

## ゲノム編集ニワトリ作製の基盤技術確立

### 研究組織

研究代表者：鈴木孝幸（名古屋大学大学院生命農学研究科）

共同研究者：竹本龍也（徳島大学先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

本研究では、未だに効率的な作成方法が発展途上であるゲノム編集ニワトリを高効率で作製する基盤技術の確立を目指す。そして技術の確立を行ったのちに、全細胞が蛍光標識されたニワトリ系統、及び中胚葉細胞の運命決定を行う種々の遺伝子を可視化したニワトリ系統を作成する。

これまでの報告で、鳥類における遺伝子改変は始原生殖細胞（PGC）へのウイルスにより遺伝子導入、及び PGC に電気穿孔法などの方法で外来 DNA を導入することにより成功したとの報告がされている。しかし、ウイルスでは遺伝子の破壊は出来ないため近年普及が進んでいる CRISPER/Cas9 システムを用いる時には電気穿孔法を用いることが必須となる。この時 PGC を一度に大量に調整する必要があり、ニワトリ胚から直接単離した PGC では数が足りない。そこで PGC を培養し、人工的に増殖させてから、その PGC に遺伝子改変を行う手法が提案されている。しかし、すべてのニワトリの系統の PGC が培養出来る訳ではなく、培養液が汎用的ではないのが実状である。さらには雌の PGC の増殖が雄に比べて非常に悪いという結果がある。そのため、PGC の培養にはニワトリの系統を選抜する必要がある。家禽は海外から生体で輸入することが出来ないため、どの系統の PGC を遺伝子改変に用いるかは自分たちで決める必要がある。

さらに、PGC をニワトリ胚に戻す方法も、背側の大動脈に戻す方法と、胚体外血管に戻す方法があり、どの方法が最も効率的に遺伝子組換え鳥類を得ることが出来るのかは未だに分かっていない。

#### [1-2]研究の方法・経過

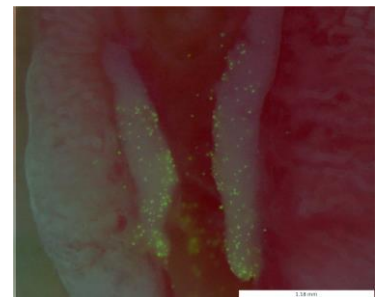
### 【2】研究成果

#### [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

まず、名古屋大学が所属する様々なニワトリ系統を用いてどの系統の PGC が最も増殖率が良いのか、系統間の比較を行った。培地には低オスモル濃度の Avian knockout DMEM を用いた。その結果ブランレグホンやブラックミノルカ、近交系などでは PGC の増殖率が低いことが判明した。一方、奈良の竹内孵卵場で生産されているホワイトレグホンの卵を用いた結果、得られた PGC の増殖率は高いことが判明した。またこれまで雌の PGC が増えたことはほとんど無かったが、雌の PGC も効率は低いが増殖することに成功した。これらの結果は、遺伝子組換え鳥類を作製する時は系統を選ぶことが必須であるということと、竹内孵卵場のホワイトレグホンの卵由来の PGC を改変する PGC として用いることが良いということが判明した。

そこで、竹内孵卵場のホワイトレグホン（以下 WL）の卵由来の PGC を採取し、増殖、株化が成功したものを徳島大学に送り、遺伝子組換え用の PGC として竹本博士に使用して頂くことにした。

外来 PGC が WL 由来のレシピエント胚に定着するかどうかを調べるために、PGC に EFP を発現させたトランスジェニック PGC を St. 14 の胚に移植し、5 日間孵卵させて生殖腺に定着しているかどうかを観察した。その結果、下の図のように EGFP を発現した外来 PGC が生殖腺に定着している様子が観察された。このことから、このレシピエント胚は、生殖腺キメラになっている

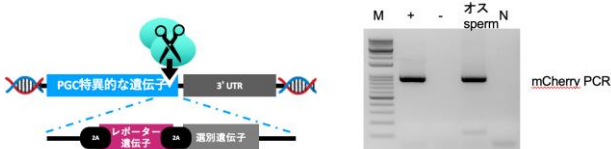


ることが判明した。

これらの研究から、実際にテクニックとして外来 PGC をレシピエントの生殖腺に定着させることに成功したため、次に外来 PGC から機能的な生殖細胞が分化出来るか検討することにした。

名古屋大学にて、発生中に生殖腺キメラが形成されていることが確認された PGC の系統をラインを孵化させ、その個体を性成熟させた。生殖腺キメラ個体を野生型のニワトリと交配し、ヘテロ個体を得ようと試みた。しかしながら、ヒナの遺伝子型を 30 個体以上チェックしたがヘテロ個体は確認出来なかった。これらの結果から、生殖腺までは外来 PGC が定着出来てはいるが、生殖細胞への分化に問題がある可能性が示唆された。名古屋大学で培養を行なっている PGC は培養日数が半年を超えており、このような長期の培養により生殖細胞への分化能を失った可能性が考えられる。

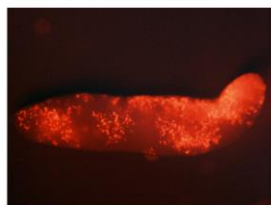
徳島大学では、この結果を元に培養日数が少ない PGC を用いて遺伝子改変を行い、PGC 特異的な遺伝子の下流に蛍光タンパク質を発現する遺伝子を組み込んだ細胞のラインを確立した。実際に遺伝子改変 PGC を発生中の血中に戻し、孵化させた個体を精成熟させた。オスの個体の精子を採取し、遺伝子が改変された生殖細胞が存在するかどうかを PCR を用いて観察した結果、精子の中に遺伝子改変されているものがあることが判明した（下図）。



同様に、発生中の生殖腺も観察した結果、生殖腺にも蛍光タンパク質を発現する細胞が観察された（下図）。

これらの結果から、培養日数が少ない PGC を用いると分化能を保持した状態の PGC が維持でき、遺伝子改変された生殖細胞を得ることが出来ることが判明した。

E16ニワトリ胚の生殖腺



[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

高効率に PGC を遺伝子改変し、遺伝子組み換え鳥類を作出する技術は世界的に見てもこれ

まで汎用的な技術となっていない。また鳥類の生体を維持する仕組みを保持している大学は日本でも少ない。そのため、本共同研究により、竹本博士が開発した電気穿孔法を用いて高効率に PGC をゲノム編集する技術と、名古屋大学で行っている外来 PGC によるトランスジェニックニワトリ作出の技術を組み合わせることにより、汎用的な遺伝子組み換え鳥類を作出する技術が確立されることが期待される。

今回の共同研究で、PGC の培養日数が個体に戻したときの生殖細胞への分化能に大きく影響を与えることが判明した。そのため、今後この技術は、今後遺伝子組換えではなくとも、貴重なニワトリの系統を PGC で凍結しておき、必要な時にそのニワトリの系譜を復元出来る、鳥類系統の保存技術としても有用である。日本には地鶏などそれぞれの地域に根ざしたニワトリの系統が存在するが、それらはすべて生体で維持されており、昨今の鳥インフルエンザの脅威にさらされている。貴重な日本のニワトリ資源の保存のためにも本技術が役に立つ可能性は極めて高い。

また、現在作成中の蛍光タンパク質を発現させたトランスジェニックニワトリは、ライブイメージングなどの基礎研究にも有用である。鳥類は外国からの輸入が難しいため自国内でトランスジェニック鳥類を作製する必要がある。本技術は今後の国内の遺伝子改変鳥類作製の基本技術となることが期待される。

### 【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

1 ページ目下の図（外来 PGC が生殖腺に定着した図）。2 ページ目左下の図（外来 PGC が精子で確認された図及び生殖腺への定着を確認した図）

### 【4】今後の課題等

今年度の研究から、遺伝子改変を行うために適切な PGC の培養日数が判明した。これらの結果から今後孵化させたキメラニワトリから実際にヘテロ個体を得ることが出来るかを直接調べたい。もし遺伝子組換え個体が次世代で伝播されていることが確認されれば、本手法を用いて、今後様々な有用な遺伝子組換えニワトリを効率的に作成していきたい。