

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年3月4日(04.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/023928 A1

- (51) 国際特許分類:
A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/004183
- (22) 国際出願日: 2009年8月27日(27.08.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-223490 2008年9月1日(01.09.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 飯島信司 (IIJIMA, Shinji) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 西島謙一 (NISHIJIMA, Ken-ichi) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 萩野幹治 (HAGINO, Mikiharu); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ1丁目21番地 アネックス・テクノ2 Gifu (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第21条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: TRANSGENIC BIRD AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF, AND METHOD FOR PRODUCTION OF PROTEIN

(54) 発明の名称: トランスジェニック鳥類及びその作製法、並びにタンパク質の生産法

(57) Abstract: Disclosed is a transgenic bird in which a foreign protein having an improved sugar chain structure can be produced in egg white. A gene encoding a protein of interest and a gene encoding β 1,4-galactosyltransferase are introduced into a bird to produce a transgenic bird in which the gene encoding β 1,4-galactosyltransferase can be expressed in an ampulla of a fallopian tube.

(57) 要約: 糖鎖構造が改善された外来タンパク質を卵白中へ産生するトランスジェニック鳥類を提供する。目的タンパク質をコードする遺伝子と、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を導入し、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子が輸卵管膨大部で発現するトランスジェニック鳥類を得る。



WO 2010/023928 A1

明 細 書

発明の名称：

トランスジェニック鳥類及びその作製法、並びにタンパク質の生産法

技術分野

[0001] 本発明はトランスジェニック鳥類に関する。詳しくは、糖鎖付加型タンパク質の生産に有用なトランスジェニック鳥類、該トランスジェニック鳥類の作製法、及び該トランスジェニック鳥類を用いたタンパク質の生産法に関する。

背景技術

[0002] トランスジェニック動物を用いて医薬品等の有用タンパク質を生産する技術（いわゆる動物工場）の実用化が進められている。ヤギやヒツジなどの大型哺乳動物に比べ、鳥類（特にニワトリやウズラに代表される家禽類）は、性成熟の期間が短いこと、小型で管理が容易なこと、高いタンパク質含量の卵を高頻度で産むことなど、数多くの有利な特徴を有し、次世代の動物工場の主力として期待されている。ニワトリについては、タンパク質へのシアル酸付加パターンがヒトのものに類似するという利点も併せもつ（非特許文献1）。

トランスジェニック鳥類の作製に関して様々な試みが行われている（非特許文献2）。例えば、レトロウイルスベクターを用いて放卵後の胚盤葉期の胚に外来遺伝子を注入する方法（非特許文献3～7）、1細胞期の受精卵の核にDNA等を直接注入する方法（非特許文献8、9）、レンチウイルスベクターを利用した方法（非特許文献10、11）、ES細胞を利用した方法（非特許文献12）等が報告されている。また、トランスジェニック鳥類を用いて医薬用タンパク質の生産に成功したとの報告もある。一方、タンパク質の効率的な生産に向けた技術開発も精力的に行われている（特許文献1、非特許文献13）。また、本発明者らの研究グループは、ヒトエリスロポエチンを高生産するキメラニワトリの作製に成功したことを報告した（非特許文献1

4)。当該キメラニワトリが卵白中に生産するヒトエリスロポエチンは、in vitroにおいて、組換えCHO細胞が生産するヒトエリスロポエチンと同等の活性を示した。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2004/016081号パンフレット

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Raju, T. S et al. Glycobiology 10 (2000) 477-486.

非特許文献2：Sang, H. Mech. Dev. 121 (2004) 1179-1186.

非特許文献3：Bosselman, R. A. et al. Science 243 (1989) 533-535.

非特許文献4：Harvey, A. J. et al. Nat. Biotechnol. 20 (2002) 396-399.

非特許文献5：Mizuarai, S. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 286 (2001) 456-463.

非特許文献6：Rapp, J. C. et al. Transgenic Res. 12 (2003) 569-575.

非特許文献7：Thoraval, P. et al. Transgenic Res. 4 (1995) 369-377.

非特許文献8：Love, J. et al. Biotechnology 12 (1994) 60-63.

非特許文献9：Sherman, A. et al. Nat. Biotechnol. 16 (1998) 1050-1053.

非特許文献10：Chapman, S. C. et al. Development 132 (2005) 935-940.

非特許文献11：McGrew, M. J. et al. EMBO Rep. 5 (2004) 728-733.

非特許文献12：Zhu, L. et al. Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1159-1169.

非特許文献13：Kamihira, M. et al. J. Virol. 79 (2005) 10864-10874.

非特許文献14：Kodama, D. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 367 (2008) 834-839.

非特許文献15：Kawabe, Y. et al. J. Biosci. Bioeng 102 (2006) 297-303.

非特許文献16：Williams, J. Biochem. J. 108 (1968) 57-67.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 医薬品などに用いるタンパク質の多くはO-グリコシル化又はN-グリコシル化などの糖鎖修飾を受けている。これら糖鎖修飾は当該タンパク質の血中半減期や薬効に重要であると考えられている。過去の報告（非特許文献12、非特許文献14）を総合すると、トランスジェニック鳥類の卵白へ特定のタンパク質を生産した場合、グリコシル化が起きにくく、不完全な糖鎖修飾となることが予想される。このような不完全な糖鎖修飾は、タンパク質本来の機能を損なう原因となる。

そこで本発明は、糖鎖構造が改善された外来タンパク質を卵白中に生産するトランスジェニック鳥類及びその作製法、並びに当該トランスジェニック鳥類を利用した有用タンパク質の生産法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 上記課題に鑑み、種々の実験を行った。まず、モデル抗体（scFv-Fc）を生産するトランスジェニックニワトリ及びトランスジェニックウズラを作製し（非特許文献13、非特許文献15）、卵白中に生産された抗体の糖鎖修飾について解析した。その結果、末端シアル酸とその内側のガラクトースを有する糖鎖がほとんどないことが判明した（図7B、図8）。内在性の卵白タンパク質も同様に不完全な糖鎖しか持たないことからすると（図7A、非特許文献16）、このような現象の原因は、卵白タンパク質を生産する組織である輸卵管の特徴にあると考えられた。そこで、輸卵管膨大部における糖鎖付加機構を解析した。その結果、輸卵管膨大部ではガラクトース転移酵素の発現が極めて弱いことが明らかとなった。以上の知見に基づき、望ましい糖鎖修飾を実現することを目的として、輸卵管膨大部でガラクトース転移酵素遺伝子を強制発現させるという戦略を立てた。この戦略の有効性及び実効性を確認すべく、ガラクトース転移酵素遺伝子を導入したトランスジェニックニワトリを作製し、卵白中に生産させた抗体の糖鎖修飾を解析した。解析結果は、ガラクトースが付加されたことを示すものであった。即ち、上記戦略の有効性及び実効性が実験的に確認された。

本発明は、以上の成果及び知見に基づくものであり、次の通りである。

〔１〕 目的タンパク質を卵白中に生産するトランスジェニック鳥類であって、目的タンパク質をコードする遺伝子と、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子とが導入されていることを特徴とするトランスジェニック鳥類。

〔２〕 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子が輸卵管膨大部で発現している、〔１〕に記載のトランスジェニック鳥類。

〔３〕 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子がニワトリ β 1,4-ガラクトース転移酵素１遺伝子である、〔１〕又は〔２〕に記載のトランスジェニック鳥類。

〔４〕 目的タンパク質の天然型が糖鎖付加型タンパク質である、〔１〕～〔３〕のいずれか一項に記載のトランスジェニック鳥類。

〔５〕 目的タンパク質が抗体である、〔１〕～〔４〕のいずれか一項に記載のトランスジェニック鳥類。

〔６〕 （１）～（４）からなる群より選択される方法によって得られるトランスジェニック鳥類又はその子孫である、〔１〕～〔５〕のいずれか一項に記載のトランスジェニック鳥類、

（１）少なくとも片方が、目的タンパク質をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する雌雄二羽の同種鳥類を用意するステップと、該雌雄二羽の同種鳥類を交配して得られた受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に対して β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を導入し、染色体への該遺伝子の挿入を生じさせるステップと、を含む方法、

（２）目的タンパク質をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する鳥類と、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する同種異性鳥類を用意するステップと、該二羽の鳥類を交配して得られた受精卵を孵卵するステップと、を含む方法、

（３）鳥類受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に対して目的タンパク質をコードする遺伝子と β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を導入し、染色体への該二つの遺伝子の挿入を生じさせるステップと、

を含む方法、

(4) 少なくとも片方が、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する雌雄二羽の同種鳥類を用意するステップと、該雌雄二羽の同種鳥類を交配して得られた受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に対して目的タンパク質をコードする遺伝子を導入し、染色体への該遺伝子の挿入を生じさせるステップと、を含む方法。

[7] 遺伝子の導入が、該遺伝子を含む複製能欠失型レトロウイルスベクターのインジェクションによって行われる、[6]に記載のトランスジェニック鳥類。

[8] レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、[7]に記載のトランスジェニック鳥類。

[9] 鳥類がニワトリである、[1]～[8]のいずれか一項に記載のトランスジェニック鳥類。

[10] その片方又は両方の生殖細胞に、目的タンパク質をコードする遺伝子が導入されている雌雄二羽の同種鳥類を用意するステップと、該雌雄二羽の同種鳥類を交配して得られた受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を導入し、染色体への該遺伝子の挿入を生じさせるステップと、を含む、トランスジェニック鳥類の作製法。

[11] 以下の(1)又は(2)の交配を行うことを特徴とする、トランスジェニック鳥類の作製法、

(1) [10]に記載の作製法によって得られた雄トランスジェニック鳥類と、[10]に記載の作製法によって得られた雌トランスジェニック鳥類との交配、

(2) [10]に記載の作製法によって得られたトランスジェニック鳥類と、同種異性の野生型鳥類との交配。

[12] [1]～[9]のいずれか一項に記載のトランスジェニック鳥類の卵白から目的タンパク質を回収することを特徴とする、タンパク質の生産

法。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]ニワトリ糖転移酵素の遺伝子発現解析。ニワトリ各臓器におけるガラクトース転移酵素（A）及びシアル酸転移酵素（B）の発現をリアルタイムRT-PCRにより解析した。発現は、脳での発現を基準として相対的に示した。卵白成分を生産する輸卵管膨大部においてはガラクトース転移酵素GalT1の発現が低いことが示された。輸卵管膨大部ではシアル酸転移酵素のうちST3Gal6の発現が高いことが示された。

[図2]ニワトリガラクトース転移酵素1（GalT1）のタンパク質発現解析。ニワトリ肝臓及び輸卵管膨大部におけるGalT1のタンパク量をマイクロソーム画分のウエスタンブロットにより解析した。GalT1のバンドを矢印で示した。肝臓に比べ輸卵管膨大部でのGalT1タンパク量が低いことが確認された。

[図3]ガラクトース転移酵素強発現トランスジェニックニワトリの作製。（A）遺伝子導入したレトロウイルスベクターの構造を示す。本ベクターコンストラクトでは、アクチンプロモーターにより全身でガラクトース転移酵素（GalT1）を発現することが可能である。LTR：Long terminal repeat、eGFP：enhanced GFP、P β act：ニワトリ β -actin プロモーター、ckGalT1：ニワトリ β 1,4-Galactosyltransferase 1。（B）トランスジェニックニワトリ作製実験の概要。一本鎖抗体生産トランスジェニックニワトリの卵を2.5日間孵卵し、発生を進めた胚（55時間胚）の心臓にウイルスベクターを注入した。5回の導入実験で計164胚に導入し、41羽（25%）のGalT1遺伝子導入キメラニワトリが得られた。

[図4]ガラクトース転移酵素導入ニワトリにおける血中のトランスジェンコピー数の算出。G0世代のガラクトース転移酵素導入キメラニワトリ（メス）の血中における導入ウイルスベクター遺伝子のコピー数を、リアルタイムPCRにて検定した。図3Aに示すウイルスベクターに特異的な配列を認識するプライマーを設計し、解析を行った。WT：非導入個体。

[図5]ガラクトース転移酵素導入ニワトリにおけるGalT1遺伝子のタンパクレ

ベルでの発現解析。輸卵管膨大部でのGalT1の発現をマイクロソーム画分のウエスタンブロットにより解析した。非導入（野生型）、遺伝子導入（＃77、＃78）ニワトリを比較した。GalT1のバンドを矢印で示した。リアルタイムPCRにより測定した導入遺伝子の輸卵管膨大部におけるコピー数を下に示した。輸卵管膨大部での導入コピー数の高い個体（＃77）において遺伝子発現がタンパク質レベルで確認できた。

[図6]ガラクトース転移酵素導入ニワトリの解析。（A）リアルタイムRT-PCRによる輸卵管膨大部での遺伝子発現解析。発現は、非導入（野生型）個体での発現を基準として相対的に示した。非導入（野生型）個体に比べ遺伝子導入個体（＃77、＃78）では、導入したGalT1遺伝子の強発現がmRNAレベルで確認された。一方で、内在性の遺伝子発現（ST6Gal1）には有意な変動は観察されなかった。（B）組織抽出液のマイクロソーム画分におけるガラクトース転移活性の測定。酵素反応の結果生成したN-アセチルラクトサミン（Gal-GlcNAc）のバンドを矢印で示した。非導入個体（野生型）の輸卵管膨大部においてはガラクトース転移酵素活性が検出されないのに対し、遺伝子導入個体（＃77、＃78）においては活性が認められた。

[図7]ニワトリにより生産された内在性卵白タンパク質、及びモデル抗体の糖鎖解析（ガラクトース付加の解析）。ガラクトース特異的レクチン（RCA120）への結合性によって、ガラクトース付加を確認した。（A）内在性タンパク質に結合したガラクトースの解析（RCA120レクチンブロット、上段）。非導入（抗体遺伝子なし及び野生型）個体の卵白タンパク質にはガラクトースが存在しないが、GalT1遺伝子導入個体（＃68、＃72、＃77、＃79、＃82）の卵白タンパク質にはガラクトースの結合が示された。等量のタンパク質が存在することをCBB染色により確認した（下段）。陽性対照として卵黄サンプルを用いた。また、抗体遺伝子、ガラクトース転移酵素遺伝子ともに導入していないニワトリ（抗体遺伝子なし）由来の卵白タンパク質も解析した。（B）卵白より精製したモデル抗体に結合したガラクトースの解析（RCA120レクチンブロット、上段）。非導入（野生型）個体の卵白由来の抗体はRCA120と

全く結合しないのに対し、遺伝子導入個体（#72、#82）の卵白由来の抗体はRCA120と強く結合した。 β -ガラクトシダーゼによりガラクトースを除去したサンプルについても解析した。等量のタンパク質が存在することを抗Fc抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した（下段）。対照として、CHO細胞で生産させたモデル抗体を同様にして解析した。抗体のバンドを矢印で示した。NF：ノイラミニダーゼ、 β Gal： β -ガラクトシダーゼ。

[図8] ガラクトース転移酵素導入ニワトリにより生産されたモデル抗体の糖鎖解析（末端シアル酸の解析1）。 α 2,6結合のシアル酸付加の有無を特異的レクチン（SSA）により確認した（上段）。GalT1遺伝子導入の有無にかかわらず、 α 2,6結合のシアル酸付加を示すバンドは認められなかった。等量のタンパク質が存在することを抗Fc抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した（下段）。卵黄由来の抗体はシアル酸が結合していることが知られることから、比較対照として用いた。（分子量の低下は部分分解による。）また、多量のシアル酸含有糖鎖を含むタンパク質であるトランスフェリンも比較対象とした。

[図9] ガラクトース転移酵素導入ニワトリにより生産されたモデル抗体の等電点電気泳動による解析（末端シアル酸の解析2）。精製した抗体を等電点電気泳動により解析した。シアル酸が結合すると酸性（陽極）側へのシフトが見られる。シアリダーゼ（NF）処理により消失するバンド（矢印）がシアル酸付加抗体のバンドと考えられる。

[図10] ガラクトース転移酵素強発現ヒトエリスロポイエチン生産トランスジェニックニワトリの作製。（A）遺伝子導入したレトロウイルスベクターの構造を示す。本ベクターコンストラクトでは、アクチンプロモーターにより全身でヒトエリスロポイエチンを発現することが可能である。また、IRESの効果により同一のmRNAから同時にガラクトース転移酵素（GalT1）を生産する。LTR：Long terminal repeat、P β act：ニワトリ β -actinプロモーター、hEPO：ヒトエリスロポイエチン、IRES：Internal Ribosome Entry Site、ckGalT1：ニワトリ β 1,4-Galactosyltransferase 1、WPRE：Woodchuck posttran

scriptional element。(B) トランスジェニックニワトリ作製実験の概要。
ニワトリ受精卵を2.5日間孵卵し、発生を進めた胚（55時間胚）の心臓にウイルスベクターを注入した。2回の導入実験で計40胚に導入し、8羽（20%）の遺伝子導入キメラニワトリが得られた。

[図11] 作製したガラクトース転移酵素強発現ヒトエリスロポイエチン生産トランスジェニックニワトリの卵白中に生産されたヒトエリスロポイエチンの解析。（A）抗ヒトエリスロポイエチン抗体を用いたウエスタンブロット法による解析。（B）卵白より精製したヒトエリスロポイエチンに結合したガラクトースの解析（RCA120レクチンブロット）。エリスロポイエチン単独で導入した個体（非特許文献14；GalT1⁻）の卵白由来のエリスロポイエチンはRCA120と全く結合しないのに対し、GalT1遺伝子を同時に導入した個体（GalT1⁺）の卵白由来のエリスロポイエチンはRCA120と強く結合した。NF：ノイラミニダーゼ、 β Gal： β -ガラクトシダーゼ。

発明を実施するための形態

[0008] （トランスジェニック鳥類）

本発明の第1の局面は目的タンパク質を卵白中に生産するトランスジェニック鳥類に関する。本発明のトランスジェニック鳥類には二つの外来遺伝子、即ち目的タンパク質をコードする遺伝子と、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子が導入されている。尚、目的タンパク質をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック鳥類と、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック鳥類との交配によって、同一個体に当該二つの遺伝子が導入されている場合も含む。本明細書では、説明の便宜上、「目的タンパク質をコードする遺伝子」のことを「目的タンパク質遺伝子」、「 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子」のことを「 β 1,4-GalT遺伝子」とも呼ぶ。

[0009] 「目的タンパク質」とは、本発明のトランスジェニック鳥類によって生産することが意図されたタンパク質である。好ましい目的タンパク質は、その天然型が糖鎖付加型のタンパク質である。このようなタンパク質を目的タン

パク質とした場合、本発明のトランスジェニック鳥類によれば、天然型と同一又は天然型に近似した糖鎖構造を有するタンパク質を生産することができる。

一方、目的タンパク質は上記の如きタンパク質に限定されるものではない。本来は糖鎖を有しないタンパク質を目的タンパク質とすれば、糖鎖が付加された改変型タンパク質を生産することが可能である。このように、タンパク質改変の手段としても本発明のトランスジェニック鳥類は有用である。

[0010] その天然型が糖鎖付加型のタンパク質の例を挙げると、抗体、エリスロポエチン、卵胞刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、サイトカインである。ここでの抗体の好ましい形態は天然に広く存在する二本鎖抗体やscFv及びscFv-Fcである。免疫グロブリンIgGの可変領域にはFv (Fragment of variable region) と呼ばれる、VH及びVLのヘテロ二量体からなるドメインがある。このFvドメインはIgGの約5分の1の分子量でありながら、単独で十分な抗原結合能を持つ。VH、VLドメイン間を人工的にペプチドリンカーで結合したものがscFvと呼ばれる低分子抗体である。このscFvにFc領域を連結したものがscFv-Fcである。Fc領域として好ましくはヒトIgGクラス由来のものを使用する。

Powersら (Powers, D. B. ら (2000) J Immunol Method 251, 123) は、scFvにヒトIgG1に由来するFc部を融合させることで、血中での安定性が増すことを見出した。このscFv-Fc抗体は医療用として有望視されている。

抗体の由来（動物種）は特に限定されない。但し、好ましくはヒト型抗体、ヒト抗体又はヒトキメラ抗体である。抗体が認識する抗原も特に限定されない。抗原の例としてCD2、CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD20、CD21、CD34、CD40、CD40L、CD80、HLAクラスII抗原、CD56（NK細胞）、CD86、CD161、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ 、iNKT、プリオンを挙げることができる。

[0011] 本発明のトランスジェニック鳥類は、体細胞にモザイク状に導入遺伝子（即ち、目的タンパク質遺伝子及び β 1, 4-GalT遺伝子）を保有する個体（即ちキメラ）であっても、全身の体細胞に導入遺伝子を保有する個体であっても

よい。また、片方の導入遺伝子に関してのみキメラであってもよい。

[0012] ここで、受精卵に遺伝子導入して得られる鳥類はキメラ個体として成長する。この一世代目の遺伝子導入鳥類をG0トランスジェニックキメラ鳥類と呼ぶ。生殖細胞が導入遺伝子を保有するG0トランスジェニックキメラ鳥類を親とし、全身の体細胞に導入遺伝子を保有する子孫はG1トランスジェニック鳥類と呼ばれる。また、導入遺伝子を受け継ぐ、G1トランスジェニック鳥類の子孫は世代順にG2トランスジェニック鳥類、G3トランスジェニック鳥類、G4トランスジェニック鳥類・・・Gnトランスジェニック鳥類（nは整数）と呼ばれる。

本明細書では、G0トランスジェニックキメラ鳥類及びその子孫（G1トランスジェニック鳥類など）を総称してトランスジェニック鳥類と呼ぶ。

[0013] 鳥類の種は特に限定されない。本発明の鳥類として、ニワトリ、ウズラ、七面鳥、カモ、ダチョウを例示できる。中でもニワトリやウズラは、入手が容易である点、産卵種としても多産である点などから特に好ましい。

[0014] 好ましい一態様では、導入遺伝子である β 1,4-GalT遺伝子が、卵白タンパク質の分泌器官である輸卵管膨大部で発現している。この特徴により、糖鎖構造が改善された目的タンパク質を効率的に卵白中へ分泌させることが可能となる。

[0015] トランスジェニック鳥類の体内において β 1,4-ガラクトース転移活性を示すタンパク質をコードする限り、 β 1,4-GalT遺伝子の種類、配列等は特に限定されない。 β 1,4-GalT遺伝子の例は β 1,4-ガラクトース転移酵素1（GalT1）遺伝子、 β 1,4-ガラクトース転移酵素2（GalT2）遺伝子、 β 1,4-ガラクトース転移酵素3（GalT3）遺伝子である。これらの遺伝子の塩基配列の例を、添付の配列表に示す（ニワトリGalT1遺伝子（配列番号1）、ニワトリGalT2遺伝子（配列番号2）、ニワトリGalT3遺伝子（配列番号3））。尚、これらの塩基配列は一例であり、当該塩基配列と部分的に相違する塩基配列であっても、 β 1,4-ガラクトース転移活性を有するタンパク質をコードする限りにおいて β 1,4-GalT遺伝子として用いることができる。また、ニワトリ以外の

種の遺伝子を用いることにしてもよい。

ニワトリ以外の種の遺伝子の例は、ヒト又はマウスの β 1,4-ガラクトース転移酵素1 (GalT1) 遺伝子、 β 1,4-ガラクトース転移酵素2 (GalT2) 遺伝子、 β 1,4-ガラクトース転移酵素3 (GalT3)、 β 1,4-ガラクトース転移酵素5 (GalT5) である。これらの遺伝子の塩基配列の例を、添付の配列表に示す（ヒト β 1,4-ガラクトース転移酵素1（配列番号4）、ヒト β 1,4-ガラクトース転移酵素2（配列番号5）、ヒト β 1,4-ガラクトース転移酵素3（配列番号6）、ヒト β 1,4-ガラクトース転移酵素5（配列番号7）、マウス β 1,4-ガラクトース転移酵素1（配列番号8）、マウス β 1,4-ガラクトース転移酵素2（配列番号9）、マウス β 1,4-ガラクトース転移酵素3（配列番号10）、マウス β 1,4-ガラクトース転移酵素5（配列番号11））。

[0016] 既述の通り、本発明者らの検討の結果、輸卵管膨大部ではGalT1遺伝子及びGalT2遺伝子の発現量が低いことが明らかとなった。また、GalT1については他の組織に比べて発現量が顕著に低いことが明らかとなった。この知見に鑑み、 β 1,4-GalT遺伝子として、好ましくはGalT1遺伝子又はGalT2遺伝子、更に好ましくはGalT1遺伝子を用いる。尚、二種類以上の β 1,4-GalT遺伝子を併用することにしてもよい。

[0017] 典型的には、本発明のトランスジェニック鳥類は、以下の（1）～（4）のいずれかの方法によって得られるトランスジェニック鳥類又はその子孫である。

（1）少なくとも片方が、目的タンパク質をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する雌雄二羽の同種鳥類を用意するステップと、該雌雄二羽の同種鳥類を交配して得られた受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に対して β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を導入し、染色体への該遺伝子の挿入を生じさせるステップと、を含む方法

（2）目的タンパク質をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する鳥類と、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する同種異性鳥類を用意するステップと、該二羽の鳥類を交配して得られた受精卵を

孵卵するステップと、を含む方法

(3) 鳥類受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に対して目的タンパク質をコードする遺伝子と β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を導入し、染色体への該二つの遺伝子の挿入を生じさせるステップと、を含む方法

(4) 少なくとも片方が、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する雌雄二羽の同種鳥類を用意するステップと、該雌雄二羽の同種鳥類を交配して得られた受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に対して目的タンパク質をコードする遺伝子を導入し、染色体への該遺伝子の挿入を生じさせるステップと、を含む方法

[0018] (1)の方法ではまず、少なくとも片方が目的タンパク質遺伝子を生殖細胞に保有する雌雄二羽の同種鳥類を用意する。ここでの「鳥類」は、目的タンパク質遺伝子を生殖細胞に保有する限り、特に限定されない。目的タンパク質遺伝子に関してキメラ個体であってもよいが、効率的に目的のトランスジェニック鳥類を得るため、G1世代以降のトランスジェニック個体であることが好ましい。G1世代以降のトランスジェニック個体を用いる場合の二羽の組合せを以下の(a)～(c)に示す。

(a) 目的タンパク質遺伝子に関してG1世代以降のトランスジェニックのオスと、同種野生型のメスの組合せ

(b) 目的タンパク質遺伝子に関してG1世代以降のトランスジェニックのオスと、目的タンパク質遺伝子に関してG1世代以降の同種トランスジェニックのメスの組合せ

(c) 目的タンパク質遺伝子に関してG1世代以降のトランスジェニックのメスと、同種野生型のオスの組合せ

尚、本明細書において「野生型」とは、導入遺伝子（上の例では目的タンパク質遺伝子）に関して野生型であること、即ち導入遺伝子が導入されていない個体であることを表す。

[0019] 次に、用意した二羽の同種鳥類を交配して受精卵を得た後、孵卵を開始す

る。孵卵の条件は常法に従えばよく、例えば37.8 °C~39.0 °C、湿度50~70%の条件下、インキュベートする。続いて、形成された初期胚に対して β 1,4-GalT遺伝子を導入し、染色体への該遺伝子の挿入を生じさせる。放卵後の受精卵の初期発生についてニワトリを例にとると、まず輸卵管内で受精した卵は、受精後約1.5時間で卵割を開始する。細胞質がつながったまま盤割が始まった卵は、1日かけて体外に放出される間に分裂し、約6万個の細胞からなる胚盤葉と呼ばれる胚になる（胚盤葉期）。この胚盤葉は、卵黄中央部の直径3~4mmの白いリングとして観察される。この胚は、上層と下層に分裂し、割腔を形成する。放卵は胚盤葉下層が形成される頃に起こり、原条が形成され、胚盤葉は上、中、下の三重構造を取り、三胚葉が形成される。その後、胚の形成、成長を経て、排卵から22日目に孵化する。胚盤葉期はステージXとも呼ばれ、この時期の細胞の一部から生殖細胞が生じることから、従来は遺伝子導入の対象としてこの時期の受精卵を使用している。

[0020] 過去の報告（例えば国際公開第2004/016081号公報）にあるように、放卵直後、胚盤葉期の受精卵を孵化条件（例えばニワトリならば37.8 °C~39.0 °C、湿度50~70%程度の孵化に適した環境条件）においた時間を0時間（孵卵開始時）とした場合、ウズラでは孵卵開始から36時間後、ニワトリでは孵卵開始後43時間頃から卵黄上に血管系の形成が観察され、心臓に分化する器官の脈動が観察できる。そして、この段階以降に遺伝子導入を実施すると、導入遺伝子が高レベルで発現する。そこで、ウズラの場合、好ましくは孵卵開始から36時間以上経過した後（具体的には孵卵開始から36時間後~50時間後の間）、ニワトリの場合、好ましくは孵卵開始から43時間以上経過した後（具体的には孵卵開始から43時間後~60時間後の間）に遺伝子導入を実施するとよい。

[0021] 遺伝子導入は、当該分野で公知の方法によって行うことができる。即ち、レトロウイルスベクターを用いて放卵後の胚盤葉期の胚に外来遺伝子を注入する方法（非特許文献3~7）、1細胞期の受精卵の核にDNA等を直接注入する方法（非特許文献8、9）、レンチウイルスベクターを利用した方法（非

特許文献 10、11) 等によって遺伝子導入すればよい。以下、代表的な方法である、組換えレトロウイルスを用いた遺伝子導入法について詳細に説明する。

[0022] まず、モロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV)、モロニーマウス肉腫ウイルス (MoMSV)、トリ白血病ウイルス (ALV)、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、マウス胚性幹細胞ウイルス (MESV)、レンチウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 等を利用してレトロウイルスベクターを構築する。中でも MSCV に由来するレトロウイルスベクターを用いることが好ましい。また、安全性の観点から、複製能欠失型レトロウイルスベクターを用いることが好ましい。複製能を欠失させるためには、ウイルス粒子の複製に必要な3種の遺伝子 gag、pol、env の一つ以上 (好ましくは二つ又は全部) を欠損させる。鳥類細胞への効率的な感染のためには、外皮タンパク質を人為的にウシ水疱性口内炎ウイルス由来の VSV-G エンベロープタンパク質とすることが好ましい (VSV-G シュードタイプ)。

[0023] レトロウイルスベクターにコードされる遺伝子は、導入遺伝子の他、プロモーター、エンハンサー、調節因子等、特に限定されない。

[0024] プロモーターとは遺伝子の転写開始位置を決定し、また転写レベルを調節する機能配列である。プロモーターは、鳥類で有効に機能するものであれば限定されない。例えば、EF1 α プロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、シミアンウイルス 40 (SV40) プロモーター、ミューリン・フォスフォグリセロキナーゼ (PGK) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ラウスザルコーマウイルス (RSV) プロモーター、ニワトリ β アクチンプロモーター等、ウイルスプロモーターや細胞性プロモーターを用いることができる。また、テトラサイクリン誘導型プロモーターに代表される誘導型プロモーターを用いることもできる。さらには、オボアルブミンプロモーターのような組織特異的プロモーターを用いることもできる。

[0025] エンハンサーとは転写を促進する機能配列である。エンハンサーの例として SV40、CMV、チミジンキナーゼエンハンサー、ステロイド応答エレメントや

リゾチームエンハンサーが挙げられる。

[0026] 調節因子とは転写調節や転写後のRNAの安定化に寄与する機能配列である。調節因子の例としてウッドチャック肝炎ウイルス由来調節エレメント (woodchuck post-transcriptional regulatory element : WPRE、米国特許6136597号明細書) 等が挙げられる。

[0027] レトロウイルスベクターは、典型的には、5' 末端、3' 末端に長い反復配列 (long terminal repeat, LTR) の少なくとも一部を含む。LTRは転写プロモーター遺伝子やpolyA付加シグナルを持つことから、プロモーターやターミネーターとして利用し得る。導入遺伝子及びその他の配列 (プロモーター、エンハンサー、調節因子等) はベクターコンストラクト上で5' LTRと3' LTRの間に含まれる。

[0028] レトロウイルスベクターをコードするプラスミド (具体的には上記の反復配列等を含むプラスミド) をパッケージング細胞へ導入することによって、組換えレトロウイルスを産生させることができる。パッケージング細胞への上記プラスミドの導入にはリポフェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法などを利用すればよい。パッケージング細胞にはウイルス粒子の形成に必要な遺伝子 (gag、pol又はgag、pol、env) を発現する細胞が用いられる。例えば、gag及びpolを構成的に発現するGP293細胞に、env遺伝子を含むプラスミドとともに上記プラスミドを導入する。あるいは293FT細胞にgag、pol、envを発現するためのプラスミドとともに上記プラスミドを一過性に遺伝子導入しても良い。VSV-Gシュードタイプの組換えウイルスを産生させるためには、例えば、gag、polを構成的に発現するGP293細胞に、VSV-G遺伝子を含むプラスミドとともに上記プラスミドを導入すればよい。高濃度のウイルス液を得るために、上記プラスミドを安定に保持するGP293細胞株を作製しパッケージング細胞として用いても良い。ウイルス液 (パッケージング細胞の培養上清) は必要に応じて濃縮される。

[0029] 以上の方法で調製した組換えレトロウイルス等を利用して β 1,4-GalT遺伝子を初期胚へ導入する。遺伝子導入効率の観点から好ましくはマイクロイン

ジェクション法 (Bosselman, R. Aら (1989) Science 243, 533) により遺伝子導入するが、これに限られるものではなく、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等により遺伝子導入してもよい。

[0030] 遺伝子導入後、引き続きインキュベートし、孵化させる。孵化は常法で行うことができる。好ましい方法の一つとして人工卵殻による方法 (Kamihira, Mら (1998) Develop Growth Differ 40, 449) を挙げることができる。

[0031] 以上の方法によれば、その体細胞にモザイク状に β 1, 4-GalT 遺伝子を持った G0 トランスジェニックキメラ鳥類が得られる。このようにして得た G0 トランスジェニックキメラ鳥類を同種野生型の鳥類と交配することにより、又は G0 トランスジェニックキメラ鳥類同士を交配することにより、導入遺伝子 (目的タンパク質遺伝子及び β 1, 4-GalT 遺伝子) を子孫に伝播させることができるとともに、全身の体細胞に導入遺伝子をもつ完全なトランスジェニック鳥類を作製できる。このように安定的に導入遺伝子を伝播するトランスジェニック鳥類の系統を確立することで、タンパク生産システムとしての品質の安定化が可能である。更に、完全なトランスジェニック鳥類を用いれば、導入遺伝子をもつ体細胞の割合が多いことから、G0 トランスジェニックキメラ鳥類に比べ、導入遺伝子に由来する、糖鎖構造が改善された組換えタンパク質の生産量の増大が望める。

尚、「交配」として、自然交配の他、人工交配を用いてもよい。

[0032] 同種鳥類を用いる場合、G1 トランスジェニックを作製するための交配型には、G0 トランスジェニックキメラのオスと同種野生型のメス、G0 トランスジェニックキメラのメスと同種野生型のオス、G0 トランスジェニックキメラのオスと G0 トランスジェニックキメラのメス、の 3 種類がある。G0 トランスジェニックキメラのオス 1 羽に対して複数羽のメス (同種野生型又は G0 トランスジェニックキメラ) を交配させることにすれば、効率的に G1 トランスジェニックを作製することができる。

[0033] G2 以降の子孫は、それまでに得られたトランスジェニック (G0 トランスジェニックキメラを含む) と野生型との交配や戻し交配などによって作製する

ことができる。

- [0034] G0トランスジェニックキメラ鳥類が作製されたことを確認するため、或いは導入遺伝子が次世代へ伝搬したことを確認するためには、得られた子孫の血液又は細胞などから抽出したDNAを試料としてPCR法又はハイブリダイゼーション法などを実施し、導入遺伝子を検出すればよい。

また、G0トランスジェニックキメラ鳥類又はG1世代以降の子孫における導入遺伝子のコピー数についても、PCR法やハイブリダイゼーション法を利用して確認することができる。導入遺伝子の発現量の確認には、RT-PCR法又はノーザンブロット法などを利用できる。

- [0035] 以下、トランスジェニック鳥類を作製するための方法（２）～（４）を説明する。（２）の方法ではまず、目的タンパク質遺伝子を生殖細胞に保有する鳥類と、 β 1,4-GalT遺伝子を生殖細胞に保有する同種異性鳥類を用意する。これらの二羽の鳥類は、導入遺伝子（目的タンパク質遺伝子、 β 1,4-GalT遺伝子）を生殖細胞に保有する限り特に限定されない。即ちキメラ個体であってもよいが、効率的に目的のトランスジェニック鳥類を得るため、G1世代以降のトランスジェニック個体であることが好ましい。

- [0036] 次に、用意した二羽の鳥類を交配して受精卵を得た後、孵卵する。孵卵及び孵化の方法、条件などは（１）の場合と同様である。（２）の方法によれば、全身の体細胞が目的タンパク質遺伝子及び β 1,4-GalT遺伝子を持つトランスジェニック個体（G1）を得ることができる。（１）の場合と同様、当該トランスジェニック個体を利用してその子孫（G2世代以降）を作製することもできる。

- [0037] （３）の方法ではまず、鳥類受精卵を用意し、孵卵を開始する。続いて、形成された初期胚に対して目的タンパク質遺伝子と β 1,4-GalT遺伝子を導入し、染色体への該二つの遺伝子の挿入を生じさせる。目的タンパク質遺伝子と β 1,4-GalT遺伝子の導入は、目的タンパク質遺伝子を搭載したベクター（第１発現ベクター）と β 1,4-GalT遺伝子を搭載したベクター（第２発現ベクター）の共導入、又は目的タンパク質遺伝子と β 1,4-GalT遺伝子を搭載した

ベクター（共発現ベクター）の導入によって行うことができる。第1発現ベクターは目的タンパク質遺伝子を発現可能に保持する。第2発現ベクターは β 1,4-GalT遺伝子を発現可能に保持する。一方、共発現ベクターの構築には例えばInternal Ribosome Entry Site(IRES)配列を利用すればよい。

[0038] (4)の方法は、目的タンパク質遺伝子ではなく β 1,4-GalT遺伝子の方を導入したトランスジェニック鳥類を用いることと、これに伴い β 1,4-GalT遺伝子ではなく目的タンパク質遺伝子を受精卵へ導入することを除いて、(1)の方法と同じである。従って、その詳細については、(1)の方法に関する上記説明を援用し、省略することにする。

[0039] (タンパク質の生産法)

本発明の更なる局面は、本発明のトランスジェニック鳥類を用いたタンパク質の生産法に関する。本発明の生産法では、本発明のトランスジェニック鳥類の卵白から目的タンパク質を回収する。例えば、卵白を緩衝液や蒸留水等で希釈した後、遠心処理、塩析（硫酸分画など）、各種クロマトグラフィーなどに供する。これらの方法は単独で或いは任意に組み合わせられて用いられる。本発明の生産法によれば、糖鎖を有するタンパク質が得られる。従って、レクチンを用いたアフィニティークロマトグラフィーなど、糖鎖との結合性を利用した分離・精製法が有効である。タンパク質部分の特徴を利用して目的タンパク質を分離・精製することにしてもよい。例えば目的タンパク質が抗体分子であれば、対応する抗原を固相化したカラムによるアフィニティークロマトグラフィーなどが有効である。

実施例

[0040] 1. ニワトリ各組織における糖転移酵素の遺伝子発現解析

以下、 β 1,4-Galactosyltransferase 1を「GalT1」、 β 1,4-Galactosyltransferase 2を「GalT2」、 β 1,4-Galactosyltransferase 3を「GalT3」、 β -galactoside α 2,6-sialyltransferase 1を「ST6Gal1」、 β -galactoside α 2,3-sialyltransferase 4を「ST3Gal4」、 β -galactoside α 2,3-sialyltransferase 6を「ST3Gal6」と略記する。

ガラクトース転移酵素及びシアル酸転移酵素遺伝子の発現を解析するため、ニワトリ産卵個体の各組織からQuick prep™ Total RNA extraction kit (GEヘルスケア)、或はRNAiso (タカラバイオ)を用い、全RNAを抽出した。組織は湿重量で約50-150 mgを用いた。操作はキットに付属のプロトコールに準じた。RNAisoを用いた場合には、さらに37℃、1時間のDNase I (タカラバイオ)処理 (20 U/サンプル) を行い、再度RNAisoによる全RNAの精製を行った。RNA量は260 nm波長の吸収により測定した。800 ng (シアル酸転移酵素遺伝子の場合)、3 µg (ガラクトース転移酵素の場合) の全RNAに5 p mole オリゴdTプライマーを加え、70℃、10分処理し、氷上で冷却することで、アニール反応を行った。RevaTra Ace (商品名、東洋紡) 付属の緩衝液、及び2 mM dNTPを加え、42℃で保温した後、100 UのRevaTra Aceを加え逆転写反応を行いcDNAを合成した。適宜希釈した反応液2 µlを鋳型cDNAとして、LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I (ロシェダイアグノスティックス)を用いてリアルタイムPCRを行なった。各糖転移酵素の発現量をLightCycler Software version 3.5 (ロシェダイアグノスティックス)により定量した。ニワトリグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の発現量を同様に測定し、これにより鋳型量を補正した。条件は以下の通りで行なった。

95 °C、10分を1サイクル

変性 95 °C、10秒、アニール 55 °C、15 秒、伸長72 °C、10 秒を40サイクル

尚、各ステップでの温度変化は20 °C/秒と設定した。

使用したプライマーは以下の通りである。

<ガラクトース転移酵素>

GalT1用forward : 5' -GGAGTATGACTATGACTGCTTTGTGT-3' (配列番号12)

GalT1用reverse : 5' -TGTTCTTTGCTCAAGGCAGAC-3' (配列番号13)

GalT2用forward : 5' -CAGAAGGTGGCTTATGGCATC-3' (配列番号14)

GalT2用reverse : 5' -GAGGTCCACATCGCTGAAA-3' (配列番号15)

GalT3用forward : 5' -TAATGTTGGTGTCCGAGAAGC-3' (配列番号16)

GalT3用reverse : 5' -TGTTTGGGATAGTATTCATCACAG-3' (配列番号 17)

<シアル酸転移酵素>

ST3Gal4用forward : 5' -AAGAAAACAAGACCGTATGTCCC-3' (配列番号 18)

ST3Gal4用reverse : 5' -CGTCCTCACCCAGAAGTAATC-3' (配列番号 19)

ST3Gal6用forward : 5' -GGAGAGAAGGAACGAAATAA-3' (配列番号 20)

ST3Gal6用reverse : 5' -ACTGGCACACAGGAACGG-3' (配列番号 21)

ST6Gal1用forward : 5' -TGGGTCGCTGTGCTGTT-3' (配列番号 22)

ST6Gal1用reverse : 5' -TGGGAGTTGACAAGACGAATC-3' (配列番号 23)

<コントロール>

ニワトリGAPDH用forward : 5' -GGGCACGCCATCACTATC-3' (配列番号 24)

ニワトリGAPDH用reverse : 5' -GTGAAGACACCAGTGGACTCC-3' (配列番号 25)

[0041] PCR反応後、増幅産物を2 %アガロース電気泳動に供し、非特異的増幅及びプライマーダイマーの形成が起こっていないことを確認した。

[0042] リアルタイムRT-PCRの結果、脳での発現量を基準とすると、GalT1は肝臓、腎臓では高発現を、輸卵管膨大部では脳と同レベルの発現を確認した。GalT3は輸卵管膨大部での発現が高いことを確認した(図1A)。また、シアル酸転移酵素については、輸卵管膨大部での $\alpha 2, 3$ 結合を生成するST3Gal6の発現は、脳におけるそれと比較して高く、また、 $\alpha 2, 6$ 結合を生成するST6Gal1の発現も脳に比較して高いことが確認された(図1B)。

[0043] 2. 抗GalT1抗体の取得

ニワトリGalT1の部分ペプチドを化学合成(東洋紡)し、キャリアーとしてKLH(カサ貝のヘモシアニン)に結合させた。このペプチドをウサギに繰り返し免疫し(一度の免疫につき0.5 mgのペプチドを使用)、抗GalT1抗体を抗血清の形で得た。用いたペプチド配列は以下の通りである。ただし、最初のシステインはキャリアータンパク質と結合させるために付加したアミノ酸である。

CRMIRHSRDRKNEPNPER (配列番号 26)

[0044] 3. ニワトリ肝臓、輸卵管組織からのミクロソーム画分の調製

-80℃にて凍結保存しておいたニワトリ組織を液体窒素中ですり潰し、1 g 当り 9 ml のホモジナイズ緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、0.25 M Sucrose) に懸濁し、ポッター型ホモジナイザー (10 ストローク) により破碎した。未破碎の組織はガーゼ濾過によって取り除いた。その後、7,700 g、30 分、4℃の遠心分離に供し、得られた上清を更に 100,000 g、60 分、4℃で遠心分離した。この遠心分離で得られる沈殿をミクロソーム画分とした。ミクロソーム画分は、20 mM MES 緩衝液 (pH 6.5)、2 % Triton X-100 溶液に懸濁し、超音波処理 (30 秒 (1 秒パルス)、2 回) を行い可溶化した。この溶液中に含まれるタンパク質量をブラッドフォード法によって定量した。

[0045] 4. GalT1 のウエスタンブロットによる発現解析

3. で調製した各サンプル 10 μ g を、ミニプロテインII (バイオラッド) を用いた 10% ポリアクリルアミドゲルによる SDS-PAGE に供し、泳動終了後、転写装置 AE-6675 (アトー 340491) により PVDF メンブレン (GE ヘルスケア) に転写した。ブロッキング液 (3% となるようにスキムミルクをトリス緩衝生理食塩水に溶解したもの) に一晩 4℃ で浸しブロッキングした。PVDF メンブレンを 0.05% Tween 20 (登録商標) を含むトリス緩衝生理食塩水で数回洗い、1 次抗体反応、2 次抗体反応を行った。1 次抗体には 2. で作製した抗血清を 1000 倍希釈として用い、2 次抗体にはヤギ抗ウサギ IgG-HRP (サンタクルーズバイオテクノロジー) 200 μ g/0.5 ml をブロッキング液で 2,000 倍希釈したものをを用いた。尚、抗体反応が終わるたびに PVDF メンブレンを 0.05% Tween 20 (登録商標) を含むトリス緩衝生理食塩水で 5 分 $\times$ 3 回洗洗淨した。2 次抗体反応後の洗淨終了後に PVDF メンブレンを、Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (パーキンエルマー) と反応させ、生じる発光をルミノイメージアナライザー (フジフィルム、LAS-3000) にて測定した。

その結果、輸卵管膨大部における GalT1 の発現は肝臓に比べ、極めて弱いことが判明した (図 2)。

[0046] 5. ニワトリ GalT1 遺伝子のクローニング

8 週齢のニワトリオス (LINE M) の腎臓より EASYPrep RNA (タカラバイオ) を

用いて全RNAを回収した。この全RNAを鋳型にReverTra Ace（東洋紡）を用いて逆転写反応を行い、cDNAを取得した。この際、プライマーにはオリゴdTを用いた。

得られたcDNAを鋳型としてPCRを行い、二つの部分に分けて別々に増幅しベクターと連結することでGalT1遺伝子をクローニングした。この際、連結部にEco RIサイトを導入するためにアミノ酸配列を変えない変異を導入した。PCRはKOD-Plus-DNA Polymerase（東洋紡）を用い、以下の条件及びプライマーにより行った。

<条件>

94℃/2分の後、94℃、15秒、54℃、30秒及び68℃、1分30秒を30サイクル

<プライマー>

(1) アミノ末端

forward: 5' -AAAGTCGACCATGAAGGAGCCGGCGCTGCCCGGCACC-3' (配列番号 27)

reverse: 5' -CAGGTTACAGGCTGGGAGAATTCCACGCG-3' (配列番号 28)

(2) カルボキシ末端

forward: 5' -GTGGAATTCTCCCAGCCTGTGAACCTGGA-3' (配列番号 29)

reverse: 5' -AAAATCGATTAGCTGCCGGGCGCTCCGATA-3' (配列番号 30)

[0047] 得られたPCR産物を電気泳動後切り出し、Mag Extractor -PCR & Gel clean up-（東洋紡）で精製した。得られたPCR産物をそれぞれSal IとEco RI及びEco RIとClalにて切断後、あらかじめSal IとClalで切断したpBluescript II KS (-)（ストラタジーン）と連結し、pBlue/β4Gal-T1を得た。

なお、配列はTHERMO Sequenase™ II dye terminator cycle sequencing kit（GE ヘルスケア）を用いて確認した。

[0048] 6. アクチンプロモーターによるGalT1発現レトロウイルスベクターの構築

アクチンプロモーターによるGalT1発現レトロウイルスベクターをコードするプラスミドpQMSCV/eGΔAGalT1は以下のようにして作製した。尚、プラスミドpQMSCV/eGΔAGalT1はQベクター由来のプラスミドベクターであり、MSCVのL

TRを有し、当該LTRによってeGFPを発現するとともに、欠失型アクチンプロモーター（イントロン部分を欠失させたもの）によりGalT1を発現する。

まず、5. で作製したニワトリGalT1をクローニングしたベクターpBlue/ β 4Gal-T1をSal I及びCla Iで切断し、1.1kbを切り出し、Sal I及びCla Iで切断したpQMSCV/eG Δ ALIG7H (TNF)に挿入し、ニワトリGalT1をニワトリアクチンプロモーターで発現させる複製能欠失型レトロウイルスベクターをコードするプラスミドpQMSCV/eG Δ AGalT1を作製した（Hotta, A. ら (2006) J Biosci Bioeng 101, 361が参考になる）。このプラスミド地図をウイルスベクターが染色体内に挿入された形で図3Aに示した。尚、pQMSCV/eG Δ ALIG7H (TNF)は以下により作製した。

[0049] まず、pMSCVneo（クローンテック）のEcoR IとSal Iのサイトに、eGFP遺伝子を含むEco RI、Xho I末端を持つDNA及びニワトリアクチンプロモーター（非特許文献13に記述がある）を含むXho I、Sal I末端を持つDNAを結合し、pMSCV/eG Δ Aを作製した。マウスIgGのH鎖のシグナル配列（NCBI M59921）の下流に抗ヒトTNF α 抗体H鎖の可変領域（米国特許 5698195号明細書）を配したDNAを化学合成し、IgG1の定常領域C γ 1と結合させ抗TNF α H鎖遺伝子を得た。マウスIgGのL鎖のシグナル配列（NCBI AF201961）の下流に抗ヒトTNF α 抗体L鎖の可変領域（米国特許 5698195号明細書）を配したDNAを化学合成、 κ 鎖の定常領域C κ と結合させ抗TNF α L鎖遺伝子を得た。合成したL鎖遺伝子、合成IRES配列（forward: 5' -TCGAC-(TTCTGACATCCGGCGGGT)₇-GACTCACAACCCAGAAACAGACATCGC-3'（配列番号31）及びreverse: 5' -GGCCGCGATGTCTGTTTCTGGGGTTGTGAGTC-(ACCCGCCGGATGTCAGAA)₇-G（配列番号32）、合成したH鎖配列をpMSCV/eG Δ Aのプロモーター下流に挿入し、pMSCV/eG Δ ALIG7H (TNF)を作製した。pMSCV/eG Δ ALIG7H (TNF)をKpn Iで切断し、Kpn Iで切断したpQMSCVベクターに挿入しpQMSCV/eG Δ ALIG7H (TNF)を作製した。

[0050] 7. アクチンプロモーターによるGalT1発現ウイルスベクターの調製

6. で作製したベクターコンストラクトpQMSCV/eG Δ AGalT1よりレトロウイルスを調製するため、GP293細胞（クローンテック）を直径100 mmの培養ディ

ッシュにてDMEM培地を用いて培養した。90%コンフルエントになるように前日にまき直しリポフェクション法によりプラスミドpQMSCV/eGΔAGalT1を11 μg及びプラスミドpVSV-G（クローンテック）11 μgをGP293細胞にトランスフェクトした。48時間後、上清を0.45 μm酢酸セルロースフィルター（アドバンテック）を通して夾雑物を除いた後、25,000 rpm、4 °Cで1.5時間超遠心分離した。上清を捨て沈殿をTNE（50 mM Tris-HCl（pH 7.8）、130 mM NaCl、1 mM EDTA）に溶解しウイルス液とした。

[0051] 8. ウイルスタイターの測定

ウイルスタイターの測定は、以下のように行った。測定の前日にNIH3T3細胞（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手）を24 wellディッシュに 1.5×10^4 細胞植え培養した。 $10^2 \sim 10^6$ 倍に10 μg/mlポリブレン入りDMEMで希釈したウイルス溶液1 mlを細胞の培地と交換し、48時間後に蛍光顕微鏡によりeGFPを発現している細胞の割合を測定し、以下の計算式によりタイターを決定した。

ウイルスタイター（cfu/ml）＝細胞数×希釈率×発現割合

7で得られた高タイターウイルス溶液のタイターをこのようにして測定したところ、 $4 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ cfu/mlであった。

[0052] 9. ニワトリ胚へのレトロウイルスのインジェクション及び胚培養

アクチンプロモーターで一本鎖抗体を全身に発現するトランスジェニックニワトリ（非特許文献13）を交配させて得た受精卵を使用した。70%エタノールで殺菌したニワトリ受精卵を自動転卵装置が内蔵された孵卵器（昭和フランキP-008型）で約55時間、38 °C、湿度65%で、15分に1回角度90度で転卵しながら孵卵することで胚発生させた。鋭端部を直径3.5 cmの円形にダイヤモンドカッターで切り取り、胚を露出させた。ガラス管（ナリシゲ GD-1）をマイクロピペット製作機（ナリシゲ PG-10）で加工し、外形約20 μmとなるように先端を折って作製した針に7. で調製したウイルス溶液を入れ、胚を実体顕微鏡で観察しながら、胚の心臓部に血流に沿った方向に刺し、マイクロインジェクター（エッペンドルフ、Transjector 5246）を用いて約2 μlを

注入した。この卵に卵殻の切り口まで卵白を満たした後、卵白を糊としてPTFE膜（ミリポア、ミリラップ）とポリ塩化ビニリデンラップ（旭化成、サランラップ）で蓋をした。ウイルスをインジェクションした受精卵は全ての卵のインジェクション終了時まで孵卵器で孵卵を行った。その後、ニワトリのLL卵を70%エタノールで消毒し鈍端部を直径4.5 cmの円形にダイヤモンドカッターで切り取り中身を取り除いた殻に、ウイルスをインジェクションした受精卵の卵白と卵黄を移し、卵白に懸濁した乳酸カルシウム溶液(50 mg/ml)を0.5 ml添加後、卵白を糊としてポリ塩化ビニリデンラップ（サランラップ、旭化成）で蓋をした。ニワトリLL卵に移した胚を自動転卵装置が内蔵された孵卵器で15分ごとに角度30度転卵しながら孵卵を行った。

[0053] 10. 遺伝子導入鳥類胚の孵化率

ニワトリ胚へのウイルス導入操作を5回にわけ計164胚行い、複製能欠失型レトロウイルスベクターにより遺伝子導入した胚を9. で示した方法により孵化させた。平均25.0%の孵化率で遺伝子導入鳥類胚を孵化させることができた（図3B）。

[0054] 11. 血液ゲノムDNAの取得

ヒヨコから採血し、室温で1時間静置した後、4℃で一晩保持した。10,000 rpm、10分の遠心により血清を除去した血餅から、MagExtactor-Genome-（東洋紡）を用いてゲノムDNAを取得した。操作はキットに付属のプロトコールに従った。DNA濃度は280 nmの吸光度により測定した。

[0055] 12. 遺伝子導入鳥類胚の血中コピー数の検定

もともと導入してあったpMSCVG ΔAscFvFcベクター（非特許文献13）には存在せず、導入したpQMSCV/eG ΔAGalT1に存在するeGFP遺伝子をリアルタイムPCR法により定量し、コピー数を決定した。使用したプライマーはForward : 5' -CGGCAACTACAAGACCCGC-3'（配列番号33）及びReverse : 5' -GAAGTTCACCTTGATGCCGTTG-3（配列番号34）である。50℃、2分、95℃、2分の後、94℃、5秒、58℃、10秒、72℃、10秒を45サイクルにてPCRを行った。

この際、陰性対照としてオートクレーブ及びUV滅菌したMilli Q（登録商標

）水と非導入ニワトリの血餅から得られたゲノムDNA 20 ngを用いた。また、コピー数既知の遺伝子導入ニワトリゲノムを用いて検量線を作製した。操作はプロトコールに準じた。

検定の結果、生まれたキメラニワトリの血中導入遺伝子コピー数は0.2~2.2であった（図4）。

[0056] 13. GalT1導入ニワトリのウエスタンブロットによる発現解析

遺伝子導入ニワトリを解剖し、輸卵管膨大部における導入遺伝子のコピー数を血中ゲノムと同様にリアルタイムPCRにより測定した。その結果、#77が1.81コピー、#78が0.53コピーであることが示された。次に、得られた輸卵管組織のミクロソーム画分におけるGalT1の発現を4.と同様にタンパクレベルで解析した。GalT1導入コピー数の高い#77の輸卵管において、GalT1の発現が認められた（図5）。

[0057] 14. GalT1導入ニワトリのRT-PCR法による発現解析

遺伝子導入ニワトリを解剖し、得られた輸卵管におけるGalT1の発現を1.と同様に解析した。導入したGalT1のmRNAが導入個体でのみ強く発現していることが確認された（図6A）。同時に内在性のシアル酸転移酵素ST6Gal1の発現量には有意な変化がないことを確認した（図6A）。

[0058] 15. 輸卵管組織におけるガラクトース転移酵素の活性測定

ミクロソーム画分として得られた組織抽出液のガラクトース転移酵素活性を測定した。13.で得られたタンパク質20 μ gを50 μ lの反応液（25 mM N-Acetylglucosamine、100 mM Tris-maleate (pH 6.8)、20 mM MnCl_2 、0.1% Triton X-100、4 mM ATP、20 mM γ -Galactono-1,4-lactone、0.5 mg/ml BSA、トリチウム標識UDP-ガラクトース 0.025 nmol）中で37°C、15分反応させた。次に、シリカゲルプレート上に、各反応液を5 μ lずつスポットし、展開溶媒（1-Butanol 50 ml、Ethanol 30 ml、蒸留水 20 ml）を用いて80分の展開を二回繰り返した。次に、プレートをフィルムに感光させた。尚、反応の詳細な条件などは、Shaperらの報文（Shaperら（1997） J Biol Chem 272, 313 89）を参考にした。

測定の結果、非導入個体の輸卵管においてはガラクトース転移酵素活性がほとんど検出されないのに対し、導入個体においては強い活性が認められた（図 6 B）。

[0059] 1 6. 卵白サンプルの調製、及び組換え抗体の卵白からの精製

内在性卵白タンパク質へのガラクトース付加を検証する為に、卵白サンプルの調製を以下のように行った。

卵白をPBSで10倍に希釈し、超音波処理（30秒）を行い、サンプルの粘性を低下させた。この溶液にSDS-PAGEサンプル緩衝液を加え、熱変性させたものをレクチンブロット解析（後述）に供した。

卵白からの組換え抗体の精製は以下のように行った。卵白をスターラーで15分間ほぐし、その5倍容のMilli Q（登録商標）水を加え室温で攪拌した。1 M HClでpH 5.0に調整し、さらに15分間攪拌した。遠心分離（7,300 rpm、4 °C、20分）し上清を回収した。回収した上清を0.45 μ mフィルターに通しFPLCを用いてprotein G カラム（GE ヘルスケア）1 mlにかけた。操作は以下のように行った。流速2 ml/分で結合緩衝液（10 mM リン酸緩衝液（pH 7.4））にて平衡化したカラムに上述のサンプルを約80 ml流し吸着させた後、溶出緩衝液（10 mM Glycine-HCl（pH 2.7））1 ml/分にて溶出した。その際に溶出液を1 mlずつ分画すると同時に150 μ lの1 M Tris-HCl（pH 8.0）で中和した。280 nmの吸光度を測定し、タンパク質のピークを認めたフラクション4、5では、抗Fc抗体を用いたELISA法により組換え抗体の存在が確認された。

[0060] 1 7. 組換え抗体に存在する糖鎖のノイラミニダーゼ（シアリダーゼ）による部分分解

精製抗体1.25 μ gを8 mM リン酸緩衝液（pH 6.6）、1.5 mUノイラミニダーゼF（マルキンバイオ、24229-74）、全量25 μ lで37 °C、6時間反応させ、末端シアル酸を除いた。

[0061] 1 8. 組換え抗体に存在する糖鎖の β -ガラクトシダーゼによる部分分解

精製抗体2.7 μ gを50 mM リン酸緩衝液（pH 5.5）、1 mU ノイラミニダーゼF、全量24 μ lで37 °C、4時間反応させ、末端シアル酸を除き、続いて、 β -

ガラクトシダーゼ (Streptococcus 6646K由来) (生化学工業、100573) 0.5 ml を加え (全量50 μ l)、37 $^{\circ}$ C、20時間反応させ、末端ガラクトースを切断した。サンプルを酵素なしで同様にインキュベートしたものを対照サンプルとした。

[0062] 19. 内在性タンパク質及び組換え抗体に存在する糖鎖のレクチンブロットによる解析

各サンプル (卵白サンプルまたは非処理、シアリダーゼ処理、 β -ガラクトシダーゼ処理精製組換え抗体) をSDS-PAGEにより電気泳動し、PVDFメンブレンに転写後、1% BSA (シグマ-アルドリッチ) 含有0.05% Tween 20 (登録商標) を含むトリス緩衝生理食塩水中で、一晩4 $^{\circ}$ Cでブロッキングした。RCA120 (Ricinus communis) (ヒママメ) レクチン (生化学工業、300162) を用いて、末端のガラクトースの有無を解析した。RCA120を1% BSA含有0.05% Tween 20 (登録商標) を含むトリス緩衝生理食塩水で1 μ g/mlに希釈し、メンブレンと4 $^{\circ}$ C、一晩反応させた。続いて、BALB/cマウスに免疫することで得たマウス抗RCA120抗血清を1% BSA含有0.05% Tween 20 (登録商標) を含むトリス緩衝生理食塩水で1,000倍希釈し、メンブレンと室温、2時間反応させた。続いて、ヤギ抗マウスIgG-HRP (サンタクルーズバイオテクノロジー、sc-2005) を1% BSA含有0.05% Tween 20 (登録商標) を含むトリス緩衝生理食塩水で0.2 μ g/mlに希釈しメンブレンと室温、1時間反応させた。その後メンブレンをWestern LightningTM Geniluminescence Reagent Plus (パーキンエルマー) のEnhanced Luminal Reagent及びOxidizing Reagentを等量混ぜたものとを約1分間インキュベートし発色させ、CCDカメラにより撮影した。

レクチン反応後、メンブレンを抗体除去緩衝液 (250 mM Glycine-HCl (pH 2.5)、1% SDS) に浸し、レクチン、抗体を除去し、1% スキムミルク含有0.05% Tween 20 (登録商標) を含むトリス緩衝生理食塩水中で、4 $^{\circ}$ C、一晩ブロッキングし、先と同様に抗ヒトFc抗体でウェスタンブロットを行い、泳動した抗体タンパク量の確認を行った。

解析の結果、GalT1遺伝子非導入個体では、卵白内在性タンパク質にガラク

トースが付加されていないこと（図7A）及びトランスジェニック鳥類に生産させた卵白由来組換え抗体にガラクトースが付加されていないこと（図7B）が確認された。一方Gal T1遺伝子導入により、卵白内在性タンパク質には有意にガラクトースが付加されていることが確認された（図7A）。また、Gal T1導入ニワトリから精製した抗体では、検出されたバンドが β -ガラクトシダーゼ処理により消失し、ガラクトースの付加が確認できた（図7B）。

[0063] 次に、 $\alpha 2, 6$ 結合で結合しているシアル酸をSSAレクチンを用いて以下により解析した。SSA (*Sambucus sieboldiana*) (ニホンニワトコ) レクチン(生化学工業、300177)を1% BSA含有0.05% Tween 20(登録商標)を含むトリス緩衝生理食塩水で1 μ g/mlに希釈し、メンブレンと室温、2時間反応させた。続いて、BALB/cマウスに免疫することで得たマウス抗SSA抗血清を1% BSA含有0.05% Tween 20(登録商標)を含むトリス緩衝生理食塩水で1,000倍希釈し、メンブレンと室温、2時間反応させた。続いてヤギ抗マウスIgG-HRP (サンタクルーズ バイオテクノロジー、sc-2005)を1% BSA含有0.05% Tween 20(登録商標)を含むトリス緩衝生理食塩水で0.2 μ g/mlに希釈し、メンブレンと室温、1時間反応させた。その後、メンブレンをRCA120の場合と同様に発色させ、CCDカメラにより撮影した。SSAレクチンにおいて、陽性対照として、ヒトトランスフェリン($\alpha 2, 6$ 結合シアル酸をもつ糖タンパク質)及び、卵黄に生産させた組換え抗体を用いた。

解析の結果、卵白より精製した抗体には、GalT1の導入の有無にかかわらず、 $\alpha 2, 6$ 結合で結合しているシアル酸の存在を示すバンドは認められなかった（図8）。

[0064] 20. 等電点電気泳動によるシアル酸付加の解析

等電点電気泳動はAmpholine PAG plate (pH 3.5-9.5、T = 5%、C = 3%) (GEヘルスケア)を用い、泳動装置には等電点電気泳動装置NA-1410型(日本エイドー)を使用した。泳動は10°Cで行なった。少量(500 μ l程度)の低粘度シリコンオイル(信越化学、KF-96L-50S)をトレイの上に垂らし、その上に11 cm

× 8 cmに切断したゲルをフィルムを下にして置き、ゲル両端から5 mm 程度の位置に各電極緩衝液を染み込ませた電極ろ紙をセットした。陽極緩衝液には1 M H_3PO_4 を、陰極緩衝液には1 M NaOHを用いた。白金電極を密着するようにろ紙の上に乗せ、ゲルを常に10°Cに保ちながら、200–400 V、8 mA、60分の予備泳動を行い(電圧は徐々に上げた)、sample application piece (GE ヘルスケア)をゲル上に置き、各サンプルを1.25 μg アプライした。マーカーとしてIEF marker 3–10 (セルバ)を用いた。アプライ後、500–600 V、2 mA、90分の泳動を行なった(電圧は徐々に上げた。また、泳動開始30分後にsample application pieceを除いた)。泳動終了後、Film Remover (GE ヘルスケア)を用いてゲルを切り離した。ゲルが非常に壊れやすいためFilm Remover上でPVD Fメンブレンを被せた。その後WB転写装置を用いて、メンブレンに80 mA/メンブレンで1時間転写した。転写後、慎重にメンブレンとゲルを切り離し、1 % スキムミルク含有0.05% Tween 20(登録商標)を含むトリス緩衝生理食塩水にてブロッキング後、19. と同様に抗ヒトFc抗体で検出した。

解析の結果、シアリダーゼによって消失する酸性(陽極)側のバンドが認められた。その量は少なく、また、Gal T1非導入ニワトリの卵白より精製した抗体においても同様のバンドが認められた(図9)。

[0065] 2 1. pETBlue2/GalT1の構築

pQMSCV/eG Δ AGalT1 (6. を参照) から、GalT1遺伝子をSal IとCla Iにより切り出し、Sal IとCla Iにより切断したpETBlue 2ベクター(ノバジェン)と連結し、pETBlue2/GalT1を作製した。

[0066] 2 2. pETBlue2/EMCV-IRESの構築

pMSCV/eGCMV H-IRES-L (TNF)からEMCV由来内部リボソーム結合配列(internal ribosome entry site, IRES)配列をSma IとEco RVにより切り出し、Hinc IIにより切断したpETBlue 2ベクターと連結し、pETBlue2/EMCV-IRESを作製した。なお、pMSCV/eGCMV H-IRES-L (TNF)は以下のように作製した。pMSCV/eG Δ ALIH(EMCV IRES, TNF α) (特開2007-295846) からSal I/ EcoRI断片(H鎖)及びEcoRI/ Cla I断片(IRES-L鎖)を切り出し、Sal I/ Cla Iで切断した

ベクターpMSCV/eGPcmvLIH(GtxIRES, TNF α ; n=7) (特開2007-295846) と結合させ、pMSCV/eGCMV H-IRES-L (TNF) を作製した。

[0067] 23. アクチンプロモーターによりヒトエリスロポイエチンとGalT1を同時に発現するレトロウイルスベクターpMSCV/G Δ AhEP0-IRES-GalT-Wの構築

pETBlue2/GalT1から、GalT1遺伝子をSse 8387IとMlu Iにより切り出した。また、pETBlue2/EMCV-IRESからIRES配列をSse8387 IとMlu Iにより切り出した。Mlu Iにより切断したpMSCV/G Δ AhEpo(c)Wベクター (非特許文献14) とGalT1遺伝子、IRES配列遺伝子を連結し、pMSCV/G Δ AhEP0-IRES-GalT-W (図10(A)) を作製した。作製したベクターはアクチンプロモーターによりヒトエリスロポイエチンを発現する。脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus, EMCV) のIRESの働きにより、ヒトエリスロポイエチンと同一のmRNAの3' 下流よりGalT1を同時に発現する。さらに下流のWoodchuck posttranscriptional element (WPRE)によりタンパク質発現量の増大が期待できる。

[0068] 24. 遺伝子導入鳥類の作製

アクチンプロモーターによりヒトエリスロポイエチン及びGalT1発現ウイルスベクターの調製、ウイルスタイターの測定及びニワトリ胚へのレトロウイルスのインジェクション及び胚培養は既述 (7. ~ 9. を参照) の方法に準じた。

[0069] 25. 遺伝子導入鳥類胚の孵化率

ニワトリ胚へのウイルス導入操作を2回にわけ計40胚行い、複製能欠失型レトロウイルスベクターにより遺伝子導入した胚を孵化させた。8羽が孵化し孵化率は平均20%であった (図10(B))。

[0070] 26. 卵白からのヒトエリスロポイエチンの部分精製

26-1. 卵白の前処理

卵白を、茶漉しを通すことで、濃厚卵白と水様性卵白に分離した。水様性卵白をスターラーで15分ほぐし、その5倍容の超純水を加え室温で攪拌した。1N塩酸でpH 5.0に調整し、さらに15分攪拌した。遠心分離 (5,000 rpm, 4 °C, 10 分) し上清を回収し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液でpH 7.1に調整後、-80

℃で保存した。

[0071] 26-2. ブルーセファロースによるヒトエリスロポイエチンの精製

結合緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) で置換したブルーセファロース (Blue Sepharose 6 fast Flow) (GEヘルスケア) 1 ml と、3.5 ml の前処理済み卵白、6.5 ml の結合緩衝液) を混ぜ、一晩4℃で、ローテーターで回転させ吸着させた。同様に、結合緩衝液で置換したブルーセファロース 1 ml と 5 ml の血清、5 ml の結合緩衝液を混ぜ、一晩4℃で、ローテーターで回転させ吸着させた。その後、溶液をカラム (スクリーニングカラム、フィッシャーヘルスケア) に通し、5 ml の結合緩衝液で洗浄した。再び 5 ml の結合緩衝液で洗浄後、8 ml の溶出緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1M NaCl) で溶出した。吸光度計にて波長 280 nm を測定し、タンパクを含む画分を確認した。各フラクション中のヒトエリスロポイエチン量はウエスタンブロット法により測定した。ウエスタンブロット法は既述 (4. を参照) の方法に準じた。一次抗体としてウサギ抗ヒトエリスロポイエチン抗体 (R&D システムズ, AB-286-NA) 1 mg/ml を 1000 倍希釈したもの、二次抗体としてヤギ抗ウサギ IgG-HRP (サンタクルーズ バイオテクノロジー) 400 μ g/ml を 2000 倍希釈したものを用いた。溶出緩衝液には高濃度の塩が含まれるため、PD-10 カラム (GEヘルスケア) により脱塩した。操作はカラムに添付されたプロトコールに準じた。なお、GalT1 非発現トランスジェニックニワトリの卵白中に生産させたヒトエリスロポイエチン (非特許文献 14) を比較対象として用いた。

[0072] 27. ヒトエリスロポイエチンに存在する糖鎖の解析

結合する糖鎖のノイラミニダーゼ (シアリダーゼ)、 β -ガラクトシダーゼによる部分分解、及びレクチンブロットは既述 (17. ~ 19. を参照) の方法により行った。まずウエスタンブロット法により産生したエリスロポイエチンの分子量を測定した。GalT1 を強発現することにより卵白中のヒトエリスロポイエチンの分子量は、GalT1 非発現ニワトリの卵白中のものに比べ明らかに大きいことが示された (図 11 (A))。 β -ガラクトシダーゼ処理によりガラクトースを除去すると同一の分子量になることから、この差がガラクト

ース付加によるものであると考えられた。さらに、N-グルコシル化糖鎖の構造を明らかにするために、糖鎖末端からシアル酸、ガラクトースを酵素的に順次遊離したタンパク質についてガラクトース特異的なRCA120レクチンを用いたレクチンブロットにより解析した(図11(B))。その結果、GalT1を強発現するニワトリの卵白中のヒトエリスロポイエチンにのみバンドが認められ、このバンドは β -ガラクトシダーゼ処理により消失した。これらのことから、GalT1を強発現することによりガラクトースが付加されたヒトエリスロポイエチンをトランスジェニックニワトリ卵白中に生産できることが示された。

産業上の利用可能性

[0073] 医薬品に利用されるタンパク質の多くは糖鎖を有する。本発明のトランスジェニック鳥類によれば、天然型と同一又は天然型に近似した糖鎖を有する有用タンパク質を生産することができる。当該有用タンパク質には例えば体内での半減期の飛躍的延長が期待できる。このように本発明は、医薬品として利用されるタンパク質の薬効の向上及びそれに伴う投与量の低減などをもたらす。

本発明を利用すれば、天然型タンパク質には存在しない糖鎖構造の付加や糖鎖の改変も可能である。即ち、人工的な糖鎖構造を有するタンパク質を生産する手段としても本発明は有用である。

[0074] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

請求の範囲

- [請求項1] 目的タンパク質を卵白中に生産するトランスジェニック鳥類であって、目的タンパク質をコードする遺伝子と、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子とが導入されていることを特徴とするトランスジェニック鳥類。
- [請求項2] β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子が輸卵管膨大部で発現している、請求項1に記載のトランスジェニック鳥類。
- [請求項3] β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子がニワトリ β 1,4-ガラクトース転移酵素1遺伝子である、請求項1又は2に記載のトランスジェニック鳥類。
- [請求項4] 目的タンパク質の天然型が糖鎖付加型タンパク質である、請求項1～3のいずれか一項に記載のトランスジェニック鳥類。
- [請求項5] 目的タンパク質が抗体である、請求項1～4のいずれか一項に記載のトランスジェニック鳥類。
- [請求項6] (1)～(4)からなる群より選択される方法によって得られるトランスジェニック鳥類又はその子孫である、請求項1～5のいずれか一項に記載のトランスジェニック鳥類、
- (1) 少なくとも片方が、目的タンパク質をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する雌雄二羽の同種鳥類を用意するステップと、該雌雄二羽の同種鳥類を交配して得られた受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に対して β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を導入し、染色体への該遺伝子の挿入を生じさせるステップと、を含む方法、
- (2) 目的タンパク質をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する鳥類と、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する同種異性鳥類を用意するステップと、該二羽の鳥類を交配して得られた受精卵を孵卵するステップと、を含む方法、
- (3) 鳥類受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に対して

目的タンパク質をコードする遺伝子と β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を導入し、染色体への該二つの遺伝子の挿入を生じさせるステップと、を含む方法、

(4) 少なくとも片方が、 β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を生殖細胞に保有する雌雄二羽の同種鳥類を用意するステップと、該雌雄二羽の同種鳥類を交配して得られた受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に対して目的タンパク質をコードする遺伝子を導入し、染色体への該遺伝子の挿入を生じさせるステップと、を含む方法。

[請求項7] 遺伝子の導入が、該遺伝子を含む複製能欠失型レトロウイルスベクターのインジェクションによって行われる、請求項6に記載のトランスジェニック鳥類。

[請求項8] レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項7に記載のトランスジェニック鳥類。

[請求項9] 鳥類がニワトリである、請求項1～8のいずれか一項に記載のトランスジェニック鳥類。

[請求項10] その片方又は両方の生殖細胞に、目的タンパク質をコードする遺伝子が導入されている雌雄二羽の同種鳥類を用意するステップと、該雌雄二羽の同種鳥類を交配して得られた受精卵を孵卵するステップと、形成された初期胚に β 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子を導入し、染色体への該遺伝子の挿入を生じさせるステップと、を含む、トランスジェニック鳥類の作製法。

[請求項11] 以下の(1)又は(2)の交配を行うことを特徴とする、トランスジェニック鳥類の作製法、

(1) 請求項10に記載の作製法によって得られた雄トランスジェニック鳥類と、請求項10に記載の作製法によって得られた雌トランスジェニック鳥類との交配、

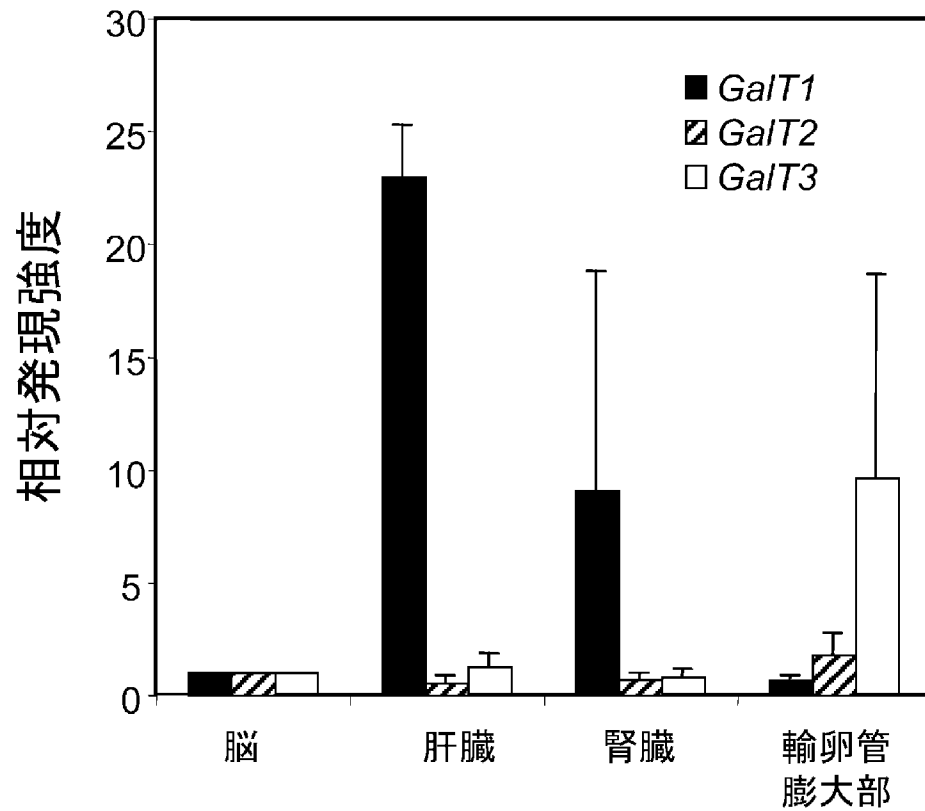
(2) 請求項10に記載の作製法によって得られたトランスジェニッ

ク鳥類と、同種異性の野生型鳥類との交配。

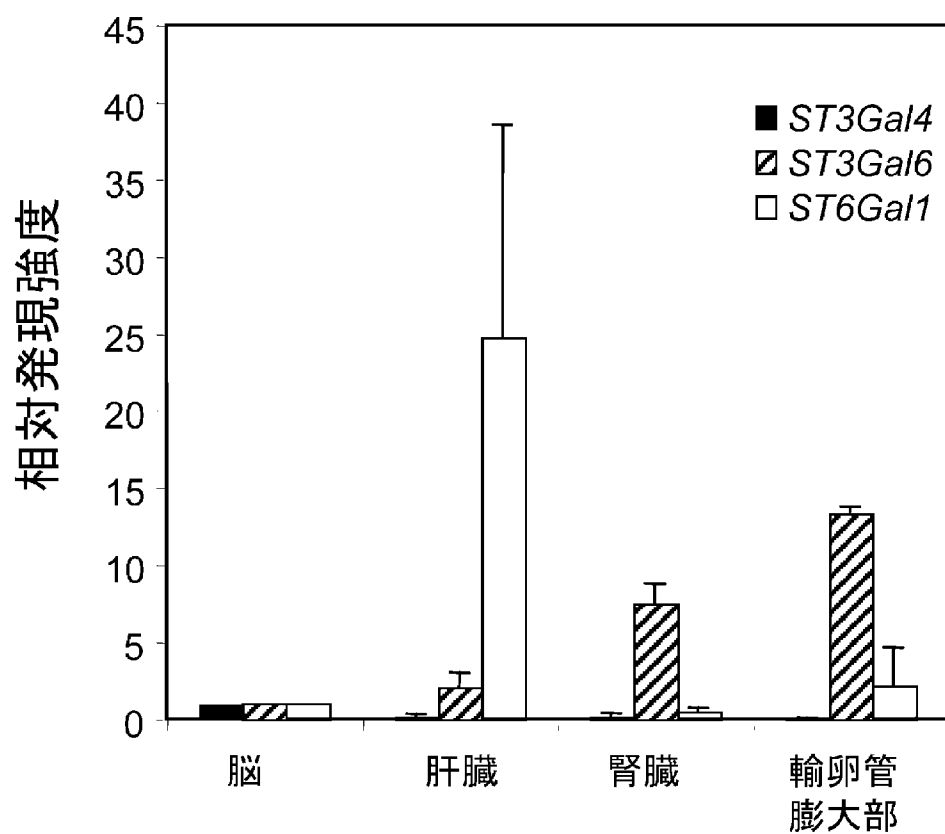
[請求項12] 請求項1～9のいずれか一項に記載のトランスジェニック鳥類の卵白から目的タンパク質を回収することを特徴とする、タンパク質の生産法。

[図1]

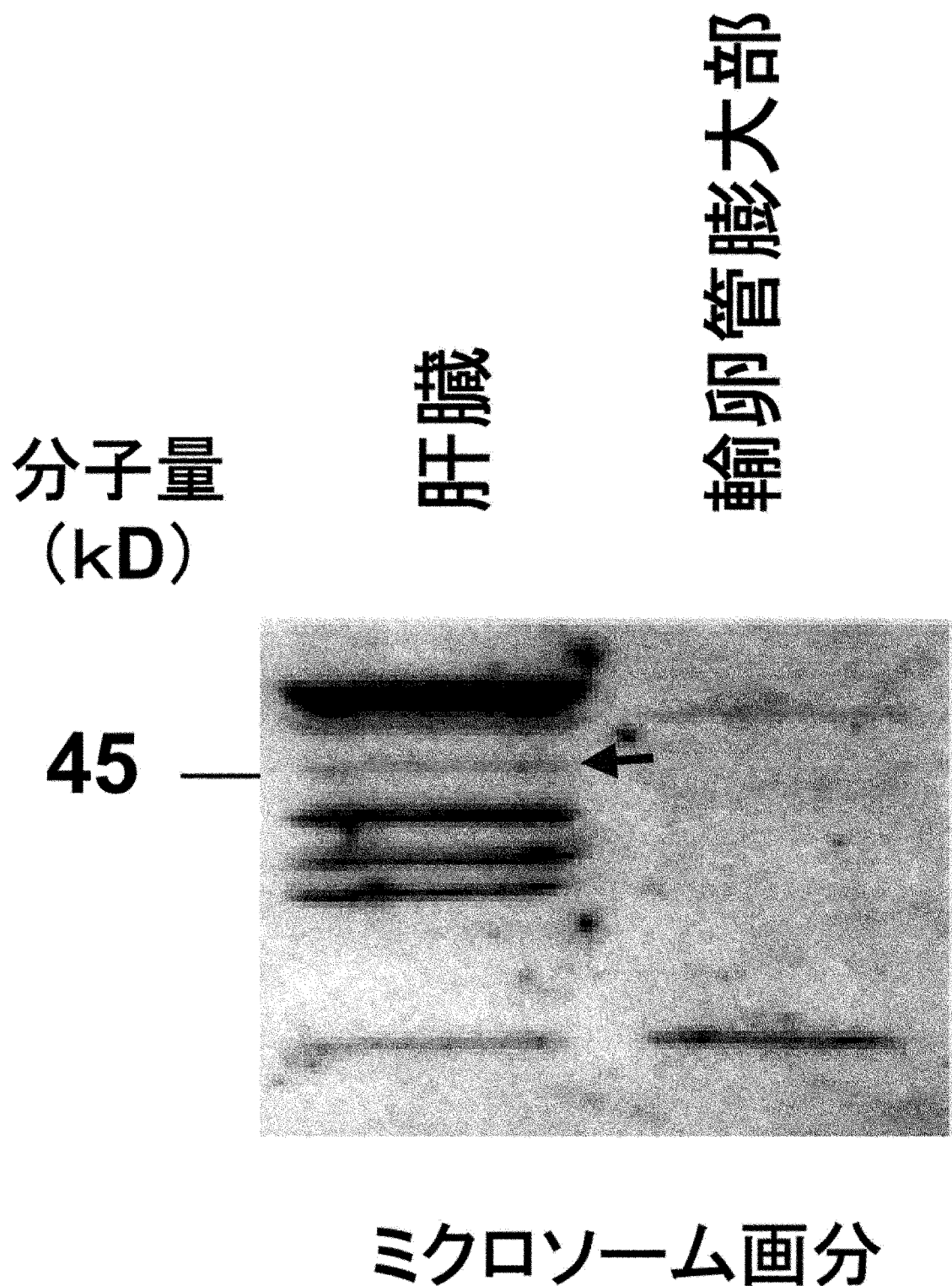
(A)



(B)

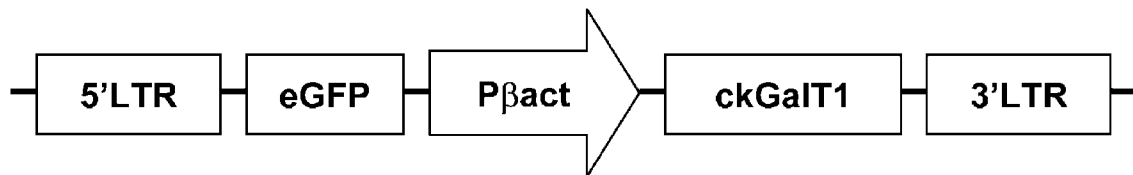


[図2]



[図3]

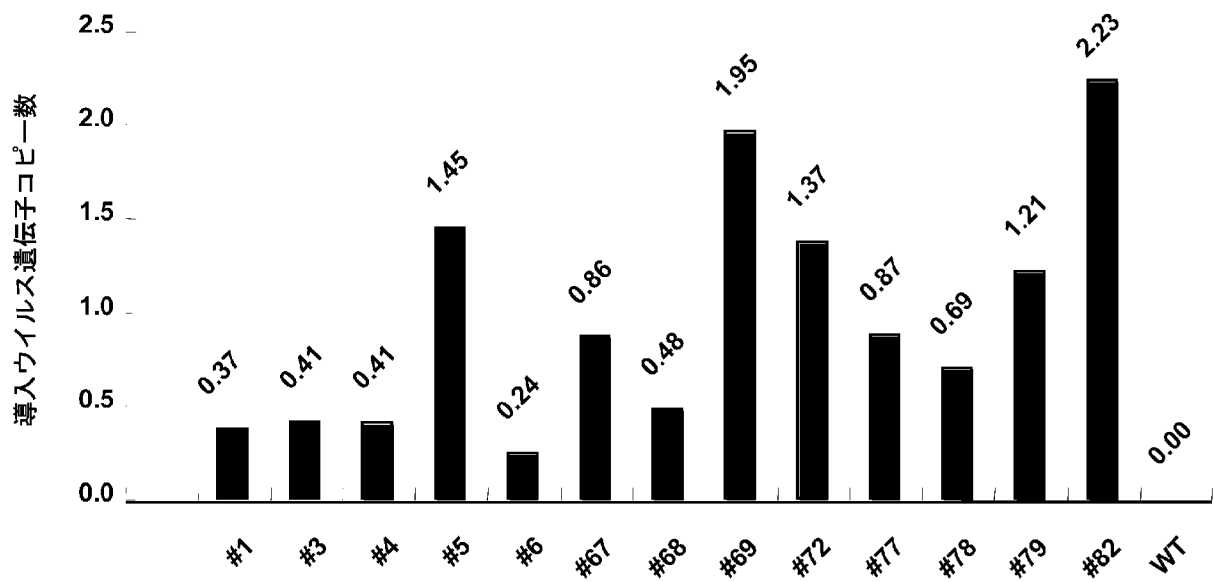
(A)

pQMSCV/eG Δ AGaIT1

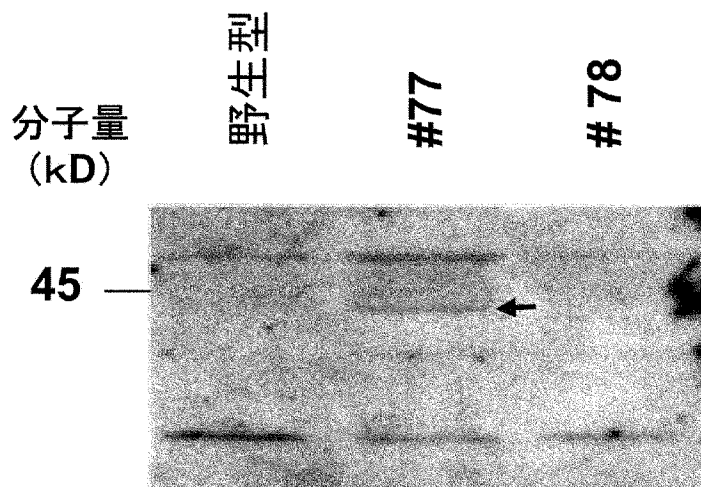
(B)

試行	ウイルス タイター [cfu/ml]	導入個体数	孵化個体数(孵化率)
1	4.5×10^8	34	2 (6%)
2	5.6×10^8	33	7 (21%)
3	7.5×10^8	20	7 (35%)
4	1.3×10^9	38	9 (24%)
5	9.2×10^8	39	16 (36%)
合計		164	41 (25%)

[図4]



[図5]



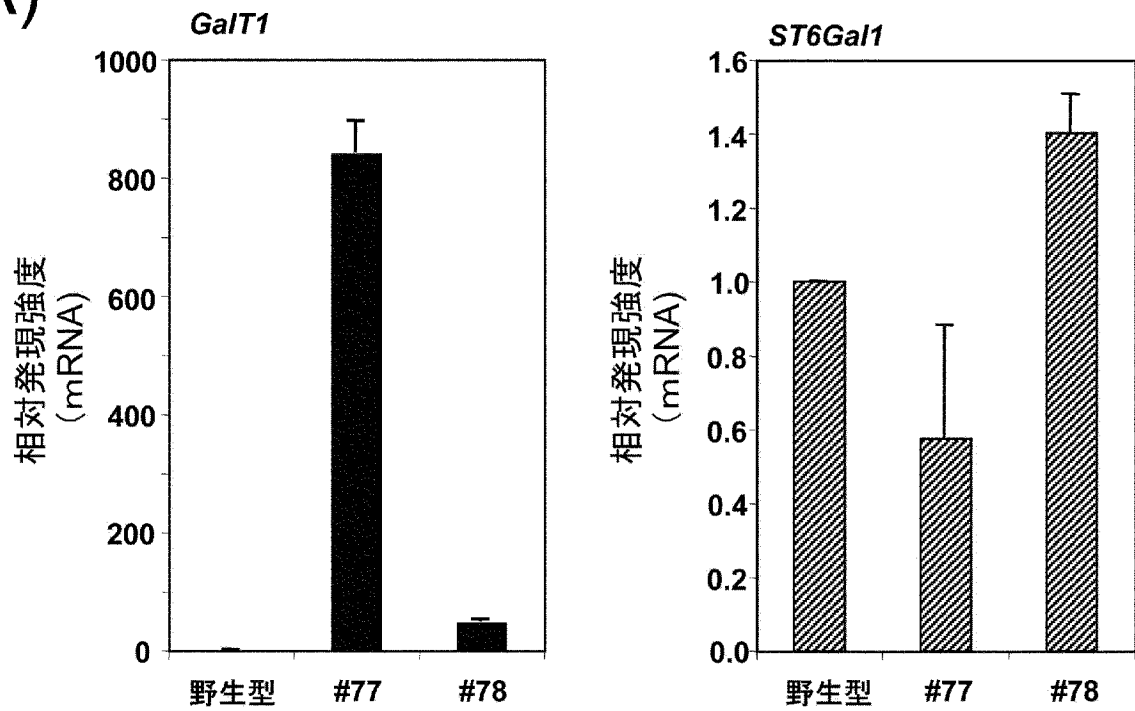
(1.81)

(0.53)

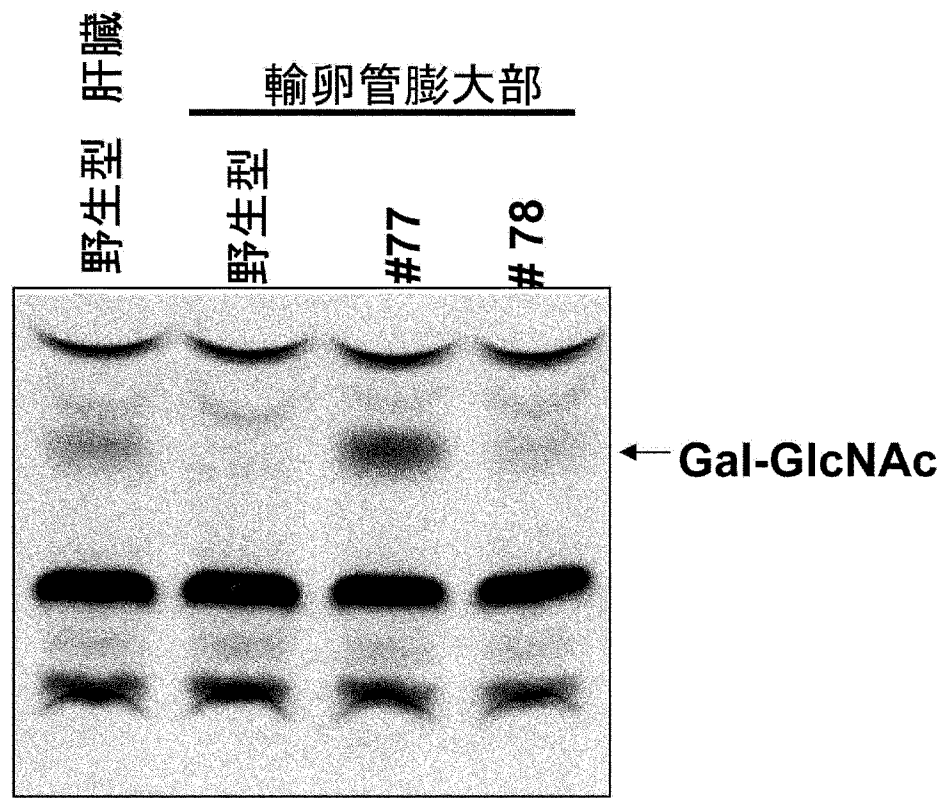
輸卵管膨大部でのコピー数

[図6]

(A)

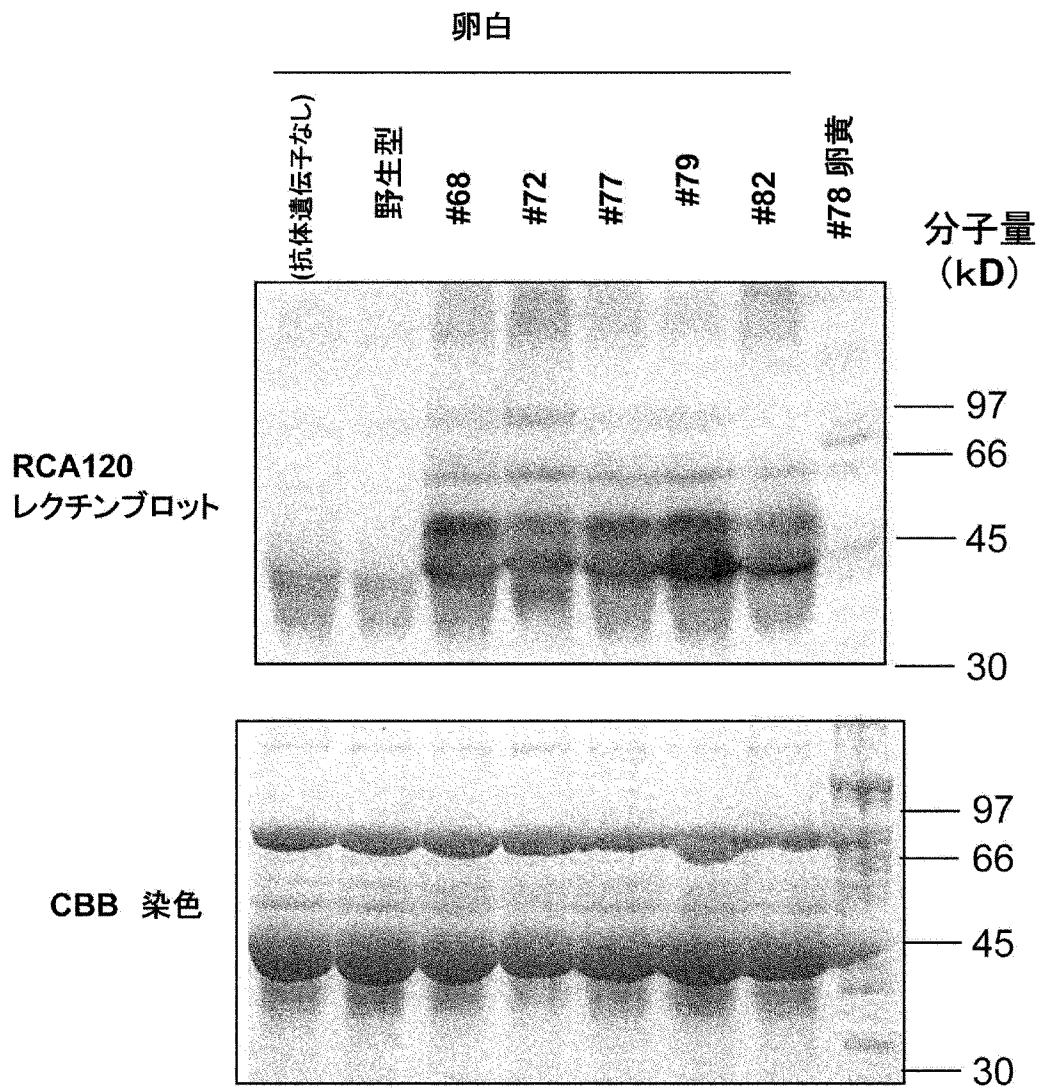


(B)

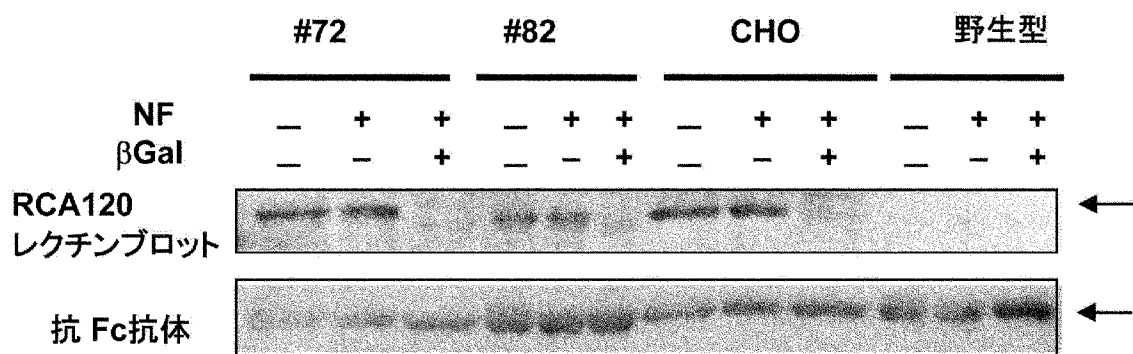


[図7]

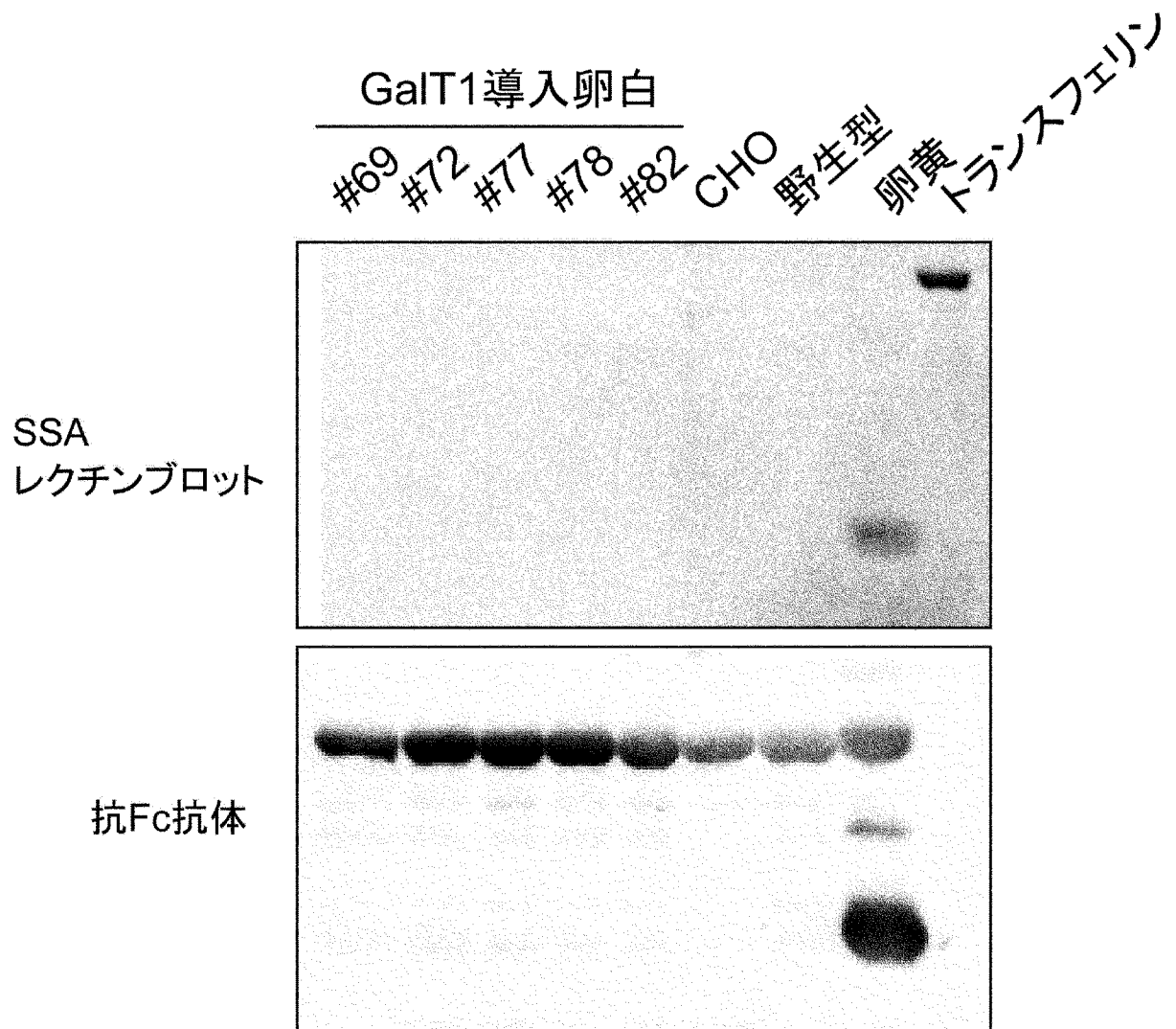
(A)



(B)



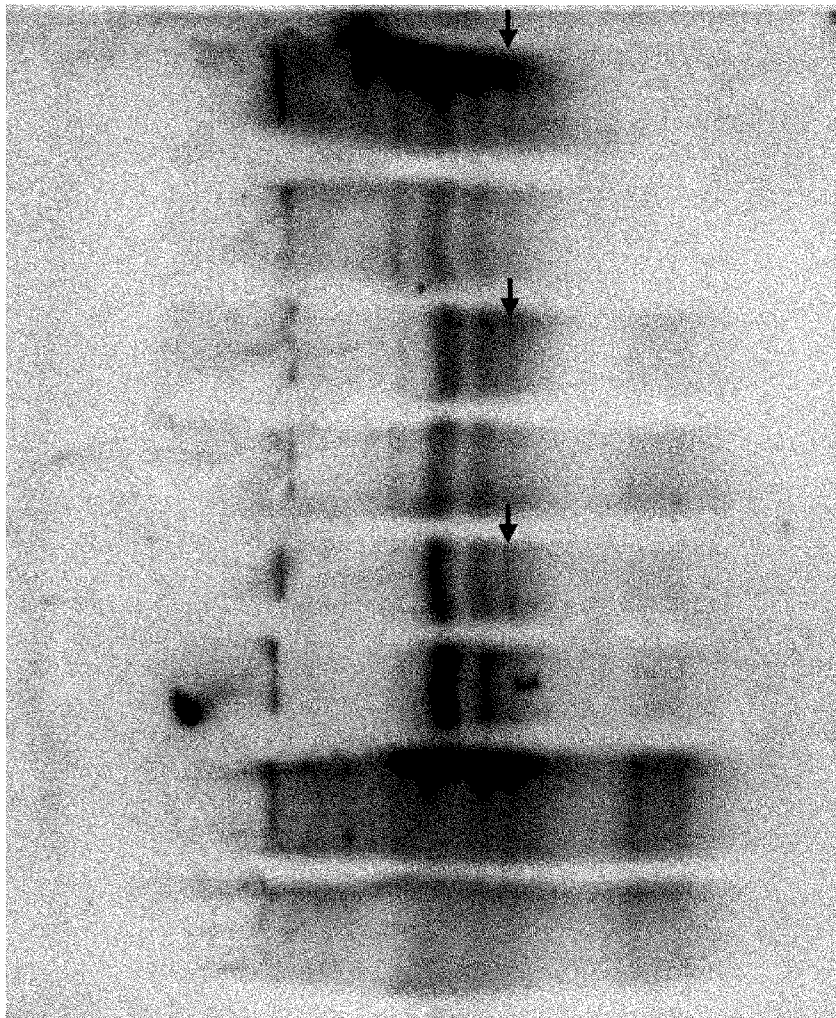
[図8]



[図9]

陰極

陽極



CHO

CHO NF处理

#69

#69 NF处理

#72

#72 NF处理

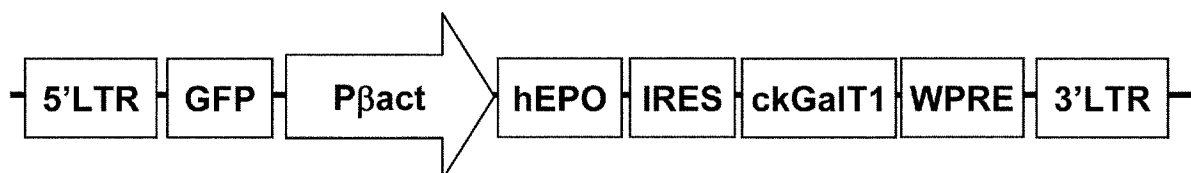
野生型

野生型 NF处理

[図10]

(A)

pMSCV/GΔAhEPO-IRES-GalT-W

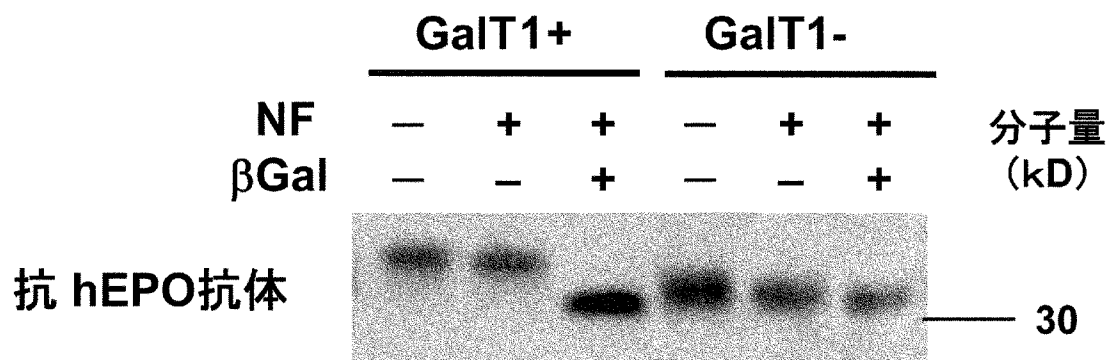


(B)

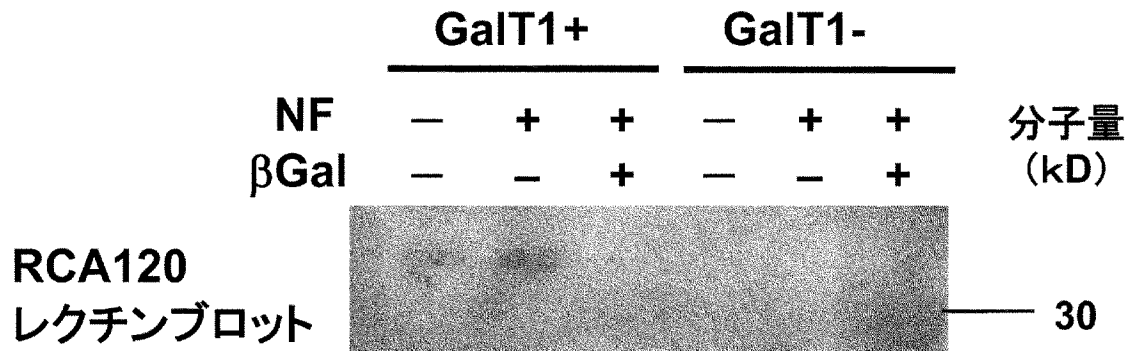
試行	ウイルス タイター [cfu/ml]	導入個体数	孵化個体数(孵化率)
1	5.0×10^7	20	2 (10%)
2	1.0×10^7	20	6 (30%)
合計		40	8 (20%)

[図11]

(A)



(B)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/004183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K67/027(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K67/027, C12P21/02, C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/SCISEARCH/BIOENG/WPIDS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KODAMA D et al., Production of human erythropoietin by chimeric chickens., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008.03, vol. 367, p. 834-839	1-12
Y	Yoshinori KAWABE et al., "Transgenic Niwatori ga Seisan shita Kumikae Kotai no Tosa Kaiseki", Abstracts of Autumn Meeting of the Society of Chemical Engineers, Japan (CD-ROM), 2006, Vol.38, Va073	1-12
Y	SHAPER N L et al., The chicken genome contains two functional nonallelic beta1, 4-galactosyltransferase genes., J. Biol. Chem., 1997, vol. 272, p. 31389-31399	3-9, 12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 October, 2009 (06.10.09)

Date of mailing of the international search report
13 October, 2009 (13.10.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/004183

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LILLICO S G et al., Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, vol. 104, 1771-1776	8, 9, 12
A	ZHU L et al., Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens., Nat. Biotechnol., 2005, vol. 23, p. 1159-1169	1-12
A	RAPP J C et al., Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens., Transgenic Res., 2003, vol. 12, p. 569-575	1-12
P, X	Takako SASAMOTO et al., "Transgenic Niwatori ni yoru Tanpakushitsu Iyaku hin no Seisan", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Chubu Shibu Dai 154 Kai Reikai Wakate Symposium Yoshishu, 29 November, 2008 (29.11.08), page 18	1-12
P, X	Akifumi MIZUTANI et al., "Niwatori Ranpaku ni Seisan shita Kumikae Kotai no Tosa Kaihen", Abstracts of Annual Meeting of the Society of Chemical Engineers, Japan (CD-ROM), 18 February, 2009 (18.02.09), Vol.74, S304	1-12
P, X	Ken'ichi NISHIJIMA, "Idenshi Donyu Chorui no Ranchu eno Iyaku hin Totanpakushitsu Seisan", Kagaku to Seibutsu, 01 March, 2009 (01.03.09), Vol.47, No.3, pages 163 to 168	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/004183

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Electronic data base consulted during the international search
(name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01K67/027 (2006.01)i, C12P21/02 (2006.01)i, C12N15/09 (2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01K67/027, C12P21/02, C12N15/00 - 15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/SCISEARCH/BIOENG/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII),
医学・薬学予稿集全文データベース, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	KODAMA D et al., Production of human erythropoietin by chimeric chickens., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008.03, vol. 367, p. 834-839	1-12
Y	河辺 佳典、他, トランスジェニックニワトリが生産した組換え抗体の糖鎖解析, 化学工学会秋季大会研究発表講演要旨集 (CD-ROM), 2006, vol. 38, Va073	1-12

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 1 0 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

1 3 . 1 0 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中村 正展

4 B

3 5 3 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	SHAPER N L et al., The chicken genome contains two functional nonallelic betal,4-galactosyltransferase genes., J. Biol. Chem., 1997, vol. 272, p. 31389-31399	3-9, 12
A	LILLICO S G et al., Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, vol. 104, 1771-1776	8, 9, 12
A	ZHU L et al., Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens., Nat. Biotechnol., 2005, vol. 23, p. 1159-1169	1-12
A	RAPP J C et al., Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens., Transgenic Res., 2003, vol. 12, p. 569-575	1-12
P X	笹本 貴子、他, トランスジェニックニワトリによるタンパク質医薬品の生産, 日本農芸化学会 中部支部 第154回例会 若手シンポジウム 要旨集, 2008.11.29, p. 18	1-12
P X	水谷 昭文、他, ニワトリ卵白に生産した組換え抗体の糖鎖改変, 化学工学会年会研究発表講演要旨集(CD-ROM), 2009.02.18, vol. 74, S304	1-12
P X	西島 謙一, 遺伝子導入鳥類の卵中への医薬品糖タンパク質生産, 化学と生物, 2009.03.01, vol. 47, no. 3, p. 163-168	1-12