

非遺伝子組換え技術による遺伝子改変ニワトリの作出技術の開発

東京大学大学院農学生命科学研究科・助教 藤井 渉

■ 緒言

本研究では、ニワトリ始原生殖細胞(PGC)を介して、非遺伝子組換え技術による標的遺伝子改変を行い、ニワトリ卵移植を行うことで、遺伝子組換え体としての制限を受けない形質転換ニワトリを作出する新たなスキームの確立を目的とする。

ニワトリは生産効率が高く宗教的制限がないなどの点から、人類にとって極めて貴重な経済動物である。これまでニワトリの経済形質に着目した育種改良が行われてきたが、現在もなお、更なる改良が求められている。最たる例は、鳥インフルエンザに対する耐病性の獲得である。鳥類は渡り鳥などを介した感染症の伝播を制御することは難しく、鳥インフルエンザの制御は公衆衛生的なアプローチに加え、個体の耐病性に依存することとなる。鳥インフルエンザの流行に伴う生産低下と価格高騰は我々の食卓の豊かさに直結することから、耐病性の向上は喫緊の課題である。耐病性のみならず、ニワトリは経済動物としてさらなる改良の余地を残している。

このような育種を進めるためには、どのような遺伝情報がどのような形質と因果関係を持つかという点を明らかにして育種マーカーを決定する必要がある。かつてはこのようなアプローチは自然突然変異に依存した遺伝的多型と形質をつなげる「順遺伝学的アプローチ」を伴う方法が一般的であった。一方で、近年の次世代シーケンサーなどの遺伝情報の解読技術の革新により、ニワトリのゲノム情報や発現遺伝子情報の知見は蓄積しており、これらの情報から、形質に関連すると目される遺伝情報を直接遺伝子操作し、それによる形質の変化を観察することで遺伝情報と形質との因果関係を解明する「逆遺伝学的アプローチ」によるニワトリの理解の加速とゲノム育種の加速化が期待されている状況にある。ゲノム編集技術の登場により、実験動物のみならず家畜や家禽などの幅広い生物種で遺伝子改変が可能となり、経済形質に関する研究の加速化が期待されている。申請者は、世界に先駆けたCRISPR-Cas9システムによる遺伝子改変マウス系統の作出¹⁾をはじめ、実験動物やブタ、魚類、麹菌などの資源生物のゲノム編集研究で成果を挙げてきた。一方で、CRISPR-Cas9システムはヌクレアーゼタンパク質であるCas9とともに、標的の遺伝子座位を識別するためのユニットであるガイドRNAを利用することから、CRISPR-Cas9システムは必ず核酸を利用することとなる。そのため、作製生物はカルタヘナ法の対象となり、飼育や取り扱いが制限され、ニワトリのような飼育コストを要する生物では、利用可能な研究者を制限する結果となることが課題となる。CRISPR-Cas9システムに対して、同じゲノム編集ツールであるZinc Finger Nuclease(ZFN)は、核酸でなくリコンビナントタンパク質の様態で利用できる培養細胞で報告されており、カルタヘナ法の制限を回避できる方法として生物個体への応用が期待されている。申請者はこれまでにZFNの高速構築系や高機能セットの発見を報告しており^{2,3)}、これらの知見を活用してZFNタンパク質によるニワトリPGCの改変系を最適化することで、利用制限の低い遺伝子改変ニワトリを作出できると着想した。

そこで本研究では、ZFNリコンビナントタンパク質によるゲノム編集がニワトリPGCにおいて利用可能か検討するとともに、ゲノム編集を行なったPGCが発生可能かを合わせて検討した。

■ 方法

①リコンビナントZFNの合成および精製系の検討

前述の自家ZFNをコードするリコンビナントタンパク質の合成系を検討した。リコンビナントタンパク質の発現系として大腸菌、HEK293Tおよび無細胞タンパク質発現系を検討し、精製タグにHisおよびSBPを検討した。

②ニワトリPGCの培養系、遺伝子導入系、および有精卵への移植効率評価

無血清培地によるニワトリPGCの培養系を利用した。遺伝子導入系として、エレクトロポレーションおよびリポフェクション法を検討した。遺伝子導入したPGCの薬剤選抜が可能か検討した。

③有精卵に対する外来因子の直接導入法の検討

ウズラで実行可能であることが報告された、有精卵の血管を介してリポフェクション試薬を直接導入する方法⁴⁾について、ニワトリ有精卵で実施可能か検討した。さらに、胚への導入を介して全身性

の遺伝子導入胚の作製が可能であるか検討した。

④リコンビナント ZFN タンパク質による in vivo PGC の遺伝子操作の検討

③の方法によってリコンビナント ZFN を導入し、生体内で PGC の遺伝子操作が可能であるか検討した。

■ 結果

① リコンビナント ZFN タンパク質の合成系を検討した。pET43 をベースに ZFN 発現ベクターを構築し、BL21 (DE3) 大腸菌に導入し IPTG で発現誘導したところ、ZFN の発現が認められた。一方、ライセートからの精製を試みたが、対照区として検討した蛍光タンパク質は精製できたが、ZFN は回収できなかった。同様に、HEK293T 発現でも ZFN リコンビナントタンパク質の回収が困難であることが明らかとなった。そこで、ZFN をコードする RNA を合成し、PurExpress システムによる無細胞タンパク質合成系を利用し、SBP タグを付加した ZFN をストレプトアビジンビーズによって回収したところ、精製度の高いタンパク質の回収が可能であることが明らかとなった。

② 広島大学の中村隼明先生にご指導いただき、Dehdilani et al., Scientific Reports, 2023 にある無血清培地によるニワトリ PGC の長期培養系の当研究室への導入に成功した。一方、有精卵から採血し、新規の PGC 株の樹立を試みたが、長期培養できる新規株の樹立には成功しなかった。

遺伝子導入について、一般的に利用されているエレクトロポレーション法を実施した。NEPA21 エレクトロポレーターによって蛍光レポーターをコードするプラスミド DNA の導入を試みたところ、蛍光発現した PGC が認められた。一方、リポフェクション法によって導入を試みたところ、前述の無血清培地下で実施したところ、Polyethylenimine および Lipofectamine 2000 のいずれを用いた場合も、蛍光発現する PGC は認められなかった。そこで、培地を OptiMEM に置換しリポフェクションを行ったところ、遺伝子導入が認められた(図 1)。

遺伝子導入細胞の濃縮を目的として薬剤選抜を試みた。piggybac システムを利用し、蛍光レポーターおよび Puromycin 耐性遺伝子をコードしたプラスミド DNA と piggybac トランスポサージェをコードしたプラスミド DNA を共導入し、48 時間後から各濃度で Puromycin 添加培地で培養を行ったが、蛍光発現細胞の濃縮は認められなかった。薬剤による影響を考慮し、遺伝子導入後に薬剤選抜を行わず有精卵への移植を行ったが、レポーター発現した生殖細胞の生着は認められなかった。

③ 前述の通り、一般的な方法では遺伝子導入 PGC の樹立と移植が困難であった。そこで、代替法として、リポフェクション試薬を有精卵の血管に直接導入し、PGC への遺伝子導入が可能であるか検討した。Lipofectamine 2000CD を用いて、DNA : lipofectamine : OptiMEM=1 ug : 3 uL : 100 uL の比率で調整したミックスを導入し、継続培養したところ、16 日胚の生殖腺においてレポーターの高い発現が認められた(図 2)。注入胚と非注入胚で形態に顕著な影響は認められず、注入は胚の発生に影響しないことが示唆された(図 2)。一方、0.5 および 1.5 日胚に同様の方法で遺伝子導入を試みたが、蛍光レポーターを発現する胚は得られず、高頻度な胚の退行が惹起された(図 3)。

④ 生体内でリコンビナント ZFN による PGC の遺伝子操作が可能であるか検討した。標的配列をコードした再構築蛍光レポーターとリコンビナント ZFN を共導入したところ、蛍光レポーターの再構築が認められたことから、リコンビナントタンパク質によってニワトリ PGC 内で遺伝子操作が可能であることが明らかとなった(図 4)。

以上の結果より、リコンビナントタンパク質によってニワトリ PGC の遺伝子操作が可能であることが示唆された。本確立技術を利用することで、カルタヘナ法を回避した遺伝子改変ニワトリの作製が可能となると期待される。

■ 考察

本研究では、カルタヘナ法に抵触しない新たな方法による遺伝子改変ニワトリ作製法の基礎技術の構築を試み、生体内で発生可能な遺伝子操作 PGC の確立に成功した。PGC を介した遺伝子導入法は、培養下における遺伝子導入が一般的であった。一方で、本研究では各実験パートは再現できたものの、連続した培養による生体への生着は再現できなかった。幹細胞培養分野では、細胞株によって生体への生着効率などに差が生じることが知られており、今回の結果は細胞株の質による影響が懸念される。加えて、無血清培養条件という極めて慎重を要する培養系を用いたため、リポフェクションによる阻害的影響が強く反映されたことも予想される。今後、血清を用いた培養条件や、リポフェクションに代わり脂質ナノ粒子などのより阻害的影響の小さな遺伝子導入法を利用することで、培養下での一連の実験を成功できると期待される。

一方で、上記の通り培養下での実験が困難を伴ったため、胚に対する直接導入法を検討したところ、ウズラによる既報と同様に、ニワトリでも生殖細胞系列に高効率に遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。PGC 培養は、一部の品種では困難であるとされていることを考慮すると、この胚への *in vivo* 導入法は、これまでに遺伝子操作が困難とされてきたニワトリ品種やその他の PGC 培養系が報告されていない鳥類にも遺伝子操作を可能とし、鳥類発生工学における新たなアプローチとなると期待される。

ゲノム編集の成否を検出するための様々な手法が存在するが、多くは標的細胞の DNA を抽出し、その標的座位を解析する方法である (T7 エンドヌクレアーゼアッセイなど)。この方法は内在性配列における変異の有無を検出できることから評価対象のゲノム編集ツールが実際の遺伝子操作に利用できるかを解析できるという点で有効であるものの、遺伝子導入効率が十分でない場合に、非導入細胞由来のゲノムも混在するため、ツールが機能していないのか、それとも遺伝子導入自体がうまくいっていないか、その評価が難しい。そこで、本研究では、ゲノム編集ツールが機能した細胞で蛍光レポーターが再構築する系を採用し、生殖細胞系列におけるレポーター発現を観察した。その結果、生殖細胞系列において蛍光レポーターの発現が認められたことから、リコンビナント ZFN によって PGC における遺伝子操作が可能であることが強く示唆された。一方で、蛍光発現が認められた細胞は、再構築を必要としない *intact* レポーターを導入した場合と比較して、極めて限られた細胞のみでレポーター発現が認められたことから、ZFN 導入された細胞でもゲノム編集が起こっていない場合もあると予想される。また、生殖腺全体のうち、多くの生殖細胞はレポーター発現が認められないことから、この個体から得られる次世代は依然として野生型の個体が混在すると予想された。そのため、より効率的な逆遺伝学的アプローチを実施するためには、より効率的な *in vivo* 導入方法を確立する必要がある。生殖細胞ではなく胚体への導入を指向して早期の胚に導入した結果、胚性致死に至ったことから、胚の時期依存的に最適化した導入技術の検討も、今後のニワトリにおける *in vivo* 遺伝子操作技術の効率化に資すると期待される。

■ 要 約

本研究ではカルタヘナ法に制限されない遺伝子操作ニワトリの作出法の確立を目的として、ニワトリ胚においてリコンビナントタンパク質による Zinc Finger Nuclease が遺伝子操作に利用可能か検討した。遺伝子操作法として、培養下のニワトリ始原生殖細胞 (PGC) における遺伝子操作に代わり、2.5 日ニワトリ胚の血管を介したリポフェクション試薬の直接導入法によって、遺伝子操作した生殖腺をもつニワトリ胚の発生が可能であることが明らかとなった。また、リコンビナント ZFN を導入したところ、PGC 内においてゲノム編集が可能であることが示唆された。今後、導入方法の効率化や、内在性ゲノム配列に対する変異導入の可否について検討することで、カルタヘナ法に制限されない次世代の遺伝子操作ニワトリ作出法として利用できると期待される。

■ 文 献

- 1) Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K* Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 41 (20) : e187. 2013
- 2) Fujii W, Kano K, Sugiura K, Naito K* Repeatable Construction Method for Engineered Zinc Finger Nuclease Based on Overlap Extension PCR and TA-cloning. *PLoS One.* 8(3) : e59801. 2013
- 3) Fujii W, Onuma A, Yoshioka S, Nagashima K, Sugiura K, Naito K* Finding of a highly efficient ZFN pair for Aqpep gene functioning in murine zygotes. *J Reprod Dev.* 61 (6) : 589-93. 2015
- 4) Serralbo O, Salgado D, Véron N, Cooper C, Dejardin MJ, Doran T, Gros J, Marcelle C. Transgenesis and web resources in quail. *Elife.* 2020 e56312.

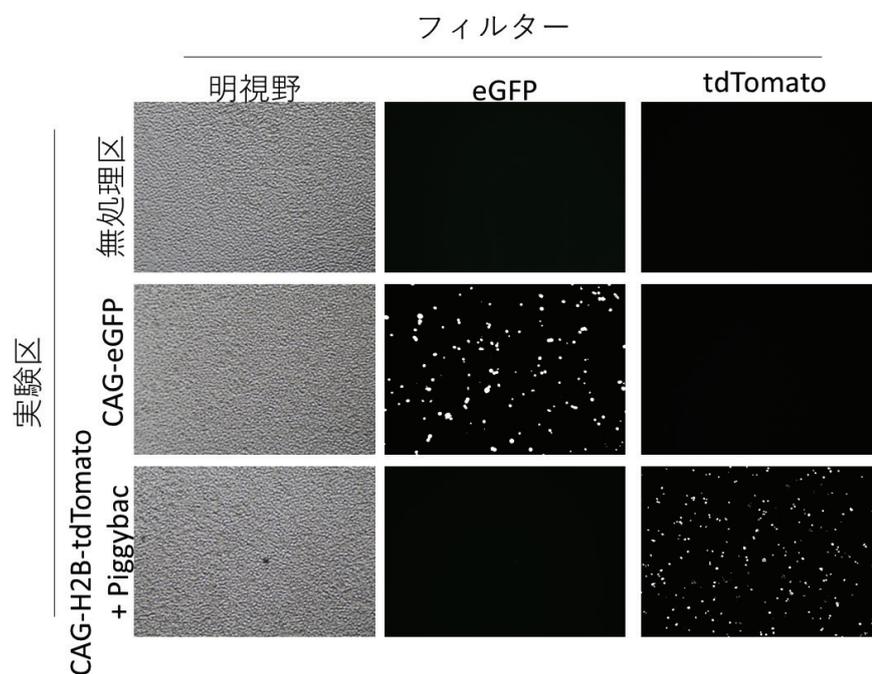


図1. ニワトリ PGC への遺伝子導入
OptiMEM に置換した培養下の PGC に eGFP または tdTomato を発現するプラスミド DNA を導入し、48 時間後に蛍光発現を観察した。

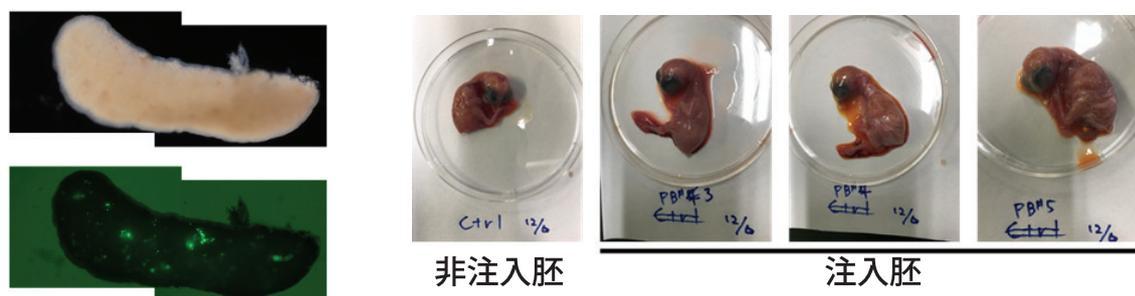


図2. In vivo 直接導入法による生殖隆起への遺伝子導入
2.5 日胚の血管にリポフェクタミンミックスを注入し 16 日胚で回収した生殖腺(左)。非注入胚と注入胚の形態(右)。



非注入胚

注入胚

図 3. in vivo 直接導入法による生殖腺への遺伝子導入
0.5 日胚の血管にリポフェクタミンミックスを注入し 6 日で回収した胚。

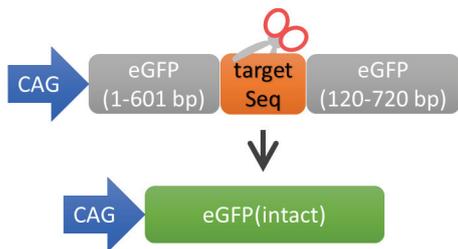
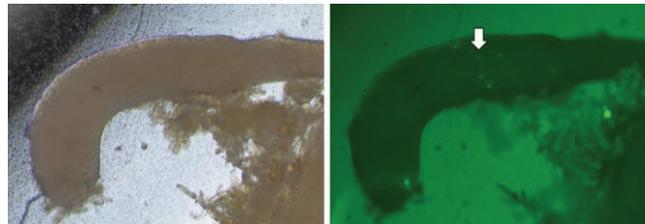


図 4. in vivo 直接導入法によるリコンビナント ZFN とレポーターの導入
ゲノム編集ツールが機能することでレポーター配列が再構築する(左)。2.5 日胚の血管にリポフェクタミンミックスを注入し 16 日胚で回収した生殖腺。レポーターの再構築によるレポーター発現が認められた(右)。