

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 ゲノム編集ニワトリの高効率作出方法に関する研究

広島大学大学院統合生命科学研究科

食品生命科学プログラム

学生番号 D215745

氏 名 渡邊 天海

ニワトリは、人類の食、産業や研究において幅広く利用されており、ゲノム編集技術の活用は、ニワトリを用いた基礎研究や応用研究に至る様々な分野において、ブレイクスルーをもたらすことが期待されている。

近年、バイオ医薬品をはじめとした組換えタンパク質の需要は、益々増加しており、様々な生産技術の開発が行われている。中でも、遺伝子組換えニワトリによる組換えタンパク質の生産は、低コストで高収量な生産方法として期待されている。それは、高いタンパク質の生産能力に加え、生産系にかかるコストは、従来の細胞培養にかかるコストに比べて低く抑えられる点にある。また、ゲノム編集技術の活用では、従来の遺伝子組換えニワトリによる生産系に比べて卵白内に組換えタンパク質を高濃度で蓄積することも報告されており、ゲノム編集ニワトリの高効率な作出方法の構築は、重要である。そこで、本研究では、ニワトリにおけるゲノム編集の効率化と実用化の際に問題となる鶏卵アレルギーを解決する研究を行った。

研究 1：ニワトリ始原生殖細胞に対するリポフェクション効率の改善とゲノム編集効率

序論

ゲノム編集ニワトリの作出では、1 細胞期受精卵の取り扱いが困難なことから、生殖細胞への分化能を有する始原生殖細胞 (primordial germ cells; PGC) が利用されており、そのため PGC の培養技術が開発されてきた。また PGC でのゲノム編集は、遺伝子改変に必要なベクターをリポフェクション法により導入する必要があるが、これまで PGC への導入効率は低く、改善する必要があった。そこで、本研究では、ベクター導入時に使用する培地に着目し、リポフェクションによるベクター導入効率の向上とゲノム編集における knock-out (KO) と knock-in (KI) 効率を評価した。

材料および方法

(1) 培地中 sodium heparin 濃度とリポフェクションによる遺伝子導入効率

PGC の培養では、sodium heparin が培地添加物として含まれる。そこで異なる濃度の sodium heparin 添加条件下 (0, 0.25, 0.5, 1.0 unit/mL) において、ZsGreen1 発現ベクターを Lipofectamine™3000 により導入した。導入から 2 日後の ZsGreen1 陽性細胞の割合を flow cytometry (FCM) により評価した。

(2) PGC におけるリポフェクションベクター導入効率の最適化

sodium heparin 不含 PGC 培地において、ZsGreen1 発現ベクターを Lipofectamine™2000 あるいは Lipofectamine™3000 を用いて導入し、2 日後の ZsGreen1 陽性細胞の割合を評価した。また、先行研究で利用されている導入時培地間での遺伝子導入効率の比較を行った。先行研究で利用されている導入時培地には、低血清培地 Opti-MEM と PGC 培地の基礎培地 KO-DMEM を用いた。比較には本研究で考案した sodium heparin 不含 PGC 培地を用い、それぞれ ZsGreen1 発現ベクターを導入し、遺伝子導入効率を FCM により評価した。さらに、sodium heparin 不含 PGC 培地におい

て遺伝子導入効率の向上に寄与する因子を探索するため、sodium heparinに加えて、PGCの増殖に寄与するB27 supplement, chicken serum, hFGF2, H1152およびblebbistatinに着目し、これらの成分を含まないPGC培地において遺伝子導入効率を評価した。

(3) CRISPR/Cas9を用いたKOの比較

前項(3)において遺伝子導入効率を評価した3種の培地を用いて、ovomucoid (OVM) 遺伝子を標的としたCRISPR/Cas9発現ベクターとpuromycin耐性遺伝子を有するベクターをLipofectamine™2000により共導入した。薬剤選択の後、ゲノムを抽出し、T7E1 assayやシーケンス解析により変異導入を解析した。また、シーケンスデータより変異導入効率を推定するTIDE toolによりKO効率を算出した。

(4) CRISPR/Cas9を用いたknock-in効率の比較

5'末端側にT2A配列を付加したenhanced green fluorescent protein (EGFP)を有するHRドナーベクターあるいはhomology-mediated end joining (HMEJ)ドナーベクターとβ-actin (ACTB) 遺伝子を標的にしたCRISPR/Cas9ベクターを各培地においてLipofectamine™2000を用いて共導入した。この実験では、修復時にドナーベクターを利用した適切なknock-inが生じるとEGFPが発現することを利用し、EGFP陽性細胞の割合をFCMで算出することでknock-in効率を評価した。

結果と考察

(1) 培地中へパリン濃度とリポフェクションによる遺伝子導入効率

培地中のヘパリンは、濃度依存的に遺伝子導入効率を低下させることが明らかとなり、PGCの遺伝子導入効率の低さは培地中のヘパリンに起因していることが示唆された。

(2) PGCにおけるリポフェクションによる遺伝子導入の最適化

導入試薬の比較から、Lipofectamine™2000はPGCへの遺伝子導入に有用なりポフェクション試薬の一つであることが明らかとなった。PGCの増殖に関わる因子を除いた培地での遺伝子導入では、導入効率が低下したことから、遺伝子導入時の増殖性関連因子の存在が導入効率の向上に寄与していることが示唆された。

(3) CRISPR/Cas9を用いたKOの比較

T7E1 assayでは、3種の培養条件の全てで変異導入が確認された。また、TIDE toolを用いた解析から、本研究で構築したりポフェクション法は、先行研究のものと同様以上の効率でKOを行うことができることが明らかとなった。

(4) CRISPR/Cas9を用いたknock-in効率の比較

HRドナーベクターによるknock-in効率は、いずれも低く、3種の培養条件で差は認められなかった。一方、HMEJドナーベクターによるknock-in効率は、本研究で構築したりポフェクション条件において最も高かった。これらのことから、PGCへのknock-inは、本研究で構築したりポフェクション条件とHMEJ介した手法が最も適していることが示された。

研究2：ニワトリ培養細胞を用いたニワトリバイオリアクターの事前評価系の構築

序論

ゲノム編集ニワトリの作出には、2~3年以上の期間を要するため、生産したい組換えタンパク質の分泌性や機能性は事前に評価することが望ましい。ニワトリによるバイオリアクターでは、多くの研究で卵管特異的に発現する遺伝子を標的にしているため、事前評価系を構築するためには、卵管細胞の培養細胞株が必要となるが、広く普及していない。また、ニワトリを利用したバイオリアクターの研究では、長らく卵白を構成するタンパク質の中で最も多く存在するovalbumin (OVA) 遺伝子座が標的にされてきたが、OVAは胚発生に必須のタンパク質であり、卵白中のOVAを全て所望の組換えタンパク質に置き換えることはできない。加えて、鶏卵を用いた医薬品生産を行う際、アレルゲンの混入の懸念は避けられない。特にovomucoid (OVM)は卵白中の代表的なアレルゲンであり、物理化学的安定性が高く、実際に鶏卵を用いた季節性インフルエンザワクチンに混入していることが明らかとなっている。即ち、鶏卵での医薬品生産を構築する場合、OVMは除去することが望ましい。さらに、OVMはOVAとは異なり、胚発生に必須のタンパク質ではないこともわかっており、また卵白

中の含有量も多い。そこで、本研究では、細胞内で恒常的に機能する EF1 α promoter を OVM 遺伝子上流に knock-in することで、OVM 発現細胞を樹立し、OVM 遺伝子座における組換えタンパク質の生産性を評価する事前評価系の構築を行った。

材料および方法

- (1) EF1 α knock-in DF-1 細胞株の樹立
DF-1 細胞株の OVM 遺伝子上流へ EF1 α promoter を有するドナーベクターを precise integration into target chromosome (PITCh) system により挿入した。薬剤選択の後、限界希釈法により DF-1 細胞のクローニングを行い、PCR を用いて各クローンの接合型を評価した。
- (2) EF1 α knock-in DF-1 細胞における OVM の発現解析
EF1 α promoter の制御下における OVM 遺伝子の適切な転写を評価するために、RT-PCR を行った。また、シーケンス解析により OVM 転写産物の塩基配列を決定し、NCBI に登録されている OVM 転写産物と比較した。さらに、培養上清中に分泌される OVM タンパク質を評価するため、OVM に対する特異抗体を用いた western blot および sandwich ELISA を行った。
- (3) OVM 発現細胞の OVM 遺伝子座への hFGF2 遺伝子の knock-in
樹立した OVM 発現細胞を用いて、幹細胞培養や再生医療等で用いられる hFGF2 の生産が可能であるかを検証した。hFGF2 遺伝子を PITCh system により OVM 遺伝子座へ挿入した。薬剤選択の後、限界希釈法により細胞のクローニングを行い、PCR を用いて各クローンの接合型を評価した。
- (4) hFGF2 knock-in DF-1 細胞における OVM の発現解析
樹立した hFGF2 knock-in 細胞の培養上清中の OVM タンパク質は、western blot および sandwich ELISA によって検出した。
- (5) hFGF2 knock-in DF-1 細胞における hFGF2 の発現解析
樹立した hFGF2 knock-in DF-1 細胞の培養上清中の hFGF2 タンパク質は、sandwich ELISA により定量した。

結果と考察

- (1) EF1 α knock-in DF-1 細胞株の樹立
本研究では、OVM 遺伝子上流に EF1 α promoter を挿入したヘテロ接合型細胞株#2 およびホモ接合型細胞株#3 をそれぞれ取得した。
- (2) EF1 α knock-in DF-1 細胞における OVM の発現解析
各細胞株#2 および#3 は、それぞれ適切なスプライシングを受けた OVM 転写産物を有していることが明らかとなった。このことから、EF1 α promoter の挿入は、細胞内の内在遺伝子を発現させる戦略として有効であることが示唆された。
- (3) OVM 発現細胞の OVM 遺伝子座への hFGF2 遺伝子の knock-in
EF1 α promoter と同アレルに hFGF2 遺伝子が挿入された細胞株#2-3 および#3-4 を取得した。これらの細胞は、hFGF2 遺伝子の挿入が、#2-3 がヘテロ接合型であり、#3-4 がホモ接合型である。
- (4) hFGF2 knock-in DF-1 細胞における OVM の発現解析
樹立した細胞株#2-3 および#3-4 の培養上清中における OVM タンパク質は、western blot では検出されず、sandwich ELISA でも検出限界以下であった。したがって、OVM 遺伝子座への hFGF2 遺伝子の knock-in により OVM 発現は欠損したことが示唆された。
- (5) hFGF2 knock-in DF-1 細胞における hFGF2 の発現解析
細胞株#2-3 の培養上清中における hFGF2 タンパク質は、sandwich ELISA で検出限界以下であった。一方で、細胞株#3-4 の培養上清から sandwich ELISA において約 500 pg/mL の濃度で検出された。ただし、分泌量は OVM 発現細胞における OVM タンパク質の分泌能に比べると極めて低いことがわかった。hFGF2 の分泌経路は、一般的な分泌タンパク質の小胞輸送を介さないことが知られており、輸送経路における分泌性の違いが示唆された。今後は、抗体などの小胞輸送を介した有用タンパク質での検証が必要であろう。

総括

本研究では、ゲノム編集ニワトリによるバイオリアクターの作出を最終目的として、効率的なゲノム編集ニワトリの作出方法に関する基盤技術の開発を行なった。本研究で得られた成果を基盤とし、高効率な遺伝子改変技術や細胞培養技術の開発を進めていくことで、ゲノム編集ニワトリを用いた産業応用のさらなる進展が期待される。