

(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
2017年6月29日(29.06.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/111144 A1

- (51) 国際特許分類:
A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/088590
- (22) 国際出願日: 2016年12月22日(22.12.2016)
- (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 2015-254361 2015年12月25日(25.12.2015) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所
(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 大石 勲(OISHI Isao); 〒5638577 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 国立研究開発法人産業技術総合研究所 関西センター内 Osaka (JP). 吉井 京子(YOSHII Kyoko); 〒5638577 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 国立研究開発法人産業技術総合研究所 関西センター内 Osaka (JP).

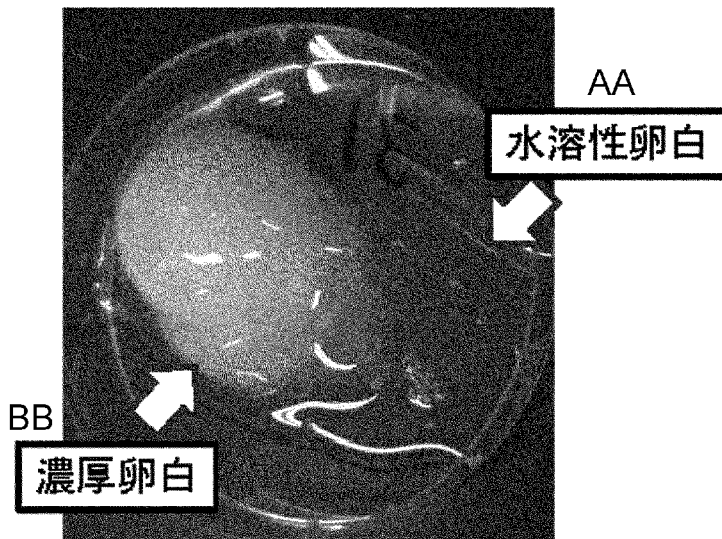
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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: GENETICALLY-MODIFIED POULTRY EGG

(54) 発明の名称: 遺伝子改変家禽卵



AA Water-soluble albumen

BB Dense albumen

(57) Abstract: Provided are a poultry knock-in egg and knock-out egg. The present invention pertains to a knock-out poultry egg in which at least one oviduct-specific gene has been knocked out, said gene being selected from the group consisting of ovalbumin, ovomucoid, ovomucin, ovotransferrin, ovoinhibitor, and lysozyme, and at least one egg allergen protein has been reduced or eliminated, said protein being selected from the group consisting of ovalbumin, ovomucoid, ovomucin, ovotransferrin, ovoinhibitor, and lysozyme.

(57) 要約: 家禽のノックイン卵及びノックアウト卵を提供する。オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びビリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも1種の卵管特異的遺伝子がノックアウトされ、かつ、オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びビリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも1種の卵内アレルゲンタンパク質が低減又は消失されたノックアウト家禽の卵に関する。

明 細 書

発明の名称： 遺伝子改変家禽卵

技術分野

[0001] 本発明は、ノックアウト家禽の卵及びそれに由来する個体、ノックイン家禽の卵並びに濃厚卵白に関する。

また、本発明は、外因性遺伝子の発現産物の調製方法に関する。

背景技術

[0002] これまでオボアルブミン翻訳開始点上流2.8kbpあるいはこの2.8kbpに更に上流のestrogen-responsive enhancer elementを結合したプロモーターにより卵内にヒトインターフェロン β を発現誘導する試みが行われている(非特許文献1)。この例では遺伝子導入はノックインではなく、レンチウイルスベクターを用いて行われており、ゲノム上の様々な場所に、また場合によっては複数個のベクター遺伝子が挿入されていることが示されている。このような遺伝子導入形態と一致して、卵内に分泌されるヒトインターフェロン β の濃度は大きくばらついており、6羽のニワトリの濃度平均が3.5-426 μ g/mlである。さらに、同一個体由来の卵であっても非常に濃度にゆらぎがありインターフェロン β の発現が極めて不安定であることがデータから読み取れる。更に、染色体上の様々な位置に挿入されているため、ジーンサイレンシング等の効果を受け、G1ニワトリでインターフェロン β を比較的多く発現したものの子孫(G2)が、総じてその発現量を減らす傾向が認められる。

[0003] 非特許文献2では全身性に発現するアクチンプロモーターを用い、レトロウイルスベクターを用いて全身にFv-Fc蛋白質を発現するトランスジェニックキメラニワトリ(G0)を作製している。このG0ニワトリの中には5mg/mlと高濃度のFv-Fc蛋白質を発現するものも認められたが、ウイルス感染をニワトリ胚において行っている為、遺伝子の導入の有無、挿入コピー数、挿入位置が同一個体の各細胞でまちまちになるというモザイク状の遺伝子導入となっている。このため、高濃度の蛋白質を発現するG0キメラ個体の子孫のトランスジ

エニック個体は挿入遺伝子の数や位置がまちまちであり、G0キメラ個体の性質を完全に引き継ぐことはありえず、実際G1世代では2mg/ml以下にG1世代では0.8mg/ml以下に留まっている。また、ウイルス感染したキメラニワトリの生殖系細胞において外因性遺伝子の導入がなされていないことも多い。したがって、たまたま1羽あるいは数羽程度の蛋白質高発現ニワトリをG0世代に得ることが可能であっても、同じ性質、遺伝情報を有する個体を増やすことはできない。このようなG0個体間あるいはG0-G1世代間の不均一性は、外来蛋白質を生産するニワトリを大量に飼育することで多くの卵を得て蛋白質の大量生産を行ういわゆる「動物工場」を構築する上で致命的な欠点である。

- [0004] 非特許文献4では卵管特異的遺伝子オボアルブミンを、TALEN法を用いて遺伝子破壊した例が示されている。しかし、この文献ではオボアルブミンがヘテロ型(+/-)で欠損したヒヨコが得られたことを示すに留まり、このような家禽が将来卵を産生し得るか、またnull(-/-)の遺伝子型の卵やこれに由来する個体を得られるか、更にはホモノックアウト雌(-/-)が卵を産むか、このオボアルブミン蛋白質を消失した卵から個体を生じ得るか、予見できない。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1: Lillico, S.G. et al. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1771-1776 (2007)

非特許文献2: Kamihira et al. High-Level Expression of Single-Chain Fv-Fc Fusion Protein in Serum and Egg White of Genetically Manipulated Chickens by Using a Retroviral Vector. *Journal of Virology*, p.10864-10874 (2005)

非特許文献3: van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE et al: Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 2006, 441(7094):766-769.

非特許文献4 : Park, T. S., Lee, H. J., Kim, K. H., Kim, J. S. & Han, J. Y. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. Proc Natl Acad Sci U S A. 111, 12716-12721 (2014).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、卵管特異的遺伝子にコードされるタンパク質の発現量を低減もしくは消失させた家禽卵を提供することを目的とする。

また、本発明は、外因性遺伝子の発現が安定し、かつ、遺伝子産物発現量の多い家禽卵を提供することを目的とする。

さらに、本発明はノックイン技術により鶏卵に外来遺伝子産物を発現した際に効率良く外来遺伝子産物を回収する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、以下のノックアウト家禽の卵及びノックイン家禽の卵を提供するものである。またノックイン家禽の卵から効率良く外来遺伝子産物を調製する方法を提供するものである。

本発明は、一態様において、

〔1〕 オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも1種の卵管特異的遺伝子がノックアウトされ、かつ、オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも1種の卵内アレルゲンタンパク質が低減又は消失されたノックアウト家禽の卵に関する。

[0008] ここで、本発明のノックアウト家禽の卵は、一実施の形態において、

〔2〕 上記〔1〕に記載のノックアウト家禽の卵であって、

前記ノックアウトされた卵管特異的遺伝子をコードする塩基配列において、PAM配列より5'側または3'側の領域近傍に塩基の欠失、置換、または挿入を有していることを特徴とする。

また、本発明のノックアウト家禽の卵は、一実施の形態において、

〔3〕上記〔1〕または〔2〕に記載のノックアウト家禽の卵であって、前記卵管特異的遺伝子がホモノックアウトされており、前記卵管特異的遺伝子の遺伝子型がnull(-/-)であることを特徴とする。

また、本発明のノックアウト家禽の卵は、一実施の形態において、〔4〕上記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のノックアウト家禽の卵であって、

前記卵管特異的遺伝子がオボアルブミンであることを特徴とする。

[0009] また、本発明のノックアウト家禽の卵は、一実施の形態において、

〔5〕上記〔4〕に記載のノックアウト家禽の卵であって、

オボアルブミンをコードする塩基配列において、配列番号1 (OVATg1)に示される塩基配列に相当する領域およびその近傍領域に塩基の欠失、置換、または挿入を有していることを特徴とする。

また、本発明のノックアウト家禽の卵は、一実施の形態において、〔6〕上記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のノックアウト家禽の卵であって、

前記卵管特異的遺伝子がオボムコイド遺伝子であることを特徴とする。

また、本発明のノックアウト家禽の卵は、一実施の形態において、

〔7〕上記〔6〕に記載のノックアウト家禽の卵であって、

オボムコイドをコードする塩基配列において、配列番号6 (OVMTg2)に示される塩基配列に相当する領域およびその近傍領域に塩基の欠失、置換、または挿入を有していることを特徴とする。

また、本発明のノックアウト家禽の卵は、一実施の形態において、

〔8〕上記〔6〕または〔7〕に記載のノックアウト家禽の卵であって、内在性のオボムコイドを実質的に含まないことを特徴とする。

[0010] また、本発明は、別の態様において、

〔9〕上記〔1〕～〔8〕のいずれかに記載のノックアウト家禽の卵由来のノックアウト家禽に関する。

[0011] また、本発明は、別の態様において、

〔１０〕 卵管特異的遺伝子プロモーターの制御下に外因性遺伝子がホモ又はヘテロでノックインされ、かつ、外因性遺伝子の発現産物が卵内で安定高発現しているノックイン家禽の卵であって、

前記卵管特異的遺伝子プロモーターが、オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも１種の卵管特異的遺伝子のプロモーターである、ノックイン家禽の卵に関する。

[0012] ここで、本発明のノックイン家禽の卵は、一実施の形態において、

〔１１〕 上記〔１０〕に記載のノックイン家禽の卵であって、

前記卵管特異的遺伝子プロモーターが、オボアルブミン遺伝子のプロモーターであり、前記外因性遺伝子が薬剤耐性遺伝子とともにオボアルブミン遺伝子のエクソン２に挿入されていることを特徴とする。

また、本発明のノックイン家禽の卵は、一実施の形態において、

〔１２〕 上記〔１０〕または〔１１〕に記載のノックイン家禽の卵であって、

前記外因性遺伝子が、オボアルブミンをコードする塩基配列における配列番号１（OVATg1）に示される塩基配列に相当する領域およびその近傍、または、配列番号２４（OVATg2）に示される塩基配列に相当する領域およびその近傍に挿入されていることを特徴とする。

また、本発明のノックイン家禽の卵は、一実施の形態において、

〔１３〕 上記〔１０〕～〔１２〕のいずれかに記載のノックイン家禽の卵であって、

前記外因性遺伝子によりコードされるタンパク質が、卵１個あたり１mg以上で含まれることを特徴とする。

また、本発明のノックイン家禽の卵は、一実施の形態において、

〔１４〕 上記〔１０〕～〔１３〕のいずれかに記載のノックイン家禽の卵であって、

前記外因性遺伝子の発現産物が濃厚卵白に優位に発現することを特徴とす

る。

また、本発明のノックイン家禽の卵は、一実施の形態において、
〔１５〕上記〔１０〕～〔１４〕のいずれかに記載のノックイン家禽の卵であって、

前記外因性遺伝子が、インターフェロン β 、免疫グロブリン、または、コラーゲンをコードする遺伝子であることを特徴とする。

また、本発明のノックイン家禽の卵は、一実施の形態において、
〔１６〕上記〔１０〕～〔１５〕のいずれかに記載のノックイン家禽の卵であって、

前記外因性遺伝子がヒト由来の遺伝子であることを特徴とする。

[0013] また、本発明は、別の態様において、

〔１７〕オボアルブミン遺伝子プロモーターの制御下に外因性遺伝子がホモ又はヘテロでノックインされたノックイン家禽の卵由来の濃厚卵白であって、

安定高発現している前記外因性遺伝子の発現産物を優位に含む、濃厚卵白に関する。

[0014] また、本発明は、別の態様において、

〔１８〕外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法であって、

（ａ）家禽始原生殖細胞の卵管特異的遺伝子プロモーターの制御下に前記外因性遺伝子をノックインする工程と、

（ｂ）前記家禽生殖細胞を用いて、前記卵管特異的遺伝子プロモーターの制御下に前記外因性遺伝子をホモ又はヘテロでノックインした雌家禽を作製する工程と、

（ｃ）前記雌家禽から得られた前記外因性遺伝子を発現する家禽卵を得る工程と

を含む、方法に関する。

[0015] ここで、本発明の外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発

現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法は、一実施の形態において、

〔19〕上記〔18〕に記載の外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法であって、

前記工程(a)が、(i)前記卵管特異的遺伝子プロモーターの制御下にある翻訳開始点の5'側領域、前記外因性遺伝子、薬剤耐性遺伝子ユニット、および、前記翻訳開始点の3'側領域を含むドナーコンストラクトと、(ii)標的配列、および、異なる薬剤耐性遺伝子ユニットを含むベクターとを用いて、前記外因性遺伝子をゲノム編集により導入する工程であることを特徴とする。

また、本発明の外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法は、一実施の形態において、

〔20〕上記〔19〕に記載の外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法であって、

前記工程(a)における前記卵管特異的遺伝子プロモーターが、オボアルブミン遺伝子プロモーターであって、

前記工程(d)が、前記家禽卵の濃厚卵白から前記外因性遺伝子の発現産物を回収する工程であることを特徴とする。

また、本発明の外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法は、一実施の形態において、

〔21〕上記〔19〕または〔20〕に記載の外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法であって、

前記工程(a)が、(i)オボアルブミン翻訳開始点の5'側2.8kb、前記外因性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子ユニット、および、オボアルブミン翻訳開始点の3'側3.0kbを含むドナーコンストラクトと、(ii)前記標的配列と

しての配列番号 24 に示される塩基配列、および、ネオマイシン耐性遺伝子ユニットを含むベクターとを用いて、前記外因性遺伝子をCRISPRにより導入する工程であることを特徴とする。

[0016] また、本発明は、別の態様において、

〔22〕 ノックイン家禽の卵より外因性遺伝子の発現産物を調製する方法であって、

上記〔18〕～〔21〕のいずれかに記載の方法における前記工程(c)の後に、(d)前記家禽卵から前記外因性遺伝子の発現産物を回収する工程をさらに含む、方法に関する。

発明の効果

[0017] 本発明のノックイン家禽の卵は、全身で同一場所に同一の外因性遺伝子(非家禽由来の遺伝子)挿入がなされたノックイン家禽個体により生産され、個体間での蛋白質発現量の差異は小さく、世代を超えてその遺伝情報と形質を正しく伝播することが出来る。さらに、遺伝子ノックインの位置を卵管特異的遺伝子にすることで外因性遺伝子発現を卵管に限局できる。このため全身性に発現させた場合と比べて発生過程やニワトリの健康に影響をおよぼす可能性が明らかに少なく、優れている。加えてオボムコイドなど卵白で高発現する遺伝子の制御下に外因性遺伝子を発現させることで外因性遺伝子の発現効率が高くなり、さらに好ましい。加えて、遺伝子ノックインをゲノム編集により行くと効率良くノックインニワトリが樹立可能であるが、このような新しい技法を用いても卵管に外来遺伝子を発現可能なこと、卵白に外来遺伝子発現産物が蓄積されることを確認した。また、外来遺伝子由来産物が卵白内の濃厚卵白に多く存在することを初めて明らかにし、これにより外来遺伝子産物を含む卵、好ましい実施形態では卵白遺伝子の遺伝子座に外来遺伝子をノックインした卵の濃厚卵白を含む領域を回収することで効率良く外来遺伝子由来産物を回収することができる。

本発明のノックアウト家禽の卵は、ノックアウトされる遺伝子が卵管特異的遺伝子であり、発生に影響することが懸念されるが、本発明者は、このよ

うなノックアウト家禽の卵が得られることを確認した。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]ニワトリオボアルブミン遺伝子の標的配列(0VATg1の標的配列)。大文字がsgRNA認識部位、隣接する下線部がPAM配列を示す。

[図2]ニワトリオボムコイド遺伝子の標的配列(0VMTg2の標的配列)。大文字がsgRNA認識部位、隣接する下線部がPAM配列を示す。

[図3]CRISPRによるオボアルブミン遺伝子破壊例。大文字(下線)がsgRNA認識部位、隣接する囲い部分がPAM配列を示す。変異した配列の欠失部は-(ハイフン)、変異部は大文字で表記。0VATg1のMetは翻訳開始部位を示す。

[図4A]CRISPRによるオボムコイド遺伝子破壊例。大文字(下線)がsgRNA認識部位、隣接する囲い部分がPAM配列を示す。

[図4B]上段：オボムコイド遺伝子が破壊されたニワトリの例。写真の移植始原生殖細胞由来ニワトリ(黒)のオボムコイド遺伝子は片アレルで図2のTg2領域の5塩基が欠損している。ニワトリゲノムの当該領域をセンス側、アンチセンス側それぞれから塩基配列を解析した結果を示す。下段：ニワトリ個体に認められたオボムコイド遺伝子変異の例(F1ニワトリ)。1から31塩基の欠損が認められた。

[図5A]オボアルブミン遺伝子座へのヒトインターフェロン β 遺伝子ノックインとゲノムPCRによるノックインの証明。プライマー1(P1)～プライマー8(P8)は以下の配列に対応。P1:配列15、P2:配列17、P3:配列16、P4:配列14、P5:配列18、P6:配列20、P7:配列21、P8:配列19。Nested PCRの結果、ノックイン始原生殖細胞(PGCs)由来ゲノムにのみ想定サイズの増幅産物を認める(写真、矢印)。

[図5B]キメラニワトリ精子におけるオボアルブミン遺伝子座へのヒトインターフェロン β 遺伝子ノックインの証明。4羽のキメラニワトリ(411-414)、1羽のネガティブコントロールニワトリ(416、NC)の精液ゲノム及びノックイン細胞(PCIFNKI#4)ゲノムを配列18と19(3' UTR)、配列15と14(5' 0VAp_out-IFN)、配列15と22(5' 0VAp_out-OVA(ATG))のプライマーを用いて増幅

した。予期されるサイズに出現したバンドを*で示す。411, 412においてポジティブコントロールと同程度の相対強度のノックインシグナルを認める。

[図5C]オボアルブミン遺伝子座にヒトインターフェロン β 遺伝子がノックインされたニワトリ。図5Bの411と412の後代ニワトリ(雌)の写真および、後代血液由来ゲノムをPCR解析し、オボアルブミン遺伝子座にIFNドナーコンストラクトがノックインされたことを示す。野生型(WT: ネガティブコントロール)ニワトリの血液、ノックイン後代(KI)ニワトリの血液ゲノム及びノックイン細胞(KI PGC: ポジティブコントロール)由来ゲノムを配列18と19(ノックイン3' 領域)、配列15と14(ノックイン5' 領域)、配列15と22(内在性オボアルブミン)のプライマーを用いて増幅した。予期されるサイズに出現したバンドを*で示す。411, 412後代においてポジティブコントロールと同パターンのシグナルを認め、後代ニワトリのオボアルブミン遺伝子座にIFNドナーコンストラクトがノックインされたと判断できる。

[図6A]ニワトリオボアルブミン遺伝子の標的配列(2ヶ所, OVATg1とOVATg2の標的配列)。大文字がsgRNA認識部位、隣接する下線部がPAM配列を示す。

[図6B]ニワトリ始原生殖細胞オボアルブミン遺伝子座への遺伝子ノックインの効率化。導入群1と導入群2ではノックインの効率は変わっておらず、細胞数は導入群2の方が多いことから、導入群2の導入法がより好ましい。導入群2と導入群3では導入群3の方がノックイン効率が高いと考えられ、導入群3の導入法がより好ましい。

[図7]オボアルブミン遺伝子座へのヒト免疫グロブリン遺伝子ノックインとゲノムPCRによるノックインの証明。プライマー1(P1)~プライマー8(P8)は以下の配列に対応。P1:配列15、P2:配列17、P3:配列29、P4:配列28、P5:配列18、P6:配列20、P7:配列21、P8:配列19。Nested PCRの結果、ノックイン始原生殖細胞(PGCs)由来ゲノムにのみ想定サイズの増幅産物を認める(写真、矢印)

[図8]オボアルブミン遺伝子座へのヒトコラーゲン遺伝子ノックインとゲノムPCRによるノックインの証明。プライマー1(P1)~プライマー8(P8)は以下の配列に対応。P1:配列15、P2:配列17、P3:配列29、P4:配列28、P5:配列18、P6

:配列20、P7:配列21、P8:配列31。Nested PCRの結果、ノックイン始原生殖細胞(PGCs)由来ゲノムにのみ想定サイズの増幅産物を認める(写真、矢印)

[図9]インターフェロン β ノックイン雌ニワトリの生産する卵の像。卵黄周囲の濃厚卵白に白濁が認められる。

[図10]卵白成分の抗ヒトインターフェロン β 抗体を用いたウェスタンブロット像。ノックインニワトリ由来卵に組換えヒトインターフェロン β (矢印部)が発現し、水溶性卵白よりも濃厚卵白において単位体積あたりより多くのヒトインターフェロン β 蛋白質が存在する。相対濃度で濃厚卵白のほうが水溶性卵白の100倍多いことがわかる。

[図11]ヒトインターフェロン β ノックインニワトリの産んだ卵白におけるヒトインターフェロン β の分布。複数のニワトリ由来卵(KI egg1, 2)において水溶性卵白よりも濃厚卵白で多くのインターフェロン β 蛋白質が認められる(囲い部分)。濃厚卵白中の組換えヒトインターフェロン β は約50mg/mlの濃度で存在するオボアルブミン蛋白質の十分の一であるから(黒矢印)約5mg/ml程度と推定される。

[図12]インターフェロン β ノックインニワトリの産む卵に含まれるインターフェロン β 蛋白質発現の安定性。1週間に渡り(d1~d7)、卵を採取し、濃厚卵白に含まれるヒトインターフェロン β をCBB染色により同定した。期間中安定したインターフェロン β の発現が認められた。

[図13]濃厚卵白遠心後の白色沈殿像 無処理1および様々な処理(2-10)を加えたインターフェロン β ノックインニワトリの産む卵の濃厚卵白を遠心し、白色沈殿の量を比較した。2-10はいずれも1に比べると白色沈殿量が減少している。図13ではそれぞれのチューブに濃厚卵白液200 μ lを加え、3Mの飽和アルギニン溶液4倍量(800 μ l)を加え転倒混和したもの(チューブ2)、3Mの飽和アルギニン溶液4倍量(800 μ l)を加え超音波破碎を行ったもの(チューブ3)、少量のアルギニン(20mg)を加え転倒混和したのちPBSにより1mlにしたもの(チューブ4)、少量のアルギニン塩酸塩(20mg)を加え転倒混和したのちPBSにより1mlにしたもの(チューブ5)、PBSにより1mlにし、超音波

破碎を行ったもの(チューブ6)、飽和量以上のアルギニン塩酸塩(200mg)を加えて転倒混和したもの(チューブ7)、3Mの飽和アルギニン溶液2倍量(400 μ l)を加え超音波破碎を行ったもの(チューブ8)、少量のアルギニン塩酸塩(20mg)を加え超音波破碎したもの(チューブ9)、少量の食塩(40mg)を加え超音波破碎したもの(チューブ10)である。20k $\times$ Gで15分遠心すると白色沈殿は認められるが、いずれも無処理(チューブ1)の場合より減少しており、特に超音波破碎を行ったもののうちチューブ3, 6, 8, 9で顕著に減少していた。

[図14]様々な処理を行った濃厚卵白上清の電気泳動像。レーン0は遠心処理を行っていない濃厚卵白をレーン1-10は図13のチューブ1-10の上清をそれぞれ泳動に供される大元の卵白量を同一にして泳動したものである。黒矢印がヒトインターフェロン β のバンドを示す。

[図15]ヒトインターフェロン β ノックインニワトリ由来卵に含まれるヒトインターフェロン β の活性。濃厚卵白粗精製物、濃厚卵白遠心上清、水溶性卵白いずれにおいてもヒトインターフェロン β の活性が認められる。

[図16]オボムコイドヘテロノックアウト(G1世代:ORF5塩基欠損)雄、雌とその後代に認められるオボムコイドヘテロ、ホモノックアウトおよび野生型ニワトリのゲノム。

[図17]異なるG1個体から得られた濃厚卵白の電気泳動像。野生型ニワトリ(ctrl)由来濃厚卵白、5羽(#584, #766, #714, #645, #640)のヒトインターフェロン β ノックインニワトリ由来の濃厚卵白をそれぞれ電気泳動している。矢印がヒトインターフェロン β のバンドを示す。

[図18]ヒトインターフェロン β ノックインニワトリ由来卵に含まれるヒトインターフェロン β (下段)と市販の組換えヒトインターフェロン β (上段)との活性比較。バイオアッセイ用細胞の培養上清をQuanti-Blue基質液に添加した像。バイオアッセイ時に細胞に添加する卵白上清ならびに市販インターフェロン β を5倍ずつ段階的に希釈しており、基質液の変色から0.01 μ g/ μ lの市販インターフェロン β に対して卵白上清は625倍以上の濃度のインターフェロ

ン β を含むとわかる。

[図19]G1世代とG2世代ヒトインターフェロン β ノックインニワトリ由来卵におけるインターフェロン β 蛋白質(左)。G1由来卵とG2(3羽の雌ニワトリ)由来卵の濃厚卵白内のヒトインターフェロン β 濃度はほぼ同等である。またG2由来卵もG1由来卵と同様に白濁する。

[図20]オボアルブミン遺伝子座へヒト抗体遺伝をノックインしたニワトリ由来卵白の抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いたウエスタンブロット像。ノックインニワトリ由来卵(hIgG KI)には野生型(ctrl)由来卵白中に存在しない組換えヒト抗体(矢印部 h IgG)が発現する(左図)。また、非還元状態で電気泳動すると市販のヒト抗体(Herceptin)と同じ移動度を呈することから抗体複合体を形成することがわかる(右図)。1/2k(1/2000), 1/200, 1/20は卵白の希釈率を示す。バンド濃度から推定し、抗体複合体の濃度は1mg/ml以上である。

[図21]オボムコイドホモノックアウト(0VM-/-、G2世代)由来の卵。卵は外見上野生型のものと著しい違いを認めず(左図)、卵白、卵黄とも加熱によって凝固するため(右図)、調理等加工する上で野生型の卵と同様に扱うことが可能である。

[図22]オボムコイドホモノックアウト(0VM-/-、G2世代)由来の卵を孵化させて得られたG3世代のオボムコイドホモノックアウト個体(上図)。0VM-/-雌と0VM-/-雄を交配し得られた。内在性のオボムコイド遺伝子だけでなく卵のオボムコイドが存在せずともニワトリは発生できる。フラグメント解析により、オボムコイド遺伝子が欠損している領域が5bpホモ欠損していることがわかる(下図)。

[図23]4系統のインターフェロン β 雌ノックインニワトリ由来卵の写真。図9と同様に全て濃厚卵白が白濁している。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明では、家禽の始原生殖細胞の遺伝子をゲノム編集により改変し、遺伝子改変した始原生殖細胞に由来するノックイン又はノックアウトの雌家禽を得、この雌から本発明のノックイン又はノックアウト家禽の卵を得る。

[0020] 本明細書において、「ノックアウト家禽の卵」は、ノックアウトされた遺伝子の遺伝子型がヘテロ(+/-)あるいはホモ(-/-; null)の雌の家禽が産んだ卵の両方を含む。ノックアウトされる遺伝子が卵管で発現し、卵白に集積する卵内アレルゲンの遺伝子の場合、ヘテロノックアウト家禽の卵では卵内アレルゲンタンパク質が低減されたノックアウト家禽の卵になる。一方、ホモノックアウト雌の家禽が産んだ卵は、卵内アレルゲンタンパク質が消失されたノックアウト家禽の卵になる。

本明細書において、「ノックイン家禽の卵」は、ノックインされた遺伝子の遺伝子型がヘテロ(+/-)の雌の家禽が産んだ卵、或いは、ノックインされた遺伝子の遺伝子型がホモ(+/)の家禽受精卵の両方を含む。ノックインされた遺伝子の遺伝子型がヘテロ(+/-)の雌の家禽が産んだ卵と比較して、ノックインされた遺伝子の遺伝子型がホモ(+/)の雌の家禽が産んだ卵の方が、外因性遺伝子の発現産物が多く含まれる。

[0021] ゲノム編集は、二本鎖DNAの切断とその修復のエラーを利用して遺伝子改変を行う技術であり、標的の二本鎖DNAを切断できるヌクレアーゼ、前記ヌクレアーゼと結合もしくは複合化したDNA認識成分を使用することができる。ゲノム編集としては、ZFN(zinc finger nuclease)、TALEN、CRISPRが挙げられる。例えば、ZFNでは、FokI(ヌクレアーゼ)とジンクフィンガーモチーフ(DNA認識成分)が用いられ、TALENでは、FokI(ヌクレアーゼ)とTALエフェクター(DNA認識成分)が用いられ、CRISPRでは、Cas9(ヌクレアーゼ)とguide RNA(gRNA, DNA認識成分)が用いられる。ゲノム編集に用いられるヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性を有していればよく、ヌクレアーゼ以外にDNAポリメラーゼ、リコンビナーゼなどを用いることもできる。

[0022] 家禽としては、ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、オナガドリ、チャボ、ハト、ダチョウ、キジ、ホロホロチョウなどが挙げられ、好ましくはニワトリ、ウズラなどが挙げられる。

始生殖細胞は雄と雌のいずれでもよい。ニワトリなどの家禽始生殖細胞は浮遊性の細胞であり、BRL細胞やST0細胞などのフィーダー細胞存在下で

培養される。または適当なサイトカインを培地に添加することでフィーダー細胞非存在下で培養しても良い。

[0023] ゲノム編集により改変される遺伝子は、卵管特異的遺伝子であり、具体的にはオボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター、リゾチームなどが挙げられる。

ゲノム編集により遺伝子機能はノックアウトにより消失する。ゲノム編集により、遺伝子の少なくとも1つの塩基が欠失もしくは挿入する場合、フレームシフトにより遺伝子機能は消失し得、フレームシフトが起こらない場合でも一部のアミノ酸が欠失することで機能が消失し得る。また、欠失や置換によって終止コドンが生じて機能が消失することもある。

[0024] ゲノム編集により外因性遺伝子をノックインする場合、外因性遺伝子が卵管特異的遺伝子座にノックインされると、卵管特異的遺伝子の発現産物の代わりに外因性遺伝子の発現産物を含む卵が得られるので好ましい。このような外因性遺伝子の発現産物であるタンパク質としては、様々な分泌性のタンパク質やペプチドが考えられ、抗体(モノクローナル抗体)又はその断片(例えばscFv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、一本鎖抗体、scFv、dsFvなど)、酵素、ホルモン、成長因子、サイトカイン、インターフェロン、コラーゲン、細胞外マトリクス分子、ワクチンなどの機能性ポリペプチド、アゴニスト性タンパク質、アンタゴニスト性タンパク質などが挙げられる。外因性遺伝子がコードするタンパク質は、ヒトに投与する医薬になり得る生理活性タンパク質の場合、哺乳動物由来、好ましくはヒト由来である。また、プロテインAや蜘蛛の糸を構成するタンパク質などの工業的に使用可能なタンパク質の場合、微生物(細菌、酵母など)、植物、動物を含む任意の生物由来のタンパク質、あるいは人工的なタンパク質をコードする外因性遺伝子が挙げられる。

[0025] 外因性遺伝子は単一の遺伝子であっても複数の遺伝子であっても良い。複数の遺伝子の場合には、複数の遺伝子が卵管特異的遺伝子の制御下に発現できればよく、複数の遺伝子をIRESなどの配列を介在させて発現させたり、2Aペプチドをコードする配列などを介在させて複数の蛋白質をオボアルブミン

プロモーターの制御下に一度に発現させ、ペプチドを切断する形で発現させても良い。

外因性タンパク質は、適切なシグナルペプチドを付加してもよく、家禽類で発現しやすくするためにコドンユーセージを変更してもよい。

[0026] 本発明のノックイン家禽の卵の好ましい一実施の形態においては、外因性遺伝子の発現産物は濃厚卵白に優位に発現する。ここで「優位」とは、(ア)濃厚卵白における外因性遺伝子の発現量が、質量でノックイン卵全体における外因性遺伝子の発現量に対して50%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上或いは98%以上であることを意味するか、または、(イ)濃厚卵白以外の卵中における外因性遺伝子の発現量と比較した際に、濃厚卵白における外因性遺伝子の発現量の相対濃度が1.1倍以上、好ましくは2倍以上、より好ましくは10倍以上で発現することを意味する。濃厚卵白にはノックインされた外因性遺伝子の発現産物が濃縮されているので、精製が容易である。また、外因性遺伝子の発現産物は活性型で発現され得る。濃厚卵白は、外因性遺伝子の発現産物により白濁することがあるが、白濁したタンパク質は、超音波処理、アルギニン塩酸塩などの可溶化剤の添加などにより容易に可溶化することができる。

[0027] 本発明の好ましい実施形態において、濃厚卵白に発現されたノックイン遺伝子の発現産物は、溶解状態であってもよく、非溶解状態であってもよい。非溶解状態のノックイン遺伝子の発現産物は、活性なタンパク質として精製可能である。ノックイン遺伝子の発現産物は、可溶化して精製することが望ましい。精製には、カラム、透析などの通常の精製手段が使用される。ゲノム編集としては、ジンクフィンガー、TALEN、CRISPRなどが挙げられ、TALEN、CRISPRが好ましく、CRISPRがより好ましい。ゲノム編集の方法は次々に開発されてきており、これらに限定されず、今後開発されるゲノム編集方法は全て本発明で使用可能である。

[0028] ゲノム編集によりノックインを行う場合、薬剤耐性遺伝子を有用な外因性遺伝子とともにゲノムに安定的に組み込み、それによりノックインされた始

原生殖細胞を選別するのが好ましい。薬剤耐性遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子(Neor)、ハイグロマイシン耐性遺伝子(Hygr)、ピューロマイシン耐性遺伝子(Puror)、ブラストサイジン耐性遺伝子(blastr)、ゼオシン耐性遺伝子(Zeor)などが挙げられ、ネオマイシン耐性遺伝子(Neor)あるいはピューロマイシン耐性遺伝子(Puror)が好ましい。

[0029] 外因性遺伝子を卵管特異的遺伝子座にノックインする場合、卵管特異的遺伝子の翻訳開始点に外因性遺伝子の翻訳開始点を合致させることが好ましい。外因性遺伝子は一本鎖や二本鎖の核酸として始原生殖細胞に導入されれば良く、二本鎖の核酸の場合、プラスミドベクターやBAC(bacterial artificial chromosome)ベクター等の形で導入されれば良い。ノックインにより翻訳開始点を合致させる場合には卵管特異的遺伝子の翻訳開始点周辺の遺伝子配列を外因性遺伝子の翻訳開始点の直前に挿入すれば良い。

卵管特異的遺伝子としてオボアルブミン遺伝子を選択し、オボアルブミン遺伝子プロモーター制御下に外因性遺伝子を導入する場合、好ましい形態として、当該外因性遺伝子の5'端が、オボアルブミンをコードする塩基配列における配列番号1(OVATg1)に示される塩基配列に相当する領域、または、配列番号24(OVATg2)に示される塩基配列に相当する領域に挿入された形態を挙げることができる。より好ましくはオボアルブミンの翻訳開始点に外因性遺伝子の翻訳開始点を挿入すれば良い。

[0030] 外因性遺伝子を卵管特異的遺伝子座にノックインし、このニワトリ個体を得て、卵を得た場合、外因性遺伝子産物を回収するために、卵の卵白を回収することが望ましい。更に効率よく回収するためには卵黄周囲にある濃厚卵白を含む領域を回収することが望ましい。

[0031] ゲノム編集を行い遺伝子機能をノックアウトにより消失させる場合、上記薬剤耐性遺伝子をゲノム編集を行う際の遺伝子導入時に始原生殖細胞に導入し、薬剤耐性遺伝子に基づき選別することが好ましい。薬剤耐性遺伝子の導入と薬剤選択は安定的でも一過的でも良く、ノックアウトの場合一過的が望ましい。薬剤耐性遺伝子は上記のものなどが挙げられ、ピューロマイシン耐

性遺伝子(Puror)あるいはゼオシン耐性遺伝子(Zeor)が好ましい。薬剤耐性遺伝子はジンクフィンガー、TALEN、CRISPRプラスミドと独立した形でも、プラスミドに組み込まれる形でも良く、薬剤耐性遺伝子がゲノム編集の為のプラスミドに組み込まれる形が好ましい。

[0032] 本発明において卵管特異的遺伝子をノックアウトする際、ノックアウトの対象となる卵管特異的遺伝子をコードする塩基配列において、塩基の欠失、置換、または挿入を生じさせることにより、当該卵管特異的遺伝子にフレームシフトやナンセンス変異を起こさせて、タンパク質が発現しないようにすることができる。例えば、CRISPRを用いてノックアウトを行うとき、PAM配列より5'側または3'側の領域近傍に塩基の欠失、置換、または挿入を生じさせることができる。PAM配列より5'側または3'側の領域近傍とは、例えば、PAM配列より約1〜50塩基、好ましくは約1〜15塩基以内とすることができる。

本発明のノックアウト家禽の卵は、一実施の形態として、以下に限定されないが、卵管特異的遺伝子としてオボアルブミン、または、オボムコイドをノックアウトした形態を挙げることができる。卵管特異的遺伝子として、オボアルブミンをノックアウトする際の好ましい一実施の形態としては、配列番号1(OVATg1)に示される塩基配列に相当する領域およびその近傍領域に塩基の欠失、置換、または挿入を生じさせることができる。また、卵管特異的遺伝子として、オボムコイドをノックアウトする際の好ましい一実施の形態としては、配列番号6(OVMTg2)に示される塩基配列に相当する領域およびその近傍領域に塩基の欠失、置換、または挿入を生じさせることができる。

ここで、例えば、「配列番号1(OVATg1)に示される塩基配列に相当する領域」というとき、オボムコイド遺伝子のホモログにおける対応する領域も含み、当業者であれば、対象の家禽により当該塩基配列に相当する領域を把握することができる。

オボムコイドの分泌前蛋白質は、(開始メチオニンを1として)210アミノ酸(210aa)より構成され、1-24aaにシグナルペプチドを有する。また、配列番号1(OVATg1)のPAM配列は、38-39aa部に相当する。よって、本発明のオボムコ

イド遺伝子をノックアウトした家禽の卵は、一実施の形態において、少なくとも160aa以降を含まない、好ましくは100aa以降を含まない、より好ましくは38aa以降を含まないオボムコイド変異蛋白質を発現する。

また、本発明のオボムコイド遺伝子をノックアウトした家禽の卵は、好ましい実施の形態において、内在性のオボムコイドを実質的に含まない。内在性のオボムコイドを実質的に含まないとは、ノックアウト雌家禽のオボムコイド遺伝子がホモでノックアウトされることにより、当該ノックアウト雌家禽より産生される卵中に、内在性のオボムコイドが消失している状態をいう。

[0033] 1つの実施形態において、本発明の遺伝子改変方法により得られた、遺伝子改変された家禽始原生殖細胞から常法に従い遺伝子改変された家禽を生産することができる。さらに遺伝子改変された家禽から卵(ノックイン及びノックアウト)を得ることが出来る。具体的な手順を以下に示す。

[0034] 遺伝子改変された始原生殖細胞をレシピエント初期胚の胚盤葉、血液中もしくは生殖巣領域に移植する。好ましくは孵卵後2〜3日程度、血流循環開始前後の時期の血流中に数百から数千個程度の細胞を顕微注射により移植する。また、移植前にレシピエントの内在性の始原生殖細胞を薬剤や電離放射線により予め不活化させたり、数を減らしても良い。移植胚を常法に従って孵卵操作を継続し、移植個体を孵化させる。移植、孵化操作は卵殻の変更を含むシステム培養であっても、卵殻の変更を行わない窓開け法でも良い。孵化した個体は通常の飼育により生体(キメラ個体)として性成熟させることが出来る。これを野生型もしくは遺伝子改変個体あるいは遺伝子改変キメラ個体と交配することにより移植細胞由来の遺伝子改変の生じた家禽を後代として生産できる。本発明で得られるゲノム編集された始原生殖細胞は増殖能力が高く、キメラ個体において数多くの受精能力の高い精子或いは卵子になる。この際、効率を上げるために、配偶子のゲノムに含まれる遺伝子改変の頻度を調査し、移植細胞の寄与率を評価した上で交配試験を行ったり、後代の羽毛色による判定を行ったりしてもよい。遺伝子改変された雌始原生殖細胞を

移植した雌キメラ家禽と雄始原生殖細胞を移植した雄キメラ家禽交配させることで、ホモ型の遺伝子改変家禽を得ることができる。また、家禽個体内に限らず、将来in vitroで始原生殖細胞を生殖細胞に分化させる等の技術が開発された場合には、これを用いた人工受精や顕微授精により遺伝子改変された家禽を生産することができる。

[0035] 図2、図4A、図4B、図16において、OVMTg2のPAM配列は「agg」であるが、ニワトリのオボムコイドのOVMTg2に対応する配列はNCBIのデータベースで2種類あり、OVMTg2の配列は、TTTCCCAACGCTACAGACA(t or a)ggと表記し得る。本発明は、このような多型を全て包含する。

[0036] 本発明の他の実施形態において、ゲノム編集は始原生殖細胞の培養を経由せずに、初期胚に各種ウイルスベクターを感染させて或いはプラスミドベクターをリポソーム複合体として初期胚血液中に注入することで、内在性の始原生殖細胞を遺伝子操作し、キメラ個体及び組換え後代を樹立してもよい。ゲノム編集により得られる始原生殖細胞は遺伝子改変効率が高く、かつ、家禽の組み換え後代や遺伝子改変後代を得るのに十分高い生殖能力を有しており、この実施形態においても有用である。本実施形態においては、始原生殖細胞の培養操作を伴うことなく(内在性の)始原生殖細胞の遺伝子改変が可能である。

[0037] ゲノム編集による遺伝子操作に用いるウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられる。これらのウイルスベクターは、培養始原生殖細胞あるいは内在性の始原生殖細胞のゲノム編集のいずれにも使用できる。

例えば、内在性の始原生殖細胞をゲノム編集を用いて改変するには、各社から販売されているゲノム編集用ウイルスベクターを用いて任意の標的配列を認識、切断するヌクレアーゼやsgRNAを発現するウイルスベクターを構築し、パッケージングにより感染可能な形態とし、家禽初期胚の胚盤葉、血液や生殖巣領域等始原生殖細胞の存在する場所に投与することで始原生殖細胞に

おけるゲノム編集を行い、後代に遺伝子改変個体や遺伝子改変産物を得ることが可能である。市販のゲノム編集用ウイルスベクターは国内外の多くの会社が販売しているが、例えばアデノ随伴ベクターを用いたTakara社の「AAVpro(登録商標) CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)」やレンチウイルスベクターを用いたSystem Biosciences, LLCの「Lentiviral CRISPR/ Cas9 System」などが挙げられる。遺伝子改変がノックインの場合、ゲノム編集に必要なウイルスベクターとノックインされる遺伝子を含むウイルスベクター、プラスミド、Bacベクター、一本鎖や二本鎖のDNA等を併用することができる。

[0038] また、ウイルスベクターを使わない、あるいは併用する形態のゲノム編集用プラスミドやドナーコンストラクトをリポソーム複合体など細胞膜を透過可能な形態にし、家禽初期胚の胚盤葉、血液や生殖巣領域等始原生殖細胞の存在する場所に投与することで始原生殖細胞におけるゲノム編集を行い、後代に遺伝子改変個体や遺伝子改変産物を得ることが可能である。

[0039] 上記方法により得られる本発明のノックイン家禽の卵は、外因性遺伝子の発現産物が卵内で安定高発現する。ここで、外因性遺伝子の発現産物が卵内で安定高発現するとは、異なる個体由来でも卵1個あたり約1mg以上の外因性遺伝子がコードするタンパク質を発現することをいう。好ましくは卵1個あたり約10mg以上、より好ましくは卵1個あたり約100mg以上の外因性タンパク質を発現する形態を挙げることができる。また、例えば、ニワトリの卵管特異的遺伝子の遺伝子座に外因性遺伝子をノックインした場合、ノックイン雌鶏の卵において認められる外因性遺伝子産物(蛋白質)の発現は、濃厚卵白において濃度が5mg/mlと従来のノックインに依らないランダムな遺伝子導入に比べて遥かに高濃度であると共に、外因性遺伝子の挿入位置が均一であるため個体間や同一個体における発現のばらつきが小さい。更に、ニワトリ個体で実際に発現する遺伝子の翻訳開始点にノックインする技術を用いていることから、G2世代以降でサイレンシングなどの影響を受け発現低下することがない。

[0040] 本法による卵管特異的遺伝子の遺伝子座に外因性遺伝子をノックインした

場合、ノックイン雌鶏の卵において認められる外因性遺伝子産物(蛋白質)の分布は水溶性卵白に比べて濃厚卵白での濃度が高い。このため、濃厚卵白を含む領域を回収することで効率よく外因性遺伝子産物を回収することが出来る。

本法により得られる卵白アレルギー遺伝子のホモノックアウトニワトリを飼養し、卵を得ることで卵白アレルギー蛋白質を欠損した卵を得ることが出来る。このような卵は低アレルギー性であることが想定される。非特許文献4ではヘテロ型のオボアルブミンノックアウトニワトリの例が示されているが、ホモノックアウトニワトリが得られるか、更にホモノックアウトニワトリから卵が得られるかについては当時の技術常識を総合しても予見できないし、当該文献からも予見できない。

実施例

[0041] 以下、本発明を実施例に基づきより詳細に説明する。

<製造例1>

ニワトリ雄始原生殖細胞を用いたゲノム編集

(製造例1-1)

オボアルブミン(OVA)遺伝子座へのノックインおよびオボムコイド(OVM)ノックアウトのための遺伝子構築

ニワトリ雄始原生殖細胞株を用い、オボアルブミンならびにオボムコイド遺伝子を標的としてCRISPR法の適用を行った。図1(オボアルブミン)、図2(オボムコイド)に示すようにそれぞれOVATg1、OVMTg2の標的としての適性を検討した。

図1に示すオボアルブミン遺伝子の標的配列を標的とし、CRISPR用プラスミドを構築した。

まず、配列番号1(OVATg1)を標的として配列番号2、配列番号3で示されるオリゴDNAを合成し、T4 Polynucleotide Kinaseを用いて5'末端をリン酸化した後、両者の混合液を98℃まで加熱し、室温までゆるやかに冷却することでアニールした。このDNA断片をプラスミドpx330(AddGENE, 米国)のNotI部

位に配列番号4のピューロマイシン耐性遺伝子ユニットを挿入したプラスミドpx330-Puro^rのBbsI切断部位に挿入した(px330-Puro^r-OVATg1)。さらにpx330-Puro^r-OVATg1のピューロマイシン耐性遺伝子ユニットを配列番号5で示すネオマイシン耐性遺伝子ユニットに置き換えたプラスミドを構築した(px330-Neor^r-OVATg1)。

図2に示すオボムコイド遺伝子の標的配列を標的とし、CRISPR用プラスミドを構築した。配列番号6(OVMTg2)を標的として配列番号7と配列番号8で示されるオリゴDNAを合成し、リン酸化後、アニールし、プラスミドpx330-Puro^rのBbsI切断部位に挿入した(px330-Puro^r-OVMTg2)。

[0042] (製造例1-2)

オボアルブミン、オボムコイド遺伝子ノックアウト

横斑プリマスロック雄胚血液中より採取し、株化したニワトリ雄始原生殖細胞(非特許文献3に準拠して調製)に上述の遺伝子(プラスミド)を一過的に導入した。1×10⁵~5×10⁵個の雄始原生殖細胞株をPBSで洗浄し、OPTI-MEMに懸濁後、3μlのリポフェクタミン2000(Life Technologies, 米国)を用いて1.6μgのpx330-Neor^r-OVATg1を遺伝子導入した。具体的には、リポフェクタミン2000とプラスミドを80μl OPTI-MEM中で混合し、雄始原生殖細胞株と混合後室温で5分程度静置し、その後抗生物質を含まない培地を500μl添加し、37℃で1~4時間程度静置した上でフィーダー細胞上に播種した。遺伝子導入後2~4日の間、ネオマイシン(G418二硫酸塩、ナカライテスク、日本)終濃度0.5mg/mlで添加し、これを洗浄除去した後に1~2週間の培養を行った。培養後に細胞を回収し、ゲノムDNAを抽出後、配列番号9, 配列番号10で示されるオリゴDNAプライマーを用いたPCR法によりオボアルブミン遺伝子の一部領域を増幅し、TAベクター(pGEM-T Easy, Promega, 米国)にサブクローンし、配列番号1(OVATg1)を含む領域のゲノム塩基配列を解析した。図3に示すように開始コドンの欠失、置換を含む変異を確認した。

次に、オボムコイド遺伝子を標的とした同様の解析を行った。上述と同様に1×10⁵~5×10⁵個の雄始原生殖細胞株にリポフェクタミン2000を用いてpx330-

0-Puro^r-0VMTg2を1.6 μ g遺伝子導入し、導入後2～4日の間、ピューロマイシンを終濃度1 μ g/mlで添加した。ピューロマイシンを洗浄除去した後に1～2週間の培養を行ない、細胞を回収し、ゲノムDNAを抽出後、配列番号11, 配列番号12で示されるオリゴDNAプライマーを用いたPCR法によりオボムコイド遺伝子の一部領域を増幅し、TAベクターにサブクローンし、配列番号6 (0VMTg2)を含む領域のゲノム塩基配列を解析した。解析した23クローン中21クローン(91%)においてオボムコイド遺伝子の配列番号6 (0VMTg2)を含む領域で遺伝子の欠失が認められた。一方、対照群として薬剤選択を行わなかったものの遺伝子欠損は24クローン中0個(0%)であった。0VMTg2を含む領域に認められた遺伝子変異の例を図4Aに示す。これらのことは家禽始原生殖細胞の遺伝子をゲノム編集する上で、薬剤耐性遺伝子導入と薬剤による一過的選択が変異の効率を顕著に上昇しうること、特にピューロマイシン耐性遺伝子とピューロマイシンによる薬剤選択で高い変異効率を得られることを示している。

[0043] (製造例1-3)

ゲノム編集ニワトリの樹立

(製造例1-2)に記載した要領で横斑プリマスロック種始原生殖細胞にpx33 0-Puro^r-0VMTg2を遺伝子導入し、薬剤選択した細胞を培養し、白色レグホン種2.5日胚(レシピエント胚)の血液中に顕微注射により移植を行った。移植に先立ち、レシピエント胚内在性の始原生殖細胞数を減少させる目的で孵卵操作前の受精卵に電離放射線を5Gyまたは6Gy照射した。電離放射線照射はガンマセル40(カナダ原子力公社)を用いたガンマ線照射により行った。

[0044] 孵卵2.5日後、卵の突端側に直径2cm程度の窓を開けて胚を露呈し、ハンバーガーハミルトンステージ13から15までのレシピエント胚血液中に約1000～5000個の薬剤選択済み細胞(1～2 μ lのPBSに懸濁)を微小ガラス針を用いて移植した。窓をセロハンテープで密閉後、温度38.5℃、湿度60～80%で培養し孵化させた(キメラヒヨコ(G0))。8羽の雄キメラヒヨコを性成熟させ、精液を採取した。精液よりゲノムDNAを抽出後、配列番号11, 配列番号12で示されるオリゴDNAプライマーを用いたPCR法によりオボムコイド遺伝子の一部領

域を増幅し、TAベクターにサブクローンし、配列番号6 (OVMTg2)を含む領域のゲノム塩基配列を解析した。高頻度に変異の見られたキメラニワトリ #372, #376(いずれもサブクローンした11クローン中10クローンにオボムコイド遺伝子の変異が見られた)を野生型の横斑プリマスロック種雌と交配させ、それぞれの後代19羽中に11羽、14羽中に6羽のオボムコイド変異ニワトリ(ヒヨコ)を見出した。オボムコイド遺伝子変異の一例を図4B上段に示す。この個体ではオボムコイドタンパク質のシグナルペプチド直下部より変異を起こす5塩基の欠損が認められ、片アレルにオボムコイド遺伝子のフレームシフト変異を有している。また、オボムコイドゲノムの標的領域を中心に認められる代表的な変異(遺伝子欠損)の例を図4B下段に示した。ここに代表されるようなオボムコイドタンパク質のシグナルペプチド直下部よりフレームシフト変異を生じるオボアルブミンヘテロノックアウトの雌雄個体を複数得ており、これら個体を性成熟後交配することでオボムコイドのホモノックアウトニワトリ作出が可能である。

[0045] <製造例2>

オボアルブミン遺伝子座へのヒトインターフェロン遺伝子ノックイン
(製造例2-1)

始原生殖細胞樹立へのノックインとノックインキメラニワトリの樹立

オボアルブミン遺伝子の翻訳開始点に外因性遺伝子(ヒトインターフェロン β ; IFN β)を挿入することを目的とし、配列番号13に示されるヒトインターフェロン β 遺伝子を導入したドナーコンストラクト(IFN β ドナーコンストラクト)を作製した。このドナーコンストラクトはオボアルブミン翻訳開始点の5'側約2.8kb、ヒトインターフェロン β 遺伝子、薬剤耐性遺伝子ユニット(PGK-Puro^r)、オボアルブミン翻訳開始点の3'側約3.0kbから構成される。このドナーコンストラクトをプラスミドpBlue ScriptII(SK+)(Stratagene, 米国現Agilent technologies)に挿入しpBS-IFN β ドナーとした。製造例1と同様に $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個の始原生殖細胞株にリポフェクタミン2000を用いてpx330-Neo^r-OVATg1を0.8 μ g、pBS-IFN β ドナーを0.8 μ g同時に遺伝子導入し、導入

後3日以降、ピューロマイシンを終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ で添加した。適宜培地交換を行い、終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ のピューロマイシン存在下で増殖する細胞を回収し、ゲノムDNAを調製した。ドナーコンストラクトがオボアルブミン遺伝子座にノックインされていることをゲノムPCRにより確認した。5' 領域についてドナーコンストラクトの外因性遺伝子とドナーコンストラクトに含まれないオボアルブミンの5' 領域に対するプライマーを用いたPCRを以下のように行った。配列番号14に示されるインターフェロン β に対するアンチセンスプライマーと配列番号15に示すオボアルブミン翻訳開始点の5' 側約3.0kbの領域に対するセンスプライマーを用いてPCRを行い、さらに増幅産物に対して配列番号16に示すインターフェロン β に対するアンチセンスプライマーと配列番号17に示すオボアルブミン翻訳開始点の5' 側約2.85kbでドナーコンストラクトには含まれない領域に対するセンスプライマーを用いてPCRを行った(nested PCR)。図5Aに示すようにpx330-Neor^r-OVATg1と共にドナーコンストラクトを導入し、薬剤選択した始原生殖細胞(ノックインPGCs)由来ゲノムを鋳型とした場合、ドナーコンストラクトが挿入された際に期待される約2.9kの位置に増幅産物が認められるのに対し、対照の遺伝子導入を行っていない始原生殖細胞由来ゲノム(対照PGCs)を鋳型とした場合、増幅産物は認められない。

[0046] 同様に、3' 領域についてドナーコンストラクトの外因性遺伝子とドナーコンストラクトに含まれないオボアルブミンの3' 領域に対するプライマーを用いたゲノムPCRにより確認した。配列番号18に示す薬剤耐性遺伝子ユニットに対するセンスプライマーと配列番号19に示すオボアルブミン翻訳開始点の3' 側約3.4kbの領域に対するアンチセンスプライマーを用いてPCRを行い、さらに増幅産物に対して配列番号20に示す薬剤耐性遺伝子ユニットに対するセンスプライマーと配列番号21に示すオボアルブミン翻訳開始点の3' 側約3.2kbでドナーコンストラクトには含まれない領域に対するセンスプライマーを用いてPCRを行った(nested PCR)。図5Aに示すようにpx330-Neor^r-OVATg1と共にドナーコンストラクトを導入し、薬剤選択した始原生殖細胞

胞(ノックインPGCs)由来ゲノムを鋳型とした場合、ドナーコンストラクトが挿入された際に期待される約3.4kの位置に増幅産物が認められるのに対し、対照の遺伝子導入を行っていない始原生殖細胞(対照PGCs)由来ゲノムを鋳型とした場合、増幅産物は認められない。以上のことから、薬剤選択された細胞集団の中に外因性遺伝子部分を含むドナーコンストラクトがオボアルブミン遺伝子座にノックインされた細胞が存在すると考えられる。

[0047] このIFN β ドナーコンストラクトがノックインされた細胞を含む始原生殖細胞を、(製造例1-3)と同じ手法によりレシピエント胚に移植後孵化させ、4羽の雄キメラニワトリを得た(#411~#414)。これらより精液を採取し、ゲノムDNAを採取後、配列番号18と配列番号19のプライマー(オボアルブミン遺伝子にノックインされたインターフェロンの3'側を増幅)、配列番号15と配列番号14のプライマー(オボアルブミン遺伝子にノックインされたインターフェロンの5'側を増幅)、配列番号15と配列番号22のプライマー(ノックインされていないオボアルブミンを増幅)を用いてそれぞれPCRを行った(図5B)。キメラニワトリ#411と#412においてオボアルブミン遺伝子座へのインターフェロンノックインを明瞭に示すシグナルが3'側、5'側で共に認められ、特に#411は移植した親株と遜色のないシグナル強度で認められることから、精子中に親株と同程度インターフェロンがノックインされた細胞が存在すると考えられる。

[0048] キメラニワトリ#411と#412を雌野生型ニワトリ(横斑プリマスロック種)と交配し、それぞれ28羽の後代、19羽の後代を得た。この後代より羽軸を採取し、ゲノムDNAを採取後、上述と同様に配列番号18と配列番号19のプライマー(オボアルブミン遺伝子にノックインされたインターフェロンの3'側を増幅)、配列番号15と配列番号14のプライマー(オボアルブミン遺伝子にノックインされたインターフェロンの5'側を増幅)、配列番号15と配列番号22のプライマー(ノックインされていないオボアルブミンを増幅)を用いてそれぞれPCRを行った。また、野生型の羽軸由来のゲノム(ネガティブコントロール(NC))、および移植したインターフェロンドナーベクターノッ

クイン始原生殖細胞由来のゲノム(ポジティブコントロール(PC))を用いて同じPCRを行った。#411由来後代28羽のうち8羽と#412由来後代19羽のうち5羽において、それぞれポジティブコントロールと同様のオボアルブミン遺伝子座へのインターフェロンノックインを明瞭に示すシグナルが3'側、5'側で共に認められた。#411由来後代(雌)と#412由来後代(雌)のPCR産物電気泳動像を図5Cにそれぞれ示す。このことより、これらの後代雌ニワトリではオボアルブミン遺伝子座にインターフェロンドナーベクターがノックインされていると判断される。

[0049] (製造例2-2)

ノックイン効率の改善

遺伝子ノックインの効率改善について検討を行った。まず、上述製造例2-1のインターフェロン β ドナーコンストラクトの薬剤耐性ユニットをPGK-Puro^rからSV40Pe-Neo^r(配列番号23)に置換したIFN β -Neoドナーコンストラクト<配列番号33>を作製した。このドナーコンストラクトはオボアルブミン翻訳開始点の5'側約2.8kb、ヒトインターフェロン β 遺伝子、薬剤耐性遺伝子ユニット(SV40Pe-Neo^r)、オボアルブミン翻訳開始点の3'側約3.0kbから構成される。このドナーコンストラクトをプラスミドpBlue ScriptII(SK+)に挿入しpBS-IFN β -Neoドナーとした。また、図6Aに示すようにOVATg1と一部重なるオボアルブミンの標的配列OVATg2(配列番号24)を標的とし、CRISPR用プラスミドを構築した。配列番号25と配列番号26でそれぞれ示されるオリゴDNAを合成し、製造例1-1と同様にリン酸化後、アニールし、DNA断片をpx330のBbsI切断部位に挿入するとともに、NotI部位に配列番号4のピューロマイシン耐性ユニットを挿入したプラスミドpx330-Puro^r-OVATg2を構築した。約 5×10^5 個の始原生殖細胞株を調製し、3分割した後に、製造例2-1と同様にリポフェクタミン2000を用いてpx330-Neo^r-OVATg1を $0.8 \mu\text{g}$ 、pBS-IFN β ドナー(ピューロマイシン耐性遺伝子ユニットを持つ)を $0.8 \mu\text{g}$ (導入群1)もしくはpx330-Puro^r-OVATg1を $0.8 \mu\text{g}$ 、pBS-IFN β -Neoドナーを $0.8 \mu\text{g}$ (導入群2)もしくはpx330-Puro^r-OVATg2を $0.8 \mu\text{g}$ 、pBS-IFN β -Neoドナーを $0.8 \mu\text{g}$ (導入

群3)それぞれ同時に遺伝子導入し、(導入群1)は製造例2-1同様導入後3日以降、ピューロマイシンを終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ で添加した。一方、(導入群2)と(導入群3)は製造例1-2と同様に遺伝子導入後2~4日の間、終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ のピューロマイシン存在下で培養し、洗浄後、終濃度 0.5mg/ml のネオマイシンを添加し培養を行った。導入後24日後に各導入群の細胞数をそれぞれ計測した所、導入群1の 2×10^4 に対し、導入群2と3では 1×10^5 の薬剤耐性細胞が認められた。また、それぞれの群より細胞を回収し、ゲノムDNAを調製後、製造例2-1と同様に配列番号18と配列番号19のプライマー(オボアルブミン遺伝子にノックインされたインターフェロンの3'側を増幅)、配列番号15と配列番号14のプライマー(オボアルブミン遺伝子にノックインされたインターフェロンの3'側を増幅)、配列番号15と配列番号22のプライマー(ノックインされていないオボアルブミンを増幅)を用いてそれぞれPCRを行った。なお、導入群2と3については配列番号18のプライマーの代わりに配列番号71のプライマーを用いた(図6B)。導入群1と2との間でPCRシグナル強度比の大きな違いを認めないことから、導入群2のピューロマイシンで短期間選択後、ネオマイシン選択する方法のほうが迅速に目的細胞を調製可能と考えられる。また、導入群3は導入群2と比較してノックインされていないオボアルブミンが殆ど認められないことから、より効率の良いノックインが起こっていると考えられる。以上より、OVAT g2配列を標的とし、CRISPRコンストラクトにピューロマイシン耐性遺伝子をドナーコンストラクトにネオマイシン耐性遺伝子をそれぞれ挿入し、始原生殖細胞に導入後一過的にピューロマイシンで選択し、その後ネオマイシンで選択を行うことで迅速かつ高効率に外因性遺伝子のオボアルブミン遺伝子座へのノックインが可能になると考えられる。

[0050] <製造例3>

オボアルブミン遺伝子座へのヒト抗体遺伝子ノックイン

上記製造例2-1のインターフェロン β ドナーコンストラクトのヒトインターフェロン β の代わりに配列番号27に示されるヒト免疫グロブリン遺伝

子を導入したドナーコンストラクト(免疫グロブリンドナーコンストラクト)を作製した。このドナーコンストラクトはオボアルブミン翻訳開始点の5' 側約2.8kbの下流に卵白リゾチームシグナルペプチド、ヒト免疫グロブリン重鎖、furinタンパク質切断標的配列、2A自己プロセッシング性ペプチド、卵白リゾチームシグナルペプチド、ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子をそれぞれコードする遺伝子を連結して配置し、薬剤耐性遺伝子ユニット(PGK-Puro^r)、オボアルブミン翻訳開始点の3' 側約3.0kbから構成されている。このドナーコンストラクトが転写、翻訳されることで免疫グロブリンの重鎖と軽鎖からなる抗体タンパク質を発現する。

[0051] プラスミドpBlue ScriptII(SK+)に免疫グロブリンドナーコンストラクトを挿入しpBS-免疫グロブリンドナー(pBS- IgG(Hc+Lc)ドナー)とした。上記pBS-IFN β ドナーと同様の手法により雄ニワトリ始原生殖細胞にノックイン後ピューロマイシンで選択し、選択された細胞のゲノムを鋳型としてPCRを行なった。5' 側は配列番号15のプライマーと配列番号28に示される卵白リゾチームシグナルペプチドに対するアンチセンスプライマーによるPCRの後、増幅産物に対して配列番号17のプライマーと配列番号29に示す卵白リゾチームシグナルペプチドに対するアンチセンスプライマーを用いてPCRを行った(nested PCR)。3' 側は上記EGFPドナーやpBS-IFN β ドナーのノックイン時と同様に配列番号18と配列番号19に示すプライマーを用いたPCRの後、増幅産物に対して配列番号20と配列番号21に示すプライマーを用いてnested PCRを行った。図7に示すように、免疫グロブリンドナーを用いた場合でも始原生殖細胞のオボアルブミン遺伝子へのノックインが認められた。

更に製造例2-2と同様に免疫グロブリンドナーコンストラクトの薬剤耐性ユニットをPGK-Puro^rからSV40Pe-Neo^r(配列番号23)に置換した免疫グロブリン-Neoドナーコンストラクト(配列番号30)を作製した。このドナーコンストラクトはオボアルブミン翻訳開始点の5' 側約2.8kbの下流に卵白リゾチームシグナルペプチド、ヒト免疫グロブリン重鎖、furinタンパク質切断標的配列、2A自己プロセッシング性ペプチド、卵白リゾチームシグナルペプチド、

ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子をそれぞれコードする遺伝子を連結して配置し、薬剤耐性遺伝子ユニット(SV40Pe-Neor^r)、オボアルブミン翻訳開始点の3'側約3.0kbから構成されている。このドナーコンストラクトをプラスミドpBlue ScriptII(SK+)に挿入しpBS-免疫グロブリン-Neoドナーとした。製造例1-2と同様の方法でpx330-Puro^r-OVATg2を0.8 μ gとpBS-免疫グロブリン-Neoドナー0.8 μ gを約 2×10^5 個の始原生殖細胞株に3 μ lのリポフェクタミン2000を用いて遺伝子導入し、遺伝子導入後2~4日の間、終濃度1 μ g/mlのピューロマイシン存在下で培養し、洗浄後、終濃度0.5mg/mlのネオマイシンを添加し培養を行った。3週間程度の培養の後、得られた免疫グロブリンノックイン細胞を含む細胞集団を(製造例1-3)と同じ手法によりレシピエント胚に移植後孵化させ免疫グロブリンノックイン生殖巣キメラニワトリを樹立した。後代にオボアルブミン遺伝子座にヒト免疫グロブリン遺伝子がノックインされたニワトリが得られ、卵白にヒト免疫グロブリンの重鎖と軽鎖からなる抗体タンパク質を発現する。

[0052] <製造例4>

オボアルブミン遺伝子座へのヒトコラーゲン遺伝子ノックイン

上記製造例2-1のインターフェロン β ドナーコンストラクトのヒトインターフェロン β の代わりに配列番号31に示されるヒトI型コラーゲン遺伝子を導入したドナーコンストラクト(コラーゲンドナーコンストラクト)を作製した。このドナーコンストラクトはオボアルブミン翻訳開始点の5'側約2.8kbの下流に卵白リゾチームシグナルペプチド、ヒトI型コラーゲン α 1鎖(COLLAGEN1A1)、furinタンパク質切断標的配列、2A自己プロセッシング性ペプチド、卵白リゾチームシグナルペプチド、ヒトI型コラーゲン α 2鎖(COLLAGEN1A2)遺伝子をそれぞれコードする遺伝子を連結して配置し、薬剤耐性遺伝子ユニット(PGK-Puro^r)、オボアルブミン翻訳開始点の3'側約3.0kbから構成されている。このドナーコンストラクトが転写、翻訳されることでヒトI型コラーゲン α 1鎖と α 2鎖からなるI型コラーゲンタンパク質を発現する。

プラスミドpBlue ScriptII(SK+)にコラーゲンドナーコンストラクトを挿入

しpBS-COL1(A1+A2)ドナーとした。上記ppBS-IFN β ドナー、pBS-IgG(Hc+Lc)ドナーと同様の手法によりpBS-COL1(A1+A2)ドナーを雄ニワトリ始原生殖細胞にノックイン後ピューロマイシンで選択し、選択された細胞のゲノムを鋳型としてPCRを行なった。5'側はpBS-IgG(Hc+Lc)ドナーと同様、配列番号15のプライマーと配列番号28に示される卵白リゾチームシグナルペプチドに対するアンチセンスプライマーによるPCRの後、増幅産物に対して配列番号17のプライマーと配列番号29に示す卵白リゾチームシグナルペプチドに対するアンチセンスプライマーを用いてPCRを行った(nested PCR)。3'側は上記pBS-IFN β ドナー、pBS-IgG(Hc+Lc)ドナーのノックイン時と同様に配列番号18と配列番号19に示すプライマーを用いたPCRの後、増幅産物に対して配列番号20と配列番号21に示すプライマーを用いてnested PCRを行った。図8に示すように、コラーゲンドナーを用いた場合でも始原生殖細胞のオボアルブミン遺伝子へのノックインが認められた。

[0053] 更に製造例2-2と同様にコラーゲンドナーコンストラクトの薬剤耐性ユニットをPGK-Puro^rからSV40Pe-Neo^r(配列番号23)に置換したコラーゲン-Neoドナーコンストラクト(配列番号32)を作製した。このドナーコンストラクトはオボアルブミン翻訳開始点の5'側約2.8kbの下流に卵白リゾチームシグナルペプチド、ヒトI型コラーゲン α 1鎖(COLLAGEN1A1)、furinタンパク質切断標的配列、2A自己プロセッシング性ペプチド、卵白リゾチームシグナルペプチド、ヒトI型コラーゲン α 2鎖(COLLAGEN1A2)遺伝子をそれぞれコードする遺伝子を連結して配置し、薬剤耐性遺伝子ユニット(SV40Pe-Neo^r)、オボアルブミン翻訳開始点の3'側約3.0kbから構成されている。このドナーコンストラクトをプラスミドpBlue ScriptII(SK+)に挿入しpBS-コラーゲン-Neoドナーとした。製造例1-2と同様の方法でpx330-Puro^r-OVATg2を0.8 μ gとpBS-コラーゲン-Neoドナー0.8 μ gを約 2×10^5 個の始原生殖細胞株に3 μ lのリポフェクタミン2000を用いて遺伝子導入し、遺伝子導入後2~4日の間、終濃度1 μ g/mlのピューロマイシン存在下で培養し、洗浄後、終濃度0.5 mg/mlのネオマイシンを添加し培養を行った。3週間程度の培養の後、得られたコラーゲンノッ

クイン細胞を含む細胞集団を(製造例1-3)と同じ手法によりレシピエント胚に移植後孵化させ免疫グロブリンノックイン生殖巣キメラニワトリを樹立した。後代にオボアルブミン遺伝子座にヒト免疫グロブリン遺伝子がノックインされたニワトリが得られ、卵白にヒトⅠ型コラーゲンの $\alpha 1$ と $\alpha 2$ からなる複合体タンパク質を発現する。

[0054] <実施例1>

上記製造例2-1に記されたようにオボアルブミン遺伝子座の翻訳開始点にヒトインターフェロン β ドナーベクターがノックインされた雌ニワトリ、雄ニワトリを樹立した。

[0055] (1) ノックインニワトリとノックイン卵の性状

樹立したノックインニワトリは、発生異常や顕著な病態を示すことなく、性成熟に達し、ノックイン雌ニワトリは産卵を始めた。卵殻を割り、内容物を検証した所、卵黄の周囲に白濁した濃厚卵白が確認された。一方粘性の低い水溶性卵白は野生型の卵と同様に存在した。典型的な割卵像を図9に示す。

[0056] (2) インターフェロンの同定、濃厚卵白に多い可能性

次に、卵白におけるヒトインターフェロン β の存在について検証を行った。濃厚卵白、水溶性卵白をそれぞれスポイトを用いて回収し、等量のサンプルバッファー(0.125M Tris pH6.8, 10% 2-ME, 4% SDS, 10%グリセロール 0.1%BPB)を加え、これをそれぞれ10倍ずつ計3段階に希釈し、5-20%のアクリルアミドゲルで電気泳動により分離を行ったのちにPVDF膜に転写し、スキムミルクで膜への抗体分子の非特異吸着をブロッキングした後、1000倍希釈した抗ヒトインターフェロン β 抗体(abcam ab85803 ウサギポリクローナル)を一次抗体、1000倍希釈した抗ウサギHRP結合抗体(GEヘルスケアNA934V)を二次抗体としたウエスタンブロットを行った。結果を図10に示す。

[0057] リコンビナントの精製ヒトインターフェロン β (Wako rhIFN- β)と同位置の約30kDaの場所に抗体で認識されるバンドが認められた。また、このバンドは野生型の卵では全く検出されなかった。図10各レーンの1, 1/10, 1/100は相対泳動量を示しており、同じ数字であれば同量の卵白液が泳動されている

。興味深いことに、水溶性卵白では微量のインターフェロンしか同定されなかった。

このことは濃厚卵白に遺伝子ノックインによる組換え発現蛋白質が比較的多く含まれる可能性を示唆している。

[0058] (3) 濃厚卵白にインターフェロン蛋白質が多く認められる(約5mg/mlと推定)

次に、野生型卵(NC: negative control)、2つのヒトインターフェロン β ノックインニワトリ由来卵(KI egg1および2)の水溶性卵白と濃厚卵白を採取し、等量ずつ計2段階の希釈をして5-20%アクリルアミドゲルで電気泳動し、クマシーブリリアントブルー染色(ナカライ CBBステインワン)により卵白に含まれる蛋白質の可視化を行った。結果を図11に示す。先のウエスタンブロットの結果と同様、約30kDaの位置に野生型卵には存在せず、2つのノックイン卵に存在する明瞭なバンドが認められ、ヒトインターフェロン β であることが分かる。また、ウエスタンブロットの結果と同様に、このヒトインターフェロン β のバンドは水溶性卵白を電気泳動した場合には殆ど認められない。CBB染色したバンドのシグナルを比較すると、オボトランスフェリンやオボアルブミンなど他の卵白成分は水溶性卵白と濃厚卵白では量が殆ど変わらないにも関わらず、ヒトインターフェロン β 量が大きく異なることから、オボアルブミン遺伝子座にノックインにより発現させたヒトインターフェロン β は濃厚卵白に優位に集積することが明らかとなった。

[0059] 更に、CBB染色像を解析することで、卵白に含まれるヒトインターフェロンの濃度が推定可能である。CBB染色は蛋白量にほぼ比例して青色を呈する。相対量1のヒトインターフェロン β のシグナル濃度をNIH Imageを用いて定量し、相対量1/10のオボアルブミンと比較すると1.01:1となる。オボアルブミンは卵白蛋白質のほぼ半分を占め、約50mg/mlの濃度であるため、ヒトインターフェロン β は約5mg/ml程度とみなされる。

[0060] 本法による発現では濃度が5mg/mlと遥かに高濃度であると共に、外来遺伝子の挿入位置が均一であるため個体間や同一個体における発現のばらつきが

小さい。更に、ニワトリ個体で実際に発現する遺伝子の翻訳開始点にノックインする技術を用いていることから、G2世代以降でサイレンシングなどの影響を受け発現低下することがない。図12は一週間にわたる3回の採卵(day1, day4, day7)による各卵白中のインターフェロンを比較したものであるが、NIH Imageで定量比較すると1:0.92:0.96となり、濃厚卵白におけるインターフェロン濃度のばらつきは殆ど認められない。また、このノックイン卵は採卵後摂氏18℃で保存したものを同時に割卵したものであるが、外来蛋白質であるインターフェロンが1週間に渡り、顕著な分解等を受けることなく安定して卵白中に存在することを示している。

[0061] (4) 異なった固体由来卵におけるインターフェロンの発現(インターフェロン発現の安定性)。

初卵を産んでから3ヶ月後の4羽のインターフェロンノックイン雌より卵を得て割卵した(図23)。いずれの卵においても濃厚卵白の白濁が認められた。また、5羽のニワトリ(#584, #766, #714, #645, #640)から卵を得てそれぞれの濃厚卵白を上記(3)と同様に電気泳動、CBB染色を行った。全ての卵でヒトインターフェロンのバンドを認めた(図17)。NIH imageで定量比較すると#584, #766, #714, #645, #640のインターフェロン濃度は1.0:1.0:0.94:0.91:0.89となる。これは、非特許文献1でみられる個体間の分泌濃度のゆらぎ(5 μ g/ml-100 μ g/ml)と比べると最大-最小の濃度差11%以内と極めて安定しており、個体間で差がないことは複数の組換えニワトリを用いて組換え蛋白質を大量に得ようとする場合に有利な点である。

[0062] <実施例2>

(1) 濃厚卵白からの効率のよいインターフェロン抽出の試み(可溶化処理が可能)

濃厚卵白に高濃度のインターフェロン β が存在することが分かったが、このインターフェロン β を一般的に活用するには卵白から抽出され、精製されることが望ましい。精製技術には分子量や化学的性状に基づいた様々なカラム処理などがあるが、カラム処理を行うには対象となる蛋白質が水溶液とな

っていることが望ましい。水溶液と不溶物は遠心操作により分離可能である。そこで、濃厚卵白中のインターフェロンが水溶液に含まれるか、不溶物なのか検討した。

濃厚卵白を200 μ l採取し、20k $\times$ Gで15分遠心すると白色の沈殿画分と液体の画分に分離が可能である(図13チューブ1)。液体の画分をアクリルアミドゲル電気泳動するとヒトインターフェロン β は含まれるものの(図14レーン1)、同量の分離前濃厚卵白(図14レーン0)よりは明らかに量が少ない。したがって、遠心により生ずる白色沈殿部に多くのインターフェロンが含まれると考えられた。そこで、白色沈殿を減らし、インターフェロンの収量を増加させる幾つかの試みを行った。図13ではそれぞれのチューブに濃厚卵白液200 μ lを加え、3Mの飽和アルギニン溶液4倍量(800 μ l)を加え転倒混和したもの(チューブ2)、3Mの飽和アルギニン溶液4倍量(800 μ l)を加え超音波破碎を行ったもの(チューブ3)、少量のアルギニン(20mg)を加え転倒混和したのちPBSにより1mlにしたもの(チューブ4)、少量のアルギニン塩酸塩(20mg)を加え転倒混和したのちPBSにより1mlにしたもの(チューブ5)、PBSにより1mlにし、超音波破碎を行ったもの(チューブ6)、飽和量以上のアルギニン塩酸塩(200mg)を加えて転倒混和したもの(チューブ7)、3Mの飽和アルギニン溶液2倍量(400 μ l)を加え超音波破碎を行ったもの(チューブ8)、少量のアルギニン塩酸塩(20mg)を加え超音波破碎したもの(チューブ9)、少量の食塩(40mg)を加え超音波破碎したもの(チューブ10)などである。20k $\times$ Gで15分遠心すると白色沈殿は認められるが、いずれも無処理(チューブ1)の場合より減少しており、特に超音波破碎を行ったもののうちチューブ3, 6, 8, 9で顕著に減少していた。

[0063] 上清を回収し、大元の濃厚卵白に対する泳動量が均一になるようにサンプル調製を行い、アクリルアミドゲルで電気泳動をおこなった(図14)。図14のレーン番号は図13のチューブ番号に対応しており、レーン0は濃厚卵白を分離せずに同量泳動したものである。レーン2からレーン10は、量の多少はあるものの、いずれも無処理(レーン1)のものより多くのインターフ

エロン β を含んでいた。特に、3Mの飽和アルギニン溶液4倍量を加え超音波破碎を行ったもの(レーン3)が多くインターフェロン β を含んでいた。これらのことは超音波破碎のような物理的処理やアルギニン、アルギニンバッファー添加のような化学的処理(より限定的には不溶蛋白質の可溶化処理)によって濃厚卵白より水溶性の画分に抽出されるインターフェロン β の量が増大することを示している。チューブ3の3Mの飽和アルギニン溶液4倍量を加え超音波破碎を行ったものを20k $\times$ Gで15分間遠心し、上清を回収したのちPBS中で一昼夜透析を行った(以下濃厚卵白粗精製物と呼ぶ)。濃厚卵白粗精製物は透明であり析出物は認められず、一連の処理により白濁部から上清に移行したものは可溶化されたと考えられる。

[0064] (2) 鶏卵に生産したインターフェロンの活性

バイオアッセイにより、水溶性卵白、濃厚卵白、濃厚卵白粗精製物のインターフェロン活性について検討した。HEK-blue IFN- α/β (Invivogen)は培地にヒトインターフェロン β を添加することでアルカリフォスファターゼを分泌する培養細胞であり、アルカリフォスファターゼの基質液(Quanti-Blue ; Invivogen)に反応後の培地を加え、基質液の変化(Quanti-Blueの場合赤色から青色への変色)を見る事でヒトインターフェロン β の活性の有無を見ることが出来る。HEK-blue IFN- α/β の培養液中にヒトインターフェロンノックイン卵由来の水溶性卵白、濃厚卵白(20k $\times$ Gで15分遠心後の上清)、濃厚卵白粗精製物(チューブ3由来))を添加した。また、ネガティブコントロールとして野生型鶏卵の水溶性卵白ならびにPBSをポジティブコントロールとして組換えヒトインターフェロンをそれぞれ添加した。細胞を20時間培養し、培養上清をQuanti-Blue基質液に添加し、摂氏37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。結果を図15に示す。

インターフェロンノックイン(IFN-KI)卵の水溶性卵白、濃厚卵白の遠心上清、濃厚卵白の粗精製物いずれにおいてもヒトインターフェロン β の活性が認められ、未精製のノックイン卵産物にインターフェロン活性が認められるとともに、超音波破碎やアルギニンバッファーによる可溶化処理を行っても

活性があることを示している。したがって鶏卵由来インターフェロンは鶏卵のまま未加工や遠心分画など簡単な加工を行っても、また可溶化、精製などのプロセスをとっても利用可能である。

[0065] (3) 鶏卵に生産したインターフェロンの活性定量

バイオアッセイにより濃厚卵白中のインターフェロン活性を測定した。(2)と同様にHEK-blue IFN- α/β の培養液中にヒトインターフェロンノックイン卵由来(初卵後3ヶ月で採卵)の濃厚卵白(超音波破碎後20k $\times$ Gで15分遠心後の上清)を5倍ずつ連続希釈して10 μ lずつ添加した。比較として市販の組換えヒトインターフェロン β (和光純薬)10 μ /mlを同様に5倍ずつ連続希釈して10 μ lずつ添加した。細胞を20時間培養し、培養上清をQuanti-Blue基質液に添加し、摂氏37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。結果を図18に示す。上段市販のヒトインターフェロンを添加した培養上清の反応系は、赤色と青色が混在するウェルが左から4番目にあるのに対し、濃厚卵白を添加した培養上清(下段)は左から8番目に存在する(希釈系列は共に左が濃く、右が薄い)。従って濃厚卵白のインターフェロン活性は市販の10 μ /mlのインターフェロンより625倍以上高く、6.25mg/ml以上と想定される。濃厚卵白はこの時点で約16ml程度取れたことから、卵1個に市販品換算で約100mg相当の活性を有するヒトインターフェロンが得られた事になる。和光純薬の組換えヒトインターフェロン β は20 μ gの市価が39,000円であり、100mgは195,000,000円(約2億円)に相当する。本法を用いることで、活性でみても極めて大量のヒト組換え蛋白質を生産することが可能である。

[0066] (4) G2世代のノックインニワトリの卵解析

G1のノックインニワトリ(雄)を野生型の雌と交配し、G2ノックインニワトリ(雄および雌)を樹立した。G2ノックインニワトリを性成熟させ、卵を得て割卵した(図19右)。G1由来卵と同様に得られた卵は全て濃厚卵白が白濁していた。更に3羽のG2ノックインニワトリより卵を得て濃厚卵白を電気泳動した。G1由来卵の濃厚卵白を比較のために電気泳動した。CBB染色像はG2由来の卵でもG1同様にインターフェロンのシグナルが認められる。以上により、

卵管遺伝子にノックインした外来遺伝子の鶏卵への発現が世代を超えて安定的に行われると示された。これにより、ノックインニワトリを用いた組換え蛋白質生産の大規模化や経時的な安定運用が担保される。

[0067] <実施例 3>

製造例 3 で記したようにして得られた、ヒトオボアルブミン遺伝子座へヒト抗体遺伝子をノックインしたニワトリから卵を得た。卵白におけるヒト抗体蛋白質の存在について検証を行った。卵白を、等量のサンプルバッファー(0.125M Tris pH6.8, 4% SDS, 10%グリセロール 0.1%BPBなお、2-MEは含まない)を加え、これをそれぞれ10倍ずつ計3段階に希釈し、5-20%のアクリルアミドゲルで電気泳動により分離を行ったのちにPVDF膜に転写し、スキムミルクで膜への抗体分子の非特異吸着をブロッキングした後、1000倍希釈した抗ヒトイムノグロブリン抗体(Jackson Immuno Research、Anti-Human IgG F(ab))を一次抗体、1000倍希釈した抗ウサギHRP結合抗体(Jackson Immuno Research、Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L))を二次抗体としたウエスタンブロットを行った。結果を図 20 に示す。

リコンビナントの精製ヒト抗体(商品名:ハーセプチン、ロッシュ)と同位置の約200kDaの場所に抗体で認識されるバンドが認められた(図 20 右)。また、このバンドは野生型の卵では全く検出されなかった(図 20 左)。これらのことから、鶏卵内で正常なサブユニット構成でヒト抗体複合体が存在すると考えられる。図 20 各レーンの1/20, 1/200, 1/2k (=1/2000)は卵白の原液を1とした相対泳動量を示している。濃度既知のハーセプチンの泳動量との比較により、抗体複合体の濃度が1mg/ml以上であると推定される(図 20 右)。

[0068] <実施例 4>

(1) オボムコイドホモ型遺伝子ノックアウトニワトリ

オボムコイドは卵白蛋白質であるが、初期発生過程における発現動態や発生における機能は解析されておらず、機能欠失が及ぼす影響も全くわかっていない。製造例 1-3 で示したように、我々はゲノム編集技術により、ヘテ

口型のオボムコイドノックアウトニワトリ(雄および雌)を作製した。さらにこれらを交配することでオボムコイドを完全欠損するニワトリ(ホモ型のオボムコイドノックアウトニワトリ)を樹立した。図16に示すようにオボムコイドの蛋白質をコードするエクソン3の同じ場所5塩基を欠損した雄、雌ヘテロノックアウトニワトリを性成熟後交配し、後代を得た。図16に示すように後代の中には野生型、ヘテロ型ノックアウトに加えてホモ型のノックアウトニワトリが得られた。また、オボムコイドのホモ型ノックアウトニワトリは雄、雌が得られており、いずれも野生型と同様に健康で形態の異常なく成長を続けている。このことから、オボムコイドは機能欠失により致死や形態異常等の初期発生に影響を及ぼすものではないことを初めて明らかにすることができた。

[0069] (2) オボムコイドノックアウトニワトリ卵の有効性

ホモ型のオボムコイドノックアウトニワトリはオボムコイドを分泌しないため、オボムコイドを含まない卵を生産する。オボムコイドは非常に強力なアレルゲン物質であり、加熱や酵素による分解によってもアレルゲン性を失わないことが知られている。オボムコイドを欠損した卵は当然オボムコイドによる強いアレルゲン性を持たないことから、低アレルギー性の卵として生食、加工食品、ワクチン製造、化粧品原料等卵を用いる全ての製造物のアレルギー性を大きく低減させるのに役に立つことが自明である。

[0070] (3) オボムコイドノックアウトニワトリ卵の性状

ホモ型のノックアウトニワトリの雌は産卵する。少なくとも6ヶ月に渡り野生型と同様ほぼ毎日産卵した。割卵像を図21左に示す。外観上は野生型の卵と違いは認められない。また、加熱により凝固するなど、加工性も通常の鶏卵と顕著な違いを認めない(図21右)。

更に、ホモ型ノックアウトニワトリ同士の交配に依りニワトリ固体が発生し得る。5bpホモ欠損個体の雌雄を交配した卵を孵卵した結果G3世代のオボムコイド5bpホモ欠損個体を得られている(図23)。このことはオボムコイド遺伝子だけでなく、オボムコイド蛋白質が欠損していてもニワトリは発生するす

なわちオボムコイドがニワトリ発生に必須ではないことを示している。

産業上の利用可能性

[0071] ＊ノックイン遺伝子のさらなる発現量の増大

今回の実施例で得られたインターフェロン β の濃度は5mg/mlと非常に高いものであったが、更に卵内における組換え蛋白質の濃度の向上を図ることが可能である。

1. ノックイン遺伝子のホモ化

解析した鶏卵の親の遺伝子型はオボアルブミン遺伝子座の片アリルにヒトインターフェロン β が挿入されたもの(ヘテロ型遺伝子ノックイン)である。ヘテロ型遺伝子ノックイン親同士の交配やノックイン始原生殖細胞を有する生殖巣キメラ個体同士の交配により両アリルにヒトインターフェロン β が挿入された個体(ホモ型遺伝子ノックイン)を作製すれば、より高濃度の組換え蛋白質を発現する個体を得ることが出来る。

2. シグナルペプチドやコドンユースエージの改良

今回オボアルブミン遺伝子の翻訳開始点にはヒトインターフェロン β のcDNAをノックインしている。したがってシグナルペプチドはヒトインターフェロン β のシグナルペプチドであり、ニワトリ卵管細胞に最適化しているものではない。ニワトリ卵管で高効率に分泌するためのシグナルペプチドとしては実際に卵管から分泌される蛋白質のシグナルペプチドが挙げられ、例えば卵白リゾチームのMRSLLILVLCFLPLAALGやオボトランスフェリンのMKLILCTVLSLGI AAVCFAなどが挙げられる。また、これに限らずニワトリ細胞で高効率に蛋白質を分泌できる人工または天然のシグナルペプチドでも良い。これらシグナルペプチドを目的蛋白質のN端に含む蛋白質をオボアルブミン遺伝子座にノックインすることでより高濃度の目的蛋白質生産が可能である。さらにノックインするcDNAの塩基配列をニワトリで用いられるコドン使用頻度に併せて最適化することで蛋白質生産の向上を図る事ができる。

3. 挿入遺伝子数の増大

今回ノックインした遺伝子は1つだけであったが、複数個の遺伝子を転写

、翻訳が可能な形で連結してノックインし、同時に発現させることで発現量を増大させることが出来る。複数個の遺伝子は単一の遺伝子であっても複数種の遺伝子であっても良く、数もいくつであっても良い。具体的には、遺伝子ノックインに際し、複数の遺伝子をIRESなどの配列を介在させて挿入することでより多くの転写、翻訳を行い、遺伝子産物を得ることが出来る。また、2Aペプチドなどを介在させて複数の蛋白質をオボアルブミンプロモーターの制御下に一度に発現させ、ペプチドを切断することでより多くの蛋白質生産が可能である。

ヒト抗体遺伝子の軽鎖遺伝子と重鎖遺伝子ならびにヒトⅠ型コラーゲン遺伝子の $\alpha 1$ と $\alpha 2$ をそれぞれ2Aペプチドの遺伝子を介して連結し、ノックインしたニワトリは好ましい実施形態の1つである。

4. ノックアウトニワトリ卵の有効性

ホモ型のオボムコイドノックアウトニワトリはオボムコイドを分泌しないため、オボムコイドを含まない卵を生産する。オボムコイドは非常に強力なアレルゲン物質であり、加熱や酵素による分解によってもアレルゲン性を失わないことが知られている。オボムコイドを欠損した卵は当然オボムコイドによる強いアレルゲン性を持たないことから、低アレルギー性の卵として生食、加工食品、ワクチン製造、化粧品原料等卵を用いる全ての製造物のアレルギー性を大きく低減させるのに役に立つことが自明である。また、交配やゲノム編集された始原生殖細胞を用いることで外因性遺伝子の発現を卵白アレルゲンノックアウトニワトリの卵で行うことも可能であり、このようにして生産された外因性遺伝子産物は精製時のアレルゲン除去過程が容易になることが自明である。

オボムコイド以外の卵管特異的遺伝子をノックアウトした家禽卵は、同様にアレルギー性を大きく低減させるのに役に立つ。

請求の範囲

- [請求項1] オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも1種の卵管特異的遺伝子がノックアウトされ、かつ、オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも1種の卵内アレルゲンタンパク質が低減又は消失されたノックアウト家禽の卵。
- [請求項2] 請求項1に記載のノックアウト家禽の卵であって、
前記ノックアウトされた卵管特異的遺伝子をコードする塩基配列において、PAM配列より5'側または3'側の領域近傍に塩基の欠失、置換、または挿入を有している、ノックアウト家禽の卵。
- [請求項3] 請求項1または2に記載のノックアウト家禽の卵であって、
前記卵管特異的遺伝子がホモノックアウトされており、前記卵管特異的遺伝子の遺伝子型がnull(-/-)である、ノックアウト家禽の卵。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか一項に記載のノックアウト家禽の卵であって、
前記卵管特異的遺伝子がオボアルブミンである、ノックアウト家禽の卵。
- [請求項5] 請求項4に記載のノックアウト家禽の卵であって、
オボアルブミンをコードする塩基配列において、配列番号1 (OVATg 1)に示される塩基配列に相当する領域およびその近傍領域に塩基の欠失、置換、または挿入を有している、ノックアウト家禽の卵。
- [請求項6] 請求項1～3のいずれか一項に記載のノックアウト家禽の卵であって、
前記卵管特異的遺伝子がオボムコイド遺伝子である、ノックアウト家禽の卵。
- [請求項7] 請求項6に記載のノックアウト家禽の卵であって、

オボムコイドをコードする塩基配列において、配列番号 6 (OVMTg2) に示される塩基配列に相当する領域およびその近傍領域に塩基の欠失、置換、または挿入を有している、ノックアウト家禽の卵。

[請求項8] 請求項 6 または 7 に記載のノックアウト家禽の卵であって、
内在性のオボムコイドを実質的に含まない、ノックアウト家禽の卵。

[請求項9] 請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のノックアウト家禽の卵由来のノックアウト家禽。

[請求項10] 卵管特異的遺伝子プロモーターの制御下に外因性遺伝子がホモ又はヘテロでノックインされ、かつ、外因性遺伝子の発現産物が卵内で安定高発現しているノックイン家禽の卵であって、

前記卵管特異的遺伝子プロモーターが、オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の卵管特異的遺伝子のプロモーターである、ノックイン家禽の卵。

[請求項11] 請求項 10 に記載のノックイン家禽の卵であって、
前記卵管特異的遺伝子プロモーターが、オボアルブミン遺伝子のプロモーターであり、前記外因性遺伝子が薬剤耐性遺伝子とともにオボアルブミン遺伝子のエクソン 2 に挿入されている、ノックイン家禽の卵。

[請求項12] 請求項 10 または 11 に記載のノックイン家禽の卵であって、
前記外因性遺伝子の 5' 端が、オボアルブミンをコードする塩基配列における配列番号 1 (OVATg1) に示される塩基配列に相当する領域、または、配列番号 24 (OVATg2) に示される塩基配列に相当する領域に挿入されている、ノックイン家禽の卵。

[請求項13] 請求項 10 ～ 12 のいずれか一項に記載のノックイン家禽の卵であって、
前記外因性遺伝子によりコードされるタンパク質が、卵 1 個あたり

1mg以上で含まれる、ノックイン家禽の卵。

[請求項14] 請求項10～13のいずれか一項に記載のノックイン家禽の卵であって、

前記外因性遺伝子の発現産物が濃厚卵白に優位に発現する、ノックイン家禽の卵。

[請求項15] 請求項10～14のいずれか一項に記載のノックイン家禽の卵であって、

前記外因性遺伝子が、インターフェロン β 、免疫グロブリン、または、コラーゲンをコードする遺伝子である、ノックイン家禽の卵。

[請求項16] 請求項10～15のいずれか一項に記載のノックイン家禽の卵であって、

前記外因性遺伝子がヒト由来の遺伝子である、ノックイン家禽の卵。

[請求項17] オボアルブミン遺伝子プロモーターの制御下に外因性遺伝子がホモ又はヘテロでノックインされたノックイン家禽の卵由来の濃厚卵白であって、

安定高発現している前記外因性遺伝子の発現産物を優位に含む、濃厚卵白。

[請求項18] 外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法であって、

(a)家禽始原生殖細胞の卵管特異的遺伝子プロモーターの制御下に前記外因性遺伝子をノックインする工程と、

(b)前記家禽生殖細胞を用いて、前記卵管特異的遺伝子プロモーターの制御下に前記外因性遺伝子をホモ又はヘテロでノックインした雌家禽を作製する工程と、

(c)前記雌家禽から得られた前記外因性遺伝子を発現する家禽卵を得る工程と

を含む、方法。

[請求項19] 請求項18に記載の外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法であって、

前記工程(a)が、(i)前記卵管特異的遺伝子プロモーターの制御下にある翻訳開始点の5'側領域、前記外因性遺伝子、薬剤耐性遺伝子ユニット、および、前記翻訳開始点の3'側領域を含むドナーコンストラクトと、(ii)標的配列、および、異なる薬剤耐性遺伝子ユニットを含むベクターとを用いて、前記外因性遺伝子をゲノム編集により導入する工程である、方法。

[請求項20] 請求項19に記載の外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法であって、

前記工程(a)における前記卵管特異的遺伝子プロモーターが、オボアルブミン遺伝子プロモーターであって、

前記工程(d)が、前記家禽卵の濃厚卵白から前記外因性遺伝子の発現産物を回収する工程である、方法。

[請求項21] 請求項19または20に記載の外因性遺伝子の安定高発現により前記外因性遺伝子の発現産物を含む、ノックイン家禽の卵を作製する方法であって、

前記工程(a)が、(i)オボアルブミン翻訳開始点の5'側2.8Kb、前記外因性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子ユニット、および、オボアルブミン翻訳開始点の3'側3.0kbを含むドナーコンストラクトと、(ii)前記標的配列としての配列番号24に示される塩基配列、および、ネオマイシン耐性遺伝子ユニットを含むベクターとを用いて、前記外因性遺伝子をCRISPRにより導入する工程である、方法。

[請求項22] ノックイン家禽の卵より外因性遺伝子の発現産物を調製する方法であって、

請求項18～21のいずれか一項に記載の方法における前記工程(

c)の後に、(d)前記家禽卵から前記外因性遺伝子の発現産物を回収する工程をさらに含む、方法。

[図1]

10	20	30	40	50	60
gacatacagctagaaagctgtattgccttttagcactcaagctcaaaagACAACTCAGAGT ← OVATg1					
70	80	90	100	110	120
TCACCATgggctccatcgggcgcagcaagcatggaatgtttgatgtattcaaggagc					
M G S I G A A S M E F C F D V F K E					
130	140	150	160	170	180
tcaaagtcaccatgccaatgagaacatcttctactgccccattgccatcatgtcagctc					
L K V H H A N E N I F Y C P I A I M S A					
190	200	210	220	230	240
tagccatggtatacctgggtgcaaaagacagcaccaggacacagataaataaggttgttc					
L A M V Y L G A K D S T R T Q I N K V V					

[図2]

10	20	30	40	50	60
atggccatggcaggcgtcttctgtgtgttctcttctgtgtttgttggttctctccagat					
M A M A G V F V L F S F V L C G F L P D					
70	80	90	100	110	120
gctgtctttggggctgaggtggactgcagtaggTTTCCAACGCTACAGACAaggaaggc					
A V F G A E V D C S R F P N A T D K E G					
130	140	150	160	170	180
aaagatgtattggtttgcaacaaggacctcgcgcccatctgttggtaccgatggagtcact					
K D V L V C N K D L R P I C G T D G V T					
190	200	210	220	230	240

[図3]

オボアルブミン遺伝子変異の例

OVATg1

Met

WT:	gctggtttgctctagACAACTCAGAGTTCACCATgggctccatcggt
mt:	gctggtttgctctagacaactcagagt----catgggctccatcggt
mt:	gctggtttgctctagacaactcagagttcac-atgggctccatcggt
mt:	gctggtttgctctagacaactcagagttcacATtgggctccatcggt
mt:	gctggtttgctctagacaactcagagttcac--tgggctccatcggt
mt:	gctggtttgctctagacaactca-----atgggctccatcggt
mt:	gctg-----catgggctccatcggt

[図4A]

オボムコイド遺伝子変異の例

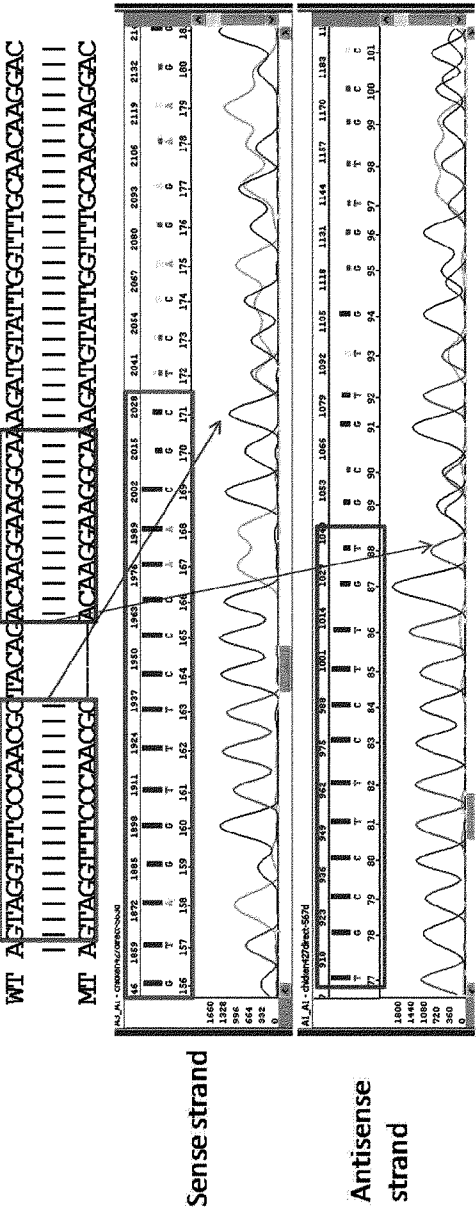
OVMTg2

```

wt:      tgcagtaggTTTCCCAACGCTACAGACAagggaaggcaaagatgtattggtttgcaa
mt:      tgcagtaggtttcccaacgctacaga-aagggaaggcaaagatgtattggtttgcaa
mt:      tgcagtaggtttcccaacgctaca-acaagggaaggcaaagatgtattggtttgcaa
mt:      tgcagtaggtttcccaacgctaca--caagggaaggcaaagatgtattggtttgcaa
mt:      tgcagtaggtttcccaacgcta---acaagggaaggcaaagatgtattggtttgcaa
mt:      tgcagtaggtttcccaacgctaca----aggaaggcaaagatgtattggtttgcaa
mt:      tgcagtaggtttcccaacgcta-----aagggaaggcaaagatgtattggtttgcaa
mt:      tgcagtaggtttcccaacg-----gacaagggaaggcaaagatgtattggtttgcaa
mt:      tgcagtaggtttcccaacg-----caagggaaggcaaagatgtattggtttgcaa
mt:      tgcagtaggtttcccaacgc-----aagggaaggcaaagatgtattggtttgcaa
mt:      tgcagtaggtttcccaacgct-----gtattgg-ttgcaa

```

[4B]

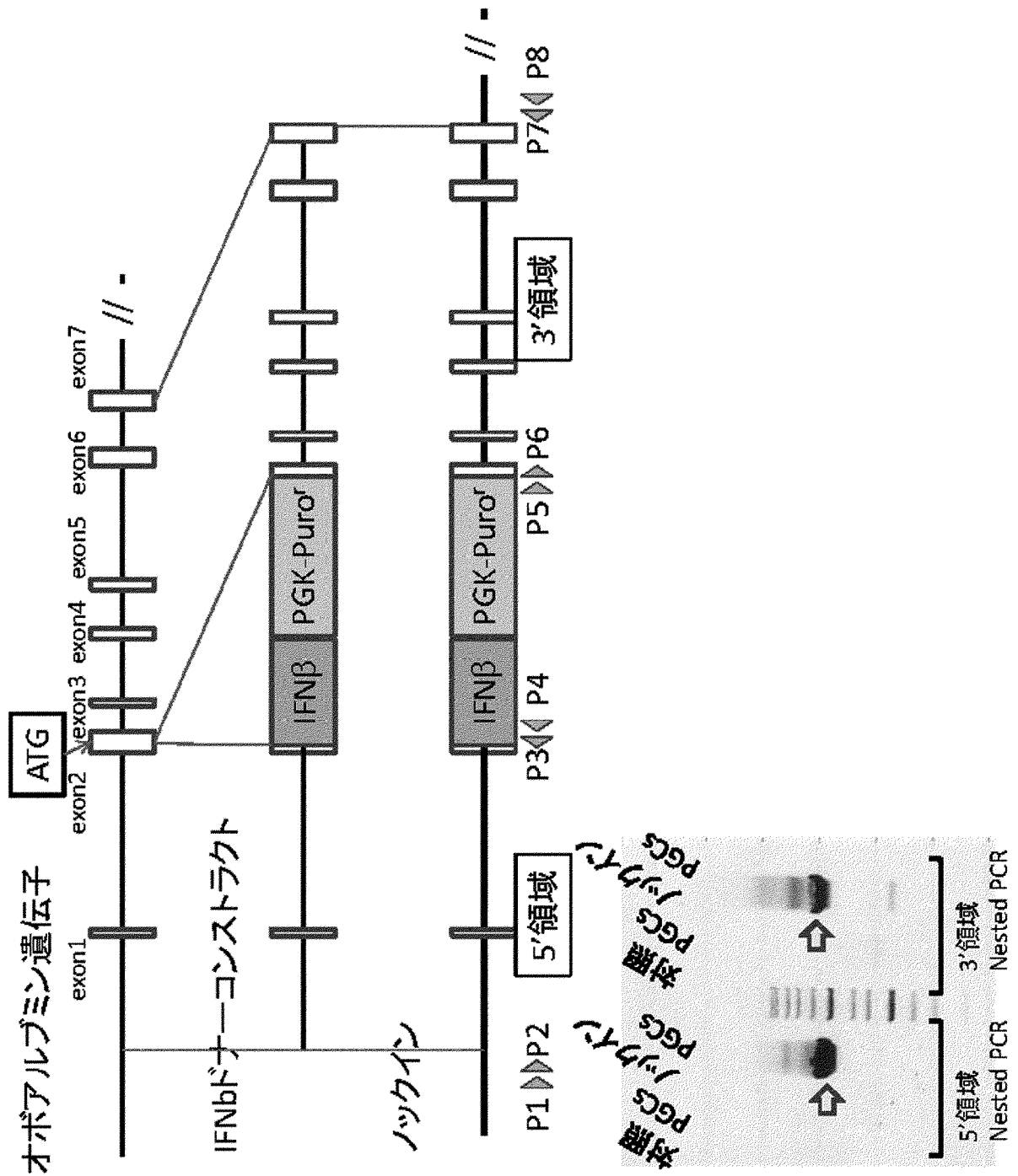


オボムコイド遺伝子変異の例 (F1ニワトリ)

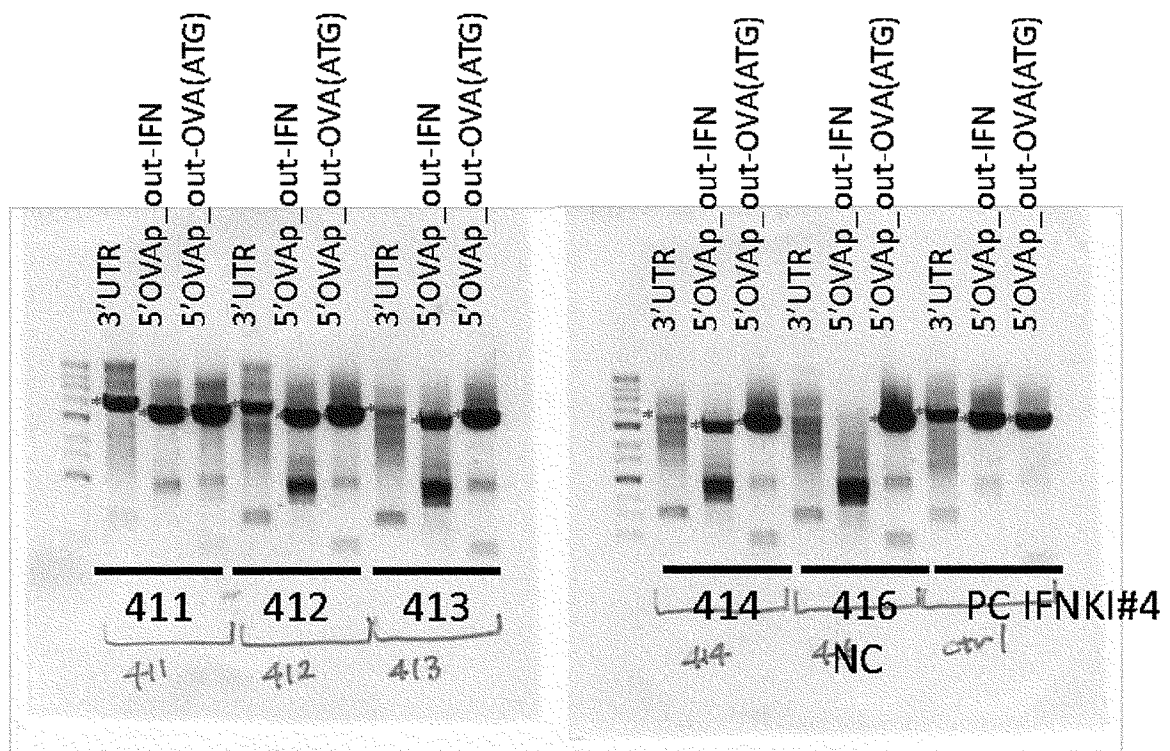
OVMTg2

wt: tgcagtaggTTTCCCAACGCTACAGACAaggaaaggcaaaagatgtattggtttgcaa
mt: tgcagtaggTTTCCCAACGCTaca-acaaggaaaggcaaaagatgtattggtttgcaa
mt: tgcagtaggTTTCCCAACGctac--acaaggaaaggcaaaagatgtattggtttgcaa
mt: tgcagtaggTTTCCCAACgct----acaaggaaaggcaaaagatgtattggtttgcaa
mt: tgcagtaggTTTCCCAAcgc-----acaaggaaaggcaaaagatgtattggtttgcaa
mt: tgcagtaggTTTCCCAAcgc-----ggaaggcaaaagatgtattggtttgcaa
mt: tgcagtaggTTTCCCAAcgc-----aaggcaaaagatgtattggtttgcaa
mt: tgcagtaggTTTCCCAAcgc-----tgattggtttgcaa
mt: tgcagtag-----gatgtattggtttgcaa

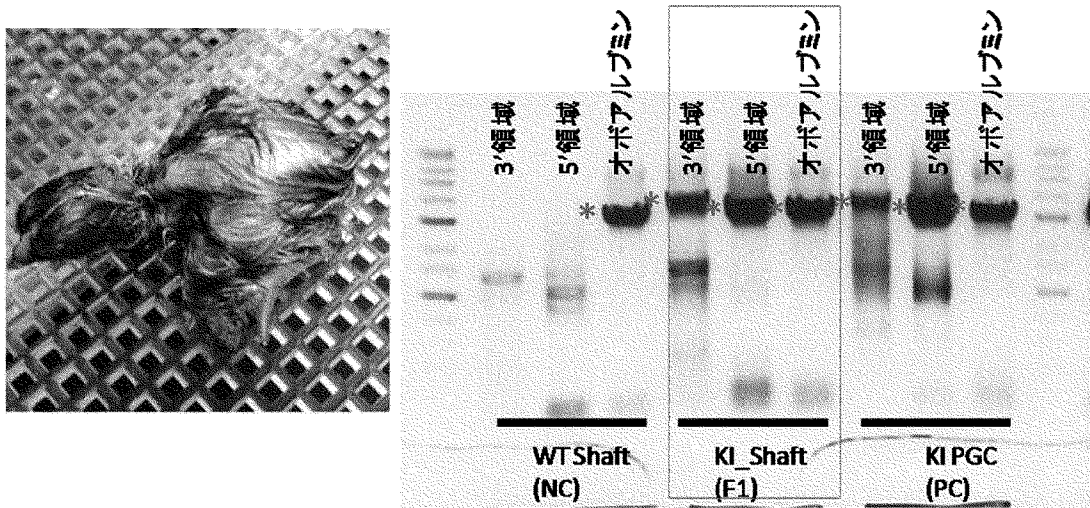
[図5A]



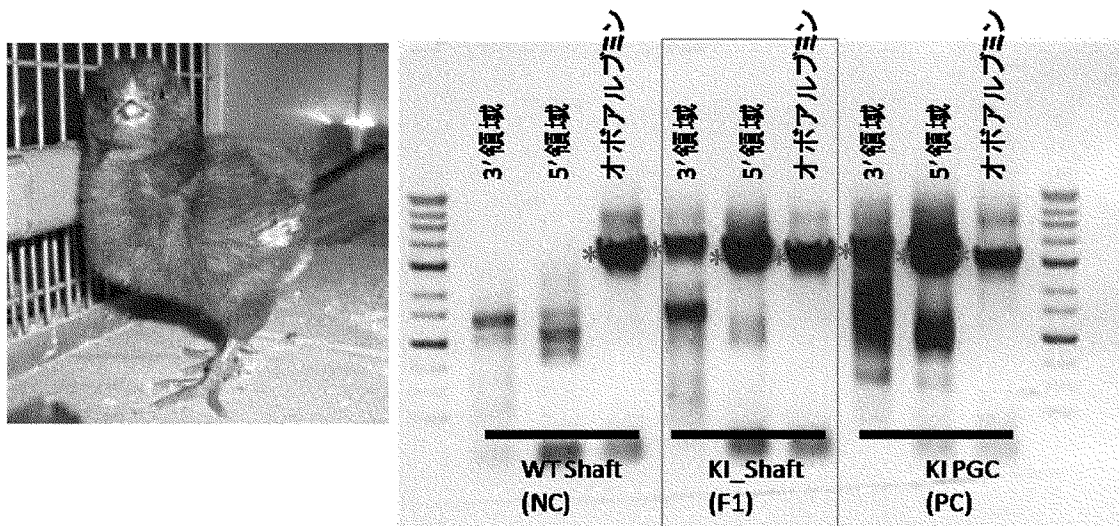
[図5B]



[図5C]

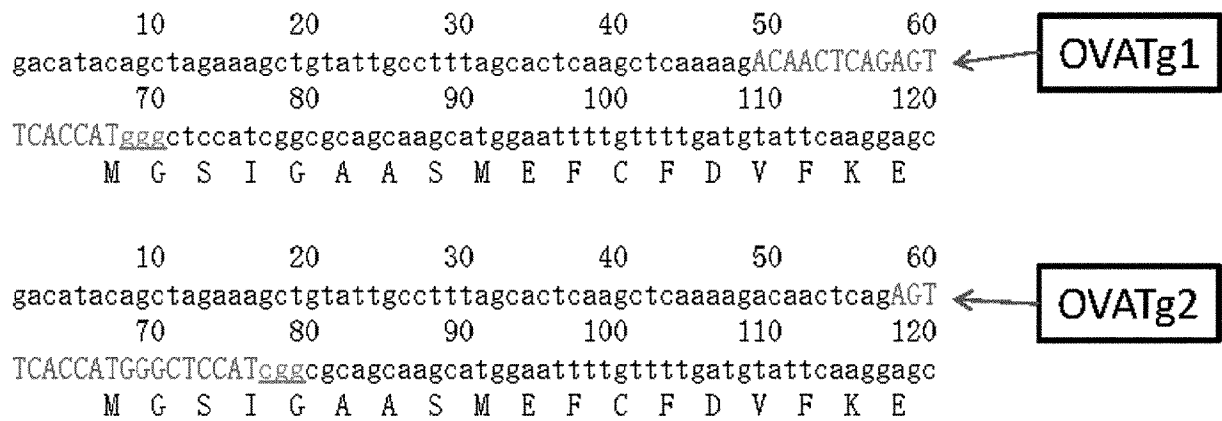


411由来雌後代(F1)

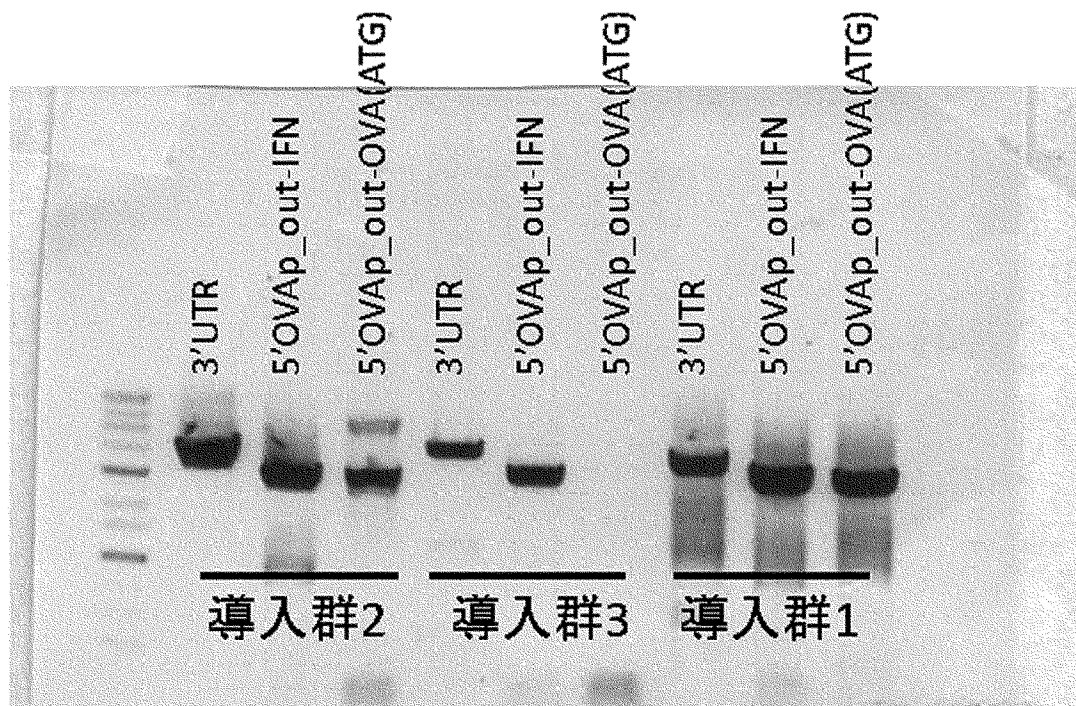


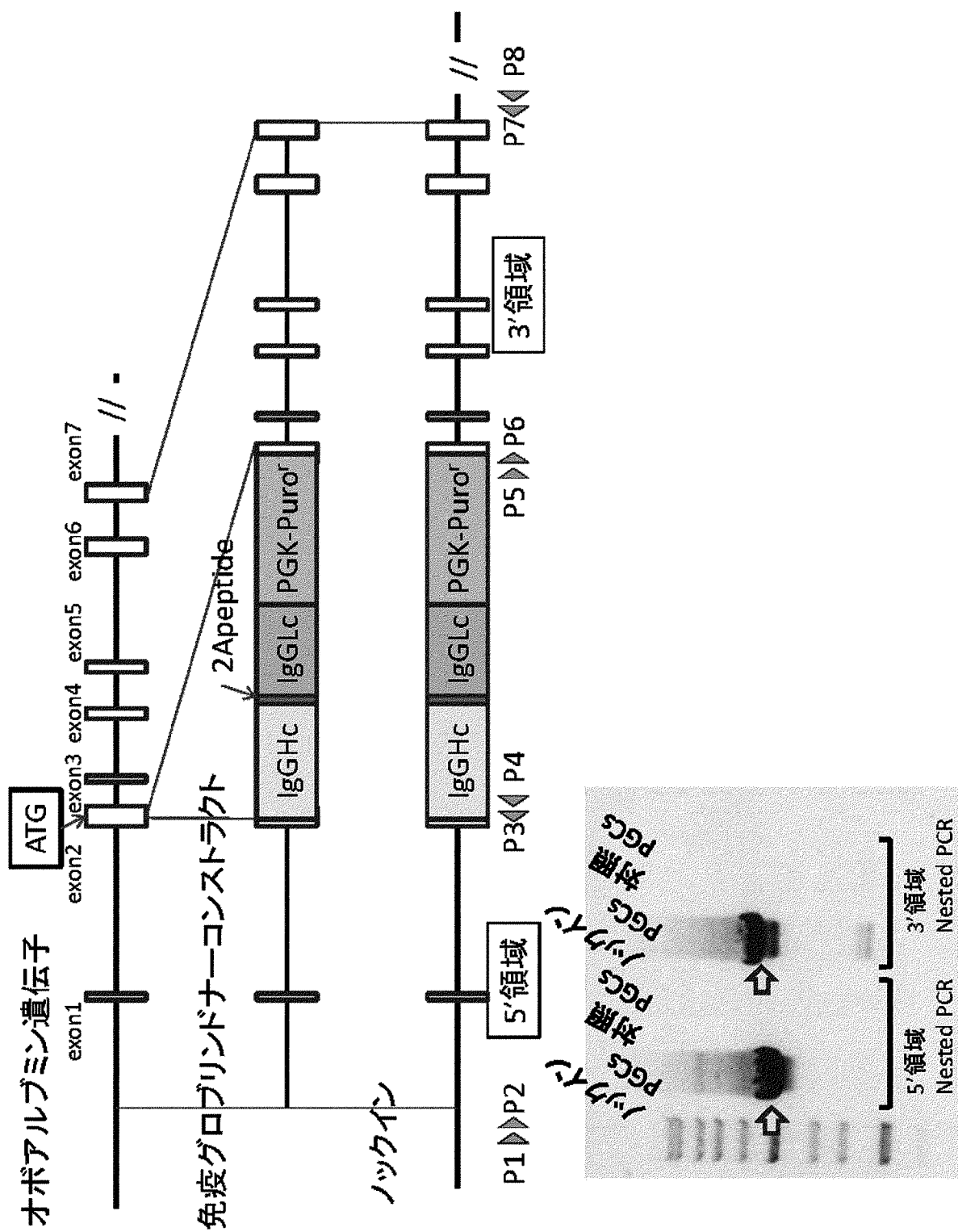
412由来雌後代(F1)

[図6A]

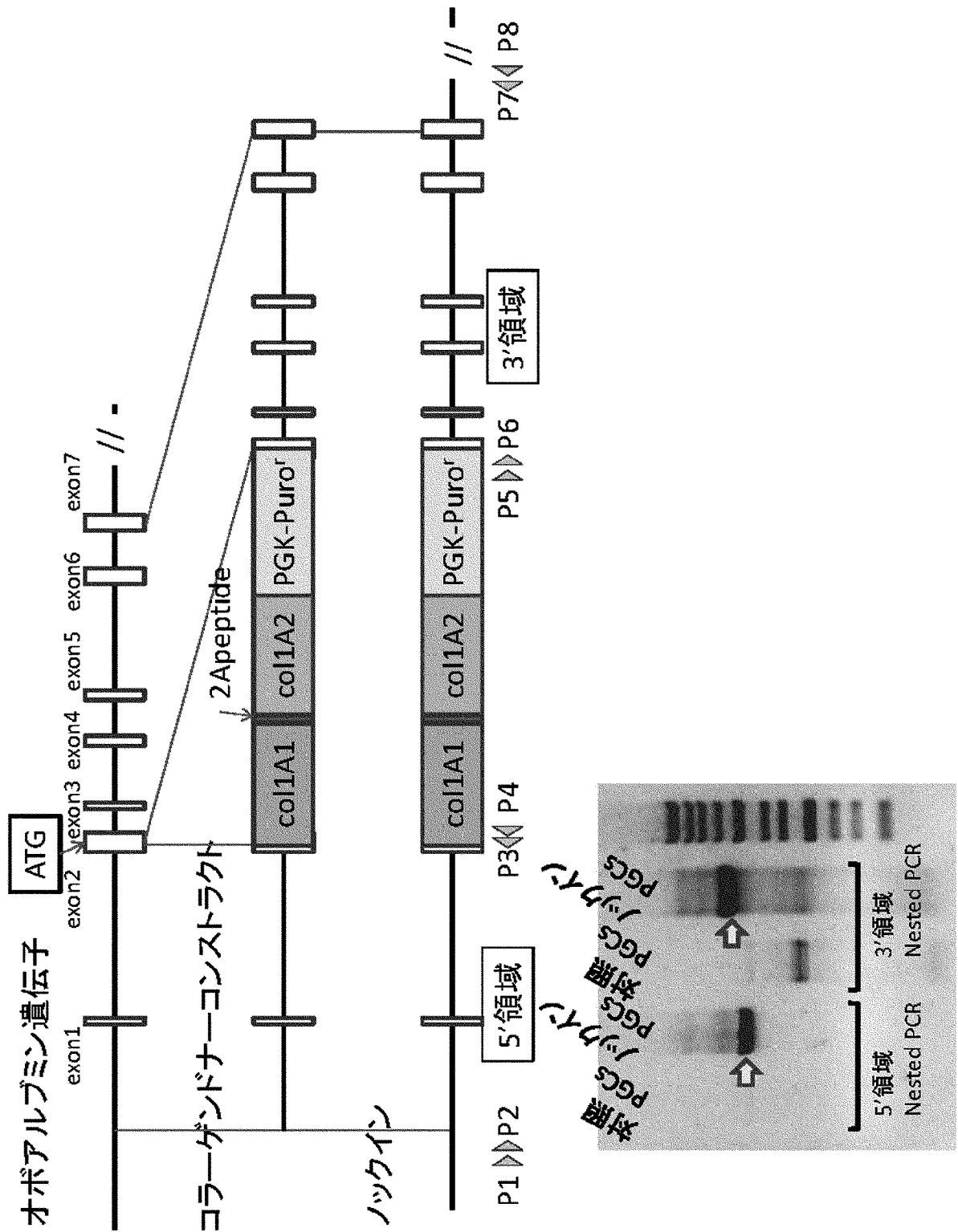


[図6B]

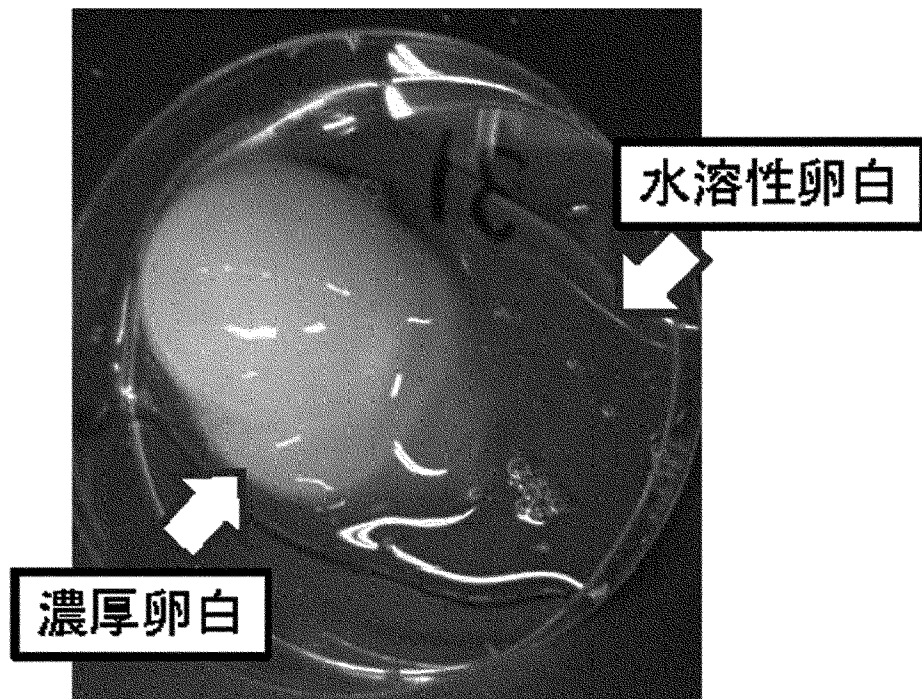




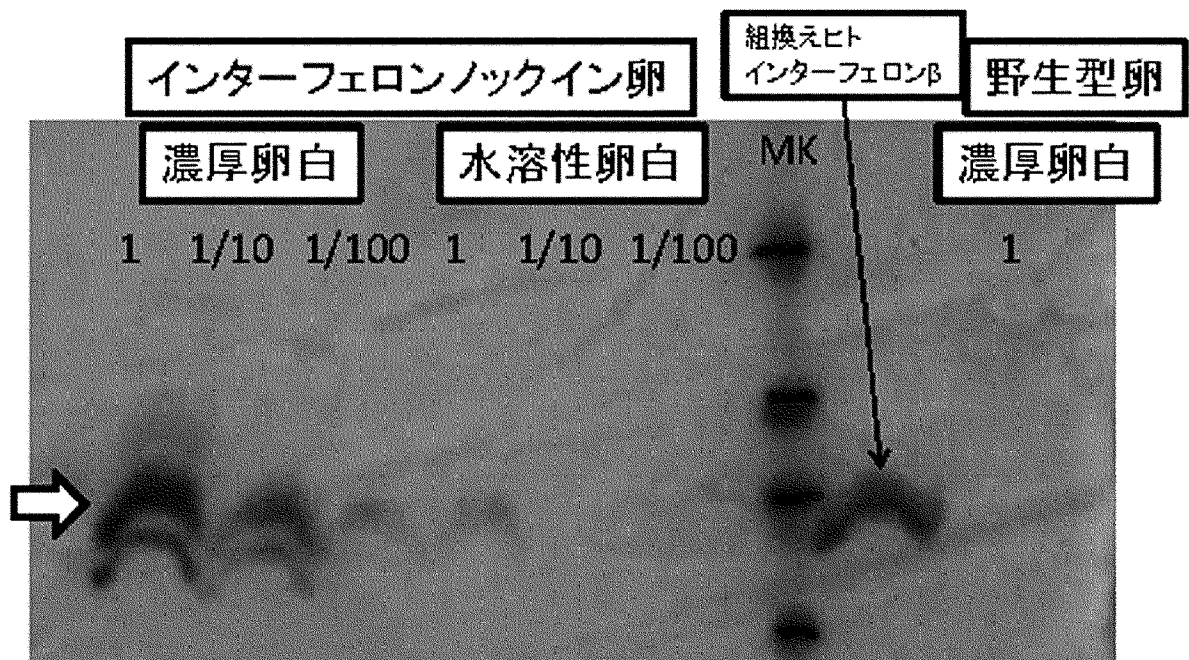
[図8]



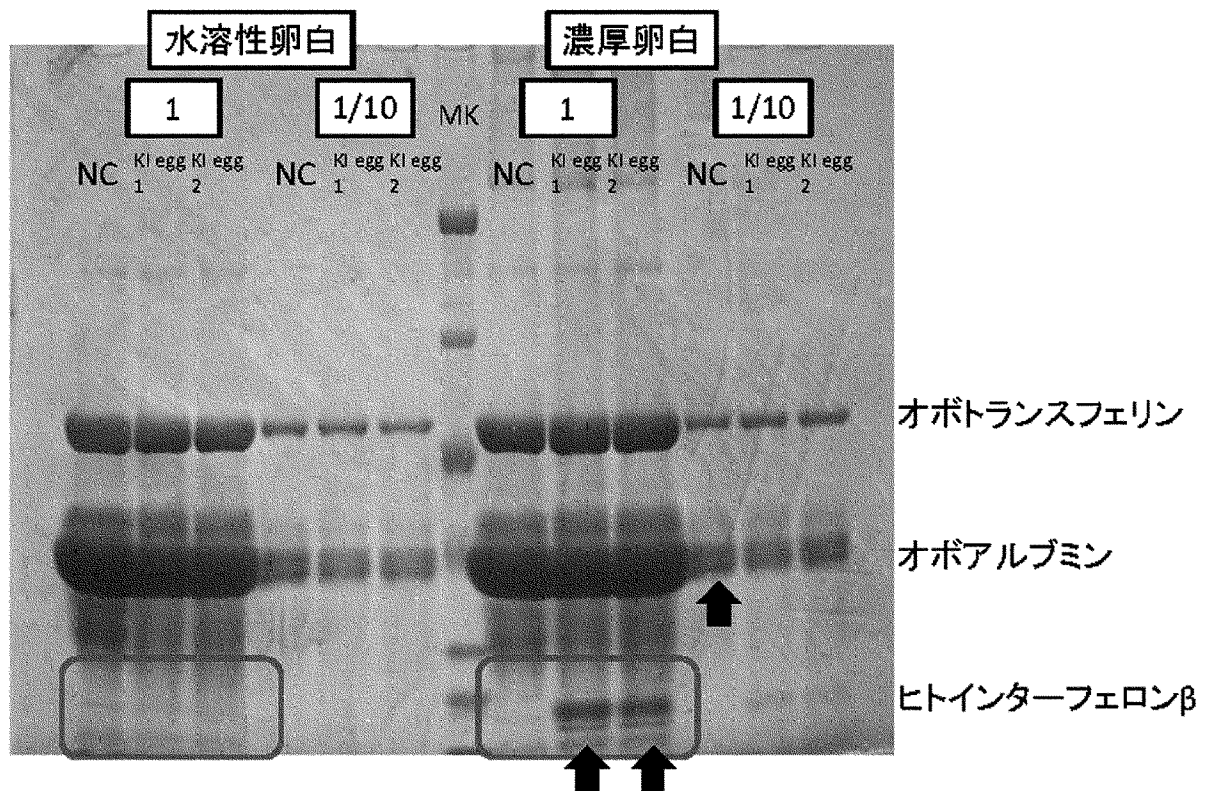
[図9]



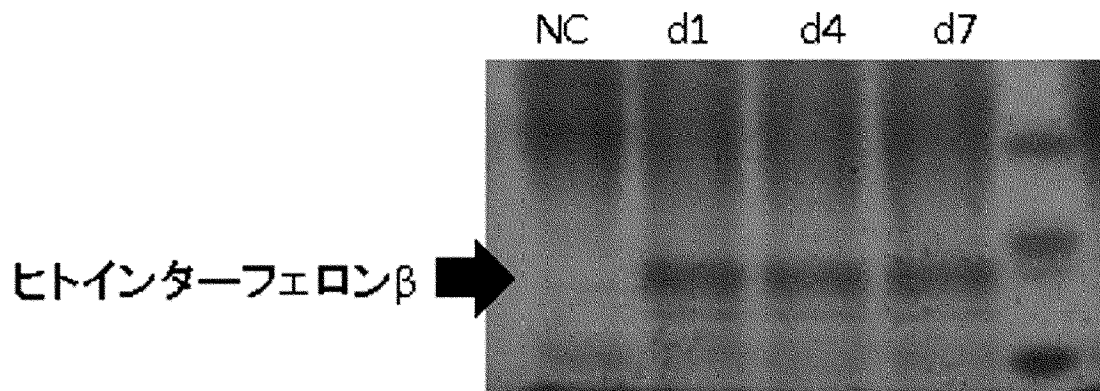
[図10]



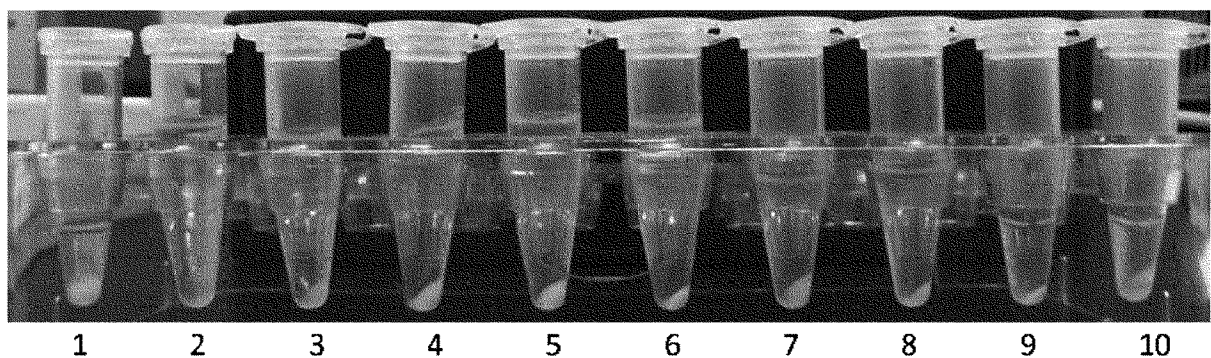
[図11]



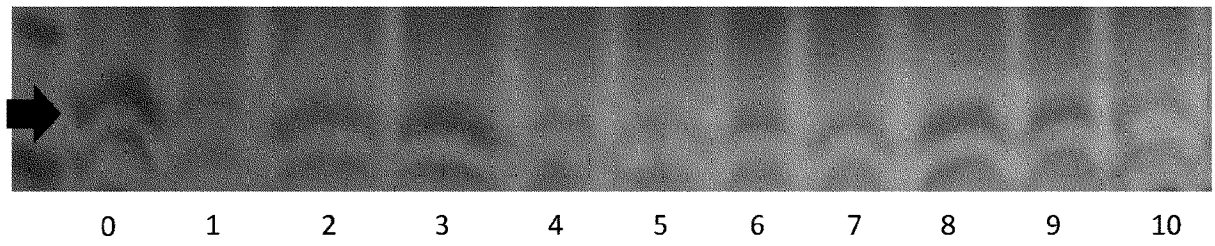
[図12]



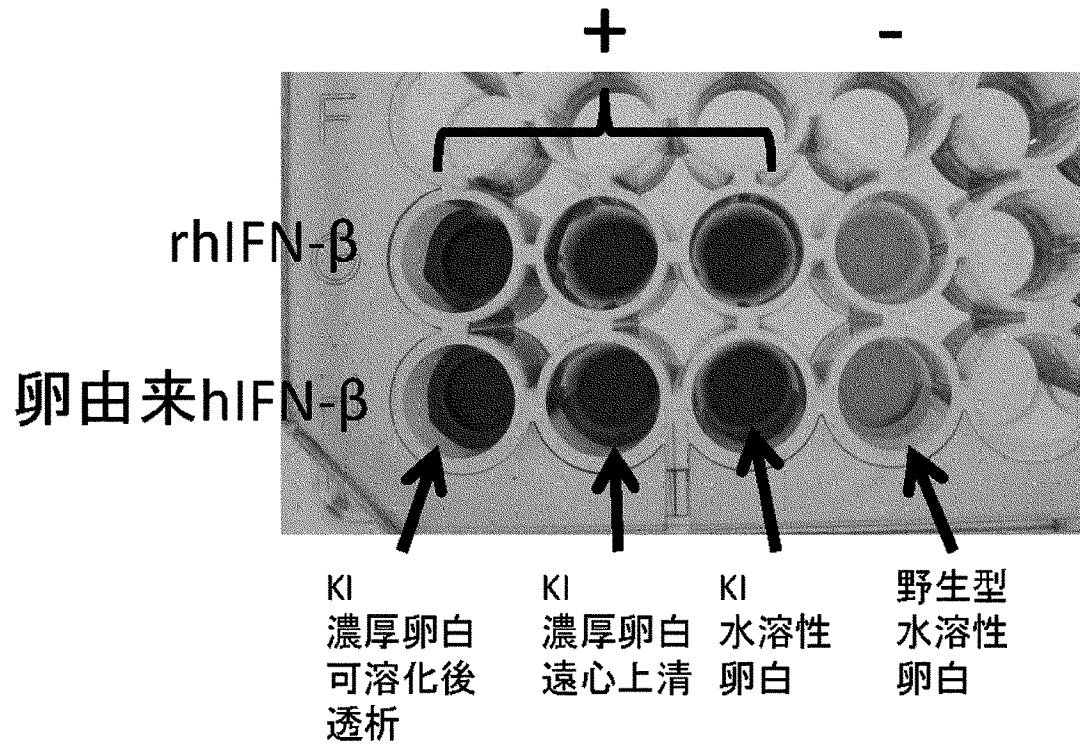
[図13]



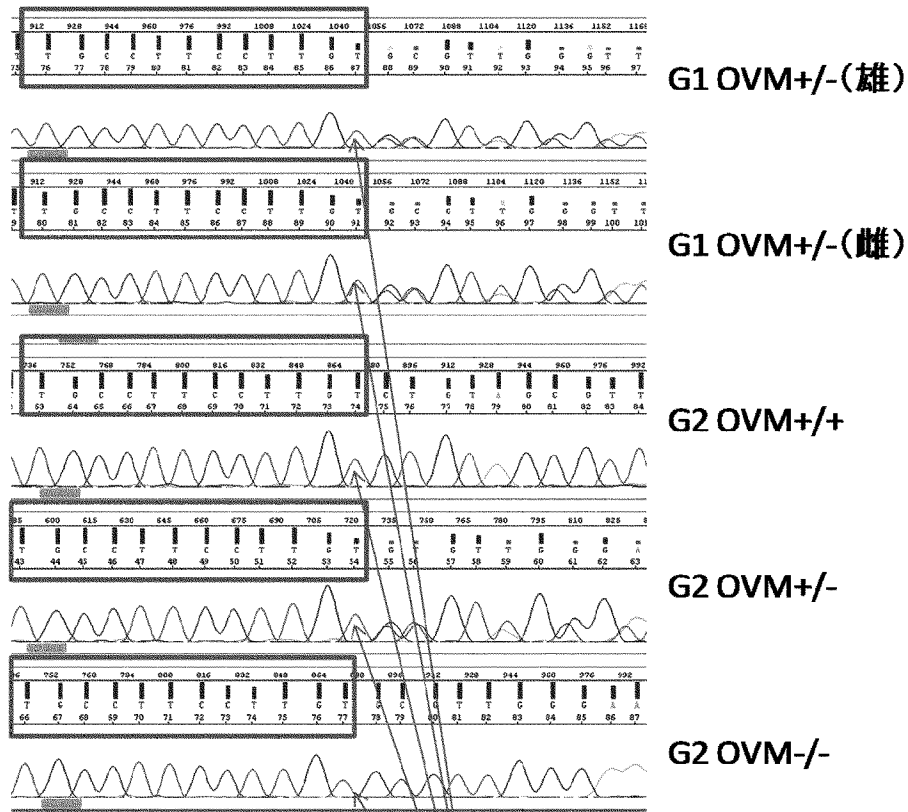
[図14]



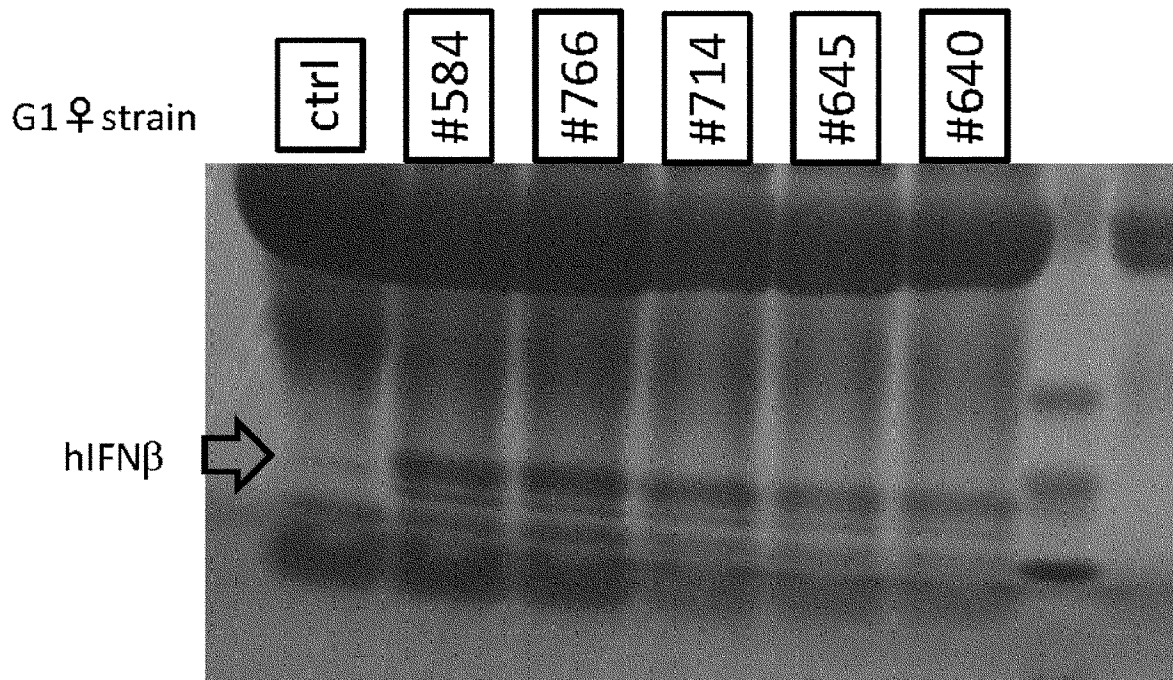
[図15]



[図16]

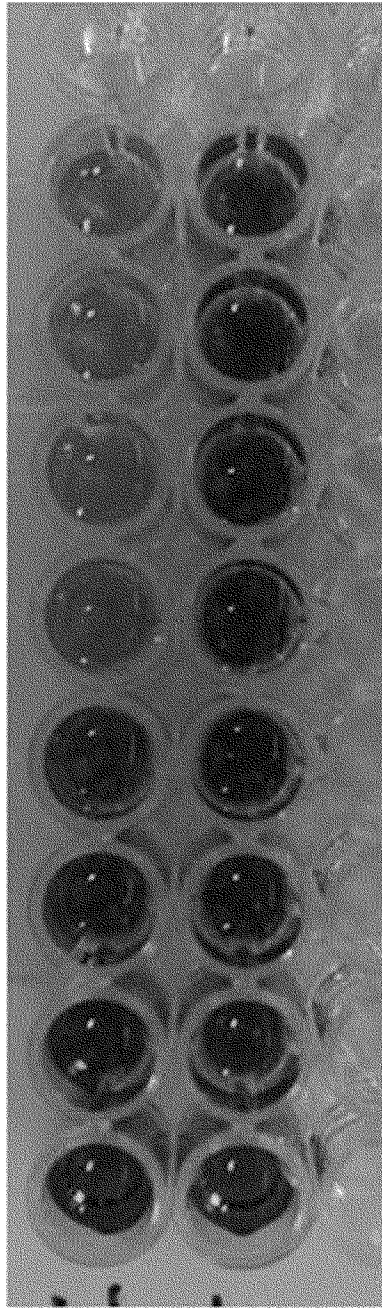


[図17]



[図18]

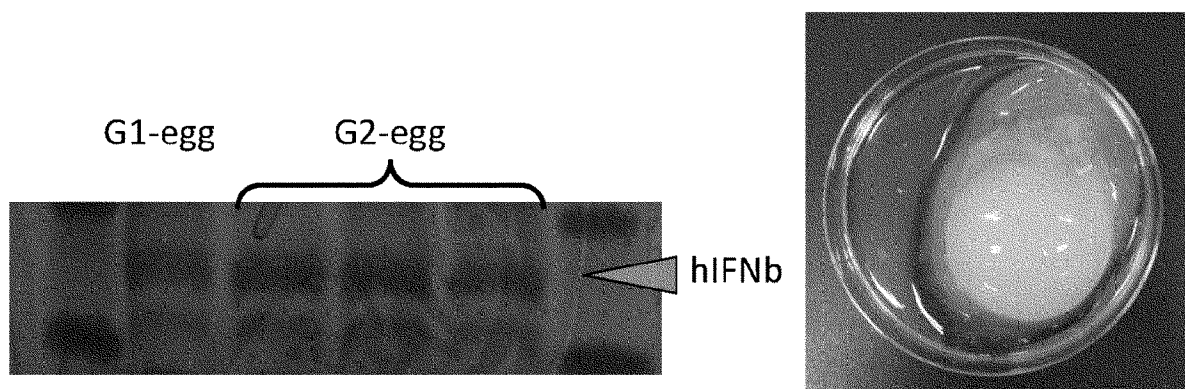
1 1/5 1/25 1/125 1/625



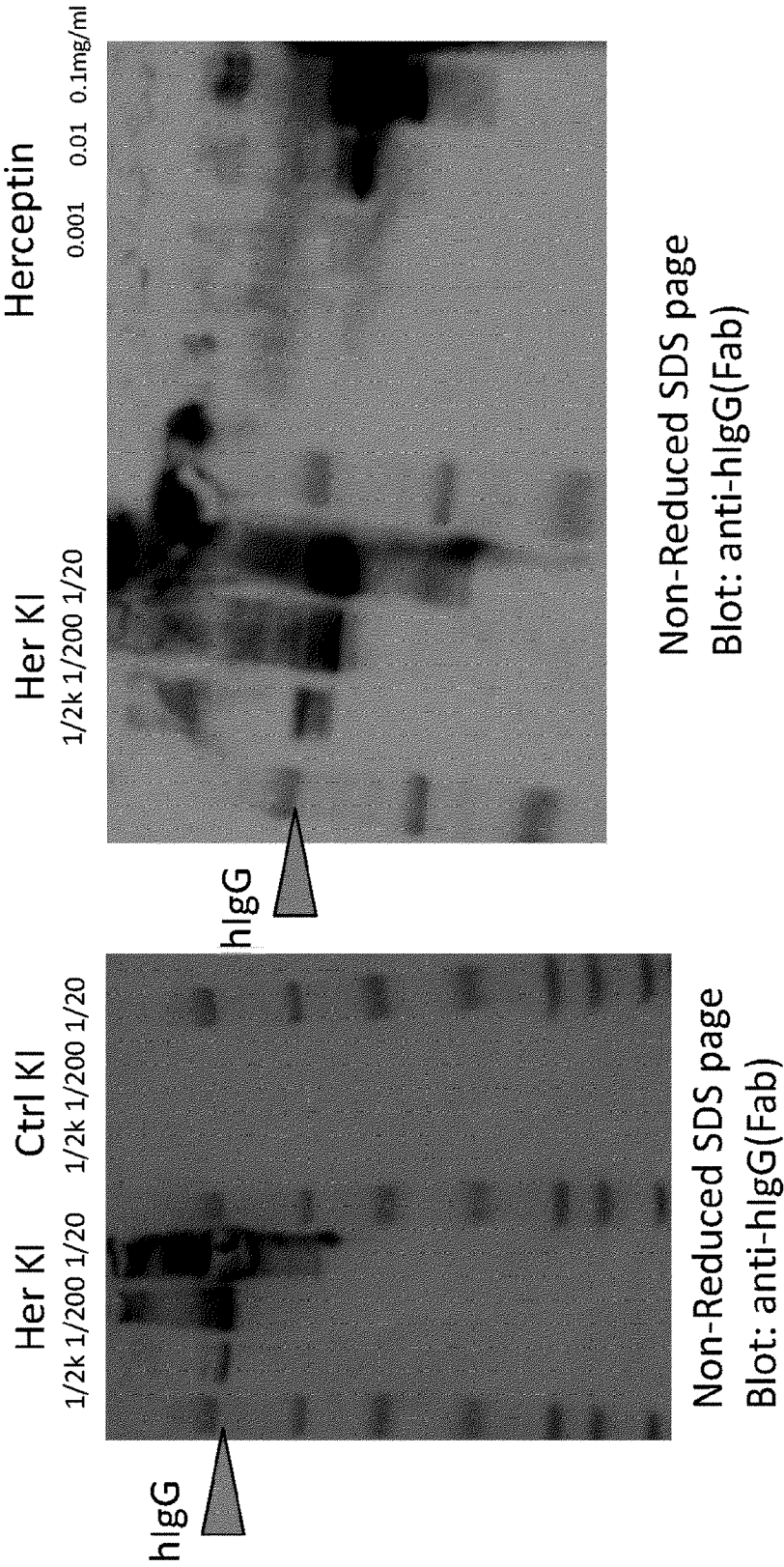
Recombinant
hIFN β 0.01ug/ul

Thick
Albumen

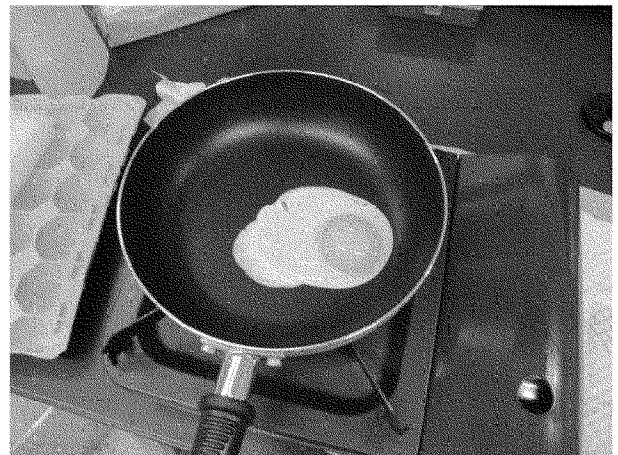
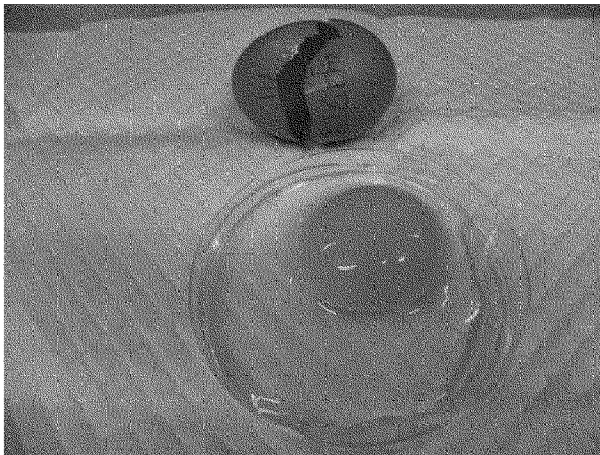
[図19]



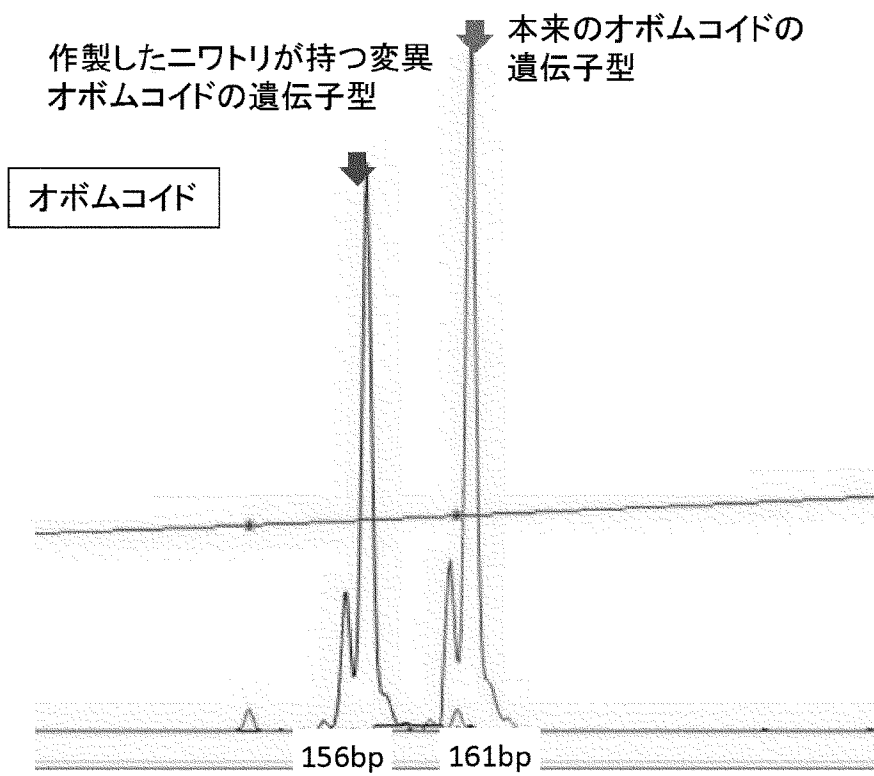
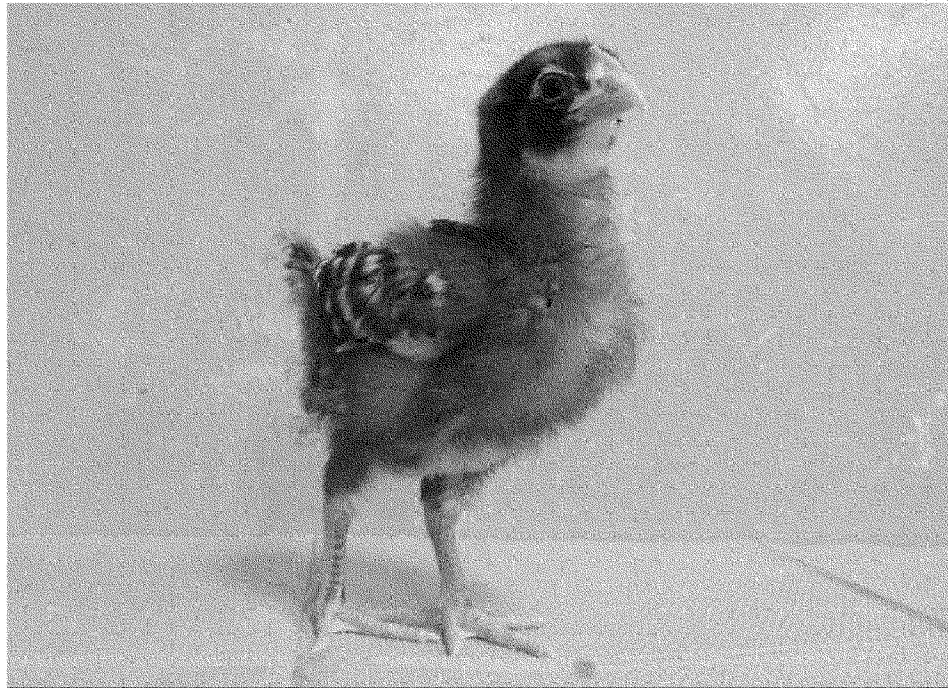
[図20]



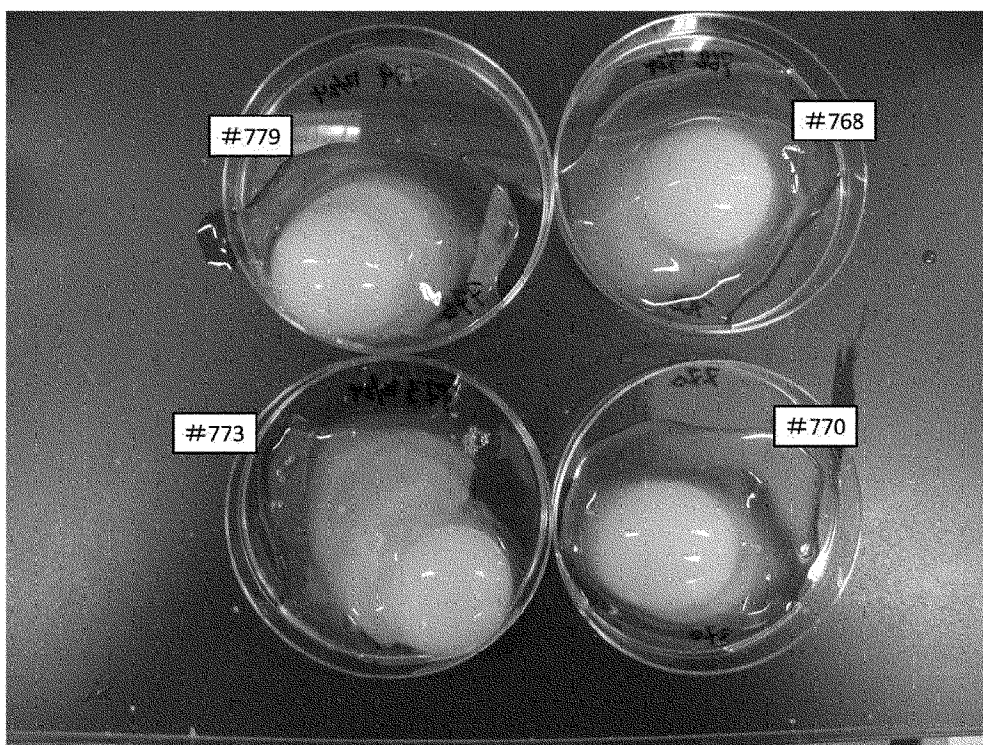
[図21]



[図22]



[図23]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/088590

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K67/027(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i

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, C12N15/00, C12N15/09, C12P21/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	PARK, T. S. et al., Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs, PNAS, 2014, 111(35):12716-12721, Fig. 1, 2, p.12718-12720	1-9 11-16, 21, 22
X Y	FAN, B. et al., Assembly and in vitro functional analysis of zinc finger nuclease specific to the 3' untranslated region of chicken ovalbumin gene, Animal Biotechnology, 2011, Vol.22, pp.211-222, Discussion	10, 13-20, 22 11-16, 21, 22
X Y A	Hiroyuki HORIUCHI, "Idenshi Kaihen-kei no Kaihatsu de Tamago Allergy Kokufuku ni Idomu Allergy Free no Tamago Kaihatsu ga Kano ka", The Niwatori-no-Kenkyu, special extra issue, 2010, no.5, pages 5 to 7, entire text	10, 13-20, 22 11-16, 21, 22 1-9

☒ 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

"I" 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
09 March 2017 (09.03.17)

Date of mailing of the international search report
21 March 2017 (21.03.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/088590

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-514404 A (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), 21 May 2015 (21.05.2015), paragraphs [0049], [0087] & US 2015/0072064 A1 paragraphs [0063], [0127] & WO 2013/155572 A1 & EP 2839016 A1	11-16, 21, 22
A	Takashi YAMAMOTO et al., "Genome Henshu o Riyo shita Baiyo Saibo ya Dobutsu ni Okeru Hyoteki Idenshi no Kaihen", Japanese Journal of Circulation Research, 2013, 36(4), 123 to 128	1-22
A	Isao OISHI et al., "Gairai Idenshi o Antei Hatsugen suru Kumikae Niwatori Juritsu no Kokoromi", Japanese Journal of Poultry Science, 2015 Nen 3 Gatsu, vol.52, the Spring Meeting issue, page 7	10-22
A	PARK, T. S. et al., Germ Cell, Stem Cell, and Genomic Modification in Birds, J. Stem Cell Res. Ther., 2014, 4(5), 1000201	1-9
A	JP 2011-010598 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 20 January 2011 (20.01.2011), (Family: none)	10-22
A	Reiko TEJIMA, Genome Henshu Dobutsu Yurai Shokuhin no Anzensei Hyoka ni Kansuru Kenkyu, Kosei Rodosho Kagaku Kenkyuhi Hojokin (Shokuhin no Anzen Kakuho Suishin Kenkyu Jigyo) 'Shin Kaihatsu Biotechnology Oyo Shokuhin no Anzensei Kakuho Narabini Kokumin Juyo ni Kansuru Kenkyu' Kyoryoku Kenkyu Hokokusho (Heisei 26 Nendo), 2015 Nen 3 Gatsu, pages 29 to 34	1-9
P, X	KR 10-2016-0073469 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION), 27 June 2016 (27.06.2016), claims; examples (Family: none)	1-9
P, X	WO 2015/199225 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 30 December 2015 (30.12.2015), claims; examples (Family: none)	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/088590

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

(Invention 1) claims 1-9

The inventions in claims 1-9, which have a special technical feature of "A knockout poultry egg in which at least one kind of oviduct-specific gene selected from the group consisting of ovalbumin, ovomucoid, ovomucin, ovotransferrin, ovoinhibitor and lysozyme is knockout and at least one kind of ovum allergen protein selected from the group consisting of ovalbumin, ovomucoid, ovomucin, ovotransferrin, ovoinhibitor and lysozyme is reduced or eliminated.", are identified as Invention 1.

(Invention 2) claims 10-22

The inventions in claims 10-22 have a common technical feature of an genome-edited poultry egg. However, this common technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the disclosure in the document 4 and, therefore, cannot be considered as a special technical feature.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Further, the above-said claims are not dependent on claim 1.

In addition, the above-said claims have no relationship such that said claims are substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, the inventions of claims 10-22 cannot be classified into Invention 1.

The inventions in claims 10-22, which have a special technical feature of "A knockin poultry egg in which an exogenous gene is homo or hetero knock-in under the control of an oviduct-specific gene promoter and an expression product of the exogenous gene is stably and highly expressed in the egg, wherein the oviduct-specific gene promoter is a promoter of at least one kind of oviduct-specific gene selected from the group consisting of ovalbumin, ovomucoid, ovomucin, ovotransferrin, ovoinhibitor and lysozyme.", are identified as Invention 2.

Document 4: JP 2015-514404 A (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), 21 May 2015 (21.05.2015)

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, C12N15/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i

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, C12N15/00, C12N15/09, C12P21/00

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 年

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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
X Y	PARK, T. S. et al., Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs, PNAS, 2014, 111(35):12716-12721, Fig.1, 2, p.12718-12720	1-9 11-16, 21, 22
X Y	FAN, B. et al., Assembly and in vitro functional analysis of zinc finger nuclease specific to the 3' untranslated region of chicken ovalbumin gene, Animal Biotechnology, 2011, Vol.22, pp.211-222, Discussion	10, 13-20, 22 11-16, 21, 22

☑ 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 9 . 0 3 . 2 0 1 7

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 3 . 2 0 1 7

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)

平林 由利子

4 B

3 6 3 4

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
X Y A	堀内浩幸, 遺伝子改変鶏の開発で卵アレルギー克服に挑む アレルギーフリーのたまご開発が可能か, 鶏の研究, 臨時増刊, 2010, No. 5, pp. 5-7, 全文	10, 13-20, 22 11-16, 21, 22 1-9
Y	JP 2015-514404 A (コモンウェルス サイエントیفフィック アンド インダストリアル リサーチ オーガナイゼーション) 2015.05.21, [0049], [0087] & US 2015/0072064 A1, [0063], [0127] & WO 2013/155572 A1 & EP 2839016 A1	11-16, 21, 22
A	山本卓他, ゲノム編集を利用した培養細胞や動物における標的遺伝子の改変, 血管, 2013, 36(4):123-128	1-22
A	大石勲他, 外来遺伝子を安定発現する組換えニワトリ樹立の試み, 日本家禽学会誌, 2015年3月, Vol. 52, 春期大会号, p. 7	10-22
A	PARK, T. S. et al., Germ Cell, Stem Cell, and Genomic Modification in Birds, J. Stem Cell Res. Ther., 2014, 4(5), 1000201	1-9
A	JP 2011-010598 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2011.01.20, (ファミリーなし)	10-22
A	手島玲子, ゲノム編集動物由来食品の安全性評価に関する研究, 厚生労働省科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業) 「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民需要に関する研究」協力研究報告書 (平成26年度), 2015年3月, pp. 29-34	1-9
P, X	KR 10-2016-0073469 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 2016.06.27, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-9
P, X	WO 2015/199225 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 2015.12.30, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-22

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(発明 1) 請求項 1-9

請求項 1-9 に係る発明は、「オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の卵管特異的遺伝子がノックアウトされ、かつ、オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の卵内アレルゲンタンパク質が低減又は消失されたノックアウト家禽の卵。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 10-22

請求項 10-22 に係る発明は、ゲノム編集された家禽の卵という共通の技術的特徴を有しているが、当該技術的特徴は、下記文献 4 の開示に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、上記の請求項は、請求項 1 の従属請求項ではない。また、上記の請求項は、発明 1 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項 10-22 に係る発明は、発明 1 に区分できない。

そして、請求項 10-22 に係る発明は「卵管特異的遺伝子プロモーターの制御下に外因性遺伝子がホモ又はヘテロでノックインされ、かつ、外因性遺伝子の発現産物が卵内で安定高発現しているノックイン家禽の卵であって、前記卵管特異的遺伝子プロモーターが、オボアルブミン、オボムコイド、オボムチン、オボトランスフェリン、オボインヒビター及びリゾチームからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の卵管特異的遺伝子のプロモーターである、ノックイン家禽の卵。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 2 に区分する。

文献 4 : JP 2015-514404 A (コモンウェルス サイエンティフィック アンド インダストリアル リサーチ オーガナイゼーション) 2015.05.21