

2015年度 生物工学賞 受賞



## 動物における遺伝子の発現制御および有用タンパク質生産技術の開発

飯島 信司



### Analyses of gene expression in animals and its application for the production of useful proteins

Shinji Iijima (Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603) *Seibutsu-kogaku* **94**: 2-13, 2016.

#### はじめに

日本において動物細胞による有用物質生産は、1980年代に盛んになった。これは、ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の生産を工業レベルで行うという時代の要請を受けたもので、ナショナルプロジェクトとしても取り上げられ多くの研究が行われた。日本生物工学会においても、酵素供給、増殖抑制物質の蓄積、培地組成の影響をはじめとして、これらを理想的状態に維持することを目的に、生育環境のオンライン測定とオンライン制御、ろ過モジュールなどを組み入れた新しいバイオリアクターの試作などの研究が展開された。その後、大学サイドにおけるこのような培養工学的研究は下火になったものの、企業を中心に研究が続けられ、今では10 g/Lという高濃度でのモノクローナル抗体の生産や、超高濃度にタンパク性生産物を含む培養液からの目的タンパク質の精製など要素技術の開発が進んでいる。一方、これらの動きとは別に、生物個体そのものを生産手段として用いる方法論についても研究されている。生物個体としては、カイコなどの昆虫、植物、そして動物個体がターゲットとして想定されている。たとえば牛や羊のミルクの中への有用タンパク質生産が有名である<sup>1)</sup>。我々は、バイオリアクターによる動物培養細胞の高濃度培養と効率的物質生産を達成すべく、培養環境のオンライン測定と制御について研究していたが<sup>2)</sup>、さらに高い生産性を目指し、ニワトリの遺伝子組換えにより卵中に有用タン

パク質を生産することを試みている。ニワトリは食用のみならず卵はワクチンの生産に大量に用いられており、さらにインフルエンザウイルスの宿主であるなど、いろいろな局面で人類と深くかかわっており研究対象としても好都合と考えられる。

#### 宿主としてのニワトリ

ニワトリ受精卵は21日で孵化する。ニワトリ卵巣で卵子は卵黄上に存在し、この状態で輸卵管を下降する。途中、精子だまりで受精し、さらに下降を続け膨大部においてtubular gland cellより分泌されたオボアルブミンなど卵白タンパク質が付加される。さらに下降した卵は総排出口近傍で殻に覆われた後放卵される。この間約24時間かかるが、受精卵では卵割が進み、放卵時には細胞数約60,000の胚盤葉を形成する。孵化した胚は約5か月で成鳥となり2年半にわたり卵を産む。このような受精、放卵過程を考慮し、どの段階で胚の遺伝子を操作するかが決まってくる。

一方、遺伝子導入(トランスジェニック)動物を作製する際には、最終的に生殖細胞の遺伝子が人工的に変換され子孫に伝えられなければならない。卵子や精子の前駆細胞である始原生殖細胞は放卵時にすでに分化をはじめており、孵卵2日目ころ形成された血管中を循環し70時間程度で生殖巣への定着が始まり生殖細胞へと分化する。マウスに比べ、始原生殖細胞への分化が比較的早い時期から起きるのもニワトリの特徴である。

## トランスジェニックニワトリ作製のストラテジー

トランスジェニックニワトリを作製する方法として何らかの形で精子や卵子など生殖細胞に遺伝子を導入し、かけあわせにより生まれた子孫を取得することが考えられる。このためには、精子や卵子を分離して遺伝子操作を行い胚に移植するか、卵割のなるべく初期の胚に遺伝子導入し、一定頻度で目的遺伝子が生殖細胞に導入されるのを期待することになる。前者の場合、受精した卵子の分離はたいへん難しく、輸卵管中に1個だけ存在する受精卵を手術などで分離するのは非現実的である。精子については、分離は容易であるが効率的に遺伝子を導入する方法が見いだされておらず成功例はない。このような状況で、実質的にターゲットとして用いられるのは始原生殖細胞である。始原生殖細胞は45～60時間胚の血中から血中循環始原生殖細胞として、また100～140時間孵卵胚の生殖巣から分離できる。始原生殖細胞の精製は、細胞表面の未分化細胞特異的糖鎖マーカであるSSEA1抗体を用い、セルソーターあるいは磁気分離により可能である。一方、後者の胚への直接遺伝子導入法の場合もやはり始原生殖細胞がターゲットとされ、卵割中の胚に直接遺伝子導入操作を行い一定頻度で始原生殖細胞へ遺伝子導入されることを期待する。いずれの場合も、遺伝子導入操作がほどこされたキメラ胚、あるいは遺伝子操作が行われた始原生殖細胞を移植したニワトリ胚を、孵化・性成熟させた後かけあわせてトランスジェニック子孫を得る。したがって、遺伝子導入効率があまりよくない場合、膨大な数の子孫をスクリーニングする必要があり、実行が不可能となる。このような観点から、プロセス全体のキーを握る要素技術は遺伝子導入であるといえる。図1にはトランスジェニックニワトリ作製の二つの方法の概略を示す。

遺伝子導入法としてはリポフェクション法など化学的方法とレトロウイルスベクターなどを用いるウイルス法があるが、前者の場合、始原生殖細胞への遺伝子導入効率がさほど高くないため実施例を見ても千個を超える胚のスクリーニングが必要となる。この点すぐれているのはレトロウイルス法である。レトロウイルスは1本鎖RNAをゲノムとして持ち、両端にLTRと呼ばれるプロモーター、エンハンサーなどを含む繰り返し配列、ウイルス粒子へのパッケージングのシグナルと *gag*, *pol*, *env* の最低3種のウイルスタンパク遺伝子を含む(図2)。このうち *pol* 遺伝子は、RNAゲノムからウイルスcDNAを生成する逆転写酵素、ウイルスcDNAを染色体に挿入するインテグラーゼおよびプロテアーゼよりなる。インテグラーゼによりきわめて効率的に遺伝子がゲノムに

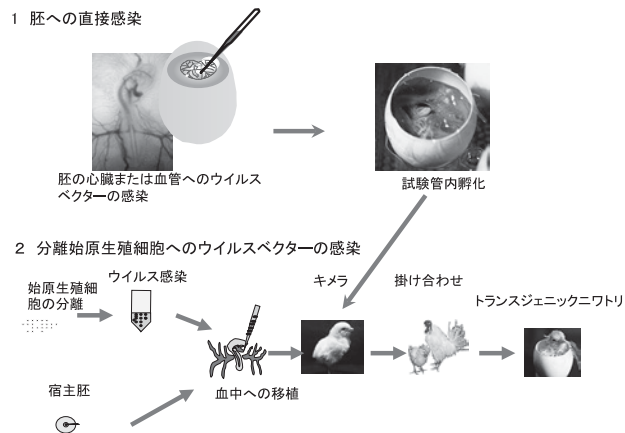


図1. トランスジェニックニワトリ作製法

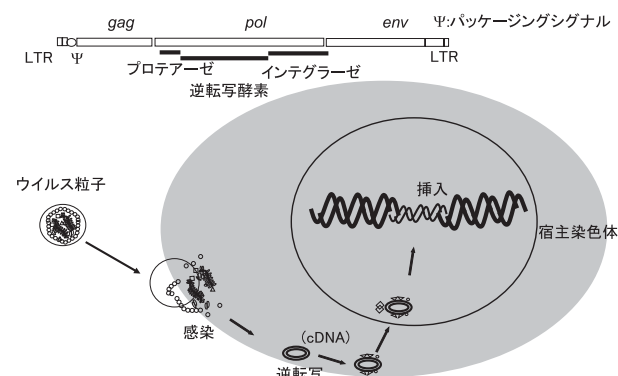


図2. レトロウイルスゲノムとウイルスの感染

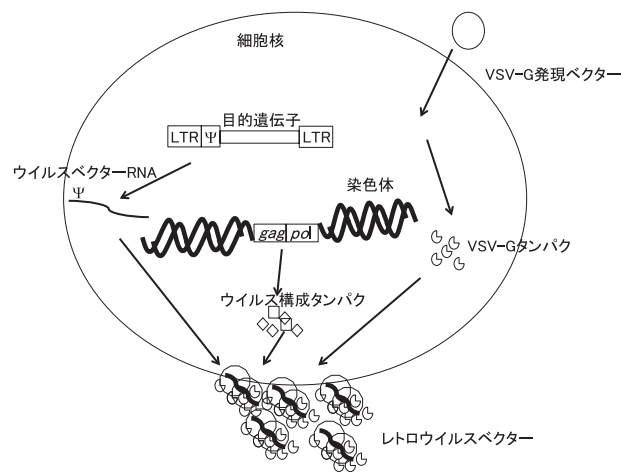


図3. 複製能欠損ウイルスベクターの作製

挿入されるのがこの方法の特徴である(図2)。また安全性の確保のために、ウイルスの増殖に必要な遺伝子(*gag*, *pol*, *env*)をウイルスベクターから除き、代わりにこれらを染色体へ組込んだ細胞を宿主として、複製能が欠損したウイルス粒子を作製する事が行われている(図3)。これによりトランスジーンの両端にLTRを配置し、パッケージングシグナルのみ残し他は目的遺伝子に

置換する事ができる。ウイルス粒子に遺伝子がパッケージングされるため、導入できる異種遺伝子の長さには制限がある。高い力価のウイルスベクターを得るには、マーカー遺伝子を含め4-5 kb程度の遺伝子の導入が一つの目安となる。また、ウイルス外皮タンパク質Envを牛口内炎ウイルス (VSV) の外皮タンパク質であるGタンパク質に置き換えることが多い。VSV-Gの受容体はリン脂質であるので、これを用いたウイルスベクターの宿主域は大幅に広がり、ほとんどすべての細胞に感染可能となる。ただし、VSV-Gタンパク質は毒性が高いため、ウイルス粒子作製時に別途その遺伝子を導入する。

ウイルスベクター感染後は操作した胚を孵化させなければならないが、卵殻を破壊し操作を行うため人工環境下における孵化技術が必要であり、これについてはいくつかの方法が報告されている<sup>3,4)</sup>。現在では人工卵殻やホスト卵殻を用いる方法にかわり、卵殻に窓をあけ操作をした後、再び窓をふさぎ孵卵させる方法が確立され多用されている。

#### トランスジェニック鳥類作製の実際と問題点、 できればいいという科学と応用技術の違い

トランスジェニックニワトリ作製については我々を含めいくつかの研究があり、我々の結果がすべてでない。我々の研究もこれら先行研究に学び、また、相互作用しながら進展してきたのも事実である。しかしながら、これらの研究においては、何千羽という子孫を解析するという力任せの研究が多いことが気になった。そこで、限られた予算と日程でトランスジェニックニワトリを得るにはどうしたらよいか、また、物質生産という観点から他のシステムをしのぐ生産性を得るにはどうしたらよいかという観点から技術の開発を行った。

トランスジェニックニワトリ作製の条件を検討するため、まず小型で扱いやすいウズラを用いて直接ウイルスベクターを胚に感染する方法の条件を検討した<sup>5)</sup>。トランスジェニックニワトリを作製するためには、理想的には受精卵、もしくは卵割のごく初期の胚を使うのが望ましい。しかしながら、これらに対応する細胞は輸卵管中にあり分離するのは困難である<sup>6)</sup>。実質的に得ることができる初期胚は放卵直後の胚であるが、このステージでは卵割が進み細胞数は約60,000に達する胚盤葉が形成されている。一方、始原生殖細胞の分化は始まっている。したがって、超高濃度のウイルスベクター溶液を用い、たとえばmultiplicity of infection (MOI) が10程度あれば、将来始原生殖細胞に分化する前駆細胞を含めてすべての細胞に遺伝子導入が可能と考えた。10<sup>9</sup>/mL前後の力価のウイルスベクター溶液2-5 μLを始原生殖細胞に分化

する領域である胚盤葉の明帯にマイクロインジェクションした。このとき、ウズラの卵は上部を切断し胚を露出させて操作した。プラスチックフィルムで封をして2日培養した後、ニワトリの卵殻に移し培養を続けた。合計134胚にウイルスを感染させたが、そのうち37胚が孵化した。これらのウズラの一部を解剖し選択マーカーとして用いた*neo<sup>r</sup>* 遺伝子の有無を検出したところ、心臓、脳、肝臓、筋肉、腎臓、脾臓、生殖巣など調べた臓器すべてで検出された。そこで、これらキメラウズラから6羽をランダムに選択し野生型ウズラと交配したところ、得られたG1子孫の80%以上からPCRによりトランスジェンが検出された。もし、G0キメラウズラの始原生殖細胞に平均1コピーのトランスジェンが存在すれば、G1トランスジェニックウズラの出現頻度は50%と想定される。したがって、この場合始原生殖細胞が複数のトランスジェンを有していたと考えられる。G1トランスジェニック子孫でのトランスジェンの存在を示すため、各臓器よりDNAを抽出しPCRにて解析したところ調べたすべての臓器でウイルスベクターに組み込んであったGFPおよび*neo<sup>r</sup>* 遺伝子が検出された。次にトランスジェンのコピー数を測定するためにDNAを制限酵素で消化後、GFP配列をプローブとしてサザンブロットにより解析したところ複数のバンドが検出され、トランスジェニックウズラが一つ以上のトランスジェンを有する事がわかった。さらにG1トランスジェニックウズラをかけ合わせG2子孫を得る事を試みた。3コピーのトランスジェンをもつG1からは86%、2コピーの遺伝子をもつ3羽のG1からは59、76、76%の頻度で、また、1コピーのトランスジェンをもつ2羽のG1からは45および35%の頻度でG2トランスジェニック子孫を取得する事ができた。G1トランスジェニック子孫のコピー数が1、2、3コピーの時のトランスジェニック子孫出現頻度は、メンデルの法則に従うと仮定するとそれぞれ50、75、87.5%であり理論値とだいたい一致した(表1)。このように、放卵直後のウズラ胚にレトロウイルスベクターで遺伝子導入すると効率的にトランスジェニック鳥類が取得可能であることが示された。

次にトランスジェンが発現しているかどうかを、G1およびG2トランスジェニックウズラで調べた。種々の臓器を分離し抽出したRNAからRT-PCRにより*neo<sup>r</sup>* のmRNAレベルを調べたところ、弱いながらもすべての臓器で発現が見られた。特に、心臓と筋肉における発現は相対的に高かった。これは*neo<sup>r</sup>* を駆動するラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーターが主にニワトリ胚の心臓と筋肉で機能するという報告と一致する。しかし発現レベルは、培養ニワトリ繊維芽細胞へMOIが0.01でウ

表1. G1トランスジェニックウズラからG2トランスジェニック子孫の誘導

G1#	性	遺伝子コピー数	解析子孫数	G2トランスジェニック子孫数 (%)
1	F	1	22	10 (45%)
2	F	2	22	13 (59%)
3	F	2	17	13 (76%)
4	M	1	20	7 (35%)
5	M	2	21	16 (76%)
6	M	3	21	18 (86%)

イルスベクターを感染させた時と同等であり、高発現と言える状況ではなかった。一方、ベクター由来の Maus モロニー白血病ウイルスLTRプロモーターで駆動される GFP の発現はまったく検出されず、レトロウイルスが胚において発現抑制を受けるという既存の結果と一致した。次にこの発現抑制の原因を探るため、トランスジーンのメチル化を調べた。このため、CpGのメチル化に感受性の制限酵素 *Bss*HI および *Hpa*II による G1 トランスジェニックウズラの染色体に挿入されたトランスジーンの切断を調べたところ、ウイルスベクター中に存在するこれら制限酵素サイト4か所いずれでも切断が確認され、DNAメチル化が発現抑制の原因ではないと考えられた。

ウズラを用いた条件検討により、放卵直後の受精卵にウイルスベクターを感染させる事によりトランスジェニックウズラを取得する事は可能であるが、トランスジーンが発現が弱く物質生産の手段として利用するのが難しい事が判明した。そこで目的タンパク質の高生産を目指し、ニワトリを用いてウイルスベクター感染時期などの条件を検討した<sup>7)</sup>。トランスジーンとしては、アクチンプロモーターにより駆動するβ-ガラクトシダーゼを有するレトロウイルスベクター (MSCV/NΔAb および LNRβ) を用いた。孵卵0から60時間の受精卵に、 $10^8$ /mL の高力価ウイルスベクターを感染させ、5.5日胚まで孵卵後胚から調製した細胞抽出液の酵素活性を調べたところ、発達が進むと活性が発現すること、孵卵55時間前後で発現が最大になる事、またウズラの実験で用いた孵卵ゼロ (胚盤葉) ではβ-ガラクトシダーゼの発現がまったくみられない事が判明した。また、孵卵60時間を超えるとβ-ガラクトシダーゼ活性が減少した (図4)。これらから、孵卵50から60時間でウイルスベクターを感染させるとトランスジーンの高レベルな発現が可能である事が示唆された。またこの実験において、孵卵0時間では明帯近傍に、発達が進んだ孵卵50時間前後で

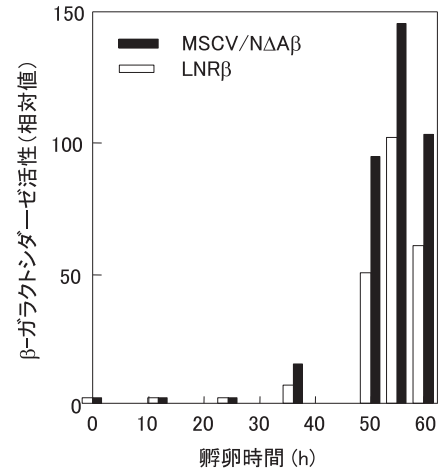


図4. レトロウイルスベクター感染時期による遺伝子発現の違い

は形成された心臓より血管にウイルスベクターを注入した。PCRの結果、55時間胚では48%の細胞にウイルスが感染している事がわかった。一方、孵卵0時間の胚盤葉では1%の細胞にしか感染がみられなかった。これは心臓が形成された後は、発達した血管システムにウイルスベクターを注入する事でウイルスベクターが効率的に全身の細胞に送達される事を示唆している。したがって、孵卵55時間胚におけるβ-ガラクトシダーゼの高発現の原因は必ずしも遺伝子発現の抑制解除だけではなく、ウイルスベクターの送達も重要な因子になっていると考えられる。同様の実験をウズラで行った結果を図5 (p. 8 掲載) に示す<sup>8)</sup>。この例ではX-galによる染色によりβ-ガラクトシダーゼの発現を観察したが、ニワトリと同様に孵卵48時間で最大となった。

次に抗体など有用タンパク質の生産を目指し、β-ガラクトシダーゼ遺伝子の代わりにβ-アクチンプロモーターで駆動する抗プリオン一本鎖抗体の遺伝子を導入したウイルスベクター (MSCV/GΔAscFv-Fc) を作製し、 $0.6-1.8 \times 10^9$ /mL 程度のウイルス溶液を孵卵55時間胚の心臓に注入した<sup>7)</sup>。総計51個の卵にウイルスを感染したところ、32個が *in vitro* で孵化した。孵化したニワトリの一部を解剖し各臓器よりDNAを抽出しPCRで解析したところ、すべての臓器よりトランスジーンが検出され感染がうまくいっている事が示唆された。また、一本鎖抗体の前にニワトリリゾチームの分泌シグナルを連結したため、卵中にも効率的に抗体が分泌されていた (表2)。分泌された抗体の量は卵白で最大5.6 mg/mL、卵1個あたりに換算すると0.1 gに達した。また、卵黄への分泌量は卵白の数分の一であった。生産は長期にわたり安定しており、1年近くたっても変化はなかった。しかし、これらのニワトリから掛け合わせによりG1トラン

表2. 一本鎖抗体を生産するG0トランスジェニックニワトリ(キメラ)の取得

No	ウイルス力価	性	一本鎖抗体濃度 (mg/mL)		
			血清	卵白	卵黄
102	$6 \times 10^8$	F	0.24	0.06	0.04
105		M	0.29		
108		F	0.40	0.59	0.10
110		F	1.72	3.88	0.85
111		M	1.74		
116		M	0.82		
305	$1.2 \times 10^9$	F	2.08	4.85	1.18
308		M	1.73		
402	$1.8 \times 10^9$	M	1.60		
405		M	3.50		
407		F	1.97	4.00	0.81
410		F	3.56	5.57	1.77

スジェニック子孫を得たところ生産性は低下した。トランスジェニック子孫では一本鎖抗体遺伝子がミクロ染色体に1コピーおよび2コピー挿入されたもの、3番染色体へ挿入されたものが得られた(表3)。またサザンハイブリダイゼーションにより、挿入配列にリコンビネーションなどが起きていない事を確認した。トランスジーンが安定に保持される事を確認するため、さらに後代のトランスジェニックニワトリが取得可能であるかを調べた。G1トランスジェニックニワトリのうちミクロ染色体に2コピーのトランスジーンをもつ個体と3番染色体に1コピーをもつ個体をそれぞれ野生型ニワトリとかけ合わせたところ、78%および51%の確率でトランスジェニック子孫を得る事ができた。これは、メンデルの法則

から予想される理論値と一致した。

次に、生産された抗体について調べた。血清、卵黄、卵白サンプルをSDSゲル電気泳動で分離後、抗Fc抗体で検出した。血清および卵白サンプルからは66 kDaの単一バンドが検出された。卵黄サンプルからはこれ以外に低分子のバンドが検出されたが、このバンドは分子量がFcと一致しており、分解産物とも考えられる。また、一本鎖抗体の推定分子量は約52,000である事から、糖鎖などの修飾が起きている事が示唆された。さらにSH試薬非存在下での電気泳動で、G0キメラの卵白に蓄積した抗体について解析したところ二量体に相当するバンドが検出された。

次にこの方法を用いて実用的に価値のあるヒトエリスロポイエチンの生産を試みた<sup>9)</sup>。このため一本鎖抗体生産用ウイルスベクターの一本鎖抗体部分をヒトエリスロポイエチンcDNAで置き換えたウイルスベクターpMSCV/GΔAhEpo(c)を作製し、 $3 \times 10^8$ /mLから $5 \times 10^{10}$ /mLの高タイターウイルスを孵卵55時間の胚90個に感染した。このうち24胚が孵化した。形成期の心臓より血流中にウイルスベクターを導入したため、赤血球や心臓では細胞あたり2.5から4.5という高いコピー数を示した。また、精子におけるコピー数は0.04であったためトランスジェニック子孫を得る事を試みたが、300羽近い子孫を解析したにもかかわらずうまくいかなかった。キメラニワトリ(G0)におけるエリスロポイエチンの生産は個体により異なっていたが、卵白中に最高で5000から6000 IUの生産量を2年間にわたり維持できた。また、*in vitro*の造血活性もCHOで生産したエリスロポイエチンと同レベルであった。

#### 始原生殖細胞を用いたトランスジェニックニワトリの作製<sup>10)</sup>

現在までにいくつかの研究室でトランスジェニックニワトリ作製について報告があるが、その大部分は分離始

表3. 一本鎖抗体を発現するG1トランスジェニック子孫の取得

No	性	一本鎖抗体濃度 (mg/mL)			コピー数	染色体挿入位置	伝播効率
		血清	卵白	卵黄			
1	M	$< 10^{-6}$	—	—	1	Micro	ND
2	F	1.1	0.22	0.48	2	Micro × 2	21/27 (78%)
3	M	0.51	—	—	1	3q2.6-2.8	22/43 (51%)
4	F	0.50	0.41	0.22	1	3q2.6-2.8	ND
5	F	1.9	1.5	0.76	1	Micro	ND
6	F	0.47	0.43	0.17	1	3q2.6-2.8	ND

ND: 測定せず

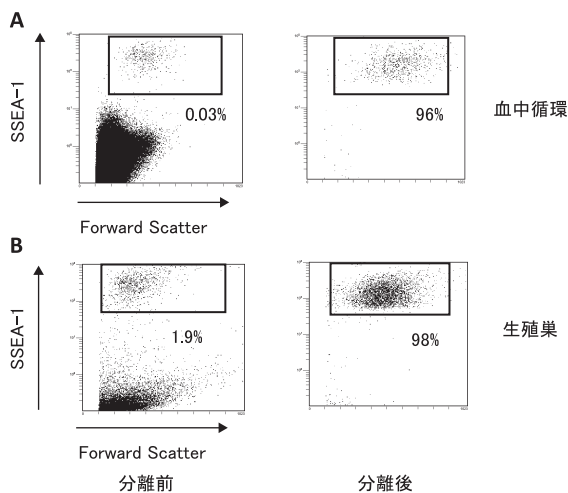


図6. 血中循環および生殖巣始原生殖細胞のセルソーターによる分離

原生殖細胞を用いたものである。また、始原生殖細胞の培養についての報告も多いが、この細胞を安定して培養し、トランスジェニックニワトリを確実に得るのはいままもって難しい。しかしながら、分離直後の始原生殖細胞に遺伝子を導入して胚に移植しトランスジェニックニワトリを取得する事は可能である。始原生殖細胞は、血中循環しているもの(孵卵45から60時間程度)、生殖巣に定着したもの(孵卵120時間程度)を採取し、超遠心、あるいはSSEA1抗体を用いてセルソーターや磁気ビーズにより精製可能である。セルソーターでの分離結果より血中細胞の0.03%、生殖巣細胞の1.9%が始原生殖細胞と推定された。また、始原生殖細胞はセルソーターにより純度95%以上に精製可能である(図6)。

最近では精製した始原生殖細胞への遺伝子導入に、レンチウイルスベクターを用いる事が多い。これはリポフェクション法では遺伝子導入の効率が悪すぎる事、また、レトロウイルスベクターでは増殖していない細胞に遺伝子を導入する事が難しいためである。これに対し、HIV1由来のレンチウイルスベクターは非増殖細胞でも感染すると考えられている。我々の実験でも、増殖細胞に比べ感染効率は落ちるものの遺伝子導入は可能であった。図7には、血中循環ならびに生殖巣始原生殖細胞に、eGFPを発現するレンチウイルスベクターをMOI73で感染させ2日間培養した後FACSで解析した結果を示す。25から30%の血中循環ならびに生殖巣始原生殖細胞でeGFPの発現が確認された。この実験ではきわめて高いMOIでウイルスベクターを感染させたが、現在までこの方法でトランスジェニックニワトリを作製したという報告ではいずれもこのように高いMOIで感染させている。これは始原生殖細胞への遺伝子導入が難しく、逆に

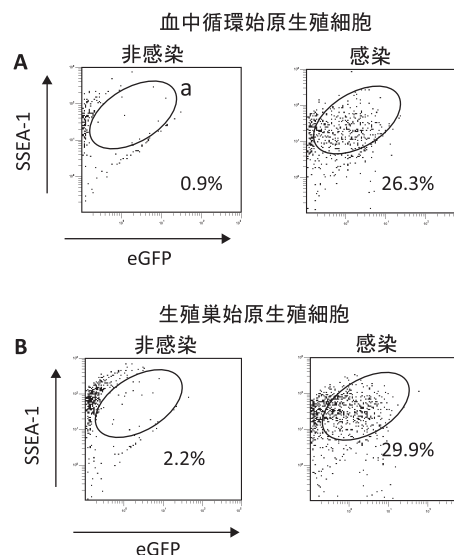


図7. 血中循環および生殖巣始原生殖細胞へのレンチウイルスベクターによるeGFP遺伝子の導入

言うといかに効率的に遺伝子導入できるかがトランスジェニックニワトリ作製のキーとなっていることを示している。

さて、次に問題になるのがどの時期の胚から分離した始原生殖細胞がトランスジェニックニワトリ作製に適しているかである。55時間孵卵胚から分離できる血中循環始原生殖細胞の数は100程度と考えられるが、120時間孵卵胚では1000個程度である。したがって、始原生殖細胞の分離という観点からは生殖巣に定着した始原生殖細胞を使うのが有利である。しかし、遺伝子操作した始原生殖細胞を胚に戻す方法として現在確立されているのは、孵卵50から60時間程度の胚で始原生殖細胞が血中を循環している事を利用して、血中に移植し内在性の始原生殖細胞とともに生殖巣に定着するのを期待するというものである。遺伝子操作に血中循環始原生殖細胞を用いれば、発達の時期がちょうど合うため問題が少ないが、生殖巣に定着した始原生殖細胞を用いる場合は、移植時に発達が進み過ぎ定着がうまくいかない恐れもある。事実、多くの生殖細胞特異的遺伝子の発現はこの二つの始原生殖細胞で差はないものの<sup>11)</sup>、PRDM14などいくつかの遺伝子では発現に明らかな差がある(奥寄未発表)。そこで、一本鎖抗体とeGFPを発現するトランスジェニックニワトリからこの二種類の始原生殖細胞を分離し、胚に移植し生殖巣への定着効率を調べた。個体による差がきわめて大きいため定量的な解析は難しいが、移植始原生殖細胞数が100個程度の場合には明らかに血中始原生殖細胞の方が定着効率が良い事、移植細胞数を300程度確保できれば両者であり差がなく、定着効率が10%程度である事がわかった。そこで、充分量

の始原生殖細胞を移植する前提で、生殖巣始原生殖細胞に高いMOIでレンチウイルスベクターを感染させた後胚に移植した。用いたレンチウイルスベクターは、アクチンプロモーターでeGFPが発現するカセットが組み込まれている。表4に結果を示すが、移植個体のうちNo205と225からは高頻度でトランスジェニック子孫G1を取得する事ができた。また、蛍光顕微鏡観察からトランスジェニック子孫の白血球ではeGFPの発現が見られるものの、赤血球では発現しない事が判明した。eGFPの発現にはアクチンプロモーターが用いられているが、このプロモーターが赤血球ではほとんど機能しない事が原因と考えられる。一方、トランスジェニックニワトリの体表（くちばし、目）でもeGFPの蛍光が見られた（図8）。

このように、始原生殖細胞を用いてもトランスジェニックニワトリを作製することが可能である。現在のところ始原生殖細胞を用いる方法と、直接ウイルスベクターを胚に感染させる方法との優劣をつける事は難しい

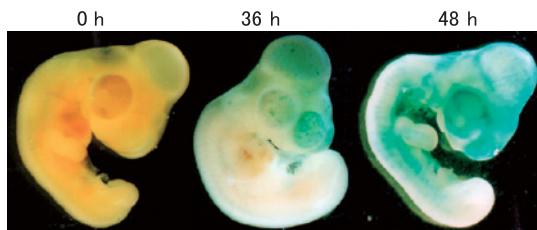
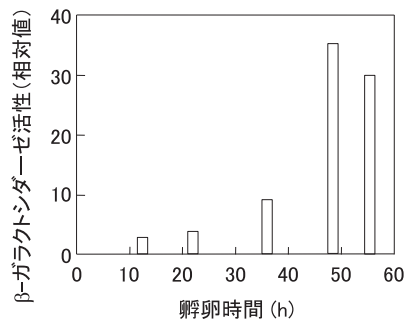


図5. レトロウイルスベクター感染時期による遺伝子発現の違い(ウズラ)

表4. レンチウイルスベクターによるトランスジェニックニワトリの作製

No.	性	使用PGC数	MOI	子孫数	G1 (%)
#128	F	1600	55	36	0
#205	F	1200	54	30	2 (6.6%)
#209	M			101	0
#225	F	850	77	30	1 (3.3%)
#226	F			33	0
#511	F	1500	24	34	0
#513	F			32	0

が、我々は多くの場合、胚に直接ウイルスベクターを感染させる方法でトランスジェニックニワトリを作製している。これは、胚への直接感染法を用いると、生まれた子孫の血中での遺伝子コピー数を測定する事により、実験後1か月程度で将来かけあわせによりトランスジェニックニワトリを取得できそうか予想できるのに対し、始原生殖細胞を用いた場合、結果のばらつきが大きいのみならず、成否がわかるのは胚が孵化しさらに性成熟して誕生した子孫を直接判定した後になるので半年以上必

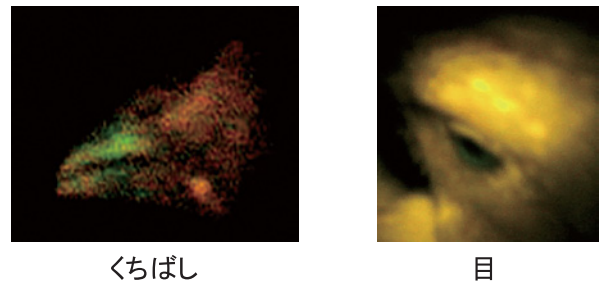
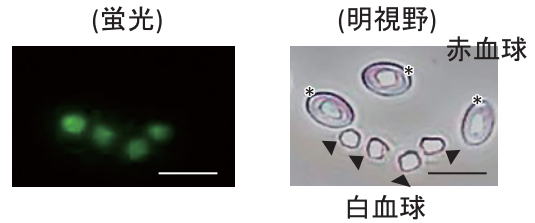


図8. トランスジェニックニワトリにおけるeGFPの発現

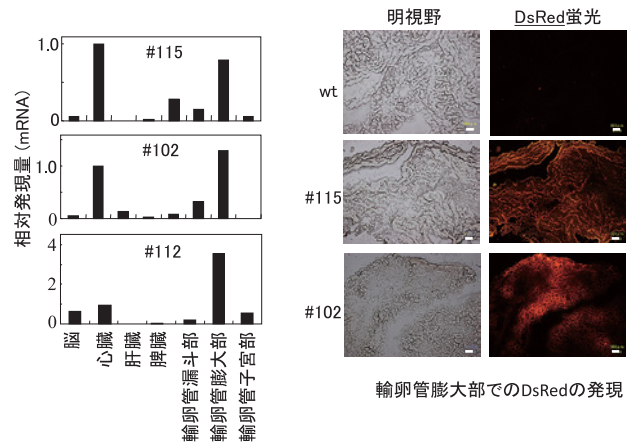


図11. DsRedの輸卵管膨大部特異的発現

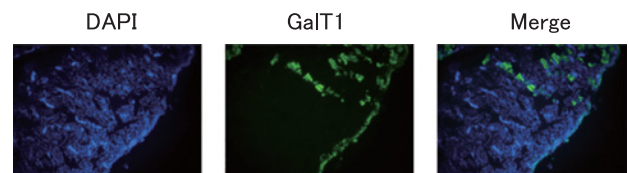


図14. 免疫染色による輸卵管膨大部におけるGalT1の発現。抗GalT1抗体で輸卵管組織切片を染色した。

要であることによる。したがって実験の効率からは胚への直接感染法が有利となる。

### 卵特異的な生産物の蓄積

タンパク性の生理活性物質の生産においては、過剰発現により全身のホメオスタシスが崩壊し宿主ニワトリの成長や生存に影響を及ぼす事が想定されるので、卵への特異的な生産が必要となる。卵への生産・蓄積を想定した場合、一般に卵白は免疫原性が高く卵黄は低いので、生産物を高度に精製しない場合は卵黄が有利である。一方、卵黄へタンパク質が移行するには輸送システムによる血中からの運搬が必要であり、この輸送システムがある抗体など特殊なタンパク質しか蓄積させることができない。卵における免疫系は、親の血中からFc受容体により卵黄に輸送されたIgYによるが、MorrissonによりヒトIgGも卵黄に蓄積する事が示された<sup>12)</sup>。我々は抗体以外にFc融合タンパク質も卵黄への蓄積が可能である事を示した<sup>13)</sup>。そこでリュウマチの治療薬でもあるTNF $\alpha$ 受容体2とヒトIgG1由来のFcの融合タンパク質(TNFR/Fc)の卵黄への蓄積を試みた<sup>14)</sup>。常法により、レトロウイルスベクターを用いてTNFR/Fcタンパク質cDNAをニワトリに導入した。G0キメラが性成熟後、精子中のTNFR/Fc cDNAのコピー数を測定したところ0.005以下ときわめて低かったため、トランスジェニック子孫の取得をあきらめG0キメラの解析を行った。血中のTNFR/Fc濃度は最高で0.2 mg/mL程度であったが、卵黄中の濃度はその1/5程度であった。したがってこのキメラタンパクは、血中から卵黄へ移行するもののその効率は低いと考えられる。また、生産は半年程度安定であった。生産されたTNFR/Fcの修飾糖鎖をN-およびO-グルカナーゼで切断したあと分子量を測定したところ、血清中に生産されたTNFR/Fcタンパク質は単一のバンドを示したが、分子的には培養細胞NSOで生産されたものより若干小さかった。一方、卵黄に蓄積したものについては、分解物とも考えられるバンドがウエスタンブロッティングにより検出された(図9)。このような結果から、現状では卵黄への生産には解決すべき多くの問題があると言える。

一方、卵白への生産は一本鎖抗体の例でも見られるように容易である。しかしながら、同時に血中や他の臓器でも生産物が蓄積されるという問題点を克服する必要がある。卵白特異的に生産物を蓄積させる技術の開発が必要となる。オボアルブミンは主要な卵白タンパク質であるが、輸卵管の膨大部領域に存在するtubular gland cellにより生産され卵白へ移行する。この他にも卵白タンパク質としてはリゾチームがあり、これらのプロモーター

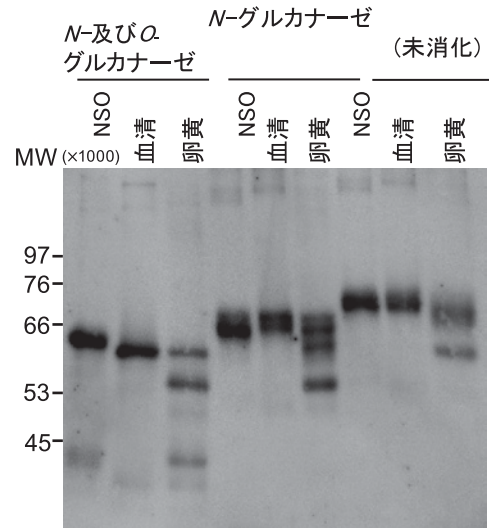


図9. キメラニワトリ卵黄でのTNFR/Fcの生産。卵黄に蓄積したTNFR/FcをプロテインAカラムで精製後、糖鎖をN-およびO-グルカナーゼで除去しウエスタンブロッティングで検出した。NSO: NSO細胞で生産されたTNFR/Fc標準品。

配列を用いれば輸卵管特異的な発現、しいては卵白への特異的な蓄積が可能と考えられる。しかし組織特異的なプロモーターは制御領域が数千ベース以上と長く、ウイルスベクターのパッケージング限界という点からそのままでは使えない。また、制御領域を切りつめれば特異性や生産性に問題をきたすことも多く、詳細な検討が必要となる。我々は、リゾチームプロモーターについて2 kb程度の制御領域を用いればトランスジェニックニワトリで輸卵管特異的な遺伝子の高発現が可能である事を見いだした(小島 未発表)。一方、オボアルブミンについては、上流7 kb以上という制御領域の大半を用いれば輸卵管特異的な発現は可能であるが、生産量はオボアルブミンと比較してきわめて低い事がわかっている。また、この領域にはエンハンサーに相当するDNase I hypersensitive site が3か所以上存在し、輸卵管特異的な遺伝子発現を保証していると考えられている<sup>15)</sup>。我々は、プロモーターの3.5 kb上流に存在するDNase I hypersensitive site IIIまでを含むオボアルブミンプロモーター領域(-3.9kbから+1.5 kb)をヒト増殖ホルモン遺伝子に連結し、レトロウイルスベクターに導入してトランスジェニックニワトリを作製した(図10)。ヒト増殖ホルモンの生産は卵白特異的であったが、生産量は1-5 ng/mL卵白と低かったのでその原因を解析したところ、ウイルスベクター作製時に想定外のスプライシングがおき、DNase I hypersensitive site IおよびIIを含む領域が欠失している事が判明した(図10)。わずかな発現はDNase I hypersensitive site IIIの中にある弱いプロモーターによると推定された。そこで、組織特異性のある程度保証



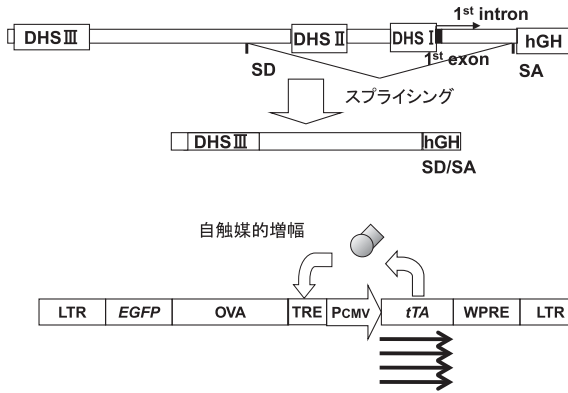


図10. オボアルブミンプロモーターの構造と自触媒的活性化ハイブリッドプロモーターの原理

するDNaseI hypersensitive site IIIの下流に、on-off制御可能なプロモーターを連結すれば組織特異的に目的タンパク質を過剰生産させるシステムが構築可能ではないかと考えた。具体的にはDNase I hypersensitive site IIIの下流にTet activator responsive element (TRE)とCMVプロモーターのコア領域 (P<sub>CMV</sub>)、さらにTet activator (tTA)を連結し、hypersensitive site IIIから輸卵管特異的に発現したtTAがTREに結合し自触媒的にtTAの転写が増強されるシステムを考案した(図10)。このウイルスベクターをもつトランスジェニックニワトリを作製すると、輸卵管特異的にtTAが生産される事がわかった。さらに、この発現系によりDsRedを発現するウイルスベクターをニワトリに感染させるとDsRedが輸卵管特異的に発現する事が示された(図11, p. 8掲載)<sup>16)</sup>。このプロモーターの強さは大まかにではあるがニワトリβ-アクチンプロモーターの半分程度と考えられる。

### 卵中に蓄積したタンパク質の糖鎖修飾

動物由来のタンパク質は多くの場合糖鎖修飾を受けているが、これは生理活性や血中における安定性に重要である。したがって、タンパク質の生産物にいかにも正しく糖鎖を付加するかは重要な問題であり、動物細胞をはじめ、酵母やカイコ、植物の生産システムでも改良が進んでいる。ヒト由来のタンパク質における糖鎖修飾は、アスパラギンに付加するN型糖鎖とセリンやスレオニンに付加するO型糖鎖の存在が知られており、タンパク質の安定性に関与するのはN型糖鎖である。O型糖鎖については、近年解析が進みつつあるが詳細な機能は不明である。N型糖鎖修飾には高マンノース型、ハイブリッド型および複合糖鎖型がある。小胞体においてタンパク質が合成され糖鎖が付加された後、ゴルジ体においてこの糖鎖からマンノースがマンノシダーゼの作用により除去される。さらに、ガラクトース転移酵素とシアル酸転移酵

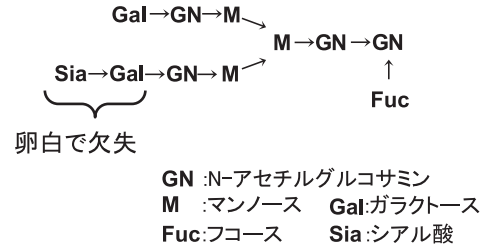


図12. N-型複合糖鎖の構造

素の働きでこれらの糖が付加され複合型糖鎖が生成する。ハイブリッド型糖鎖はこれらの中間型である。図12には複合型糖鎖の構造を示す。複合型糖鎖の末端シアル酸が欠失すると、肝臓におけるアシアロタンパク受容体によりタンパク質が吸着分解をうける事が知られており、この点からもより完全な複合糖鎖構造を付加する事が大切と考えられている。我々はトランスジェニックニワトリの卵白で生産された一本鎖抗体の糖鎖について解析し、ハイブリッド型糖鎖と複合型糖鎖が大部分を占める事、顕著なシアル酸の結合は観察されずガラクトースの付加も完全ではない事、多くのN型糖鎖の末端がN-アセチルグルコサミンかマンノースであることを明らかにした<sup>17)</sup>。同様の事はZhuによっても報告されている<sup>18)</sup>。これに対し、血清や卵黄に蓄積した抗体では一部ガラクトースやシアル酸の付加が起きていた<sup>19)</sup>。

エリスロポイエチンの場合、N型糖鎖が最大3本、また、O型糖鎖が存在し、これら糖鎖がその安定性と*in vivo*の生物活性に大きな影響を与える。そこで、前に述べたトランスジェニックニワトリで生産されたエリスロポイエチンについて調べたところ、分子量的にCHO細胞で生産された標準品と異なっていたが<sup>9)</sup>、PNGaseとO-グルカナーゼで糖鎖を消化すると分子量20 kD程度の単一バンドが検出され、分子量の違いは糖鎖修飾の違いによるものと考えられた。さらに生産されたエリスロポイエチンをPNGaseで部分分解すると、N型糖鎖が1本、2本、また、3本付加したと推定されるバンドが検出された。また、α-2, 3結合シアル酸特異的MAMレクチンを用いたレクチンブロットで、CHOにより生産された市販エリスロポイエチンにはノイラミニダーゼF (NF) 処理により消失するバンドが検出されるが、ニワトリで生産されたエリスロポイエチンではこのようなバンドは認められなかった。また、α-2,6結合シアル酸特異的SSAレクチンを用いた場合、CHO、卵白どちらで生産されたエリスロポイエチンでもシアル酸は検出できなかった。レクチンブロットの感度が低いため断定はできないものの、これらの結果からシアル酸の付加レベルは低いと推定される。また、ガラクトース特異的レクチンRCA120

では、ノイラミニダーゼ処理依存的にバンドが検出されたが、ニワトリ卵白の場合CHOエリスロポイエチンに比べバンドの濃さが35%程度でありガラクトースの付加も不完全であることが示唆された。

卵白タンパク質において一般的にガラクトースの付加が起りにくいのかを調べるために、ニワトリの原種とされる赤色野鶏をはじめ多くのニワトリについて卵白タンパク質N型糖鎖へのガラクトースの付加をレクチンプロットにより解析したところ、大部分のタンパク質のN型糖鎖でガラクトースの付加レベルは低かった。また、卵白タンパク質が生産される輸卵管膨大部の細胞のゴルジ体フラクションからガラクトース転移酵素活性を検出できなかった。ニワトリには3種類のガラクトース転移酵素の存在が示唆されているので、遺伝子をクローン化した。これら遺伝子のcDNAを昆虫細胞に導入し酵素を生産し、Gal $\beta$ 1,4GlcNAcをアクセプターとし放射ラベルしたUDP-ガラクトースの転移活性を測定したところ、GalT1およびT2に明らかな糖転移酵素活性が見いだされたが、GalT3では活性が検出できなかった。糖鎖基質を用いた試験管内の反応のため断定はできないが、GalT3は酵素活性をもたない、あるいは基質特異性の異なる酵素であると考えられた。また、RT-PCRによりニワトリにおけるこれら遺伝子の発現の臓器特異性を調べたところ、輸卵管膨大部におけるGalT1の発現がきわめて低い事がわかった(図13)。また、GalT2の発現は輸卵管膨大部を含むすべての臓器で観察されるものの、その発現レベルはGalT1と比較して低レベルであった。そこでレトロウイルスベクターにGalT1遺伝子を組込み、一本鎖抗体を生産するトランスジェニックニワトリの胚に感染した<sup>20)</sup>。比較的高いコピー数を持つG0キメラでは膨大部で野生型ニワトリに比べきわめて高いGalT1のmRNAが検出された。図14(p.8掲載)には、

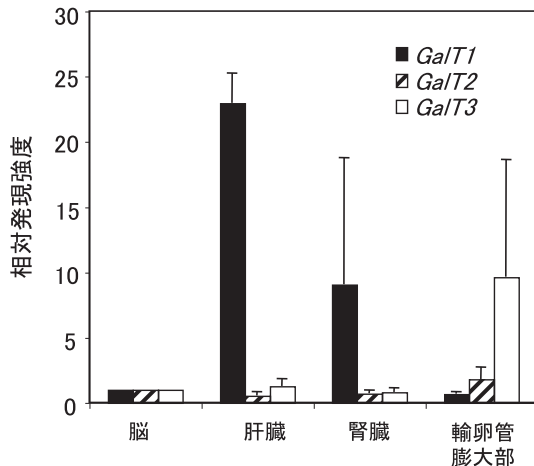


図13. ニワトリ臓器におけるガラクトース転移酵素の発現

輸卵管膨大部におけるGalT1の発現を示す。また、卵白よりProteinGカラムで一本鎖抗体を精製しガラクトース特異的レクチンRCA120を用いたレクチンプロットで検出したところ、糖転移酵素遺伝子を導入していないコントロールには存在しないRCA120と反応するバンドが検出された。また、このバンドは $\beta$ -ガラクトシダーゼ処理により消失したため、N型糖鎖の末端ガラクトースと推定された(図15)。

このようにGalT1遺伝子を導入したニワトリでは、卵白タンパク質のN型糖鎖にガラクトースを付加することができたので、次にエリスロポイエチンについて糖鎖修飾の改善を試みた。アクチンプロモーターから発現したヒトエリスロポイエチンとGalT1のポリシストロニックRNAから、インターナルリボソームエンタリーサイト(IRES)を用いてこの2種類のタンパク質が生産されるよう設計されたウイルスベクターをニワトリ胚に感染しキメラニワトリを得た。性成熟後得られた卵白から抗体で精製したヒトエリスロポイエチンをレクチンプロットで解析したところ、抗ガラクトースレクチンRCA120と反応することから、ガラクトース付加が起っていることが判明した(図16)<sup>21)</sup>。この実験では、GalT1を導入していないトランスジェニックニワトリで生産したエリスロポイエチンにガラクトースの付加は検出できなかった。以上より、トランスジェニックニワトリにGalT1遺伝子を導入すればN型糖鎖の改善が図られることが示された。しかしながらこれらのタンパク質への顕著なシアル酸の付加は見られなかった。

そこでニワトリのシアル酸転移酵素について解析することとした。ほ乳類ではシアル酸を2,3結合で転移するST3-3, 3-4, 3-6と、2,6で転移するST6-1および6-2が存在することが知られている。ヒトの場合、シアル酸の結合は2,6である。そこでほ乳類の酵素の塩基配列を参考にしてニワトリのこれらの酵素遺伝子をクローン化し、293FT細胞で発現したライゼートを用いて、Gal $\beta$ 1,4GlcNAcへの放射ラベルしたCMP-シアル酸の

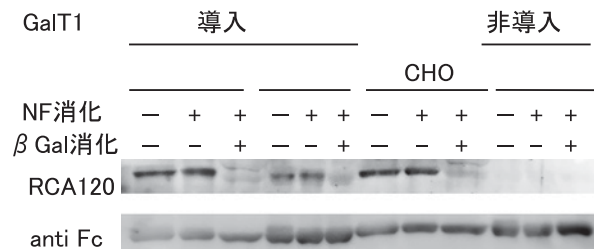


図15. GalT1導入ニワトリにおける卵白に蓄積した一本鎖抗体へのガラクトースの付加。精製一本鎖抗体をガラクトース特異的レクチンRCA120を用いたレクチンプロットにより解析した。CHO: CHO細胞で生産された一本鎖抗体。

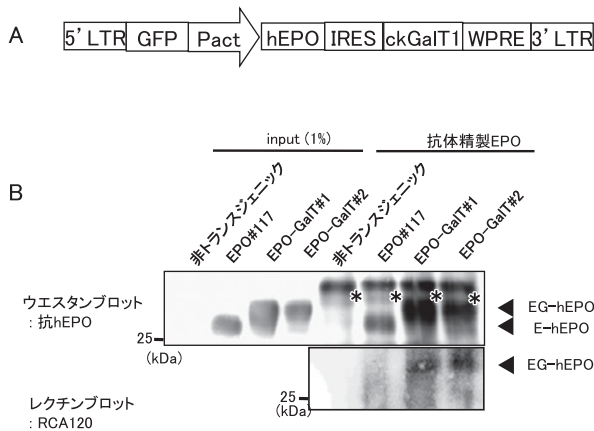


図16. 卵白に蓄積したエリスロポイエチンへのガラクトースの付加. A: レトロウイルスベクターの構造. B: ガラクトース特異的レクチンRCA120を用いたレクチンプロット. \*: 抗体軽鎖. E-hEPO: ヒトエリスロポイエチンのみ発現するトランスジェニックニワトリ#117により生産. EG-hEPO: ヒトエリスロポイエチンとGalT1を発現するトランスジェニックニワトリEPO-GalT#1および#2により生産.

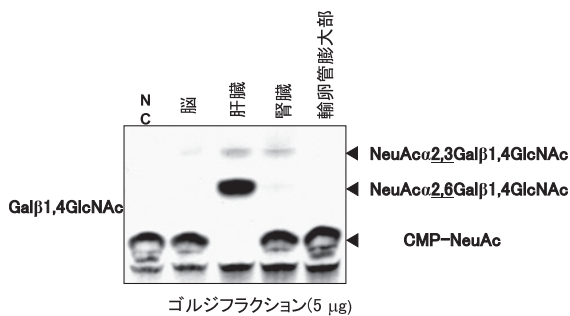


図17. ニワトリ各臓器におけるシアル酸転移酵素活性. ニワトリ臓器の細胞からゴルジフラクションを精製し、 $\alpha$ 2,3および $\alpha$ 2,6シアル酸転移酵素活性をGal $\beta$ 1,4GlcNAcと放射ラベルしたCMP-シアル酸を基質として測定した.

転移活性を調べたところ、ST3-3、3-6、6-1に活性が認められた。ST3-4および6-2に酵素活性が検出できなかった理由は現在のところ不明である。次にこれらのmRNAの発現を調べたところ、肝臓においてはほとんどすべてのシアル酸転移酵素の発現が見られたが、輸卵管膨大部ではST3-6の発現が弱く見られただけである。そこでニワトリの種々の臓器の細胞からゴルジフラクションを調製し酵素活性を測定したところ、肝臓では弱い2,3および強い2,6転移酵素活性が見られるのに対し輸卵管膨大部では酵素活性は検出できなかった(図17)<sup>22)</sup>。したがって、卵白タンパク質が生産される輸卵管膨大部のシアル酸転移酵素活性が低いことが卵白タンパク質のN型糖鎖にシアル酸が転移しない原因と考えられ、今後ST6-1を導入したニワトリが作製できれば糖鎖に関する問題を乗り越える事ができると考えている。

シアル酸にはN-アセチルノイラミン酸とN-グリコリ

ルノイラミン酸の2種類が知られているが、ヒトおよびニワトリは前者のみ含むのに対し、CHOなど哺乳類細胞では両者を含む。これはN-アセチルノイラミン酸からN-グリコリルノイラミン酸への変換酵素が、ヒトやニワトリで存在しない事による。N-グリコリルノイラミン酸は免疫原性があるとも考えられており、この点からニワトリの生産システムは有利である。また、卵白で生産された一本鎖抗体のN型糖鎖ではフコースが検出されない。N型糖鎖のフコースは、抗体医療などで重要な抗原特異的細胞障害活性(ADCC)を阻害する事が知られており、ニワトリで生産された抗体はこの点からも有利である。

## おわりに

我々は20年近くにわたってトランスジェニックニワトリの開発を行ってきたが、汎用技術としては未完成である。特にウイルスベクターを用いると短い遺伝子しか導入できないことが最大の難点である。これを解決するにはリポフェクション法による遺伝子導入がよいが、始原生殖細胞への遺伝子の導入効率が低すぎるため利用できない。そこで我々はウイルス法の特徴である、染色体への組み込み酵素(インテグラーゼ)の利用を考えて基礎研究を行い<sup>23)</sup>、精製インテグラーゼとLTRを含むトランスジーン複合体をリポフェクション法などで始原生殖細胞へ導入することを目指した。この方法は培養細胞では機能するが、始原生殖細胞は長期培養が難しいため適用が難しく、トランスジェニックニワトリ作製には至っていない。これらより始原生殖細胞の安定な培養が、トランスジェニックニワトリ技術に汎用性をもたらすために重要と考えられる。

一方、生産物の糖鎖修飾に関してはシアル酸転移酵素導入ニワトリにより十分対応可能と考える。また、近年ニワトリインフルエンザのパンデミックやインフルエンザワクチンの効率的生産なども重要な課題となっており、今後これらについてもニワトリ糖鎖の研究を通して何らかの寄与ができればと考えている。

本総説では、我々が行ってきた動物に関する研究のうちトランスジェニックニワトリについてまとめた。今回触れる事ができなかったが、この他に三宅克英博士、金岡英徳博士を中心に動物細胞における遺伝子発現制御、染色体構造変換さらに紫外線損傷修復<sup>24,25)</sup>、また、西島謙一博士とは、自然免疫とシアル酸結合レクチン<sup>26)</sup>などの研究を行っており、これらを含め大変楽しく充実した研究生活ができたと感謝している。また、これらの研究成果や得られた技術は、トランスジェニックニワトリの研究を進める上でも重要なものであった。

## 謝 辞

本研究は上平正道博士（現九州大学教授）、三宅克英博士（現石川県立大学教授）、西島謙一博士（現名古屋大学）、金岡英徳博士（現名古屋大学）河辺佳典博士（現九州大学）、堀田秋津博士（現京都大学）、元野誠博士（現京都大学）吉田和央博士（現長寿研）、水谷昭文博士（現岡山大学）をはじめ多くの研究室のメンバーの献身的な努力によりなし得たもので深く感謝します。また、長年にわたり共同研究を行った（株）カネカにこの場を借りて感謝します。この研究は科学研究費補助金、JST育成研究、A-step、生研センター新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業、NEDO産業技術実用化開発費補助事業など多くの補助を頂いて行われたものでここに深く感謝します。また、ニワトリやウズラを提供していただいたナショナルバイオリソースプロジェクト、ニワトリウズラに深く御礼申し上げます。最後になりますが、私にBioengineeringの考え方を教えていただき、生物工学会との深いご縁をおつくりいただいた名古屋大学名誉教授小林猛先生と、レトロウイルスやニワトリといった本研究の根幹を教えていただいた故花房秀三郎ロックフェラー大学教授、また、学生であった私に生物学の面白さを教えてくださった東京大学名誉教授別府輝彦先生に心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Houdebine, L. M.: *Transgenic Res.*, **9**, 305–320 (2000).
- 2) 飯島信司：発酵工学, **69**, 507–520 (1991).
- 3) Perry, M. M.: *Nature*, **331**, 70–72 (1988).
- 4) Kamihira, K., Oguchi, S., Tachibana, A., Kitagawa, Y., and Iijima, S.: *Dev. Growth Differ.*, **40**, 449–455 (1998).
- 5) Mizuarai, S., Ono, K., Yamaguchi, K., Nishijima, K., Kamihira, M., and Iijima, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 456–463 (2001).
- 6) Love, J., Gribbin, C., Mather, C., and Sang, H.: *Biotechnology*, **12**, 60–63 (1994).
- 7) Kamihira, M., Ono, K., Esaka, K., Nishijima, K., Kigaku, R., Komatsu, H., Yamashita, T., Kyogoku, K., and Iijima, S.: *J. Virol.*, **79**, 10864–10874 (2005).
- 8) Kawabe, Y., Kamihira, M., Ono, K., Kyogoku, K., Nishijima, K., and Iijima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 297–303 (2006).
- 9) Kodama, D., Nishimiya, D., Iwata, K., Yamaguchi, K., Yoshida, K., Kawabe, Y., Motonon, M., Watanabe, H., Yamashita, T., Nishijima, K., Kamihira, M., and Iijima, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**, 834–839 (2008).
- 10) Motonon, M., Yamada, Y., Hattori, Y., Nakagawa, R., Nishijima, K., and Iijima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 315–321 (2010).
- 11) Motonon, M., Ohashi, T., Nishijima, K., and Iijima, S.: *Cytotechnology*, **57**, 199–205 (2008).
- 12) Morrison, S. L., Mohammed, M. S., Wims, L. A., Trinh, R., and Etches, R.: *Mol. Immunol.*, **38**, 619–625 (2002).
- 13) Kawabe, Y., Naka, T., Ando-Noumi, N., Matsumoto, H., Ono, K., Nishijima, K., Kamihira, M., and Iijima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 518–523 (2006).
- 14) Kyougoku, K., Yoshida, K., Watanabe, H., Yamashita, T., Kawabe, Y., Motonon, M., Nishijima, K., Kamihira, M., and Iijima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 454–459 (2008).
- 15) Kaye, J. S., Pratt-Kaye, S., Bellard, M., Dretzen, G., Bellard, F., and Chambon, P.: *EMBO J.*, **5**, 277–285 (1986).
- 16) Kodama, D., Nishimiya, D., Nishijima, K., Okino, Y., Inayoshi, Y., Kojima, Y., Ono, K., Motonon, M., Miyake, K., Kawabe, Y., Kyogoku, K., Yamashita, T., Kamihira, K., and Iijima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 146–153 (2012).
- 17) Kamihira, M., Kawabe, Y., Shindo, T., Ono, K., Esaka, K., Yamashita, T., Nishijima, K., and Iijima, S.: *J. Biotechnol.*, **141**, 18–25 (2009).
- 18) Zhu, L., van de Lavoie, M.-C., Albanese, J., Beenhouwer, D. O., Cardarelli, P. M., Cuisson, S., Deng, D. F., Deshpande, S., Diamond, J. H., Green, L., Halk, E. L., Heyer, B. S., Kay, R. M., Kerchner, A., Leighton, P. A., Mather, C. M., Morrison, S. L., Nikolov, Z. L., Passmore, D. B., Pradas-Monne, A., Preston, B. T., Rangan, V. S., Shi, M., Srinivasan, M., White, S. G., Winters-Digiaccinto, R., Wong, S., Zhou, W., and Etches, R. J.: *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1159–1169 (2005).
- 19) Yoshida, K., Okuzaki, Y., Nishijima, K., Kyogoku, K., Yamashita, T., Kawabe, Y., Motonon, M., Kamihira, M., and Iijima, S.: *Cytotechnology*, **65**, 985–992 (2013).
- 20) Mizutani, A., Tsunashima, H., Nishijima, K., Sasamoto, T., Yamada, Y., Kojima, Y., Motonon, M., Kojima, J., Inayoshi, Y., Miyake, K., Park, E. Y., and Iijima, S.: *Transgenic Res.*, **21**, 63–75 (2012).
- 21) Kojima, Y., Wakita, J., Kaneoka, H., Nishijima, K., and Iijima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 676–679 (2014).
- 22) Kojima, Y., Mizutani, A., Okuzaki, Y., Nishijima, K., Kaneoka, H., Sasamoto, T., Miyake, K., and Iijima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 623–628 (2015).
- 23) Inayoshi, Y., Okino, Y., Miyake, K., Mizutani, A., Yamamoto-Kishikawa, J., Kinoshita, Y., Morimoto, Y., Imamura, K., Morshed, M., Kono, K., Itoh, T., Nishijima, K., and Iijima, S.: *J. Virol.*, **84**, 8250–8261 (2010).
- 24) Sato, Y., Miyake, K., Kaneoka, H., and Iijima, S.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 21629–21639 (2006).
- 25) Tsuge, M., Masuda, Y., Kaneoka, H., Kidani, S., Miyake, K., and Iijima, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **438**, 26–31 (2013).
- 26) Ando, M., Tu, W., Nishijima, K., and Iijima, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 878–883 (2008).