

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27年度は、遺伝子改変ニワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出試験を行なうと共に、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）における個体差や雌雄差を明らかにするために、非組換えニワトリの血漿、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。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。平成29年度は、今後の解析に利用可能な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・維持を行なうとともに各オミクス解析データの総合解析を実施した。

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。

そこで本研究では、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が目的である。平成27年度は、遺伝子改変ニワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出試験を行なうと共に、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）における個体差や雌雄差を明らかにするために、非組換えニワトリの血漿、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。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。平成29年度は、今後の解析に利用可能な遺伝子改変ニ

ワトリ（外来遺伝子導入とゲノム編集）の作出・維持を行なうとともに各オミクス解析データの総合解析を実施した。

B. 研究方法と結果

（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。それぞれの試料は、研究協力者へオミクス解析のため送付した。

（3）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。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。

（4）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

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。その結果、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。

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, 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：C11-29, 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. 考察

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。このモデルニワトリを用いたオミクス解析では、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。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考えられた。

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。本研究結果をもとに、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。

新たなモデルニワトリの作出試験では、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. 結論

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. 健康危険情報

異常なし。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

1) 中川祐樹, 江崎僚, 佐久間哲史, 黒岩麻里, 山本卓, 堀内浩幸, ゲノム編集技術を用いた鳥類の性決定関連遺伝子の解析, 第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 (神戸)

2) 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.

3) 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.

- 4) 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.
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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.
- 8) 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).

- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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.

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
3. その他
なし。