

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 学 術 )	氏名	渡邊 天海
学位授与の要件	学位規則第4条第1・2項該当		
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 (Study on highly efficient production methods of genome-edited chickens)			
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	助 教	松 崎	芽 衣
〔論文審査の要旨〕			
<p>本論文は第1章緒言、第2章「ニワトリ始原生殖細胞における遺伝子導入効率の改善とゲノム編集効率」、第3章「ニワトリ培養細胞を用いたニワトリバイオリクター事前評価系の構築」、第4章総合考察、第5章総括から構成されている。</p> <p>第1章では、研究の背景として、ニワトリにおけるゲノム編集技術の難しさや、その応用用途（アレルゲンの低減や物質生産など）が拡大していることが説明されている。しかしながら、ニワトリでゲノム編集を行うためには、現状、始原生殖細胞（PGC）を初期胚から回収し、ゲノム編集を行わなければならないが、回収できるPGCの数が少ないため、一旦、<i>in vitro</i>で培養増殖させたのちに利用しなければならない。ニワトリPGCの培養技術はここ数年で大きな進展を見せてきたが、ゲノム編集などの遺伝子改変を行うには、遺伝子導入技術の改変などの技術開発が必要であることが示された。さらに、改善された技術を応用していく上で、応用例の1つであるニワトリバイオリクター化での評価系が乏しいことが指摘されていた。</p> <p>第2章では、ニワトリPGCの遺伝子導入効率の低さが遺伝子改変技術の適用の障壁になっていることに焦点を絞り、その要因を明らかにする研究が行われた。ニワトリPGCの培養系には、線維芽細胞増殖因子2（FGF2）の添加が必須であるが、FGF2の培養液中での安定性を維持するためには、ヘパリンの添加が重要である。ヘパリンは分子中に多数含まれる硫酸基が負に帯電しているため、遺伝子導入に使用される陽性荷電物質であるリポフェクション試薬が遺伝子との結合を競合阻害している可能性がある。そこでこの点を調べたところ、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った。次に、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。以上の条件を組み合わせ、CRISPR/Cas9を用いたノックアウトとノックインへの適用を評価した。その結果、本研究で構築したりポフェクション法は、先行研究の手法と比較しても効果的にニワトリPGCに対してゲノム編集が行えることがわかった。</p> <p>第3章では、第2章で構築した高効率遺伝子導入方法の応用例として、ニワトリバイオリクターへの適用を検討した。PGC鶏卵バイオリクター化では、卵白中の最大成分であるオボアルブミン（OVA）の転写翻訳系の利用が主流であるが、OVAは鶏卵中で胚発生</p>			

の必須タンパク質であり、OVA を全て有用タンパク質に置換することはできない。そのため、現状、鶏卵1個あたりのOVA量が2gであるの対して、現状の手法では60mgの低生産量になっている。そこで、本研究では、鶏卵中に約400mg以上含まれており、また厄介なアレルゲンであるオボムコイド(OVM)に着目した。OVMは、OVAと異なり胚発生の必須タンパク質ではなく、完全に他のタンパク質に置換することが可能であり、また生産物のOVMフリー鶏卵としての安全利用にも貢献できることが予想された。そこで、本研究ではまずOVM遺伝子を強制発現させたニワトリ胚線維細胞株であるDF1細胞を樹立した。次に、この細胞株を用いて、OVM遺伝子座へヒト線維芽細胞増殖因子(hFGF2)遺伝子をノックインすることでOVMをノックアウトしてhFGF2発現させることに成功した。

第4章では、それぞれの本研究成果に対して、これまでの知見と比較する形で、総合考察が行われていた。なお本研究は、遺伝子改変ニワトリを作出する上で、遺伝子導入効率に問題のあったPGCの培養系の改変と遺伝子導入方法を提案している。さらに本手法を有効活用する手法として、アレルゲンノックアウトと有用物質生産を両立させた方法を構築し、その事前評価系も構築した

本研究は、ニワトリPGCのゲノム編集を含む遺伝子改変技術を高効率化させる手法を発見した。またこの手法を活用するひとつの手法として、厄介なアレルゲンであるOVMをノックアウトした上で、高収量のタンパク質生産系とその評価方法を検証した。今後、これらの成果は、ニワトリでの遺伝子改変技術に大きな発展をもたらすことが期待される。

以上、審査の結果、本論文は統合生命科学研究科学位論文評価基準を満たし、渡邊氏は博士(学術)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。