すると、PGC を移植した胚は、代理卵殻に移し、卵白を充填した後、透明なラップで密封した。この胚は、38 度、相対湿度 60% で 3 日間培養した (システム II)。3 日間培養した胚は、再び大きな代理卵殻に移し、透明なラップで密封し、38 度、相対湿度 60% で、さらに 4 日間、または孵化するまで培養した (システム III)。生殖腺の単離は、システム III の培養開始から 4 日後に剖検により行った。生殖腺の観察は、PBS で洗浄後、蛍光実体顕微鏡 (SZX12, Olympus) を用いて行った。

(9) 後代の作出

人工授精による交配は、(8) の方法により作出されたキメラの雄鶏より採精し、野生型の BPR 雌鶏の卵管へと注入し行った。得られた後代の由来する PGC の判定は、黒 (BPR 色) であればドナー由来、黄色 (WL 色) であればレシピエント由来と判定した。

1-3 成績

(1) ニワトリ PGC 培養系における低分子阻害剤の効果の検証

オスのニワトリ PGC へのアポトーシスシグナル関連因子の低分子阻害剤の影響は、3つの低分子阻害剤 (blebbistatin, H1152, および Z-VAD) を培地に添加し培養した後、その増殖活性を測定した。本実験で使用した 0.25, 0.5, 1.0, および 2.0 μM の4つの濃度の中で、PGC の増殖を亢進するのに最も効果的だった濃度は、blebbistatin および H1152 は 0.25 μM , Z-VAD は 0.5 μM であった (図 1)。低分子阻害剤による 10 日間の刺激培養期間に各低分子阻害剤によって誘導された細胞数のうち、最も多かった細胞数は、培養開始時の細胞数である 250 cells から blebbistatin は $4.21 \times 10^5 \text{ cells} \pm 0.23 \text{ cells}$ (図 1a), H1152 は $2.68 \times 10^5 \text{ cells} \pm 0.12 \text{ cells}$ (図 1b), および Z-VAD は $2.50 \times 10^5 \text{ cells} \pm 0.12 \text{ cells}$ (図 1c) に達した。これらの細胞数は、低分子阻害剤を添加せずに培養した細胞数と比較して blebbistatin は 3.84 倍 (図 1a), H1152 は 2.45 倍 (図 1b), そして Z-VAD は 2.28 倍 (図 1b) の増加であった。倍化時間について言及すると、低分子阻害剤を添加せずに培養した PGC は 1.16 日で倍化したのに対し、blebbistatin を用いて培養した PGC は 0.81 日, H1152 および Z-VAD で培養した PGC は 0.90 日で倍化した。PGC の生存と増殖に関するこれらの結果は、低分子阻害剤の使用が PGC の増殖能力を効率的に促進することを示唆している。

(2) ニワトリ PGC 培養系におけるカスパーゼ活性化の検出

第 1 章の成績 (1) において PGC 培養系においてブレベリグを伴うアポトーシス関連因子の阻害剤が有効であることが示されたため、アポトーシスは、PGC 培養系の中でどれほど起こっているのか、FCM 解析により検出を試みた。検出したのは、エフェクター (実行型) カスパーゼであるカスパーゼ 3/7 である。その結果、紫外線照射によりアポトーシスを誘導した雄 PGC では、52.28% がカスパーゼ 3/7 の活性化が起こっており、この実験系においてアポトーシスの誘導と検出ができることが示された (図 2a)。培養培地にインスリン、

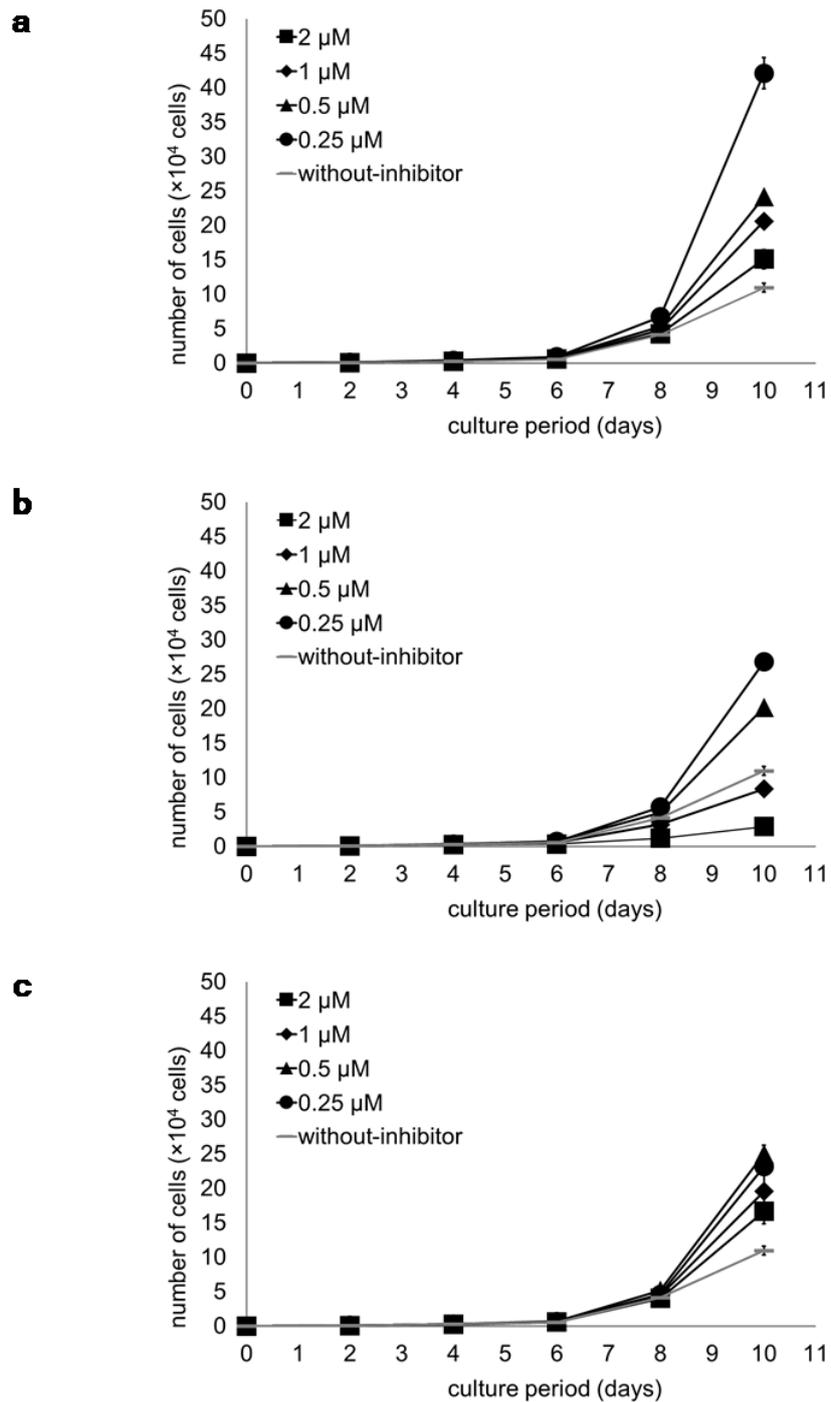


図1. 低分子阻害剤を添加した培地におけるニワトリ primordial germ cell (PGC) の増殖

ニワトリ PGC は、0.25-2.0 μM の blebbistatin (a), H1152 (b), および Z-VAD (c) を含む培地で培養し、その細胞数をモニタリングした (n=3)。

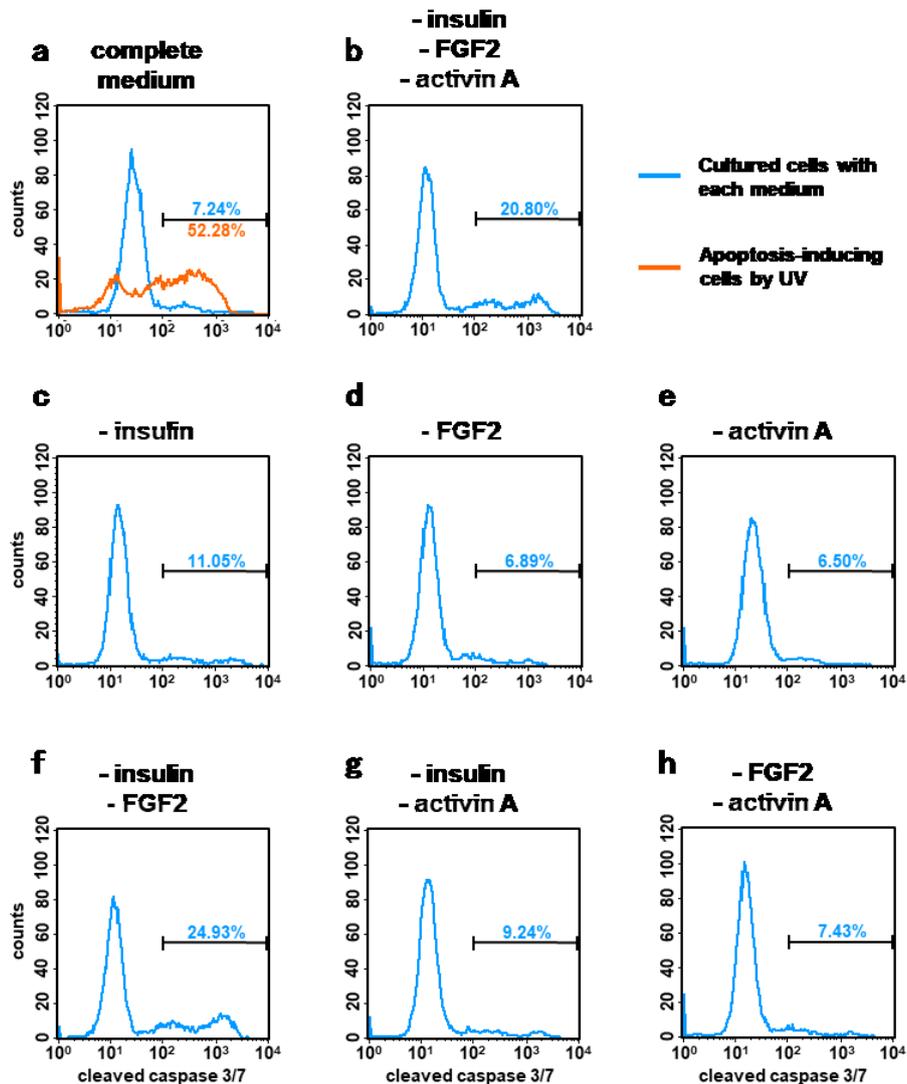


図2. 培養雄ニワトリ primordial germ cell (PGC) 培養系におけるカスパーゼ3/7の活性化

培養雄ニワトリPGCにおけるカスパーゼ3/7の活性化は、フローサイトメトリーにより解析した。ポジティブコントロールには、紫外線照射によりアポトーシスを誘導した雄PGCを供試した。解析サンプルには、培養培地にインスリン、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、およびactivin Aの3種類のサイトカインを添加した完全培地と、完全培地から1種、2種、または3種のサイトカインを除いた培地により4時間刺激した雄PGCを用いた。

FGF2, および activin A を添加して培養した雄 PGC は, 7.24%の細胞がカスパーゼ 3/7 を活性化していた (図 2a) のに対し, 3つのサイトカインを添加せずに培養した雄 PGC では, 20.80%の細胞において, カスパーゼ 3/7 の活性化が起こっていた (図 2b)。また, PGC 培養培地より1つのサイトカインを除いた条件におけるカスパーゼ 3/7 の活性化は, PGC 培養培地よりインスリンを除いた培地では 11.05% (図 2c), FGF2 を除いた培地では 6.98% (図 2d), activin A を除いた培地では, 6.50% (図 2e) の細胞で起こっていた。さらに, PGC 培養培地より2つのサイトカインを除いた条件におけるカスパーゼ 3/7 の活性化は, インスリンと FGF2 を除いた条件では 24.93% (図 2f), インスリンと activin A を除いた条件では 9.24% (図 2g), FGF2 と activin A を除いた条件では 7.43% (図 2h) の細胞で起こっていた。

同様に, 雌 PGC において培養系の中でどれほどアポトーシスが起きているのかを検出した。その結果, 紫外線照射によりアポトーシスを誘導した雌 PGC では, 49.16%がカスパーゼ 3/7 の活性化が起こっており, 雄 PGC と同様に, この実験系においてアポトーシスの誘導と検出ができることが示された (図 3a)。培養培地にインスリン, FGF2, および activin A を添加して培養した雌 PGC は, 7.52%の細胞がカスパーゼ 3/7 を活性化していたのに対し (図 3a), 3つのサイトカインを添加せずに培養した雌 PGC では, 26.85%の細胞は, カスパーゼ 3/7 の活性化が起こっていた (図 3b)。また, PGC 培養培地より1つのサイトカインを除いた条件におけるカスパーゼ 3/7 の活性化は, PGC 培養培地よりインスリンを除いた培地では 17.89% (図 3c), FGF2 を除いた培地では 10.81% (図 3d), activin A を除いた培地では, 7.83% (図 3e) の細胞で起こっていた。さらに, PGC 培養培地より2つのサイトカインを除いた条件におけるカスパーゼ 3/7 の活性化は, インスリンと FGF2 を除いた条件では 30.61% (図 3f), インスリンと activin A を除いた条件では 16.48% (図 3g), FGF2 と activin A を除いた条件では 10.51% (図 3h) の細胞で起こっており, 全体的に雄 PGC におけるカスパーゼが活性化された細胞の割合と比較して高い割合を示した。

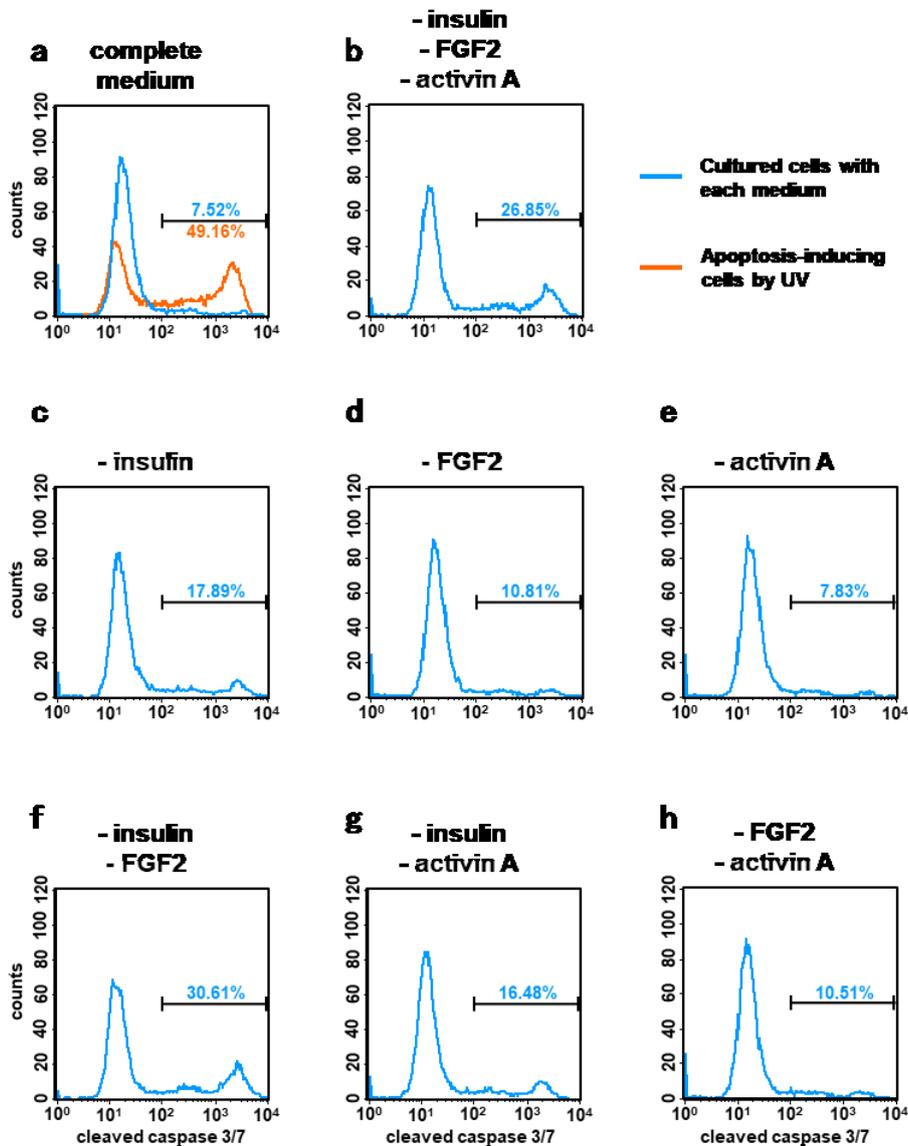


図3. 培養雌ニワトリ primordial germ cell (PGC) 培養系におけるカスパーゼ3/7の活性化

培養雌ニワトリ PGC におけるカスパーゼ3/7の活性化は、フローサイトメトリーにより解析した。ポジティブコントロールには、紫外線照射によりアポトーシスを誘導した雌PGCを供試した。解析サンプルには、培養培地にインスリン、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、およびactivin Aの3種類のサイトカインを添加した完全培地と、完全培地から1種、2種または3種のサイトカインを除いた培地により4時間刺激した雌PGCを用いた。

興味深いことに、雄雌共に、3つのサイトカインを除いた条件よりもインスリンと FGF2 を除いた条件の方が、アポトーシスを起こす細胞の割合が多く、activin A の必要性に疑問符が付く結果となった。そこで続いて、インスリンと FGF2 を含む PGC 培養培地に、activin A と第 1 章の成績 (1) にて有効性が確認された低分子阻害剤を添加し、PGC を培養し、カスパーゼ 3/7 の活性化を FCM により解析した。その結果、雄 PGC では、3つのサイトカインを添加した培養条件では、6.34%の割合でカスパーゼ 3/7 の活性化が起こっており (図 4a)、0.2 μ M blebbistatin と 0.2 μ M H1152 を添加することにより、5.30%と僅かではあるがカスパーゼ 3/7 の活性化は抑えられた (図 4c)。また、PGC 培養培地より activin A を除いた培地で培養した雄 PGC では、6.08%の割合でカスパーゼ 3/7 が活性化されており (図 4d)、0.2 μ M blebbistatin と 0.2 μ M H1152 を添加することにより、4.71%と僅かではあるが、さらにカスパーゼ 3/7 の活性化は抑えられた (図 4f)。

同様に、雌 PGC における activin A と低分子阻害剤のアポトーシスに与える影響を試験したところ、雌 PGC では、3つのサイトカインを添加した培養条件では、9.67%の割合でカスパーゼ 3/7 の活性化が起こっており (図 5a)、0.2 μ M blebbistatin と 0.2 μ M H1152 を添加することにより、8.45%と僅かではあるがカスパーゼ 3/7 の活性化は抑えられた (図 5c)。また、PGC 培養培地より activin A を除いた培地で培養した雌 PGC では、7.73%の割合でカスパーゼ 3/7 が活性化されており (図 5d)、0.2 μ M blebbistatin と 0.2 μ M H1152 を添加することにより、9.40%と僅かではあるが、カスパーゼ 3/7 の活性化細胞の割合は増加した (図 5f)。これらの結果より、activin A の添加は、カスパーゼ 3/7 の活性化という観点から見ると、必要性は無く、雄 PGC における blebbistatin と H1152 の組み合わせは、僅かではあるもののカスパーゼ 3/7 の活性化を抑え、培養系を安定化できる可能性が示唆された。

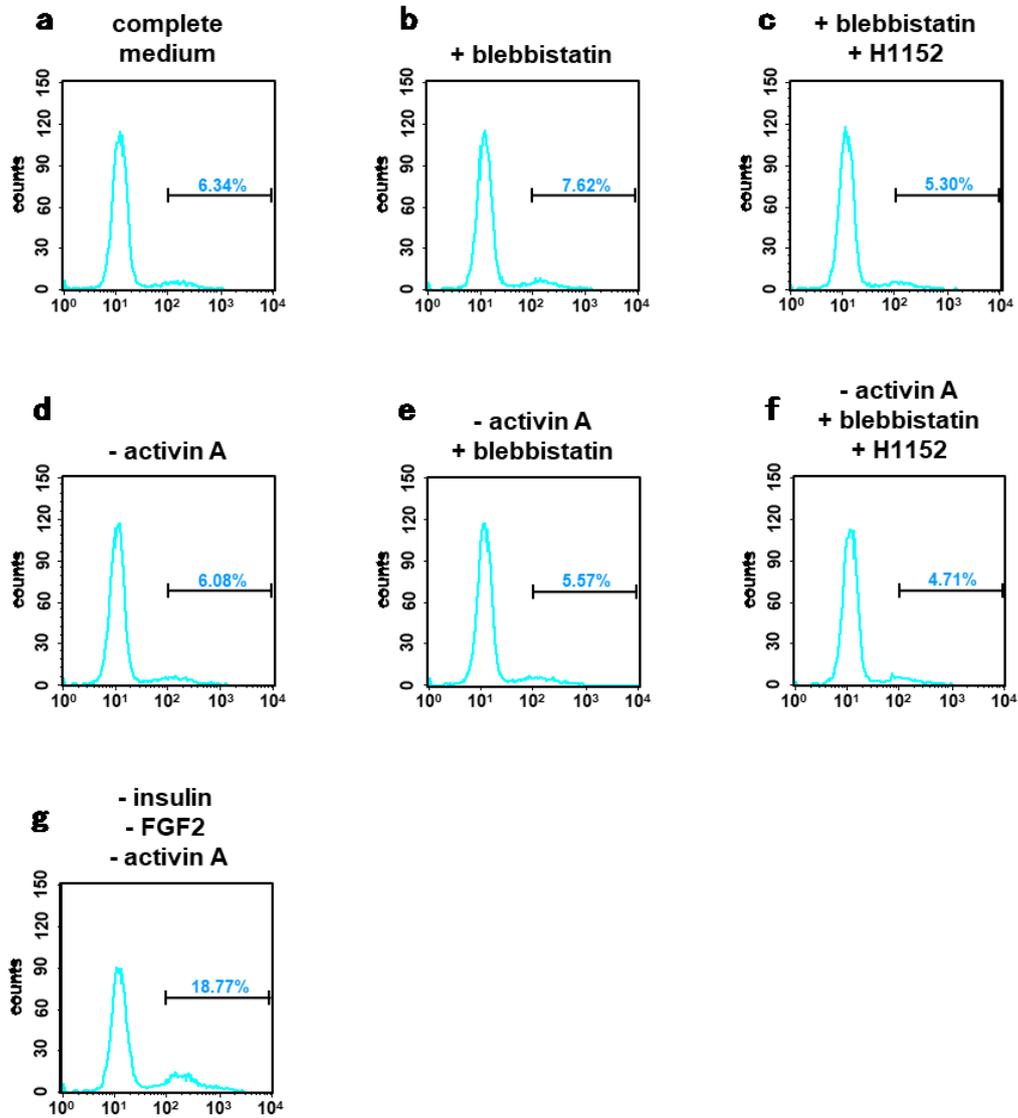


図4. 培養雄ニワトリ primordial germ cell (PGC) 培養系における activin A および低分子阻害剤のカスパーゼ3/7活性化に与える影響

培養雄ニワトリ PGC におけるカスパーゼ3/7の活性化は、フローサイトメトリーにより解析した。解析サンプルには、培養培地にインスリン、FGF2、および activin A の3種類のサイトカインを添加した完全培地と、完全培地から activin A を除いた培地および $0.2 \mu\text{M}$ blebbistatin, $0.2 \mu\text{M}$ H1152 を添加した培地により4時間刺激した雄 PGC を用いた。

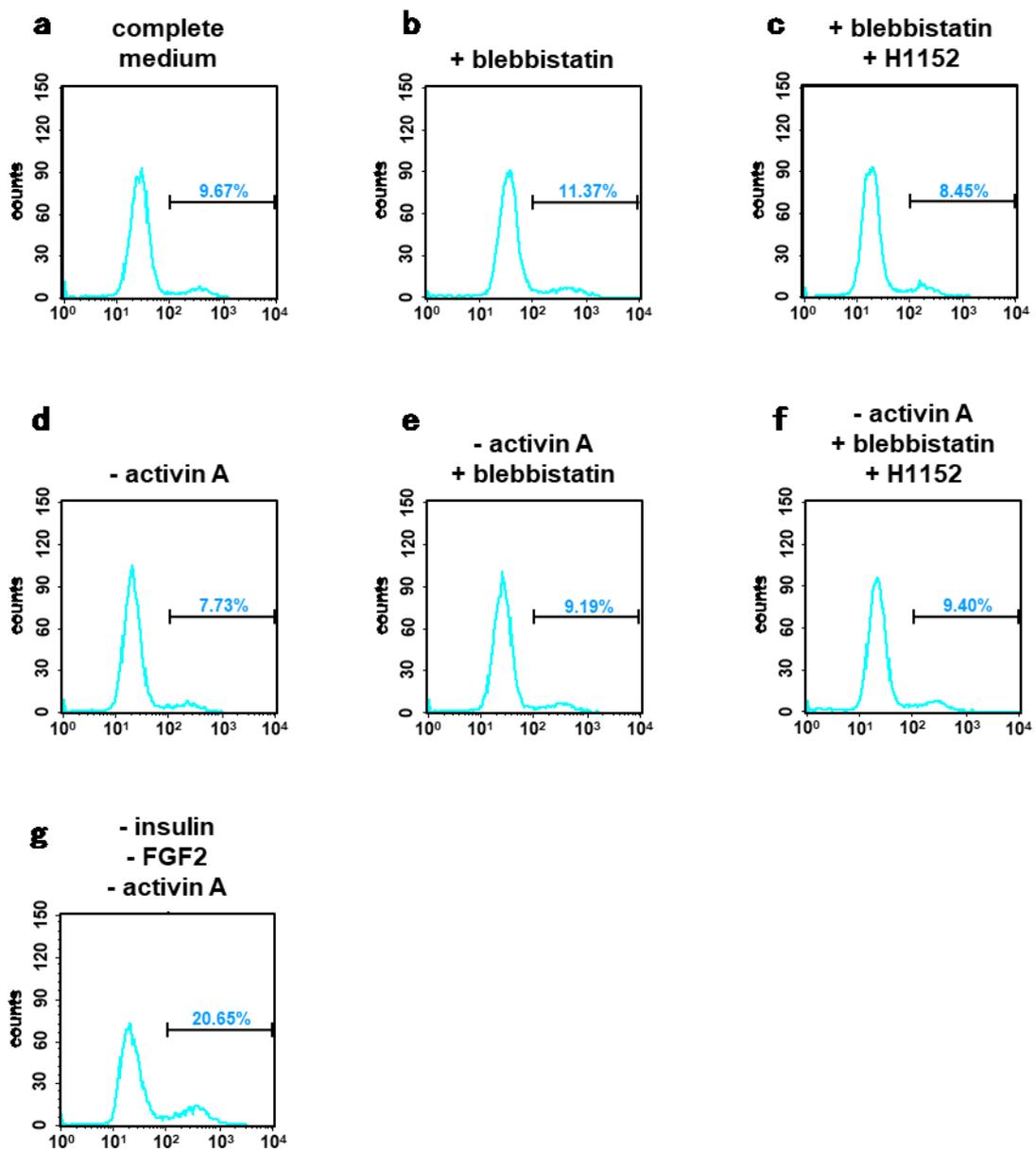


図5. 培養雌ニワトリ primordial germ cell (PGC) 培養系におけるactivin Aおよび低分子阻害剤のカスパーゼ3/7活性化に与える影響

培養雌ニワトリPGCにおけるカスパーゼ3/7の活性化は、フローサイトメトリーにより解析した。解析サンプルには、培養培地にインスリン、FGF2、およびactivin Aの3種類のサイトカインを添加した完全培地と、完全培地からactivin Aを除いた培地、および0.2 μ M blebbistatin, 0.2 μ M H1152を添加した培地により4時間刺激した雌PGCを用いた。

(3) 培養ニワトリ PGC の *in vitro* および *in vivo* における特性評価

HH ステージ 13-15 の雄胚血液から得られたニワトリ PGC は、blebbistatin を添加した PGC 培養用培地を用いて培養した。長期 (28 日) 培養された PGC は、多数のグリコーゲン顆粒と多くの脂肪小滴が観察され、典型的な PGC の特徴を有していた (図 6a, b)。また、培養 PGC は、適切な増殖率を維持するために 2-4 日ごとに継代培養し、凍結保存および、その後の再培養後も、同じ特徴を維持することが確認された。PGC 培養の成功率は、約 50~60% であり、本研究で使用した培養 PGC の性染色体型は、ZZ であった。

次に、ニワトリ培養 PGC への形質転換は、ZsGreen1 蛍光タンパク質の発現カセットを有するレンチウイルスベクターにより行い、ZsGreen1 を発現する PGC クローンは、限界希釈によるクローニングにより取得した。この ZsGreen1 を発現する PGC クローンは、PGC の特性を維持しているかを分析するために、免疫蛍光染色により、生殖細胞特異的マーカーである CVH および多能性マーカーである NANOG の発現を分析した。その結果、蛍光顕微鏡による観察により、レンチウイルスベクターにより形質転換した PGC クローンは、ZsGreen1 を発現しており (図 6d, h)、また CVH は、PGC の細胞質で検出され (図 6e, f)、NANOG は、PGC の核で検出された (図 6i, j)。

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確認するために、移植実験は、BPR 由来である ZsGreen1 を発現する PGC クローンをドナー細胞とし、WL 由来のレシピエント胚に注入して行った。移植実験を行った胚では、7 日間の培養後、生殖腺に多くの ZsGreen1 陽性細胞が観察された (図 6k, l)。

(4) 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

ドナー細胞として用いた培養ニワトリ PGC がレシピエント生殖腺で機能的配偶子に分化できることを実証するために、移植実験は、雄の BPR 由来の培養 PGC (5000 cells) を EGK ステージ X の WL 胚レシピエントの胚盤葉下腔に注入し行った。キメラニワトリによる後代の作出は、移植実験にて作製したキメ

ラ胚を孵化させ、性成熟まで飼育し、そして野生型の BPR 雌鶏と交配し行った。その結果、BPR の子孫は、キメラニワトリの精子を人工授精した BPR 雌鶏から得られ (図 7a)、長期間 (177 日) 培養された PGC を使用した場合でも効率は高かった (93%) (図 7b)。この結果は、blebbistatin を含む培地で長期間維持された PGC が生殖系列伝播能を有していることを示している。

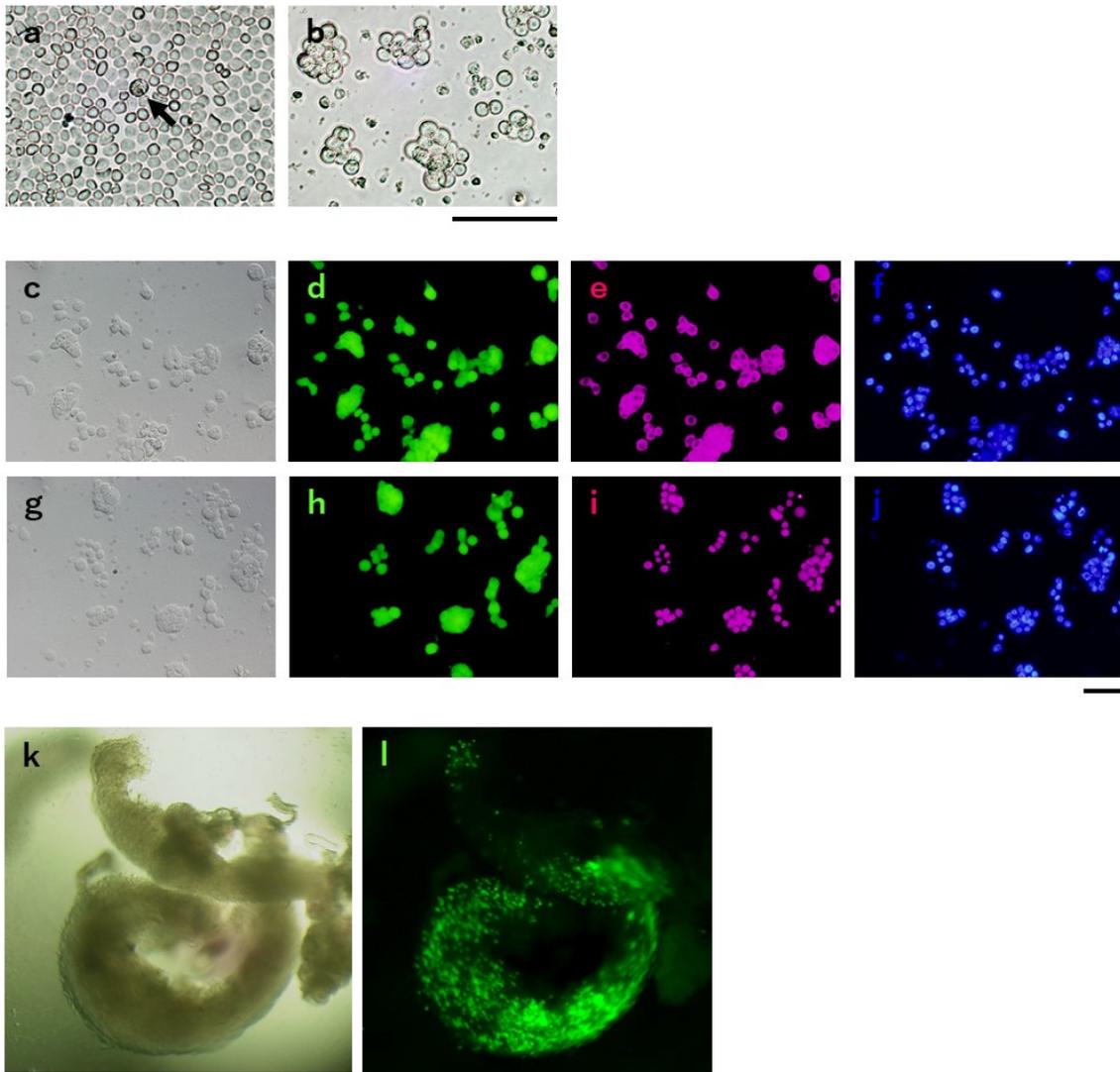


図6. blebbistatinを用いて培養したprimordial germ cell (PGC) の特性評価

ニワトリPGCを含むニワトリ全血サンプルは、ステージ13~15の黄斑プリマ
スロック胚から採取し、blebbistatinを含むPGC培養用培地に分散させた (a, 矢印は
PGC)。(b)はblebbistatinを含む培地にて28日間培養されたニワトリPGCを示す。
(c-j)に0.25 μ Mのblebbistatinを含む培地にて75日間培養されたニワトリPGCの
chicken vasa homolog (CVH) およびNANOGの免疫蛍光染色像を示した。培養
PGCは、典型的なPGCの形態を維持しており (c, g), レンチウイルスベクターに
より形質転換されたZsGreen1を発現していた (d, h)。このニワトリPGCは、抗
CVHモノクローナル抗体 (e) およびNANOGポリクローナル抗体 (i) を用いた
免疫蛍光染色に供試し、細胞核は4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; f, j) を用い
て可視化した。(k, l)はZsGreen1陽性ニワトリPGCの移植実験を行ったキメラ
ニワトリの生殖腺を示している。ステージXのレシピエント胚への移植実験は、
0.25 μ M blebbistatinを用いて80日間培養したPGCを用いて行い、その7.5日胚の
生殖腺を観察した。(k)は7.5日胚の生殖腺の実体顕微鏡像および (l)は蛍光
顕微鏡像を示す。スケールバー, 100 μ m



b

Founder birds	Days in culture	Eggs set	Chicks hatched	PGC-derived offspring
#362	196	217	58 (27%)	13 (22%)
#7186	177	99	14 (14%)	13 (93%)
#7721	50	360	121 (34%)	92 (76%)

図7. blebbistatinを含む培地で増殖したニワトリ primordial germ cell (PGC) 由来の後代の作出

blebbistatinを含む培地を用いて培養した雄のニワトリPGCは、キメラニワトリの作製へ供試した。後代は、性成熟後、キメラニワトリの精子を用いて野生型の黄斑プリマスロック (Barred Plymouth Rock, BPR) 雌鶏へ人工授精を行って作出した (a)。また同様に、BPR雌鶏からドナーPGC由来の子孫が出現する頻度 (生殖系列伝播の頻度) は、表に示した (b)。

1-4 考察

生殖細胞系列に寄与することができる細胞の培養は、遺伝子改変およびゲノム編集ニワトリの作製、ならびに家禽の遺伝資源の保護および管理にとって重要である。ニワトリの遺伝子改変が成功した最初の報告例は、生殖三日月環または胚血液から収集されたニワトリ PGC を、ウイルスベクターで形質転換し、レシピエント胚に移植するという方法だった [33]。それ以来、ニワトリ PGC は、ES 細胞とともに、遺伝子改変ニワトリの作製法の標的細胞となっている。今日まで、PGC 培養システムは、液性因子と細胞間相互作用によって維持されている鶏卵内での PGC ニッチの再構築に焦点を合わせているのに対し、本研究のアプローチは、PGC がニッチにないときに発生するアポトーシスシグナル伝達の阻害に焦点を当てている。同様の原理に基づく培養法は、霊長類 ES 細胞および人工多能性幹 (induced pluripotent stem, iPS) 細胞の維持のために開発されている。例えば、ヒト ES 細胞および iPS 細胞のアポトーシスは、細胞間接着の喪失によってブレベイング (ミオシン II の異常活性化による細胞運動) という現象を伴い誘導される。しかし、アポトーシスシグナル伝達経路の阻害剤を使用することで、これらの細胞は細胞間接着がなくても培養でき、クローニングを伴う細胞の均一化も可能である [54]。また、これらの細胞と同様に、ニワトリエピブラスト幹細胞 (epiblast stem cell, EpiSC) は、通常、クローニングすることはできないが、アポトーシスシグナル伝達阻害剤の使用により、クローニングが可能になる [51]。これらの細胞のアポトーシスは、異所性 PGC を排除するプロセスと同様に、エピブラスト層に組み込まれない細胞を排除するのに利用されている可能性がある [46]。

FGF2 シグナルおよびインスリン/insulin-like growth factor (IGF1) シグナルの活性化は、ニワトリ PGC の培養において必須とされている。この FGF2 は、マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (mitogen-activated protein kinase kinase, MEK) /細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase, ERK) シグナルを活性化する。また、インスリン/IGF1 は、Akt シグナルを活性

化し、これらのシグナルは、それぞれ PGC の自己複製に寄与している [44]。これらのシグナル伝達経路は、アポトーシス関連シグナルとクロストークしており、ERK および Akt シグナルの活性化は、抗アポトーシス活性を持つ B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) ファミリー (Bcl-2, Bcl-xL) を活性化し、なおかつアポトーシスを促進する Bcl-2 ファミリー (Bad, Bax) の活性化を抑制している。これらの Bcl-2 ファミリーへの作用は、ミトコンドリアからのシトクロム c の放出を防ぎ、カスパーゼの活性化を抑制している。さらに、ブレビングを伴うアポトーシスシグナルの Rho 関連プロテインキナーゼ (Rho-associated protein kinase, ROCK) は、ブレビングおよびカスパーゼの活性化を誘導するとともに、ホスファターゼおよびテンシンホモログ (phosphatase and tensin homolog, PTEN) を介して Akt および ERK を抑制する [55]。

本研究では、調査したすべての低分子阻害剤 (blebbistatin, H1152, および Z-VAD) が PGC の増殖活性を増加させることを示した。ミオシンに対して高い親和性および選択性を持つ阻害剤であるブレビスタチン [56] は、調査したすべての小分子阻害剤の中で最も効果的に PGC の増殖を誘導することが実証された。blebbistatin は、ミオシンアデノシン三リン酸加水分解酵素活性を阻害し、アクトミオシンベースの運動性を阻害する。この阻害は、アクトミオシン筋フィラメントを弛緩させ、ブレビングの抑制を含むいくつかの生物学的効果をもたらす。ブレビングは、アポトーシスの定義された特徴の 1 つであり、細胞骨格が破壊され、プログラム細胞死の際に膜が外側に膨らむ現象である。これらは断片化された細胞質 (断片化された核および細胞小器官を含む) を膨らませ、アポトーシス小体として細胞から分離する [57]。また、ミオシンの過剰活性化の上流にある ROCK の阻害も PGC の増殖能力の亢進に効果的だった。興味深いことに、シングルセルへと解離したヒト ES 細胞で観察された現象 [54] と同様に、ミオシンの過剰活性化を阻害することは、ニワトリ PGC 培養においてカスパーゼを阻害するよりも効果的だったが、そのメカニズムを解明することはできなかった。

本研究で低分子阻害剤の添加条件を検討するのに用いたニワトリ PGC 培養用の基礎培地には Whyte らの PGC 培養用培地 [44] を用いた。この報告では、ニワトリ PGC の自己複製において FGF レセプターからの MEK/ERK シグナル、インスリンレセプターや IGF1 レセプターからの Akt シグナル、そして、アクチビンレセプターからの SMAD2/3 および BMP レセプターからの SMAD 1/5/8 シグナルが重要であると示されている。これらのシグナルのうち、MEK/ERK シグナルは、FGF2 を用いて、Akt シグナルは、B-27 supplement に含まれるインスリンを用いて、SMAD シグナルは、Activin A を用いて活性化させ、PGC の自己複製を促している。

本研究では、各サイトカインの重要性を実行型カスパーゼであるカスパーゼ 3/7 の活性化により評価したところ、インスリンおよび FGF2 非添加条件は、添加条件と比較してカスパーゼ 3/7 を活性化し、この二つのサイトカインの PGC 生存における重要性が示された。また、activin A 添加、非添加条件では、カスパーゼ 3/7 の活性化に大きな差は無かった。activin A 等による SMAD シグナルの活性化は、重要ではあるが [44]、培地に含まれる血清成分やオートクライン等で、そのシグナルが補填されている可能性が示唆され、あえて培地に添加する必要性はないものと考えられる。また、培地成分への activin A の非添加と blebbistatin と H1152 の共添加は、雄ニワトリ PGC において僅かではあるがカスパーゼ 3/7 の活性化を抑えた。その差は、1.63%と僅かではあるが、PGC の刺激培養時間が 4 時間ということを考えると、長期培養において、その効果が PGC 培養系の安定化という形で現れたのではないかと考えている。

カスパーゼ 3/7 の活性化における雌雄差に着目すると、雌 PGC は、雄 PGC と比較してカスパーゼ 3/7 が活性化された細胞の割合が多かった。雌 PGC は、雄 PGC と比較して培養が難しいと言われており、雌 PGC のアポトーシスの起こしやすさがこの培養の難しさに関係しているのかもしれない。これらのことから、アポトーシスに注目してさらに培養系を改変することで、雌 PGC の培養系をさらに安定化することができる可能性がある。

また、blebbistatin を使用した培養法にて増殖させたニワトリ PGC は生殖腺に移動する能力を維持しており、それらの生殖系列伝播能は長期培養後も維持されていることが示された。本研究においてキメラニワトリが示したドナーPGC の生殖系列への高い寄与率は、培養法による PGC 特性の維持だけでなく、ガンマ線によるレシピエント胚の効果的な照射にも起因している可能性がある。さらに、低分子阻害剤を使用した PGC 培養システムは、BPR 以外の WL やロードアイランドレッドなどの他の鶏種でも利用できる（データは示していない）。この方法は、ニワトリだけでなく、遺伝資源として貴重な鳥類の保護および管理や、ウズラやキンカチョウなどの基礎生物学において広く使用されている鳥類にも適用できる可能性がある。

本章では、低分子阻害剤を使用し、ニワトリ PGC を培養するための新しい安定したプロトコルを開発した。本方法で培養したニワトリ PGC は、CVH と NANOG を発現することが示され、長期の継代培養にてその発現を維持することが確認された。さらに、これらの PGC をドナー細胞として用いた移植実験では、PGC は、レシピエント胚の生殖隆起へ移動し、キメラニワトリの発生と生殖系列伝播が可能であることが実証された。これらの結果は、低分子阻害剤が安定したニワトリ PGC 培養の維持に有用であり、将来の基礎研究および応用研究に使用されるニワトリのゲノム編集を、加速するのに役立つ可能性が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 CRISPR/Cas9 を 用いた遺伝子ノックアウト法の検討

2-1 序論

2010年に報告されたTALEN [21] や2012年に報告されたCRISPR/Cas [26-28] に代表されるゲノム編集技術は、特定のゲノムDNAを認識して核酸分解酵素により切断する技術である。この核酸分解酵素により切断されたゲノムDNAは、そのままでは遺伝子が分断された状態となり致命的であるため、速やかに修復されるが、この修復時に起きる修復ミスにより、遺伝子に変異が導入され、フレームシフトやナンセンス変異により遺伝子がノックアウトされる。またゲノム編集技術は、遺伝子のノックアウトだけでなく、相同配列を持つドナーベクターを共導入することで遺伝子のノックインも可能である [58]。さらに、核酸分解酵素の代わりに様々な機能的な人工因子を連結させることも可能となり [59, 60]、文字通り自在にゲノムを編集できる技術に進化している。このゲノム編集技術は、ライフサイエンスの分野において、欠かすことのできない技術に成りつつあるが、農業における品種改良や医療など様々な分野に変革をもたらしている。特にこの技術は、“ゲノムDNAの中の標的部位を高い精度で編集することにより特定の遺伝子が担う形質を改良、付加できる”という特性を持ち、品種改良に適した技術である。また、これまでの育種法である突然変異の誘導や有用種同士の交配と比較して、品種改良に要する期間を極端に短縮することも可能である。最近、筑波大学のグループによる、 γ -アミノ酪酸 (gamma amino butyric acid, GABA) を分解する酵素の遺伝子をゲノム編集によりノックアウトし、GABAを豊富に含むトマト[61]や、京都大学のグループによる、ミオスタチン遺伝子をゲノム編集によりノックアウトし、肉厚にしたマダイ[62]など、社会実装例が報告されている。

ゲノム編集技術の大きな特徴の一つは、微生物からヒトまで、あらゆる生物に適用できるという汎用性である。多くの動物では、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となっている。一方、ニワトリでは、一細胞期受精卵操作が成熟していないため [30, 31]、ゲノム編集技術の適用が遅れている。そこでニワトリでは、生殖細胞に分化可能な

PGC を *in vitro* で培養して、ゲノム編集が行われている。PGC の長期培養方法は、これまでに複数の方法が報告されており [42, 44], 培養した PGC に対してゲノム編集を施し、初期胚へ移植することでゲノム編集ニワトリが作出されている [38, 40]。しかし、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、これがニワトリにおけるゲノム編集の進展の妨げにになっている。特に遺伝子のノックインについては、その低さが顕著に表れる [39, 41, 65]。高度な組換えや困難な標的を効率よく編集するためには、根本的な組換え効率を改善する必要がある。

ニワトリ PGC でのゲノム編集において、その可否を左右する要因には、いかに高効率にゲノム編集ツールを PGC に導入できるかにかかっているが、どの方法が有効かは十分に検討されていないのが現状である。そこで本研究では、PGC における高効率なゲノム編集ツール導入方法の開発を目指し、陽イオン性リポソームに焦点を絞り、その効果を検証した。

2-2 材料と方法

(1) 供試動物

本研究で使用した受精卵およびニワトリは、第1章の材料と方法(1)と同様に、産卵直後の未培養の受精卵を、BPRは祓川エッグファーム、WLは株式会社アキタより購入し、広島大学大学院統合生命科学研究科付属瀬戸内圏ワールド科学教育研究センター西条ステーション(農場)の隔離された施設で維持した。また、本研究の実験方法は、広島大学の動物管理委員会により承認された(承認番号C16-23-3)。

(2) ニワトリ PGC の分離と培養

ニワトリ PGC の分離と培養は、第1章の材料と方法(2)に従って行い、その培養培地にいくつかの変更を加えた。簡単に説明すると、PGC 培養用培地は、1×B-27 supplement, minus vitamin A (Thermo Fisher Scientific), 1% chicken serum (Thermo Fisher Scientific), 1×EmbryoMax nucleosides (Merck), 1×GlutaMAX supplement (Thermo Fisher Scientific), 1×MEM non-essential amino acid solution (Thermo Fisher Scientific), 0.5 mM StemSure モノチオグリセロール溶液 (Wako Pure Chemical Industries), 1×antibiotic-antimycotic mixed stock solution (Nacalai Tesque), 10 ng/mL human FGF2 (PeproTech), 1 unit/mL heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (Merck), 0.2 μM blebbistatin, そして 0.2 μM H1152 (Wako Pure Chemical Industries) 含 KnockOut DMEM (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

(3) 培養ニワトリ PGC への遺伝子導入

遺伝子導入試薬は、Lipofectamine 2000 transfection reagent, Lipofectamine 3000 reagent (Thermo Fisher Scientific), および Viromer RED (Lipocalyx GmbH, Halle, Germany) を用いた。初回の実験では、各試薬の添付のマニュアルに従い、 2×10^5 cells の PGC (核型 ZZ, 継代数 85 回に統一) に対し、0.5 または 1.5 μg の

pBApo-EF1 α Pur DNA (Takara Bio) のマルチクローニングサイトに ZsGreen1 遺伝子を挿入した緑色蛍光タンパク質発現ベクター (ZsGreen1 発現ベクター, 5.6 kbp) の遺伝子導入を行った (以下, マニュアル法とする)。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 2×10^5 cells の PGC に DNA/遺伝子導入試薬複合体を加えて懸濁し 5 分間, 37 度で加温する条件も設定した (以下, ダイレクト添加法とする)。遺伝子導入した PGC は, 24 ウェルプレートへ播種し, 2 日後に蛍光顕微鏡 IX71 (Olympus) で蛍光観察を行った。遺伝子導入効率は, 倍化時間が一定でかつ同細胞数で条件を整えていることから, 培養器の任意の 4 ヶ所の蛍光細胞数をカウントし, その平均値で比較した。

また, Viromer RED を用いた導入条件の検討は, 以下に示す手順で行った。まず 0.5 または 1.5 μ g のプラスミド DNA を, buffer Red (キット添付) を用いて全量が 35 μ L になるように調製した (Tube 1)。別のチューブに 0.2, 0.6 μ L の Viromer RED を, buffer RED を用いて全量が 15 μ L になるように調整した (Tube 2)。Tube 1 と Tube 2 を DNA : 遺伝子導入試薬が 1.0 μ g : 0.4 μ L になる組み合わせで混合し, 室温で 15 分間加温した。その後, 上清を除去した 2×10^5 cells の PGC (核型 ZZ, 継代数 86 回) に DNA/遺伝子導入試薬複合体を加えて懸濁し, 10, 30, 60 分間, 37 度で加温した。加温後, PGC は 24 ウェルプレートへ播種し, PGC 培養用培地を用いて 38 度, 5% CO₂, 3% O₂ 環境下で培養した。ZsGreen1 を遺伝子導入した PGC は, 遺伝子導入から 2 日後に蛍光顕微鏡 IX71 を用いて観察した。遺伝子導入効率は, 前述した方法と同様に行った。

(4) CRISPR/Cas9 を用いた培養ニワトリ PGC のゲノム編集

本研究で使用した CRISPR/Cas9 発現ベクターは, ピューロマシン耐性遺伝子を付加した pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Plasmid #42230, Addgene, Cambridge, MA, USA) を用いて構築した。また, sgRNA は CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて設計した。標的とした遺伝子は *ovomuroid* (*OVM*, Gene ID: 416236), *hemogen* (*HEMGN*, Gene ID: 427378), *doublesex and mab-3 related transcription factor 1* (*DMRT1*, Gene ID: 769693) の 3 種類であり構築に使用した

オリゴヌクレオチドの配列は表 1 に示した。構築した CRISPR/Cas9 発現ベクター (9.8 kbp) は、前述した Viromer RED を用いて PGC (核型 ZZ, *OVM*: 継代数 10 回, *HEMGN*: 継代数 20 回, *DMRT1*: 継代数 46 回) へ遺伝子導入し、導入 2 日後に 1-2 $\mu\text{g/mL}$ のピューロマイシンによる薬剤選択を開始した。薬剤選択を行った細胞は選択開始から 24 もしくは 48 時間後にピューロマイシンを含まない培養培地に交換し、培養を継続した。

(5) ゲノム DNA の抽出および Cel-I アッセイ

Cel-I アッセイとは、ミスマッチ特異的ヌクレアーゼの特性を利用した DNA の変異や多型を検出するための方法である [63]。第 2 章の材料と方法 (4) で準備した PGC は、Genra Puregene cell kit (QIAGEN) を用いて、それぞれゲノム DNA の抽出を行った。ゲノミック PCR に用いたプライマーは、表 1 に示した。それぞれの予想される PCR 増幅産物の大きさは、*OVM* で 393 bp, *HEMGN* で 624 bp, そして *DMRT1* で 372 bp であった。ゲノミック PCR 産物は、Surveyor mutation detection kits (Integrated DNA Technologies) を用いて Cel-I アッセイに供試し、その変異の有無を確認した。

(6) 塩基配列の確認

塩基配列の確認には、第 2 章の材料と方法 (5) で変異導入が確認された PGC ゲノムを供試し、材料と方法 (5) と同様のプライマーを用いたゲノミック PCR により変異導入領域を増幅した。ゲノミック PCR 産物は、TOPO TA cloning kit for sequencing (Thermo Fisher Scientific) を用いてクローニングし、各クローンのインサート塩基配列をダイレクトシーケンス法により BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) と ABI 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析した。変異導入効率は、“変異導入されたクローン数/配列を確認した全クローン数 $\times 100$ ”で算出した。

表 1. 第 2 章で使用した合成オリゴヌクレオチド配列

名称	配列 (5'-3')	使用目的
CRISPR-OVM_s	CACCGCTGTTCTCTTTTCGTGCTTTG	<i>OVM</i> 遺伝子座
CRISPR-OVM_as	AAACCAAAGCACGAAAGAGAACAGC	sgRNA テンプレート
CRISPR-HEMGN_s	CACCGCCTTCCTCTACAGCCCACG	<i>HEMGN</i> 遺伝子座
CRISPR-HEMGN_as	AAACCGTGGGCTGTAGAGGAAGGC	sgRNA テンプレート
CRISPR-DMRT1_s	CACCGCCTGATCGCCGAGCGGCAGC	<i>DMRT1</i> 遺伝子座
CRISPR-DMRT1_as	AAACGCTGCCGCTCGGCGATCAGGC	sgRNA テンプレート
OVM-Cel-I_F	CCTCATTGTGCCGCTGACAGATTCA	<i>OVM</i> Cel-I アッセイ
OVM-Cel-I_R	GGGAGCACAGAACCCAACAGACACC	
HEMGN-Cel-I_F	CTGCTGCACCAGTAACTCCAGATTCCAT	<i>HEMGN</i> Cel-I アッセイ
HEMGN-Cel-I_R	GTCTCCTCCCCAATCCATCCTAAG	
DMRT1-Cel-I_F	AGCTGCCGCGTCTGCCCAAGT	<i>DMRT1</i> Cel-I アッセイ
DMRT1-Cel-I_R	CGTCGAGGAAACCCCGCATTC	

2-3 成績

(1) PGC の培養と核型解析

培養 PGC (継代回数 86 回) の形態は、図 8 に示した。培養 PGC は、球形であり細胞質に多数のグリコーゲン顆粒と、多くの脂肪小滴が観察され、典型的な PGC の特徴を有していた。本研究では、PGC の核型が ZZ のものを使用し、その倍加時間は、約 20 時間であった。

(2) ZsGreen1 発現ベクターを用いた遺伝子導入

遺伝子導入試薬の有効性を検討するために、3 種の遺伝子導入試薬 (Lipofectamine 2000, Lipofectamine 3000, および Viromer RED) 比較検討した。その結果、マニュアル法を用いて導入した条件では、Lipofectamine 2000 で 0.5 μg の DNA を導入した条件で 0.25 個 \pm 0.25 個、1.5 μg の DNA を導入した条件で 0.25 個 \pm 0.25 個、Lipofectamine 3000 で 0.5 μg の DNA を導入した条件で 0.25 個 \pm 0.25 個、1.5 μg の DNA を導入した条件で 3.25 個 \pm 1.03 個、および Viromer RED で 0.5 μg の DNA を導入した条件で 0.25 個 \pm 0.25 個、1.5 μg の DNA を導入した条件で 5.25 個 \pm 2.02 個であり Viromer RED が最も蛍光細胞数が多いことがわかった (図 9, マニュアル法)。また、ダイレクト添加法では、Lipofectamine 2000 で 0.5 μg の DNA を導入した条件で 2.00 個 \pm 0.71 個、1.5 μg の DNA を導入した条件で 4.25 個 \pm 1.25 個、Lipofectamine 3000 で 0.5 μg の DNA を導入した条件で 0.50 個 \pm 0.50 個、1.5 μg の DNA を導入した条件で 1.50 個 \pm 0.96 個、および Viromer RED で 0.5 μg の DNA を導入した条件で 0.25 個 \pm 0.25 個、1.5 μg の DNA を導入した条件で 8.50 個 \pm 2.72 個であり Viromer RED が最も蛍光細胞数が多いことがわかった (図 9, ダイレクト添加法)。

(3) Viromer RED を用いた遺伝子導入条件検討

PGC への遺伝子導入では、3 種の導入試薬のうち Viromer RED を用いたダイレクト添加法が最も蛍光細胞数が多かったことから、Viromer RED を用いてき

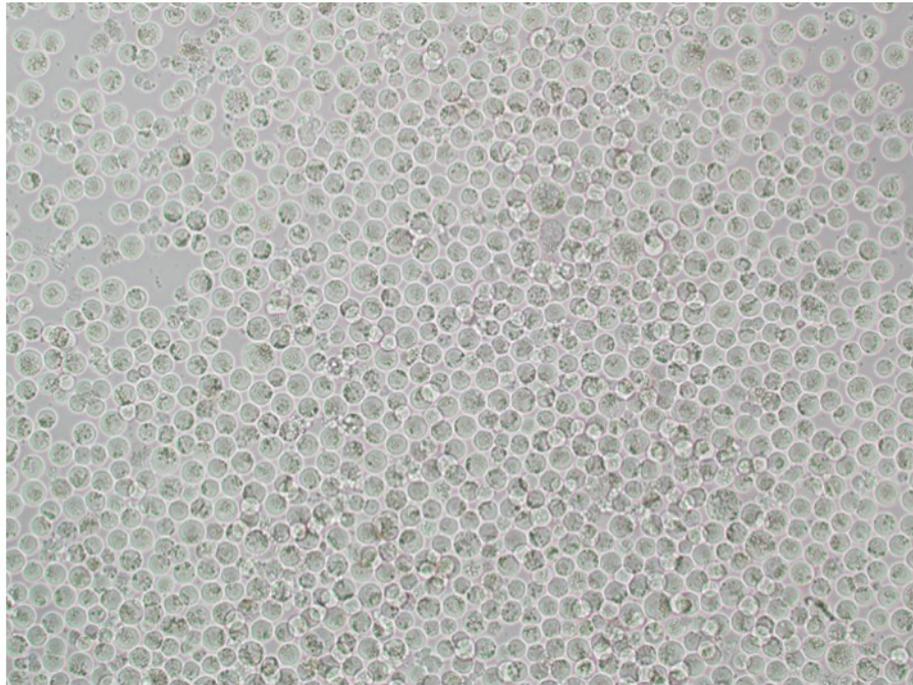


図8. ニワトリ培養primordial germ cell (PGC) の形態

本研究で使用したニワトリPGCの培養形態。ニワトリPGCは、胚より分離し培養維持し、その後本研究に使用した。スケールバー，100 μm

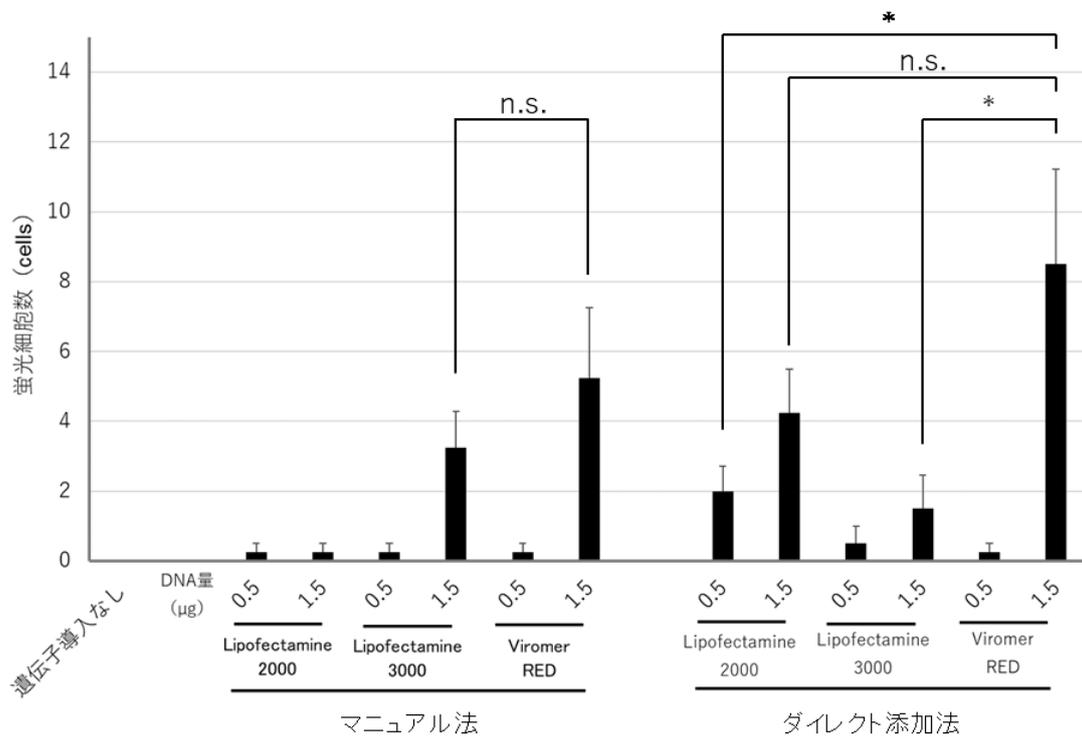


図9. 遺伝子導入試薬を用いたprimordial germ cell (PGC) への遺伝子導入条件検討

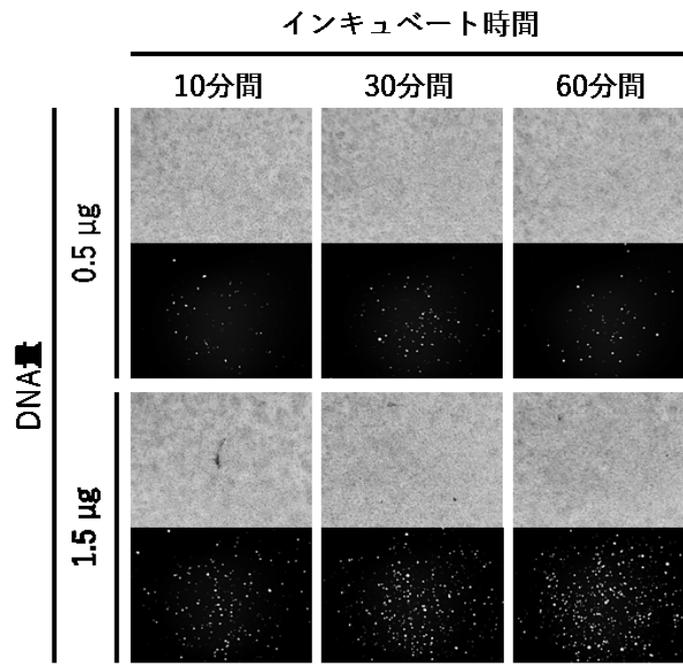
培養PGCには、Lipofectamine 2000, Lipofectamine 3000, およびViromer REDを用いてZsGreen1発現ベクターの遺伝子導入を行った。遺伝子導入条件は、マニュアルに従い遺伝子導入した群（マニュアル法）と細胞へ直接DNA/遺伝子導入試薬複合体を添加し加温した群（ダイレクト添加法）を設け、それぞれ0.5 µgまたは1.5 µgのプラスミドDNAの遺伝子導入を行った。遺伝子導入効率は、培養器の任意の4ヶ所の蛍光細胞数をカウントし、その平均値を比較した（n=4）（* p<0.05, n.s.: 有意差なし）。

らにダイレクト添加法の詳細な条件検討を行った。導入する DNA 量を 0.5 または 1.5 μg , PGC に DNA/遺伝子導入試薬複合体を加えて加温する時間を 10-60 分間とし、第 2 章の成績 (2) と同様の方法により評価したところ、DNA 量が多いほど多くの蛍光細胞が観察され、さらに DNA/遺伝子導入試薬複合体を細胞に直接作用させる時間が長いほど多くの蛍光細胞が観察された (図 10a, b)。Viromer RED を用いたダイレクト添加法では、1.5 μg の DNA 量で 60 分間作用させた条件が最良と判断し、以降の実験では、この条件を採用した。

(4) CRISPR/Cas9 によるゲノム編集および Cel-I アッセイ

培養 PGC は、CRISPR/Cas9 発現ベクターを第 2 章の成績 (3) で決定した条件で遺伝子導入を行い、薬剤選抜後、薬剤を除去して培養を継続した。十分な細胞数の増加を確認した後、培養 PGC からゲノム DNA の抽出を行い、抽出したゲノム DNA は、Cel-I アッセイに供試した。その結果、Cel-I アッセイの陽性を示す、ヌクレアーゼによる消化バンドは、*OVM*, *HEMGN*, および *DMRT1* のそれぞれすべての標的遺伝子で検出された (図 11)。Cel-I アッセイ陽性 (消化バンドが検出されたもの) になったピューロマイシン選択条件は、*OVM* は、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 48 時間 (図 11a), *HEMGN* は、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 24 時間、1.0 または 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 48 時間 (図 11b), *DMRT1* は、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 48 時間 (図 11c) であった。Cel-I アッセイの陽性の PGC から得られたゲノム DNA は、塩基配列の解析を行い、標的領域に全て変異が導入されていることを確認した。その解析の一例として、*HEMGN* の変異導入領域の塩基配列解析結果は、図 12 に示した。*HEMGN* の変異導入領域では sgRNA の認識領域を中心に欠失、挿入、および置換が確認された (図 12)。その変異導入効率は、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシンにて薬剤選択を行ったものが 82.35%, 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で薬剤選択を行ったものは 95.12%であった。

a



b

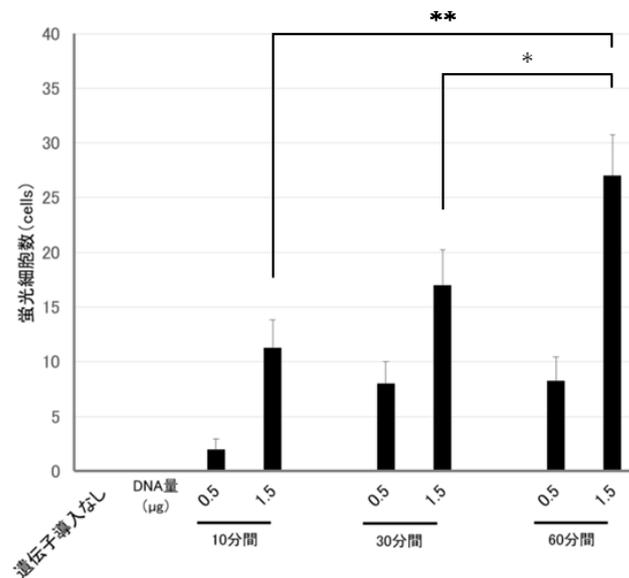
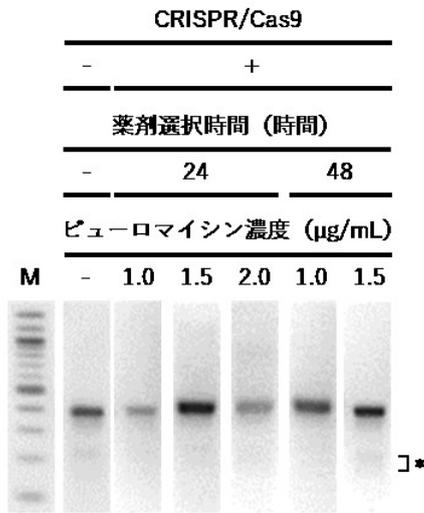


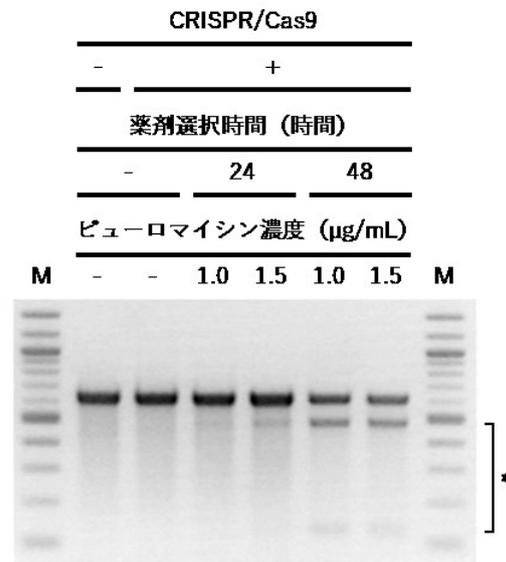
図10. Viromer REDによる培養primordial germ cell (PGC) への遺伝子導入条件検討

(a) Viromer REDを用いた遺伝子導入法の条件を検討するために、培養PGCには、0.5または1.5 μg のZsGreen1発現ベクターを10-60分間作用させ遺伝子導入を行った。スケールバー、100 μm 。(b) 遺伝子導入効率は、培養器の任意の4ヶ所の蛍光細胞数をカウントし、その平均値を比較した ($n=4$) (** $p<0.01$, * $p<0.05$)。

a OVM



b HEMGN



c DMRT1

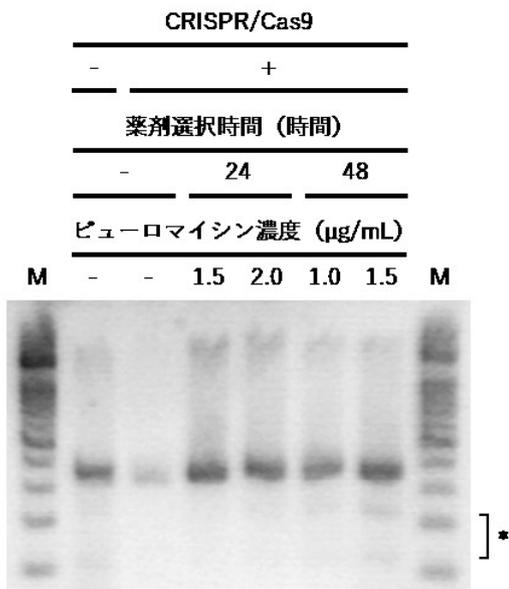


図11. Ce-Iアッセイによるゲノム編集の確認

培養始原生殖細胞へのゲノム編集は, *ovomuroid (OVM, a)*, *hemogen (HEMGN, b)*, および *doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1, c)* を標的とした clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) /CRISPR-associated (Cas) 9発現ベクターを, Viromer REDにより遺伝子導入して行い, その変異の有無をCe-Iアッセイにより確認した。*, 消化バンド, M, 100 bpラダーマーカー。

a

sgRNA認識配列	クローン数	変異の種類
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCCCACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×6)	野生型
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCC-ACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×9)	-1
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCCC-CGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-1
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGC--ACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×6)	-2
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCC--CGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×3)	-2
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACA----CGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-5
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCCC-----AACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-8
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCC-----GAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-13
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCCCACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatg	(×2)	+1
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCCCACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatg	(×4)	+1

b

sgRNA認識配列	クローン数	変異の種類
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCCCACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×2)	野生型
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCC-ACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×16)	-1
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCC-ACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-1/A>T
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCCC---GGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-4
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACA----CGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×3)	-5
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCT-----CACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-6
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCCC-----AGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-6
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGC-TT-----G--CACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×2)	-11
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTT-----CACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-11
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGC-TT-----G--CACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-11/T>C
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCT-----AGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-13
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACA-----GAGCCAGgtaaatgc	(×1)	-18/T>C
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATT-----CACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatgc	(×2)	-30
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACA-----gc	(×2)	-30
ATGGACAGTTGGGGAGAGACCACGATTATTCCAACAACCTTCTCTGCCTTCTCTACAGCCCACGAGGAGAACGCTGAGCCAGgtaaatg	(×6)	+1

図12. hemogenの変異導入領域における塩基配列解析

(a) 1.0 μg/mL, (b) 1.5 μg/mLのピューロマイシンにより薬剤選択を行った始原生殖細胞のhemogen変異導入領域における塩基配列を解析した。-は、欠失した塩基、下線は、挿入された塩基、囲み線は、置換された塩基を示す。

2-4 考察

ニワトリにおける CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集研究では、培養細胞を標的にしたものが多数報告されており、個体レベルでのゲノム編集ニワトリの作製には培養 PGC を用いた方法が主流である [64]。遺伝子導入方法は、エレクトロポレーション [39, 41]、およびリポフェクション [39, 40, 65] と様々であり、HR による遺伝子のノックイン効率は、導入後の蛍光活性化セルソーティングによる選択を実施しても 30%程度である [65]。培養 PGC からゲノム編集個体を作成して、研究や品種改良に応用するためには、他の生物と比較して長い期間を要するため、まず PGC におけるゲノム編集の効率を高める必要がある。ゲノム編集効率を高めるには、ゲノム編集ツールの細胞への導入効率が重要であり、本研究では比較的安価で手法的にも簡便な薬剤導入法に焦点を当て解析を行った。本研究では、これまでに PGC におけるゲノム編集において使用された実績のある 2 種の Lipofectamine [40, 65] と新たに Viromer RED を用いた方法で検討した。Oishi らの方法では、PGC へ直接 DNA/遺伝子導入試薬複合体を加え 5 分間 37 度で加温している [40] ことから、5 分間の加温条件も各試薬に設けた。その結果、Viromer RED を用いた条件が高成績を示した。本来であれば、蛍光陽性細胞数/生細胞数で割合を取らなければならないが、本実験の場合は、生細胞数を正確にカウントできなかつたため、蛍光細胞数が多い Viromer RED を採用した。Viromer シリーズの遺伝子導入試薬は、インフルエンザウイルスの持つ細胞侵入機構をモデルとしてデザインされたポリマー系遺伝子導入試薬である。この機構では、DNA/遺伝子導入試薬複合体は、エンドサイトーシスで取り込まれた後のエンドソームから効率的に離脱し DNA を細胞質へ輸送する。インフルエンザウイルスは、発育鶏卵で種を問わずよく増殖する [4] ことから、ニワトリ細胞への遺伝子導入にも適しているのかもしれない。特に、第 2 章の成績 (3) で示したように 37 度で加温する時間を長くすることで大幅に導入効率が亢進され、本方法を用いることで複数の標的遺伝子で PGCs ゲノム DNA を編集できることが確認された。

本研究では、ゲノム編集 PGC 薬剤選択にピューロマイシンによる一過的な薬剤処理を用いた。これまでのゲノム編集ニワトリ作製の報告においても遺伝子導入細胞の選択は必須であり、蛍光タンパク質発現カセットの共導入による蛍光活性化セルソーティング [65] を用いるか、薬剤耐性遺伝子発現カセットの共導入による薬剤選択 [39-41] のいずれかを用いる必要がある。本研究の Cel-I アッセイでは、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシンによる薬剤選択条件ではほとんど陽性を示す消化バンドが見えなかったものが、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシンにより選択することで Cel-I アッセイ陽性を示したことから、ゲノム編集の標的によっては、選択条件を厳しくすることで、より効果的にゲノム編集できる可能性が示唆された。また、Oishi らの報告では、遺伝子の変異導入効率は、導入後の薬剤選択を行わない実験系では 0-6.7%、薬剤選択を行う実験系では 13-100% である [40]。今回の実験では、ピューロマイシンによる選択を行っており、その変異導入効率は 82-95% であり、安定して遺伝子導入が可能であることが分かった。

本章では、PGC への CRISPR/Cas9 ベクターの導入にこれまで報告がなかった Viromer RED を用いた方法が有効であることを発見した。今後は、本手法を用いた実際のゲノム編集ニワトリの作出やノックイン手法への応用に期待したい。

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

3-1 序論

近年、動物の遺伝子改変技術は、目覚ましい進歩を遂げている。遺伝子改変動物は、さまざまな生物学的現象を解明するためのモデル生物としてや、医療および畜産で広く利用されている。ニワトリの一細胞期受精卵では、受精様式が多精子受精であるため、前核は複数形成され、その細胞質は、脂質に富む大量の卵黄を含んでいる。したがって、ニワトリ一細胞期受精卵に、マイクロインジェクション法 [10] および体細胞核移植法 [66] を使用して直接アプローチすることは困難である。遺伝子改変ニワトリを作製する方法としては、ウイルスベクター法 [7] や精子ベクター法 [67] が使用されてきたが、これらの方法では、遺伝子がランダムインテグレーションによりゲノムに挿入される。家禽産業において遺伝子改変ニワトリが、さらに有効活用されるためには、ゲノム上の任意の標的領域に導入遺伝子を挿入する手法が必要である。すなわち、ゲノム編集技術は、簡便で効率的な遺伝子ターゲティング技術として注目されている。ゲノム編集技術は、DNA に二本鎖切断 (double strand breaks, DSB) を引き起こす人工ヌクレアーゼを使用し、遺伝子をノックアウトまたはノックインする技術である。2012 年に開発され、急速に広まった CRISPR/Cas9 システムは、ゲノム編集をより簡単かつ効率的にした [25-27]。CRISPR/Cas9 システムでは、Cas9 ヌクレアーゼが DSB を導入し、NHEJ が DSB を修復する際に遺伝子に変異が導入される。この変異は、欠失、挿入、および置換による塩基修復エラーを含むため、その際に起こるフレームシフトが、標的遺伝子の機能を喪失させ、遺伝子がノックアウトされる。一方、DSB が HDR によって修復される場合には、遺伝子ノックインが可能である。HDR での修復は、通常、姉妹染色分体を鋳型として使用し、その DNA 修復は、NHEJ よりも HDR の方が正確である。ゲノム編集によるノックインでは、標的遺伝子座と相同性のある塩基配列を持つドナーベクターを鋳型として HDR を起こさせ、DNA の切断部位にドナーベクターが含んでいる変異や挿入された遺伝子をゲノム上の目的の位

置に挿入する [26, 27]。ただし、HDR の頻度は、動物種や細胞種によって異なるため、この方法は、HDR の頻度が低い動物種や細胞種では困難である [68]。

2014 年に開発された precise integration into the target chromosome (PITCh) 法は、HDR 頻度の低い動物種や細胞種におけるノックイン効率を改善するための新しい技術である [69]。この方法では、DNA 修復メカニズムとして HDR の代わりに microhomology-mediated end joining (MMEJ) を利用している。HDR を使用する従来のノックインでは、500-1,000 bp の相同配列が必要だが、PITCh 法では、ドナーベクターに 5-50 bp の短い相同配列で組換えを起こすことができる。これらの利点により、PITCh 法は、従来の方法ではノックインが困難な動物種や細胞種でのノックインを可能とした。

一般的にゲノム編集の標的細胞は、一細胞期受精卵が使用される。つまり、ゲノム編集技術は、受精卵を体外で操作することが可能な動物種に適用することができる。一方、ニワトリでは、体外受精法の報告例は、僅かである [30, 31]。また、1羽の雌鶏から1個の受精卵しか得られず、多くの受精卵を用意することは困難である。したがって、ニワトリのゲノム編集の標的細胞は、主に、生殖細胞の前駆細胞である PGC が利用されている [38-40]。ニワトリでは、培養 PGC でゲノム編集を行い、目的の編集済み PGC を選択して初期ニワトリ胚に移植し、生殖細胞キメラニワトリを作製する。この生殖細胞キメラニワトリから子孫を取得することにより、ゲノムが編集されたニワトリを取得することが可能である。

本研究では、生殖質の構成要素である *vasa* 遺伝子を標的とした。*vasa* 遺伝子は、ショウジョウバエの生殖細胞決定因子として同定されており [70]、*vasa* およびその相同分子は、線虫、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、マウス、ヒトなど様々な動物種で生殖細胞特異的マーカーとして利用されている [71-75]。ニワトリでは、*chicken vasa homologue (CVH)* が *vasa* 遺伝子に相同な遺伝子として同定され、CVH は生殖細胞で特異的に発現することが示されている [45]。CVH ノックアウトニワトリは、すでにゲノム編集技術を使用して作製されており、このニワトリでは、初期胚において PGC は形成されるが、生

殖細胞は発生中の卵巣の減数分裂中に失われ、成鶏の雌の不妊につながるものが報告されている [39] が、CVH の詳細な機能については、未だ明らかになっていない。そこで本研究では、CRISPR/Cas9 および CRISPR を介した PITCh (CRIS-PITCh) 法を使用し、CVH の機能解析のためのモデルニワトリの作出のための実験を行った。

3-2 材料と方法

(1) 供試動物

本研究で使用した受精卵およびニワトリは、第1章の材料と方法(1)と同様に、産卵直後の未培養の受精卵を、BPRは祓川エッグファーム、WLは株式会社アキタより購入し、広島大学大学院統合生命科学研究科付属瀬戸内圏ワールド科学教育研究センター西条ステーション(農場)の隔離された施設で維持した。また、本研究の実験方法は、広島大学の動物管理委員会により承認された(承認番号C16-23-3)。

(2) ベクター構築

ゲノム上の*CVH* 遺伝子座を切断するためのオールインワン CRISPR/Cas9 発現ベクターとドナーベクターは、Sakumaらの方法 [76] に従い、pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Plasmid #42230, Addgene, Cambridge, MA, USA) を使用して構築した。sgRNA は、CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) を使用して設計した。*CVH* および *PITCh* ドナーベクターを標的とする sgRNA の鋳型として使用したオリゴヌクレオチドは、表2に示した。*PITCh* ドナーベクターを構築するために、ベクター骨格は、pBApo-EF1 α Pur ベクター (Takara Bio) を用いた。*PITCh* ドナーベクターは、そのベクター骨格に、標準的な分子生物学的手法を用いて pAcGFP1-N1 ベクター (Takara Bio) より *AcGFP1* を付加、同時に EF1 α プロモーターをベクターから除去し、さらに *AcGFP1* の上流に *CVH* 遺伝子座の終止コドン周辺と相同性のあるマイクロホモロジーを挿入した。

(3) ニワトリ PGC の分離と培養

ニワトリ PGC の分離と培養は、第1章の材料と方法(2)に従って行い、その培養培地には、いくつかの変更を加えた。簡単に説明すると、PGC 培養用培地は、1×B-27 supplement, minus vitamin A (Thermo Fisher Scientific), 1%

表 2. 本研究で使用したオリゴヌクレオチド

名称	塩基配列 (5'-3')	目的
CRISPR-CVH_s	CACCGCTGAAACAACATTTAAGTCA	CVH 遺伝子座
CRISPR-CVH_as	AAACTGACTTAAATGTTGTTTCAGC	sgRNA テンプレート
CRISPR-PITCh donor_s	CACCGTTCAGAATATGACATCCTCA	PITCh ドナー
CRISPR-PITCh donor_as	AAACTGAGGATGTCATATTCTGAAC	sgRNA テンプレート
CVH-check_F1	ACGAACTGGTCGTTGTGGAA	
CVH-check_R1	GATGTGCTGCAAGGCGATTA	
CVH-check_F2	CTGAGGTTGGTCAAAGCATGTCC	PCR ジェノタイピング
CVH-check_R2	GTGCTGCTTCATGTGATCGG	
CVH-check_R3	AGCGCCATCATGAGATAACAAG	

chicken serum (Thermo Fisher Scientific), 1×EmbryoMax nucleosides (Merck), 1×GlutaMAX Supplement (Thermo Fisher Scientific), 1×MEM non-essential amino acid solution (Thermo Fisher Scientific), 0.5 mM StemSure モノチオグリセロール溶液 (Wako Pure Chemical Industries), 1×antibiotic-antimycotic mixed stock solution (Nacalai Tesque), 10 ng/mL human FGF2 (PeproTech), 1 unit/mL heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (Merck), 0.2 μM blebbistatin, そして 0.2 μM H1152 (Wako Pure Chemical Industries) 含 KnockOut DMEM (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

(4) 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
PITCh 法による遺伝子ノックインのために, 遺伝子導入には, 4×10^6 個の PGC (核型 ZZ, 継代数 46 回) を用いた。Viromer RED による遺伝子導入は, 第 2 章の材料と方法 (3) に従って行い, いくつかの変更を加えた。簡単に説明すると, 導入するプラスミド DNA は, CVH ゲノムと PITCh ドナーを標的とする 2 種の CRISPR/Cas9 発現ベクターと PITCh ドナーベクターをそれぞれ 2.5 μg (計 7.5 μg) 用い, 遺伝子導入の反応系は, その DNA 量に合わせて調整した。遺伝子導入したニワトリ PGC は, 60 mm 細胞培養へ播種し, PGC 培養用培地を用いて 38 度, 5% CO₂, 3% O₂ 環境下で培養した。

ピューロマイシンによる薬剤選択は, 遺伝子導入から 72 時間後に, 遺伝子導入された PGC に終濃度 0.4 μg/mL のピューロマイシンを添加することにより実施した。薬剤選択中の PGC は, 2-3 日ごとに継代し, 継代の度にピューロマイシンを含む新鮮な培地で培養した。遺伝子導入 PGC のクローニングは, ピューロマイシンによる薬剤選択を 2 週間実施した後, 安定して増殖する PGC を用いた限界希釈法により行った。まず, 細胞を回収し, 10 cells/mL の細胞密度に調整後, 100 μL の懸濁細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルに移した (1 細胞/ウェル)。

(5) 蛍光顕微鏡による観察

ピューロマイシンによる薬剤選択の約 2 週間後に蛍光観察を行った。明視野および蛍光画像は、IX71 蛍光顕微鏡 (Olympus) を使用して取得した。

(6) ジェノタイピングと塩基配列解析

ゲノム DNA の抽出は、Genra Puregene cell kit (QIAGEN) を使用して行った。PCR ジェノタイピングは、表 2 に記載したプライマーを使用して行った。続いて、塩基配列の解析は、PCR ジェノタイピングにより、正しくノックインされていることが確認された細胞からの 5'側ノックインジャンクションの PCR 産物を、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit と ABI 3130xl genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific) を使用したダイレクトシーケンス法により実施した。

(7) 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 (8) に従って行い、いくつかの変更を加えた。キメラニワトリの作出用 PGC は、2% chicken serum を含む KnockOut DMEM を使用して 2500 cells/ μ L に調製した。レシピエント胚への PGC の打ち込みは、2500 cells/ μ L に調整した PGC (2 μ L) を、EGK ステージ X [52] の WL レシピエント胚の胚盤葉下腔に注入し行った。PGC を注入したステージ X のレシピエント胚は、Perry により報告されたニワトリ胚の卵殻外培養法 [53] を用いて孵化させた。生殖腺の単離は、システム III の培養開始から 7 日後に剖検により行った。生殖腺の観察は、PBS で洗浄後、蛍光実体顕微鏡 (SZX12, Olympus) を用いて行った。

3-3 成績

(1) *CVH* を標的とした PITCh 法によるノックインシステムの設計

CVH 遺伝子座を標的とした PITCh システムの構築は、CRISPR/Cas9 により標的遺伝子座の終止コドン周辺で部位特異的 DSB を誘導し、MMEJ 修復により PITCh ドナーベクターが有する *AcGFP1* 遺伝子が *CVH* にインフレーム挿入できるように設計した。sgRNA 標的部位は、*CVH* ゲノム配列 (GenBank accession number: NC_052572) をもとに設計し、*CVH* 遺伝子座を標的とする CRISPR/Cas9 発現ベクター、PITCh ドナーベクター、および PITCh ドナーベクターを標的とする CRISPR/Cas9 発現ベクターの計 3 種類のベクターを設計および構築した (図 13)。PITCh ドナーベクターが組み込まれた細胞が容易にスクリーニングできるように、ピューロマイシン耐性遺伝子カセットは、*CVH* 融合 *AcGFP1* とは独立して配置し、SV40 プロモーターによって発現するように設計した。これにより、ピューロマイシン耐性遺伝子カセットは、プラスミドがランダムな組み込みによってゲノムに組み込まれた場合でも機能するが、*AcGFP1* 遺伝子は、ノックインが成功した場合にのみ機能する。

(2) 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

CVH 遺伝子に対する CRISPR/Cas9、PITCh ドナーベクターに対する CRISPR/Cas9 の 2 つの発現ベクターは、PITCh ドナーベクターとともに同時に PGC へ遺伝子導入した。導入した PGC の *AcGFP1* の発現は、ピューロマイシンによる薬剤選択の 2 週間後に蛍光顕微鏡を使用して観察した。その結果、*AcGFP1* 陽性細胞は、ゲノム編集された PGC では検出されるが、野生型細胞では検出されず、検出された *AcGFP1* は、*CVH* と同様に細胞質に局在していた (図 14)。すべてのピューロマイシン耐性細胞に対する *AcGFP1* 陽性細胞の割合は、 $94.7\% \pm 0.5\%$ であった。

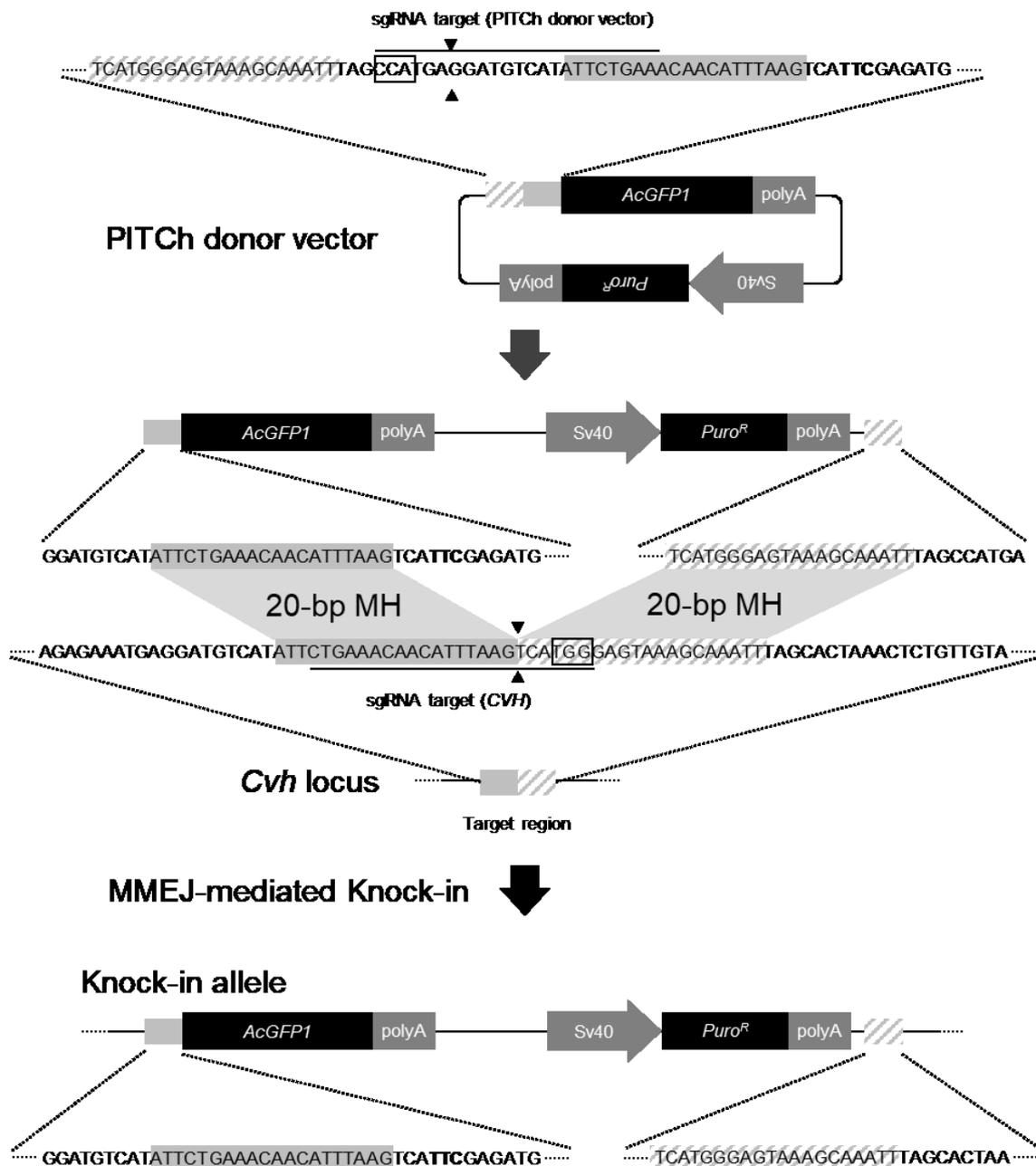


図13. chicken vasa homolog (CVH) を標的としたCRISPR-mediated precise integration into the target chromosome (CRIS-PITCh) 法的设计

黒線は、single guide RNA (sgRNA) の標的配列を、太字は、protospacer adjacent motif (PAM) 配列を、矢頭は二本鎖切断部位を、囲み線は、CVHを標的とするsgRNAがノックインアレルを再び切断しないようにPAM配列を無効化した変異を示す。MH、マイクロホモロジー、*Puro^R*、ピューロマイシン耐性遺伝子

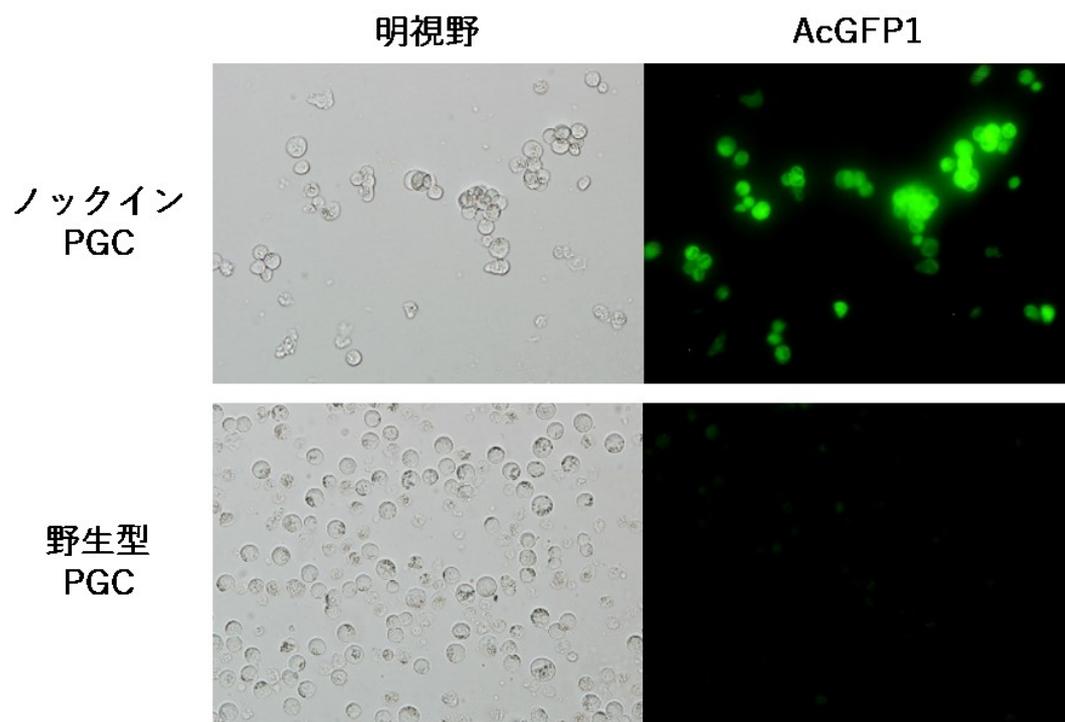


図14. ノックインおよび野生型始原生殖細胞の明視野および蛍光画像

スケールバー, 100 μm

次に、これらの細胞のノックインが正しく行われているかを確認するために、*CVH* 遺伝子座のジェノタイピングを行った。PITCh ドナーベクターが、正しくノックインされた場合の対立遺伝子の構造の概略図を図 15a に示し、それから転写された mRNA 配列の構造の概略図を図 15b に示した。AcGFP1 陽性細胞は、ゲノミック PCR によるジェノタイピングおよび reverse transcription PCR (RT-PCR) による 5'側へのノックインジャンクション部分の DNA 配列の増幅により、ノックイン対立遺伝子を有することが確認された (図 15a, b)。さらに、ゲノミック PCR および RT-PCR 産物の塩基配列を決定したところ、これらの PCR 産物の塩基配列は、*CVH* および AcGFP1 の配列をインフレームで並べた予想配列と一致し、標的ゲノムを切断する sgRNA の protospacer adjacent motif (PAM) 配列を無効化する変異を含んでいることも確認された (図 15c)。

(3) *CVH* 遺伝子座へ *AcGFP 1* 遺伝子がノックインされた遺伝子座の確認

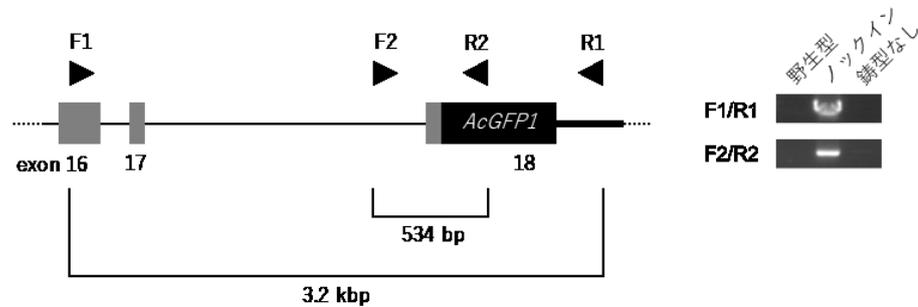
AcGFP1 陽性細胞のノックイン遺伝子座 (片アレルなのか、両アレルなのか) を推定するために、AcGFP1 陽性細胞のクローニングを行った。その結果、96 ウェルプレートを用いた限界希釈法により、17 個の単一細胞クローンを得た。ノックイン遺伝子座の推定には、片アレルでもノックインされていれば PCR により増幅される F2-R2 プライマーと野生型アレルが存在する場合に増幅される F2-R3 プライマーを使用した (図 16a) すなわち、F2-R2 と F2-R3 の両方のプライマーで増幅される場合には、片アレルへノックインされていることが分かる。一方、両アレルへノックインされている場合は、F2-R3 の断片が 4.8 kbp に及ぶため増幅されない。以上の判定をもとに PCR を行ったところ、クローン化した 17 の株のうち 3 クローンのみ片アレルノックインが確認され、残りの 14 クローンは両アレルであることが推定された。

4) AcGFP1 ノックイン PGC の生殖腺への移動能の確認

AcGFP1 ノックイン PGC が生殖腺への移動能を保持しているかを確認するために、移植実験を行った。移植胚の蛍光観察は、孵卵 10 日後の生殖腺を剖検

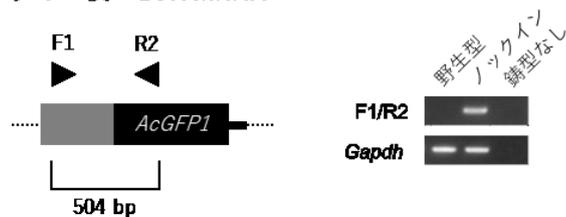
a

ノックイン後のCVH遺伝子座



b

ノックイン後のCVH mRNA



c

Acgfp1 -----ATGGTGAGCAAGGGCGC

ノックイン AATGAGGATGTCATATTCTGAAACAACATTTAAGTCA TCGAGATGGTGAGCAAGGGCGC

CVH AATGAGGATGTCATATTCTGAAACAACATTTAAGTCA TGGAGTAA

図15. polymerase chain reaction (PCR) ジェノタイプリング

ゲノミックPCR (a) およびreverse transcription PCR (RT-PCR) (b) の結果を示す。ノックイン対立遺伝子 (a) とmRNA (b) の概略図は、それぞれの左側に示しており、矢頭は、PCRに使用したPCRプライマーのそれぞれの設計位置を示す。ノックイン始原生殖細胞の5' ノックインジャンクションの塩基配列は (c) に示しており、正しいAcGFP1 open reading frame (ORF) 配列を上部に、chicken vasa homolog (CVH) ORF配列を下部に示している。太字は、protospacer adjacent motif (PAM) 配列が無効になっている変異であり、CVHを標的とするsingle guide RNAが組換えゲノムを再び切断することは無い。

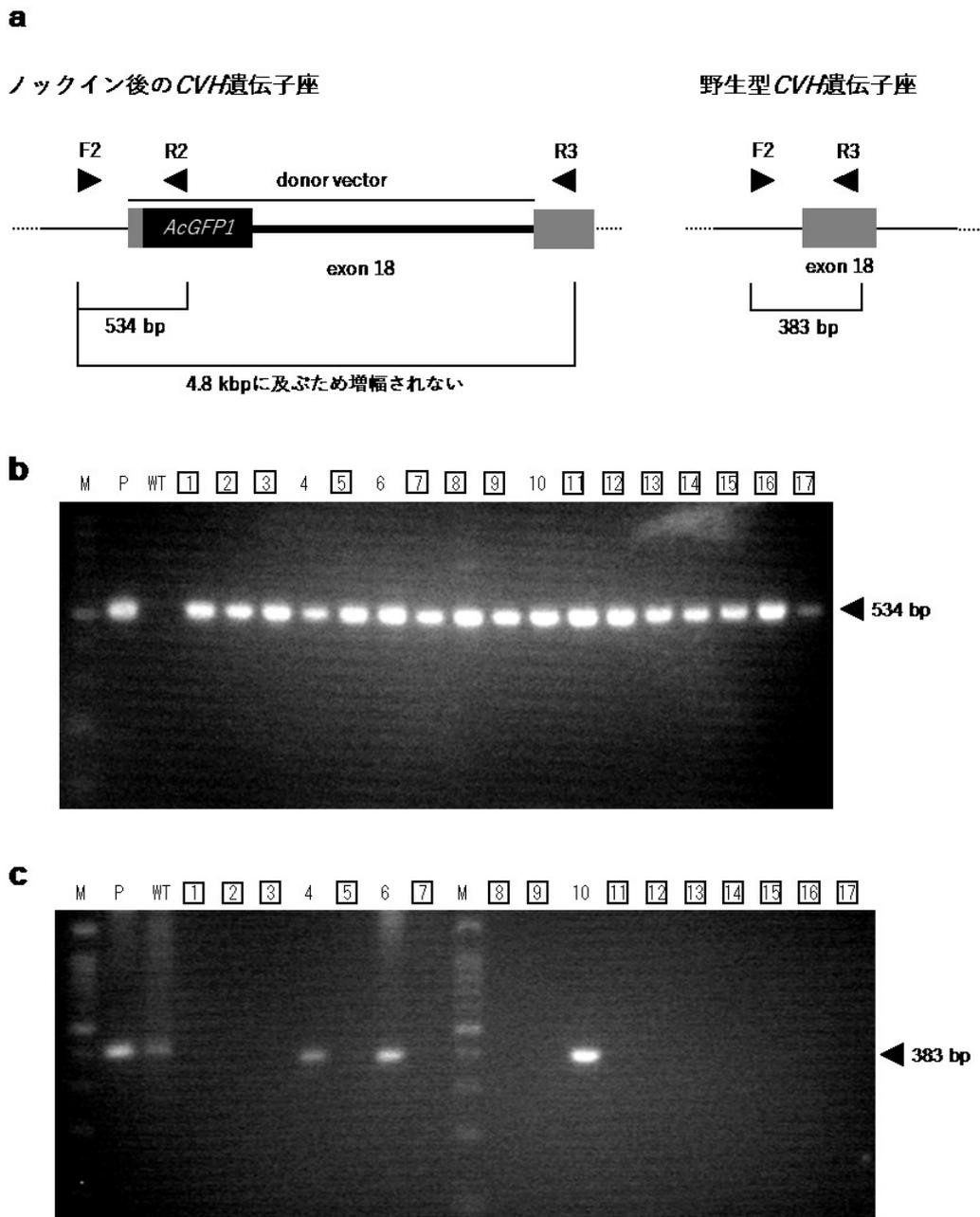


図16. ノックインprimordial germ cells (PGC) クローンにおけるpolymerase chain reaction (PCR) ジェノタイピング

ノックインおよび野生型対立遺伝子の概略図 (a)。矢頭は、ジェノタイピングに使用したPCRプライマーのそれぞれの設計位置を示す。ノックインPGCおよび野生型PGCは、プライマーF2-R2 (5' ノックインジャンクション, b) およびF2-R3 (非ノックイン対立遺伝子, c) を使用したゲノミックPCRによりそのCVH遺伝子座を評価した。クローン番号は、各パネルの上部に示し、囲み線は、ダブルノックインが成功したクローンを示す。M, 100bpラダーマーカー, P, ポリクローンPGC (クローンニング前), WT, 野生型PGC

により摘出し、蛍光実体顕微鏡により行った。その結果、ノックイン PGC を移植した生殖腺に多くの AcGFP1 陽性細胞が観察され (図 17), AcGFP1 ノックイン PGC が正常に生殖腺へ移動することが確認された。

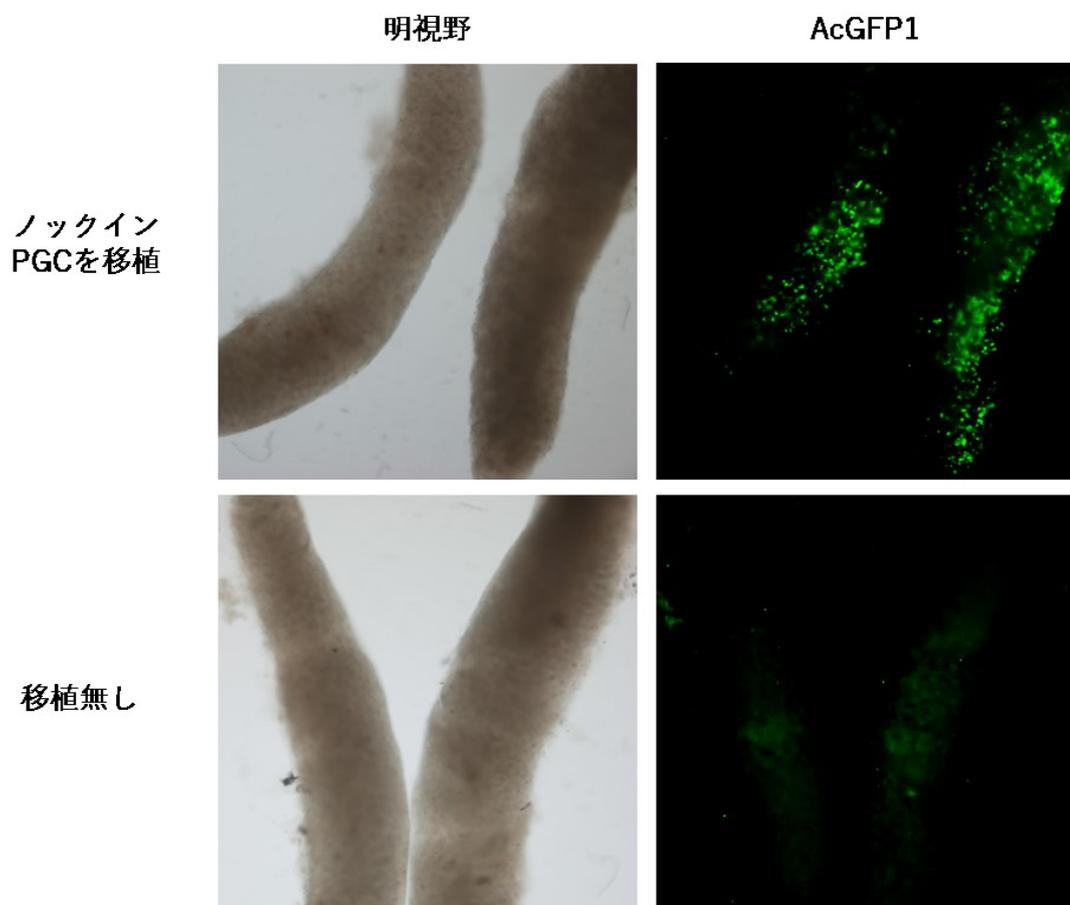


図17. ノックインprimordial germ cell (PGC) の生殖腺への移動能の確認

蛍光観察は、130日間培養したchicken vasa homolog (CVH) -AcGFP1融合タンパク質発現PGCをステージXのレシピエント胚に移植し、10日間孵卵後、生殖腺のAcGFP1陽性細胞を観察した。

3-4 考察

HDR 法は、ゲノム編集ツールを使用した遺伝子ノックインに利用されてきたが、HDR の頻度が低い動物種や細胞種では効果的ではない [68]。PITCh 法は、MMEJ を利用した方法であり、従来の方法では成功しなかった動物種および細胞種でも遺伝子ノックインを実現している [69]。これまでのゲノム編集ニワトリの報告では、ゲノム編集されたニワトリを生成するために、培養 PGC を利用した論文が報告されており [64]、CRISPR/Cas9 システムを使用して作製されたノックインニワトリの論文も報告されている [41, 65, 77, 78]。これらの論文では、CRISPR/Cas9 発現ベクターとドナーベクターを PGC に遺伝子導入した後の抗生物質による薬剤選択または蛍光タンパク質マーカーを用いた細胞のソーティングの必要性を報告している。蛍光タンパク質を介した細胞のソーティングを伴う相同性媒介末端結合 (homology-mediated end joining, HMEJ) 法を利用した研究によれば、目的の組換えを起こした細胞は、1 回のソーティングで 30% の効率で得られ、最終的に、2 回のソーティングを行っている [65]。また、HDR 法とハイグロマイシンによる薬剤選択を使用した研究では、得られた 9 つのクローンは、すべてで目的のノックインの成功が報告されている [41]。本研究では、PITCh 法とピューロマイシンによる薬剤耐性を使用することにより、得られた 17 のクローンすべてで正確なターゲティングが成功した。これらの結果から考えると、蛍光タンパク質でソーティングするよりも薬剤選択を採用する戦略を選択することにより、目的のノックイン細胞を容易に取得できることを示唆している。通常、両方のアレルに効果的にノックインするためには、それぞれの対立遺伝子に異なる蛍光タンパク質マーカーや薬剤選択マーカーをノックインするなどの二重選択が必要である [79]。しかし、本研究では非常に興味深いことに二重選択は行わなかったが、CRIS-PITCh 法を使用して得られたノックインクローンは、82% の効率で両アレルに目的の組換えが起きたクローンであることが示唆された。

本研究では、ノックインの標的遺伝子としてニワトリの生殖細胞マーカーとして使用されている *CVH* 遺伝子を標的とした [45]。CVH は、2 細胞期受精卵の卵割溝の底に発現することから、ニワトリの生殖細胞の運命決定のメカニズムは、前成説 [80, 81] によって決定されると考えられている。しかし、EpiSC の CVH の発現を観察すると、この前成説では説明できない現象が存在する。エピブラストに由来する EpiSC は、CVH 陽性細胞と CVH 陰性細胞からなるモザイク状のコロニーを形成する。しかし、それらをクローン化しても、そのコロニーでは、CVH 陽性細胞と陰性細胞が再びモザイク状になって表れる [51]。CVH 陽性細胞が CVH 陰性細胞から分裂すると、後成説 [80] のように生殖細胞が形成される可能性がある。PITCh 法を用いて *CVH* 遺伝子の下流に蛍光タンパク質がノックインされたニワトリは、生殖細胞の運命決定メカニズムを解明するためのモデル生物として使用することができる。

本研究で使用された PITCh ドナーベクターは、組換えが成功すると AcGFP1 を発現するように設計し、この組換えには、2 つの sgRNA を用いる CRIS-PITCh 法を使用した。これらの 2 つの sgRNA の 20mer + PAM は、それぞれの標的配列とのみ結合するが、12 mer + PAM (シード配列) は、*CVH* ゲノムを切断する sgRNA では 10 個のオフターゲット候補が、ドナーベクターを切断する sgRNA では 9 個のオフターゲット候補が存在する。ただし、それらのオフターゲット候補は、すべて遺伝子をコードしていないか、イントロン配列であるため、プロモーターを欠く *AcGFP1* がこれらの領域に挿入されても緑色蛍光は得られないと考えられる。また、本研究で作製した *CVH* 遺伝子座へ *AcGFP1* 遺伝子がノックインされたニワトリ PGC は、抗 CVH 抗体 [51] を用いた免疫蛍光染色により、CVH の発現を維持していることが確認された (未発表データ)。重要なことに、PGC が本来持つ特徴の 1 つである生殖腺への移動能は、*CVH* 遺伝子座を編集した PGC においても維持されており (10 日および 18 日胚)、その機能がジーンターゲティングによって阻害されなかったことを示している。

本章では、CRIS-PITCh 法をニワトリのゲノム編集に利用することで、ニワトリ PGC の *CVH* 遺伝子座を編集できることを実証した。*CVH* 遺伝子座へ *AcGFPI* 遺伝子がノックインされたニワトリ PGC は、培養システムおよび組織の蛍光を介して明瞭に観察され、追跡システムが有効であることを示している。本研究では、*CVH* 発現の追跡に使用できるモデルニワトリを誕生させることはできなかったが、ゲノム編集ニワトリを作出するための PITCh 法の有用性が示された。

総合考察

ゲノム編集技術は、食品分野や医療分野など様々な分野に変革をもたらしている。このゲノム編集技術のニワトリへの応用は、産業的に有用なニワトリの利用方法の選択肢をさらに広げることが期待される。実際、いくつかのゲノム編集ニワトリの作製が報告されており、*OVM* 遺伝子をノックアウトした鶏卵の低アレルギー化へ向けた研究 [40] や、インターフェロン β や有用抗体をオボアルブミン遺伝子座にノックインし、卵白にそれらを蓄積するニワトリバイオリアクターの開発へ向けた研究 [77, 78] など、産業的に有用なニワトリの品種改良の報告が散見されるようになってきた。また、基礎研究分野においても、*CVH* 遺伝子のノックアウトの研究 [39] が報告されており、これらの報告は、培養ニワトリ PGC の培養技術と TALEN もしくは CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術が利用されている。これらの組み合わせによるゲノム編集ニワトリの作製は、基礎研究から応用研究まで、今後ますます盛んに行われていくものと考えられる。以上の観点から本研究では、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 章では、ニワトリ PGC の培養法を検討し、低分子阻害剤を用いたニワトリ PGC の培養系を開発した。第 2 章では、ニワトリ PGC への遺伝子導入方法を検討し、いくつかの遺伝子を標的に CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子ノックアウト法の検討を行った。そして第 3 章では、CRISPR/Cas9 と共に新たに開発されたジーンターゲティング法である PITCH 法をニワトリへ適用し、生殖細胞マーカーである *CVH* 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を行った。

第 1 章から第 3 章を通して、まず、ニワトリ PGC の新規培養系を構築し、安定してニワトリ PGC を増殖させ、大量の細胞数を確保する方法を開発した。また、その増殖させた 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。本来、1 個体から 100 cells ほどしか回収できない PGC を大量に扱えることは、ゲノム編集ニワトリの作製に利用できるだけでなく、PGC の基礎研究においても大きな貢献ができると考えてい

る。また、PGCの *in vivo* におけるニッチは、血流中を循環し到達する生殖腺である。ニワトリ PGC は、生殖腺に到達後、分化・成熟していくことを考えると、PGC の自己複製において細胞間相互作用は重要な役割を占めている可能性がある。これらの点から、旋回培養による PGC の血流循環の *in vitro* における再現や非接着系の細胞培養プレートの利用、細胞外マトリックス等を用いた細胞培養プレートのコーティングなどに検討の余地がある。

PGC の培養技術と合わせて遺伝子導入技術を開発することで、培養 PGC の基礎研究および応用研究における利用の幅を広げることができると考え、ニワトリ PGC へ遺伝子導入する技術を検討した。第 1 章では、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行い、第 2 章では、これまでニワトリ PGC の遺伝子導入に利用された報告がなかった Viromer RED を用いて遺伝子導入法を検討した。これにより、安定発現株の取得に成功し、またゲノム編集ツールを用いて複数の遺伝子においてノックアウトができること、そして CRIS-PITCh 法を用いてノックインができることも実証した。しかし、その遺伝子導入の効果・効率の検討は十分ではなく、さらなる検討が必要であると考えられる。本研究においてダイレクト添加法はマニュアル法より効果的であったことから、培地成分が遺伝子導入試薬による導入を妨げている可能性が示唆され、培地からの構成成分の除去により導入効率を高めることができるかもしれない。

本研究で作製したすべての遺伝子改変 PGC およびゲノム編集 PGC は、移植実験においてレシピエント胚の生殖隆起へ移動し、このキメラニワトリの発生と培養 PGC の生殖系列伝播が可能であることが確認された。これらの結果は、低分子阻害剤が安定したニワトリ PGC 培養の維持に有用であり、なおかつ本研究で用いた遺伝子導入法は、PGC の特性を大きく変えることなく形質転換できることを示している。

これらの成果は、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。

総括

ニワトリは、最も広く利用されている家畜（家禽）の1つであり、食品から医薬品まで様々な分野で利用されている。この産業的に有用なニワトリの利用の可能性を遺伝子改変技術によって、さらに引き出すことが試みられてきたが、これまでニワトリの遺伝子改変は、難しかった。一方、これまでの遺伝子改変技術では、遺伝子操作が出来なかった生物種においても、遺伝子改変の成功例が続々と報告されている技術がゲノム編集技術である。ニワトリにおいてもゲノム編集技術が利用されてきており、その利用が広まれば、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となると考えられる。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】第1章ではゲノム編集技術をニワトリに適用する際の標的細胞としてニワトリ PGC の培養法を検討した。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、ブレッキングを伴うアポトーシス経路の活性化に着目し、これを、低分子阻害剤を用いて抑えることで、ニワトリ PGC の培養系の安定化を図った。その結果、ミオシン II の特異的阻害剤である blebbistatin は、PGC の増殖を亢進することを発見し、blebbistatin を用いたニワトリ PGC を培養するための新しい安定したプロトコルを開発した。本方法で培養したニワトリ PGC は、CVH と NANOG を発現することが示され、長期の継代培養にてその発現を維持することが確認された。さらに、これらの PGC をドナー細胞として用いた移植実験では、PGC は、レシピエント胚の生殖隆起へ移動し、キメラニワトリの発生と生殖系列伝播が可能であることが実証された。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り、将来の基礎研究および応用研究に使用されるニワトリのゲノム編集を、加速するのに役立つ可能性があることを示している。

【第2章】第2章では、ニワトリ PGC への CRISPR/Cas9 ベクターの導入にこ

れまで報告がなかった Viromer RED を用いた方法が有効であることを発見した。この Viromer RED を用いてニワトリ PGC への遺伝子導入方法を検討し、PGC の細胞ペレットに直接、DNA/遺伝子導入試薬複合体を添加し、60 分間、37 度でインキュベートする方法が効果的であることを見出した。本手法を用いて、*OVM*、*HEMGN*、および *DMRT1* の 3 つの遺伝子を標的にした CRISPR/Cas9 発現ベクターは、ニワトリ PGC へ導入され、これらの遺伝子に実際に変異導入できることが確認された。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。今後は、本手法を用いた実際のゲノム編集ニワトリの作出やノックイン手法への応用に期待したい。

【第 3 章】第 3 章では、CRISPR/Cas9 と共に新たに開発されたジーンターゲティング法である PITCh 法をニワトリへ適用し、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を行った。CRISPR/Cas9 と PITCh 法を合わせて利用した CRIS-PITCh 法は、利用する動物種や細胞種を選ばずに高効率で組換えを起こすことができる手法である。本章では、CRIS-PITCh 法をニワトリのゲノム編集に利用することで、ニワトリ PGC の *CVH* 遺伝子座を編集できることを実証した。*CVH* 遺伝子座へ *AcGFPI* 遺伝子がノックインされたニワトリ PGC は、培養システムおよび組織において蛍光を介して明瞭に観察され、これらの結果は、生殖細胞の追跡システムが有効であることを示している。本研究では、*CVH* 発現の追跡に使用できるモデルニワトリを誕生させることはできなかったが、ゲノム編集ニワトリを作出するための CRIS-PITCh 法の有用性を示した。

本研究では、ニワトリ PGC の新規培養系を構築し、その培養 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。ニワトリ PGC を大量に扱えることは、ゲノム編集ニワトリの作製に利用できるだけでなく、ニワトリ PGC および生殖細胞の基礎研究においても大きな貢献

ができると考えている。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ることも実証した。そして、ニワトリにおいて利用された報告がなかったCRIS-PITCh法を用いて遺伝子のノックインができることも実証した。これらの成果は、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る。

謝辞

本研究を行うにあたり終始ご懇篤なるご指導，ご鞭撻と恵まれた研究環境を施して頂き，そしてご配慮を賜りました広島大学大学院 統合生命科学研究科 免疫生物学研究室 堀内 浩幸 教授に謹んで感謝申し上げます。さらに本論文作成に際し，価値ある校閲を賜りました広島大学大学院 統合生命科学研究科 分子遺伝学研究室 山本 卓 教授，同研究科 分子栄養学研究室 矢中 規之 教授，同研究科 応用分子細胞生物学 船戸 耕一 准教授に厚く御礼申し上げます。

また，常日頃から研究にご助力頂き，暖かく励ましていただきました広島大学 生物生産学部／広島大学大学院 生物圏科学研究科／同大学院 統合生命科学研究科 免疫生物学研究室の皆様，ご退職された先生方・研究員の皆様，そして多くの卒業，修了生の皆様に深謝致します。

最後に，経済的，精神的に支えてくれた家族をはじめ，現在に至るまでの私を支えてくださいました皆様に深く感謝致します。

文献

[1] Diamond, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* **418**: 700-707. 2002.

[2] West, B., and Zhou, B.X. Did chickens go North? New evidence for domestication. *J. Archaeol. Sci.* **15**: 515-533. 1988.

[3] Hata, A., Nunome, M., Suwanasopee, T., Duengkae, P., Chaiwatana, S., Chamchumroon, W., Suzuki, T., Koonawootrittriron, S., Matsuda, Y., and Srikulnath, K. Origin and evolutionary history of domestic chickens inferred from a large population study of Thai red junglefowl and indigenous chickens. *Sci. Rep.* **11**: 2035. 2021.

[4] Stanley, W.M. THE PREPARATION AND PROPERTIES OF INFLUENZA VIRUS VACCINES CONCENTRATED AND PURIFIED BY DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION. *J. Exp. Med.* **81**: 193-218. 1945.

[5] Jaenisch, R., and Mintz, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**: 1250-1254. 1974.

[6] Jaenisch, R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 1260-1264. 1976.

[7] van, der, Putten, H., Botteri, F.M., Miller, A.D., Rosenfeld, M.G., Fan, H., Evans, R.M., and Verma, I.M. Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 6148-6152. 1985.

[8] Stewart, C.L., Stuhlmann, H., Jähner, D., and Jaenisch, R. De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 4098-4102. 1982.

[9] Jähner, D., Stuhlmann, H., Stewart, C.L., Harbers, K., Löhler, J., Simon, I., and Jaenisch, R. De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* **298**: 623-628. 1982.

[10] Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 7380-7384. 1980.

[11] Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E. Jr, Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* **315**: 680-683. 1985.

[12] Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C., and Evans, R.M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* **300**: 611-615. 1982.

[13] Mintz, B., and Illmensee, K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 3585-3589. 1975.

[14] Evans, M.J., and Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-156. 1981.

[15] Skoultschi, A.I., Nandi, A., Roginski, R.S., Gregg, R.G., and Smithies, O.

Expression of genes inserted at the human beta-globin locus by homologous recombination. *Prog. Clin. Biol. Res.* **251**: 581-594. 1987.

[16] Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**: 503-512. 1987.

[17] Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.L., and Smith, A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* **135**: 1287-1298. 2008.

[18] Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R.E., Schulze, E.N., Song, H., Hsieh, C.L., Pera, M.F., and Ying, Q.L. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* **135**: 1299-1310. 2008.

[19] McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., and Henikoff, S. Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.* **18**: 455-457. 2000.

[20] Kim, Y.G., Cha, J., and Chandrasegaran, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 1156-1160. 1996.

[21] Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**: 757-761. 2010.

[22] Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**: 1509-1512. 2009.

- [23] Moscou, M.J., and Bogdanove, A.J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**: 1501. 2009.
- [24] Sakuma, T., Ochiai, H., Kaneko, T., Mashimo, T., Tokumasu, D., Sakane, Y., Suzuki, K., Miyamoto, T., Sakamoto, N., Matsuura, S., and Yamamoto, T. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci. Rep.* **3**: 3379. 2013.
- [25] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816-821. 2012.
- [26] Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**: 819-823. 2013.
- [27] Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**: 823-826. 2013.
- [28] Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **31**: 397-405. 2013.
- [29] Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* **153**: 910-918. 2013.
- [30] Tanaka, K., Wada, T., Koga, O., Nishio, Y., and Hertelendy, F. Chick production by

in vitro fertilization of the fowl ovum. *J. Reprod. Fertil.* **100**: 447-449. 1994.

[31] Batellier, F., Couty, I., Olszanska, B., Stepinska, U., and Brillard, J.P. In vitro fertilisation of chicken oocytes after in vitro ovulation. *Br. Poult. Sci.* **44**: 819-820. 2003.

[32] Nishijima, K., and Iijima, S. Transgenic chickens. *Dev. Growth Differ.* **55**: 207-216. 2013.

[33] Vick, L., Li, Y., and Simkiss, K. Transgenic birds from transformed primordial germ cells. *Proc. Biol. Sci.* **251**: 179-182. 1993.

[34] Leighton, P.A., van, de, Lavoit, M.C., Diamond, J.H., Xia, C., and Etches, R.J. Genetic modification of primordial germ cells by gene trapping, gene targeting, and phiC31 integrase. *Mol. Reprod. Dev.* **75**: 1163-1175. 2008.

[35] Macdonald, J., Taylor, L., Sherman, A., Kawakami, K., Takahashi, Y., Sang, H.M., and McGrew, M.J. Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**: E1466-1472. 2012.

[36] Park, T.S., and Han, J.Y. piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**: 9337-9341. 2012.

[37] Schusser, B., Collarini, E.J., Yi, H., Izquierdo, S.M., Fesler, J., Pedersen, D., Klasing, K.C., Kaspers, B., Harriman, W.D., van, de, Lavoit, M.C., Etches, R.J., and Leighton, P.A. Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous

recombination in primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**: 20170-20175. 2013.

[38] Park, T.S., Lee, H.J., Kim, K.H., Kim, J.S., and Han, J.Y. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**: 12716-12721. 2014.

[39] Taylor, L., Carlson, D.F., Nandi, S., Sherman, A., Fahrenkrug, S.C., and McGrew, M.J. Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. *Development* **144**: 928-934. 2017.

[40] Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Kagami, H., and Tagami, T. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* **6**: 23980. 2016.

[41] Dimitrov, L., Pedersen, D., Ching, K.H., Yi, H., Collarini, E.J., Izquierdo, S., van, de, Lavoit, M.C., and Leighton, P.A. Germline Gene Editing in Chickens by Efficient CRISPR-Mediated Homologous Recombination in Primordial Germ Cells. *PLoS One* **11**: e0154303. 2016.

[42] van, de, Lavoit, M.C., Diamond, J.H., Leighton, P.A., Mather-Love, C., Heyer, B.S., Bradshaw, R., Kerchner, A., Hooi, L.T., Gessaro, T.M., Swanberg, S.E., Delany, M.E., and Etches, R.J. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* **441**: 766-769. 2006.

[43] Naito, M., Harumi, T., and Kuwana, T. Long term in vitro culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood and incorporation into germline of recipient embryo. *J. Poult. Sci.* **47**: 57-64. 2010.

[44] Whyte, J., Glover, J.D., Woodcock, M., Brzezczynska, J., Taylor, L., Sherman, A.,

Kaiser, P., and McGrew, M.J. FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports* **5**: 1171-1182. 2015.

[45] Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T., and Noce, T. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* **127**: 2741-2750. 2000.

[46] Tres, L.L., Rosselot, C., and Kierszenbaum, A.L. Primordial germ cells: what does it take to be alive? *Mol. Reprod. Dev.* **68**: 1-4. 2004.

[47] Pesce, M., Farrace, M.G., Piacentini, M., Dolci, S., and De Felici, M. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* **118**: 1089-1094. 1993.

[48] Ge, C., Yu, M., Petite, J.N., and Zhang, C. Epidermal growth factor-induced proliferation of chicken primordial germ cells: involvement of calcium/protein kinase C and NFkB1. *Biol. Reprod.* **80**: 528-536. 2009.

[49] HAMBURGER, V., and HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**: 49-92. 1951.

[50] Fridolfsson, A., and Ellegren, H. A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. *J. Avian Biol.* **30**: 116-121. 1999.

[51] Nakano, M., Arisawa, K., Yokoyama, S., Nishimoto, M., Yamashita, Y., Sakashita, M., Ezaki, R., Matsuda, H., Furusawa, S., and Horiuchi, H. Characteristics of novel chicken embryonic stem cells established using chicken leukemia inhibitory factor. *J. Poult. Sci.* **48**: 64-72. 2011

- [52] Eyal-Giladi, H., and Kochav, S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev. Biol.* **49**: 321-337. 1976.
- [53] Perry, M.M. A complete culture system for the chick embryo. *Nature* **331**: 70-72. 1988.
- [54] Ohgushi, M., Matsumura, M., Eiraku, M., Murakami, K., Aramaki, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., Nakano, T., Suga, H., Ueno, M., Ishizaki, T., Suemori, H., Narumiya, S., Niwa, H., and Sasai, Y. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**: 225-239. 2010.
- [55] Stankiewicz, T.R., and Linseman, D.A. Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Front. Cell Neurosci.* **8**: 314. 2014.
- [56] Kovács, M., Tóth, J., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A., and Sellers, J.R. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* **279**: 35557-35563. 2004.
- [57] Wickman, G.R., Julian, L., Mardilovich, K., Schumacher, S., Munro, J., Rath, N., Zander, S.A., Mleczak, A., Sumpton, D., Morrice, N., Bienvenut, W.V., and Olson, M.F. Blebs produced by actin-myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death Differ.* **20**: 1293-1305. 2013.

[58] Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* **333**: 1843-1846. 2011.

[59] Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K.Y., Shimatani, Z., and Kondo, A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* **353**: aaf8729. 2016.

[60] Park, M., Keung, A.J., and Khalil, A.S. The epigenome: the next substrate for engineering. *Genome Biol.* **17**: 183. 2016.

[61] Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., Teramura, H., Yamamoto, T., Komatsu, H., Miura, K., Ezura, H., Nishida, K., Ariizumi, T., and Kondo, A. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* **35**: 441-443. 2017.

[62] Kishimoto, K., Washio, Y., Yoshiura, Y., Toyoda, A., Ueno, T., Fukuyama, H., Kato, K., and Kinoshita, M. Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture* **495**: 415-427. 2018.

[63] Qiu, P., Shandilya, H., D'Alessio, J.M., O'Connor, K., Durocher, J., and Gerard, G.F. Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques* **36**: 702-707. 2004.

[64] Panda, S.K., and McGrew, M.J. Genome editing of avian species: implications for animal use and welfare. *Lab. Anim.* **10**: 23677221998400. 2021.

[65] Xie, L., Sun, J., Mo, L., Xu, T., Shahzad, Q., Chen, D., Yang, W., Liao, Y., and Lu,

- Y. HMEJ-mediated efficient site-specific gene integration in chicken cells. *J. Biol. Eng.* **13**: 90. 2019.
- [66] Pennisi, E., and Williams, N. Will Dolly send in the clones? *Science* **275**: 1415-1416. 1997.
- [67] Chang, K., Qian, J., Jiang, M., Liu, Y.H., Wu, M.C., Chen, C.D., Lai, C.K., Lo, H.L., Hsiao, C.T., Brown, L., Bolen, J. Jr, Huang, H.I., Ho, P.Y., Shih, P.Y., Yao, C.W., Lin, W.J., Chen, C.H., Wu, F.Y., Lin, Y.J., Xu, J., and Wang, K. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol.* **2**: 5. 2002.
- [68] Taleci, R., and Nikjoo, H. Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle. *Mutat Res.* **756**: 206-212. 2013.
- [69] Nakade, S., Tsubota, T., Sakane, Y., Kume, S., Sakamoto, N., Obara, M., Daimon, T., Sezutsu, H., Yamamoto, T., Sakuma, T., and Suzuki, K.T. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat. Commun.* **5**: 5560. 2014.
- [70] Hay, B., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. A protein component of Drosophila polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell.* **55**: 577-587. 1988.
- [71] Roussell, D.L., and Bennett, K.L. glh-1, a germ-line putative RNA helicase from Caenorhabditis, has four zinc fingers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 9300-9304. 1993.
- [72] Komiyama, T., Itoh, K., Ikenishi, K., and Furusawa, M. Isolation and characterization

of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **162**: 354-363. 1994.

[73] Yoon, C., Kawakami, K., and Hopkins, N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* **124**: 3157-3165. 1997.

[74] Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M., and Noce, T. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**: 12258-12262. 1994.

[75] Castrillon, D.H., Quade, B.J., Wang, T.Y., Quigley, C., and Crum, C.P. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 9585-9590. 2000.

[76] Sakuma, T., Nakade, S., Sakane, Y., Suzuki, K.T., and Yamamoto, T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat. Protoc.* **11**: 118-133. 2016.

[77] Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., and Tagami, T. Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Sci. Rep.* **8**: 10203. 2018.

[78] Mukae, T., Okumura, S., Watanobe, T., Yoshii, K., Tagami, T., and Oishi, I. Production of Recombinant Monoclonal Antibodies in the Egg White of Gene-Targeted Transgenic Chickens. *Genes (Basel)* **12**: 38. 2020.

[79] Jarazo, J., Qing, X., and Schwamborn, J.C. Guidelines for Fluorescent Guided Biallelic HDR Targeting Selection with PiggyBac System Removal for Gene Editing. *Front. Genet.* **10**: 190. 2019.

[80] Extavour, C.G., and Akam, M. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development* **130**: 5869-5884. 2003.

[81] Johnson, A.D., Richardson, E., Bachvarova, R.F., and Crother, B.I. Evolution of the germ line-soma relationship in vertebrate embryos. *Reproduction* **141**: 291-300. 2011.