

# 遺伝子導入鳥類の卵中への有用蛋白質生産技術の開発

研究成果活用プラザ東海における育成研究 平成14年度採択課題  
「遺伝子導入鳥類の卵中への有用蛋白質生産技術の開発」

代表研究者：〔国立大学法人名古屋大学 大学院工学研究科・  
化学生物工学専攻 教授 飯島信司〕



遺伝子導入(トランスジェニック)ニワトリによる治療用抗体などバイオ医薬品の生産は新しい製造技術として注目を集めている。我々は、遺伝子治療用に用いられるレトロウイルスベクターの感染時期を調節することにより、世界に先駆けて卵中に高濃度の抗体等を生産するトランスジェニックニワトリを作製することに成功した。

## ■ 研究内容、研究成果

遺伝子導入ニワトリ(トランスジェニックニワトリ)技術を用いて、治療用抗体などバイオ医薬品を卵白や卵黄に生産する技術は次世代の生産技術としての期待が大きい。また、トランスジェニック動物としては牛や羊が先行しているが、プリオンの問題もあり、この点を克服できるシステムとして近年、トランスジェニックニワトリの開発競争が熾烈を極めていく。ニワトリではマウスに見られるようなES細胞の利用が難しく、また卵子の採取も難しい。そこで我々は確実に外来遺伝子を導入し、安定に保持させるために、遺伝子治療などに用いるレトロウイルスを利用し受精卵に直接遺伝子を導入した(図1)。しかしながら、レトロウイルスベクターで導入した遺伝子は一般的に不活化され目的の遺伝子産物がほとんど生産されない。我々はレトロウイルスベクターを卵に感染させる時期を遅らせ、2日程度孵卵した後に導入すると遺伝子が不活化されないことを発見し(図2)、卵1個あたり0.2gという大量のモデル一本鎖抗体を生産できることを示した(図3)。これは現在まで報告された中でも圧倒的な生産量である。しかしこのニワトリ個体はウイルスベクターを胚に感染させたものであり(G<sub>0</sub>キメラ) 体中のすべての細胞に均一に遺伝子が導入されているわけでないため、このままでは安全性や生産の安定性が求められるバイオ医薬品の生産手段としては問題がある。そこで本研究ではこれをさらに発展させ、まず体中に均一に遺伝子を持つトランスジェニック子孫が獲得できることを示した(図4)。このため通常メスのニワトリとオスG<sub>0</sub>キメラをかけあわせて子孫を得たが、約30羽に1羽が導入遺伝子を保持していた。これはG<sub>0</sub>キメラの精子の約3%が導入遺伝子を含んでいるという結果と一致する。また、トランスジェニック子孫では、1または2コピーの遺伝子が染色体に組み込まれており安定にモデル抗体を生産していた。生産された抗体も動物培養細胞等で生産されたものとまったく同等であり生物活性を有していた。さらにその2代後の子孫まで検定したが、遺伝子は安定に保持されモデル一本鎖抗体が効率的に生産できた。次に、実際の治療用抗体として用いられる天然型の二本鎖抗体を生産する方法について検討した。二本鎖抗体では、抗体重鎖、軽鎖に対応して遺伝子が2本あるためこれらを同時に導入し、同レベルで重鎖、軽鎖タンパクを生産するという技術的問題がある。我々はこの点を克服するため、内部リボソーム結合部位配列という特殊なDNA配列を利用して2本の遺伝子を連結してベクターに組込んだ。このウイルスベクターを用いて抗CD2二本鎖抗体を卵1個あたり約1mg生産することに成功した。他の抗体でも検討したが生産量はモデル一本鎖抗体の十から百分の一程度であり、高生産に向けて今後の技術改良が必要である。

## ■ 今後の展開、将来の展望

基本的に抗体を含む種々のタンパク質を安定に生産できることが明らかとなったが、事業化に向けてさらに生産

量の向上、また医薬品の薬効や血中半減期を支配するタンパク質の糖鎖修飾の解析、改良、また卵白や卵黄から効率的に生産物を回収する方法の開発を進める必要がある。現在、数年以内の事業化をめざし、これらの研究を行うとともに、国内外を通して本技術のPRをはかっており、実用化をめざした共同研究も開始しつつある。また生産設備の導入や組換え生物由来の医薬・動物薬生産の規制対応のための生産システムのSPF(specific pathgen free)化、さらにそれに伴う作業基準のマニュアル化等を行いつつある。さらに一部抵触特許の実施許諾の取得も進めている。

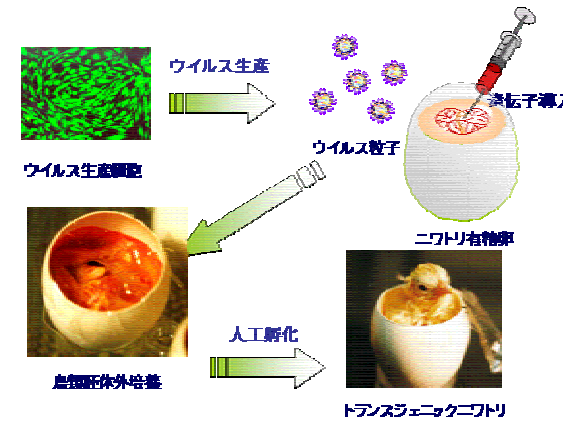


図1 レトロウイルスベクターを用いたトランスジェニックニワトリ作成法

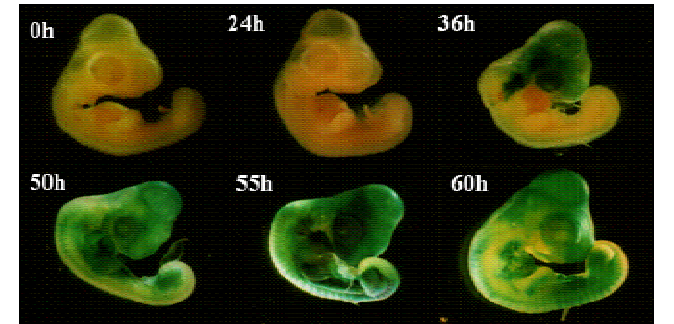


図2 感染時期の調節によるレトロウイルス不活化の回避。孵卵55時間以降に感染させると遺伝子産物(緑色)が生産される。

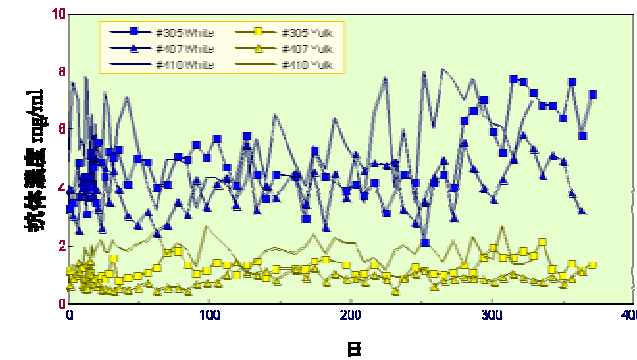


図3 G<sub>0</sub>キメラによる一本鎖抗体の長期安定生産



図4 一本鎖抗体を生産するトランスジェニックニワトリ

## ■ 研究体制

- ◆ 代表研究者  
〔国立大学法人名古屋大学 大学院工学研究科・化学生物工学専攻 教授 飯島信司〕
- ◆ 研究者  
小松弘幸(独立行政法人科学技術振興機構)、木学量子(独立行政法人科学技術振興機構)、上平正道(国立大学法人名古屋大学)、三宅克英(国立大学法人名古屋大学)、西島謙一(国立大学法人名古屋大学)、中井孝尚(株式会社カネカ)、山下 敬(株式会社カネカ)、進藤卓也(株式会社カネカ)、京極健司(株式会社カネカ)、渡邊裕幸(株式会社カネカ)
- ◆ 共同研究機関  
国立大学法人名古屋大学  
株式会社カネカ

## ■ 研究期間

平成15年3月 ~ 平成17年9月