

研究課題名	鶏卵アレルギー除去卵の作出
フリガナ	ミズシマ シュウセイ
代表者名	水島 秀成
所属機関 (機関名) (役職名)	北海道大学大学院理学研究院生物科学部門 助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	学会発表 The role of inositol-trisphosphate receptors during egg activation in Japanese quail. The 2nd International Conference on Tropical Animal Science and Production 2019. July 9-12, 2019. Suranaree University of Technology, Thailand. * Award for the best poster presentation to S. Mizushima.

## 研究結果要約

本研究課題では、鶏卵アレルギー物質であるオボアルブミン、オボムコイド、オボトランスフェリンを欠損したノックアウトウズラを CRISPR/Cas9 システムを用いて創出することを目的とした。

それぞれの遺伝子の翻訳開始地点近傍に gRNA を設計し、*in vitro* 転写システムによりそれぞれの gRNA ならびに Cas9 mRNA を合成した。排卵直後のウズラ卵に精子を直接注入（顕微授精）することにより、または自然交配により卵管から得られた 1 細胞期受精卵に、3 つの遺伝子を標的とした gRNA および Cas9 mRNA を顕微注入し、卵培養を行った。一部の初期胚から DNA を注入し、塩基配列の編集を確認したところ、同一個体の全ての遺伝子に 1-5 塩基の欠損が確認され、更にはホモでゲノム編集が施されていた。しかしながら、全ての個体が孵化直前で死亡する結果となった。コントロール群と比較して、死亡した胚の重量は約 5 割減少しており、特に頭部および胸筋の形成に異常が生じていた。またコントロール胚の脳および筋肉における mRNA 発現を解析した結果、オボアルブミンとオボトランスフェリンが両方に、オボムコイドは脳において発現していることが判

明した。本研究から、オボアルブミン、オボムコイド、オボトランスフェリンは、脳や筋肉の形成・発達に必要な遺伝子であり、3つの遺伝子をノックアウトしたウズラ個体は致死になることが分かった。

## 研究目的

鶏卵は、理想的な栄養価を持つ食品として我々の暮らしの中で最も身近な食材のひとつであり、またマヨネーズやパン等の加工用食材としても重要である。一方で、同時に食物アレルギーの原因第1位に挙げられるほど、アレルゲンとしての活性が強いことも知られている。特に1歳以下のアレルギー患者の約半数が鶏卵アレルギーを持っていると言われている。またインフルエンザや麻疹等のワクチン生産にも鶏卵は用いられており、その接種の際にもアレルゲンのコンタミネーションが問題となっている。

哺乳類では、顕微授精や1細胞期受精卵への顕微注入技術が産業として成り立つようになり、現在においては、CRISPR/Cas9やTALENシステムを介した遺伝子ノックアウトマウスの作出が相次いで報告されている。このような人為的に受精卵をつくる、1細胞期で遺伝子に変異を加える技術の確立は、鶏卵アレルゲン物質を欠損させたあるいは変異させた鶏卵の大量生産を行う上で、大きなアドバンテージを有しており、しかも1世代でそれを達成できる点において理想的である。もし確実にゲノム編集を鳥類で行うことができれば、アレルゲン除去卵の大量生産、そして低アレルゲン卵での"ワクチン生産"にも繋がるだけでなく、ノックイン技術の応用は、卵白への有用タンパク質（ヒト臨床用抗体など）の大量分泌、すなわち"鶏卵バイオリクター"にも対応可能であり、医薬、飲食品産業における新技術・新分野の構築に対しても多大な貢献が期待できる。これまでに鳥類ではTALENやCRISPR/Cas9を利用した培養始原生殖細胞（PGCs）における遺伝子のノックアウト技術が確立されてきたが、PGCsをレシピエントに移植する生殖系列キメラ作出を介した遺伝子ノックアウト個体の作出には2-3世代に渡る継代飼育が必要であることから、時間的なロスがあるとともに、雌型PGCsの培養が極めて困難であるというデメリットが存在するため<sup>1)</sup>、これらの事象は、特に雌の遺伝子機能の解析を行う上で非常に不利となる。

そこで本研究課題では、我々がこれまでに確立してきた単一精子を用いた鳥類顕微授精技術<sup>2)</sup>を応用して、鶏卵アレルギー物質であるオボアルブミン (OVA)、オボムコイド (OVM)、オボトランスフェリン (OTF) の 3 つの遺伝子を、1 世代でノックアウトしたウズラを作出すること目標とした。

## 研究計画及び研究手法

本研究では、まずウズラにおける OVA、OVM および OTF に関する基礎情報が不十分であったため、性成熟に達した雌ウズラの卵管を材料にして、それぞれの遺伝子発現に関する基礎解析を行った。基礎解析後、それぞれの遺伝子に対して、CRISPR/Cas9 による標的配列を決定・gRNA を合成し、*in vitro* による gRNA の切断活性試験を実施した。次いで顕微授精法 (ICSI) により、または卵管から採取した 1 細胞期受精卵に、Cas9 mRNA とともにそれらの gRNA を同時にまたは単一の gRNA のみを投与し、投与卵の体外培養を行った。しかしながら、ほぼ全ての投与卵は孵化直前で死亡する結果となったため、当初の計画であったノックアウト雌ウズラの卵白特性評価を行うことができなかった。従って、なぜノックアウトウズラ胚は孵化できなかったのか、その原因を調査するため、OVA、OVM および OTF のノックアウト胚における発現解析等を実施した。

## OVA、OVM および OTF 遺伝子の卵管における発現解析

ウズラにおける OVA、OVM および OTF に関する基礎情報が不十分であるため、まずは性成熟に達した雌ウズラの卵管を材料に、それぞれの遺伝子に対する cDNA クローニングを行い、それより得られた配列からアミノ酸の 1 次構造を決定するとともに、ニワトリを抗原として作製された市販の抗体を用いてウェスタンブロッティング法および免疫組織科学的手法を用いた解析を行った。またエライザキット (Fastkit エライザ Ver.III) を用いて、ウズラ卵白の反応性を確認した。

## OVA、OVM および OTF 遺伝子の gRNA の設計

上述より得られた cDNA の塩基配列をもとに、シグナルペプチド近傍に gRNA の標的配列を設計

し、T7 プロモーターおよびその下流にそれぞれの遺伝子の標的配列を組み込んだ gRNA 発現ベクターを構築した。次いで T7 ribomax large scale RNA production system kit (Promega)を用いて、gRNA の合成を行った。また作成した gRNA の切断活性を調べるために、コールドショック発現系による Cas9 リコンビナントタンパク質を作製した。

### **OVA、OVM および OTF 遺伝子のノックアウトウズラの作出**

gRNA 投与予定である 1 細胞期ウズラ受精卵を作出するために、卵管漏斗部または卵管膨大部より排卵直後の卵を採取し、ウズラの精子由来受精ファクターであるホスホリパーゼ C ゼータ、クエン酸合成酵素およびアコニット酸ヒドラターゼの cRNA を単一射出精子とともに ICSI、または精子侵入直後の体内受精卵を卵管から採取し、2 時間の体外培養を行った<sup>2)</sup>。培養卵の卵細胞質に gRNA と pTnT ベクターより転写して得られた Cas9 mRNA を投与し、22 時間の追加体外培養を行った。その後卵白を用いたシステム II および III 培養<sup>3)</sup>を駆使して卵殻培養を行った。

### **ノックアウトウズラの解析**

死亡した胚の重量計測を行い、脳・肝臓・筋肉のサンプリングを行った。脳と筋肉はウェスタンブロットティングおよびエライザ法に供し、肝臓は gRNA によるゲノムの切断活性を確認するために、DNA 抽出を行った後、OVA、OVM、OTF 特異的なプライマーを用いた PCR およびシーケンス解析を実施した。

### **OVA、OVM および OTF 遺伝子の mRNA 発現解析**

シーケンス解析により変異が見られ、且つ死亡時に頭部や胸筋の表現型に異常を呈した個体から total RNA およびタンパク質を抽出し、RT-PCR 法により、OVA、OVM、OTF の遺伝子発現解析を実施した。

## **結果と考察**

### **ウズラ卵管における OVA、OVM および OTF 遺伝子の発現解析**

OVA、OVM、OTF cDNA の塩基配列を決定したところ、それぞれ 1,152、633、2,115 bp の ORF 全長配列が含まれていた。それらの配列をニワトリと比較すると 93.5、88.6、92.7%の相同性があった。また得られた塩基配列から予測されるアミノ酸をニワトリと比較すると、OVA は 3 アミノ酸、OTF は 1 アミノ酸分短いことが分かり、それぞれ 384、311、705 残基から構成されていた。またニワトリとの相同性は、OVA、OVM、OTF はそれぞれ 87.8、76.7 および 88.9%を示し、予想よりも低いことが分かったが、分泌シグナル、リン酸化やジスルフィド結合に必須なアミノ酸残基は保存されていた。またエライザキットを用いて、卵白成分に含まれるアレルゲン量の計測を試みたが、同タンパク質量のニワトリ卵白と比較すると反応率が 1/8 に落ちることが分かった。またウズラ由来の OVA、OVM、OTF のリコンビナントタンパク質を合成し、エライザ測定に供したところ、全てのサンプルにおいて計測が可能であった。一方で、SDS-PAGE および CBB 染色で卵白成分の比較を行ったが、それぞれのバンドの濃さに顕著な違いは見られなかった。

またニワトリを抗原に作出された抗 OVA、抗 OVM、抗 OTF 抗体を用いて、ウェスタンブロッティング解析を行ったところ、卵白および卵管において、それぞれ 50k、40k および 90 kDa にバンドが検出された。さらに放卵直後の雌ウズラの卵管膨大部を採取後、パラフィン切片を作製し、免疫組織化学解析を行ったところ、OVA、OVM および OTF とともに上皮細胞で強いシグナルが観察され、ほぼ全ての上皮細胞で均一にその発現が認められた。

以上の結果から、鶏卵アレルゲン物質である OVA、OVM および OTF は、ウズラ卵白中にニワトリとほぼ同量で含有されていることが予想されるが、ニワトリとアミノ酸レベルでの相同性が低いだけでなく、またエライザによる抗体との反応性も低いことから、ニワトリ卵白に対するアナフェラキシー症候を呈する患者には、食料としてだけでなくワクチンの生産・摂取にウズラ卵を利用することが有効であるかもしれない。

### **OVA、OVM、OTF 遺伝子のトリプルノックアウトウズラの作出**

OVA、OVM および OTF 遺伝子配列に特異的な gRNA を設計し、PCR 産物の切断を基盤とした *in vitro* 系の実験を試みたところ、全ての gRNA にその活性が確認された。これまでに鳥類では、

TALEN や CRISPR/Cas9 システムを用いて複数の遺伝子配列を編集した報告は見られなかったが、本研究では一度に 3 つの遺伝子編集が可能であることが分かった。1 細胞期に gRNA と Cas9 mRNA を投与し、24 時間後の胚盤葉ステージ X (放卵時の胚発生ステージ) でゲノム解析したところ、OVA は 1-4 bp、OVM は 1-5 bp、OVF は 1-3 bp の欠損が確認されるとともに、intact の配列が検出されなかったことから、1 細胞期においてホモでの編集が施されたことが予想される。gRNA を投与した卵の中で 15 個体が孵化直前 (孵卵 17 日) までの発生を示し、漿尿膜を破る行動が確認されたが、全ての個体が死亡した。一方、Cas9 mRNA のみを投与した胚の一部は孵化できることが分かった。非常に興味深いことに、Cas9 mRNA を投与した、あるいは未処理の体外培養のみを行った孵化直前の胚 (5.06g) と比較して (コントロール)、死亡したゲノム編集胚の重量 (2.56g) が約 50%減少していた。解剖を行った結果、胸筋の発達が著しく悪いことが分かり、また頭皮の一部が形成されず、脳がむき出しになったサンプルも観察された。死亡した胚は全ての遺伝子に変異が観察された。

### **OVA、OVM、OTF 遺伝子トリプルノックアウトウズラの発現解析**

OVA、OVM、OTF 遺伝子は、鶏卵アレルギー物質としての名を馳せているが、実際の遺伝子機能についてはよく知られていないのが現状である。そこで本研究では、OVA、OVM、OTF 遺伝子の主要な臓器における mRNA 発現およびタンパク質発現解析を実施した。

未処理の孵化直前の胚から脳、肝臓、中腎、筋肉から total RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った結果、OVA、OTF の mRNA 発現が全ての臓器で確認されたが、OVM は脳と肝臓で観察された。また脳および筋肉からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング解析を行ったところ、OVA、OVM は全ての臓器で観察されたが、OVM は脳でのみで検出された。一方、孵化直前で死亡したゲノム編集胚の脳および筋肉のサンプルでは、全てのタンパク質発現は認められず、エライザ法を用いても同様に検出以下であった。

また OVA、OVM、OTF 遺伝子の gRNA をそれぞれ単独で投与し、発生を確認したところ、全ての個体が孵化しなかった。孵卵 17 日における OVA、OVM、OTF ノックアウト胚の重量は、コントロール群と比較して、48% (2.62g)、20% (4.00g) および 47% (2.65g) の減少が認められ、OVA、

OVM gRNA 処理群では、筋肉の発達に顕著な遅れが認められた。

以上の結果から OVA、OVM、OTF 遺伝子をゲノム編集によって遺伝子機能を欠失させると、ウズラ胚の脳や筋肉を中心に臓器の発育不全が生じることが分かった。特に OVA および ORF をそれぞれノックアウトしたウズラにおいても同様な発育障害が生じていることから、OVA、OTF はウズラ胚の成長に必須な遺伝子であると考えられる。胚発生段階における卵黄中のオボアルブミンの含有量は、孵卵 10 日以降に急激に増加することから<sup>4)</sup>、オボアルブミンを含めた卵白成分が、卵黄吸収を通して、胚への栄養源として供給されている可能性が高い。一方、卵黄への蓄積が孵卵 12 日をピークにその後減少すること、また本研究から孵卵 12 日以降の胚において OVA、OTF の mRNA およびタンパク質発現が確認された事象を鑑みると、臓器発達に不足分の OVA、OVM を胚自身が生産し、その補填に充てていると考えられる。オボアルブミンやオボトランスフェリンの機能については、現在もなお不明な部分が多いが、我々の研究から、卵管内精子貯蔵間に存在する精子の長生き効果など<sup>5)</sup>、新規な機能も見つかっていることから、これまでに見つかっていない臓器形成・維持に関する分子シグナリングの発見につながる可能性が高い。一方、オボムコイドをノックアウトしたウズラ胚では脳形成異常や胸筋発達不全等の表現系は示さなかったが、明らかな胚重量の減少が確認された。CRISPR/Cas9 システムによって OVM をノックアウトしたニワトリ個体は正常に孵化する報告があるため<sup>1)</sup>、この矛盾点については現段階では不明であるが、本来のプロテアーゼインヒビターとしての機能以外にも、新規な機能が潜んでいる可能性が高い。

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いて 3 つの遺伝子変異を同時に誘導できることが分かり、OVA、OVM、OTF の新規遺伝子機能を示唆するデータを構築することができた。当初の計画であったノックアウト雌ウズラの卵白特性評価を行うことができなかったが、この評価を行うためには、卵管特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域の配列を用いたコンディショナルノックアウト個体を作成する必要があることが分かった。想定外の結果も含まれたが、今後はノックアウトサンプル例を増やすとともに、臓器形成に対する OVA、OVM、OTF の機能を追求し、それより得られた成果を学会発表および論文としてまとめる予定である。

今後の研究活動について

本研究から、OVA、OVM、OTF の遺伝子の機能に関して新たな知見を得ることができた。コンディショナルノックアウトウズラを作出するには相当の時間を要するため、これらの遺伝子の臓器形成に関する研究を推進する予定である。

#### 参考文献

- 1) Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, Kagami H, Tagami T. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 2016 Apr; 6:23980.
- 2) Mizushima S, Hiyama G, Shiba K, Inaba K, Dohra H, Ono T, Shimada K, Sasanami T. The birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. *Development.* 2014 Oct;141(19):3799-3806.
- 3) Mizushima S, Matsuzaki M, Sasanami T. Handling of gametes for in vitro insemination in birds. *Methods Mol Biol.* 2017 Aug;1650:243-257.
- 4) Yoshizaki N, Ito Y, Hori H, Saito H, Iwasawa A. Absorption, transportation and digestion of egg white in quail embryos. *Develop Growth Differ.* 2002 Feb;44(1):11-22.
- 5) Matsuzaki M, Mizushima S, Dohra H, Sasanami T. Expression of transferrin and albumin in the sperm-storage tubules of Japanese quail and their possible involvement in long-term sperm storage. *J Poult Sci.* 2020 Jan;57(1):88-96.

以上