

# インフルエンザワクチンの効率的生産を目指した 糖鎖改変鶏卵の開発

名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻・助教 金岡 英徳

## ■ 緒 言

新型インフルエンザ発生とパンデミックの懸念からインフルエンザワクチン生産の効率化が急がれている。しかしながら、現在行われている発生途中のニワトリ胚(発育鶏卵)を用いるワクチン生産は時間がかかり、急な流行に対応できない。ヒトインフルエンザウイルスは感染時に細胞表面を覆う糖鎖構造末端の $\alpha$ -2, 6 結合型シアル酸を認識するが、発育鶏卵では $\alpha$ -2, 3 結合型シアル酸が大部分を占め、ワクチン生産に必要なウイルス培養に長時間を有する原因になっている。これは発育鶏卵のインフルエンザウイルス感染部位である漿尿膜において、 $\alpha$ -2, 6 結合型シアル酸を形成するシアル酸転移酵素(ST6GalI)の発現量が低いことが原因であると考えられる<sup>1)</sup>。そこでトランスジェニックニワトリを利用し、ST6GalIを高発現するニワトリを作製することでこの問題の解決を目指した。

一方で、ワクチン生産における安全性の確保も非常に重要である。単純な遺伝子導入による糖鎖改変トランスジェニックニワトリはヒトインフルエンザウイルスへの感染性が強くなってしまう可能性があり、生産管理上の新たなリスクとなる。そこで我々は Cre/loxP システムを用いることにより、そのリスク回避が可能であるか検討を行った。

## ■ 方 法

### 1. Cre/loxP 作動性 ST6GalI 発現プラスミドの構築

ニワトリ ST6-1 遺伝子の upstream にスタッパー遺伝子として loxP 配列ではさんだ mCherry を持つ pPV/EF1 $\alpha$ -mCherry-ST6GalI プラスミドを作製した。ベースとなる pPV ベクターは PiggyBac トランスポゾンによる安定発現細胞株の樹立が可能である。さらに Cre リコンビナーゼを発現する pPV/PGK-eGFP-Cre プラスミドを作製した。このプラスミドは eGFP と Cre リコンビナーゼを P2A 配列でつなぐことで2つの遺伝子を同時に発現することが可能である。

### 2. ニワトリ DF-1 細胞および始原生殖細胞(PGC)における安定発現細胞株の樹立

DF-1 細胞または PGC を 24well プレートに播種し、1 晩 37°C でインキュベート後、Lipofectamine2000(ThermoFisher)を用いて pPV/EF1 $\alpha$ -mCherry-ST6GalI プラスミドのトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 2 日後、セルソーター(FACSJazz; BD Biosciences)により mCherry 陽性細胞を分離し、限界希釈法により安定細胞株を樹立した。その後、樹立した mCherry 陽性細胞株に pPV/PGK-eGFP-Cre プラスミドをトランスフェクションで導入した。トランスフェクションから 1 週間後、Cre/loP 組換え反応により mCherry 陰性(ST6GalI 陽性)となった細胞をセルソーターにより再度分離した。PGC における pPV/PGK-eGFP-Cre プラスミドの安定発現株も上記の方法で樹立した。

### 3. 定量 PCR による遺伝子発現量解析

細胞から ISOGEN II(NIPPON GENE)を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace(TOYOBO)により cDNA の合成を行った。合成した cDNA を使用し、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)を用いて、発現遺伝子の定量を行った。

### 4. レクチン免疫染色

ガラスベースディッシュ(IWAKI)を Poly-L-lysine でコーティングし、細胞を播種した。翌日 PBS で細胞を洗浄し、0.025U/ml のノイラミニダーゼ(Nacalai Tesque)で細胞を処理した。4%パラホルムアルデヒドを加え、室温で 20 分間固定化を行った後、PBS(+1%BSA)で 30 分間ブロッキングを行った。SSA レクチンを PBS(+1%FBS)で 50 倍希釈し、37°C で 2 時間反応させた。その後 mouse anti-SSA 抗体を PBS(+1%FBS)で 100 倍希釈し 4°C で 2 時間反応させた。PBS(+1%FBS)で 2 回洗浄後、anti-mouse IgG Alexa Flour® 488 を PBS(+1%FBS)で 1000 倍希釈し、4°C で 1 時間反応させた。PBS で 2 回洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

## 5.PGC 定着率の検定

ニワトリ種卵(日本レイヤー)を転卵角度 90°、転卵間隔 1 時間、転卵温度 38°Cの条件で 2.5 日胚(HHSt14-16)まで発生を進行させた。mCherry-ST6Gal1 または eGFP-Cre を導入した PGC をレシピエント胚の血中へ 1 胚あたり 1 $\mu$ l(5000cell)ずつ移植した。移植を行った種卵は穴を開けた面を上にした状態で転卵角度 30°、転卵間隔 1 時間、転卵温度 38°Cの条件で 3.5 日間転卵を行った。

その後、発生が進んだ胚より生殖腺を回収し、トリプシン処理により 15 分反応し、細胞を分散した。その後 PBS(+1%FBS)で細胞を洗い、mCherry-ST6Gal1 導入 PGC は Alexa Fluor® 488 anti-mouse/human SSEA-1 (BioLegend)、eGFP-Cre 導入 PGC は anti-SSEA-1 mouse monoclonal IgM (Santa Cruz Biotechnology)を加えて 4°Cで 1 時間反応させた。次いで遠心分離(1000rpm, 5min, 4°C)により細胞を回収し、PBS(+1%FBS)に懸濁して一度洗浄し、eGFP-Cre 導入 PGC は goat anti-mouse IgM-PE (Santa Cruz Biotechnology)と 4°Cで 1 時間反応させた。その後遠心分離により細胞を回収し、PBS(+1%FBS)に懸濁した。染色した細胞はフローサイトメーターにより解析した。

## ■ 結果

### 1) Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 安定発現細胞株の取得

ニワトリ培養細胞 DF-1 に mCherry を loxP 配列ではさんだ pPV/EF1  $\alpha$ -mCherry-ST6Gal1 プラスミドを PiggyBac トランスポザーゼとともに導入し、安定発現細胞株の樹立を行った。mCherry 陽性細胞をセルソーターにより分離後、限界希釈によるクローン化を行い、発現量の異なる 3 種類(クローン #2, #3, #11)の細胞株を取得した(図 1)。この細胞株は mCherry の発現はあるが、ST6Gal1 は mCherry の後に polyA 付加配列があるため発現しない。次に樹立したこれらの細胞へ Cre リコンビナーゼ発現プラスミド(pPV/PGK-eGFP-Cre)の導入を行った。Cre/loxP 組換えにより mCherry 遺伝子が polyA 付加配列とともに欠失するため、mCherry 蛍光が消失し、ST6Gal1 遺伝子が発現するようになる。セルソーターにより mCherry 陰性細胞を分離し、次の解析に用いた。

### 2) Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 の発現確認

Cre/loxP 組換え前後の細胞から total RNA を抽出し、cDNA の合成を行った。合成した cDNA を用いて定量 PCR を行い、それぞれの細胞における mCherry 遺伝子、ST6Gal1 遺伝子の発現量を測定した。mCherry の発現量は各クローンの蛍光強度と一致しており、蛍光の弱い #2 と強い #11 を比較するとその差は約 20 倍であった。また、Cre/loxP 組換え後はいずれの細胞株も mCherry の発現減少が見られた。#11 は元の発現量が高かったため、組換え後も mCherry の発現が残っていたが、#2 と #3 は検出限界以下まで減少したことから、ほぼ全ての mCherry 遺伝子が欠失したと考えられる(図 2A)。一方、ST6Gal1 遺伝子は DF-1 細胞で内在性の発現はほとんど見られず、Cre/loxP 組換え後に発現が観察された(図 2B)。また、その発現量は組換え前の mCherry の発現量を反映しており、mCherry から ST6Gal1 に発現が切り替わったことを示唆している。

次に ST6Gal1 の発現により細胞表面に  $\alpha$ -2, 6 結合型シアル酸が形成されたことを確認するため、 $\alpha$ -2, 6 結合型シアル酸を特異的に認識する SSA レクチンを用いて免疫染色を行った。Cre/loxP 組換え前後のクローン #3 を染色した結果、組換え前では  $\alpha$ -2, 6 結合型シアル酸を示す蛍光は観察されなかったが、組換え後の細胞では蛍光が観察されるようになった。さらに、この細胞を末端シアル酸を切断するシアリダーゼにより処理したところ、蛍光が消えたことから、細胞表面に  $\alpha$ -2, 6 結合型シアル酸が形成されたことを確認できた(図 3)。

### 3) Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 導入 PGC の定着率検定

DF-1 細胞を用いて Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 システムの確認ができたため、pPV/EF1  $\alpha$ -mCherry-ST6Gal1 と pPV/PGK-eGFP-Cre プラスミドを安定発現するニワトリ PGC 株を樹立した(図 4)。この細胞を 2.5 日レシピエント胚に移植し、その後 6 日胚の生殖腺より細胞を分離し、SSEA-1 染色を行った。移植した PGC は導入遺伝子による蛍光を持つため、内在性の PGC と区別が可能である。mCherry-ST6Gal1 導入 PGC の定着率は個体により差はあるが高いもので約 50%であり、eGFP-Cre 導入 PGC の定着率は 20-30%であった(表 1)。これらの結果から今回樹立した Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 システムを導入した PGC は生殖腺への定着能を有していることがわかり、今後これらの PGC 移植したニワトリを交配することにより、糖鎖改変トランスジェニックニワトリの作製が可能であると考えられる。

## ■ 考 察

Cre/loxP 作動性 ST6GalI システムを構築するために mCherry-ST6GalI と eGFP-Cre を発現するプラスミドを作製し、PiggyBac トランスポゾンを用いて安定発現細胞株を樹立した。ニワトリ PGC において、以前の検討結果よりウイルスベクターを用いた遺伝子導入は遺伝子サイレンシングの影響を強く受けることがわかっているため<sup>2)</sup>、トランスポゾンを用いることとした。まず初めにシステムの確認を DF-1 細胞で行った。mCherry-ST6GalI の安定発現細胞株に eGFP-Cre を導入すると、Cre/loxP 組換えにより mCherry 蛍光の消失が見られた。mCherry 陰性となった細胞をセルソーターで分離し、遺伝子発現量を解析すると、組換え後の細胞は mCherry の発現が減少する代わりに ST6GalI の発現が検出されるようになった(図 2)。また、各クローンにおける ST6GalI の発現量は組換え前の mCherry の発現を反映しており、設計通りの組換えが起こったことを示している。遺伝子導入の発現量が高いクローン #11 は eGFP-Cre 導入後も mCherry の発現が 25% 程度残っていた(図 2B)。これはクローン #11 は多コピーで遺伝子導入がされており、その一部で組換えが起こったことを示している。また、完全な発現の切り替わりが起こらなかったことから、ST6GalI の過剰発現は細胞増殖を抑制する可能性も考えられた。そのため PGC を用いた安定発現株樹立の際は、導入コピー数の低い細胞を選別することとした。次に ST6GalI の発現により細胞表面に  $\alpha$ -2, 6 結合型シアル酸が形成されたことを確認するため、SSA レクチンを用いた免疫染色を行った。Cre/loxP 組換え前後のクローン #3 を染色した結果、組換え前にはなかった  $\alpha$ -2, 6 結合型シアル酸の蛍光が組換え後には検出するようになった(図 3)。さらにこの蛍光はシアリダーゼ処理により、ほぼ消失したことから細胞表面に  $\alpha$ -2, 6 結合型シアル酸が形成されたことを確認できた(図 3)。

最後に mCherry-ST6GalI 導入 PGC と eGFP-Cre 導入 PGC をそれぞれレシピエント胚へ移植し、遺伝子導入 PGC の生殖腺への定着率を評価した(表 1)。mCherry-ST6GalI 導入 PGC は高い個体で約 50% の定着率があり、移植に用いるのに十分であると考えられる。eGFP-Cre 導入 PGC の定着率は 20-30% で、mCherry-ST6GalI と比較すると低い結果となった。eGFP-Cre 導入 PGC を移植した生殖腺には SSEA-1 で染色されない eGFP 陽性細胞が存在していた。これは移植した PGC が生殖腺へ定着後、分化して SSEA-1 陰性になった可能性が考えられる。また、mCherry-ST6GalI と eGFP-Cre はそれぞれ異なるプロモーター(EF1  $\alpha$  プロモーターと PGK プロモーター)により発現が誘導されるため、発現パターンに差が生じた可能性も考えられる。定着率に差は見られたが、どちらの遺伝子導入 PGC も生殖腺への定着していることがわかった。今後、これらの PGC を移植した生殖細胞キメラニワトリを作製し、交配することで糖鎖改変トランスジェニックニワトリの樹立が期待される。

## ■ 要 約

インフルエンザワクチンを効率的に生産するために、糖鎖改変トランスジェニックニワトリの利用が考えられる。しかし、単純にニワトリの糖鎖改変を行うとヒトインフルエンザウイルスがニワトリへ感染する危険性が生じてしまうため、その問題を解決するため Cre/loxP 作動性 ST6GalI システムを考案した。このシステムは Cre リコンビナーゼが作用することで初めて ST6GalI の発現を誘導することができる。このシステムの有効性を確認するためにニワトリ DF-1 細胞で検討を行った結果、Cre リコンビナーゼによる ST6GalI 遺伝子の発現誘導と  $\alpha$ -2, 6 結合型シアル酸の形成が確認された。次にこのシステムをニワトリ PGC に導入し、レシピエント胚へ移植実験を行った結果、生殖腺への定着が観察されたことから、樹立した遺伝子導入 PGC を用いることではトランスジェニックニワトリの作製が可能であると考えられる。

## ■ 文 献

- 1) Kidani S., Kaneoka H., Okuzaki Y., Asai S., Kojima Y., Nishijima K., and Iijima S. (2016) Analyses of chicken sialyltransferases related to O-glycosylation. *J Biosci Bioeng.* 122, 379-384
- 2) Motono M., Yamada Y., Hattori Y., Nakagawa R., Nishijima K., and Iijima S. (2010) Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector, *J Biosci Bioeng.* 109, 315-321.

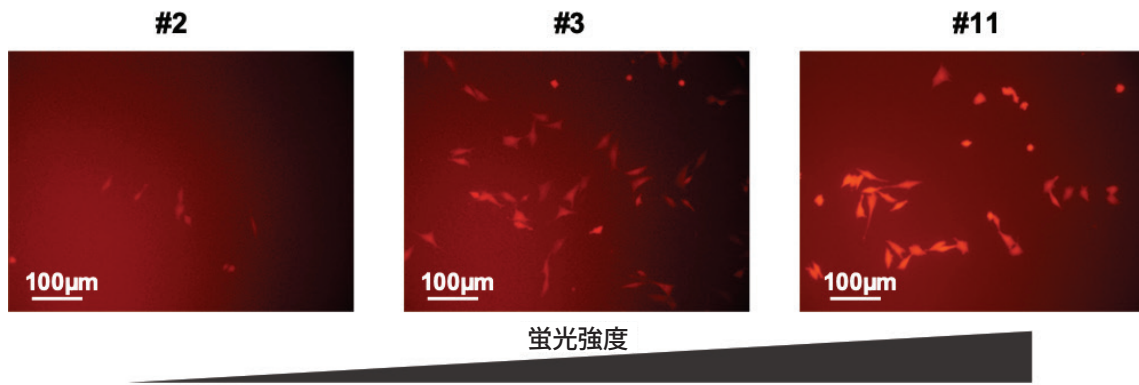


図1 mCherry-ST6Gal1 安定発現細胞株

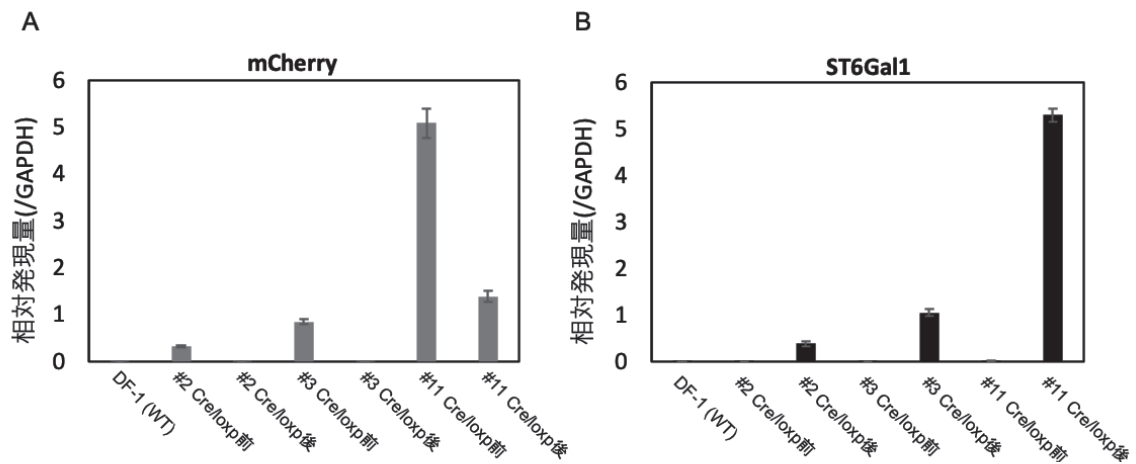


図2 Cre/loxP 組換え前後の遺伝子発現量比較



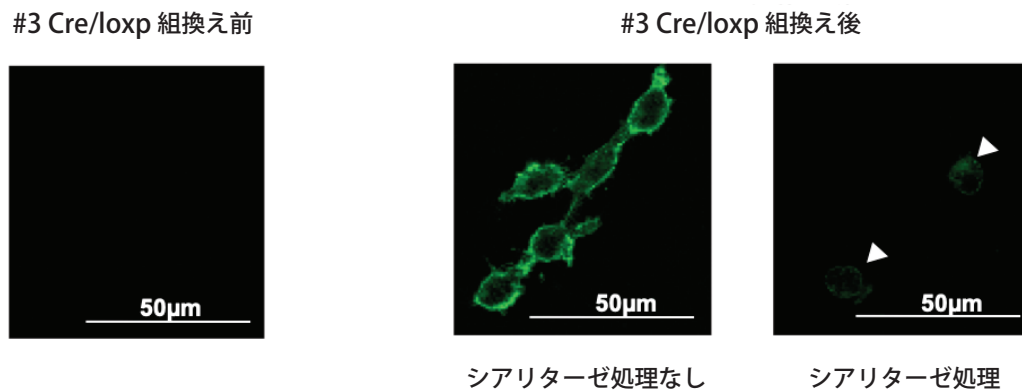


図3 Cre/loxP 組換え前後の SSA レクチン染色

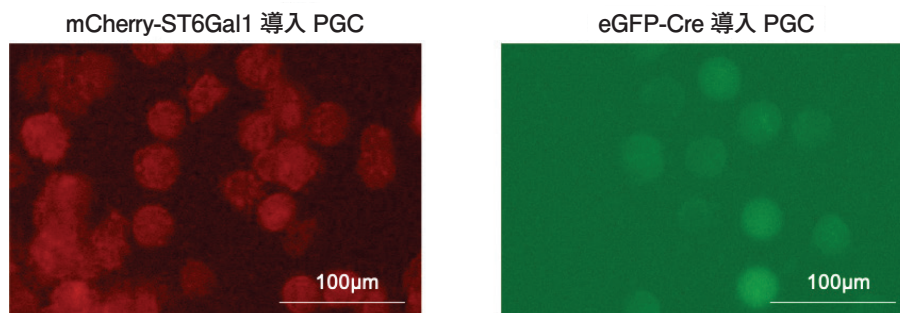


図4 Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 発現システム導入 PGC

表1 レシピエント胚の生殖腺における各 PGC の割合と定着率

| mCherry-ST6Gal1導入PGC |                  |               |                |         |
|----------------------|------------------|---------------|----------------|---------|
|                      | 移植PGC (mCherry+) | 全PGC (SSEA1+) | mCherry+SSEA1- | 定着率 (%) |
| No.1                 | 1.35             | 2.72          | 0.02           | 49.63   |
| No.4                 | 0.88             | 3.55          | 0.04           | 24.79   |

| eGFP-Cre導入PGC |                    |               |             |         |
|---------------|--------------------|---------------|-------------|---------|
|               | 移植PGC (GFP+SSEA1+) | 全PGC (SSEA1+) | eGFP+SSEA1- | 定着率 (%) |
| No.2          | 0.61               | 2.87          | 0.70        | 21.25   |
| No.3          | 0.72               | 3.00          | 0.96        | 24.00   |
| No.4          | 0.47               | 2.35          | 2.88        | 20.00   |
| No.5          | 0.59               | 2.05          | 1.14        | 28.78   |