

講演番号：2A22p13

講演日時：3月16日 16:32～ 共通講義棟北 A22 会場

培養始原生殖細胞株の樹立と CRISPR/Cas9 による eGFP ノックインニワトリの作製
Establishment of eGFP knock-in chicken by applying CRISPR/Cas9 system to cultured primordial germ cell line

○萩原 遥太、奥寄 雄也、金岡 英徳、飯島 信司、西島 謙一 (名古屋大工)

○Yota HAGIHARA, Yuya OKUZAKI, Hidenori KANEOKA, Shinji IJIMA, Ken-ichi NISHIJIMA (Nagoya Univ.)

【目的】 近年の目覚ましいバイオ医薬品市場の拡大により、有用タンパク質を安価に大量に生産できる技術の開発が求められている。我々はニワトリの卵中に有用タンパク質を生産させ、生きたバイオリクターとして利用するための技術開発を進めてきた。これまでにウイルスベクターを用いた遺伝子導入によりモデル抗体やエリスロポエチンなどを生産するニワトリの取得を行ってきた。一方でトランスジェニック後代取得効率の低さが問題となっており、代替方法としてニワトリ始原生殖細胞 (PGC: Primordial Germ Cell) の利用を検討してきた。今回、PGCの *in vitro* で培養及び遺伝子導入とレシピエント胚へ移植する方法の検討を行った。

【方法と結果】 ニワトリPGCの培養法には様々な報告があるが、必ずしも再現可能とは言えない。Whyteらの開発したFAIcs培地を元に培養条件の検討を行い、2.5日胚の全血から半年以上増殖が可能なPGC様細胞株を複数樹立した。これらの細胞は凍結融解が可能であった。免疫染色や定量PCRで確認を行ったところ、PGCで高発現するCVHやPrdm14などは分離した直後のPGCと大差ないレベルであったことから、未分化・生殖細胞性ともに維持していると考えられた。次に樹立した細胞にCRISPR/Cas9システムを用いてeGFP遺伝子のノックインを行った。PGCで強く発現している遺伝子座を標的としてノックインを行った結果、内在性のプロモーター活性によりeGFPを安定的に強発現するニワトリPGC細胞株の樹立に成功した。一方、レンチウイルスを用いたランダムな遺伝子導入ではゲノムDNAへの組込みは可能であったがeGFPは発現しなかった。この樹立した細胞株をレシピエント胚に移植し、5.5日胚で解析を行った結果、生殖線中PGCのうち最大84%が移植したPGC由来であった。そこで移植した胚を孵化させキメラニワトリの取得を行った。成熟後、これらニワトリの精子を解析したところ、最大でゲノムあたり約0.6コピーのeGFP遺伝子の挿入が確認された。そこでキメラニワトリの精子を人工受精させトランスジェニックニワトリの取得を試みた。その結果49羽中14羽(29%)という非常に高い確率でトランスジェニックニワトリの取得に成功した。これらトランスジェニック個体のゲノムを解析したところ、予想通りeGFPは片アレルにノックインされており、もう一方のアレルは変異がなかった。これらの結果から樹立した細胞株を用いて種々の遺伝子改変ニワトリの作製が可能であると考えられた。

なお、本研究は科研費16H01253の助成を受け行われた。

Transgenic chicken, Primordial germ cells, CRISPR/Cas9

発表責任者：西島謙一 (nishijima@chembio.nagoya-u.ac.jp)