

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」
分担研究報告書(平成25年度)

()ゲノム編集動物由来食品の安全性評価に関する研究

研究分担者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長

研究要旨:

人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術は、新しい農畜産物の育種技術として注目されている。そこで本研究では、本技術を用いて今後開発される食品を想定し、食品としての安全性を担保する上で必要な科学的な要件を整理することを目的とした。平成25年度は、ゲノム編集技術を用いたアレレルゲンの遺伝子ノックアウトを想定し、鶏卵をモデルケースにアレレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの再設計並びに構築、SSA(single-strand annealing) assay による活性評価、ニワトリ多能性幹細胞へのエフェクターの導入条件の検討、および変異導入効果を評価した。その結果、平成24年度に作製したエフェクターよりも強い活性を持つエフェクターの構築に成功し、また多能性幹細胞に対するエレクトロポレーションの至適条件を決定した。さらに Cel-1 assay を用いた変異導入活性評価試験では、ニワトリ多能性幹細胞に対して、構築したエフェクターが十分な変異導入活性を有することが示唆された。

協力研究者

堀内 浩幸 国立大学法人広島大学 大学院
生物圏科学研究科 教授

A. 研究目的

遺伝子組換え食品の安全性評価は、次世代の国民の食の安全性を確保する上で重要な研究課題であり、既に遺伝子組換え植物は、世界的な流通規模となっており、様々な対策が図られ、またリスクコミュニケーションが進められている。一方遺伝子組換え動物では、水域における魚類において流通の許可待ちの段階まででき、その安全性評価や対策が進められている。しかし陸域の遺伝子組換え動物は、現在、研究段階であるものが多く、今後5~10年後の実用化を目指すものが多い。

一方、最近、遺伝子の組換えを伴わないゲノム編集という技術が開発され、次世代の遺伝子改変技術として注目されている。ゲノム編集技術では、基本的にDNAの塩基配列に特異的に

結合するタンパク質と Fok I というヌクレアーゼを細胞内で一過性に発現させ、標的領域に二重鎖切断(DSB)を誘導する手法である。DSBは、自然界でも、例えば紫外線や放射線の影響により起こる現象であり、生体にとっては生死に関わる問題である。そこで、細胞は非相同末端連結という修復機構を有し、この切断面を修復する能力を有している。ところが、細胞は極稀にこの修復過程で塩基の欠失や挿入といったエラーを起こしてしまう場合がある。このエラーを利用した遺伝子改変技術がゲノム編集技術と呼ばれるものである。例えば、このエラーがゲノム上の翻訳領域で起こった場合、そのゲノム上にコードされた遺伝子の翻訳産物は正常なものとは異なるかもしくは翻訳されなくなり、これがゲノム編集技術を用いた新しい遺伝子のノックアウト技術となる。現在、ゲノム編集に利用される人工ヌクレアーゼには、zinc-finger nuclease (ZFN)と transcription activator-like (TAL) effector nuclease (TALEN) がある

が、認識配列のバリエーションが豊富な TALEN が主流である。TALEN は、植物病原細菌キサントモナスの TAL エフェクターに由来する人工ヌクレアーゼであり、その DNA 結合ドメインは、1 リピート 33~35 残基が 1 塩基を認識して結合する。TALEN の開発以降、いろいろな細胞や生物でこの技術を用いたゲノム編集生物が作製できるようになり、遺伝子組換えに変わる新規の遺伝子改変生物の作出が加速している。

そこで本研究では、TALEN の技術を用いたゲノム編集動物が 5 年以内に実用化されることを想定し、そこから得られる食品の安全性の評価基準を考える上で必要な科学的な知見を整理することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、今後想定されるゲノム編集技術を用いた食品のアレルゲンノックアウト技術を念頭に、鶏卵をモデルケースに選択し、本年度は鶏卵のアレルゲンであるオボムコイドの TAL エフェクターの再設計と構築を行い、活性評価試験並びにニワトリ多能性幹細胞へのエフェクター導入実験を行なった。

1) アレルゲン破壊 TAL エフェクターの再設計と構築

平成 24 年度には、標的アレルゲン (オボムコイド) に対して Addgene の Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit を用いて、TAL エフェクター発現ベクターの構築を行なった。平成 25 年度には、広島大学において開発された platinum TALEN and TAL Effector Kit を用いて、TAL エフェクター発現ベクターの再構築を行なった。両エフェクターセットは、標的領域を人工的に組込んだ HEK293T 細胞を用いた single-strand annealing (SSA) assay のルシフェラーゼ発現活性を指標に評価・比較した。

2) アレルゲン破壊 TAL エフェクターの導入条件の検討

SSA assay により高活性が得られたアレルゲン破壊 TAL エフェクターをニワトリ多能性幹細胞に導入するために、ネッパジーン NEPA21 typeII システムを使用した 11 種 (条件 2-12) の導入条件により至適条件の検討を行なった。なお遺伝子導入条件の評価には、GFP 発現ベクターを用いた導入後の細胞生存率と GFP 発現により行なった。

3) アレルゲン破壊 TAL エフェクターによる変異導入

高活性のアレルゲン破壊 TAL エフェクターは、2 で決定した至適条件によりニワトリ多能性幹細胞へ導入した。変異導入の有無は、Cel-1 assay により評価した。

C. 研究結果

1) アレルゲン破壊 TAL エフェクターの再構築と活性評価

平成 24 年度には、オボムコイド遺伝子座の exon 3 を標的に Golden Gate 法により TAL エフェクターを構築した。平成 25 年度はより確実にアレルゲンがノックアウトできるように、exon 1 を標的に platinum 法により、TAL エフェクターを再構築し、この 2 種を SSA assay により活性評価を行なった。その結果、図 1 に示したように対象 TALEN を 1 とした場合の相対評価において、exon3 を標的にした場合で約 2 倍、exon1 を標的にした場合で約 5 倍の高い活性が得られた。

2) アレルゲン破壊 TAL エフェクターの導入条件の検討

アレルゲン破壊 TAL エフェクターをニワトリ多能性幹細胞 (epiblast-derived stem cell; epiSC) に導入するにあたり、エレクトロポレーションに使用する NEPA21 typeII システムの条件検討を行なった。pulsing pulse を変えた全 11 条件を用いて、epiSC に GFP 発現ベクターを導入し 48 時間後に細胞の生存率と GFP 発現細胞 (導入効率) を算出し比較したところ条件 9 (150 v, 5 ms, 2 times) の条件で最も高い生存率と導入効率が

得られることがわかった(図2)。

3) アレルゲン破壊 TAL エフェクターによる変異導入活性

変異導入活性では、2で決定した TAL エフェクター発現ベクター導入条件をもとに epiSC へのベクターを導入し、48 時間培養後の epiSC からゲノム DNA を回収した後、Cel-1 assay に供試した。Cel-1 assay とは、TALEN の標的部位を挟み込むように PCR を行い、未変異と変異断片を増幅し、再ハイブリダイゼーションさせることで hetero-duplex を育成させ、Cel-1 nuclease による消化で断片を確認する方法である(図3)。電気泳動後、この断片が確認されれば、変異導入が起きていることが示唆される。本研究では、ニワトリ ES 細胞 (M22) 1 種と 5 種の epiSC に対して、Cel-1 assay を行なったところ、3 種の epiSC において、hetero-duplex の育成を示す消化断片が確認された(図4)。

(倫理面への配慮)

本研究で実施している組換え DNA 実験は、我が国が定める「生物の多様性確保に関する法律」を順守し、協力研究者が研究を実施する広島大学において規定されている「広島大学組換え DNA 実験安全管理規則」に従い適正に研究計画を立案し、機関承認を得ている。また実験動物の使用に関しては、同じく同機関が定める「広島大学動物実験実施規則」に従い研究計画書(承認番号 C09-1)を提出するとともに、本実施規則に従い適切に実験動物を使用している。

D. 考察

2010 年に初めて、ZFN を用いたゲノム編集技術が報告されて以降、続いて TALEN の技術開発が行なわれ、いろいろな培養細胞や生物種でこの技術を用いた遺伝子改変がおこなわれるようになってきた。2013 年には、多能性幹細胞を用いた遺伝子組換え技術が進まないラットにおいて、メラニン色素合成遺伝子を TALEN により破壊した人為的なアルビノラットも作出されている。人工ヌクレ

アーゼの利点は、細胞内に導入した人工ヌクレアーゼの発現でゲノム DNA に変異を導入できる点であり、遺伝子を組換える必要がない点である。即ちこれは、ノックアウトやノックインなど多能性幹細胞の樹立が必須であった技術から培養細胞でない受精卵への適応を可能とし、ほぼマウスのみで可能であった遺伝子組換え技術を微生物、植物からさまざまな動物種への適応を可能にしている。よって今後、ゲノム編集技術を活用した新開発バイオテクノロジー応用食品が比較的短期間に研究、開発されていくことが予想される。

現状、ゲノム編集技術を活用したノックアウト技術は、ナチュラルオカレンス扱いであり、組換え DNA 実験を規制するカルタヘナ法適用外であるが、この技術を活用した応用食品は、現行の食品安全委員会で検討される事項である。そこで本研究では、その科学的な評価基準の設定に必要な要件の整理を目的にモデルケースの構築をおこなった。

ゲノム編集技術を活用した応用食品の開発では、アレルゲンのノックアウトが非常に現実的な開発項目であり、鶏卵はその最も身近な対象食品である。しかし、未だ鳥類ではゲノム編集技術の導入は進んでいない。本研究では、鶏卵アレルゲンであるオボムコイドに対する 2 種の TAL エフェクター発現ベクターセットを作製し、変異導入に十分な活性を有する TALEN の合成に成功した。またこの TALEN を実際にニワトリ多能性幹細胞に導入した所、変異導入を示す hetero-duplex の存在が確認された。しかし、hetero-duplex はゲノムの 1 塩基多型(SNP)でも検出されることがあり、今後は変異導入領域の塩基配列を解析し、どのような変異が起きているのかを明らかにする必要があるものと思われる。

E. 結論

平成 25 年度は、ゲノム編集技術で可能なアレルゲンの遺伝子ノックアウトを想定し、鶏卵をモデルケースにアレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの再設計並びに構築、SSA assay による活性評価、ニワトリ多能性幹細胞へのエフェクターの導入条件並び

に epiSC への変異導入を検討した。アレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターセットは, exon1 と exon3 を標的に2種作製した。その結果, exon3 を標的にした場合で約 2 倍, exon1 を標的にした場合で約 5 倍の高い比活性が得られた。次に epiSC に GFP 発現ベクターを導入し 48 時間後に細胞の生存率と GFP 発現細胞 (導入効率) を算出し比較したところ, 条件 9 (150 v, 5 ms, 2 times) の条件で最も高い生存率と導入効率を得られることがわかった。決定した条件をもとに, epiSC に対して変異導入を行い Cel-1 assay 供試したところ, 変異導入を示す hetero-duplex の存在が示唆された。

3 . その他
なし

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1.論文発表

1) Alev, C., Nakano, M., Wu, Y., Horiuchi, H. and Sheng, G. Manipulating the avian epiblast and epiblast-derived stem cell. Methods Mol. Biol. 1074: 151-173, 2013.

2 . 学会発表

1) 堀内浩幸, 「鳥類多能性幹細胞の遺伝子改変技術の現状とこれから」 第 2 回実験動物科学シンポジウム, 公益社団法人日本実験動物学会主催, 名古屋, 2013 年 12 月 (招待講演)

2) 堀内浩幸, 「鳥類多能性幹細胞を用いた鶏卵の低アレルゲン化」, 第 1 回タマゴシンポジウム, タマゴ科学研究会主催, 東京, 2013 年 5 月 (招待講演)

G . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし