

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19260

研究課題名（和文）「生物工場」実現に向けたニワトリ卵白における組換えタンパク質のヒト型糖鎖修飾

研究課題名（英文）Human-like Glycosylation of Recombinant Proteins in Chicken Egg Whites for the Realization of a "Recombinant Protein Production Factory"

研究代表者

大石 勲 (Oishi, Isao)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副研究部門長

研究者番号：50314472

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝子組換えニワトリを用いてヒト型糖鎖を有する組換えタンパク質を鶏卵内で大量生産する技術の開発を目的とした。具体的には、ガラクトースおよびシアル酸転移酵素（GalT1およびST6Gal1）を卵管腺細胞特異的に発現するノックイン（KI）ニワトリを作出し、その糖転移酵素を持つKIニワトリとヒトインターフェロン β （hIFN- β ）を高発現するKIニワトリを交配させ、ダブルノックイン（GTs-hIFN- β KI）ニワトリを作製した。結果として、GTs-hIFN- β KIニワトリの卵白中には、ガラクトースおよびシアル酸が付加されたhIFN- β が確認され、その生物活性も向上が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、医療用組換えタンパク質の低コスト大量生産を実現するための重要なステップを示している。特に、糖鎖修飾の完全性が求められるバイオ医薬品の製造において、ニワトリを利用した生物工場の可能性を示した。GalT1およびST6Gal1を卵管腺細胞で発現させることで、ヒト型糖鎖を有する高品質な組換えタンパク質の生産が可能となり、従来の培養細胞を用いた方法に比べて大幅なコスト削減に繋がることが期待される。同一性という点では課題を残すものの、組換え鶏卵を用いたタンパク質生産の高度化は再生医療やバイオ医薬品の普及に向けて重要な技術的進展であり、医療費の抑制や新たな治療法の開発に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a technology for the mass production of recombinant proteins with human-like glycosylation in chicken eggs using genetically modified chickens. Specifically, we generated knock-in (KI) chickens that specifically express galactosyltransferase (GalT1) and sialyltransferase (ST6Gal1) in the oviduct gland cells. We then crossed these KI chickens, which possess the glycosyltransferases, with another KI chicken that highly expresses human interferon-beta (hIFN- β). As a result, we produced double knock-in (GTs-hIFN- β KI) chickens. The egg whites of these GTs-hIFN- β KI chickens contained hIFN- β with added galactose and sialic acid, and the biological activity of hIFN- β was also found to be enhanced.

研究分野：分子生物学

キーワード：始原生殖細胞 ニワトリ 遺伝子ノックイン 糖鎖 糖転移酵素 シアル酸 組換え蛋白質

1. 研究開始当初の背景

バイオ医薬品市場は急速な成長を続けており、製品数と消費量の双方で拡大が見込まれている。特に再生医療研究においては、ヒト組換えタンパク質の需要が急増している。現在の多くの医療用組換えタンパク質は、CHO細胞などの培養細胞を用いて生産されているが、この方法は巨額の投資を必要とする生産設備や煩雑な生産管理が伴うため、製造コストが極めて高くなる。その結果、製品自体が非常に高価となり、医療費の高騰が社会的受容を超える懸念がある。

この問題を解決するためには、医療用組換えタンパク質を圧倒的な低コストで生産する革新技術が必要である。これに対して、挑戦的な研究が国内外で行われている。例えば、ヤギやウシ、カイコやタバコなどの動植物を遺伝子組換えして、乳汁や絹糸、葉などにヒト組換えタンパク質を生産する「生物工場」の研究が進められており、実際にヤギ乳汁由来ヒトアンチスロンピンなどが医薬品として承認され、上市されている。

このような背景のもと、我々は独自のニワトリ遺伝子組換え技術を開発し、卵白にヒトサイトカインやヒト抗体を大量生産することに成功した。より具体的には、卵白主成分オボアルブミンの翻訳開始点に外来遺伝子をノックインすることで、鶏卵中にヒトインターフェロンやヒト抗体を大量に生産することに成功した。最近ではさらに効率を10倍近く高め、0.5g/卵以上の安定生産も実現している。鶏卵は安価に生産可能であり、ニワトリは医療用組換えタンパク質の超低コスト大量生産を実現する生物工場としての高いポテンシャルを持っている。

しかし、卵白に蓄積するヒトタンパク質のN-結合型糖鎖には末端のガラクトースやシアル酸が欠けているという問題がある(図1<卵白型>)。バイオ医薬品をはじめ、多くの医療用組換えタンパク質は糖タンパク質であり、特にN-結合型糖鎖はその安定性や機能、活性において重要である。実際、卵白から得られたヒトサイトカインやヒト抗体は、半減期や活性が培養細胞由来のものに比べて低下しているとの報告もある。

糖鎖工学を用いて卵白由来組換えタンパク質を*in vitro*で望ましく糖鎖修飾することも可能だが、これでは組換え鶏卵を用いる低コスト生産性のメリットが失われてしまう。そのため、組換え鶏卵内で外来タンパク質をヒト型に糖鎖修飾する技術が実現可能か明らかにすることが求められていた。より具体的には卵白中において発現するタンパク質にガラクトースやシアル酸を図1<ヒト型>のように付加できるか不明であった。

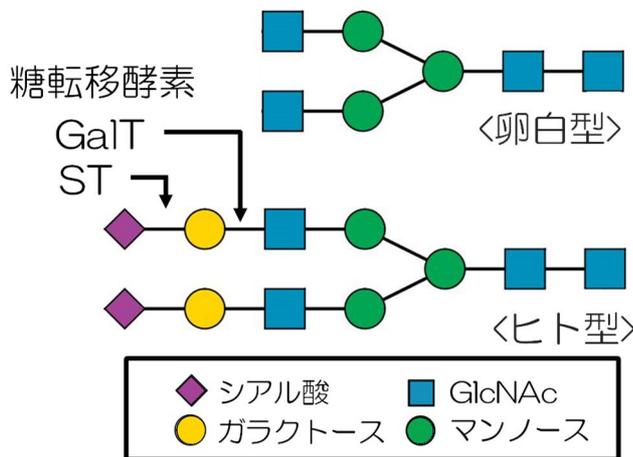


図1 卵白型、ヒト型糖鎖修飾

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子組換えニワトリを用いてヒト型糖鎖を有する組換えタンパク質を鶏卵内で大量生産する技術を開発することである。特に、ガラクトースおよびシアル酸転移酵素を卵管組織特異的に発現させることで、卵白中の組換えタンパク質にヒト型糖鎖修飾を付加することが可能になると考えた。そのために、オボアルブミン以外の卵管特異的遺伝子座にガラクトース転移酵素ならびにシアル酸転移酵素の遺伝子をノックインしたニワトリを作出し、その卵を解析するとともに、このニワトリとオボアルブミン遺伝子座に外来タンパク質遺伝子をノックインしたニワトリを交配したダブルノックインニワトリを作出し、鶏卵における外来タンパク質の糖鎖構造を評価することとした。

3. 研究の方法

卵白タンパク質はニワトリ卵管組織の腺細胞で作られ、卵管腔に分泌され卵白成分となる。先行研究から卵管組織で **-1,4-galactosyltransferase 1 (GalT1:ガラクトース転移酵素)**と **-galactoside -2,6-sialyltransferase 1 (ST6Gal1:シアル酸転移酵素)**の発現や活性が弱いことが知られており、これら糖転移酵素を卵管腺細胞に異所的に発現することでヒト型糖鎖構造を有する組換えタンパク質生産が期待される。これについて検証するために本研究では以下の方法を取った

(a) 糖転移酵素ノックインニワトリの作出

卵白タンパク質オボムコイドの翻訳開始点にニワトリ **GalT1** と **ST6Gal1** 遺伝子をノックインする。両糖転移酵素は **2A** 自己切断ペプチド配列で繋がれる形とし、卵管腺細胞特異的にこれら酵素を発現するニワトリを作出する。作出したニワトリの発生や妊性について検討し、卵白の内在性タンパク質について糖鎖修飾の解析を行った (図 2 研究(a))。

(b) 鶏卵内組換えタンパク質のヒト型糖鎖修飾

既に作出しているヒトインターフェロン を卵白に高発現するノックインニワトリ (卵白タンパク質オボアルブミンの翻訳開始点に遺伝子ノックイン) と上記糖転移酵素ノックインニワトリを交配し、ヒト由来の外来遺伝子と糖転移酵素を同時に卵管腺細胞で発現するダブルノックインニワトリを作出した。性成熟後の雌より鶏卵を得て、卵白におけるヒトタンパク質の糖鎖を解析した (図 2 研究(b))。

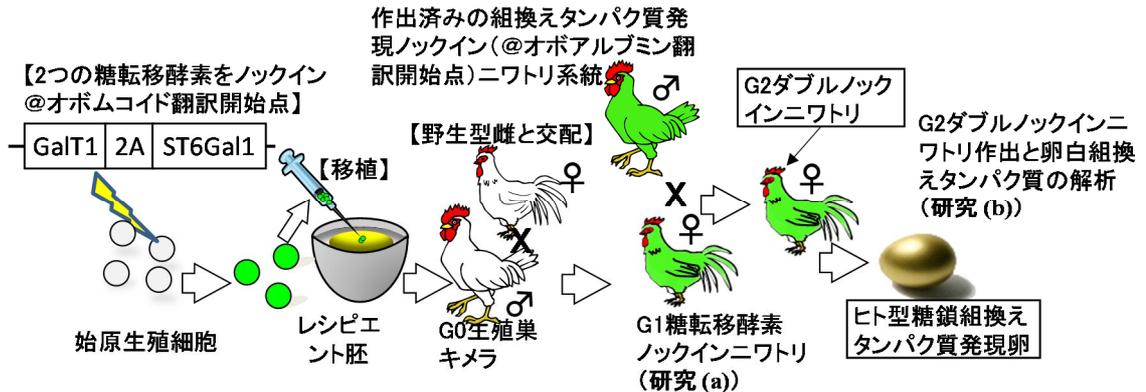


図 2 糖転移酵素の卵管異所発現による組換えタンパク質のヒト型糖鎖修飾の試み

4. 研究成果

(a) 糖転移酵素ノックインニワトリの作出

ノックインドナーベクターの構築

本研究で作製したノックインドナーベクターを図 3(GalT1/ST6-1 donor)に示す。ニワトリ **GalT1** と **ST6Gal1** 遺伝子を口蹄疫ウイルス由来 **2A** ペプチド (**F2A**) をコードするヌクレオチド配列でつなぎ、**ST6Gal1** のストップコドンの 3' 側にネオオマイシン耐性遺伝子を配置した。さらに **homology arm** としてオボムコイドの翻訳開始点直上の **2.5kb** (5' **homology region**; **HR**) とエキソン 1 から下流の **2.6kb** (3' **HR**) を配置した。

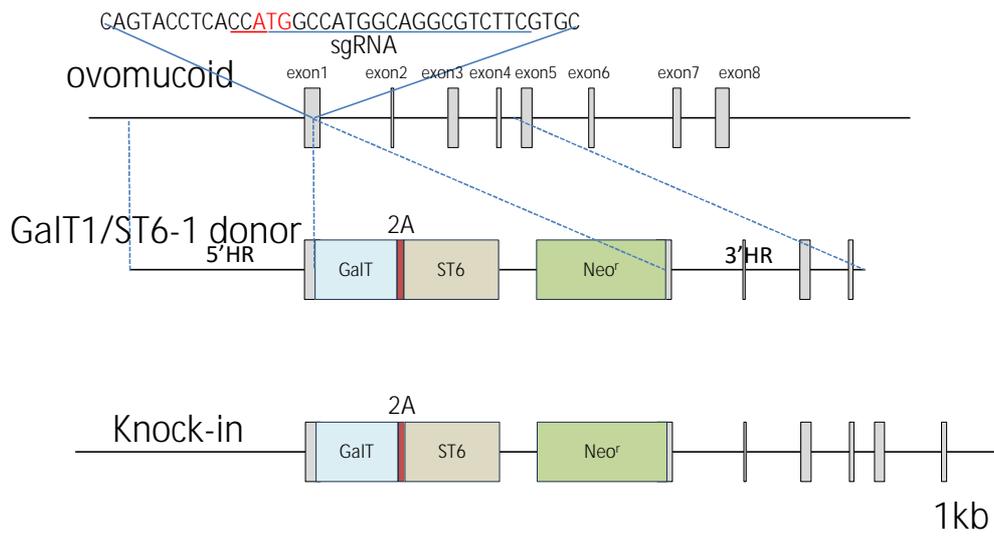


図 3 糖転移酵素発現ドナーベクターとオボムコイド遺伝子座へのノックインのデザイン

始原生殖細胞を介した糖転移酵素ノックインニワトリの作出と卵白の評価

ニワトリ始原生殖細胞を用いて **CRISPR/Cas9** による遺伝子ノックインを実施した。図 3 上段に示す標的配列(CCA)TGGCCATGGCAGGCGTCTTを切断するガイドRNA を **hCas9** と共発現するベクター **pX330-OVM-Tg2** を構築し、**GalT1/ST6-1 donor** とともにニワトリ始原生殖細胞にトランスフェクトした。ネオマイシン耐性の始原生殖細胞を選択し、レシピエント胚(2.5日胚)の血液中に約 **2000** 個/個体で顕微注射により移植し、孵化操作を行った。孵化した **G0** キメラ雄ヒヨコを飼育し性成熟させた。精子をそれぞれの個体より採取し、ゲノム **DNA** を用いて

ノックインした遺伝子を標的とした定量 PCR を行ない、ドナー寄与率の高いものを野生型雌と交配し、糖転移酵素ノックイン（以下 **GTs-KI**）後代（**G1**）を得た。**GTs-KI** ニワトリが産卵を開始するまで育て、卵白中の糖鎖修飾を確認した。具体的には、**SDS-PAGE** とクマシーブリリアントブルー（**CBB**）染色を行い、卵白タンパク質の分子量の変化を確認した。**GTs-KI** メスの卵白には、**OVT** および **OVG** に対応するバンドが高分子側にシフトしており、内因性卵白タンパク質の追加修飾を示唆していた（図 4）。

さらに内因性卵白タンパク質の糖鎖修飾を評価するために、レクチンプロットを行った。**WT** および **GTs-KI** の卵白を **SDS-PAGE** で分離し、**PVDF** 膜に転写した後、**N**-アセチルグルコサミン（**GlcNAc**）末端の **N**-グリカンに特異的に結合するレクチン（**WGA**）、ガラクトースを含む **N**-グリカンに結合するレクチン（**RCA120**）、およびシアル酸に結合するレクチン（**SNA**）でプロットした（図 5）。**WT** 卵白では、**OVA** および **OVG** を含むいくつかのシグナルが **WGA** レクチンプロットで検出されたが、**GTs-KI** 卵白ではほとんど検出されなかった。これに対し、**RCA120** および **SNA** レクチンプロットの結果では、**GTs-KI** 卵白には多くのバンドが検出され、**WT** 卵白にはほとんど見られなかった。これらの結果は、**GTs-KI** メスが産む卵白タンパク質にガラクトースおよびシアル酸が付加されていることを示している。

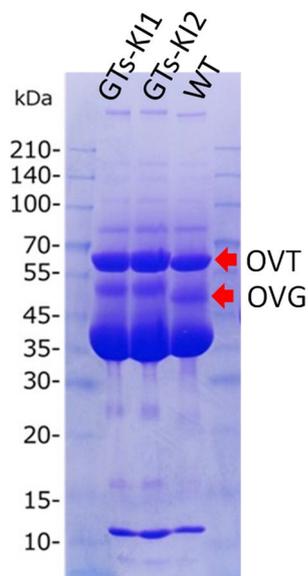


図 4 糖転移酵素発現による内在タンパク質の移動度変化

(b) 鶏卵内組換えタンパク質のヒト型糖鎖修飾

GTs-KI メスが卵白中に分泌する外来組換えタンパク質の **N**-グリカンにガラクトースとシアル酸を付加する能力を評価するために、**GalT1**、**ST6Gal1**、および外来タンパク質を同時にマグナム細胞で発現するトランスジェニックメスニワトリを作出した。これまでに、**hIFN-** 遺伝子を **OVA** 遺伝子座の翻訳開始点に挿入し、卵管腺細胞特異的に **hIFN-** を発現させることにより、卵白中に大量の組換え **hIFN-** を分泌する **hIFN- KI** ニワトリを作成している。そこで、**GTs-KI** メスと **hIFN- KI** オスを交配さ、**GalT1**、**ST6Gal1**、および **hIFN-** を同時に卵管腺細胞で発現するダブルノックイン（**GTs-hIFN- KI**）メスニワトリの作出を試みた。**GTs-KI** メスには妊性が認められ、**GTs-hIFN- KI** 後代を得ることができた。このメスは性成熟の後に産卵を開始したので、卵白に発現する **hIFN-** の糖鎖修飾について検討した。

CBB 染色、ウエスタンブロッティング、**ELISA**、およびレクチンブロッティングを用いて、卵白中 **hIFN-** を評価した（図 6）。**CBB** 染色では、期待されるサイズ付近のバンドが **hIFN- /WT** レーンに観察され、**hIFN- /GTs** レーンではバンドが高分子量側にわずかにシフトしていた（図 6 **CBB**）。ウエスタンブロッティングでは、**hIFN-** のシグナルが **hIFN- /WT** および **hIFN- /GTs** の両方に観察され、**hIFN- /GTs** のシグナルは **hIFN- /WT** よりもわずかに強かった（図 6 **hIFNb**）。**ELISA** では、**hIFN-** の濃度が **hIFN- /WT** では $2.97 \pm 0.29 \text{ mg/ml}$ 、**hIFN- /GTs** では $5.56 \pm 0.62 \text{ mg/ml}$ であることが検出された。**WGA** レクチンブロッティングでは、**hIFN- /WT** で **hIFN-** シグナルが検出されたが、**hIFN- /GTs** では明確なシグナルは観察されなかった（図 6 **GlcNAc**）。対照的に、**RCA120** および **SNA** レクチンブロッティングでは、**hIFN- /GTs** で **hIFN-** シグナルが検出され、**hIFN- /WT** では明確なバンドは観察されなかった（図 6 **ガラクトース**、**シアル酸**）。これらのデータは、シア

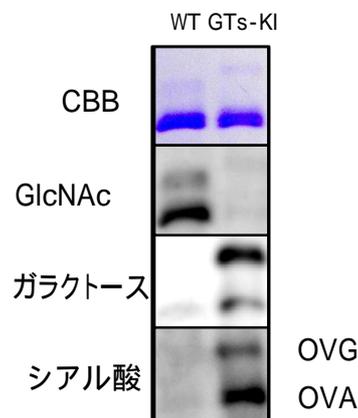


図 5 糖転移酵素発現による内在タンパク質の糖鎖修飾変化

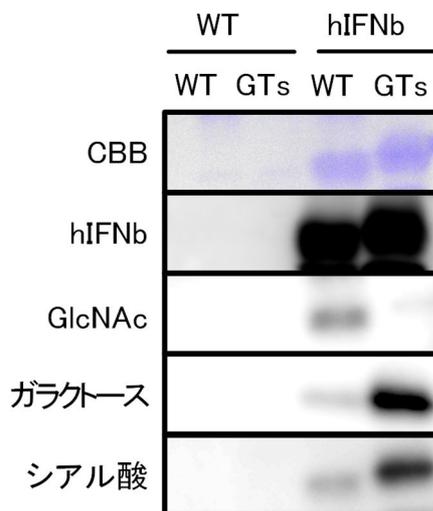


図 6 糖転移酵素発現による外来タンパク質(hIFNb)の糖鎖修飾変化

ル酸が付加された **hIFN- γ** が **GTs** トランスジェニックニワトリの卵白に含まれていることを示している。

さらに、液体クロマトグラフィー質量分析 (**LC-MS**) による糖鎖構造解析を行った。その結果、**WT** の **hIFN- γ** では複合型の **N-グリカン** が多く見られ、その一部は末端にシアル酸を含んでいた。対照的に、**GTs-hIFN- γ** **KI** の **hIFN- γ** では、すべての複合型 **N-グリカン** が末端にシアル酸を含んでいた。これにより、**GTs-hIFN- γ** **KI** ニワトリが産む **hIFN- γ** には、ヒト型糖鎖が完全に付加されていることが確認された。また、**hIFN- γ** /**WT** と **hIFN- γ** /**GTs** のレポーターアッセイを行い、各サンプルの **1/EC50** を計算した。**hIFN- γ** /**WT** から得られた **hIFN- γ** の **1/EC50** は **hIFN- γ** /**GTs** のそれよりも **1.2** 倍高く、糖転移酵素を発現したトランスジェニックニワトリから得られた **hIFN- γ** は、機能が向上していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大石 勲 迎武紘
2. 発表標題 ゲノム編集ニワトリとその産業利用
3. 学会等名 日本食品科学工学会第70回記念大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 迎 武紘、吉井 京子、大石 勲
2. 発表標題 遺伝子組換えニワトリにより生産されたモノクローナルIgG抗体の精製工程と糖鎖構造の評価
3. 学会等名 日本薬学会第144回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 迎武紘
2. 発表標題 ゲノム編集ニワトリ由来IgG抗体を用いた低コスト抗原検出技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	迎 武紘 (MUKAE TAKEHIRO) (40803309)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------