

卵を用いた胚発生研究を推進する新規ゲノム編集技術の開発

神戸大学農学研究科・准教授 万谷 洋平

■ 緒 言

卵は食品としての有用性の他、脊椎動物の個体発生メカニズムの研究において極めて有用な実験材料でもある。神経堤細胞は、胚発生の途上で神経管の背側部に出現し、様々な細胞へと分化することのできる細胞で、その分化メカニズムはニワトリ胚による実験を用いて精力的に推進されてきた。とくに近年、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、神経堤細胞発生における各遺伝子の役割解明に関する研究が複数報告されている^{1,3)}。このことから、ニワトリ胚は今後も発生学においてより重要な実験モデルとなるはずである。

ニワトリ胚への遺伝子導入実験では、同一胚内で、遺伝子導入を受けた細胞と受けていない細胞が混在しているため、両者を比較することができる。このユニークな点は、ニワトリ胚を用いるメリットの一つである一方、重要な課題も含んでいる。つまり、既報のゲノム編集技術の多くで用いられるプラスミドベクターによる遺伝子発現は、胚発生の進行と共に減弱・消失するため、数日程度を経過すると、遺伝子導入を受けた細胞と受けていない細胞とを区別することができなくなる。そこで本研究では、この課題を克服するために、宿主細胞へのゲノムへ遺伝子を挿入できるトランスポゾンベクターに CRISPR-Cas9 システムを導入し、卵を用いた長期的な胚発生研究をより加速させる新規ゲノム編集技術の開発を目的とした。

■ 方 法

研究開始当初、ニワトリレトロウイルスプラスミドに CRISPR-Cas9 システムを導入したベクターを作出する予定であったが、プラスミドの増幅効率が低いことやウイルスを作出する手間など、利便性が低いと判断されたため、計画を変更し、より利便性の高い他のトランスポゾンベクターを試みた。

実験 1：培養細胞を用いた各種 CRISPR-Cas9 ベクターのマーカー発現持続性の検証

本研究では、ゲノム中への遺伝子挿入に有効なトランスポゾンベクターに注目した。gRNA のプロモーターには、ニワトリ胚での有用性が報告されている cU6.3 プロモーターを用いて、① Cas9、② cU6.3>control gRNA、③ GFP(緑色蛍光タンパク質；遺伝子導入のマーカー)をそれぞれ、①通常のプラスミドベクター、②レンチウイルスプラスミド、トランスポゾンベクターである③ Piggybac プラスミドに挿入したベクターを作製した(以後、本報告書では① pRP-Cas9-ctrlgRNA：GFP、② pLV-Cas9-ctrlgRNA：GFP と③ pPB-Cas9-ctrlgRNA：GFP とそれぞれ記載する)。次いで、それぞれのベクターのトランスフェクションによって、細胞での GFP 発現がどの程度持続的に起こるかについて、DF1 細胞(ニワトリ胚由来線維芽細胞系列)を用いて評価した。この際、③ pPB-Cas9-ctrlgRNA：GFP は、Piggybac ベクターにおける遺伝子をゲノム内へ挿入するのに必要な hyPBBase を発現させるベクター pRP[hyPBBase]と一緒に導入した。細胞における GFP 発現面積は、ImageJ を用いて算出した。

実験 2：ニワトリ胚への pPB-Cas9-ctrlgRNA ベクターの導入

実験 1 で有効性を確認した pPB-Cas9-ctrlgRNA：GFP+pRP[hyPBBase]を、卵中におけるニワトリ胚(Hamburger Hamilton ステージ 9(孵卵 29 時間))の頸部神経管領域にエレクトロポレーション法によって導入し、通常のプラスミドベクターでは蛍光タンパク質の発現がほとんどみられない孵卵 7 日目まで孵卵した。得られた胚を蛍光実体顕微鏡で観察し、蛍光タンパク質の発現が見られた頸部の脊髓領域と前腸を採取して、クリオスタットによる凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察、写真撮影を行った。

■ 結 果

実験 1：三種類のベクターを遺伝子導入したすべてのグループにおいて、導入直後には十分な細胞数が GFP を発現していた(図 1)。継代を重ね、7 日目を迎える頃には、① pRP-Cas9-ctrlgRNA：

GFP と② pLV-Cas9-ctrlgRNA : GFP のグループにおける GFP 発現は著しく減弱した(GFP 発現が 6 日ほどで極めて弱くなったため、9 日目に実験を中止した)。一方、9 日目には、ほとんど③ pPB-Cas9-ctrlgRNA : GFP + pRP[hyPBase]を導入した細胞でのみ GFP の発現が認められ、同ベクター導入群では 16 日目でも GFP 発現が持続していた(図 1, 2)。以上のことは、pPB-Cas9-ctrlgRNA : GFP+pRP[hyPBase]による遺伝子導入が、ゲノム編集関連遺伝子(Cas9 や gRNA)のゲノムへの挿入と恒久的な発現につながることを示唆している。

実験 2 : pPB-Cas9-ctrlgRNA : GFP+pRP[hyPBase]を導入したニワトリ胚から、孵卵 7 日目に頸部領域や消化管を採取し、蛍光抗体法を実施した結果、頸部の脊髄領域において、明瞭に GFP を発現する神経細胞が観察された(図 3)。さらに、前腸の領域においても、GFP 発現細胞が少数観察されるとともに、GFP を発現する神経突起も観察された(図 3)。このことから、pPB-Cas9-ctrlgRNA : GFP+pRP[hyPBase]が CRISPR-Cas9 システムを恒久的に卵中のニワトリ胚へ導入できることが示唆された。

■ 考 察

本課題では、既報において恒久的な遺伝子発現の報告されているトランスポゾンベクターに、Cas9 : GFP : cU6.3>gRNA を組み込んだベクターを複数作製し、恒久的な遺伝子発現が可能かを検証した。その結果、pPB-Cas9-ctrlgRNA : GFP+pRP[hyPBase]を導入した DF1 細胞でのみ、持続的な GFP 発現を観察できた。一方、それ以外のベクターでは、通常のプラスミドベクターの特徴である、GFP 発現の減少・消失が起こった。さらに、pPB-Cas9-ctrlgRNA : GFP+pRP[hyPBase]をニワトリ胚の頸部神経管に導入した場合でも、少なくとも孵卵 7 日目まで GFP 発現を示す細胞群が頸部の脊髄に観察された。Piggybac ベクターを用いて、ニワトリ胚に GFP 発現を誘導させた場合、孵化後にもその発現が持続したことが報告されている²⁾。本研究では、孵卵 7 日目までの日数しか孵卵を試みていないが、Macdonald et al., [2012]²⁾の報告を考慮すると、一度ゲノムに挿入された細胞とその娘細胞では、孵卵後まで遺伝子の発現が持続されると期待できる。Piggybac ベクター以外にも、トランスポゾンベクターは存在するため、本技術をニワトリ胚へ最適化できるように改良することも可能であると考えている。

結論として、ニワトリ胚の長期的な胚発生研究を推進する新規ゲノム編集技術に関する重要な知見を得ることができた。今回、字数の関係上、解析途上のデータについては記載を割愛したが、control gRNA ではなく、任意の遺伝子への gRNA を導入したベクターも作製し、ニワトリ胚へ導入する実験を現在進めている。研究期間内には、ベクター開発に注力することになったが、今後実際にゲノム編集誘導実験を実施することで、実際に胚発生に関わる各遺伝子の役割解明を進めることができると考えている。

■ 要 約

卵は食品としての有用性の他、脊椎動物の個体発生メカニズムの研究において極めて有用な実験材料でもある。ニワトリ胚で汎用される通常のプラスミドベクターによって導入された遺伝子は、胚発生の進行と共に減弱するため、長期的な発生イベントを調べる際には、遺伝子導入を受けた細胞と受けていない細胞とを区別することができなくなる。そこで本研究では、この課題を克服し、長期にわたる発生イベントを解析できる新規ゲノム編集技術の開発を目的とした。通常のプラスミドベクターと、宿主細胞ゲノムへの遺伝子挿入が可能なトランスポゾンベクターに、GFP(遺伝子導入マーカー)、Cas9 および control gRNA を挿入し、ニワトリ培養細胞 DF1 に導入してその有効性を評価した。GFP 発現の持続性を見ると、通常のプラスミドベクターでは 9 日目までに GFP 発現が減弱・消失するのに対し、トランスポゾンベクターである Piggybac ベクターでは 16 日経ってもその発現が持続していた。さらに、同ベクターを卵内のニワトリ胚の頸部神経管へ導入すると、孵卵 7 日目でも、頸部の脊髄部分に GFP 発現が観察された。このことから、Piggybac ベクターがニワトリ胚におけるゲノム編集細胞の恒久的な標識に有用である可能性が示され、ニワトリ胚の長期的な胚発生研究を推進する新規ゲノム編集技術に関する重要な知見を得ることができた。

■ 文 献

- 1) Gandhi S, Hutchins EJ, Maruszko K, Park JH, Thomson M, Bronner ME. Bimodal function of chromatin remodeler Hmgal in neural crest induction and Wnt-dependent emigration. *Elife*. 2020, 9 : e57779.

- 2) Macdonald J, Taylor L, Sherman A, Kawakami K, Takahashi Y, Sang HM, McGrew MJ. Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012, 109 (23) : E1466-72
- 3) Williams RM, Senanayake U, Artibani M, Taylor G, Wells D, Ahmed AA, Sauka-Spengler T. Genome and epigenome engineering CRISPR toolkit for in vivo modulation of cis-regulatory interactions and gene expression in the chicken embryo. *Development*. 2018, 145 (4) : dev160333.

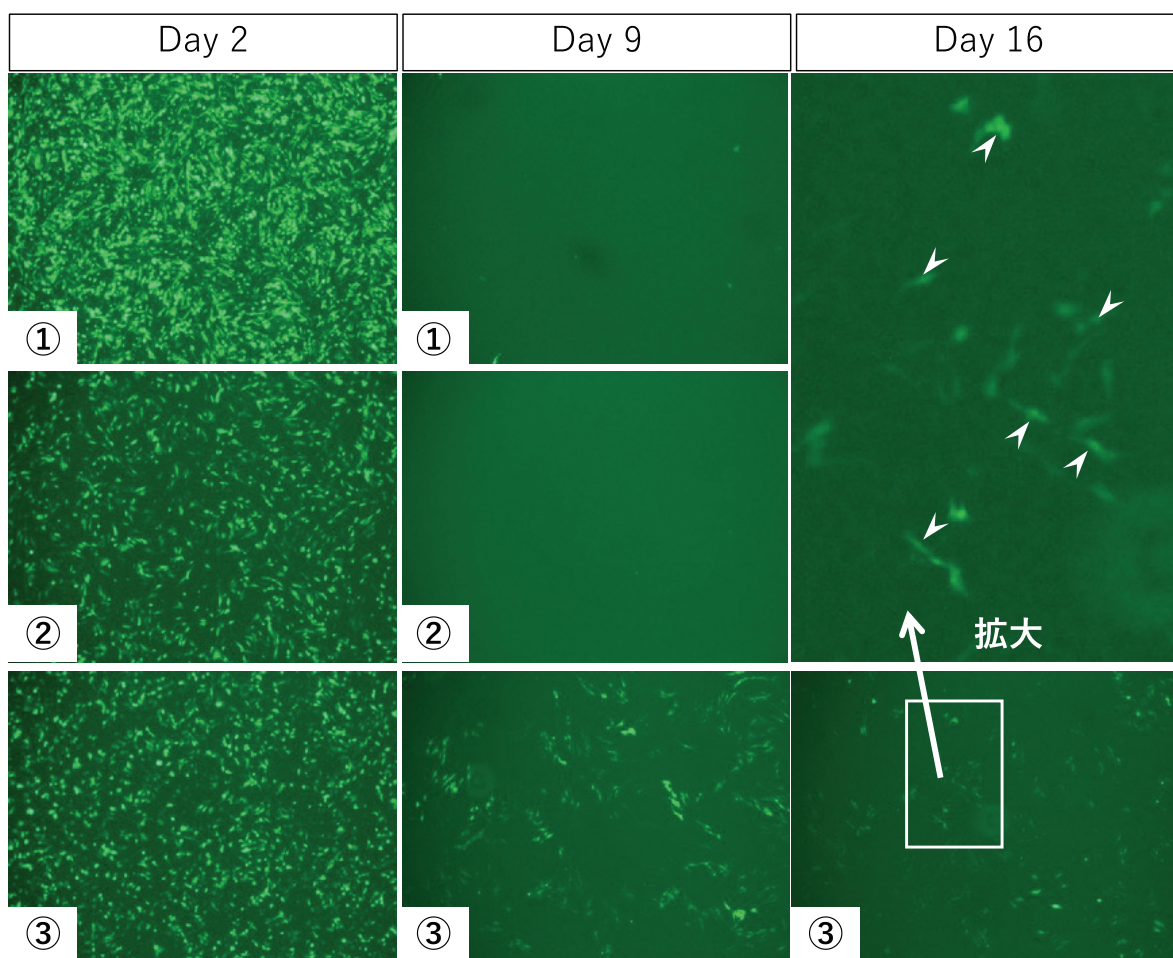


図 1 ① pRP-Cas9-ctrlgRNA : GFP, ② pLV-Cas9-ctrlgRNA : GFP ③ PB-Cas9-ctrlgRNA : GFP+pRP [hyPBase] をそれぞれトランスフェクションした DF-1 細胞の GFP 発現の経時変化 : PB-Cas9-ctrlgRNA : GFP+pRP [hyPBase] でのみ, GFP 発現が day9 以降も持続している (矢尻)

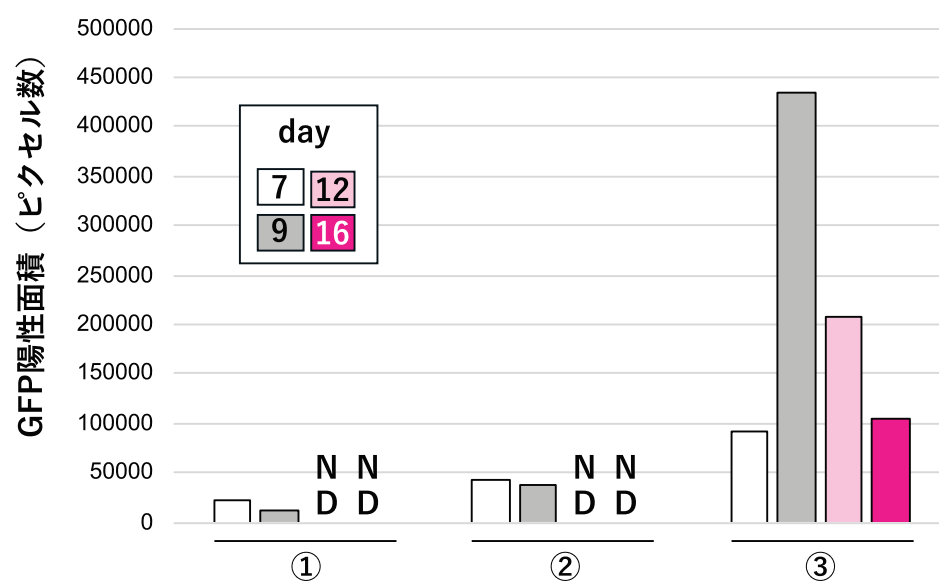


図2 GFP 発現面積の測定結果：7 日目までは，GFP 発現レベルが強すぎるため，本グラフには表記していない。③PB-Cas9-ctrlgRNA：GFP+pRP[hyPBase]でのみ，16 日目においても十分な GFP 発現が検出されている。ND(測定せず)

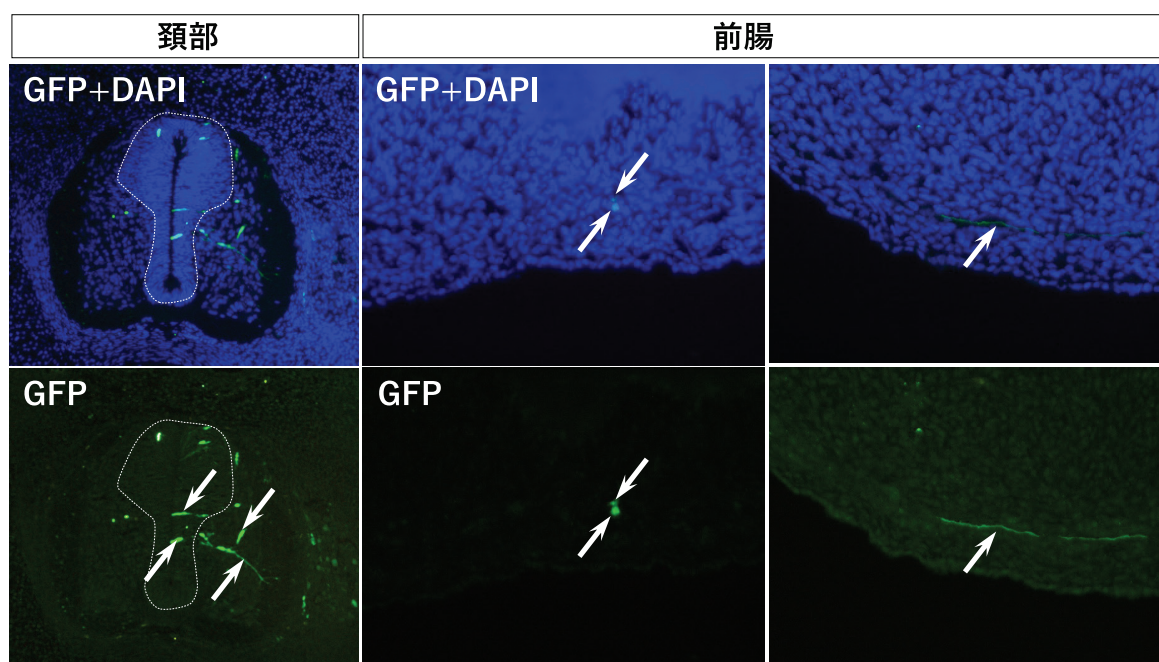


図3 PB-Cas9-ctrlgRNA : GFP+pRP[hyPBase]をエレクトロポレーション法で導入したニワトリ胚(孵卵七日目)の頸部と前腸のGFPに対する免疫染色の結果。GFP陽性細胞と陽性神経突起が観察される(矢印)。