

鶏卵バイオリクターを可能にするニワトリ始原生殖細胞ゲノム編集技術の開発

国立研究開発法人産業技術総合研究所健康工学研究部門・主任研究員 大石 勲

■ 緒言

鶏卵は安価で優れた畜産物であり、食品等工業製品の素材としても有用である。最近では、ニワトリ遺伝子改変により鶏卵内にバイオ医薬品に代表される有用な組換え蛋白質を生産する新しい試み(いわゆる鶏卵バイオリクター化技術)も行われており、鶏卵が食用に留まらず、多様な組換え蛋白質の供給源となることに大きな期待が寄せられている¹⁾。特に、需要があり高額な抗体医薬等を低コストで生産することで、価格を大幅に低減すると期待され、社会ニーズも非常に高い。本研究では鶏卵バイオリクター実現を可能とする新たなニワトリ遺伝子改変技術を確認することを目的とした。

鶏卵バイオリクター化の大きな問題は、有用蛋白質遺伝子をニワトリゲノムに導入した際に高頻度に起こる遺伝子サイレンシング(外来遺伝子の発現抑制)である。この問題の解決には従来のランダムな遺伝子導入ではなく、ニワトリゲノム上の特定領域に遺伝子導入可能な部位特異的遺伝子改変技術が必要である。最近、マウスやゼブラフィッシュ等の実験動物受精卵で用いられている TALEN, CRISPR といったゲノム編集技術は遺伝子ノックイン等部位特異的遺伝子改変個体作製に有効であるが、ニワトリへのノックイン技術適用は困難であり、世界でも報告されていない。これはニワトリの受精卵を用いた遺伝子改変ならびに個体作製技術が未熟なことに起因しており、受精卵に代わる細胞ベースの新たな技術開発が不可欠と考えた。

そこで、本研究では、申請者らが独自開発したニワトリ始原生殖細胞株(将来生殖細胞に分化可能な細胞株)を用いて遺伝子ノックインニワトリ個体作製に適用可能なゲノム編集技術の創出を試みた。特に、ニワトリ卵管組織特異的遺伝子座に外来遺伝子をノックインすることで、将来遺伝子サイレンシングを受けることなく有用蛋白質を安定生産可能とする技術を開発するとともに、ニワトリ個体への適用を目指した。

■ 方法

・始原生殖細胞株樹立

横斑プリマスロック種雄 2.5 日胚(HH14-16)の環状静脈よりガラスニードルを用いて採血を行った。1 胚体あたり 2-4 μ l 採血を行い、同時に PCR により性決定を行い、雄胚体由来の 3 サンプルを混合し、培地中で培養を行った。培地組成は既報の通りとした^{2,3)}。また、フィーダー細胞として不活化 BRL 細胞を使用した。1ヶ月の培養の後、増殖性を獲得した始原生殖細胞株を得た。

・遺伝子コンストラクト

雄 BPR 由来始原生殖細胞を用いてゲノム編集による遺伝子ノックインを行った。オポアルブミン遺伝子の翻訳開始点に外来遺伝子(EGFP)を挿入することを目的とし、図 1 に示されるドナーコンストラクト(EGFP ドナーコンストラクト)を作製した。このドナーコンストラクトをプラスミド pBlue ScriptII(SK+)(Stratagene, 現 Agilent technologies)に挿入し pBS-EGFP ドナーとした。また、標的部位に対する遺伝子切断を行う目的で px330(Addgene)にオポアルブミン認識配列を有する px330-OVATg1 を構築した。

・始原生殖細胞における遺伝子ノックイン操作

$1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個の始原生殖細胞株にリポフェクタミン 2000(Life Technologies)を用いて px330-OVATg1 と pBS-EGFP ドナーを同時に遺伝子導入し、導入後 3 日以降、ピューロマイシンを終濃度 1 μ g/ml で添加した。適宜培地交換を行い、終濃度 1 μ g/ml のピューロマイシン存在下で増殖する細胞を選抜した。

・PCR および定量 PCR による始原生殖細胞ゲノムの解析

$1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個の始原生殖細胞回収し、QIA tissue and blood kit(QIAGEN)を用いてゲノム DNA を調製した。遺伝子ノックイン可否の検定は、ゲノム DNA を鋳型とし、各種プライマーとともに Mighty Amp ver.2(Takara)を用い、サーマルサイクラー Veriti(Applied Biosystems)を用いた PCR による遺伝子増幅操作により行った。

ノックイン効率の検定は THUNDERBIRD qPCR Mix(東洋紡)を使用し 7300 Real Time PCR system

(Applied Biosystems)を用いた定量 PCR により解析した。

■ 結果

(1) 始原生殖細胞株樹立とノックインゲノム編集操作

樹立した始原生殖細胞はこれまでの報告と同様に球形の浮遊性細胞であり、大型の核と多くの油滴が認められた。px330-OVATg1 とともに pBS-EGFP ドナーを遺伝子導入し、薬剤選択した細胞も外観に大きな違いは認められない(図 2)。

(2) 始原生殖細胞遺伝子ノックインの検証

次に、ドナーコンストラクトがオボアルブミン遺伝子座にノックインされていることをゲノム PCR により確認した。5' 領域についてドナーコンストラクトの外来遺伝子とドナーコンストラクトに含まれないオボアルブミンの 5' 領域に対するプライマーを用いた PCR を行った。図 3 に示すように px330-OVATg1 と共にドナーコンストラクトを導入し、薬剤選択した始原生殖細胞(ノックイン PGCs)由来ゲノムを鋳型とした場合、ドナーコンストラクトが挿入された際に期待される約 2.9k の位置に増幅産物が認められるのに対し、対照の遺伝子導入を行っていない始原生殖細胞由来ゲノム(対照 PGCs)を鋳型とした場合、増幅産物は認められない。

同様に、3' 領域についても図 3 に示すようにノックイン PGCs 由来ゲノムを鋳型とした場合、ドナーコンストラクトが挿入された際に期待される約 3.4k の位置に増幅産物が認められるのに対し、対照の PGCs 由来ゲノムを鋳型とした場合、増幅産物は認められない。以上のことから、薬剤選択された細胞集団の中に外来遺伝子部分を含むドナーコンストラクトがオボアルブミン遺伝子座にノックインされた細胞が存在すると考えられる。

(3) ノックイン効率の検定

次に、薬剤選択された細胞群にどの程度の割合でドナーコンストラクトがオボアルブミン遺伝子座にノックインされた細胞が存在するか検定した。薬剤選択された細胞群と遺伝子導入を行っていない始原生殖細胞(対照 PGCs)よりゲノム DNA をそれぞれ調製した。これを鋳型として 3 組の定量 PCR(PCR(OVA5'), PCR(OVA(ATG)), PCR(GAPDH))を行った。図 4 に模式的に示すように OVA5' の PCR 産物はノックインされていないオボアルブミン遺伝子、ランダムに挿入されたドナーコンストラクト、ノックインされたドナーコンストラクトのいずれをも鋳型として増幅される。一方、OVA(ATG)の PCR 産物はノックインされていないオボアルブミン遺伝子のみを鋳型とし、ランダムに挿入されたドナーコンストラクト、ノックインされたドナーコンストラクトを鋳型とした増幅は長い増幅領域のため、殆ど起こらない。GAPDH はゲノム量の内部標準として用いた。内部標準による補正を行った定量 PCR の結果をグラフ化したものを図 4 に示す。OVA5' の PCR 産物が薬剤選択された細胞群ゲノムと対照の始原生殖細胞ゲノムにおいて有意差が無いのに対し、OVA(ATG)の PCR 産物は薬剤選択された細胞群ゲノムにおいて対照の十分の一以下となっている。OVA5' の PCR 産物に有意差が無いことは、ドナーコンストラクトのノックイン以外のランダムな挿入が検出限界以下であることを示している。一方、OVA(ATG)の PCR 産物が薬剤選択された細胞群ゲノムにおいて対照の十分の一以下となったことは、このゲノムのオボアルブミン遺伝子の 9 割以上でドナーコンストラクトがノックインされていることを示している。すなわち、薬剤選択された始原生殖細胞群において 90% 以上のオボアルブミン遺伝子がノックインコンストラクトによって置き換えられていると判断される。

■ 考察

本研究では培養始原生殖細胞にゲノム編集技術により高効率に遺伝子ノックインを可能にする方法を開発した。また、実際に 90% 以上の細胞でドナーコンストラクトのノックインが推定され、一方でランダムな挿入は限定的であると考えられる。遺伝子操作した始原生殖細胞を初期胚に導入することで生殖巣キメラが樹立可能であり、これを介した遺伝子組み換えニワトリも作出できる。これらのことから、今回開発した技術を用いることで染色体の任意の場所に外来遺伝子をノックインしたニワトリの樹立が可能になったと考えられる。

ニワトリの遺伝子組み換えにより、卵管組織特異的に有用外来遺伝子産物を発現することで有用組換え蛋白質を鶏卵内に大量発現させる試みが行われてきた⁴⁻⁶⁾。従来技術によるランダムな遺伝子導入法では卵管特異的に遺伝子発現可能なものの、発現量は限定的で鶏卵内への組換え蛋白質蓄積は期待したほどのものにはなっていない。今回開発したノックイン技術によりオボアルブミンなど鶏卵内で大量発現するような遺伝子の遺伝子座に有用外来遺伝子を正確に挿入することが可能になる。こ

れにより、従来以上の有用組換え蛋白質を鶏卵内に発現することが可能になると強く期待される。本研究の成果を受けて、現在ヒトサイトカイン等の有用蛋白質遺伝子ノックインに取り組んでおり、今後鶏卵バイオリアクターの実現に向けて研究を推進して行きたい。

■ 要 約

ニワトリを遺伝子組換えし、鶏卵内に有用蛋白質を大量生産する技術(鶏卵バイオリアクター技術)の開発が期待されているが、遺伝子ノックイン技術等の樹立が必要である。本研究ではニワトリ始原生殖細胞を用いたゲノム編集技術の開発を試み、卵白の最大成分であるオボアルブミンの遺伝子座にモデル外来遺伝子を高効率にノックインすることに成功した。今回開発した手法が今後、鶏卵バイオリアクターを実現する上で非常に有効な要素技術となることが強く期待される。

■ 文 献

1. Lillico, S. G., Mcgrew, M. J., Sherman, A. & Sang, H. M. (2005) Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today*, 10(3), 191-6.
2. 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), 766-9.
3. Oishi, I. (2010) Improvement of transfection efficiency in cultured chicken primordial germ cells by percoll density gradient centrifugation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74(12), 2426-30.
4. Zhu, L., Van De Lavoie, M. C., Albanese, J., Beenhouwer, D. O., Cardarelli, P. M., Cuisson, 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., Pradas-Monne, A., Preston, B. T., Rangan, V. S., Shi, M., Srinivasan, M., White, S. G., Winters-Digiaccinto, P., Wong, S., Zhou, W. & Etches, R. J. (2005) Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol*, 23(9), 1159-69.
5. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(6), 1771-6.
6. Park, T. S., Lee, H. G., Moon, J. K., Lee, H. J., Yoon, J. W., Yun, B. N., 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 J*.

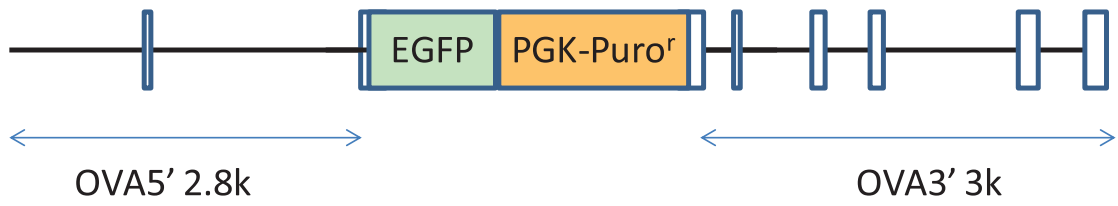


図1 EGFP ドナーコンストラクト

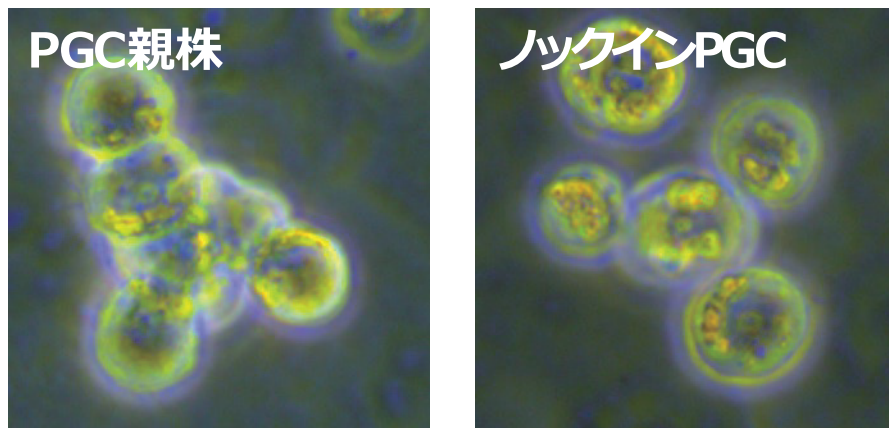


図2 遺伝子ノックインしたニワトリ始原生殖細胞

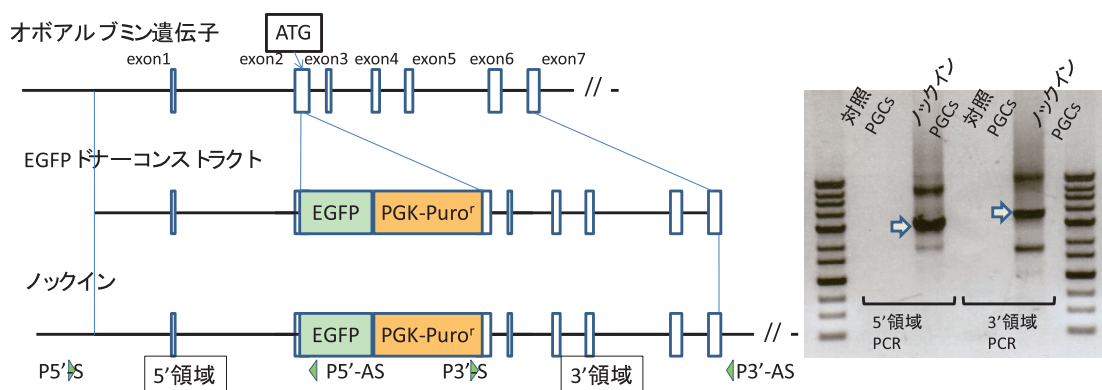


図3 ゲノム PCR による始原生殖細胞遺伝子ノックインの検証

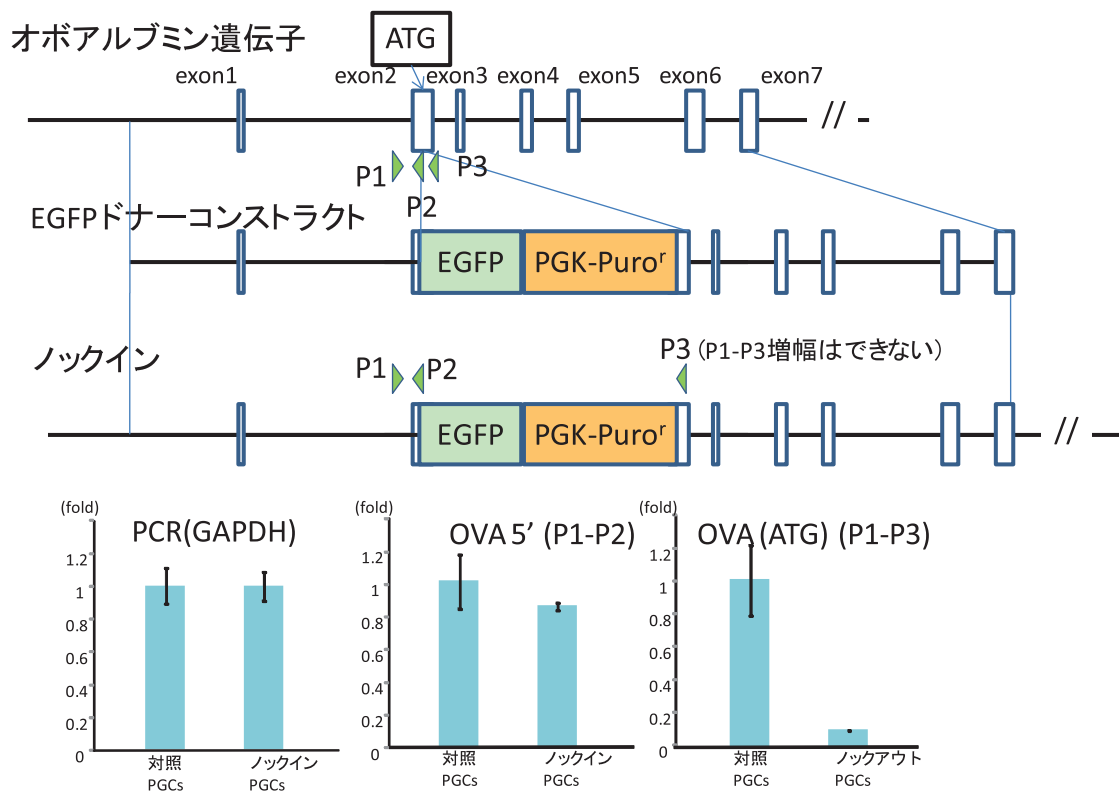


図4 qPCRによるノックイン効率の検定