

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所・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 29 年度は、平成 28 年度に得られたオミクス解析データの総合評価を行なうとともに、新たなニワトリのモデル組換え体として遺伝子組換えニワトリ 2 種とゲノム編集ニワトリ 2 種を作出した。

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）の認可があり、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 29 年度は、平成 28 年度に得られたオミクス解析データの総合評価を行なうとともに、新たなニワトリのモデル組換え体の作出を行なった。

B. 研究方法

(1) オミクス解析データの総合評価

研究協力者のもとで実施した 3 つのオミクス解析（ニワトリ血漿のメタボローム解析、ニワトリ白血球 mRNA を用いたトランスクリプトーム解析、ニワトリ血清のプロテオーム解析）のデータを全てまとめて、遺伝子組換えによる動物細胞への遺伝子から成分変化までを総合的に評価した。

(2) 遺伝子改変ニワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出・維持

これまでのニワトリ epiSC を用いた遺伝子改変技術に代え、培養始原生殖細胞（PGC）を用いる方法で、遺伝子組換えニワトリとしてセンサー遺伝子導入ニワトリと ZsGreen 導入ニワトリの作出試験と維持を行なった。センサー遺伝子導入ニワトリは、ウイルスベクター法を用いて、また、ZsGreen 導入ニワトリは、プラスミドベクターを用いる方法で行なった。さらに、同培養 PGC を用いる手法で、ゲノム編集ニワトリとしてアレルゲンノックアウトニワトリと 2 種の雄化遺伝子のノックアウトニワトリの作出試験と維持を行なった。アレルゲンノックアウトには、TALEN 法を、雄化遺伝子のノ

ックアウトには、CRISPR/Cas9法を使用した。

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：28-103-2, 29-14-2）。

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：C16-23）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）オミクス解析データの総合評価

研究球力者のもとで実施した 3 つのオミクス解析のデータを全てまとめて、遺伝子組換えによる動物細胞への遺伝子から成分変化までを総合的に評価した。その結果、すべての解析データにおいて、平成 27 年度に実施した正常ニワトリを用いて得られた個体差を示す変動以外に外来遺伝子導入による変動は認められないことがわかった。今回、解析した遺伝子改変ニワトリに導入された遺伝子は GFP であり、細胞内でのみ発現するため、生体の代謝や恒常性の維持に関わる変動が認められないことが示唆された。

（2）遺伝子改変ニワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出・維持

平成 29 年度は、培養始原生殖細胞（PGC）を用いる方法で、遺伝子組換えニワトリとしてセンサー遺伝子導入ニワトリと ZsGreen 導入ニワトリ生殖系列第 2 世代（G1）の作出試験に成功した。センサー遺伝子導入ニワトリは、さらに G1 世代が性成熟したことから、これらを戻し交配することで系統の維持と染色体上での導入遺伝子の数と位置を特定した。また、同培養 PGC を用いる手法で、ゲノム編集ニワトリとしてアレルゲンノックアウトニワトリと 2 種の雄化遺伝子のノックアウトニワトリの作出試験を行いそれぞれ G1 世代の作出に成功した。平成

29 年度に作出したモデル遺伝子改変ニワトリは今後、食品利用に近い個体であることから系統の維持と安全性評価としてオミクス解析が必要であると考えられた。

D. 考察

オミクス解析データの総合評価では、解析した遺伝子改変ニワトリに導入された遺伝子は GFP であり、細胞内でのみ発現するため、生体の代謝や恒常性の維持に関わる変動が認められないことが示唆された。今後は、生体の代謝や機能に影響を及ぼす可能性があり、また食品への利用が推察されるような遺伝子改変ニワトリ（例えばノックアウトニワトリや新機能付加ニワトリ）での解析が必要である

新たなモデル組換え体の作出試験では、今後、食品利用に近い複数種の組換え体の作出に成功した。今後は、本研究成果で得られた知見をもとに、オミクス解析等による安全性評価試験を行なう必要がある。

E. 結論

平成 29 年度は、組換えニワトリと正常ニワトリのオミクス解析データの総合評価を行い、GFP 遺伝子導入では、外来遺伝子導入による変動は認められないことがわかった。また、新たに食品利用に近い複数種の組換えニワトリやゲノム編集ニワトリの作出に成功した。

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) Ichikawa K, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Cloning and expression analyses of chicken forkhead box L3. The Fourth World Congress of Reproductive Biology. Sep 27, 2017, Okinawa, JAPAN.
- 2) Saheki K, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Isolation, culture and characterization of chicken amniotic mesenchymal stem cells. 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 7 日（神戸）.
- 3) 岡座悠輝, 江崎僚, 古澤修一, 堀内浩幸. ゲノム編集技術を用いた鳥類性決定機構に

関する研究. 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 7 日 (神戸).

- 4) 正木陽登, 江崎 僚, 古澤修一, 堀内浩幸.
ア鳥類始原生殖細胞における DAZL の機能解析. 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 7 日 (神戸).
- 5) Okaza Y, Ezaki R, Furusawa S, Horiuchi H. Elucidation of mechanism of avian sex determination using genome editing. The 2nd Annual Meeting of the Japanese Society for Genome Editing. Sep 29, 2017, Osaka, Japan.

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。