

博士論文

ゲノム編集ニワトリの高効率作出方法に関する研究

令和6年3月

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

ゲノム編集先端人材育成プログラム

渡邊天海

## 目次

	頁
第1章 緒言	3
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	11
第1部 序論	12
第2部 材料および方法	15
第3部 結果	22
第4部 考察	32
第5部 小括	36
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	37
第1部 序論	38
第2部 材料および方法	39
第3部 結果	46
第4部 考察	60
第5部 小括	63
第4章 総合考察	64
第5章 総括	69
参考文献	74

## 第1章 緒言

ゲノム編集は、任意の標的配列に対し DNA の二本鎖切断 (double strand break; DSB) を導入し、その修復過程において変異を導入する遺伝子改変の方法である。これまで、任意の標的配列を切断することのできる部位特異的ヌクレアーゼとして、zinc finger nuclease (ZFN) (Y. G. Kim et al., 1996) や transcription activator like effector nuclease (TALEN) (Miller et al., 2011), clustered regulatory interspaced palindromic repeat/CRISPR-associated proteins 9 (CRISPR/Cas9) (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013; Jinek et al., 2012) が開発、発見され、ゲノム編集ツールとして利用されてきた。特に CRISPR/Cas は、構築のしやすさ、汎用性の高さからさまざまな生物種や細胞種で適用が拡大されるだけでなく、小型 Cas の探索・開発やより精密で高活性型の Cas の開発 (Vakulskas et al., 2018) も行われており、今では欠かすことのできない技術となっている。

これらのゲノム編集ツールが細胞へ導入されると、核内で標的ゲノムの二本鎖切断が生じ、切断されたゲノム DNA は細胞が持つ修復機構によって修復される。この修復経路は、相同末端を必要としない非相同末端再結合 (non-homologous end joining; NHEJ) と相同配列に依存した相同組換え修復 (homology directed repair; HDR) に大別される。遺伝子の破壊 (knock out; KO) では、NHEJ や HDR の一部の経路が利用されることが知られており、比較的小規模な欠損や挿入により機能的な遺伝子の破壊を行うことができる。また、外来遺伝子の挿入 (knock-in) では、それぞれの修復経路を利用した方法が開発されており、細胞種や目的によって使い分けられる。相同組換え修復 (Homologous recombination; HR) を介した knock-in 手法は、一般的な knock-in 手法であり、挿入したい遺伝子の両末端に 500 bp から数 kbp の相同配列を必要とする。一方で、マイクロホモロジー媒介末端結合 (microhomology-mediated end joining; MMEJ) を介した knock-in 手法は、precise integration into target chromosome (PITCh) システムと呼ばれ、必要な相同配列が数 bp から 40 bp ほどであり、設計が簡便で高効率な knock-in 方法として報告され (Nakade et al., 2014), CRISPR/Cas9 及び TALEN の両方で使用実績

がある (Aida et al., 2016; Sakuma et al., 2016). また, NHEJ を介した homology-independent targeted integration (HITI) 法は, 相同配列を必要としない knock-in 手法であり, 非分裂細胞への knock-in も可能であることが示されている (Suzuki et al., 2016). 加えて, 近年では, 数百 bp の相同配列で HR よりも効率よい knock-in 手法として知られる homology-mediated end joining (HMEJ) 法 (Yao et al., 2017) や長鎖の一本鎖 DNA をドナーとして使用する efficient additions with ssDNA insert-CRISPR (easi-CRISPR) 法 (Miura et al., 2015; Quadros et al., 2017) など様々な knock-in 方法が開発されている.

ゲノム編集技術は, 様々な生物種で活用されており, ニワトリも例外ではない. ニワトリは我々の生活を支える重要な家禽である. 鶏肉や鶏卵は世界的にも重要なタンパク源であり, 食糧生産を考える上で欠かすことはできない. また, 産業面ではインフルエンザワクチンがニワトリの発育鶏卵を用いて生産されてきた. さらに, 遺伝子組換えニワトリを作出できるようになり, 鶏卵を利用した医薬品タンパク質の生産にも利用されている. 特に近年では, ゲノム編集技術の活用により, 思い通りの変異を導入できることから, ゲノム編集ニワトリの活用は生命現象を探究する基礎研究から産業応用を見据えた応用研究まで広がりを見せている.

卵白の主要なタンパク質であり, アレルゲンとしても知られる ovalbumin (OVA) や ovomucoid (OVM) を KO した報告 (Oishi et al., 2016; T. S. Park et al., 2014) は, それぞれニワトリの遺伝子改変に CRISPR/Cas9 および TALEN を使用した初めての報告である. また, Ezaki らにより作出された OVM 欠損ニワトリは, ゲノム上の off-target 変異や鶏卵における OVM タンパク質, フレームシフト変異によって生じることが予想される変異 OVM ペプチドが検出されず, 低アレルゲン鶏卵としての食品応用の可能性が示唆された (Ezaki et al., 2023). 一方で, ゲノム編集技術は基礎研究にも利用されており, 生殖細胞に特異的に発現する chicken vasa homolog (CVH) や deleted in azoospermia like (DAZL) を標的に蛍光タンパク質遺伝子を knock-in することで, 生体内での生殖細胞

の分化過程を追跡できる系が作られた (Ezaki et al., 2022; Rengaraj, Cha, et al., 2022; Taylor et al., 2017). さらに, 性決定因子である *doublesex and mab-3-related transcription factor 1* (DMRT1) やインフルエンザウイルスの増殖に関与している *acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32* (ANP32) 遺伝子ファミリーに数塩基の変異を導入したゲノム編集ニワトリも作出され, 性決定様式の解明やトリインフルエンザ抵抗性に関する研究に用いられている (Idoko-akoh et al., 2023; Ioannidis et al., 2021). このように, ニワトリでは基礎から応用まで幅広くゲノム編集が活用されており, 今後もゲノム編集個体による研究の発展が期待される.

これまで示してきた遺伝子組換えニワトリは, 一般的に配偶子の前駆細胞である始原生殖細胞 (*primordial germ cells*; PGC) を介した方法で作出される (図 1). 一般的な脊椎動物のゲノム編集個体の作出方法では, モザイク性を避けるために 1 細胞期受精卵に対して遺伝子操作を行う. しかし, ニワトリ受精卵は卵黄が豊富であること, 1 細胞期受精卵の取得が困難であることから, 受精卵を直接的に遺伝子操作することで個体を作成することは現時点では現実的な方法ではない. その中で, ニワトリでは PGC の単離・培養技術が開発され, 遺伝子操作を施した培養 PGC を移植した生殖系列キメラニワトリを介して遺伝子改変ニワトリが作出された (Van De Lavoie et al., 2006). その後, より安定した PGC の長期培養系が確立され (Dehdilani et al., 2023; Ezaki et al., 2020; Whyte et al., 2015), 培養 PGC への遺伝子改変は行いやすくなった. さらに最近では, 薬剤処理により内在性の PGC を除去できるようなシステムが開発され (Ballantyne et al., 2021; Chen et al., 2023), PGC を介した遺伝子改変ニワトリの作出は効率化されてきた.

しかしながら, 培養 PGC への遺伝子改変は未だ効率よく行えず, 遺伝子改変 PGC の取得効率は低い. 培養 PGC への遺伝子改変では, ゲノム編集ツールを発現するプラスミド DNA などを PGC へ導入する必要がある. しかしながら, PGC への遺伝子導入効率は極めて低く (Oishi, 2010; Wang et al., 2017), これがゲノム編集 PGC の取得を困難に

している原因であると考えられる。したがって、ゲノム編集ニワトリを利用した研究分野では、培養 PGC における適切な遺伝子導入方法を確立し、ゲノム編集 PGC を取得しやすくすることが求められる。

ニワトリはワクチン以外の医薬品生産にも用いられることが期待されている。近年、バイオ医薬品市場は拡大しており、組換えタンパク質の生産技術の開発の重要性が高まっている。バイオ医薬品とは、遺伝子組換え技術と細胞培養技術など生物由来のタンパク質生産能力を利用して生産されるタンパク質を有効成分とする医薬品であり、生物学的製剤や遺伝子組換え医薬品とも呼ばれる。標的特異性の高さから副作用は低く、高い治療効果が得られることが期待されており、現在では生理活性タンパク質から抗体まで幅広く展開されている。さらに、組換えタンパク質は病気の診断、再生医療等にも利用されることから需要の高さがうかがえる。これらの組換えタンパク質の生産には一般的に培養細胞を利用する方法が用いられている。培養細胞は遺伝子操作をやすく、遺伝子工学的な技術により目的の活性タンパク質を作らせることができる。一方で、医薬品として生産するためには、細胞を大量に培養する必要があり、生産用のタンクや培地、生産過程における特許等、生産コストが大きいという課題を抱えている。そこで、培養細胞に替わりうる組換えタンパク質の生産手段として注目されてきたのが動植物を利用した生産方法である (Houdebine, 2009)。

動植物をバイオリクターとする利点として、導入、生産、スケールアップにかかるコストの低さ、そしてタンパク質合成の高生産性が挙げられ、従来の細胞培養にかかるコストを低く抑えられることが期待されている。また、動物バイオリクターによって生産されるタンパク質はヒトと類似した構造や修飾を持つ。ウシやウサギ、ヤギなど哺乳動物の乳腺細胞やニワトリの卵管細胞はそれぞれ乳や卵白に代表されるようにタンパク質の生産に特化した器官であり、優れたバイオリクターとしての能力が評価されてきた。遺伝子組換えヤギにより生産されるアンチトロンビン（商品名：ATryn）は、

遺伝子組換え動物で生産される世界初の医薬品として 2006 年に欧州, 2009 年にアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) で認可されており, 他の遺伝子組み換え動物由来のバイオ医薬品も複数認可されている (Bertolini et al., 2016; Sheridan, 2016).

ニワトリは 1 羽あたり年間 300 個ほどの卵を産む高い生産性に加え, 哺乳動物よりもライフサイクルは早く, 1 羽あたりの飼育スペースも小さいことから, スケールアップのしやすさにおいて利点がある. さらに生産されるタンパク質の糖鎖修飾は非抗原性であることが確認されている (J. S. Park et al., 2023; Zhu et al., 2005). これまでニワトリをバイオリクターとして用いる際, ovalbumin (OVA) 遺伝子が着目されてきた. OVA は卵白中の最も代表的な構成成分であり, 卵管特異的に発現することからニワトリ生体への影響も最小限に抑えつつ高収量の組換えタンパク質が得られると期待される. これまで, interferon- $\alpha$ 2 や Fc 融合 colony-stimulating factor-1 (CSF1), interferon- $\beta$ -1a, ヒト化 scFv-Fc (miR24), epidermal growth factor (EGF), erythropoietin (EPO) などの有用タンパク質を生産する遺伝子組換えニワトリが作出され, 卵白中にこれら組換えタンパク質が蓄積することが報告されている (Herron et al., 2018; Kwon et al., 2018; Lillico et al., 2007; T. S. Park et al., 2015). 加えて, ライソゾーム病の 1 種であるライソゾーム酸性リパーゼ欠損症の治療薬として知られるセベリパーゼ アルファ (商品名: カヌマ) は遺伝子組換えニワトリを利用して生産された初の医薬品であり, アメリカ, ヨーロッパ, 日本などで承認されている (Sheridan, 2016).

先に紹介した組換えタンパク質を生産することのできる遺伝子組換えニワトリは, クローニングされた OVA プロモーターと組換えタンパク質遺伝子の発現カセットをウイルスベクターによりニワトリゲノムへ組み込むことで作出されてきた. これらのニワトリは, 卵管で組換えタンパク質を発現するが, ほとんどの場合で卵白中の所望の組換えタンパク質の収量が低いことやウイルスに由来する配列のサイレンシングの懸念, 世代



を経るごとに収量が低下することが指摘されてきた。近年では、ゲノム編集技術を用いることで、ウイルス由来の配列を持ち込まずにニワトリゲノムを改変することが可能となり、これらの課題は解消されつつある。また、ゲノム編集技術は、内在性のプロモーターの利用を可能とした。Oishi らや Mukae らは、OVA 遺伝子座へ interferon- $\beta$  遺伝子あるいは抗体遺伝子 (anti-HER2 mAb) を knock-in したゲノム編集ニワトリを作出した。これにより、彼らは内在性 OVA プロモーターを利用して卵白中に組換えタンパク質を蓄積させることに成功しており、従来の遺伝子組換えニワトリよりも高収量であることを報告している (Mukae, Okumura, et al., 2021; Oishi et al., 2018)。また、同遺伝子座は adiponectin の生産にも利用できる可能性も報告されている (Y. M. Kim, Park, et al., 2023)。Albumin 遺伝子座に hIgG1 Fc 遺伝子が挿入されたニワトリは、血清や卵黄中に hIgG1 Fc を蓄積することが報告されており (J. S. Park et al., 2023)、ゲノム編集ニワトリによる医薬品生産の可能性が示されつつある。

ゲノム編集ニワトリによるバイオリクター研究では、OVA 遺伝子座を利用した研究が多く報告されてきたが、その収量は培養細胞によるバイオリクターと比較して高いとは言えない。この要因として OVA 遺伝子は胚発生に重要であり、両アレルに所望のタンパク質遺伝子を組み込むことができないためであると考えられる。これまで報告されたゲノム編集ニワトリは、いずれも OVA の発現量を担保するため、組換えタンパク質遺伝子は片アレルにのみ knock-in されている。卵白タンパク質遺伝子を所望の有用タンパク質遺伝子に置き換えるためには、胚発生等に影響がない遺伝子を選択する必要がある。本研究室のこれまでの研究から、卵白を構成するタンパク質の中でも OVM の欠損は胚発生や子孫の成長に目立った影響を与えないことがわかっている。OVM は、卵白中の約 12% を占めており卵 1 個あたり約 500 mg 含まれる。また、物理化学的安定性の高いアレルゲンとしても知られ、食品応用やワクチン利用のために OVM の欠損が望まれてきた。OVM 欠損ニワトリは子孫を残せることから、OVM 遺伝子座の利用は、

安定的な有用タンパク質の生産と低アレルギーでの生産を両立できると考えられる。

加えて、ゲノム編集ニワトリは作出までに2-3年ほどの期間を要するため、生産されたタンパク質の分泌性や機能性、品質を評価するまでに時間がかかる点もニワトリバイオリアクターの課題である。特に、ゲノム編集ニワトリを作出後に所望の組換えタンパク質が分泌されない、生産されないとなれば、バイオリアクターの構築を最初からやり直さなければならない。この課題に対する解決策として、培養細胞株を利用した事前評価系を構築することが挙げられる。ゲノム編集個体を作出する前に分泌性や機能性等を事前に評価することができれば、バイオリアクターによって得られるタンパク質の分泌性や機能性について見通しを立てることができる。OVA や OVM のような卵白タンパク質は卵管上皮細胞特異的に発現しているが、この特徴を有する培養細胞株は長期培養が困難であり、十分に普及していない。また、実験の度にニワトリから卵管上皮細胞を採取することも実験に制限をかけてしまうため現実的ではない。これまで、OVA に関してはゲノム上の調節領域に関する研究が重ねられ、近年では TATA box 周辺に CRISPRa system (dCas9-VPR) を作用させたり、調節領域内の negative regulatory element (NRE) を CRISPR/Cas9 によって取り除いたりすることで胚線維芽細胞株 (DF-1 細胞) において OVA を発現させることに成功している (Shi et al., 2020; Yousefi Taemeh et al., 2023)。しかしながら、OVM 遺伝子は調節領域の存在が明らかになっていないため、このような報告と同じ戦略をとることができない。そこで、OVM 発現細胞の取得はこれらの報告とは異なる戦略により取得しなければならない。

これらの背景から、本研究では、バイオリアクターとしてのゲノム編集ニワトリを効率よく作出するための基盤構築を目的とした。第2章では、ニワトリ PGC における遺伝子導入効率の最適化を図ることで、ゲノム編集効率の向上に取り組んだ。第3章では、ニワトリ培養細胞株で本来卵管特異的に発現する OVM をゲノム編集技術により発現させ、ニワトリによるバイオリアクターを事前に評価できる系の構築に取り組んだ。

## 第2章

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

## 第1部 序論

前章で述べたように、ゲノム編集ニワトリの作出は基礎研究から応用研究に至る幅広い分野に貢献しうることが期待されている。遺伝子改変ニワトリの作出には配偶子への分化能を有する始原生殖細胞（PGC）を介した方法がとられており、PGCの培養方法の確立はニワトリでの遺伝子工学の発展に大きく貢献した。PGCへのゲノム編集では、ゲノム編集ツールをPGCへ導入する必要があるが、リポフェクションやエレクトロポレーションといった導入方法が用いられてきた。

エレクトロポレーション法は、電気刺激を利用した高効率な遺伝子導入方法として知られており、専用の装置を必要とする。当研究室でも4D-Nucleofector®を用いたエレクトロポレーションによる遺伝子導入条件を検討したが、導入後のPGCを維持することができなかった。他方で、リポフェクション法は、カチオン性の脂質やポリマーを利用した方法であり、簡便で汎用的な遺伝子導入方法として普及している。しかしながら、ニワトリPGCへのリポフェクションによる遺伝子導入は効率が低い (Oishi, 2010; Wang et al., 2017)。したがって、ニワトリPGCへの簡便な遺伝子導入を達成するためには高効率なリポフェクション法の改善が求められる。

PGCにおけるリポフェクション効率の改善は、密度勾配遠心によるPGCの精製により達成できることが報告されており、培養培地におけるデブリや毒性物質の存在が示唆されている (Chojnacka-Puchta et al., 2015; Oishi, 2010)。また、ゲノム編集ニワトリを作出した報告のいくつかでは、PGCの遺伝子導入を培養とは異なる培地条件で行っており、培養培地中にリポフェクションを阻害する因子が含まれている可能性が推察される。

そこで、本研究ではPGC培地の構成要素の1つである sodium heparin（ヘパリン）に着目し、リポフェクション効率への影響を評価した。加えて、リポフェクション試薬の検討、その他培養因子のリポフェクション効率への影響を評価することでPGCにおけ

る効率的な遺伝子導入の確立, さらにはゲノム編集効率について評価した.

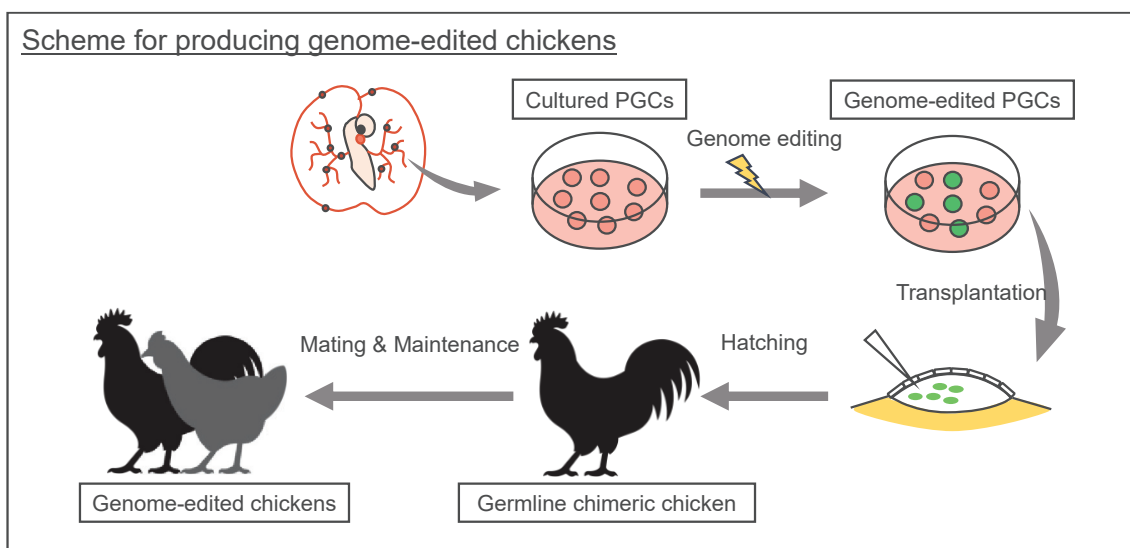


図1. PGCを介したゲノム編集ニワトリ作出の概要図.

## 第2部 材料および方法

### (1) 細胞培養

本研究では、横斑プリマスロック種由来の始原生殖細胞 (PGC) および American Type Cell Collection より購入したニワトリ線維芽細胞株 DF-1 細胞 (#CRL-12203) を使用した。PGC は、1×B-27 Supplement Minus vitamin A (Thermo Fisher Scientific) 1× GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific), 1× EmbryoMAX nucleosides (Merck, Darmstadt, Germany), 1× MEM non-essential amino acids (Thermo Fisher Scientific), 1× sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific), 1% chicken serum, 1× monothioglycerol (Wako Pure Chemical Industries), 10 ng/mL human fibroblast growth factor-2 (hFGF2) (PeproTech), 1 unit/mL sodium heparin (Merck), 0.2 mM H1152, 0.2 mM Blebbistatin (Wako Pure Chemical Industries)を含む KnockOut™ DMEM (Thermo Fisher Scientific) を用い、38°C, 5% CO<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub> 下で培養した。

### (2) 培養細胞におけるリポフェクション効率の算出

緑色蛍光タンパク質 ZsGreen1 を発現するベクターを PGC へリポフェクションにより導入し、2 日後の生細胞に占める ZsGreen1 陽性細胞の割合をリポフェクション効率として算出した。ZsGreen1 発現ベクターは、当研究室にて pBApo-EF1α-pur ベクターに ZsGreen1 遺伝子を挿入することで作製された。また、リポフェクション効率の算出には Cell Sorter MA900 (Sony) を使用した。

### (3) ヘパリンおよびプロタミンに着目したリポフェクション効率

異なるヘパリン濃度 (0, 0.25, 0.5, 1.0 unit/mL) の PGC 培地 1mL に  $2 \times 10^5$  cells となるように細胞数を調製した PGC を懸濁し、12-well plate に播種した。その後、

ZsGreen1 発現ベクター1  $\mu\text{g}$  を Lipofectamine<sup>TM</sup>3000 (Thermo Fisher Scientific) で導入し、前項の方法にてリポフェクション効率を算出した。

Protamine sulfate (プロタミン) が、ヘパリンによるリポフェクション阻害を中和するか評価するために、ヘパリン 1 unit/mL を含む通常 PGC 培地 1 mL に  $2 \times 10^5$  cells 含まれるように PGCs を調製し 12-well plate に播種した。その後、プロタミンを 1, 5, 10, 15  $\mu\text{g/mL}$  となるように培地へ添加し、前項に示した方法にてリポフェクション効率を算出した。

#### (4) PGCs におけるリポフェクション条件の最適化

PGC におけるリポフェクション条件を最適化するために、リポフェクション試薬の検討と先行研究でゲノム編集ニワトリの作出に用いられたリポフェクションとの比較を行った。

まず、PGC への遺伝子導入で使用され、市販されている 2 種のリポフェクション試薬 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 および Lipofectamine<sup>TM</sup>3000 を用いたリポフェクション効率を評価した。ヘパリン不含 PGC 培地 500  $\mu\text{L}$  で  $1 \times 10^5$  cells の PGC を 24-well plate に播種し、500 ng の ZsGreen1 発現ベクターを Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 あるいは Lipofectamine<sup>TM</sup>3000 を用いて導入した。リポフェクション効率は (3) に示した方法にて算出した。

これまでの報告では、PGC のリポフェクションでは Opti-MEM 培地のような PGC に必要とされる因子を含まない条件下で遺伝子導入されている。そこで、増殖因子非添加の培地条件とヘパリンのみを除いた PGC 培地条件を用いてリポフェクション効率を比較した。増殖因子非添加の培地には、論文での報告のある低血清培地 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) , PGC 培地の基礎培地として用いられている KnockOut<sup>TM</sup> DMEM を使用した。PGC  $1 \times 10^5$  cells をそれぞれの培地 500  $\mu\text{L}$  で 24-



well plate に播種し、500 ng の ZsGreen1 発現ベクターを Lipofectamine™2000 を用いて導入した。リポフェクション効率は (3) に示した方法にて算出した。

さらに、ヘパリンフリーPGC 培地下における PGC へのリポフェクション効率の効果が高いことを追求するため、ヘパリン以外の増殖因子に着目して、それぞれの因子 (B-27 supplement, chicken serum, hFGF2) とリポフェクション効率の関係を評価した。PGC  $1 \times 10^5$  cells をヘパリンとそれぞれの因子を除いた培地 500  $\mu$ L で 24-well plate に播種し、500 ng の ZsGreen1 発現ベクターを Lipofectamine™2000 を用いて導入した。リポフェクション効率は (3) に示した方法にて算出した。

#### (5) ベクターの構築

本研究では OVM 遺伝子座と ACTB 遺伝子座を標的とした CRISPR/Cas9 ベクターを構築した。これらのベクターは、共に pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas ベクター (Addgene #42230) に sgRNA の鋳型となるアニーリングした合成オリゴを Bpi I (Thermo Fisher Scientific) および Ligation high ver.2 (Toyobo) を用いて挿入することで作製した。それぞれの遺伝子座を標的とする sgRNA は CRISPR direct software (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて設計した。設計したオリゴの塩基配列は表 1 に示す。

また、ACTB 遺伝子の下流に T2A-EGFP を挿入するための HR ドナーベクターおよび HMEJ ドナーベクターを作製した。HR ベクターは、PCR により増幅断片化した ACTB ホモロジーベクター、T2A-EGFP を In-Fusion HD cloning kit (TaKaRa Bio) を用いてライゲーションすることで作製した。ACTB ホモロジーベクターは、TA クローニングにより作製し、T2A-EGFP は pEGFP-N1 ベクターより増幅した。HMEJ ドナーベクターは、HR ドナーベクターを改変することにより作製した。ベクター作製の概略図と使用したプライマーはそれぞれ図 2 と表 1 に示す。PCR には KOD

One® PCR Master Mix (Toyobo Co., Ltd.) を用いた.

#### (6) PGC における OVM 遺伝子の KO

OVM 遺伝子を標的とした CRISPR/Cas9 ベクターを PGC へ導入し, T7EI assay およびシーケンス解析により KO 効率を評価した. T7EI assay は, ヘテロデュプレックスを形成した二本鎖 DNA を認識し切断する T7 endonuclease を用いて, ゲノム編集に由来するインデル変異を検出する方法である (Hye et al., 2009; Vakulskas et al., 2018).

OVM 遺伝子を標的とした CRISPR/Cas9 ベクターと puromycin 耐性遺伝子カセットを有するベクターを Opti-MEM, KnockOut™ DMEM, ヘパリン不含 PGC 培地でリポフェクションにより導入し, 6 時間後に通常の PGC 培地へと培地交換した. 導入から 2 日後に puromycin 1 µg/mL で薬剤選択を 2 日間実施した. その後, 十分に増殖した細胞からゲノムを抽出し, genomic PCR を行った. ゲノム抽出には Puregene® Core Kit A (QIAGEN), genomic PCR には TaKaRa LA taq® (TaKaRa Bio) を使用した. 使用したプライマーは表 1 に示す. PCR 産物は, リハイブリダイズによりヘテロデュプレックスを形成させた後, Alt-R® Genome Editing Detection kit (IDT Inc. IA) を用いて T7EI assay を行った. PCR 産物および T7EI assay 後の産物は, アガロースゲル電気泳動により確認した. さらに, PCR 産物の一部は, SpreDye v3.1 Cycle Sequencing kit (AdvancedSeq) を用いてサイクルシーケンスを行い, SeqStudio™ genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific) によりシーケンスを解析した. 得られたシーケンス配列は TIDE analysis web tool (<https://tide.nki.nl/>) を用いてインデル変異の割合を算出した.

#### (7) PGC における knock-in 効率の評価

PGC において恒常的に発現する ACTB 遺伝子座を利用し, knock-in 効率を評価

した. ACTB 遺伝子座を標的とした CRISPR/Cas9 ベクターおよびプロモーターレスな EGFP ドナーベクターを PGC へ共導入し, 適切な knock-in が生じた際に EGFP の蛍光を観察することができることを利用し, knock-in 効率を評価した. EGFP ドナーベクターには, 約 500 bp のホモロジーと EGFP 遺伝子を含む HR ドナーベクターと両ホモロジーの外側に Cas9 による切断箇所を持つ HMEJ ドナーベクターの 2 種のベクターを作製した.

それぞれのベクターは Opti-MEM, KnockOut™ DMEM, ヘパリンフリーPGC 培地で Lipofectamine™2000 を用いたリポフェクションにより導入し, 6 時間後に通常の PGC 培地へと培地交換した. 導入から 4 日後における生細胞に占める EGFP 陽性細胞の割合を knock-in 効率として算出した. knock-in 効率の算出には Cell Sorter MA900 を用いた.



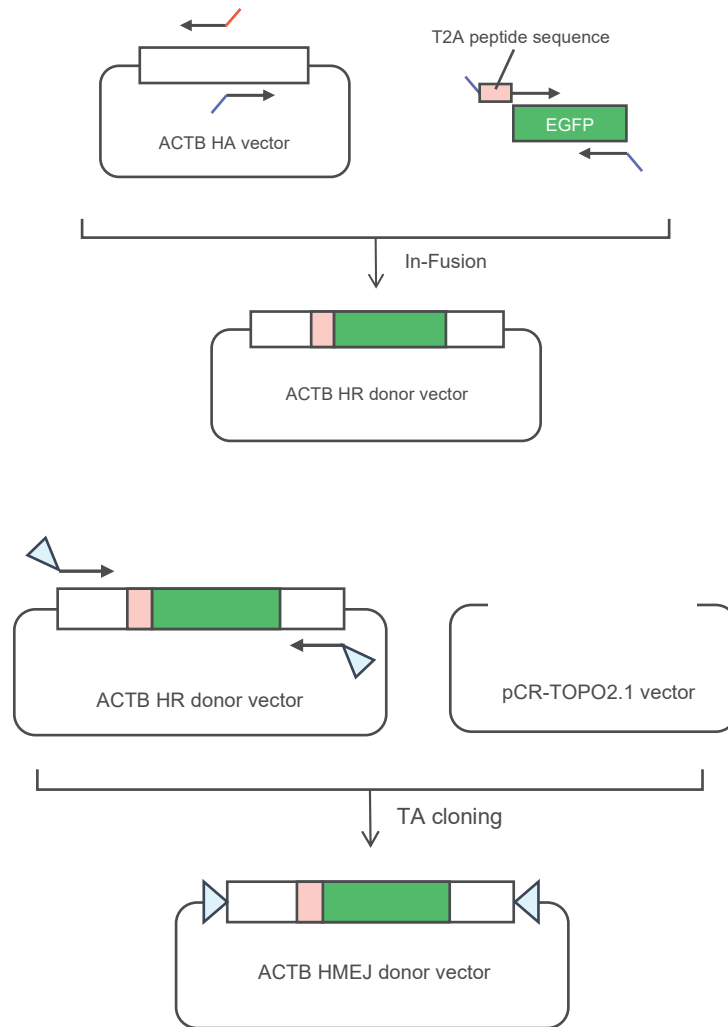


図2. ACTB HR donor vectorおよびACTB HMEJ donor vectorの構築過程の概要図. 各黒矢印はプライマーを示し, 矢印の末端に付与されている赤, 青, 緑の棒線はIn-Fusion反応における方向性を表す. また, 三角形はsgRNAの標的配列を示している.

### 第3部 結果

#### (1) 培地中ヘパリンによるリポフェクションの阻害

PGC 培地に添加されるヘパリンがリポフェクション効率に与える影響について評価した。ヘパリン含有培地(通常 PGC 培地)あるいは不含培地において、ZsGreen1 発現ベクターを Lipofectamine™3000 により導入した。その結果、ZsGreen1 発現細胞は、ヘパリン不含培地では観察されたが、ヘパリン含有培地ではほとんど観察されなかった(図 3A)。また、異なるヘパリン濃度(0, 0.25, 0.5, 1.0 unit/mL)の培地条件下にて、同様に ZsGreen1 発現ベクターを導入し、フローサイトメトリーによりリポフェクション効率を算出した。その結果、リポフェクション効率はヘパリン濃度が高くなるにつれて有意に低下することが明らかとなった(図 3B)。

#### (2) Protamine sulfate によるヘパリン存在下でのリポフェクション効率の回復

プロタミンは、塩基性アミノ酸を豊富に含むペプチドであり、医療分野ではヘパリンの中和剤として、核酸送達分野ではカチオン性バイオポリマーの1つとして用いられている(Jarzebska et al., 2021; L. B. Jaques, 1973)。そこで、本研究では、ヘパリン存在下において、プロタミンの添加がヘパリンによるリポフェクション阻害効果を中和するか検証した。プロタミンは 1well あたり 0, 1, 5, 10, 15  $\mu\text{g/mL}$  の条件で検討した。その結果、ヘパリン存在下においてプロタミン 10  $\mu\text{g}$  の添加は、リポフェクション効率を  $9.92 \pm 2.02\%$  まで改善させた(図 4)。しかしながら、プロタミン 15  $\mu\text{g}$  の添加はリポフェクション効率を  $6.81 \pm 2.19\%$  に低下させた。以上の結果より、PGC におけるリポフェクション効率の低さは PGC 培地中のヘパリンの電荷に起因することが明らかとなった。

### (3) PGCにおけるリポフェクション効率の最適化

前項より、PGCにおけるリポフェクション効率の低さは培地中のヘパリンによって生じていることが明らかとなった。しかしながら、PGCにおけるリポフェクション効率は依然として10%程度であり、PGCに最適なりポフェクション条件を検討することで、より高効率な遺伝子導入を目指す。

そこで、リポフェクション試薬の検討を行った。本研究では、様々な細胞種で利用されPGCにおいてもよく使用されるリポフェクション試薬Lipofectamine™2000およびLipofectamine™3000を検討した。ヘパリン不含PGC培地下においてそれぞれの試薬を用いてZsGreen1発現ベクターを導入し、リポフェクション効率を比較した。その結果、リポフェクション効率は、Lipofectamine™2000を用いて導入した方が高く、 $49.02 \pm 10.54\%$ であった（図5）。一方で、Lipofectamine™3000により導入した場合は $12.52 \pm 1.05\%$ であった。

次に、これまでニワトリPGCでのゲノム編集の実績のある低血清培地条件(OptiMEM)やPGC培地の基礎培地KO-DMEM、ヘパリン不含PGC培地の3つの条件下におけるリポフェクション効率を比較した (Idoko-Akoh et al., 2018; Y. M. Kim, Shim, et al., 2023)。それぞれの培地条件下におけるリポフェクション効率を算出した結果、ヘパリン不含PGC培地条件でのリポフェクション効率が最も高く、他の条件と比べて約3倍高かった（図6A）。

この結果を説明するために、本研究ではヘパリン以外の培地成分、特にPGCの増殖に関わる因子B-27 supplement, chicken serum, hFGF2, H1152/Blebbistatinに注目した。ヘパリンに加え、これらの因子を含まないような培地条件下においてZsGreen1発現ベクターを導入後、リポフェクション効率を算出し、比較した。その結果、リポフェクション効率は、コントロールの条件と比較してchicken serumあるいはB-27 supplement/chicken serum/hFGF2を除いた条件にて有意に低かった（図

6B) . 以上より, ニワトリ PGC へのリポフェクションは, ヘパリン不含 PGC 培地  
下において Lipofectamine™2000 を用いることで高い遺伝子導入効率を達成するこ  
とができることが明らかとなった.

#### (4) CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集効率の比較

最適化したリポフェクションが PGC のゲノム編集においても有用であることを  
評価した. 比較条件には, ゲノム編集ニワトリの作出実績のある Opti-MEM あるい  
は KO-DMEM 培地条件下におけるリポフェクションを用いた.

CRISPR/Cas9 を介した KO 効率を評価するため, OVM 遺伝子を標的とした  
CRISPR/Cas9 ベクターと puromycin 耐性遺伝子を有するベクターをそれぞれの条件  
下にて PGC へ共導入した. OVM 遺伝子における sgRNA の標的箇所および標的配  
列は図 7A に示す. 薬剤選択の後, 細胞を回収し T7EI assay を行った. その結果,  
3 つの全ての条件において, 標的箇所での CRISPR/Cas9 による変異導入を確認した  
(図 7B) . また, シークエンス解析の結果も, 波形データのずれから, CRISPR/Cas9  
によりインデル変異が導入されたことを示した (図 7C) . さらに, 波形データか  
らインデル変異を予想し定量化することのできる TIDE 解析を行ったところ, 変異  
導入効率は本研究で最適化したリポフェクション条件において最も高かった (図 7  
D) .

#### (5) knock-in 効率の比較

次に, CRISPR/Cas9 を介した knock-in 効率を評価した. PGC において恒常的に  
発現する ACTB 遺伝子座を標的とし, EGFP 遺伝子が適切に挿入された場合に  
ACTB 遺伝子の発現に伴って EGFP の蛍光が観察される系を用いた (図 8A) . ま  
た, 本実験ではホモロジーを利用した正確な knock-in 手法に用いられる HR ドナー



ベクターと近年ニワトリ細胞における有効性が確認され、HR と同程度のホモロジーを利用した knock-in 手法に用いられる HMEJ ドナーベクターの 2 種のドナーベクターを作製し、knock-in 効率の評価に用いた。生細胞に占める EGFP 陽性細胞を knock-in 効率とし、それぞれの遺伝子導入条件下にて比較を行った。

その結果、HR ドナーベクターを用いた knock-in 効率は、どの条件においても差が見られなかったが、HMEJ ベクターを用いた knock-in 効率は本研究で最適化したリポフェクション条件において最も高いことが明らかとなった（図 8B）。

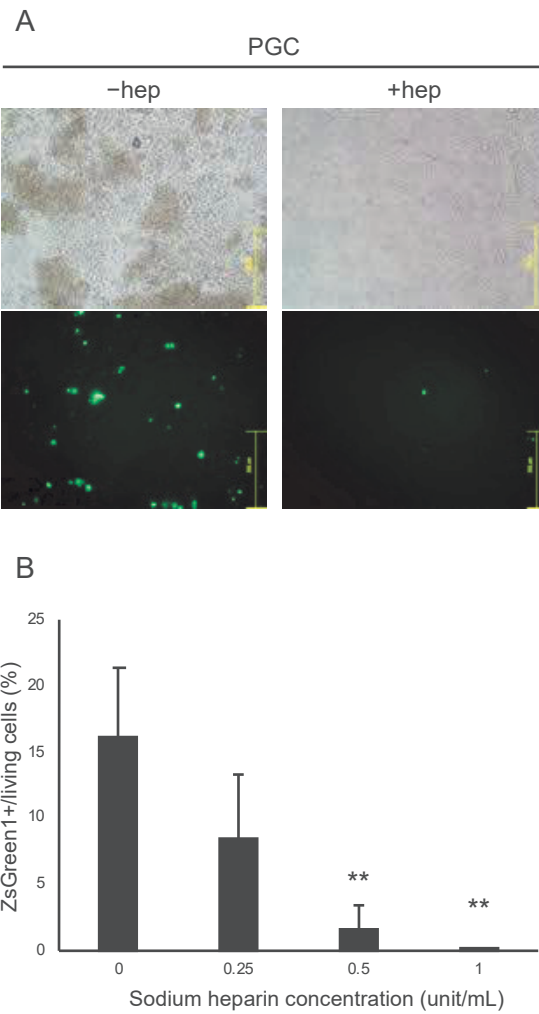


図3. PGC培地中のヘパリンがリポフェクション効率に与える影響。  
 (A) ヘパリン不含あるいは含有培地におけるZsGreen1発現ベクターをリポフェクション後の蛍光観察。(B) セルソータにより算出したPGCにおける培地ヘパリン濃度とリポフェクション効率の関係。

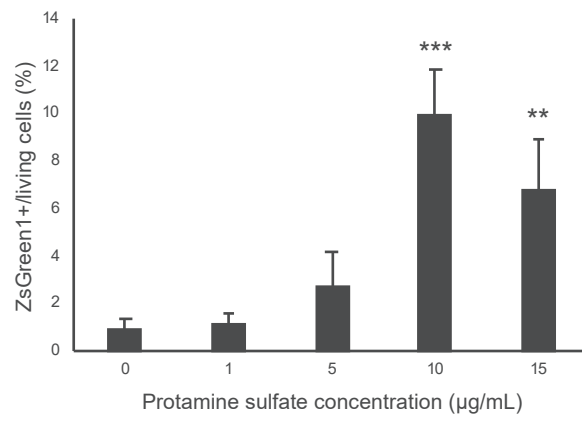


図4. Protamine sulfateの添加による培地sodium heparinのリポフェクション阻害の中和.

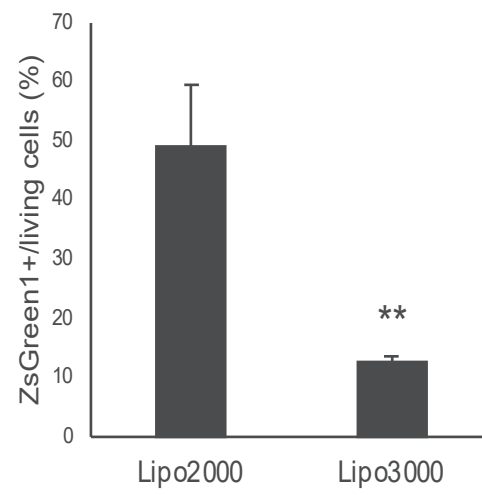


図5.へパリン不含PGC培地下におけるリポフェクション試薬の比較.

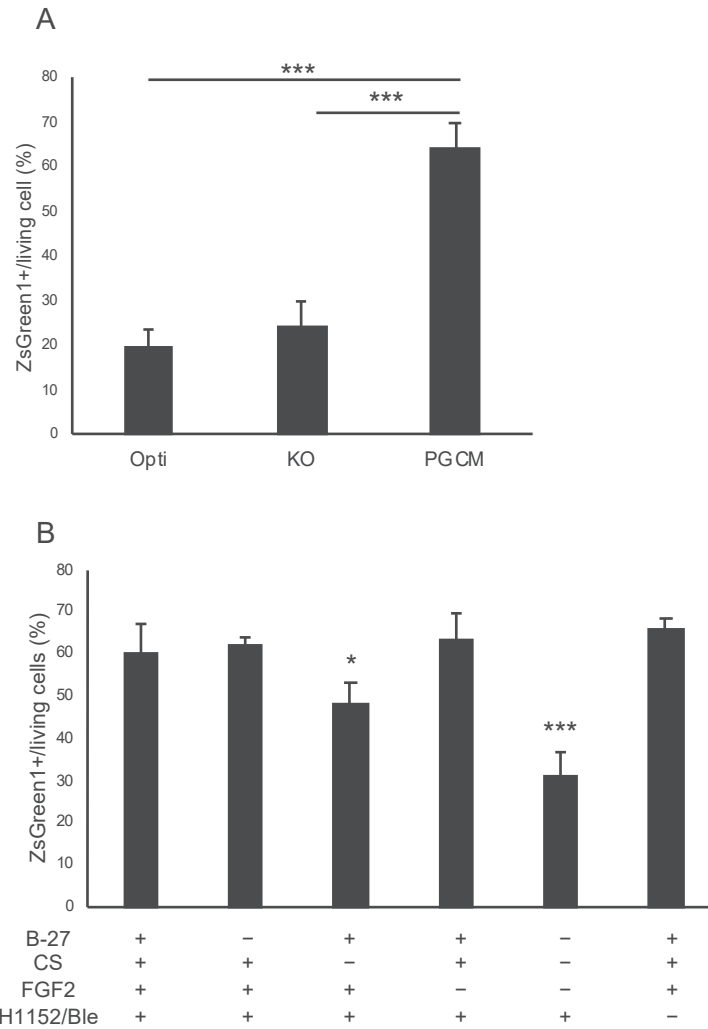


図6. 培地条件によるリポフェクション効率の比較. 全てヘパリン不含条件でリポフェクション効率を算出しており, エラーバーは各平均値の標本標準偏差 (SD) を示す (n=3). (A) 先行研究のリポフェクションプロトコルとの比較. 統計解析は, turkey's testにより行い, 各リポフェクション効率間の比較を行った (\*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). Opti; Opti-MEM, KO; KnockOut™ DMEM, PGCM; PGC培地. (B) PGC増殖因子とリポフェクション効率の関係. 統計解析は, Dunnett's testにより行い, 対照群と各条件との比較を行った (\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001). B-27; B-27 supplement, CS; chicken serum, FGF2; hFGF2, H1152/Ble; H1152 and Blebbistatin.

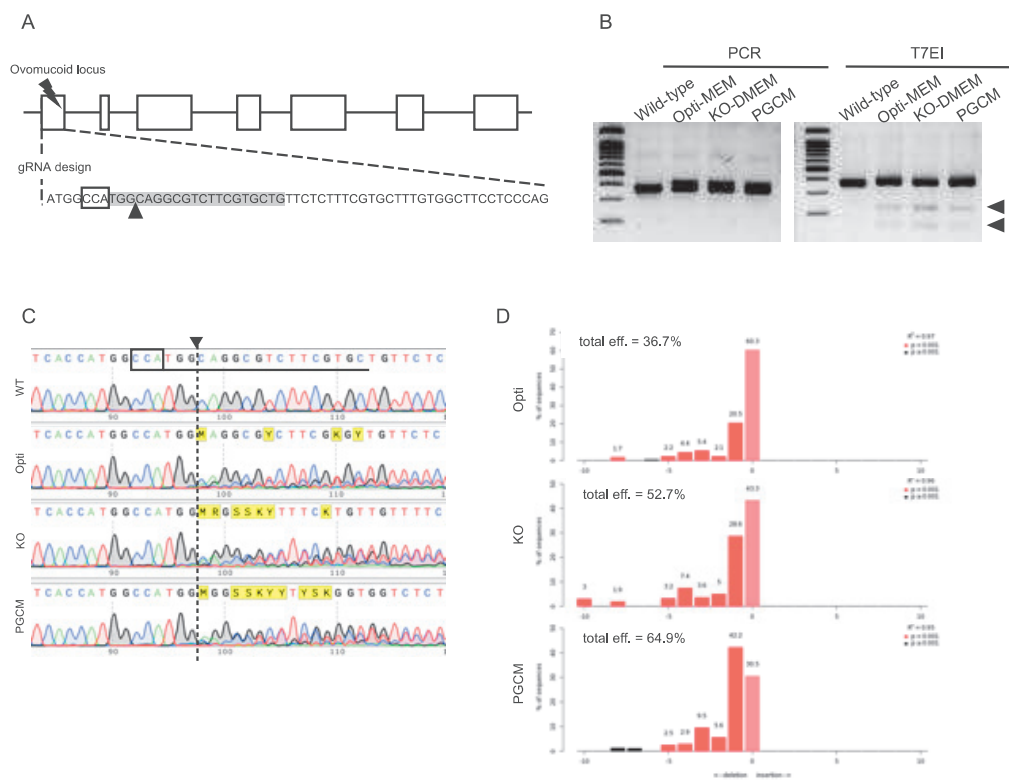


図7. CRISPR/Cas9を介したOVM遺伝子のKO. (A) OVM遺伝子座におけるsgRNAの設計. 白のボックスはovomuroid遺伝子のexonを表し, 網掛けした塩基配列が設計されたsgRNAの配列, 四角で囲んだ配列(5'-CCA-3')はCRISPR/Cas9が認識するPAM配列, 黒い三角形はCas9によるゲノムの切断位置を示している. (B) OVM遺伝子を標的としたKOの評価. 左図はPCR後の電気泳動の結果, 右図はT7EI assay後の電気泳動の結果. (C) 各サンプルのシークエンス解析の結果. (D) 各サンプルのTIDE解析の結果.

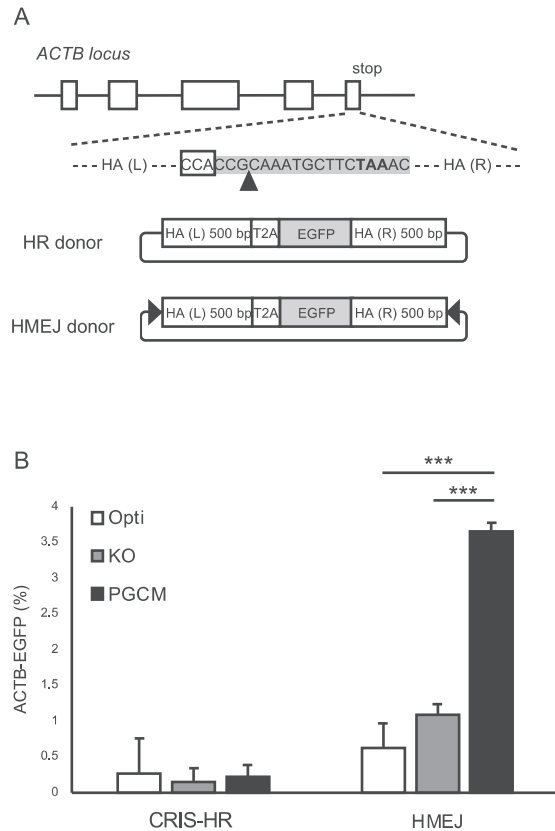


図8. HRおよびHMEJ戦略におけるACTB遺伝子を標的としたCRISPR/Cas9によるknock-in効率. (A) ACTB遺伝子座とドナーベクターの概要図. 白いボックスはACTB遺伝子のexonを表し, 網掛けした塩基配列は設計したsgRNAを四角で囲んだ配列 (5'-CCA-3') はCas9のPAM配列, 黒い三角形はCas9による切断位置を示す. また, 終始コドン (5'-TAA-3') は太字で示している. HA (L); homology arm (left), HA (R); homology arm (right).

(B) 各knock-in戦略を用いた培地条件におけるknock-in効率の比較. エラーバーは, 各平均値の標本標準偏差 (SD) を示す (n=3). 統計解析は, 各knock-in戦略における培地条件間のknock-in効率をturkey's testにより比較した (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ).

## 第4部 考察

PGC への遺伝子導入は、ゲノム編集ニワトリの作出において重要なステップの1つであり、これまで様々な方法にて PGC への遺伝子導入が達成されてきた。リポフェクション法は、広く用いられている遺伝子導入方法であるが、ニワトリ PGC における遺伝子導入効率は極めて低かった。本研究では、PGC 培地中のヘパリンがリポフェクションを阻害し、これを取り除くことでリポフェクション効率が大きく改善することを示した。

ニワトリ PGC の培養系は複数報告されているが、共通して FGF2 シグナルはニワトリ PGC の増殖を促すことが知られている (Choi et al., 2010; Macdonald et al., 2010; Whyte et al., 2015)。しかしながら、PGC 培地に添加される hFGF2 は熱安定性が低いため、培地中で長時間活性を維持するためには hFGF2 の安定化が重要であった。ヘパリンは FGF2 活性を持続させることが知られており (Caldwell et al., 2004)、ニワトリ PGC 培地にも添加する培養系が多い (Dehdilani et al., 2023; Ezaki et al., 2020; Whyte et al., 2015)。

しかしながら、本研究では、この PGC 培地に含まれるヘパリンがリポフェクション効率を顕著に低下させる原因であることを明らかにした。ヘパリンは、硫酸基に由来するアニオン性物質であり、核酸とカチオン性物質の乖離度を測定する際の溶媒として用いられている (McLendon et al., 2010; Siewert et al., 2020)。したがって、PGC 培地中のヘパリンは、カチオン性脂質-DNA 複合体の安定性を顕著に低下させ、PGC への十分な量の DNA の到達を阻止していたことが推察される。これは、ヘパリンによるリポフェクション阻害効果が、塩基性アミノ酸を豊富に含むプロタミンの適切な添加によって回復させることができたことから支持される。プロタミンは、塩基性アミノ酸に由来するカチオン性物質である。ヘパリン含有培地へのプロタミンの添加は、ヘパリンに由来する負電荷を相殺し、カチオン性脂質-DNA 複合体の安定性を高めたものと考えられる。



プロタミンは、核酸送達においてカチオン性物質として DNA の凝集を強めることが知られており、プロタミンの過剰な添加が、リポフェクション効率の低下を招くことから、リポフェクション培地中の電荷的な相互作用のバランスの重要性が示唆される。本実験により、PGC 培地中へパリンのリポフェクション阻害効果が明らかとなったが、PGC の安定的な培養にはへパリンの添加が重要であると考えられる。したがって、PGC への効率的な遺伝子導入と安定的な培養を両立するため、へパリン非添加培地はリポフェクションによる遺伝子導入時に一過的に使用することが推奨される。

ニワトリ PGC へのゲノム編集では Lipofectamin™2000 や Lipofectamine™3000 といったリポフェクション試薬が用いられてきた (Idoko-Akoh et al., 2018; Oishi et al., 2016, 2018; Xie et al., 2019)。本研究では、これら 2 種の試薬を用いてへパリン不含 PGC 培地にてリポフェクション効率を比較した。結果として、Lipofectamine™2000 の方がより効率よく PGC へ遺伝子導入できることが明らかとなり、より良い遺伝子導入条件を決定するためには遺伝子導入試薬の選択が重要であることが示唆された。リポフェクションでは様々な種類のカチオン性脂質が利用されており、物理化学的な安定性や遺伝子導入効率、細胞の生存性はその組み合わせによって決定される (Buck et al., 2019; Ponti et al., 2021)。市販されている遺伝子導入試薬はその成分比が明らかにされていないため、いくつかの種類を導入試薬を検討することが適切な遺伝子導入試薬の選択に重要である。

リポフェクションによる遺伝子導入時の培地条件に着目し、Opti-MEM, KO-DMEM, へパリン不含 PGC 培地の 3 つの培地条件の比較により、へパリン不含 PGC 培地下におけるリポフェクションは先行研究に比べて十分に高い遺伝子導入効率を示すことが明らかとなった。また、PGC の増殖に重要な因子が、リポフェクション効率の向上に寄与することが示唆された。遺伝子導入において、導入されるプラスミド DNA は細胞膜と核膜の 2 つの障壁を通過しなければならない。遺伝子導入試薬は、プラスミド DNA が細胞膜を通過することを促すが、核膜の通過には直接的には寄与していない。細胞質へ

侵入したプラスミド DNA は細胞分裂時、テロフェーズの核膜再形成の際に核内へと取り込まれ、導入遺伝子を発現するようになる (Haraguchi et al., 2022). また、細胞周期の同調や核膜の不安定化は、細胞質へ導入された遺伝子の発現効率を向上させることも知られている (Boyle et al., 2019). すなわち、最適なりポフェクション効率を達成するには、プラスミド DNA が核膜を十分に通過できるような条件が重要となり、これは増殖条件と関連していると考えられる. 本研究で得られた結果は、リポフェクション時の増殖条件がリポフェクション効率の向上に寄与することを支持する結果である. 以上のことから、PGC へのリポフェクションでは、ヘパリン不含 PGC 培地下において Lipofectamine™2000 を用いることを推奨する.

本研究で最適化したリポフェクションは、CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集にも有用であることが示された. 先行研究で使用されてきた方法に比べ、本条件は、より高い KO 効率を示した. 本研究では、薬剤選択によりベクターが導入された細胞を濃縮しているため、本来ならば KO 効率は大きく変わらないことが推測される. しかしながら、本研究では、培地条件によって KO 効率に差が見られた. これは、異なるサイズのベクターを共導入しているために生じていると考えられる. ベクターサイズは発現効率と密接に関わり、大きなベクターサイズはその効率が極端に低下する (Boyle et al., 2019). 本研究で使用した puromycin 選択用のベクターと CRISPR/Cas9 ベクターのサイズはそれぞれ約 5600 bp, 8500 bp であり、puromycin 選択用ベクターは CRISPR/Cas9 ベクターよりも遺伝子導入効率が高いと考えられる. リポフェクションにより、CRISPR/Cas9 ベクターが導入された PGC のほとんどは puromycin 選択用ベクターも導入されていると考えられる. 最適化されたリポフェクションでは、2 種のベクターが共導入された細胞がより容易に濃縮され、その結果として KO 効率が高くなったと考えられる. 最適化されたリポフェクションにより、より多くの PGC に CRISPR/Cas9 ベクターや薬剤耐性遺伝子を導入でき、標的遺伝子 KO 細胞株が得られやすくなると期待される.

加えて、最適化されたリポフェクションを用いた HMEJ 法による knock-in 効率は、先行研究のリポフェクションに比べて約 3 倍高かった。本実験ではベクターが導入された細胞の濃縮を行っていないため、knock-in 効率はリポフェクション効率の差をそのまま反映したものと考えられる。一方で、HR 法では knock-in 効率の違いを明らかにすることができなかったが、これは、knock-in 効率が極めて低かったためであると考えられる。Xie からも HMEJ 法の有効性を支持しており、HR 法よりも高効率な knock-in 手法であることを報告している (Xie et al., 2019)。HMEJ 法は、SSA 経路のような HR 経路以外の修復経路を利用すると考えられているため、ニワトリ PGC において効率の良い knock-in には HR 以外の修復経路を選択することが望まれる。また、ニワトリ細胞においては MMEJ を介した PITCH 法や SSA を介した easi-CRISPR といった HR 以外の修復経路による knock-in 手法の有効性も報告されている (Ezaki et al., 2022; Liu et al., 2023)。しかしながら、HMEJ 法の詳細な機序については明らかになっておらず、PGC においてどのような修復経路が効率良い knock-in に利用できるかについては今後検討が必要である。ニワトリ PGC は、ニワトリ胚線維芽細胞との RNA-seq による比較から DNA 修復機構に関わる遺伝子発現が高いことが報告されているものの、PGC における DNA 修復経路の選択性については明らかになっていない (Rengaraj, Won, et al., 2022)。今後は、PGC における DNA 修復経路やその選択性に関する知見を集め、高効率な knock-in 戦略の選択、目的の変異を有する細胞の濃縮方法を検討していかなければならない。また、本研究では CRISPR/Cas9 を用いてゲノム編集効率を算出したが、産業化に向けて ZFN や TALEN、他の CRISPR システムを利用したゲノム編集効率についても評価していく必要がある。目的に応じた適切なゲノム編集ツールの選択や設計は必要であるが、いずれの手法においても PGC の遺伝子導入は避けられない。本研究で示した PGC における最適化されたリポフェクションは、より高効率な PGC へのゲノム編集を可能にすると期待される。

## 第5部 小括

PGC への遺伝子導入は、ゲノム編集ニワトリの作出において重要なステップである。しかしながら、PGC への遺伝子導入効率は低く、ゲノム編集ニワトリ作出の障壁の1つであった。これまでの研究により、PGC の精製はリポフェクション効率を改善することが報告され、培地中のデブリによるリポフェクション効率の阻害が示唆されていた。本研究では、PGC 培地に含まれるヘパリンがリポフェクションを阻害する要因であることを明らかにした。この阻害効果は、カチオン性ペプチドであるプロタミンの添加により改善されることから、リポフェクションにおける培地中の電荷バランスの重要性が示唆された。また、これまでニワトリ PGC において使用されてきたリポフェクション試薬や導入条件を比較・検討したところ、ヘパリンのみを除いた PGC 培地下において Lipofectamine™2000 を用いることにより、高い遺伝子導入効率を達成できることを示した。先行研究に比べ本研究での培地条件は種々の増殖因子を含み、リポフェクション時における増殖性が維持された状態であると考えられる。細胞へ導入したプラスミド DNA は、細胞膜と核膜の2つの障壁を通過しなければならない。これまでの研究により、細胞膜の通過には遺伝子導入試薬の選択が、核膜の通過には細胞の増殖が重要であることが知られており、本研究の成果も、これまでの報告を支持するものと考えられる。さらに、この条件は、ゲノム編集効率 (KO 効率および knock-in 効率) を先行研究と比べてもより高い効果を得ることができることを示した。これらのことから、本研究で示したリポフェクション法は、PGC への簡便で高効率な遺伝子導入方法であり、今後のゲノム編集ニワトリの作出効率に大きく貢献するものと期待される。

### 第3章

#### 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

## 第1部 序論

緒言でも述べたように、バイオ医薬品をはじめとした組換えタンパク質の低コスト高収量な生産系として、家畜動物を利用したバイオリクターが期待されてきた。近年では、ゲノム編集ニワトリによる組換えタンパク質のバイオリクターの有用性が示されつつある。

ゲノム編集ニワトリによるバイオリクターを構築する上で、OVA 以外の卵白タンパク質の利用可能性と目的の組換えタンパク質の分泌性を評価することは重要である。OVM は、卵白を構成する主要なタンパク質の1つであり、胚発生や子孫の成長にほとんど影響を与えない。また、物理化学的な安定性が高いアレルゲンとしても知られており、医薬品生産を考える上では除去することが望ましく、標的候補として適切であると考えられる。また、ニワトリ細胞における目的の組換えタンパク質の十分な分泌性を検証するには培養細胞による評価系を構築する必要がある。これまで、OVA の発現調節領域を利用した評価系が報告されてきたが (Shi et al., 2020; Yousefi Taemeh et al., 2023), OVM のように発現調節領域の同定されていない遺伝子はこれまで評価系を構築することができなかった。したがって、ニワトリバイオリクターにおける OVM 遺伝子座の利用可能性と目的の組換えタンパク質の分泌性を事前に評価するためには OVM 発現細胞の樹立が求められる。

そこで、本研究では、培養細胞株 DF-1 細胞に対し、構成的なプロモーター配列を挿入することで、OVM 発現細胞の樹立を試みた。また、樹立された OVM 発現細胞を用いた事前評価系としての有用性を評価するため、さらに OVM 遺伝子座へヒト線維芽細胞増殖因子 2 (human fibroblast growth factor-2; hFGF2) 遺伝子を挿入した。これにより樹立された細胞から、OVM の代わりに hFGF2 を発現することが可能であるかを評価した。

## 第2部 材料および方法

### (1) プラスミドベクターの構築

本研究では、ニワトリ培養細胞株 DF-1 細胞の OVM 遺伝子座に対し、2段階の knock-in を実施することで、*in vitro* 評価系としての機能性を評価した。本研究の概要図を図9に示す。いずれの knock-in においても、ドナーベクターの設計が容易で knock-in 効率の高い PITCh system を利用した。

OVM 発現細胞を樹立するため、OVM 遺伝子上流および PITCh ドナーベクターのそれぞれを標的とした2種の CRISPR/Cas9 ベクター、EF1 $\alpha$  promoter と puromycin 耐性遺伝子カセットを有する PITCh ドナーベクターを作製した。CRISPR/Cas9 ベクターは、ともに pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 vector (Addgene#42230) を Bpil (Thermo Fisher Scientific) で処理し、sgRNA の鋳型となるアニーリングした合成オリゴを Ligation high ver.2 (Toyobo) にてライゲーションすることで作製した。PITCh ドナーベクターには、EF1 $\alpha$  promoter と puromycin 耐性遺伝子カセットを有する pBApo-EF1 $\alpha$ -pur (TaKaRa) を使用した。マイクロホモロジーとなるアニーリングさせたオリゴと BamHIおよび Hind3IIIで処理した pBApo-EF1 $\alpha$ -pur を Ligation high ver.2 でライゲーションした。

OVM 遺伝子座へ hFGF2 コンストラクトを挿入するため、OVM 遺伝子開始コドン(Start Codon)を標的とした CRISPR/Cas9 ベクター、hFGF2 遺伝子と zeocin 耐性遺伝子を有する PITCh ドナーベクターを作製した。CRISPR/Cas9 ベクターは、上記と同様の方法で作製した。PITCh ドナーベクターは、複数の遺伝子断片をつなぎ合わせることでできる In-Fusion 反応を利用して作製し、概略図を図10に示す。また、OVM 上流および OVM 開始コドンを標的とした sgRNA は CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて設計し、ベクターの作製に使用したオリゴやプ

ライマーの配列は表 2 に示す.

## (2) 培養細胞と遺伝子導入

本研究では、ニワトリ線維芽細胞株 DF-1 細胞 (ATCC® CRL-12203™) を使用した. DF-1 細胞は, 10% fetal bovine serum (FBS) と 1×GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific) を含む KnockOut™ DMEM (Thermo Fisher Scientific) を用い, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した.

目的配列を knock-in した細胞株を樹立するため, 細胞は 6-well plate に 1×10<sup>6</sup> cells/mL で播種し, Lipofectamine™3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて遺伝子導入を行った. 遺伝子導入後, EF1α promoter の knock-in には 1 μg/mL の puromycin を hFGF2 遺伝子の knock-in には 200 μg/mL の zeocin を含む培地にて薬剤選択を行った. 薬剤選択後に生存していた細胞は限界希釈法によるクローニングを行った.

クローニングされた細胞の genomic PCR およびシーケンス解析を行うことで, 目的の配列を保持している細胞のスクリーニングを行った.

## (3) Genomic PCR による EF1α knock-in 細胞のスクリーニング

クローニングされた細胞のゲノム DNA は, Genra Puregene Cell Kit (Qiagen) を用いて抽出し, PCR に供試した. EF1α promoter 挿入および hFGF2 挿入を確認するためにそれぞれ 3 つのプライマーセットを設計し, PCR によるスクリーニングを行った. PCR 酵素には, KOD One® PCR Master Mix (Toyobo Co. Ltd) を使用した. サイクルシーケンスには SupreDye v3.1 Cycle Sequencing Kit (AdvancedSeq) を用い, SeqStudio™ genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific) にてデータを取得, Snap gene viewer でデータ解析を行った. 使用したプライマーセットは表 2 に示す.



#### (4) RT-PCR

樹立した EF1 $\alpha$  knock-in DF-1 細胞における OVM 遺伝子の発現を確認するため、樹立した細胞から抽出した total RNA を用いて cDNA 合成した。その後、PCR により、OVM 転写産物を検出した。Total RNA の抽出には FastGene™ RNA Premium Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd) を用い、cDNA の合成は oligo dT primer と SuperScript IV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を使用した。その後、合成した cDNA を鋳型とした PCR には、KOD® PCR Master Mix (Toyobo Co. Ltd) を用いた。使用したプライマーセットは表 2 に示す。また、前項と同様にシーケンス解析を行い、NCBI に登録されている OVM transcript variant 1 (NM\_01308494.2) および SPINK7 OVM mRNA (OVM transcript variant 2; NM\_001112662.2) と塩基配列を比較した。

#### (5) 細胞培養上清を用いた western blot

DF-1 細胞から分泌された OVM あるいは hFGF2 タンパク質を調べるため、培養上清を用いて western blot を行った。細胞は、6-well plate に  $1 \times 10^6$  cells 播種し、FreeStyle™293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific) で培養した。1 週間後の培養上清を回収し、ULTRAFREE®-MC 5,000 NMWL Filter Unit (MILLIPORE) を用いて濃縮したものをサンプルとして使用した。陽性対照には精製 OVM タンパク質を 1 レーンあたり 10 ng となるように調製して使用した。各サンプルは NuPAGE® LDS Sample buffer (Thermo Fisher Scientific) を加え、90°C で 10 分間の熱処理を行い、SDS-PAGE へ用いた。各サンプルは、15% 分離ゲルおよび 4% 濃縮ゲルを用いて泳動を行った後、Immuno-Blot PVDF Membrane (Biorad) へ転写し、HRP 標識 anti-OVM mAb あるいは HRP 標識 anti-His tag mAb を用いて上清中の OVM あるいは hFGF2 の検出を行った。SDS-PAGE は、running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) にて行い、転写は、blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 5% (v/v)

methanol, 0.1% SDS) にて行った。転写後の PVDF 膜のブロッキングには PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal® (Toyobo) を用い、抗体反応には Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 1 (Toyobo) を用いた。HRP の基質には ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare) を使用し、Amersham Imager680 を用いて検出した。

(6) 培養上清を用いた sandwich ELISA によるタンパク質の定量

培養上清中に含まれる OVM タンパク質や hFGF2 タンパク質の定量は、それぞれのタンパク質に対する特異抗体を用いた sandwich ELISA にて定量した。

培養上清中の OVM タンパク質の定量には、当研究室で作製された 2 種類の OVM に対する抗体を用いた (Ezaki et al., 2023)。捕捉抗体にはウサギで作製されたポリクローナル抗体 0.5 µg/mL を、検出抗体にはマウスで作製されたモノクローナル抗体を HRP で標識したものを使用した。ブロッキングは Block Ace (DS Pharma Biomedical) を PBS で 5 倍に希釈したもので行った。

培養上清中の hFGF2 の定量には、Human FGF basic/FGF2/bFGF DuoSet™ ELISA kit (R&D Systems) を使用し、操作は添付のプロトコルに従って行った。

いずれも HRP の発色基質には SureBlue Reverse™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (SeraCare Life Science) を用い、反応停止液には 1N HCl を使用した。反応後、Multiskan SkyHigh spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) にて 450 nm における吸光度を測定した。

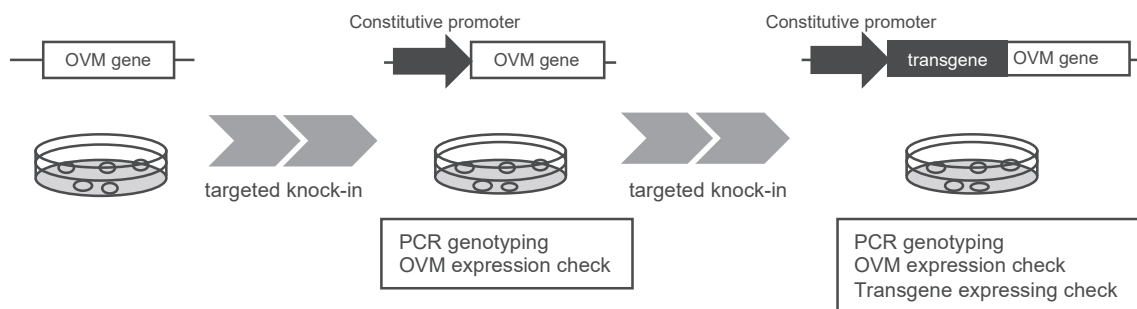


図9. *in vitro*における評価系構築に用いる培養細胞株の作製の概要図.

表2. 本研究で使用したプライマーおよびオリゴの一覧

Primer	Sequence (5' to 3')	Application
OV1 upstream sense	CACGGCTCCTGAGATGGTCCGCCCG	construction of CRISPR/Cas9 targeting OVM upstream
OV1 upstream antisense	AAACCGGGGACCATCTCAGGAC	construction of CRISPR/Cas9 targeting OVM upstream
EF1a_PITCh sense	CACCGCTGCCCTGCAATATATACA	construction of CRISPR/Cas9 targeting EF1a_PITCh donor vector
EF1a_PITCh antisense	AAACTGTATATATTTGAGGCGCCCTCGG	construction of CRISPR/Cas9 targeting EF1a_PITCh donor vector
EF1a_PITCh microhomology sense	GATCGGGGACCATCTCAGGAGCAGAGCACCTGTATATATTTGACGAGCCCTCGG	construction of EF1a_PITCh donor vector
EF1a_PITCh microhomology antisense	AGCTCCGAGGCTGCCGCAATATATACAAGGTGCTCTGCTCCGAGATGGTCCCG	construction of EF1a_PITCh donor vector
OV1 exon1 sense	CACCCAGCAGAGACGCCTGCCA	construction of CRISPR/Cas9 targeting OVM exon1
OV1 exon1 antisense	AAACTGGCAGGCGTCTCGTGGTG	construction of CRISPR/Cas9 targeting OVM exon1
IF_PITCh-backbone fwd	CCTTGGCAGGCGTCTCGTGGTGGCAATAGCATCACAAATTTTC	construction of hFGF2_PITCh donor vector
IF_PITCh-backbone rev	TGGCAGCGCTCTCGTGGTGGATTACTCGTTATCAGAACC	construction of hFGF2_PITCh donor vector
IF_hFGF-tag fwd	GGCAGTACCCTCACCATGGCTGCTGGCAGCATC	construction of hFGF2_PITCh donor vector
IF_hFGF-tag rev	GGCTATATGGTCAGGCTGATCAGCGGG	construction of hFGF2_PITCh donor vector
IF_EGFP-pur fwd	TCAGCCCTGAGCCATAGAGCCACCAGCATC	construction of hFGF2_PITCh donor vector
IF_EGFP-pur rev	TCACCTGGGAGACATTGATTTGACTAGTTAATAATAGTAATCAATTACGG	construction of hFGF2_PITCh donor vector
IF_zeocin fwd	GCTGATCAGCCTGGACCATAGAGCCACCAGCATCC	construction of hFGF2_PITCh donor vector
IF_zeocin rev	CAGCAGGAGAGCCCTGCCAAGGCTGAAAAGTTACTCACCTGGGAGACATTGATTATGAC	construction of hFGF2_PITCh donor vector
F1	ACGCAGCATTACCTGGAG	EF1a-OVM 5' junction
R1	GGTGGGATCGACAGATG	EF1a-OVM 5' junction
F2	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTG	EF1a-OVM 3' junction/EF1a-FGF2 PCR genotyping
R2	CAGTCTGAAAGTTACTACCT	EF1a-OVM 3' junction/EF1a-OVM PCR genotyping
F3	GCTATTAAACCAGTGTCCA	EF1a-OVM PCR genotyping
F4	TTTGGCCCTTTTGGTTTTGG	EF1a-FGF2 5' junction
R3	CAGTCTCTGGGGTCCCTTGA	EF1a-FGF2 5' junction
F5	TGAAGTAAATGACCCCGTAATTG	EF1a-FGF2 3' junction
R4	CAGCATCTGTTGTCAGGGATA	EF1a-FGF2 3' junction
R5	GGGAGCACAGAACCCCAACAGACACC	EF1a-FGF PCR genotyping

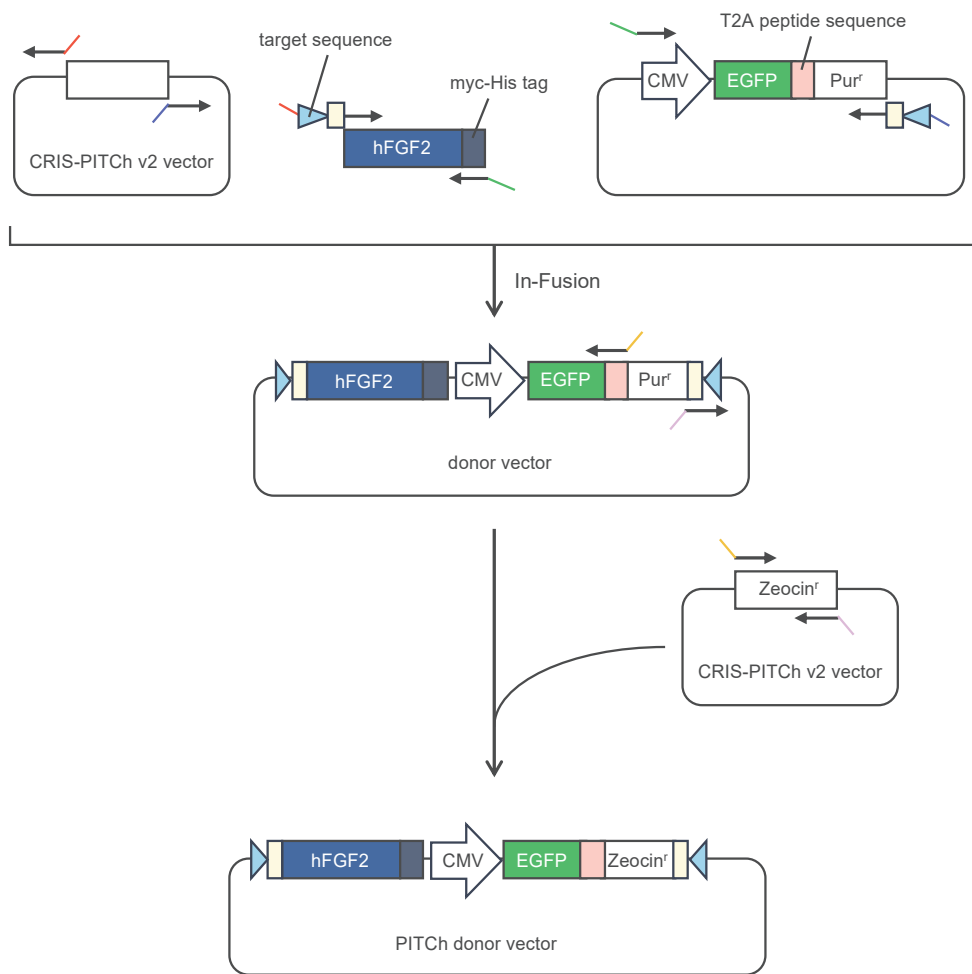


図10. in vitroにおける評価系構築に用いる培養細胞株の作製の概要図.

### 第3部 結果

#### (1) EF1 $\alpha$ knock-in DF-1 細胞の樹立

PITCh system を利用した EF1 $\alpha$  promoter の knock-in における概略図を図 11 に示す。EF1 $\alpha$ \_PITCh ドナーベクターは、DF-1 細胞ゲノムへ knock-in されると 5'側より puromycin 耐性遺伝子カセット、EF1 $\alpha$  promoter と並ぶように設計した。OVM 遺伝子上流およびドナーベクターをそれぞれ標的とする 2 種類の CRISPR/Cas9 ベクターと EF1 $\alpha$ \_PITCh ドナーベクターを DF-1 細胞へ共導入し、puromycin による薬剤選択を行った。その後、限界希釈によりクローニングされた DF-1 細胞は genomic PCR によりスクリーニングした。スクリーニングには 5'側の挿入部位 (F1-R1; 5' junction fragment) , 3'側の挿入部位 (F2-R2; 3' junction fragment) , 及び挿入部位の全領域 (F3-R2; PCR genotyping fragment WT or knock-in) を増幅することのできるプライマーセットを用いた (図 12A) 。本スクリーニングにより、EF1 $\alpha$ ヘテロ接合型 DF-1 細胞株 (#2) ならびに EF1 $\alpha$ ホモ接合型 DF-1 細胞 (#3) を樹立した (図 12B) 。また、5' junction fragment のシーケンス解析により、両接合型の DF-1 細胞はともに適切にドナーベクターが挿入されていることが明らかとなった (図 12C) 。

#### (2) EF1 $\alpha$ knock-in DF-1 細胞における OVM の発現解析

樹立した細胞株#2 および#3 における OVM 遺伝子の発現について、RT-PCR ならびに western blot, sandwich ELISA により行った。

これらの細胞の total RNA を回収し、RT-PCR を行った結果、#2 および#3 の細胞株は OVM 遺伝子の転写産物を有していることが明らかとなった (図 13A) 。また、この転写産物の塩基配列は、NCBI に登録されている OVM transcript variant1

(NM\_0130849.2) とほぼ一致していた (図 13B) . 取得した細胞株は登録されている配列と異なる塩基の置換が 3 箇所あったが (c.15C>T, c.300A>G, c.489C>T) , 全てサイレント変異であり, アミノ酸配列に影響がないことを確認している.

次に, western blot により, 得られた細胞株の培養上清から OVM タンパク質の検出を試みた. 各細胞を無血清培地である FreeStyle293 expression medium にて 1 週間培養後, 培養上清を回収し, western blot に供試した. その結果, 細胞株 #2, #3 は培養上清中に OVM タンパク質を分泌することが明らかとなった (図 14) . また, この培養上清中の OVM タンパク質を sandwich ELISA により定量した結果, #2, #3 の培養上清には OVM タンパク質がそれぞれ 876.1 ng/mL, 2013.1 ng/mL で含まれていた (図 15) . 野生型 DF-1 細胞の培養上清における OVM タンパク質は検出限界以下であった. これらの結果から, DF-1 細胞は EF1 $\alpha$  promoter 挿入により, OVM 遺伝子の発現能を獲得したことが明らかとなった.

### (3) OVM 発現細胞への hFGF2 遺伝子の knock-in

OVM 発現細胞を用いた *in vitro* 評価系の活用として, OVM 遺伝子座へ hFGF2 遺伝子カセットを挿入した細胞の樹立を試みた. PITCh system を利用した hFGF2 コンストラクトの knock-in における概要図を図 16 に示す. hFGF2\_PITCh ドナーベクターは, マイクロホモロジーに挟まれるように 5'側から hFGF2, EGFP-T2A-zeocin 耐性遺伝子発現カセットを有しており, その両末端には sgRNA の標的部位を持つように設計した. hFGF2\_PITCh ドナーベクターと CRISPR/Cas9 ベクターを OVM 発現細胞 #2 および #3 それぞれに共導入し, zeocin による薬剤選択後, 限界希釈法によりクローニングを行った. クローニングされた細胞は, genomic PCR により, EF1 $\alpha$  promoter が挿入されたアレルに hFGF2\_PITCh ドナーベクターが挿入された細胞をスクリーニングした. スクリーニングには 5'側の挿入部位 (F3-R3; 5' junction

fragment) , 3'側の挿入部位 (F4-R4; 3' junction fragment) , および挿入部位の全領域 (F2-R5; EF1 $\alpha$  -OVM fragment or EF1 $\alpha$  -hFGF2 fragment) を増幅することのできるプライマーセットを用いた (図 17A) . 本スクリーニングにより, EF1 $\alpha$  -hFGF2 ヘテロ接合型 DF-1 細胞 (#2-3) ならびに EF1 $\alpha$  -hFGF2 ホモ接合型 DF-1 細胞 (#3-4) を取得した (図 17B) . また, のシーケンス解析により, 両接合型の DF-1 細胞はともに適切にドナーベクターが挿入されていることが明らかとなった (図 17C) .

(4) EF1 $\alpha$  -hFGF2 knock-in 細胞#2-3, #3-4 における OVM タンパク質の発現解析

PCR スクリーニングにより, EF1 $\alpha$  promoter 下流に hFGF2 コンストラクトが挿入された DF-1 細胞株#2-3, #3-4 を取得した. これらの細胞における OVM 遺伝子の発現について, 培養上清を用いた western blot および sandwich ELISA によりタンパク質の解析を行った.

各細胞を無血清培地である FreeStyle293 expression medium にて 1 週間培養後, 培養上清を回収し, western blot に供試した. その結果, #2-3, #3-4 の培養上清中に OVM タンパク質は, 検出されなかった (図 18) . また, この培養上清中の OVM タンパク質を sandwich ELISA により定量した結果, #2-3, #3-4 の培養上清中の OVM タンパク質濃度は野生型 DF-1 細胞と同様に検出限界以下であった (図 19) . これらの結果から, OVM 細胞 #2, #3 は, OVM 開始コドンを標的とした hFGF2 遺伝子の挿入により, OVM 産生能を欠損したと考えられる.

(5) EF1 $\alpha$  -hFGF2 knock-in 細胞#2-3, #3-4 における hFGF2 タンパク質の発現解析

細胞株#2-3, #3-4 を取得した. これらの細胞における hFGF2 遺伝子の発現について, 培養上清を用いた western blot および sandwich ELISA によりタンパク質の解析を行った.



各細胞の培養上清を用いて western blot を行ったところ、hFGF2 タンパク質は検出されなかった。一方で、hFGF2 ELISA 検出キットを用いて定量を試みたところ、細胞#3-4 は野生型の細胞株に比べて培養上清中に hFGF2 タンパク質を顕著に分泌していることが明らかとなった（図 20）。

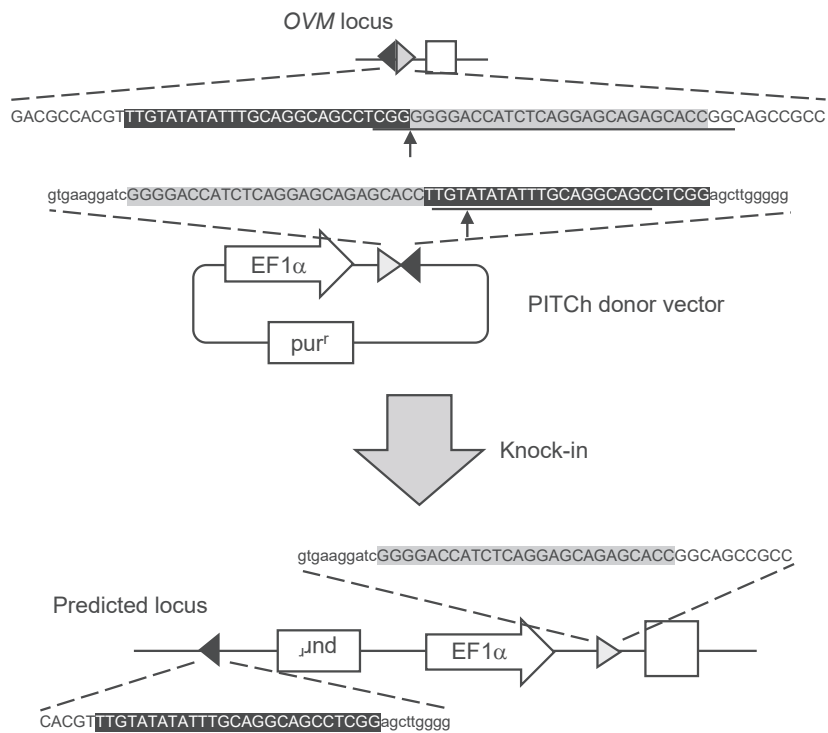
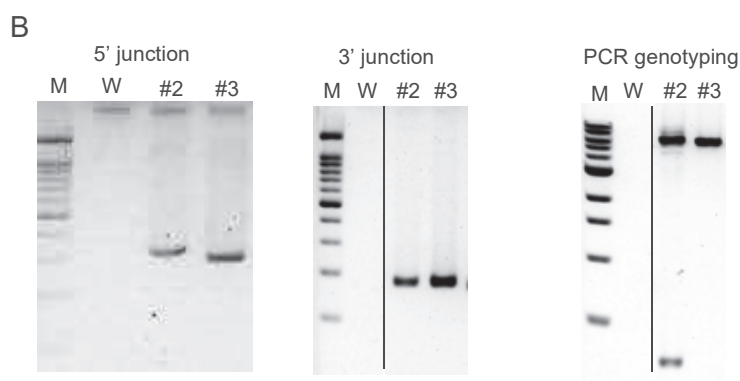
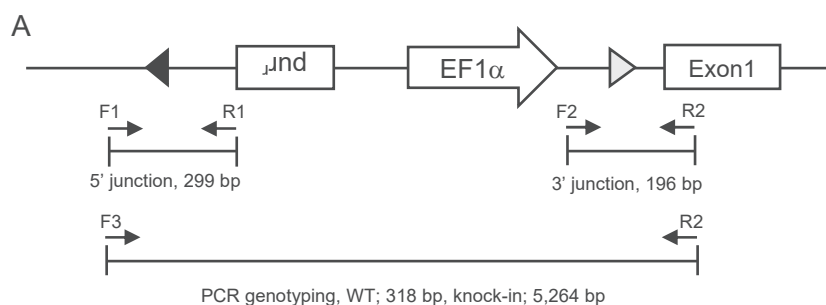


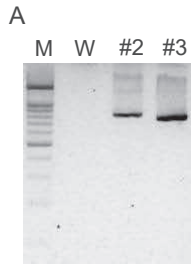
図11. EF1 $\alpha$  promoterのknock-inにおける概要図. 下線部はsgRNAの標的配列を, 矢印はCas9による切断部位を示している. 塩基配列の網掛け部分はPITCh systemにおけるマイクロホモロジーに該当する箇所であり, 模式図ではそれぞれ灰色あるいは黒で対応する三角形で表している.



**C**

	PITCh donor derived sequence	OVM 5' upstream
EF1a-OVM amplicon.txt	1:GATCGGGGACCATCTCAGGAGCAGAGCACCGGCAGCCGCCTGCAGAGCCGGGCAGTACCT	60
#2.txt	1:GATCGGGGACCATCTCAGGAGCAGAGCACCGGCAGCCGCCTGCAGAGCCGGGCAGTACCT	60
#3.txt	1:GATCGGGGACCATCTCAGGAGCAGAGCACCGGCAGCCGCCTGCAGAGCCGGGCAGTACCT	60
	*****	

図12. EF1 $\alpha$  knock-in DF-1細胞におけるPCRスクリーニングの結果. (A) EF1 $\alpha$  knock-in アレルの模式図. プライマーは矢印で示し, 白いボックスはOVM遺伝子のexon1を表す. また, 模式図における三角形はPITCh systemにおいてマイクロホモロジーとして使用した部分を示している. (B) PCRジェルのタイピングの結果. M; 100 bp marker, M'; 1 kb marker, W; 野生型DF-1細胞, #2; EF1 $\alpha$  ヘテロ接合型DF-1細胞, #3; EF1 $\alpha$  ホモ接合型DF-1細胞. (C) EF1 $\alpha$  promoterとOVM遺伝子上流のつなぎ目のシーケンス解析の結果. 網掛け部分はマイクロホモロジーを示す.



**B**

```

OVM transcript variant 1.txt      1:ATGGCCATGGCAGGCGTCTTCGTGCTGTTCTCTTTCTGCTTTTGGCTTCCTCCAGAT 60
SPINK7 OVM mRNA.txt            1:ATGGCCATGGCAGGCGTCTTCGTGCTGTTCTCTTTCTGCTTTTGGCTTCCTCCAGAT 60
#2.txt                          1:ATGGCCATGGCAGGCGTCTTCGTGCTGTTCTCTTTCTGCTTTTGGCTTCCTCCAGAT 60
#3.txt                          1:ATGGCCATGGCAGGCGTCTTCGTGCTGTTCTCTTTCTGCTTTTGGCTTCCTCCAGAT 60
                                M A M A G V F V L F S F V L C G F L P D

OVM transcript variant 1.txt      61:GCTGCCCTTTGGGCTGAGGTGACTGCACTAGAGTTTCCACGCTACAGCAGGAGGC 120
SPINK7 OVM mRNA.txt            61:GCTGCCCTTTGGGCTGAGGTGACTGCACTAGAGTTTCCACGCTACAGCAGGAGGC 120
#2.txt                          61:GCTGCCCTTTGGGCTGAGGTGACTGCACTAGAGTTTCCACGCTACAGCAGGAGGC 120
#3.txt                          61:GCTGCCCTTTGGGCTGAGGTGACTGCACTAGAGTTTCCACGCTACAGCAGGAGGC 120
                                A A F G A E V D C S R F P N A T D K E G

OVM transcript variant 1.txt      121:AAAGATGTATTGGTTTGCACAGGACTCCGCCCATCTGTGGTACCGATGGAGTCACT 180
SPINK7 OVM mRNA.txt            121:AAAGATGTATTGGTTTGCACAGGACTCCGCCCATCTGTGGTACCGATGGAGTCACT 180
#2.txt                          121:AAAGATGTATTGGTTTGCACAGGACTCCGCCCATCTGTGGTACCGATGGAGTCACT 180
#3.txt                          121:AAAGATGTATTGGTTTGCACAGGACTCCGCCCATCTGTGGTACCGATGGAGTCACT 180
                                K D V L V C N K D L R P I C G T D G V T

OVM transcript variant 1.txt      181:TACACCAACGATTGCTGTGTGCTTACAGCATAGAAATTGGAAACCAATATCAGCAA 240
SPINK7 OVM mRNA.txt            181:TACACCAACGATTGCTGTGTGCTTACAGCATAGAAATTGGAAACCAATATCAGCAA 240
#2.txt                          181:TACACCAACGATTGCTGTGTGCTTACAGCATAGAAATTGGAAACCAATATCAGCAA 240
#3.txt                          181:TACACCAACGATTGCTGTGTGCTTACAGCATAGAAATTGGAAACCAATATCAGCAA 240
                                Y T N D C L L C A Y S I E F G T N I S K

OVM transcript variant 1.txt      241:GAGCAGGATGGAGAATGCAAGGAACTTCTCTATGACTGCAAGTATGCCACACA 300
SPINK7 OVM mRNA.txt            241:GAGCAGGATGGAGAATGCAAGGAACTTCTCTATGACTGCAAGTATGCCACACA 300
#2.txt                          241:GAGCAGGATGGAGAATGCAAGGAACTTCTCTATGACTGCAAGTATGCCACACA 300
#3.txt                          241:GAGCAGGATGGAGAATGCAAGGAACTTCTCTATGACTGCAAGTATGCCACACA 300
                                E H D G E C K E T V P M N C S S Y A N T

OVM transcript variant 1.txt      301:ACAAGCGAGGACGAAAAGTGTGGTCTCTGCAACAGGCGCTCAACCCCTGTGTGGT 360
SPINK7 OVM mRNA.txt            301:ACAAGCGAGGACGAAAAGTGTGGTCTCTGCAACAGGCGCTCAACCCCTGTGTGGT 360
#2.txt                          301:ACAAGCGAGGACGAAAAGTGTGGTCTCTGCAACAGGCGCTCAACCCCTGTGTGGT 360
#3.txt                          301:ACAAGCGAGGACGAAAAGTGTGGTCTCTGCAACAGGCGCTCAACCCCTGTGTGGT 360
                                T S E D G K V M V L C N R A F N P V C G

OVM transcript variant 1.txt      361:ACTGATGGAGTCACTACGCAATGAGTGTCTGCTGTGCCCCCAAGTAGAGCAGGG 420
SPINK7 OVM mRNA.txt            361:ACTGATGGAGTCACTACGCAATGAGTGTCTGCTGTGCCCCCAAGTAGAGCAGGG 420
#2.txt                          361:ACTGATGGAGTCACTACGCAATGAGTGTCTGCTGTGCCCCCAAGTAGAGCAGGG 420
#3.txt                          361:ACTGATGGAGTCACTACGCAATGAGTGTCTGCTGTGCCCCCAAGTAGAGCAGGG 420
                                T D G V I Y D N E C L L C A H K V E Q G

OVM transcript variant 1.txt      421:GCCAGCCTTGACAAGGCAATGATGGTGGATGAGGAAGAACTTCTGCTGTGAGTGT 480
SPINK7 OVM mRNA.txt            421:GCCAGCCTTGACAAGGCAATGATGGTGGATGAGGAAGAACTTCTGCTGTGAGTGT 480
#2.txt                          421:GCCAGCCTTGACAAGGCAATGATGGTGGATGAGGAAGAACTTCTGCTGTGAGTGT 480
#3.txt                          421:GCCAGCCTTGACAAGGCAATGATGGTGGATGAGGAAGAACTTCTGCTGTGAGTGT 480
                                A S V D R R H D G G C R K E L A A V S V

OVM transcript variant 1.txt      481:GACTGCAGCGAGTACCTAAGCCTGACTGCACGCGAGAGCAGACCTCTCTGTGGCTCC 540
SPINK7 OVM mRNA.txt            475:GACTGCAGCGAGTACCTAAGCCTGACTGCACGCGAGAGCAGACCTCTCTGTGGCTCC 534
481:GACTGCAGCGAGTACCTAAGCCTGACTGCACGCGAGAGCAGACCTCTCTGTGGCTCC 540
481:GACTGCAGCGAGTACCTAAGCCTGACTGCACGCGAGAGCAGACCTCTCTGTGGCTCC 540
481:GACTGCAGCGAGTACCTAAGCCTGACTGCACGCGAGAGCAGACCTCTCTGTGGCTCC 540
                                D C S E Y P K P D C T A E D R P L C G S

OVM transcript variant 1.txt      541:GACACAAACATATGGCAACAGTCAACTTCTGCAATGCACTGTGGAAAGCAGCGGG 600
SPINK7 OVM mRNA.txt            535:GACACAAACATATGGCAACAGTCAACTTCTGCAATGCACTGTGGAAAGCAGCGGG 594
541:GACACAAACATATGGCAACAGTCAACTTCTGCAATGCACTGTGGAAAGCAGCGGG 600
541:GACACAAACATATGGCAACAGTCAACTTCTGCAATGCACTGTGGAAAGCAGCGGG 600
541:GACACAAACATATGGCAACAGTCAACTTCTGCAATGCACTGTGGAAAGCAGCGGG 600
                                D N K T Y G N R C N F C N A V V E S N G

OVM transcript variant 1.txt      601:ACTCTCACTTTAAGCCATTTTGGAAAATGCTGA 633
SPINK7 OVM mRNA.txt            595:ACTCTCACTTTAAGCCATTTTGGAAAATGCTGA 627
#2.txt                          601:ACTCTCACTTTAAGCCATTTTGGAAAATGCTGA 633
#3.txt                          601:ACTCTCACTTTAAGCCATTTTGGAAAATGCTGA 633
                                T L T L S H F G E C *

```

図13. EF1a knock-in DF-1細胞株におけるOVM遺伝子転写産物の解析. (A) RT-PCRの結果. M; 100 bp marker, W; 野生型DF-1細胞, #2; EF1a ヘテロ接合型DF-1細胞, #3; EF1a ホモ接合型DF-1細胞. (B) OVM 転写産物のシーケンス解析の結果. 参照配列にはNCBIで登録されているOVM transcript variant 1 (NM\_01308494.2) およびSPINK7 OVM mRNA (OVM transcript variant 2; NM\_001112662.2) を用いた. ▼はレファレンス配列と#2および#3とで異なる塩基を示している. 下段にはアミノ酸配列を併記している.

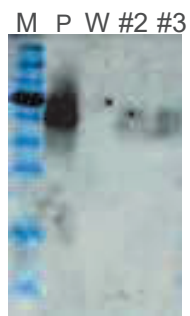


図14. 培養上清を用いたwestern blotの結果. HRP標識 anti-OVM mAbを用いてOVMタンパク質を検出した. M; protein marker, P; 精製ovomuroid (10 ng/lane), W; 野生型DF-1細胞, #2; EF1a ヘテロ接合型DF-1細胞, #3; EF1a ホモ接合型DF-1細胞.

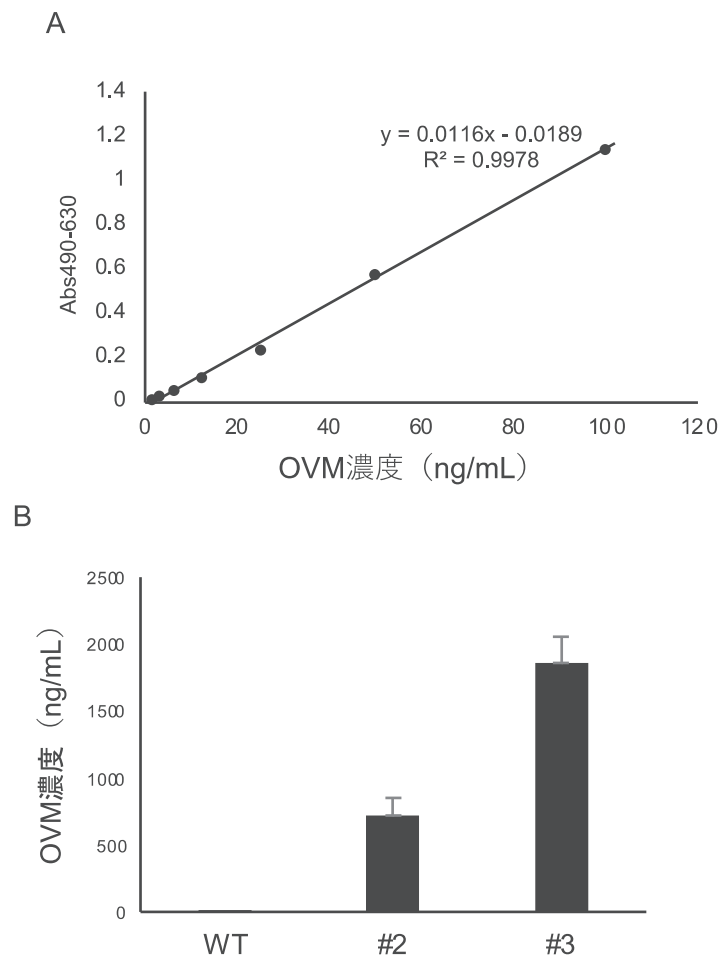


図15. 培養上清中のOVMタンパク質の定量. (A) sandwich ELISAにおけるOVMタンパク質濃度の検量線. (B) 培養上清中のOVMタンパク質の濃度. エラーバーは各平均値の標本標準偏差 (SD) を示す. WT; 野生型DF-1細胞, #2; EF1a ヘテロ接合型DF-1細胞, #3; EF1a ホモ接合型DF-1細胞.

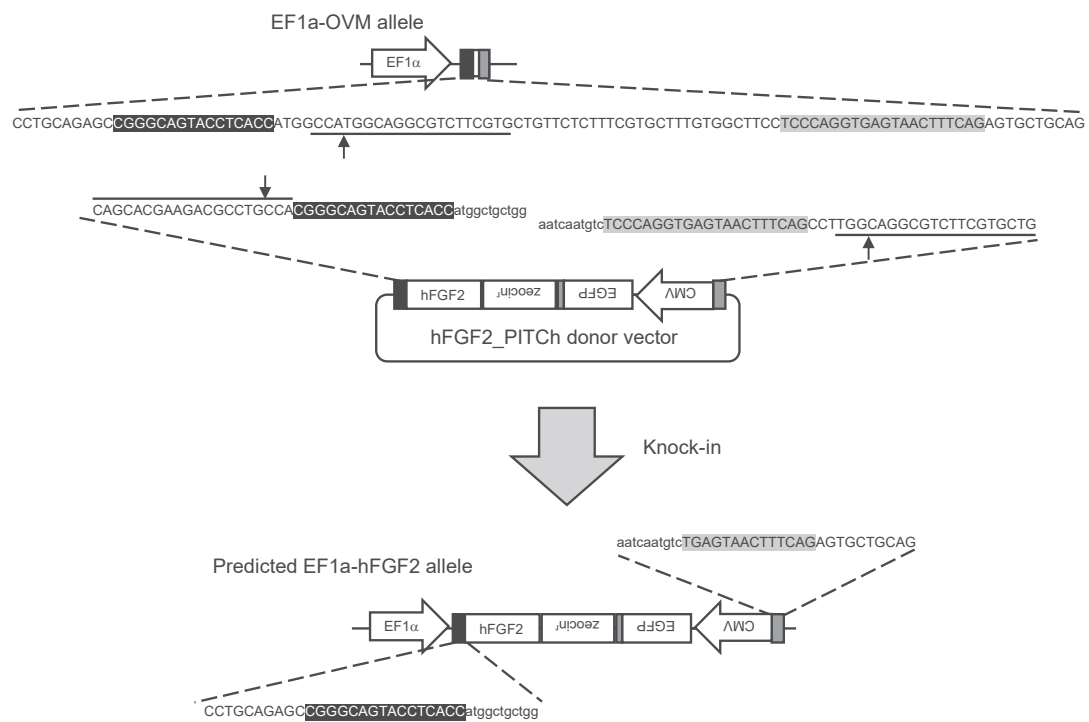


図16. OVM発現細胞へのhFGF2遺伝子のknock-inにおける概要図。下線部はsgRNAの標的部位を矢印はCas9の切断部位を示す。黒や灰色の網掛けはPITCh systemにおけるマイクロホモロジーの配列に該当する。

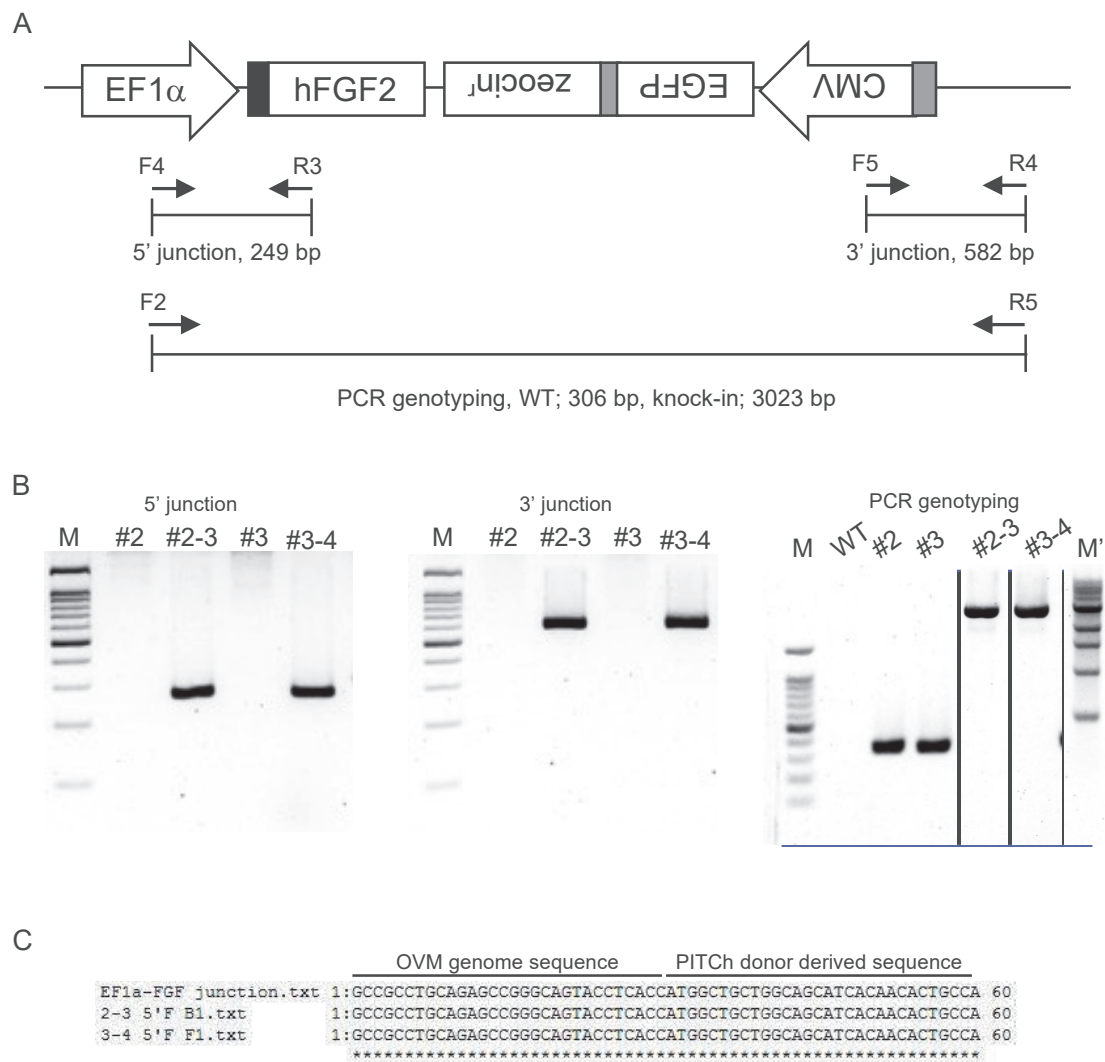


図17. hFGF2 knock-in DF-1細胞のPCRスクリーニングの結果。(A) EF1a-hFGF2 knock-inアレルの概要図。矢印はプライマーを示している。(B) PCRジェルのタイピングの結果。M; 100 bp marker, M'; 1 kb marker, WT; 野生型DF-1細胞, #2; EF1a ヘテロ接合型DF-1細胞, #3; EF1a ホモ接合型DF-1細胞, #2-3; EF1a-hFGF2 ヘテロ接合型DF-1細胞, #3-4; EF1a-hFGF2 ホモ接合型DF-1細胞。(C) シーケンス解析の結果。網掛け部分はマイクロホモロジーに使用した配列を示す。



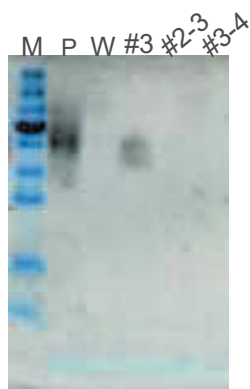


図18. Western blotによる培養上清中のovomucoidタンパク質の検出. M; protein marker, P; 精製OVMタンパク質 (10 ng/lane), W; 野生型DF-1細胞, #3; EF1a-OVMホモ接合型DF-1細胞, #2-3; EF1a-hFGF2 ヘテロ接合型DF-1細胞, #3-4; EF1a-hFGF2 ホモ接合型DF-1細胞.

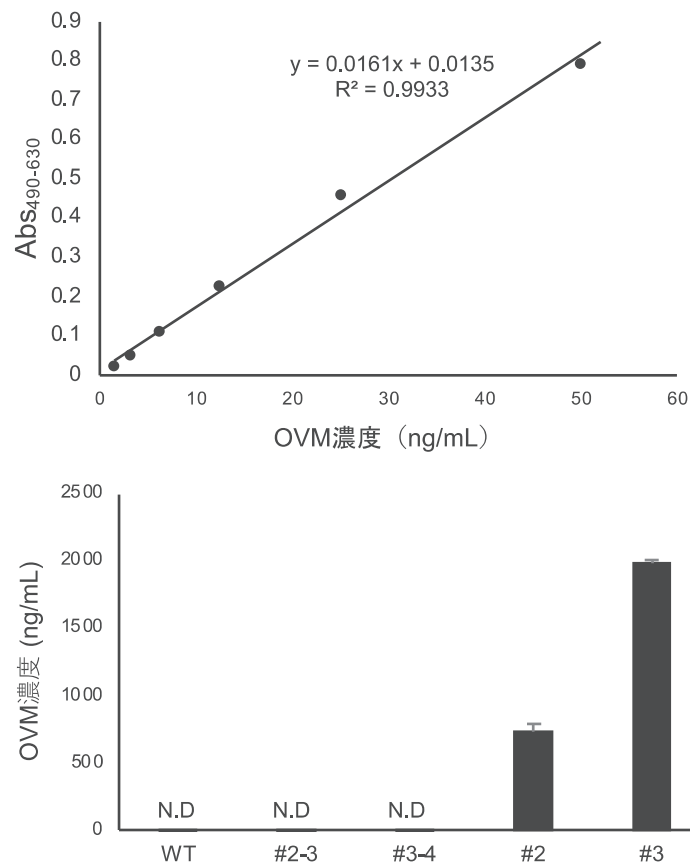


図19. Sandwich ELISAによる培養上清中に含まれるOVMタンパク質濃度の定量。  
 (上図) 精製OVMタンパク質を用いた検量線。(B) 培養上清中に含まれるOVMタンパク質濃度。エラーバーは各サンプルの平均値の標本標準偏差 (SD) を示し、N.D.は検出限界以下であったことを示す。W; 野生型DF-1細胞, #2; EF1a-OVM ヘテロ接合型DF-1細胞, #3; EF1a-OVMホモ接合型DF-1細胞, #2-3; EF1a-hFGF2 ヘテロ接合型DF-1細胞, #3-4; EF1a-hFGF2 ホモ接合型DF-1細胞。

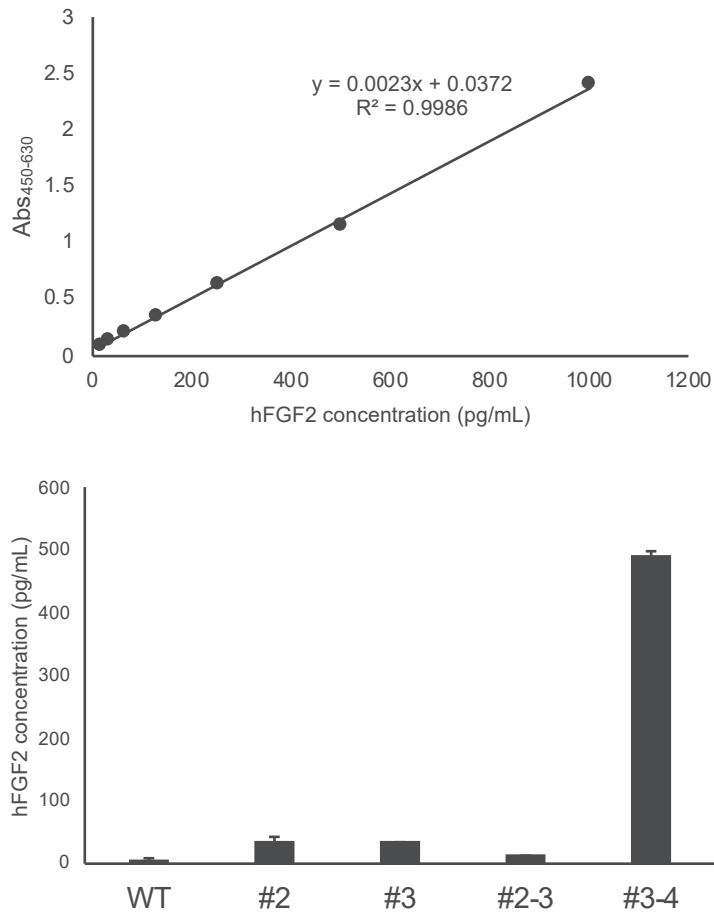


図19. Sandwich ELISAによる培養上清中に含まれるhFGF2タンパク質濃度の定量。  
 (上図) 精製hFGF2タンパク質を用いた検量線。(B) 培養上清中に含まれるhFGF2タンパク質濃度。エラーバーは各サンプルの平均値の標本標準偏差 (SD)を示す。WT; 野生型DF-1細胞, #2; EF1aヘテロ接合型DF-1細胞, #3; EF1a ホモ接合型DF-1細胞, #2-3; EF1a-hFGF2ヘテロ接合型DF-1細胞, #3-4; EF1a-hFGF2ホモ接合型DF-1細胞。

#### 第4部 考察

本研究では、knock-in 効率の高い PITCh system を用いて構成的プロモーターである EF1 $\alpha$  promoter を OVM 遺伝子上流へと knock-in した。スクリーニングの結果、ヘテロおよびホモ接合型の EF1 $\alpha$  knock-in DF-1 細胞がそれぞれ得られた（ヘテロ接合型；#2, ホモ接合型；#3）。得られた細胞株#2, #3 は共に、OVM を転写・翻訳しており、培養上清中に OVM タンパク質を分泌していた。これらの細胞の OVM 転写産物の配列は、NCBI に登録された OVM transcript variant 1 とほとんど一致していることから、構成的なプロモーターはゲノム配列から適切なスプライシングやプロセッシングを伴う遺伝子発現を促すことが示唆された。一方で、得られた細胞由来の OVM 転写産物は比較した塩基配列と異なる部分があったが、いずれもサイレント変異であり、アミノ酸配列に影響を与えるものではなかった。培養上清における OVM タンパク質は、EF1 $\alpha$ ホモ接合型 DF-1 細胞（#3）において EF1 $\alpha$ ヘテロ接合型 DF-1 細胞（#2）の約2倍発現していることを確認しており、EF1 $\alpha$  promoter が挿入された OVM アレルに依存して OVM タンパク質の分泌量が増加することが示唆された。これらの結果より、DF-1 細胞へ EF1 $\alpha$  promoter を knock-in することで OVM 発現細胞株を樹立することができ、構成的プロモーターの knock-in は、培養細胞株における内在性遺伝子を発現させるための戦略として有効であることが示唆された。

Mukae らや Ezaki らは、それぞれゲノム編集によって OVM に変異を誘導したニワトリを作出し、鶏卵中の OVM の分泌を評価している。Mukae らは、OVM 遺伝子の exon3 に Ezaki らは OVM 遺伝子の exon1 にそれぞれ変異を誘導しており、いずれの変異においても鶏卵中の OVM タンパク質は検出限界以下であることを報告している (Ezaki et al., 2023; Mukae, Yoshii, et al., 2021)。遺伝子産物の完全な欠損を生じさせるには、変異を誘導する標的位置の選択が重要となる。複数の候補配列がある場合に、全ての候補を

標的にゲノム編集された個体を作成することは現実的ではない。特に、食品や医薬品等への応用するためには、個体レベルの評価はもちろんであるが、事前に評価できる系の構築が重要となる。本研究で樹立した OVM 発現細胞は、OVM 遺伝子を標的としたゲノム編集ニワトリの事前評価系を構築するための細胞株としての役割が期待される。

本研究では、OVM 発現細胞のバイオリクターの評価系としての有効性を確かめるため、EF1 $\alpha$  promoter が挿入された OVM 遺伝子座へ hFGF2 遺伝子カセットをさらに knock-in した。その結果、EF1 $\alpha$  promoter と同アレルに hFGF2 遺伝子が knock-in された細胞株 #2-3, #3-4 を取得した。それぞれの細胞株において、培養上清中から OVM タンパク質は検出されなかったことから、hFGF2 遺伝子の knock-in により、OVM の KO が可能であることが示唆された。一方で、hFGF2 タンパク質は、#3-4 の培養上清から最も多く分泌されていたが、#2-4 の培養上清にはほとんど分泌されていなかった。FGF2 は細胞の増殖や分化に重要な機能を有するタンパク質であり、分泌されることが広く知られている。一方で、その分泌経路は一般的な小胞体・ゴルジ体を介したタンパク質分泌経路とは異なることが報告されている (Dimou et al., 2019; Steringer & Nickel, 2018)。また、細胞質から放出される FGF2 は細胞外基質であるヘパラン硫酸プロテオグリカンに保持される。本研究で樹立した#3-4における培養上清中の hFGF2 タンパク質濃度は、#2-3 のものに比べ高いことから、細胞膜上で保持しきれない hFGF2 タンパク質は培養上清中へ遊離されると考えられる。本研究室で構築した OVA をヘテロ接合型で発現する評価系においても、培養上清中の hFGF2 タンパク質濃度は極めて低いことが明らかとなっている。また、#3-4 培養上清中の hFGF2 タンパク質濃度は、#3 の培養上清中の OVM タンパク質濃度に比べ顕著に低い。hFGF2 タンパク質を卵管上皮細胞で分泌させる場合には、その発現量を高い状態で維持することが極めて重要であると示唆された。FGF2 の熱安定性が低いことも培養上清からの hFG2F タンパク質の検出を困難にしている要因の一つであるかもしれない。今後は、安定性が高く分泌性が担保されている抗

体等のタンパク質遺伝子を knock-in することにより，OVM 発現細胞の評価系としての機能を検証していく必要がある．また，OVM 発現 DF-1 細胞と OVM 発現卵管上皮細胞を比較し，発現するタンパク質の糖鎖修飾や発現量の同等性について調べ，評価系に用いる細胞の適性を評価する必要があると考えられる．

## 第5部 小括

ゲノム編集ニワトリによる有用タンパク質生産が期待されるなか、生産させたい有用タンパク質の分泌性や機能性を個体作出前に評価する系の構築が求められる。OVMは、卵管特異的に発現しニワトリの発生や成長にほとんど影響しないことが知られており、OVAに代わる新たな候補遺伝子である。しかし、卵管上皮細胞の長期培養系は普及しておらず、OVMを発現できる細胞株の樹立が必要であった。

本研究では、EF1 $\alpha$  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、さらにhFGF2遺伝子の挿入により事前評価系としての有用性を検証した。その結果、OVMを発現する2種の細胞株(#2, #3)を樹立し、それぞれ予想される転写産物およびタンパク質を発現していることが明らかとなった。これにより、OVM遺伝子を標的とした遺伝子操作や機能評価を*in vitro*にて実施できる可能性が示唆された。また、EF1 $\alpha$  promoterと同アレルにhFGF2がknock-inされた2種の細胞株#2-3, #3-4を樹立した。これらの細胞の培養上清中におけるOVMタンパク質は検出限界以下であるため、OVM遺伝子座へのhFGF2遺伝子のknock-inは、ゲノム上のOVM遺伝子の構成を破壊し、タンパク質レベルでのOVMの発現を欠損させることが示唆された。本研究では、#3-4の培養上清においてhFGF2が分泌されることを確認した。FGF2は小胞体を介さない独自の経路により分泌され、細胞外基質に保持される特性を有することから、細胞におけるhFGF2タンパク質の生産では極めて高い発現量が必要であることが示唆された。今後、より安定的で分泌性の担保されるタンパク質で検証を行うとともに、分泌されるタンパク質の糖鎖付加などを確認することで、より卵管上皮細胞に近い特性を示すか検討していく必要がある。

## 第 4 章 総合考察



ゲノム編集は、生物学的な意義を探求する基礎研究から社会実装に向けた応用研究まで幅広く活用されており、この技術のニワトリへの適用はさまざまな分野のブレイクスルーにつながることを期待できる。特に、近年ではバイオ医薬品をはじめ組換えタンパク質の需要の拡大に伴い、ゲノム編集ニワトリによる生産技術の開発が進められてきた (Y. M. Kim, Park, et al., 2023; Mukae, Okumura, et al., 2021; Oishi et al., 2018; J. S. Park et al., 2023).

本研究では、ニワトリ細胞におけるゲノム編集技術を十分に活用し、ニワトリによるバイオリクターを効率よく作出するための技術開発を最終目標とした。そのために、ニワトリ PGC におけるゲノム編集技術の適用およびバイオリクターの事前評価系の構築するための細胞の樹立を行った。

第 2 章では、ニワトリ PGC への遺伝子導入効率に着目し、ゲノム編集効率の向上を図った。ここでは、PGC におけるリポフェクション法を最適化し、ゲノム編集 PGC の取得効率を向上させることに成功した。PGC 培養培地に含まれるヘパリンは、リポフェクションによる遺伝子導入を大きく阻害しており、ヘパリン不含培地を用いることでリポフェクション効率は大きく改善した。また、PGC の増殖に関与することが報告されている chicken serum をリポフェクション時に除くとリポフェクション効率が低下することから、リポフェクション時の増殖性の維持が重要であることが示唆された。遺伝子導入において、細胞質内へ導入された遺伝子は、細胞周期の移行に伴って核内へと取り込まれることが明らかとなっている (Haraguchi et al., 2022)。本研究では、PGC へのリポフェクションにおいて培地中のヘパリンは、プラスミド DNA が細胞膜を通過することを阻害し、chicken serum は核膜への侵入を促すことを示唆している。また、PGC におけるゲノム編集効率はリポフェクション効率の向上に伴い向上した。特に、本研究では CRISPR/Cas9 による HR 法と HMEJ 法による knock-in 効率を比較したが、HR 法による knock-in 効率は極めて低かった。一方で、HMEJ 法による knock-in 効率は HR 法に比べ

高く、これは先行研究の結果とも一致していた (Xie et al., 2019). この結果は、PGC における高効率な knock-in を実現するためには、HR 以外の修復経路を選択することが重要であることを示唆するものと考えられる。しかしながら、PGC における DNA 修復に関する知見はほとんどない。PGC における DNA 修復の選択性を明らかにし、高効率な knock-in 手法を確立することは、ゲノム編集ニワトリの産業応用を促進すると考えられる。第 2 章における PGC でのリポフェクションによる遺伝子導入効率の改善は、ゲノム編集された PGC の取得を容易にし、効率的なゲノム編集ニワトリの作出が可能になることが期待される。

今後は、PGC における正確性と効率の高いゲノム編集方法の選択が求められる。ゲノム編集技術は、細胞内のゲノム修復機構を効率よく利用するための技術であり、ゲノム修復機構は細胞によって異なる。発生初期の blastodermal cells や PGC, 胚線維芽細胞は、それぞれ扱われる DNA 修復機構に偏りがあることが示唆されている (Rengaraj, Won, et al., 2022). PGC で頻繁に扱われる DNA 修復機構を明らかにし、利用することでより高効率で精密なゲノム編集が可能になると考えられる。また、本研究では knock-in 効率の算出においてセクションを行っていないが、適切なセクションマーカを用いてベクターが導入された細胞のみを濃縮することで、より目的の変異を有する PGC を効率よく取得することが可能であると考えられる。より高効率なゲノム編集ニワトリ作出のためには、正確で高効率なゲノム編集方法の開発および遺伝子改変された細胞を効率よく回収する方法が求められる。

第 3 章では、ゲノム編集ニワトリによるバイオリアクターを構築するにあたり、OVA 以外の卵白タンパク質の利用可能性と目的の組換えタンパク質の分泌性を評価するため、事前評価系の構築に取り組んだ。ここでは、ニワトリ DF1 細胞の OVM 遺伝子上流へ構成的プロモーターである EF1 $\alpha$  promoter を PITCh system により knock-in することで、2 種の OVM 発現細胞を樹立した。さらに、この細胞の OVM 遺伝子座へ hFGF2 遺

伝子を knock-in することで、培養細胞株における hFGF2 の分泌性について検討した。

本研究で樹立した 2 種の OVM 発現細胞は、予想される転写産物およびタンパク質を発現していた。また、OVM の発現量は EF1 $\alpha$ -OVM アレル数に応じて異なり、ゲノム上の OVM 遺伝子は挿入された EF1 $\alpha$  promoter により制御されていた。これらの結果は、構成的なプロモーターの knock-in が、培養細胞株における内在性遺伝子の発現を正確に制御する戦略として有用であることを示唆している。

遺伝子産物の完全な欠損を評価するためには、複数の変異体を評価する必要があるが、個体レベルでこれら全ての解析を行うことはコストや時間を必要とする。したがって、個体作出前にどのような変異が有効であるかを *in vitro* で検証することは、実験コストを低下させ、見通しを持った実験計画を立てることにつながる。本研究で樹立した OVM 発現細胞は、OVM 遺伝子座を標的としたゲノム編集ニワトリの事前評価系としての役割を果たすことが期待される。

さらに、樹立した OVM 細胞を用いて、ニワトリ細胞における hFGF2 の分泌性を検証した。OVM 遺伝子の開始コドンを選択的に hFGF2 遺伝子を knock-in し、EF1 $\alpha$  promoter と同じアレルに hFGF2 遺伝子が挿入された細胞株 #2-3、#3-4 を樹立した。これらの細胞の培養上清から OVM タンパク質は検出されず、OVM 遺伝子座への外来遺伝子の knock-in により OVM 遺伝子の KO が達成された。一方で、#3-4 の培養上清から hFGF2 タンパク質が検出されたが、#3-4 と同様の EF1 $\alpha$ -hFGF2 アレルを有する #2-3 の培養上清中の hFGF2 タンパク質濃度は極めて低かった。FGF2 は細胞の増殖や分化に機能する分泌性タンパク質であるが、その分泌経路は一般的な小胞体を介する経路ではないことが知られている (Dimou et al., 2019; Steringer & Nickel, 2018)。また、細胞外へと出た FGF2 は一部の細胞外基質に保持されることから、#3-4 は保持できなかった hFGF2 タンパク質が培養上清中で検出されたと考えられる。#2-3 と #3-4 では EF1 $\alpha$ -hFGF2 アレルのコピー数が異なることから、細胞における hFGF2 の分泌は極めて高い発現量を必要とす

ることが示唆された。加えて、FGF2 の熱安定性が低いことも培養上清からの FGF2 タンパク質の検出を困難にしている原因の1つであると考えられる (Caldwell et al., 2004). hFGF2 をニワトリ細胞で分泌性タンパク質として生産するにはシグナル配列の付与を考慮する必要がある。今後は、より安定的で分泌性の担保されるタンパク質で評価系としての検証を行うことが求められる。また、本研究では EF1 $\alpha$  promoter を利用することで評価系細胞を樹立したが、ゲノム編集によるバイオリクターでは卵管上皮細胞が目的のタンパク質の発現を担う。したがって、EF1 $\alpha$  promoter と内在の OVM promoter との違いや異なる細胞種を用いることによる糖鎖付加などタンパク質の修飾の違いを理解するとともに、生産したタンパク質がニワトリ母体や雛の成長に与える影響についても検討する必要があると考える。

第2章、第3章を通して、本研究では、バイオリクターに利用されるゲノム編集ニワトリの効率的な作出を促す基盤技術の開発を行った。本研究は、ゲノム編集ニワトリの作出における課題である PGC への遺伝子導入効率や事前評価系に用いる細胞株の樹立への解決策を提示するものであり、ゲノム編集ニワトリを作出する上で重要な知見になることを確信している。本研究で開発された技術だけでなく、高効率な遺伝子改変技術や細胞培養技術の開発を進めることで、ゲノム編集ニワトリを用いた研究の加速が求められる。

## 第 5 章 総括

ゲノム編集技術の発展は著しく、様々な生物種にも適用されており、ニワトリもその例外ではない。ニワトリは、基礎研究から応用研究まで幅広く扱われており、ゲノム編集技術の適用は様々な研究分野におけるブレイクスルーをもたらすことが期待できる。

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の拡大に伴い、様々な生産技術が開発されてきた。中でも遺伝子組換えニワトリをバイオリクターとして利用する方法は、組み換えタンパク質を低コスト高収量で生産できる方法として研究されている。ゲノム編集技術は、遺伝子組換えニワトリの作出を効率化する重要な技術である。ゲノム編集ニワトリは、生殖細胞への分化能を有する PGC へゲノム編集を施すことで作出される。これまで、PGC の単離・長期培養技術が開発されてきたが、PGC への遺伝子導入効率は低く、ゲノム編集技術が扱いにくい現状がある。また、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。したがって、ゲノム編集ニワトリで生産したいタンパク質の分泌性や機能性は事前に評価されることが望ましい。ゲノム編集ニワトリをバイオリクターとして効率よく利用するためには、PGC への遺伝子導入方法の改善や事前評価系に用いる細胞の構築といった基盤技術が求められる。

まず、第2章では、PGC への遺伝子導入効率の改善を図ることで、ゲノム編集 PGC の取得効率の向上に取り組んだ。PGC の遺伝子導入にはリポフェクション法がよく用いられており、PGC の精製や培養培地以外の条件により遺伝子導入が達成され、ゲノム編集個体が作出されてきた。そこで、本研究では、遺伝子導入時の培地条件に着目し、遺伝子導入効率の改善・検討を行った。PGC 培地に含まれるヘパリンは、リポフェクションによる遺伝子導入を顕著に阻害していることが明らかとなった。また、遺伝子導入試薬の検討から、ヘパリン不含培地下において、Lipofectamine™2000 を導入試薬として用いることで高い遺伝子導入効率が達成された。本遺伝子導入による遺伝子導入効率は、先行研究の遺伝子導入に比べて約3倍高かった。先行研究と比べ本研究での遺伝子導入時の培地条件は、種々の増殖因子を含んでおり、リポフェクションによる遺伝子導入で

は増殖性が遺伝子導入効率の向上に寄与することが示唆された。さらに、本研究で最適化したリポフェクションは、ゲノム編集効率（KO 効率および knock-in 効率）も先行研究と比較して同等以上の効果があることが示された。これらのことから、本研究で示したリポフェクションは、PGC へのゲノム編集にも有効な簡便で高効率な遺伝子導入であり、今後のゲノム編集ニワトリの作出効率の向上に貢献することが期待される。

また、第3章では、卵管特異的に発現する OVM に着目し、ニワトリ胚線維芽細胞株 DF-1 細胞において OVM を恒常的に発現する細胞の樹立とそれを用いた事前評価系の構築に着手した。OVM は卵白の代表的な構成成分であり、ニワトリをバイオリクターとして利用する際の標的遺伝子の候補として挙げられる。また、OVM を発現する卵管上皮細胞の培養細胞株は普及しておらず、事前評価系を構築するには OVM 発現細胞の樹立が求められた。そこで、構成的なプロモーターである EF1 $\alpha$  promoter を DF-1 細胞の OVM 遺伝子上流に PITCh system を用いて knock-in することで OVM 発現細胞の樹立を試みた。EF1 $\alpha$  promoter を knock-in した2種の細胞株#2, #3 は、それぞれ OVM を発現していることを明らかにした。これらの細胞株が持つ OVM 転写産物は登録された配列と一部異なる塩基を有していたが、アミノ酸配列に影響はなく、分泌される OVM も精製 OVM と同分子量であった。また、上清中の OVM タンパク質濃度は、EF1 $\alpha$ -OVM アレルの数に依存していた。さらに、これらの細胞株の OVM 遺伝子座へ hFGF2 遺伝子を knock-in し、OVM と hFGF2 の分泌量について評価した。その結果、hFGF2 が knock-in された細胞株#2-3, #3-4 は、OVM タンパク質の分泌能を欠損していた。また、#3-4 においては培養上清中に hFGF2 タンパク質を低濃度で分泌していた。一方で、EF1 $\alpha$ -hFGF2 アレルを1コピー有する#2-3の培養上清中における hFGF2 タンパク質濃度は極めて低かったことから、hFGF2 タンパク質を細胞外へ分泌するためには極めて強い発現量を必要とすることが示唆された。これらの結果より、樹立された OVM 発現細胞は、より詳細な検証を必要とするが、OVM を標的としたゲノム編集ニワトリの事前評価系

として有用であることが示唆された。

本研究では、ゲノム編集ニワトリをバイオリアクターとして効率的に利用することを最終目標として、ゲノム編集ニワトリの作出に関わる基盤技術の開発に着手した。第2章で確立した PGC へのリポフェクションによる簡便かつ高効率な遺伝子導入は、PGC へのゲノム編集に応用することで、従来よりも高効率なゲノム編集ニワトリの作出が可能となった。また、第3章で樹立した OVM 発現細胞は、OVM を標的とするバイオリアクターの事前評価系を構築するのに適していると考えられる。本研究で得られた技術や知見を基盤としながら、さらに研究を発展させることで、ゲノム編集による組換えタンパク質のバイオリアクターとしての利用が達成されると確信している。



## 謝辞

本研究を遂行し、取りまとめるに際してご指導とご鞭撻を賜りました、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、松崎芽衣助教、江崎僚特任助教に謹んで感謝の意を表します。また、本論文を作成するにあたり貴重な御助言いただきました分子遺伝学研究室 山本卓教授、分子栄養学研究室 矢中規之教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、御助言、hFGF2 遺伝子の提供いただきました住友化学株式会社 生物環境化学研究所 高橋康彦研究員、笹岡紀男研究員、山本真寿研究員、浅野宏治研究員に深く感謝いたします。

研究費の管理や補助等していただきました池田由紀さん、金指暁子さん、実験やその他多々のご指導、ご助言をいただきました市川健之助博士、寺田拓実博士をはじめ、ご支援いただいた本研究室の大学院生、学生の皆様に心より感謝すると共に、御礼申し上げます。

最後に、博士課程進学を応援していただいた家族に感謝いたします。

## 参考文献

- Aida, T., Nakade, S., Sakuma, T., Izu, Y., Oishi, A., Mochida, K., Ishikubo, H., Usami, T., Aizawa, H., Yamamoto, T., & Tanaka, K. (2016). Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics*, *17*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3331-9>
- Ballantyne, M., Woodcock, M., Doddamani, D., Hu, T., Taylor, L., Hawken, R. J., & McGrew, M. J. (2021). Direct allele introgression into pure chicken breeds using Sire Dam Surrogate (SDS) mating. *Nature Communications*, *12*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20812-x>
- Bertolini, L. R., Meade, H., Lazzarotto, C. R., Martins, L. T., Tavares, K. C., Bertolini, M., & Murray, J. D. (2016). The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Research*, *25*(3), 329–343. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9933-9>
- Boyle, W. S., Twaroski, K., Woska, E. C., Tolar, J., & Reineke, T. M. (2019). Molecular Additives Significantly Enhance Glycopolymer-Mediated Transfection of Large Plasmids and Functional CRISPR-Cas9 Transcription Activation Ex Vivo in Primary Human Fibroblasts and Induced Pluripotent Stem Cells. *Bioconjugate Chemistry*, *30*(2), 418–431. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00760>
- Buck, J., Grossen, P., Cullis, P. R., Huwyler, J., & Witzigmann, D. (2019). Lipid-based DNA therapeutics: Hallmarks of non-viral gene delivery. *ACS Nano*, *13*(4), 3754–3782. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07858>
- Caldwell, M. A., Garcion, E., TerBorg, M. G., He, X., & Svendsen, C. N. (2004). Heparin stabilizes FGF-2 and modulates striatal precursor cell behavior in response to EGF. *Experimental Neurology*, *188*(2), 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.05.007>
- Chen, Y.-C., Saito, D., Suzuki, T., & Takemoto, T. (2023). An inducible germ cell ablation chicken model for high-grade germline chimeras. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.202079>
- Choi, J. W., Kim, S., Kim, T. M., Kim, Y. M., Seo, H. W., Park, T. S., Jeong, J. W., Song, G., & Han, J. Y. (2010). Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS ONE*, *5*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012968>
- Chojnacka-Puchta, L., Sawicka, D., Lakota, P., Plucienniczak, G., Bednarczyk, M., & Plucienniczak, A. (2015). Obtaining chicken primordial germ cells used for gene transfer: in vitro and in vivo results. *Journal of Applied Genetics*, *56*(4), 493–504. <https://doi.org/10.1007/s13353-015-0276-7>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., & Marraffini,

- L. a. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>. Multiplex
- Dehdilani, N., Yousefi Taemeh, S., Rival-Gervier, S., Montillet, G., Kress, C., Jean, C., Goshayeshi, L., Dehghani, H., & Pain, B. (2023). Enhanced cultivation of chicken primordial germ cells. *Scientific Reports*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39536-1>
- Dimou, E., Cosentino, K., Platonova, E., Ros, U., Sadeghi, M., Kashyap, P., Katsinelos, T., Wegehingel, S., Noé, F., García-Sáez, A. J., Ewers, H., & Nickel, W. (2019). Single event visualization of unconventional secretion of FGF2. *Journal of Cell Biology*, 218(2), 683–699. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802008>
- Ezaki, R., Hirose, F., Furusawa, S., & Horiuchi, H. (2020). An improved protocol for stable and efficient culturing of chicken primordial germ cells using small-molecule inhibitors. *Cytotechnology*, 72(3), 397–405. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00385-9>
- Ezaki, R., Ichikawa, K., Matsuzaki, M., & Horiuchi, H. (2022). Targeted Knock-in of a Fluorescent Protein Gene into the Chicken Vasa Homolog Locus of Chicken Primordial Germ Cells using CRIS-PITCh Method. *Journal of Poultry Science*, 59(2), 182–190. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0210067>
- Ezaki, R., Sakuma, T., Kodama, D., Sasahara, R., Shiraogawa, T., Ichikawa, K., Matsuzaki, M., Handa, A., Yamamoto, T., & Horiuchi, H. (2023). Transcription activator-like effector nuclease-mediated deletion safely eliminates the major egg allergen ovomucoid in chickens. *Food and Chemical Toxicology*, 175(March), 113703. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113703>
- Haraguchi, T., Koujin, T., Shindo, T., Bilir, Ş., Osakada, H., Nishimura, K., Hirano, Y., Asakawa, H., Mori, C., Kobayashi, S., Okada, Y., Chikashige, Y., Fukagawa, T., Shibata, S., & Hiraoka, Y. (2022). Transfected plasmid DNA is incorporated into the nucleus via nuclear envelope reformation at telophase. *Communications Biology*, 5(1), 1–3. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03021-8>
- Herron, L. R., Pridans, C., Turnbull, M. L., Smith, N., Lilloco, S., Sherman, A., Gilhooley, H. J., Wear, M., Kurian, D., Papadakos, G., Digard, P., Hume, D. A., Gill, A. C., & Sang, H. M. (2018). A chicken bioreactor for efficient production of functional cytokines. *BMC Biotechnology*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0495-1>
- Houdebine, L. M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(2), 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.11.005>
- Hye, J. K., Lee, H. J., Kim, H., Cho, S. W., & Kim, J. S. (2009). Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Research*,

- 19(7), 1279–1288. <https://doi.org/10.1101/gr.089417.108>
- Idoko-akoh, A., Goldhill, D. H., Sheppard, C. M., Bialy, D., Quantrill, J. L., Sukhova, K., Brown, J. C., Richardson, S., Campbell, C., Taylor, L., Sherman, A., Nazki, S., Long, J. S., Skinner, M. A., Shelton, H., Sang, H. M., Barclay, W. S., & McGrew, M. J. (2023). *Creating resistance to avian influenza infection through genome editing of the ANP32 gene family*. 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41476-3>
- Idoko-Akoh, A., Taylor, L., Sang, H. M., & McGrew, M. J. (2018). High fidelity CRISPR/Cas9 increases precise monoallelic and biallelic editing events in primordial germ cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33244-x>
- Ioannidis, J., Taylor, G., Zhao, D., Liu, L., Idoko-Akoh, A., Gong, D., Lovell-Badge, R., Guioli, S., McGrew, M. J., & Clinton, M. (2021). Primary sex determination in birds depends on DMRT1 dosage, but gonadal sex does not determine adult secondary sex characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(10), 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020909118>
- Jarzebska, N. T., Mellett, M., Frei, J., Kündig, T. M., & Pascolo, S. (2021). Protamine-based strategies for RNA transfection. *Pharmaceutics*, 13(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060877>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), 1156–1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
- Kim, Y. M., Park, J. S., Choi, H. J., Jung, K. M., Lee, K. Y., Shim, J. H., Park, K. J., & Han, J. Y. (2023). Efficient production of recombinant human adiponectin in egg white using genome edited chickens. *Frontiers in Nutrition*, 9(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1068558>
- Kim, Y. M., Shim, J. H., Park, J. S., Choi, H. J., Jung, K. M., Lee, K. Y., Park, K. J., & Han, J. Y. (2023). Sequential verification of exogenous protein production in OVA gene-targeted chicken bioreactors. *Poultry Science*, 102(1), 102247. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102247>
- Kwon, M. S., Koo, B. C., Kim, D., Nam, Y. H., Cui, X. S., Kim, N. H., & Kim, T. (2018). Generation of transgenic chickens expressing the human erythropoietin (hEPO) gene in an oviduct-specific manner: Production of transgenic chicken eggs containing human erythropoietin in egg whites. *PLoS ONE*, 13(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194721>

- L. B. Jaques. (1973). Antagonist To Heparin. *Can Med Assoc J*, 108(10), 1291–1297.
- Lillico, S. G., Sherman, A., McGrew, M. J., Robertson, C. D., Smith, J., Haslam, C., Barnard, P., Radcliffe, P. A., Mitrophanous, K. A., Elliot, E. A., & Sang, H. M. (2007). Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), 1771–1776. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610401104>
- Liu, L., Wei, J., Chen, C., Liang, Q., Wang, B., Wu, W., Li, G., & Zheng, X. (2023). Electroporation-based Easi-CRISPR yields biallelic insertions of EGFP-HiBiT cassette in immortalized chicken oviduct epithelial cells. *Poultry Science*, 102(12), 103112. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103112>
- Macdonald, J., Glover, J. D., Taylor, L., Sang, H. M., & McGrew, M. J. (2010). Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015518>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- McLendon, P. M., Buckwalter, D. J., Davis, E. M., & Reineke, T. M. (2010). Interaction of poly(glycoamidoamine) DNA delivery vehicles with cell-surface glycosaminoglycans leads to polyplex internalization in a manner not solely dependent on charge. *Molecular Pharmaceutics*, 7(5), 1757–1768. <https://doi.org/10.1021/mp100135n>
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Dulay, G. P., Hua, K. L., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., Holmes, M. C., Zhang, L., Gregory, P. D., & Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29(2), 143–150. <https://doi.org/10.1038/nbt.1755>
- Miura, H., Gurusurthy, C. B., Sato, T., Sato, M., & Ohtsuka, M. (2015). CRISPR/Cas9-based generation of knockdown mice by intronic insertion of artificial microRNA using longer single-stranded DNA. *Scientific Reports*, 5(March), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep12799>
- Mukae, T., Okumura, S., Watanobe, T., Yoshii, K., Tagami, T., & Oishi, I. (2021). Production of recombinant monoclonal antibodies in the egg white of gene-targeted transgenic chickens. *Genes*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/genes12010038>
- Mukae, T., Yoshii, K., Watanobe, T., Tagami, T., & Oishi, I. (2021). Production and characterization of eggs from hens with ovomucoid gene mutation. *Poultry Science*, 100(2), 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.026>
- Nakade, S., Tsubota, T., Sakane, Y., Kume, S., Sakamoto, N., Obara, M., Daimon, T., Sezutsu,

- H., Yamamoto, T., Sakuma, T., & Suzuki, K. I. T. (2014). Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature Communications*, 5, 1–3. <https://doi.org/10.1038/ncomms6560>
- Oishi, I. (2010). Improvement of transfection efficiency in cultured chicken primordial germ cells by percoll density gradient centrifugation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(12), 2426–2430. <https://doi.org/10.1271/bbb.100464>
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Kagami, H., & Tagami, T. (2016). Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 6(April), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep23980>
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., & Tagami, T. (2018). Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Scientific Reports*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28438-2>
- Park, J. S., Choi, H. J., Jung, K. M., Lee, K. Y., Shim, J. H., Park, K. J., Kim, Y. M., & Han, J. Y. (2023). Production of recombinant human IgG1 Fc with beneficial N-glycosylation pattern for anti-inflammatory activity using genome-edited chickens. *Communications Biology*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04937-5>
- Park, T. S., Lee, H. G., Moon, J. K., Lee, H. J., Yoon, J. W., Yun, B. N. R., Kang, S. C., Kim, J., Kim, H., Han, J. Y., & Han, B. K. (2015). Deposition of bioactive human epidermal growth factor in the egg white of transgenic hens using an oviduct-specific minisynthetic promoter. *FASEB Journal*, 29(6), 2386–2396. <https://doi.org/10.1096/fj.14-264739>
- Park, T. S., Lee, H. J., Kim, K. H., Kim, J. S., & Han, J. Y. (2014). Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), 12716–12721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410555111>
- Ponti, F., Campolungo, M., Melchiori, C., Bono, N., & Candiani, G. (2021). Cationic lipids for gene delivery: many players, one goal. *Chemistry and Physics of Lipids*, 235(November 2020), 105032. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105032>
- Quadros, R. M., Miura, H., Harms, D. W., Akatsuka, H., Sato, T., Aida, T., Redder, R., Richardson, G. P., Inagaki, Y., Sakai, D., Buckley, S. M., Seshacharyulu, P., Batra, S. K., Behlke, M. A., Zeiner, S. A., Jacobi, A. M., Izu, Y., Thoreson, W. B., Urness, L. D., ... Gurumurthy, C. B. (2017). Easi-CRISPR: A robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. *Genome Biology*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1220-4>
- Rengaraj, D., Cha, D. G., Lee, H. J., Lee, K. Y., Choi, Y. H., Jung, K. M., Kim, Y. M., Choi, H. J., Choi, H. J., Yoo, E., Woo, S. J., Park, J. S., Park, K. J., Kim, J. K., & Han, J. Y. (2022). Dissecting chicken germ cell dynamics by combining a germ cell tracing transgenic chicken



- model with single-cell RNA sequencing. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 1654–1669. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.040>
- Rengaraj, D., Won, S., Jung, K. M., Woo, S. J., Lee, H., Kim, Y. M., Kim, H., & Han, J. Y. (2022). Chicken blastoderms and primordial germ cells possess a higher expression of DNA repair genes and lower expression of apoptosis genes to preserve their genome stability. *Scientific Reports*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04417-y>
- Sakuma, T., Nakade, S., Sakane, Y., Suzuki, K. I. T., & Yamamoto, T. (2016). MMEJ-Assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nature Protocols*, 11(1), 118–133. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.140>
- Sheridan, C. (2016). FDA approves “farmaceutical” drug from transgenic chickens. *Nature Biotechnology*, 34(2), 117–119. <https://doi.org/10.1038/nbt0216-117>
- Shi, M., Kawabe, Y., Ito, A., & Kamihira, M. (2020). Targeted knock-in into the OVA locus of chicken cells using CRISPR/Cas9 system with homology-independent targeted integration. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(3), 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.09.011>
- Siewert, C. D., Haas, H., Cornet, V., Nogueira, S. S., Nawroth, T., Uebbing, L., Ziller, A., Al-Gousous, J., Radulescu, A., Schroer, M. A., Blanchet, C. E., Svergun, D. I., Radsak, M. P., Sahin, U., & Langguth, P. (2020). Hybrid Biopolymer and Lipid Nanoparticles with Improved Transfection Efficacy for mRNA. *Cells*, 9(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/cells9092034>
- Steringer, J. P., & Nickel, W. (2018). A direct gateway into the extracellular space: Unconventional secretion of FGF2 through self-sustained plasma membrane pores. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 83, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.010>
- Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E. J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebel, A., Soligalla, R. D., Qu, J., ... Belmonte, J. C. I. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 540(7631), 144–149. <https://doi.org/10.1038/nature20565>
- Taylor, L., Carlson, D. F., Nandi, S., Sherman, A., Fahrenkrug, S. C., & McGrew, M. J. (2017). Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. *Development (Cambridge)*, 144(5), 928–934. <https://doi.org/10.1242/dev.145367>
- Vakulskas, C. A., Dever, D. P., Rettig, G. R., Turk, R., Jacobi, A. M., Collingwood, M. A., Bode, N. M., McNeill, M. S., Yan, S., Camarena, J., Lee, C. M., Park, S. H., Wiebking, V., Bak, R. O., Gomez-Ospina, N., Pavel-Dinu, M., Sun, W., Bao, G., Porteus, M. H., & Behlke, M. A. (2018). A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables

- efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nature Medicine*, 24(8), 1216–1224. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0137-0>
- Van De Lavoie, 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., & Etches, R. J. (2006). Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 441(7094), 766–769. <https://doi.org/10.1038/nature04831>
- Wang, L., Chen, M. J., Chen, D. Y., Peng, S. F., Zhou, X. L., Liao, Y. Y., Yang, X. G., Xu, H. Y., Lu, S. S., Zhang, M., Lu, K. H., & Lu, Y. Q. (2017). Derivation and characterization of primordial germ cells from Guangxi yellow-feather chickens. *Poultry Science*, 96(5), 1419–1425. <https://doi.org/10.3382/ps/pew387>
- Whyte, J., Glover, J. D., Woodcock, M., Brzezczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., Kaiser, P., & McGrew, M. J. (2015). FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports*, 5(6), 1171–1182. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.008>
- Xie, L., Sun, J., Mo, L., Xu, T., Shahzad, Q., Chen, D., Yang, W., Liao, Y., & Lu, Y. (2019). HMEJ-mediated efficient site-specific gene integration in chicken cells. *Journal of Biological Engineering*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0217-9>
- Yao, X., Wang, X., Hu, X., Liu, Z., Liu, J., Zhou, H., Shen, X., Wei, Y., Huang, Z., Ying, W., Wang, Y., Nie, Y. H., Zhang, C. C., Li, S., Cheng, L., Wang, Q., Wu, Y., Huang, P., Sun, Q., ... Yang, H. (2017). Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Research*, 27(6), 801–814. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.76>
- Yousefi Taemeh, S., Dehdilani, N., Goshayeshi, L., Rival-Gervier, S., Mehrzad, J., Pain, B., & Dehghani, H. (2023). Study of the regulatory elements of the Ovalbumin gene promoter using CRISPR technology in chicken cells. *Journal of Biological Engineering*, 17(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13036-023-00367-3>
- Zhu, L., Van De Lavoie, M. C., Albanese, J., Beenhouwer, D. O., Cardarelli, P. M., Cuison, S., Deng, D. F., Deshpande, S., Diamond, J. H., Green, L., Halk, E. L., Heyer, B. S., Kay, R. M., Kerchner, A., Leighton, P. A., Mather, C. M., Morrison, S. L., Nikolov, Z. L., Passmore, D. B., ... Etches, R. J. (2005). Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1159–1169. <https://doi.org/10.1038/nbt1132>