

ニワトリ遺伝子組換えによる 有用蛋白質大量生産技術の試み

研究責任者：

大石勲（（独）産業技術総合研究所 健康工学研究部門
主任研究員）

コーディネータ：

堀野裕治（（独）産業技術総合研究所 関西センター 関西産
学官連携センター イノベーションコーディネーター）

研究背景: 蛋白質生産技術の必要性

産業用蛋白質需要の拡大

- ・抗体医薬などバイオ医薬品で顕著

生産コストが大きな課題

- ・培養細胞を用いる生産技術に起因

革新技术による蛋白質生産必要

- ・培養細胞を用いない蛋白質生産法が望まれる

組換え生物を用いた蛋白質生産(動物工場、植物工場などのバイオリアクター技術)に期待が寄せられる

ニワトリ遺伝子組み換えによる卵白への有用蛋白質生産技術の開発目指す(金の卵を産むニワトリの開発)



研究背景：組換えニワトリ遺伝子発現の課題

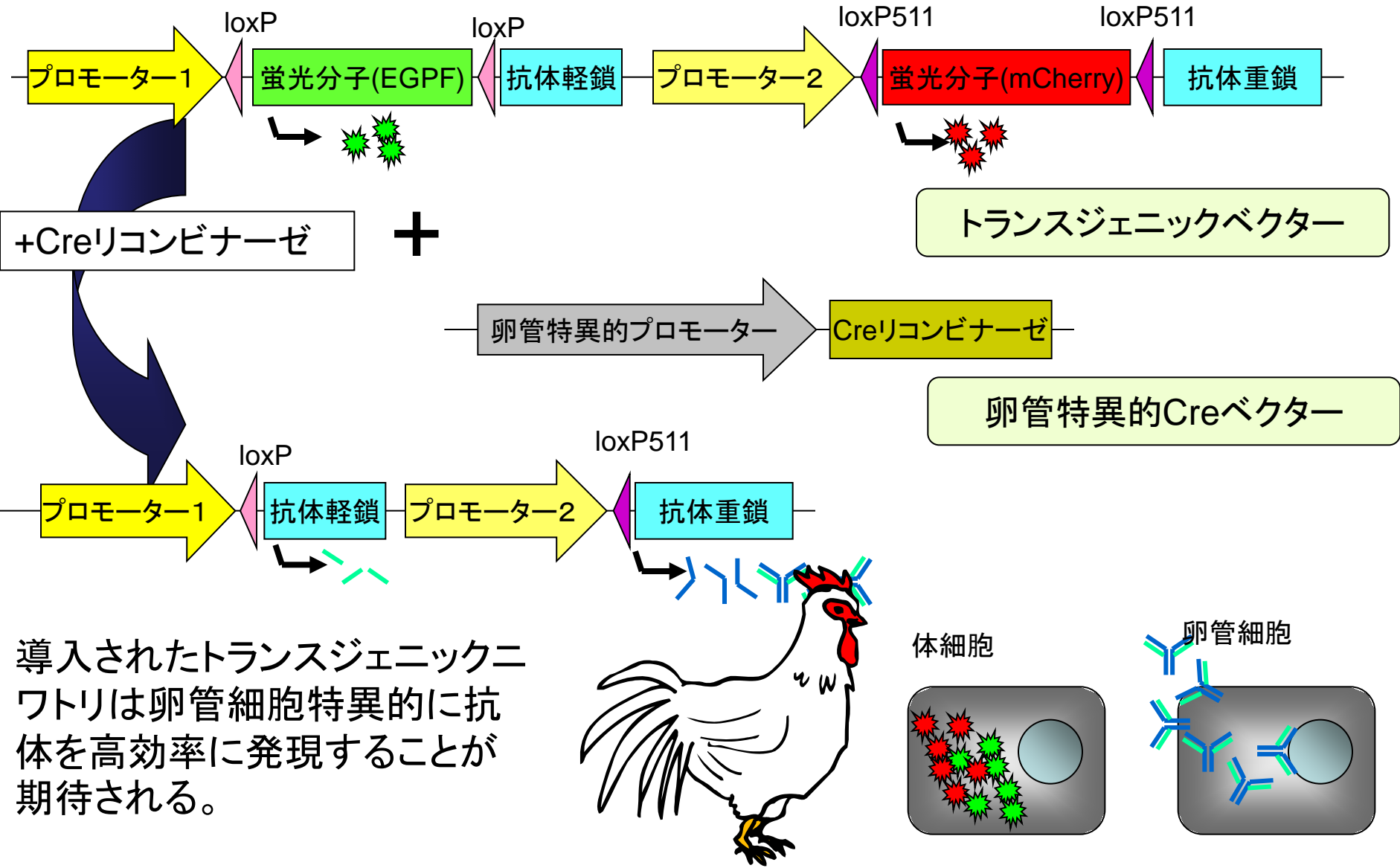
ニワトリの発生や健康を損なわずに高効率に有用蛋白質を鶏卵中に発現誘導することが求められる。

従来技術	利点	問題点
汎用プロモーターによる発現誘導	高効率な遺伝子発現誘導	全身で発現する為、遺伝子によってはニワトリに害を及ぼす可能性
オボアルブミンプロモーターによる発現誘導	卵管特異的な遺伝子発現 個体に害を及ぼす可能性が比較的低い	発現効率低い

➡ 「オボアルブミンプロモーター」の卵管特異性と
「汎用プロモーター」の高い発現効率の
「組み合わせ」により卵管特異的高発現を目指す
特に需要の高いヒト抗体(トラスツズマブ)をモデルに発現系を開発

研究開発成果

卵管特異的抗体分子高発現系のデザイン



トランスジェニックベクター

卵管特異的Creベクター

導入されたトランスジェニックニワトリは卵管細胞特異的に抗体を高効率に発現することが期待される。

体細胞

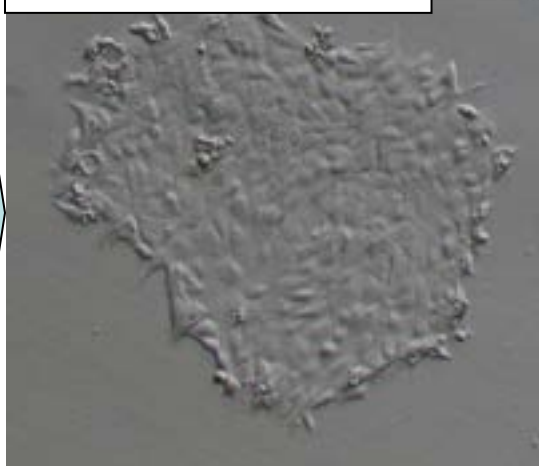
卵管細胞

卵管細胞におけるヒトモノクローナル抗体発現

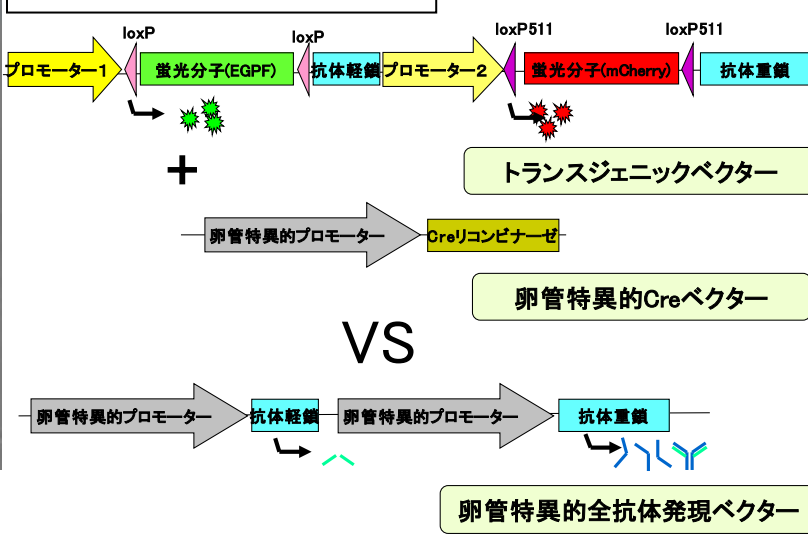
ニワトリ卵管組織



卵管初代培養細胞

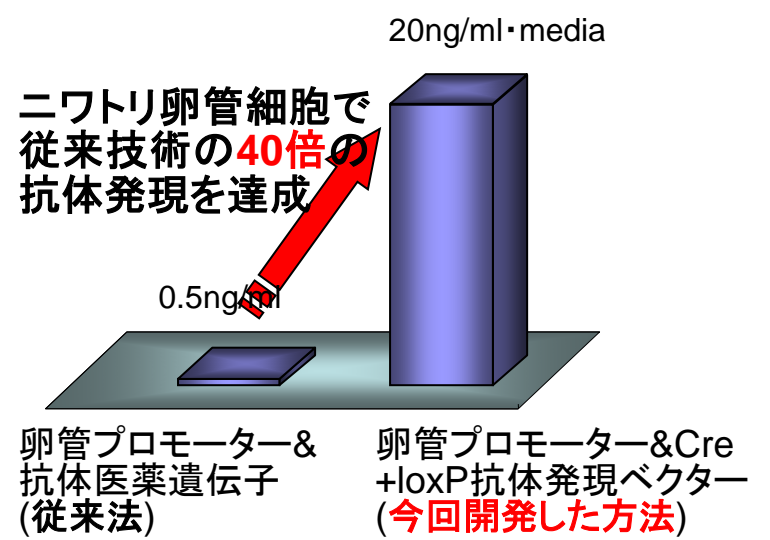


発現系遺伝子導入



ヒトモノクローナル抗体の検出

		今回の方法		従来法	
		1	2	3	4
Culture sup. Blot: a-hlgG					
導入遺伝子	Tg Vector	+	+	+	+
	Ova2.8k-Cre		+		
	Ova2.8k-hlgG			+	
	CMV-Cre				+



始原生殖細胞を用いたニワトリ遺伝子組換え

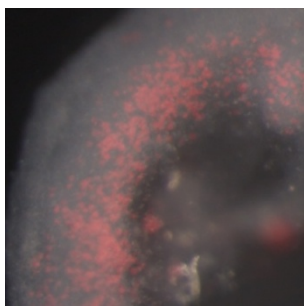
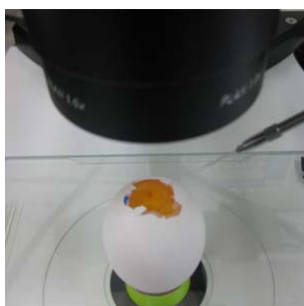
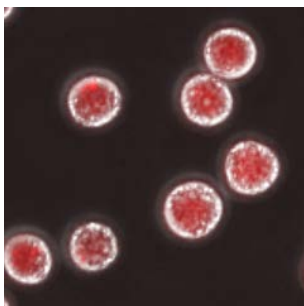
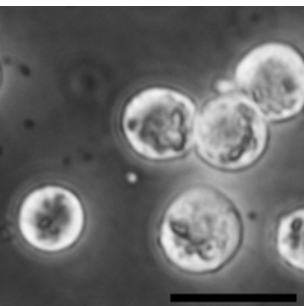
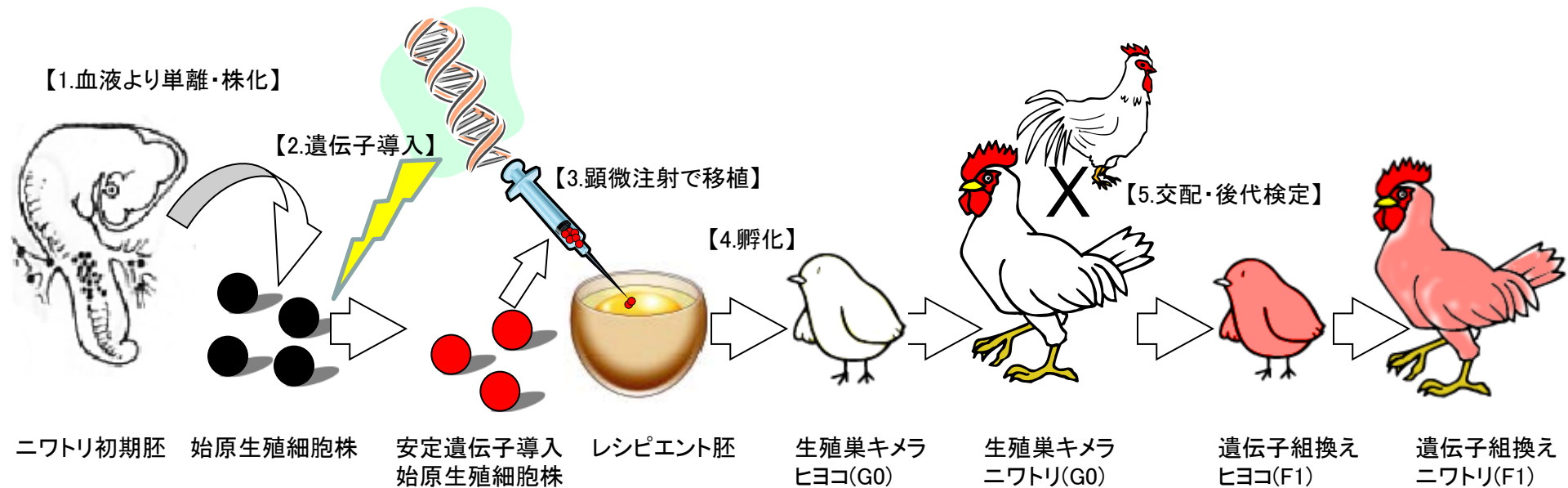
【1.血液より単離・株化】

【2.遺伝子導入】

【3.顕微注射で移植】

【4.孵化】

【5.交配・後代検定】



WT キメラニワトリ精液 PC 精液 #9 #10 #11 #12 #13
inCherry

【1.ニワトリ始原生殖細胞株】

【2.安定遺伝子導入】

【3.顕微注射】

【3.移植細胞の生殖腺への局在(7日胚)】

【4.生殖巣キメラヒヨコ孵化】

【5.生殖巣キメラニワトリ】

①始原生殖細胞株を樹立し、②安定遺伝子導入技術を開発し、③生殖巣キメラヒヨコ4種類12系統を樹立し、④7系統の精液中に移植細胞由来のゲノムDNAの存在を認めた。

新技術の特徴、従来技術・競合技術との比較

	新技術 卵管特異的組換え 遺伝子発現系	従来技術 汎用プロモーター 遺伝子発現系	従来技術 オボアルブミンプロモーター 遺伝子発現系
卵管組織 特異性	◎ 卵管細胞特異的	× なし 全身性	◎ 卵管細胞特異的
発現抗体 や蛋白質 の自由度	◎ 自由度高い	△ 発生過程で障害性のある ものは困難	◎ 自由度高い
発現効率	◎ 高い(汎用プロモーターを 使用)	◎ 高い(200mg/卵の例あり)	△ 限定的(3mg/卵の例あり)
発現系	△ 複雑、大型(10kb超)、2 系統発現必要	◎ 単純、小型(10kb以内)	◎ 単純、小型(10kb以内)
生殖系列 への導入	△ ウイルスベクター困難 細胞ベースの組換え必要	○ ウイルスベクターで可能	○ ウイルスベクターで可能

想定される用途

生産コストの高い高品位蛋白質生産に適用することで**生産コスト削減**のメリットが大きいと考えられる。

- 抗体医薬などバイオ医薬品、診断薬の生産、研究開発
- 安価なバイオシミラー抗体医薬品の生産
- 動物用バイオ医薬品の生産、研究開発
- 機能性化粧品素材など工業用蛋白質生産
- 経口ワクチンの生産 など

実用化に向けた課題

継続中課題

- ・発現制御系の最適化
- ・始原生殖細胞を用いた組換えニワトリの樹立
- ・組換えニワトリ卵由来有用蛋白質生産の検証
- ・特にヒト抗体医薬(トラスツズマブ)をモデルとした、収量、機能特性、発現の安定性、安全性の検討

新規課題

- ・組換えニワトリ生産の高効率化研究

平成24年度A-STEP探索タイプで採択

課題名:「鶏卵バイオリクター化を目指したニワトリ生殖巣キメラ率改善技術開発」

本技術に関する知的財産権

- ・ 発明の名称 : 鳥類卵管細胞を用いた抗体製造方法
 - ・ 出願番号 : 特開2011-010598
 - ・ 出願人 : 独立行政法人産業技術総合研究所
 - ・ 発明者 : 大石勲
-
- ・ 発明の名称 : 鳥類始原生殖細胞に遺伝子を導入する方法
 - ・ 出願番号 : 特開2011-234642
 - ・ 出願人 : 独立行政法人産業技術総合研究所
 - ・ 発明者 : 大石勲、吉井京子

想定される技術移転

技術の優位性と課題

- ・培養細胞を用いた蛋白質生産は大型の培養プラントの構築、管理を含め高コストであり、1グラム当たりの生産コストは1～10万円程度とされている。
- ・遺伝子組換え動物を用いた場合1グラム当たり100円前後と想定されており生産コスト課題を解決する上で魅力のある選択肢といえる。
- ・特にニワトリは大型家畜よりも短期間、小スペースで飼育可能なため、産業用組換え個体として期待される。
- ・一方、鳥類は哺乳動物と比較して組換え技術が大きく遅れており、本課題でも抗体医薬生産ニワトリの樹立は継続課題となっている。

企業への期待

1. 製薬、化学、化粧品企業

企業ニーズのある分泌性蛋白質の大量生産に関する共同研究・技術移転（特に、スポットで大量に必要とされる蛋白質ではなく、長期間に渡り需要が見込まれる蛋白質が望ましい）

2. 製薬企業

モデル蛋白質として先行開発しているトラスツズマブ生産ニワトリを使用した共同研究・技術移転

お問い合わせ先

大石 勲

独立行政法人産業技術総合研究所

健康工学研究部門

大阪府池田市緑丘1-8-31

e-mail: oishi-i@aist.go.jp