

ゲノム編集ノックインニワトリの卵を用いた 有用蛋白質大量生産法の検証

国立研究開発法人産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門・グループリーダー 大石 勲

■ 緒 言

鶏卵は蛋白質に富み、安価に生産される優れた畜産物であり、食品はもとよりファインケミカルなどの製品素材としても有用である。最近では、ニワトリの遺伝子改変により鶏卵中にバイオ医薬品などの有用組換え蛋白質を生産する試み(いわゆる鶏卵バイオリクター技術)も行われており、Alexion 社 Kanuma® のように医薬品として承認を受け上市されたものもある。こういった研究開発の流れを受けて、今後鶏卵は食用に留まらず、抗体医薬や再生医療用サイトカイン、工業用酵素など社会ニーズの高い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¹⁻⁵⁾。

一方、ニワトリの遺伝子改変は技術的に困難とされてきた。これは、遺伝的操作に必要な受精直後の接合子にアクセスしにくいこと(卵管最深部にあるだけでなく近傍に巨大な卵黄が存在している等の理由)が原因であった。この問題の解決のために、ウイルスベクターを用いたニワトリ遺伝子改変技術が開発されており、上述の Kanuma® も当該技術を利用している。また、様々なヒトサイトカインや一本鎖抗体など様々な組換え蛋白質をウイルスベクターを介して遺伝子改変したニワトリの卵に発現する研究もなされている⁶⁻¹¹⁾。しかし、ウイルスベクターを用いて作製された鶏卵バイオリクターは総じて組換え蛋白質の発現量が少なかったり、親鳥が違えばと極端に発現量が低下するなど不安定であったり、世代を超えて形質が十分に伝播しない等の課題があり、実用化の妨げとなっていた⁵⁾。想定される原因としては、ウイルスベクターを用いることによるランダムな染色体上への遺伝子挿入により、発現量が大きく影響を受けること(位置効果)や、卵白発現細胞特異的に強力に外来遺伝子を発現誘導する技術が不十分であることなどが考えられる。本研究ではこれら課題の解決を目的とし、ウイルスベクターを用いないニワトリ遺伝子操作を行い、卵白内に①大量に、②安定的に(個体間で大きく発現量が変化しない)、③世代を超えて形質を伝播させる技術開発とその実証を試みた。より具体的には将来ニワトリ配偶子に分化可能な培養始原生殖細胞を用いて、ゲノム編集により卵管特異的な強力なプロモーターの直下にヒトサイトカイン遺伝子を挿入し、大量安定発現する鶏卵バイオリクターの構築を試みた。

■ 方 法

ニワトリ始原生殖細胞は、横斑プリマスロック 2.5 日胚を採血し、Buffalo rat liver (BRL)細胞で調化した KO-DMEM 培地(5%FCS)に対して 7.5% FCS、2.5% chicken serum、2mM glutamine、1mM pyruvate、1x nucleosides、1x non-essential amino acids、0.1mM 2-mercaptoethanol、1x penicillin/streptomycin、6ng/ml human stem cell factor、4ng/ml human recombinant fibroblast growth factor となるように調製した培地中で、増殖性の浮遊細胞として株化した¹²⁻¹⁴⁾。その上で、①この始原生殖細胞株に対し CRISPR/Cas9 法を用いてヒトインターフェロンβ(以下 IFN-β)遺伝子のノックインを試みた。特に卵白内での大量発現を目指し、卵白の半分以上を占める蛋白質オボアルブミン遺伝子の翻訳開始点に IFN-β 遺伝子を挿入することとした。ノックイン細胞は薬剤耐性遺伝子を有するため適切な薬剤選択(puromycin 0.5 μg/ml)により得られると期待された。②得られた薬剤耐性の細胞群を遺伝的に解析し、ノックイン細胞の存在を確認し、これをドナー細胞としてレシピエント胚血液中に移植を行った。移植胚については孵卵器を用いてこれを孵化させ、得られた雄鶏雛を生殖巣キメラニワトリの候補として性成熟させた。移植したドナー細胞がキメラニワトリ精巣内で増殖、分化すれば、キメラニワトリの後代にノックイン個体が得られるはずである。性成熟させたニワトリ精液を解析し、ドナー細胞の寄与について評価した後、野生型雌との交配により後代を得た。得られた個体の遺伝型を解析しノックイン個体の存在を確認した。③この後、得られたノックイン個体(雄および雌)を飼育し、性成熟させた。雌の卵の中に IFN-β 蛋白質が大量に分泌されることが強く期待されるが、得られた卵における IFN-β 蛋白質の発現について SDS-PAGE や western blotting、ELISA 等により検証した。④また、IFN-β 蛋白質の活性についてレポーターアッセイ(HEK-Blue IFN-α/β reporter cells, Invivogen)により検討を行った。

■ 結果

① IFN- β ノックイン始原生殖細胞の樹立：既に報告したオポアルブミン翻訳開始点近傍を認識配列とする CRISPR/Cas9 システム¹⁵⁾を用いてヒト IFN- β 遺伝子と puromycin 耐性遺伝子を含むドナーベクターをオポアルブミン翻訳開始点にノックインした(図 1A)細胞を薬剤選択し、生存細胞のゲノムを PCR 解析することでノックイン細胞が得られたことを確認した(図 1B)。

②生殖巣キメラ個体(G0)とノックイン後代(G1)の樹立：得られたノックイン始原生殖細胞を卵殻に窓開けした白色レグホン 2.5 日胚血液中に顕微注射した。窓をシールし、孵卵器で孵化操作を行った。得られた雄個体 4 羽を飼育し、性成熟させた。精液を採取し、このゲノムを鋳型とした PCR を行い、精液中のノックイン細胞の有無について検討した。図 2A に示すように、得られた 4 羽いずれにおいてもノックイン細胞(大部分は精子と予想される)が存在するが、PCR 増幅産物の多少を指標に # 411 と # 412 が相対的にドナー寄与率が高いと判断し、これらの後代検定を行った。# 411 より 102 羽、# 412 より 55 羽の後代を得て PCR により遺伝型を決定した結果(図 2B)、それぞれ 23 羽、8 羽のノックイン後代(雄、雌含む)が得られ、平均で約 2 割の高頻度でノックイン後代が得られた。

③ヒト IFN- β ノックイン個体由来卵の解析：得られた G1 ノックイン個体を飼育し性成熟させた後、得られた卵について解析を行った。ノックイン個体由来卵を割ると、全ての卵において白濁した卵白が認められた(図 3A)。白濁部は卵黄周囲で優勢であり、辺縁部の粘性の低い卵白は総じて透明であった。ヒト IFN- β ノックイン卵の卵白白濁部、透明部、および野生型卵の濃厚卵白を SDS-PAGE で分離し、クマシー染色を行った(図 3B)。白濁部の 20kDa 付近に明瞭なシグナルが認められ、その移動度からヒト IFN- β であると推定された。このことは抗ヒト IFN- β 抗体を用いた Western blotting によっても確認された(図 3C)。遺伝子ノックインにより、染色体上の同一の位置に外来遺伝子(IFN- β)を挿入したため、個体間・世代間で外来遺伝子の発現が大きくばらつかないことが期待された。実際、異なった G1 ノックイン雌由来卵の中の IFN- β 蛋白質量は大きく変動していないことが SDS-PAGE の結果によって示されている(図 3D)。定量的な解析を行うために卵白中のヒト IFN- β 濃度を ELISA により検定した(図 3E)。白濁部における濃度は 1.9 ± 0.3 から 3.5 ± 0.9 mg/ml であり、IFN- β の総量は卵 1 個あたり 30-60mg 以上と推定された。このことにより、従来のウイルスベクターによる鶏卵バイオリクターよりも発現量に圧倒的に優れるとともに、他に類を見ない個体間での発現の安定性が確認された。加えて、世代間での発現の安定性について検討を行った。G1 ノックイン雌由来の卵は孵化しなかったが、野生型と G1 ノックイン雄を交配することで G2 ノックイン(雄、雌)を得ることが出来る。G2 ノックイン雌 3 個体より卵を得て ELISA を行った結果、白濁部における IFN- β 蛋白質濃度は 2.7 ± 0.5 から 4.4 ± 1.3 mg/ml と見積もられ、世代を超えても発現量が低下せず安定的に外来蛋白質が卵白に分泌されることが明らかとなった(図 3F)。

④レポーターアッセイによる卵白由来ヒト IFN- β 活性の解析：IFN- β は抗ウイルス作用を有するサイトカインであり、様々な方法で活性を測定することが可能である。本研究では IFN- β シグナル伝達系を用いたレポーターアッセイ系を用いてノックイン卵白の IFN- β 活性を検討した。ノックイン卵濃厚卵白を超音波破碎し、段階希釈してレポーター解析を行った所、市販の精製 IFN- β (和光純薬)と比較し、5%程度の比活性が認められた(図 4A)。精製品と比べて重量あたりのインターフェロン活性が低いことと卵白が白濁していることを合わせて考えると、IFN- β 蛋白質の折りたたみの異常が一定の割合であり、不定形の凝集が出来ていることが考えられた。そこで、卵白を塩酸グアニジンと DTT 処理により変性後、化学シャペロン存在下で再構成することで IFN- β 蛋白質の正常な折りたたみを促し、活性の向上が認められるか検討した。図 4B に示すように、一連の操作により 8 倍近くの IFN- β 活性の向上が認められ、卵白由来 IFN- β 蛋白質が変性している可能性を示すと同時に、その利用に向けて有効な手段があることが示された。

■ 考察

本研究では、ゲノム編集技術をニワトリに適用し、世界初となる「遺伝子ノックイン鶏卵バイオリクター」の構築に成功した。2 系統で平均 2 割以上のノックイン後代を得ており、実用に足る樹立効率と再現性を証明した。また、卵の中に含まれる外来遺伝子産物(IFN- β 蛋白質)を解析することで、従来のウイルスベクターを用いた卵白内蛋白質発現法より遥かに優れた技術であることを実証した。蛋白質の変性が生じるなど課題も見つかったが、変性後に再構成することで活性の大幅な向上が認められるなど、必要な対応策も示唆された。

従来のウイルスベクターを用いた外来蛋白質発現系はほとんどの場合卵 1 個あたり最大でも 1-3mg

以下の発現量に留まっていた。今回我々が樹立したノックイン鶏卵バイオリクターは30-60mg以上の発現量があり、従来技術に比べて飛躍的に高い発現効率を実現している。また、個体間で100倍以上発現量の変動することがざらである従来技術に比べ最大でも2倍以内と極めて安定した発現を達成しており、高精度での生産計画策定可能な組換え蛋白質生産技術と評価出来る。さらに、世代を超えても発現安定性は担保されており、この点もウイルスベクターを用いた技術に対する優位性と考えられる。ノックイン雌個体は不妊であったが、雄は妊性があるため雄を介してノックイン個体を無制限に増やすことも可能であり、大規模生産にも対応可能なことも合わせて示された。

活性の面では無処理の卵白において総組換え蛋白質の5%程度のみ活性を有すると考えられる。しかしながら、再変性、再構成により8倍近く比活性を向上させることが出来るため、卵白中の組換え蛋白質の大部分が折りたたみのエラーなどを起こしている可能性がある。今後、再構成の条件を最適化することにより、さらに比活性を高めることは十分可能であると考えられるし、精製技術等の確立により商業利用に足る新たな高効率組換え蛋白質生産系として利用可能と極めて強く期待される。

■ 要 約

ニワトリを遺伝子改変し、卵白中に組換え蛋白質を分泌させる「鶏卵バイオリクター技術」について、世界で初めてゲノム編集を用いた遺伝子ノックイン技術を適用し、ニワトリを樹立、卵の解析を行った。卵白内に組換えヒトインターフェロン β 蛋白質を30-60mgと大量に含む卵が複数のニワトリから安定的に得られており、さらに世代を重ねても同様の卵が得られている。また、得られたヒトインターフェロン β 蛋白質は5%程度の比活性を示し、さらに再構成することで8倍程度活性を上げることが出来た。遺伝子ノックインによる鶏卵バイオリクターは高収量、高い安定性、活性のある蛋白質を得られると言った点で優れた組換え蛋白質生産法となることが強く期待される。

■ 文 献

1. Ivarie, R. Avian transgenesis : progress towards the promise. *Trends Biotechnol* 21, 14-19(2003).
2. Lillico, S.G., McGrew, M.J., Sherman, A. & Sang, H.M. Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today* 10, 191-196(2005).
3. Houdebine, L.M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32, 107-121(2009).
4. Nishijima, K. & Iijima, S. Transgenic chickens. *Dev Growth Differ* 55, 207-216(2013).
5. Farzaneh, M., Hassani, S.N., Mozdziaik, P. & Baharvand, H. Avian embryos and related cell lines : A convenient platform for recombinant proteins and vaccine production. *Biotechnol J* 12(2017).
6. Rapp, J.C., Harvey, A.J., Speksnijder, G.L., Hu, W. & Ivarie, R. Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res* 12, 569-575(2003).
7. Lillico, S.G. *et al.* Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1771-1776(2007).
8. Koo, B.C. *et al.* Tetracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic Res* 19, 437-447(2010).
9. Park, T.S. *et al.* Deposition of bioactive human epidermal growth factor in the egg white of transgenic hens using an oviduct-specific minisynthetic promoter. *FASEB J*(2015).
10. Cao, D. *et al.* Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. *PLoS One* 10, e0118626 (2015).
11. Kamihira, M. *et al.* High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *J Virol* 79, 10864-10874(2005).
12. van de Lavoie, M.C. *et al.* Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441, 766-769(2006).
13. Park, T.S. & Han, J.Y. piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9337-9341(2012).
14. Macdonald, J., Glover, J.D., Taylor, L., Sang, H.M. & McGrew, M.J. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS One* 5, e15518(2010).
15. Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Kagami, H. & Tagami, T. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 6, 23980(2016).

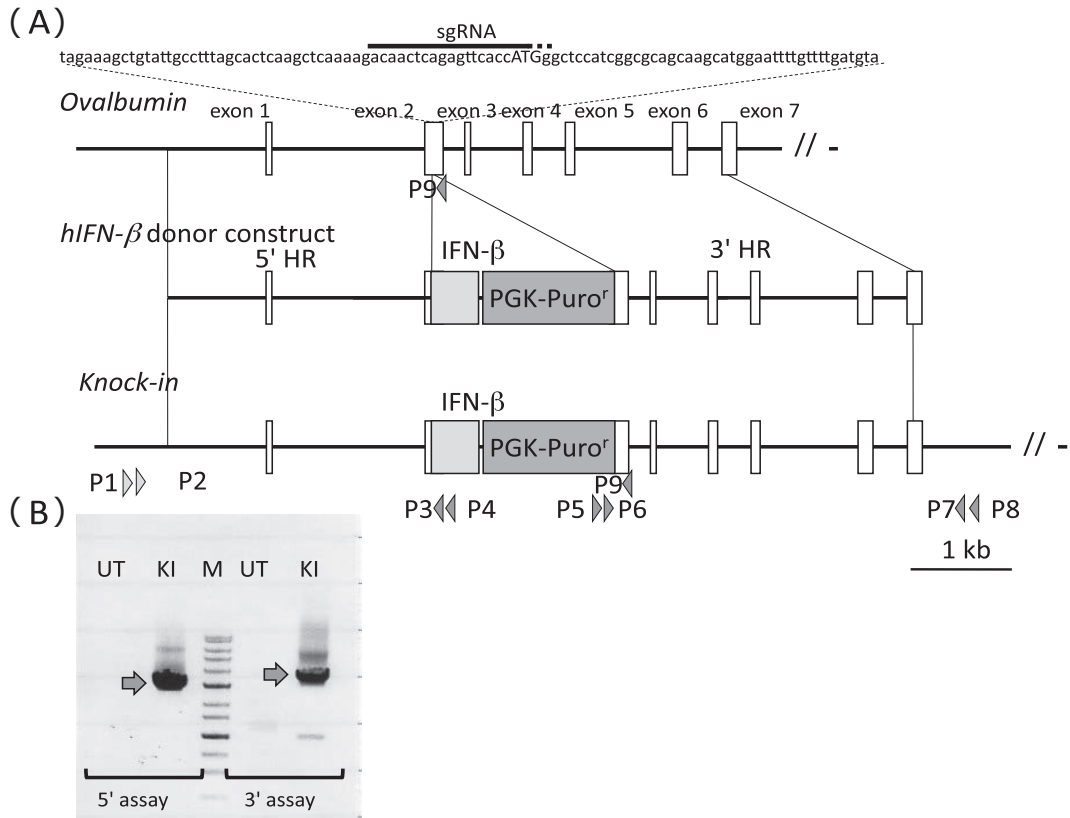


図1 オボアルブミン遺伝子座へのインターフェロン β ノックイン

(A) ノックインコンストラクト模式図オボアルブミン翻訳開始点付近に sgRNA をデザインし CRISPR/Cas9 法を用いて始原生殖細胞においてドナーコンストラクトをノックインした
(B) ノックイン始原生殖細胞を PCR により検証した。遺伝子導入していない(UT)とノックイン(KI)細胞を図 1-A の P1-P4 (5' assay)、P5-P8 (3' assay) のプライマーを用いた nested PCR を行い、ノックイン細胞の存在を確認した。

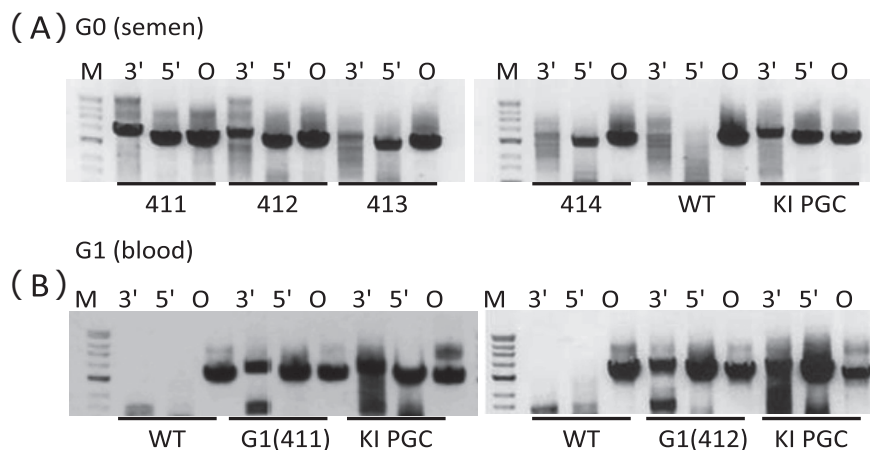


図2 G0 精液および G1 血液 PCR 像

(A) 4羽の生殖巣キメラ (G0) 雄精液 PCR 3' (P1&P4)、5' (P5&P8)、O(P1&P9; 内在性オボアルブミン遺伝子を増幅)
(B) 2話のノックイン個体(G1)由来血液 PCR G1 個体の親を括弧内に記載。WT: 野生型(negative control) KIPGC: ノックイン始原生殖細胞(positive control)

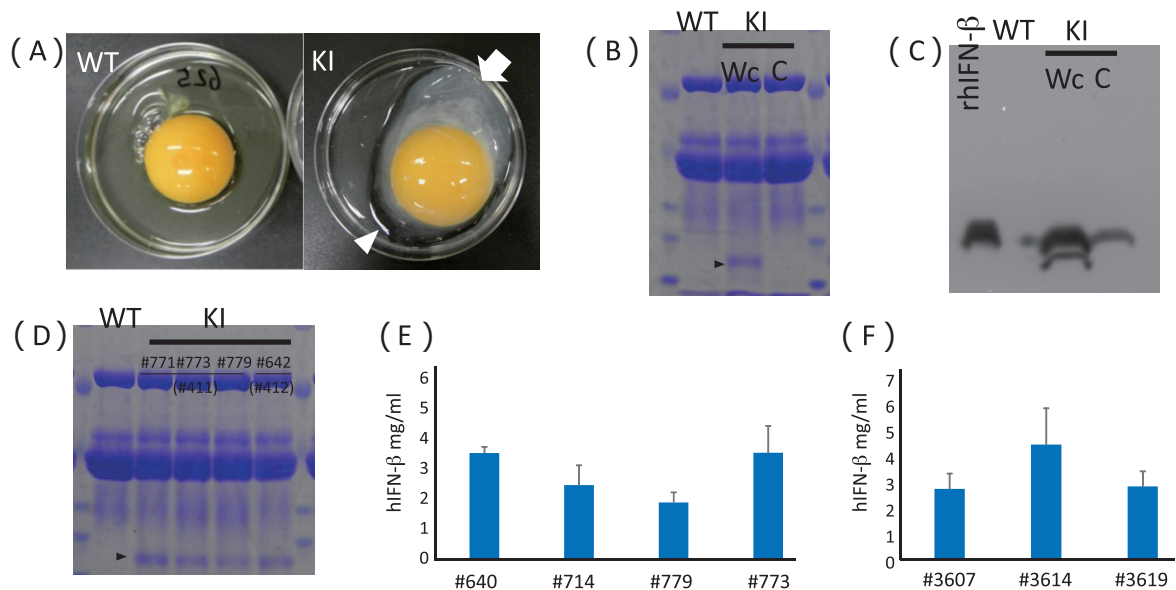


図3 ノックイン個体由来卵の解析

(A)卵の外観ノックイン(KI)の卵白が白濁(矢印)しているが、辺縁部は透明(矢頭)WT:野生型
 (B)ノックイン卵白におけるインターフェロン β の発現卵白を SDS-PAGE で分離後クマシー染色で同定。矢頭に組換えインターフェロン β のバンドを認める。Wc:白濁部サンプル、C:透明部サンプル。
 (C)抗インターフェロン β 抗体を用いた western blotting 像。
 (D)異なる個体由来卵白の SDS-PAGE 像。
 (E&F)ELISA によるインターフェロン β の定量結果。E:G1 の4個体由来卵、F:G2 の3個体由来卵の結果をそれぞれ示す。

Hen #	3607	3614	3619
Concentration (ELISA)	2.7 mg/ml	4.4 mg/ml	2.8 mg/ml
Concentration (reporter assay)	114 μ g/ml	235 μ g/ml	159 μ g/ml
Relative activity	4.2%	5.8%	5.6%

Egg white(#3619)	Untreated	Refolded
Concentration (reporter assay)	111 μ g/ml	796 μ g/ml

図4 インターフェロン β レポーターアッセイ

(A)3羽のG2個体由来卵のレポーターアッセイを行い、50%の活性を指標に、市販インターフェロン β に比較しての濃度を検定した。ELISAの結果を併せて示し、全体に対する推定上の活性割合を計算した。

(B)変性-再構成により、レポーターアッセイによる活性は8倍程度増加した。