

バイオテクノロジーを用いて得られた食品のリスク管理及び 国民受容に関する研究

分担課題 ニワトリのモデル組換え体の作出

研究分担者	堀内 浩幸	(広島大学生物圏科学研究科・教授)
研究協力者	小関 良宏	(東京農工大学工学研究院・教授)
	太田 大策	(大阪府立大学生命環境学研究科・教授)
	手島 玲子	(国立医薬品食品衛生研究所・客員研究員 徳島文理大学香川薬学部・特任教授)

研究要旨

本研究は、食品や医薬品への応用研究開発が進んでいる遺伝子改変 (TG) ニワトリをモデルに、オミクス解析などによる安全性評価に関する実証的データの蓄積と整備を行い、その検討を行なうことが目的である。平成 28 年度は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が片アレルに組込まれた GFP ニワトリから 15 羽のヒナを孵化させた。孵化したヒナは、組換え体の有無と雌雄判定を PCR により行い、1-2 ヶ月齢まで飼育した。飼育した中から、雌の正常ニワトリと TG ニワトリを 3 羽ずつ選抜し、オミクス解析用に血漿と血清を分離した。また白血球由来 RNA の抽出を行い、それぞれ研究協力者に解析を依頼した。

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アメリカ食品医薬品局 (FDA) の認可がおり、いよいよ流通の段階までできている。陸域の遺伝子組換え動物は、既に医薬品において組換え動物由来の医薬品が複数 FDA により認可され、日本でも遺伝子組換えニワトリの鶏卵で製造された組換え酵素製剤の認可が了承されたところである。今後は、ゲノム編集技術を中心とした遺伝子改変動物由来の食品開発が加速することも予想され、その対策が急務であると思われる。

そこで本研究の目的は、食品や医薬品への応用研究開発が進んでいる遺伝子改変ニワトリをモデルにオミクス解析などによる安全性評価に関する実証的データの蓄積と整備を行い、その検討を行なうことである。平成 28 年度は、遺伝子改変ニワトリ (GFP ニワトリ) の各オミ

クス解析 (メタボローム解析, トランスクリプトーム解析, プロテオーム解析) を行なうために、GFP 及び正常ニワトリの血漿, 血清並びに白血球由来 RNA の抽出を行い、研究協力者への試料提供を行なった。

B. 研究方法

(1) GFP 遺伝子導入ニワトリの選抜と育成

GFP ニワトリは、国立大学法人名古屋大学・鳥類バイオサイエンス研究センターで維持されている LSi/ Δ AeGFP-TG ニワトリの受精卵を導入した。この GFP ニワトリは、片方のアレルに GFP 遺伝子が導入されたもので GFP^{+/+}で維持されている。導入した受精卵は、分担者の研究室で孵化させたのち、血液を試料に GFP 遺伝子の有無と雌雄判定を PCR によって行なった。雌雄判定には、chicken dead end homologue (CDH) 遺伝子を標的とした。CDH 遺伝子は、ニワトリの性染色体にコードされた遺伝子であり、Z 染色体と W 染色体上で塩基に違いがある。そのためこの領域を PCR で増幅すると、ZZ (雄) では 1 本、ZW (雌) では 2 本のバンドが増幅され、電気泳動により雌雄を判定することがで

きる。GFP 遺伝子が検出されたヒナは GFP ニワトリとして、また検出されなかったヒナは正常ニワトリとして、分担者が管理する TG ニワトリ飼育施設で育成した。

(2) GFP 及び正常ニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出

1-2 ヶ月齢の雌の GFP 及び正常ニワトリそれぞれ 3 羽を選抜し、採血を行い、遠心分離によりそれぞれ血漿を回収した。また採血した血液は、37°C で一時間固化させた後、4°C で一昼夜静置し、その後、遠心分離により血清を回収し、-80°C で保存した。また白血球の分離では、採血した血液を PBS(-) で 2 倍に希釈し、Ficoll-Paque を用いた密度勾配遠心法 (740 G, 10 分) により白血球を回収した。回収した白血球は全 RNA 単離キット (RNeasy, QIAGEN) により全 RNA を単離した。単離した全 RNA は分光光度計により、230, 260, 280 nm の吸光度を測定し、全 RNA の量と純度を計算した。

倫理面への配慮

組換え DNA 実験に関しては、カルタヘナ法のもと、広島大学が定める組換え DNA 実験安全管理規則に従い、研究計画書を提出し、機関承認実験として広島大学長から承認を得て実施した (承認番号: 27-69, 27-99)。

動物使用実験に関しては、広島大学動物実験実施規則に従い研究計画を提出し、広島大学長からの承認 (承認番号: C11-29) を受け、この規則に従い研究を実施した。

研究倫理教育は、平成 27 年 12 月 21 日 (月) に広島大学において開催された理工農系の研究者を対象とした研究倫理教育 FD を受講するとともに、CITI JAPAN の基本コース B を e-learning により受講し、平成 28 年 10 月 29 日に全てのカリキュラムを修了した。

C. 研究結果

(1) GFP 遺伝子導入ニワトリの選抜と育成

導入した GFP ニワトリ受精卵 20 個を 3 週間孵卵し、15 羽 (#42-56) を孵化させた。孵化したヒナは、少量の採血を行い、血液細胞を用いた PCR 法に供試した。GFP 遺伝子の有無を判定する PCR から、9 羽が GFP ニワトリ、6 羽が正常ニワトリであることがわかった (図 1)。次に雌雄判定の PCR では、GFP ニワトリの 5 羽が ZZ (雄) であり、4 羽が ZW (雌)、また正

常ニワトリでは、2 羽が ZZ (雄) であり、4 羽が ZW (雌) であることがわかった。そこで、オミクス解析の試料は、それぞれ ZW の雌個体を育成して、調整した。

(2) GFP 及び正常ニワトリの血漿、血清並びに白血球由来 RNA の抽出

分離した血漿は、メタボローム解析用とし、研究協力者へ分与した。また同様に、分離した血清はプロテオーム解析用とし、研究協力者へ送付した。白血球由来 RNA は、数回の実験でゲノム DNA の混入が認められたため、手法を一部変更して行なったところ、高純度で十分量の RNA が単離された (表 1) ことから、トランスクリプトーム解析用に研究協力者へ送付した。

D. 考察

平成 28 年度は、当初予定していた計画を全て完了することができた。モデルニワトリの作出試験では、国立大学法人名古屋大学・鳥類バイオサイエンス研究センターから GFP 遺伝子が導入されたニワトリの受精卵から育成した。このニワトリは、GFP^{+/+}では胚性致死となるため、GFP^{+/+}で維持されている。そのためメンデルの法則に従うと、組換え体と正常ニワトリが 1:1 の割合で孵化する。本作出試験では、約 3:2 の割合で孵化しており、ほぼメンデルの法則に準じているものと思われる。

組換え動物をオミクス解析等により評価する際、個体差を如何にデータに反映させ補正するかは、極めて重要であり、データの変動が個体差によるものなのか、それとも遺伝子の改変によるものなのかを明らかにする必要がある。またこれは雌雄差によっても生じるものであり、このデータの蓄積は必須である。平成 27 年度には、既にこれらのデータの蓄積が済んでいることから、本実験結果から、外来遺伝子がランダムに発現する生体内での、代謝系、遺伝子発現、タンパク質の翻訳に与える影響が解析できるものと思われる。これらの点は、遺伝子改変生物を食品や医薬品として利用していく上で、安全性を評価する重要な視点である。本研究成果をもとに、今後は鶏卵や鶏肉など実際の可食部での解析も必要であろう。

E. 結論

平成 28 年度は、GFP^{+/+}ニワトリ受精卵 20 個から、15 羽のニワトリを孵化させ、選抜の結果、GFP^{+/+}ニワトリ 9 羽と正常ニワトリ 6 羽を育成

させた。この内、それぞれ雌3羽ずつからオミクス解析に使用する血漿、血清及び白血球由来RNAの調整を行い、各種解析に使用した。

F. 健康危険情報
異常なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

1) Ezaki R, Hirose F, Furusawa S, Horiuchi H. Stable and simple culture protocol for chicken primordial germ cells using apoptosis inhibitor. The 17th Asian- Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. Aug 22, 2016, Fukuoka, JAPAN.

2) Nakagawa Y, Ezaki R, Sakuma T, Kuroiwa A, Yamamoto T, Furusawa S, Horiuchi H. Genome editing in chicken primordial germ cells using genome editing tools. The 1st Annual Meeting of the Genome Editing Society of Japan. Sep 8, 2016, Hiroshima,

JAPAN.

3) Kameyama F, Nakagawa Y, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Genome editing in chicken epiblast derived stem cells using CRISPR/Cas9. The 1st Annual Meeting of the Genome Editing Society of Japan. Sep 8, 2016, Hiroshima, JAPAN.

4) 江崎僚, 廣瀬文哉, 古澤修一, 堀内浩幸. アポトーシス阻害剤を活用したニワトリ始原生殖細胞の新規培養方法. 第39回日本分子生物学会年会2015年12月1日(横浜)

5) 平野朝子, 江崎僚, 古澤修一, 堀内浩幸. ニワトリエピブラスト幹細胞はナイーブ型かプライム型か. 第39回日本分子生物学会年会2015年12月1日(横浜)

H. 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
3. その他
なし。

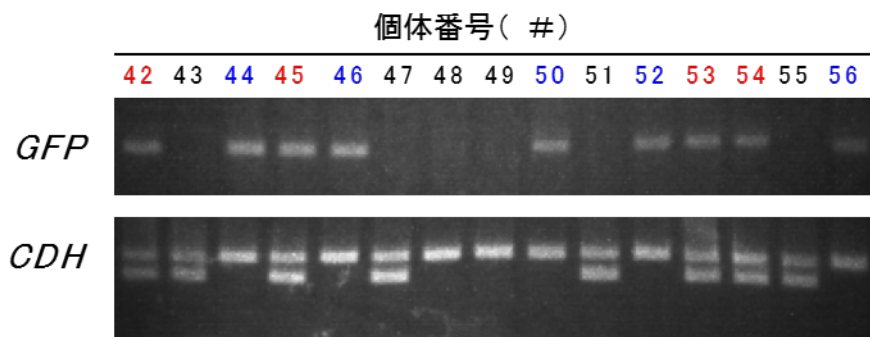


図1. ゲノムPCRによるTG・雌雄判定

GFP導入TGニワトリ	正常(non-TG) ニワトリ
♂: 44・46・50・52・56	♂: 48・49
♀: 42・45・53・54	♀: 43・47・51・55

表1 白血球RNAの量と純度

個体番号	RNA量(μg)	濃度(ng/mL)	容量(μL)	A _{260/280}	A _{260/230}
43	11	137	80	1.691	1.03
51	6.5	81	80	1.688	0.786
55	7.4	87	85	1.706	0.294
45	4.6	57	80	1.676	0.282
53	5.3	66	80	1.65	1.222
54	6.9	86	80	1.623	1.72