

## 研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	プリオン遺伝子ホモKO牛の特性に関する研究 (研究期間：平成20年度～平成22年度)
主任研究者名	所属：東京大学 農学生命科学研究科 氏名：眞鍋 昇 (研究課題番号：0804)

経口的に感染するのみならず孤発性も確認されている牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy: BSE) の統御には病原体であるプリオンタンパクを発現しないようにプリオン遺伝子をホモノックアウト (KO) した牛の作出しか方策がない。プリオン遺伝子KO牛作出とその特性解明を目的とする本研究開発事業は、食品の安全の担保、牛生体材料を利用した様々な医薬・医療品などの安全確保にとって必須である。プリオン遺伝子KO牛では体細胞核移植の効率が悪いので、大幅に改善する手法を開発した。またプラスミド由来の外來性の塩基配列がプリオン遺伝子欠損部位に残っているのでKOベクターに自殺遺伝子を導入し、残存外來遺伝子を大幅に減少させることができた。プリオン遺伝子KO牛でも体細胞核クローン牛に共通に認められる大きな胎仔と胎盤、自然分娩の困難、新生仔における高死亡率などは認められるものの、対象 (体細胞核クローン牛) と比較した場合、胎仔においては臨床レベルでの異常、様々な臓器における病理学的異常、生化学的脳神経系における抗酸化系酵素活性の異常などの明瞭な異常は認められなかった。しかし詳細に調べると、プリオン遺伝子KO牛では、KO操作にともなって脳を含む様々な臓器の多様なタンパクの発現が影響を受けていること、神経系細胞において多くのタンパクの酸化変性や脂質酸化の抑制が生じていることが判明し、加齢に伴う変化や次世代における健常性を見極めなくてはならないことが分かった。

## 研究成果報告書（本体）

研究課題名	プリオン遺伝子ホモKO牛の特性に関する研究 (研究期間：平成20年度～平成22年度)
主任研究者名	所属：東京大学 農学生命科学研究科 氏名：眞鍋 昇 (研究課題番号：0804)

## I 研究の全体計画

## 1 研究期間

平成20～22年度（3年間）

## 2 研究目的

経口的に感染するのみならず孤発性も確認されている牛海綿状脳症（bovine spongiform encephalopathy：BSE）の統御には病原体であるプリオンタンパクを発現しないようにプリオン遺伝子をホモKOした牛の作出しか方策がない。プリオン遺伝子KO牛作出とその特性解明を目的とする本研究開発事業は、食の安全の担保、牛生体材料を利用した様々な動物用医薬品を介した食品などの安全確保にとって必須である。わが国で独自に開発された牛胎仔由来リサイクル体細胞核移植法により、プリオン遺伝子ホモノックアウト（KO）クローン牛（プリオン遺伝子KO牛・黒毛和種の雌牛）が2007年11月に誕生した。全国農業組合連合会の中央研究所と胚移植（ET）センターの技術開発によって生産されたKO牛は、約1年半先行して生産された合衆国のプリオンKO雄牛（ホルスタイン種）と異なり、作出がより困難な黒毛和種を用いかつ雌牛で成功したもので、科学的価値も高い。生殖工学的取扱の容易なマウスと異なり、牛では胚性幹細胞（ES）細胞は確立しておらず、かつ性成熟までの期間が長いので、KO牛の作出には手間と時間のかかる複雑なプロセスが必要である。具体的には、最初に牛の発生初期の胎仔の線維芽細胞を体外で培養し、これを用いてヘテロプリオンKO細胞を作出する。この核をあらかじめ核を抜いておいた（脱核）卵母細胞に移植（核移植）して初期胚とし、これを胚盤胞まで体外で成熟培養したものを仮母牛（レシーピエント牛・受胚牛）の子宮に移植（胚移植）し、着床させて胚発生を進める（1次体細胞クローン牛の作出）。このようにして作出した発生初期の胎仔は、一対ある遺伝子の片側だけがKOされたヘテロKO体であるので、両側がKOされたホモKO体を作出するために、再び線維芽細胞を調製して体外で培養し、これを用いてプリオン遺伝子ホモKO細胞を作出する。このホモKO細胞の核を脱核した卵母細胞に核移植してホモプリオンKO初期胚を作出し、これをレシーピエント牛の子宮に胚移植して2次体細胞クローン牛を作出する（2次体細胞クローン牛の作出）。平成20年度は2次体細胞クローン牛（プリオン遺伝子ホモKO牛）作出のために5頭のレシーピエント牛を用い、各々にホモプリオンKO初期胚を2胚ずつ合計10胚を移植した結果、4頭（うち2頭は双子妊娠）で着床が認められ、これらは順調に妊娠が推移して出産に漕ぎ着け、6頭のプリオンKO雌牛を作出することができた。しかしながら、6頭のうちの1頭は誕生の直後に原因不明で死亡し、1頭は過大仔で分娩時事故によって死亡した（牛や豚などの家畜だけでなくマウスなどの実験動物でも、体細胞核クローン動物の胎仔は巨大仔となり、分娩時期に流産したり出産時に死産となることが多い）。残りの4頭は正常（健康体）であった。プリオン遺伝子ノックアウトの影響を

生化学および病理学的に精査するために、これらの全てを経時的に安楽殺して全身の臓器を採取した（2頭は生後3ヶ月齢で、1頭ずつを5ヶ月齢と12ヶ月齢）。平成21年度はより詳細な研究をすすめるために同様にプリオン遺伝子ホモKO牛の作出を進め、健全な1頭を得た。また併行して対照として遺伝子操作を施していない体細胞核クローン牛を作出し、供試した。

このように最先端の遺伝子工学と繁殖工学技術を駆使して誕生したプリオン遺伝子KO牛において、加齢に伴いプリオン遺伝子の欠損が牛にどのような影響を与えるかを分子生物学的、臨床的、病理学的に評価し、牛における正常プリオンタンパクの機能を解明すること、性成熟に達した時点で、この遺伝形質が配偶子に安定して継代されるか否かを受精卵で確認すること、およびプリオン遺伝子を欠損する有用性を細胞などプリオン遺伝子を欠損する有用性を食品の原料、動物用医薬品の利用面からヒトへの健康影響評価をすることが、安全な畜産物を安定して供給するためには必須であるので、これらを科学的に明らかにすることが本事業の目的である。そのために、プリオン遺伝子ホモKO牛、対照体細胞核クローン牛（クローン牛）の作成法の改良遺伝子を検討、作出された牛を用いて、mRNAや、プリオンタンパクの発現の有無を確認する。また、プリオン遺伝子KO牛の臨床データの取得、臨床病理学的解析、生殖系細胞の解析により、プリオン遺伝子KO牛の特性を解析する。さらに、血液成分、性ホルモンや代謝酵素系、薬物代謝系、脳内酸化変性タンパク等の網羅的解析を行い、プリオンタンパク欠失による生体内代謝酵素系や抗酸化作用等への影響を解明しなくてはならない。

### 3 研究内容及び方法等

#### (1) 研究内容及び方法

以下に各分担課題別にまとめる。

##### 1) 分担課題：「プリオン遺伝子ホモKO牛の特性の解析」

(分担研究者：東京大学 眞鍋昇、吉川泰弘、小野憲一郎、  
協力研究者：濱崎裕子、小野山一郎)

##### ① 研究目的

わが国で独自に開発された牛胎仔由来リサイクル体細胞核移植法により、プリオン遺伝子をホモにノックアウト（KO）したクローン黒毛和種（プリオン遺伝子KO牛）が作出できた。具体的には黒毛和種雌牛の胎仔線維芽細胞を用いてプリオンホモノックアウト細胞（#H2-14CrN）を作製し、これをドナーとして、脱核した未受精卵に核移植を行い、体細胞由来クローン胚を作出した。平成20年度には、5頭のメス牛（レシーピエント牛・借腹牛）にプリオンKO初期胚を2胚ずつ合計10胚を移植した結果4頭が妊娠し（うち2頭は双子を妊娠）、その結果、6頭のプリオンKO雌黒毛和種を作出することができた。このようにして生産したプリオン遺伝子ホモKO牛の発育・加齢に伴いプリオン遺伝子の欠損が牛にどのような影響を与えるかを分子生物学的、臨床的、病理学的に評価し、牛における正常プリオンタンパクの機能を解明すること、性成熟に達した時点で、この遺伝形質が配偶子に安定して継代されるか否かを受精卵で確認すること、およびプリオン遺伝子を欠損する有用性を細胞などプリオン遺伝子を欠損する有用性を食品の原料、動物用医薬品の利用面からヒトへの健康影響評価をすることが本研究課題の目的である。そのために、プリオン遺伝子ホモKO牛を用いて、mRNAや、プリオンタンパクの発現の有無を確認する。またプリオン遺伝子KO牛の臨床データの取得、臨床病理学的解析、生殖細胞の解析などによりプリオン遺伝子KO牛の特性を解析する。さらに、血液成分、性ホルモン/代謝酵素系、薬物代謝系、脳内酸化変性タンパク等の網羅的解析を行い、プリオンタンパク欠失による生体内代謝酵素系や抗酸化作用等への影響を解明することも重要な目的である。

## ② 研究方法

平成20年度は6頭のうちの4頭（3ヶ月齢雌2頭、5ヶ月齢雌1頭および1歳齢雌1頭）のプリオン遺伝子KO牛から得られた脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管などの各臓器を用いて、プリオン遺伝子KO牛の臨床病理学的解析、およびプリオン遺伝子の発現解析を行った。このプリオン遺伝子KO牛は、最終的には、プリオン遺伝子のうち、エクソン3の一部（ORFの大部分を含む2914bp）が欠損し、その代わりに、loxPを含む外来遺伝子をプリオン遺伝子ORF領域に含む。プリオン遺伝子KO牛の全身状態を確認するため、サンプリングにより得られた各臓器を、パラホルムアルデヒド溶液で固定後、パラフィンブロックを作成した。1歳齢のプリオン遺伝子KO牛以外の3頭のサンプルについては、脳など代表的な組織に関して、薄切後、HE染色を行った。凍結保存した各サンプルを用いて、RT-PCRを行い、プリオン遺伝子のmRNAの発現を確認した。まず、対照として2ヶ月齢ホルスタイン雄のサンプルを用いたRT-PCRによりcDNAを合成した。得られたcDNAのうち、大脳、および肝臓のcDNAを用いてPCRの各条件を検討・決定した。

平成20年度作出したプリオン遺伝子ホモKO牛（1回目）は、北海道士幌町にある全農ETセンターで誕生後6ヶ月間飼育され、その後茨城県にある東大牧場に移動されたために、この後から12ヶ月齢にて採材のために安楽殺されるまで経時的に臨床性状を調べた。このため、免疫系および消化器系が脆弱である兆候を示すプリオン遺伝子ホモKO牛の特性を理解するために重要な出生直後（誕生直後から1週間の初乳哺乳期は特に免疫系の確立に重要な時期である）、その後の哺乳時期（1週齢から50週齢まで）、徐々に反芻胃が発育して粗飼料を摂食し始める50週齢以降から性成熟（黒毛和種の初回発情は早くても12ヶ月齢）に達するまでの一連の推移を詳細に検討できなかった。

平成21年度は2回目のプリオン遺伝子ホモKO牛を生産した。すなわち、平成21年2月に胚移植した妊娠中の母牛を妊娠安定期に北海道の全農ETセンターから東大牧場に移送して飼育して、プリオン遺伝子ホモKO牛およびその対照牛（胎仔線維芽細胞の核を用いた体細胞核クローン牛）の出産、誕生直後からの臨床生化学的な情報臨床性状を詳細にフォローしている。この牛が性成熟に達した後は、雌性配偶子の解析、体外授精、初期胚の体外成熟培養、レシーピエント牛子宮への胚移植を試み、次世代（F1）個体におけるプリオン遺伝子ノックアウトの影響を的確に評価する基盤を確立しようとしている。具体的には、平成21年度生まれたプリオン遺伝子ホモKO牛と対照牛の体尺測定、体温測定、心拍数測定などを行って臨床所見を随時記録するとともに、定期的に採血して臨床血液学・生化学検査を行って、健全性のモニタリングを行った。

併行して、平成20年度得られたプリオン遺伝子ホモKO牛（出産直後1頭、3ヶ月齢2頭、5ヶ月齢1頭、12ヶ月齢1頭）のサンプルを用いた基盤情報の集積を平成20年度に引き続いて行った。平成20年度生まれたプリオン遺伝子ホモKO牛の諸臓器（脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管など）におけるプリオン遺伝子およびノックアウト操作に用いたベクターに依然1つ含まれているloxP配列を含むプラスミド由来の外来遺伝子（328残基）などの発現解析を行うとともに、エピジェネティック変動の解析およびプロテオーム解析を行った。加えて、諸臓器を定法に従って組織切片として一般染色、免疫染色、*in situ* hybridizationなどを施して病理組織学的異常の有無を検索した。

平成22年度には平成21年度までに得られたプリオン遺伝子ホモKO牛および対象健全牛の大脳、脊髄、扁桃などを用いて、それぞれの組織で発現しているタンパクをLC-MS/MSを利用したショットガン法により網羅的に解析した。

## 2) 分担課題：「プリオン遺伝子KO牛、対照クローン牛の作成と改良法の検討」

(分担研究者：全農飼料畜産中央研究所 千代豊、協力研究者：浦川真実、出田篤司)

### ① 研究目的

プリオン遺伝子ホモKO牛および対照群として同一の胎仔由来線維芽細胞の体細胞核を用いて作製した胚由来クローン牛を作成するとともに、現在の欠損部位に残っているプラスミド由来の外来性の塩基配列を除去する方法の検討を進める。加えて作製効率を大幅に改善する作出方法の開発を進めた。すなわち、プリオン遺伝子をノックアウトするために使用したノックアウトベクターは、プリオンタンパクをコードする領域を除去するようにデザインし構築したものであるが、選択マーカ遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子）を挟むかたちに1 o x P配列が位置しており、Cre組換え酵素処理（Cre発現アデノウイルス）することにより選択マーカ遺伝子を除去できる構造となっている（下図）。このベクターを使用することによって1種類（本来は2種類必要）のノックアウトベクターを使用してホモノックアウト体細胞株を比較的容易に樹立することが可能となり、牛胎仔由来線維芽細胞を出発材料として2回のノックアウト操作によりホモノックアウト細胞株が得られた。さらに、このホモノックアウト細胞をドナーとした核移植クローン操作によりプリオン遺伝子ホモKO牛を作出してきた。ノックアウト操作の開始からホモKO牛の誕生まで、おおよそ14ヶ月を要した。この作出法は通常の繁殖法（性成熟後のヘテロKO牛のかけ合わせ）と比べると非常に短期間に作出できる方法であるが、1年以上も必要であるので、格段の改善が必要である。

### ② 研究方法

プリオン遺伝子ホモKO牛は、培養体細胞を用いた遺伝子ノックアウト操作と得られたノックアウト体細胞の核を使用した核移植クローン操作により作出した。牛プリオン遺伝子は3つのエクソンより構成されており、プリオンタンパクをコードする領域はエクソン3に位置している。このプリオンタンパクをコードする領域を除去するようにデザインし構築したノックアウトベクターは、選択マーカ遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子）を挟むかたちに1 o x P配列が位置しており、Cre組換え酵素処理（Cre発現アデノウイルス）することにより選択マーカ遺伝子を除去できる構造となっている。本来は2種類必要なのだが、このノックアウトベクターを使用することによって1種類のベクターでホモノックアウト体細胞株（プリオンタンパクをコードする遺伝子領域を完全に欠失）を比較的短期間で樹立することが可能となった。即ち、牛胎仔由来の線維芽細胞を出発材料として2回のノックアウト操作によりホモノックアウト細胞株（#H2-14CreN株）を得た。このプリオンKO細胞とこれの樹立に使用した胎仔由来線維芽細胞（#906株）をドナーとして体細胞核移植クローン操作を実施した。各々を2頭ずつのレシーピエント牛2胚ずつに胚移植し、プリオン遺伝子ホモKO牛および対照牛を作出した。平成20年度は体細胞核移植の効率がよくなかったので、平成21年度には研究協力者の浦川らが開発した方法（Urakawa et al. Theriogenology 62, 714-728, 2004）を改善し、初期G1期に細胞周期コントロールしたドナー細胞を使用することで、成功率を大幅に向上した。このようにして作成した受胎牛を妊娠9ヶ月の時点で全農ETセンターから東大牧場へ移動して分娩・出産を行った。さらに平成22年度には外来遺伝子を残さないKO法の開発を進めた。即ち、現行のKO操作では、プリオン欠損部位にプラスミド由来の塩基配列（1 o x P配列を含むプラスミド由来の328塩基対）が残る。本試験においては、ノックアウトベクター中に自殺遺伝子を導入した新規のベクターを構築し、2回の相同遺伝子組換え操作を経て外来遺伝子を除去する方法の検討を実施した。

### 3) 分担課題：「プリオン遺伝子K〇牛の生化学的解析」

(分担研究者：酪農学園大学 横田博、

協力研究者：松田一哉、宮庄拓、野村幸子、奥村佳奈子)

#### ① 研究目的

プリオンタンパクは、細胞の酸化ストレスを防御する super oxide dismutase (SOD) 活性を担っており、プリオンをノックアウトしたマウスでは細胞の自然死であるアポトーシスが誘発されるという報告がある。しかしこれの牛における役割は不明である。マウスと同様であれば、プリオン遺伝子ホモK〇牛の神経細胞は酸化ストレスを受け易く、増殖・成長過程で重要な障害を受ける可能性がある。これを確認するために、平成20年度はプリオン遺伝子ホモK〇牛の神経(延髄)細胞中の酸化ストレスに関連している一群の酵素(SOD、Caspase-3、Caspase-7、protein disulfide-isomerase: PDI)の活性をノックアウトしていない牛のそれと比較した。さらに神経組織内の酸化状態をカルボニル化タンパクを検出することで比較した。その結果、これら酸化ストレス関連酵素の活性は、両者間で有意な差異が認められなかったが、プリオン遺伝子ホモK〇牛の神経組織では数種のタンパクのカルボニル化が観察された。この結果から、抗酸化作用を有するプリオンタンパクを欠失したことにより、神経タンパクの酸化が促進されたことが推察されたので平成21年度と平成22年度には、プリオンタンパク欠失による神経組織におけるタンパクの酸化促進を明らかにする目的で、*in vitro*でのタンパク酸化反応系を確立し、プリオンタンパク欠失牛の神経のタンパクが酸化を受けやすいか否かを確認し、併せて脂質の易酸化性も検討した。

#### ② 研究方法

細胞のタンパクの酸化は様々な障害や疾病へと発展する引き金の役目を担っており、中でもタンパクのカルボニル化は不可逆的な反応で、アルギニンの分解を誘導するのでタンパクの機能障害を示唆する重要な指標である。プリオン遺伝子ホモK〇牛や対照牛の神経組織ホモゲネートを調製し、*in vitro*系での酸化反応系によって標本中のタンパクのカルボニル化を測定した。併行して、牛の神経組織ホモゲネートに活性酸素を発生させる目的で FeCl<sub>2</sub> を添加し、これに含まれる脂質の過酸化によって生じる malondialdehyde などの thiobarbituric acid 反応性物質(TAB)を測定することで、脂質の過酸化の程度を評価した。細胞のタンパクの酸化は様々な障害や疾病へと発展する引き金の役目を担っており、中でもタンパクのカルボニル化は不可逆的な反応で、アルギニンの分解を誘導するのでタンパクの機能障害を示唆する重要な指標である。試験管内フェントン反応系で、神経組織ホモゲネートに活性酸素を発生させ、脂質過酸化物や神経タンパクの酸化(カルボニル化)を生じさせることに成功した。

### 4 倫理面への配慮について

全農飼料畜産中央研究所、酪農学園大学および東京大学附属牧場における動物の供試に関しては、全て各々の動物実験倫理委員会の許可を得て行った。

## II 平成20年度研究成果報告

### 1 平成20年度の研究目標

全農及び酪農学園大学の技術開発により、我が国で初めてプリオン遺伝子（プリオン）をホモにノックアウト（KO）した黒毛和種が生産された。具体的にはプリオンホモノックアウト細胞（#H2-14CreN）をドナーとして、未受精卵に核移植を行い、体細胞由来クローン胚を作出した。5頭のメス牛（レシーピエント牛）にプリオンKO初期胚を2胚ずつ移植した。その結果4頭が妊娠し（うち2頭は双子を妊娠）、その結果、6頭のプリオンKO雌黒毛和種を作出することができた。出生した6頭のうち、1頭は誕生直後に死亡した。また1頭は分娩時の事故による死産となったため、最終的に4頭が正常（健康体）に誕生した。4頭のうち2頭は生後3か月で安楽殺し、全身の臓器を採取した。解剖時に腰部の構造に脆弱性が認められた。また、残りの1頭も腰部・後肢に脆弱性を示し、飼育柵に挟まれる事故のため切迫と殺した。最後の1頭は東大牧場で飼育したが、慢性肝機能障害で栄養状態が悪く、ヘルニアを起こしたため開腹手術を実施した。開腹時に腹腔内に大きな膿瘍が認められた。生誕時の臍帯の化膿が原因と考えられた。衰弱が激しく手術中に心停止した。本研究では、プリオン遺伝子KO牛の性状の確認、および、プリオン遺伝子を欠失させることが、加齢に伴い牛にどのような影響を与えるかを明らかにする。

### 2 平成20年度の主な研究成果

#### (1) 研究項目ごとの研究成果の概要

##### 1) 分担課題：「プリオン遺伝子ホモKO牛の特性の解析」

（分担研究者：東大；吉川泰弘、小野憲一郎、眞鍋昇、  
協力研究者：濱崎裕子、小野山一郎）

本研究では、プリオン遺伝子KO牛の性状の確認、およびプリオン遺伝子を欠失させることが、加齢に伴い牛にどのような影響を与えるかを検討することを目的としている。

平成20年度は、3ヶ月齢雌2頭、5ヶ月齢雌1頭、および1歳齢雌1頭、計4頭のプリオン遺伝子KO牛から得られた脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管などの各臓器を用いて、プリオン遺伝子KO牛の臨床病理学的解析、および、プリオン遺伝子の発現解析を行った。プリオン遺伝子KO牛の全身状態を確認するため、サンプリングにより得られた各臓器を、パラホルムアルデヒド溶液で固定後、パラフィンブロックを作成した。1歳齢のプリオン遺伝子KO牛以外の3頭のサンプルについては、脳など代表的な組織に関して、薄切後、HE染色を行ったが、現在のところ、特に異常と思われる所見は得られていない。

一方で、凍結保存された各サンプルを用いて、RT-PCRを行い、プリオン遺伝子のmRNAの発現を確認した。まず、対照として2ヶ月齢ホルスタイン雄のサンプルを用いたRT-PCRによりcDNAを合成した。得られたcDNAのうち、大脳、および肝臓のcDNAを用いてPCRの各条件を検討、決定した。この条件下で、各臓器由来サンプルを用いて行ったPCRにより、ホルスタイン牛では多くの臓器でプリオン遺伝子のmRNAの発現があり、その発現量は、臓器により差異があることが確認された。

次に、プリオン遺伝子KO牛を用いて同様の検討を行った。このプリオン遺伝子KO牛は、最終的には、プリオン遺伝子のうち、エクソン3の一部（ORFの大部分を含む2914bp）が欠損し、その代わりに、loxPを含む外来遺伝子をプリオン遺伝子ORF領域に含む。プリオン遺伝子KO牛のどの臓器からも、プリオン遺伝子の欠失プリオンタンパク部分のmRNAは、検出されず、きちんとノックアウトされていることが確認された。さらに、プリオン遺伝子KO牛のみに発現している外来遺伝子部分を用いて、プリオン遺伝子KO牛の各臓器におけるプリオン遺伝子の転写状況を確認するため、外来遺伝子に置換された領域を含むようなプ

プリオン遺伝子のORF部分を含む領域を増幅させるPCRを試みたところ、多くの臓器において、この領域のmRNAの発現が確認された。

プリオン遺伝子KO牛のサンプルを用いて、それぞれの解析を進めており、プリオン遺伝子KO牛におけるプリオン遺伝子の発現、およびプリオン遺伝子の転写状況の経時的なmRNAの発現の変化について検討できる。今後は、パラフィン切片を用いて、病理組織学的にプリオン遺伝子KO牛を評価すること、プリオン遺伝子(mRNA)の臓器による発現パターン、量的または経時的な変化に関して検討していく予定であり、エピジェネティックな解析も試みたいと考えている。さらに、プロテオーム解析により、プリオンタンパクが発現されないことにより、細胞内の発現タンパクのプロファイルがどのように変化しているのかを解析していく。

## 2) 分担課題：「プリオン遺伝子KO牛、対照クローン牛の作成と改良法の検討」

(分担研究者：全農飼料畜産中央研究所 千代豊)

プリオン遺伝子KO牛の作出：プリオン遺伝子(プリオン)KO牛の作出は培養体細胞を用いた遺伝子ノックアウト操作と得られたノックアウト体細胞を使用した核移植クローン操作により実施した。牛プリオン遺伝子は3つのエクソンより構成されており、プリオンタンパクをコードする領域はエクソン3に位置している。今回、プリオン遺伝子をノックアウトするために使用したノックアウトベクターは、プリオンタンパクをコードする領域を除去するようにデザインし構築した。また、ノックアウトベクターは、選択マーカ遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子)を挟むかたちにloxP配列が位置しており、Cre組換え酵素処理(Cre発現アデノウイルス)することにより選択マーカ遺伝子を除去できる構造となっている。

このようなベクターを使用することにより、1種類(本来は2種類必要)のノックアウトベクターを使用してホモノックアウト体細胞株を比較的短期間で樹立することが可能となる。牛胎子由来細胞(線維芽細胞)を出発材料として2回のノックアウト操作によりホモノックアウト細胞株が得られた。さらに、このホモノックアウト細胞をドナーとした核移植クローン操作によりプリオン遺伝子ホモKO牛を作出した。ノックアウト操作の開始からホモKO牛の誕生まで、おおよそ14ヶ月を要したが、この作出法は通常の繁殖法(性成熟後のヘテロKO牛のかけ合わせ)と比べると非常に短期間に作出できる方法と考えられる。

樹立されたプリオンホモノックアウト細胞(#H2-14Cre)及び当該細胞をドナーとして作出したクローン胎子由来の細胞(#H2-14CreN)におけるゲノム上のプリオン遺伝子の存在様式をRT-PCR法により解析した。樹立されたプリオンホモノックアウト細胞(#H2-14Cre および #H2-14CreN)はプリオンタンパクをコードする遺伝子領域を完全に欠失しており、プリオンタンパク領域の遺伝子を発現していないことが確認できた。

プリオンホモノックアウト細胞(#H2-14CreN)をドナーとして作出したプリオン遺伝子ホモKO牛の作出成績では、5頭の受胎牛にプリオンKO胚を2胚ずつ移植し、4頭が妊娠を継続し(うち2頭は双子妊娠)、6頭のプリオン遺伝子ホモKO牛を作出することができた。6頭中、1頭は生後直死、1頭は分娩事故による死産となり、最終的に4頭が正常(健康体)に誕生した。正常に誕生した4頭のプリオン遺伝子ホモKO牛のゲノム遺伝子のPCR解析の結果では、4頭全てにおいてプリオンタンパクをコードする領域が欠失していることが確認できた。また、死亡した2頭においても同様の解析結果が得られた。

## 3) 分担課題：「プリオン遺伝子KO牛の生化学的解析」

(分担研究者：酪農学園大学横田博、

協力研究者：松田一哉、宮庄拓、野村幸子、奥村佳奈子)

プリオンタンパクは細胞の酸化ストレスを防御するSuper oxide Dismutase (SOD) 活性

を担っているという報告が有るので、プリオン遺伝子をKOすると、細胞の自然死であるアポトーシスが誘発される可能性が考えられる。プリオン遺伝子をノックアウトした牛の神経は酸化ストレスを受け易く、増殖／成長過程で重要な障害を受ける可能性を示している。平成20年度は生後数ヶ月のKO牛の神経（延髄）細胞中の酸化ストレスに関連している下記酵素活性をKOしていない牛のそれと比較した。さらに、同組織内の酸化状態をカルボニル化タンパクを検出することで比較した。

プリオンKO新生子牛神経組織のSOD、Caspase 3/7、PDI活性を測定した結果、どの酵素活性もクローン牛のそれと大きな差はなかった。プリオンの本来の機能として予測される抗酸化作用について明らかにするために、今後、成長過程を追ってこれらの酵素活性をモニターしてゆくことが求められる。また、プリオンタンパクが抗酸化作用を有しているとすると、プリオンKO新生子牛神経組織は酸化ストレスを受け易いことが予測される。タンパクの酸化ストレスの代表的指標であるカルボニル化状態をクローン牛のそれと比較したところ、プリオンKO新生子牛脳では数種のタンパクのカルボニル化が観察された。この結果は、抗酸化作用を有するプリオンを欠失したことにより、これらのタンパクの酸化が防御できなかったと推察される。よって、プリオンKO新生子牛の神経細胞ではいろんなタンパクが酸化ストレスを受けやすく成長後様々な障害が出現する可能性が考えられる。

## (2) 全体の研究成果

第1回目のプリオン遺伝子ホモKO牛はいずれも次世代の配偶子を取るまで生存することはできなかった。いずれの個体も腰部に脆弱性を示している。対照のクローン胚由来の雌黒毛和種は腰部にやや脆弱性がうかがわれるが、約4歳齢で生存している。以上のことから、①ドナーに用いた個体の細胞に腰部の脆弱性を持つ形質がある可能性、②ホモノックアウト時に細胞のゲノムに問題が起こった可能性、③プリオン遺伝子のホモノックアウトが悪影響を示した可能性が考えられる。平成20年1月に、新たにプリオン遺伝子ホモKO牛作成のための胚移植を開始した。今回はプリオン遺伝子ホモKO牛と同時に対照クローン牛の生産も計画している。

1) 正常に誕生した4頭のプリオン遺伝子KO牛のゲノムのPCR解析では4頭全てにおいてプリオンタンパクをコードする遺伝子領域が欠失していることが確認できた。また、死亡した2頭においても同様の解析結果が得られた。

2) 3ヶ月齢雌2頭、5ヶ月齢雌1頭、および1歳齢雌1頭、計4頭のプリオン遺伝子KO牛から得られた、脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管などの各臓器を用いて、プリオン遺伝子の発現解析を行った。プリオン遺伝子KO牛のどの臓器からも、プリオン遺伝子の欠失プリオンタンパク部分のmRNAは、検出されず、mRNAレベルでも、きちんとノックアウトされていることが確認された。他方、プリオン遺伝子KO牛のみに発現している外来遺伝子部分を用いて、プリオン遺伝子KO牛の各臓器におけるプリオン遺伝子の転写状況を確認するため、外来遺伝子に置換された領域を含むようなプリオン遺伝子のORF部分を含む領域を増幅させるPCRを試みたところ、多くの臓器において、この領域のmRNAの発現が確認された。このことは、プリオンタンパクの発現の有無が、プリオン遺伝子のmRNAの読み取りに影響していない可能性を示している。

3) プリオン遺伝子KO牛の全身状態を確認するため、サンプリングにより得られた各臓器を、パラホルムアルデヒド溶液で固定後、パラフィンブロックを作成した。1歳齢のプリオン遺伝子KO牛以外の3頭のサンプルについては、脳など代表的な組織に関して、薄切後、HE染色

を行ったが、現在のところ、特に異常と思われる所見は得られていない。

4) プリオン遺伝子KO新生仔牛神経組織のSOD、Caspase-3、Caspase-7、PDI活性を測定した結果、どの酵素活性も対照としたクローン牛のそれと大きな差はなかった。しかし、タンパクの酸化ストレスの代表的指標であるカルボニル化状態をクローン牛のそれと比較したところ、プリオン遺伝子KO新生仔牛脳では数種のタンパクのカルボニル化が観察された。この結果は、抗酸化作用を有するプリオンを欠失したことにより、これらのタンパクの酸化が防御できなかった可能性が考えられる。

これらに関する解析結果は以下のとおりである。

1) 正常に誕生した4頭のプリオン遺伝子ホモKO牛のゲノムのPCR解析では4頭全てにおいてプリオンタンパクをコードする遺伝子領域が欠失していることが確認できた。また、死亡した2頭においても同様の解析結果が得られた。

2) 3ヶ月齢雌2頭、5ヶ月齢雌1頭、および1歳齢雌1頭、計4頭のプリオン遺伝子ホモKO牛から得られた、脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管などの各臓器を用いて、プリオン遺伝子の発現解析を行った。プリオン遺伝子KO牛のどの臓器からも、プリオン遺伝子の欠失プリオンタンパク部分のmRNAは、検出されず、mRNAレベルでも、きちんとノックアウトされていることが確認された。他方、プリオン遺伝子KO牛のみに発現している外来遺伝子部分を用いて、プリオン遺伝子KO牛の各臓器におけるプリオン遺伝子の転写状況を確認するため、外来遺伝子に置換された領域を含むようなプリオン遺伝子のORF部分を含む領域を増幅させるPCRを試みたところ、多くの臓器において、この領域のmRNAの発現が確認された。このことは、プリオンタンパクの発現の有無が、プリオン遺伝子のmRNAの読み取りに影響していない可能性を示している。

3) プリオン遺伝子KO牛の全身状態を確認するため、サンプリングにより得られた各臓器を、パラホルムアルデヒド溶液で固定後、パラフィンブロックを作成した。1歳齢のプリオン遺伝子KO牛以外の3頭のサンプルについては、脳など代表的な組織に関して、薄切後、HE染色を行ったが、現在のところ、特に異常と思われる所見は得られていない。

4) プリオンKO新生仔牛神経組織のSOD、Caspase 3/7、PDI活性を測定した結果、どの酵素活性も対照としたクローン牛のそれと大きな差はなかった。しかし、タンパクの酸化ストレスの代表的指標であるカルボニル化状態をクローン牛のそれと比較したところ、プリオンKO新生仔牛脳では数種のタンパクのカルボニル化が観察された。この結果は、抗酸化作用を有するプリオンを欠失したことにより、これらのタンパクの酸化が防御できなかった可能性が考えられる。

### Ⅲ 平成21年度研究成果報告

#### 1 平成21年度の研究目標

全国農業組合連合会などの技術開発により、我が国で初めてプリオン遺伝子（プリオン）をホモにノックアウト（KO）した黒毛和種が生産された。具体的にはプリオンホモノックアウト細胞（#H2-14CreN）をドナーとして、未受精卵に核移植を行い、体細胞由来クローン胚を作成した。5頭のメス牛（レシーピエント牛）にプリオン遺伝子KO初期胚を2胚ずつ移植した。その結果4頭が妊娠し（うち2頭は双子を妊娠）、その結果、6頭のプリオン遺伝子KO雌黒毛和種を作成することができた。出生した6頭のうち、1頭は誕生直後に死亡した。また1頭は分娩時の事故による死産となったため、最終的に4頭が正常（健康体）に誕生した。4頭のうち2頭は生後3か月で安楽殺し、全身の臓器を採取した。解剖時に腰部の構造に脆弱性が認められた。また、残りの1頭も腰部・後肢に脆弱性を示し、飼育柵に挟まれる事故のため切迫と殺した。最後の1頭は東大牧場で飼育したが、慢性肝機能障害で栄養状態が悪く、ヘルニアを起こしたため開腹手術を実施した。開腹時に腹腔内に大きな膿瘍が認められた。生誕時の臍帯の化膿が原因と考えられた。衰弱が激しく手術中に心停止した。第1回目のプリオン遺伝子KO牛はいずれも次世代の配偶子を取るまで生存することはできなかった。いずれの個体も腰部に脆弱性を示している。対照のクローン胚由来の雌黒毛和種は腰部にやや脆弱性がうかがわれるが、約4歳齢で生存している。以上のことから、①ドナーに用いた個体の細胞に腰部の脆弱性を持つ形質がある可能性、②ホモノックアウト時に細胞のゲノムに問題が起こった可能性、③プリオン遺伝子のホモノックアウトが悪影響を示した可能性が考えられる。平成21年1月に、新たにプリオン遺伝子KO牛作成のための胚移植を開始した。平成21年度はプリオン遺伝子KO牛と同時に対照クローン牛の生産し、特性の精査を進める。また上記6頭に関する解析も遂行する。

#### 2 平成21年度の主な研究成果

##### (1) 研究項目ごとの研究成果の概要

##### 1) 分担課題：「プリオン遺伝子ホモKO牛の特性の解析」

（分担研究者：東京大学 吉川泰弘、小野憲一郎、眞鍋昇、

協力研究者：濱崎裕子、小野山一郎）

##### ① 研究目的

プリオン遺伝子ホモKO牛の発育に伴う臨床性状の確認およびプリオン遺伝子を欠失させることが加齢に伴ってどのような影響を与えるのか検討することを目的としている。

##### ② 研究方法

平成20年度の1回目のプリオン遺伝子ホモKO牛は、北海道士幌町にある全農ETセンターで誕生後6ヶ月間飼育され、その後茨城県にある東大牧場に移動されたために、この後から12ヶ月齢にて採材のために安楽殺されるまで経時的に臨床性状を調べた。このため、免疫系および消化器系が脆弱である兆候を示すプリオン遺伝子ホモKO牛の特性を理解するために重要な出生直後（誕生直後から1週間の初乳哺乳期は特に免疫系の確立に重要な時期である）、その後の哺乳時期（1週齢から50週齢まで）、徐々に反芻胃が発育して粗飼料を摂食し始める50週齢以降から性成熟（黒毛和種の初回発情は早くても12ヶ月齢）に達するまでの一連の推移を詳細に検討できなかった。平成21年度は2回目のプリオン遺伝子ホモKO牛を生産した。すなわち、平成21年2月に胚移植した妊娠中の母牛を妊娠安定期に北海道の全農ETセンターから東大牧場に移送して飼育して、プリオン遺伝子ホモKO牛およびその対照牛（胎仔線維芽細胞の核を用いた体細胞核クローン牛）の出産、誕生直後か

らの臨床生化学的な情報臨床性状を詳細にフォローしている。この牛が性成熟に達した後は、雌性配偶子の解析、体外授精、初期胚の体外成熟培養、レシーピエント牛子宮への胚移植を試み、次世代（F1）個体におけるプリオン遺伝子ノックアウトの影響を的確に評価する基盤を確立しようとしている。具体的には、平成21年度に生まれたプリオン遺伝子ホモKO牛と対照牛の体尺測定、体温測定、心拍数測定などを行って臨床所見を随時記録するとともに、定期的に採血して臨床血液学・生化学検査を行って、健全性のモニタリングを行った。併行して、平成20年度得られたプリオン遺伝子ホモKO牛（出産直後1頭、3ヶ月齢2頭、5ヶ月齢1頭、12ヶ月齢1頭）のサンプルを用いた基盤情報の集積を昨年度に引き続いて行った。平成20年度に生まれたプリオン遺伝子ホモKO牛の諸臓器（脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管など）におけるプリオン遺伝子およびノックアウト操作に用いたベクターに依然1つ含まれている loxP 配列を含むプラスミド由来の外来遺伝子（328残基）などの発現解析を行うとともに、エピジェネティック変動の解析およびプロテオーム解析を行った。加えて、諸臓器を定法に従って組織切片として一般染色、免疫染色、*in situ* hybridizationなどを施して病理組織学的異常の有無を検索した。



### ③ 研究成果

対照胚とホモプリオンKO胚を各々2頭のレシーピエント牛に2胚ずつ移植し、着床した。対照胚移植レシーピエント牛のうちの1頭は妊娠212日で流産したが、残りは11月に双子を出産した。ホモプリオンKO胚移植レシーピエント牛は2頭とも分娩期まで妊娠を維持できたが、片方は分娩時に死産となり、残り1頭は分娩予定日を越えても明確な分娩兆候が確認出来なかったため帝王切開して1頭のプリオン遺伝子ホモKO牛を得た（右図：誕生直後）。これら仔牛の成長にとまなう臨床特性の推移を調べている。第1回目と同様に2回目のプリオン遺伝子ホモKO牛も下半身、特に腰部と大腿部の発育が悪い。哺乳初期から気管支炎などを発症し易く、しばしば下痢気味であるため成長が悪い。このように形態形成異常と免疫系および消化器系の脆弱兆候が認められる。ただし対照牛でも腰部の脆弱性がうかがわれるので、両者を比較してこれらの異常が何に起因するものなのか精査している。昨年度誕生した第1回目のプリオン遺伝子ホモKO牛の諸臓器の病理組織学的検索の結果、特記すべき異常所見は得られていない。また、平成21年度死産となってしまった個体の病理組織学的検索の結果も同様であり、死産の原因は体細胞クローン胎仔特有の過剰発育に起因する可能性が高い。プリオンKO操作に起因するエピジェネティックな変化の有無を検討するため、第1回目のプリオン遺伝子ホモKO牛の各臓器よりゲノムDNAを抽出し、それにおける遺伝子のメチル化状況について検索した。プリオン遺伝子のメチル化を確認するため、データベースより得られたゲノムシーケンス（AJ298878\_1）を用いてCpG islandであると予測される部位を推測した（条件： $300 \text{ bp} < \text{length of island} < 2,000 \text{ bp}$ ,  $\text{C+Gs}/\text{total bases} > 50\%$ ,  $\text{CpG observed}/\text{CpG expected} > 0.6$ ）。その結果、48887 - 50730 の1,844 bp中にCpG islandが存在することが推定できた（下図）。

推測されるCpGサイト



そこで、この部位に対して実際のゲノムのメチル化の状況を確認するため、バイサルファイト・シーケンス法を用いてメチル化部位を特定することを試みた。ゲノム配列からプライマーとなりうる範囲を検索、およそ 49,300 - 50,240 の範囲で、シーケンスを行った。バイサルファイト処理によってメチル化されていないCはTに変換されるため、全体としてAT/GC比が極端に大きくなり、PCRやDNAシーケンスを行うことが極端に困難となるため、実際には300~500 bpの小さな領域ずつのシーケンスを行っている。現在までにプリオン遺伝子ホモKO牛のゲノム上に<sup>m</sup>Cの存在は確認できていない。また、プリオン遺伝子以外のエピジェネティックな変化の解析として、網羅的にメチル化を解析するために抽出したゲノムをメチル化感受性酵素 HpaII で処理した後、末端にアダプターを付加し、この末端アダプターを利用してPCRによりゲノムの増幅を行っている。このようにして得られたゲノム増幅産物を用いて、加齢に伴うメチル化の推移を検討している。

併行して、諸臓器におけるタンパクプロファイルの変化を主に2次元電気泳動法にて検索した。これまでにプリオン遺伝子ホモKO牛（3ヶ月齢）と健常牛の諸臓器からタンパクを抽出して2次元電気泳動を行ったところ、脾臓、脊髄などでは両者間でタンパクプロファイルが類似していたが、大脳、扁桃では、プリオン遺伝子ホモKO牛に特有のスポットが認められた（下図）。プリオン遺伝子のノックアウトにより、タンパクのプロファイルが変化する可能性が示唆された。より詳細なプロテオーム解析を行うことにより、プリオン遺伝子ホモKO牛のタンパク発現レベルでの生化学的特性の把握が可能になると考えられる。

大脳タンパクの2次元電気泳動像

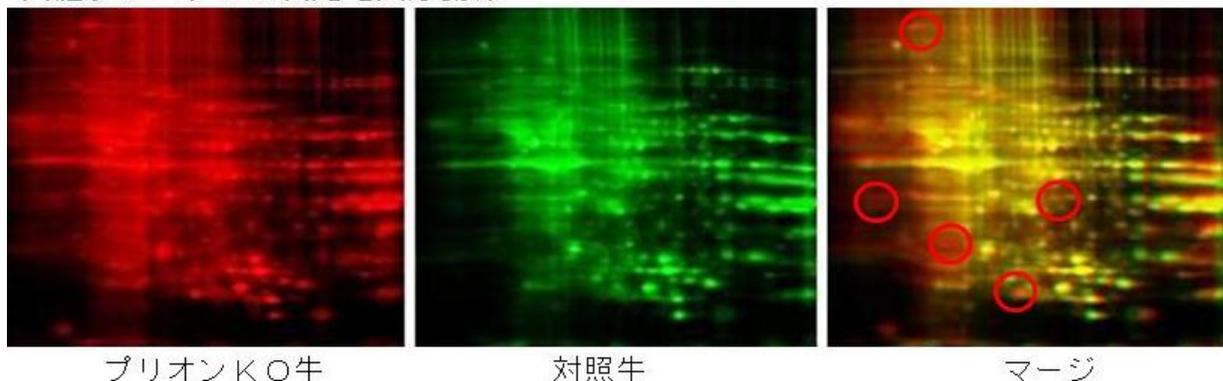


図. 2次元電気泳動法にて大脳のタンパクプロファイルの変化を検索した例。3か月齢のプリオン遺伝子ホモKO牛（3ヶ月齢）と健常牛の大脳からタンパク調製し、2次元電気泳動を行ったところプリオン遺伝子ホモKO牛に特有のスポットが認められた（マージ像の赤丸）。プリオン遺伝子をノックアウトすることにより、タンパクプロファイルが変化する。

## 2) 「プリオン遺伝子KO牛、対照クローン牛の作成と改良法の検討」

（分担研究者：全農飼料畜産中央研究所 千代豊、

協力研究者：浦川真実、出田篤司）

### ① 研究目的

プリオン遺伝子ホモKO牛および対照群として同一の胎仔由来線維芽細胞の体細胞核を用いて作製した胚由来クローン牛を作成するとともに、現在の欠損部位に残っているプラスミド由来の外來性の塩基配列を除去する方法の検討を進める。

### ② 研究方法

プリオン遺伝子ホモKO牛は、培養体細胞を用いた遺伝子ノックアウト操作と得られたノ

ックアウト体細胞の核を使用した核移植クローン操作により作出した。牛プリオン遺伝子は3つのエクソンより構成されており、プリオンタンパクをコードする領域はエクソン3に位置している。このプリオンタンパクをコードする領域を除去するようにデザインし構築したノックアウトベクターは、選択マーカー遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子)を挟むかたちにloxP配列が位置しており、Cre組換え酵素処理(Cre発現アデノウイルス)することにより選択マーカー遺伝子を除去できる構造となっている。本来は2種類必要なのだが、このノックアウトベクターを使用することによって1種類のベクターでホモノックアウト体細胞株(プリオンタンパクをコードする遺伝子領域を完全に欠失)を比較的短期間で樹立することが可能となった。牛胎仔由来の線維芽細胞を出発材料として2回のノックアウト操作によりホモノックアウト細胞株(#H2-14CreN株)を得た。このプリオンKO細胞とこれの樹立に使用した胎仔由来線維芽細胞(#906株)をドナーとして体細胞核移植クローン操作を実施した。各々を2頭ずつのレシーピエント牛2胚ずつに胚移植し、プリオン遺伝子ホモKO牛および対照牛を作出した。前回は体細胞核移植の効率がよくなかったため、これを高めるために研究協力者の浦川らが開発した方法(Urakawa et al. Theriogenology 62, 714-728, 2004)を改善して初期G1期に細胞周期コントロールしたドナー細胞を使用して大幅に向上した。このようにして作成した受胚牛を妊娠9ヶ月の時点で全農ETセンターから東大牧場に移動して分娩・出産を行った。

### ③ 研究の成果

平成20年度に作出した第1回目のプリオン遺伝子ホモKO牛は全て生化学および病理学的検索のために安楽殺して採材したため、今年度再びプリオン遺伝子ホモKO牛の作出を試みた。第2回目では、プリオンKO樹立に使用したオリジナル細胞(胎仔由来線維芽細胞#906株)をドナーとした核移植クローン牛(対照牛)の作出も併せ行った。核移植の結果、#906株を用いた核移植において23個の核移植胚中の11個(47.8%)の胚が移植可能胚(胚盤胞)へと発生した。#H2-14CreN株を用いた核移植においては、23個の核移植胚中、12個(52.2%)の胚が移植可能胚へと発生し、両者間で差異はなかった。この高い胚発生率は、体細胞核移植に用いる核を提供するドナー細胞の細胞周期を初期G1期に同期できるコントロール法の確立が大きく寄与していると考えられた。子宮に移植可能な胚を用いた作出の結果は、対照牛作出において2頭のレシーピエント牛にそれぞれ2個の移植可能胚を移植し、1頭の受胚牛は妊娠212日目で流産したが、残りの1頭は妊娠を継続して2頭(双子)の対照牛を出産に至ることができた。プリオン遺伝子ホモKO牛作出においては、2頭のレシーピエント牛にそれぞれ2個の移植可能胚を移植し、2頭(双子および単子)とも分娩期まで妊娠を継続できた。しかし、プリオンKO2胎仔(双子)を妊娠した受胚牛は分娩において、難産となり2胎仔とも死産となり、プリオンKO単子妊娠牛は分娩予日を越えても明確な分娩兆候が確認出来なかったため緊急に帝王切開して仔牛を摘出した。このように、最終的に1頭のプリオン遺伝子ホモKO牛と2頭の対照牛が作出できた。今回作出したプリオン遺伝子ホモKO牛では、loxP/Cre組換え反応によりKOベクター中の薬剤耐性遺伝子領域は完全に除去されているが、依然外来遺伝子(loxP配列を含むプラスミド由来の328bp残基)が1つ含まれている。これを除去しなくてはならないので、この外来遺伝子除去法の開発を進めた。文献情報等を調査して外来遺伝子の除去に有効と考えられるベクターを設計し、数種類のベクターを構築して有効性を検討したが、不十分なものであった。来年度は、さらにベクターの構築を進めて有効性の確認に取り組む。

### 3) 「プリオン遺伝子KO牛の生化学的解析」

(分担研究者：酪農学園大学 横田博、

協力研究者：松田一哉、宮庄拓、野村幸子、奥村佳奈子)

#### ① 研究目的

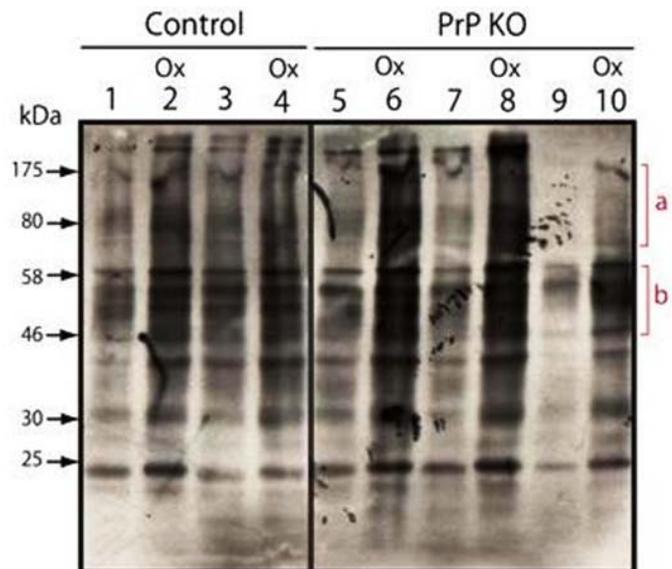
プリオンは、細胞の酸化ストレスを防御する super oxide dismutase (SOD) 活性を担っており、プリオンをノックアウトしたマウスでは細胞の自然死であるアポトーシスが誘発されるという報告があるが、牛における役割は不明である。マウスと同様であれば、プリオン遺伝子ホモKO牛の神経細胞は酸化ストレスを受け易く、増殖・成長過程で重要な障害を受ける可能性がある。これを確認するために、平成20年第1回目のプリオン遺伝子ホモKO牛の神経(延髄)細胞中の酸化ストレスに関連している一群の酵素(SOD、Caspase-3、Caspase-7、protein disulfide isomerase: PDI)の活性をノックアウトしていない牛のそれと比較した。さらに神経組織内の酸化状態をカルボニル化タンパクを検出することで比較した。その結果、これら酸化ストレス関連酵素の活性は、両者間で有意な差異が認められなかったが、プリオン遺伝子ホモKO牛の神経組織では数種のタンパクのカルボニル化が観察された。この結果から、抗酸化作用を有するプリオンタンパクを欠失したことにより、神経タンパクの酸化が促進されたことが推察された。平成21年度は、プリオンタンパク欠失による神経組織におけるタンパクの酸化促進を明らかにする目的で、*in vitro*でのタンパク酸化反応系を確立し、プリオンタンパク欠失牛神経のタンパクが酸化受けやすいか否かを確認し、併せて脂質の易酸化性も検討した。

#### ② 研究方法

細胞のタンパクの酸化は様々な障害や疾病へと発展する引き金の役目を担っており、中でもタンパクのカルボニル化は不可逆的な反応で、アルギニンの分解を誘導するのでタンパクの機能障害を示唆する重要な指標である。プリオン遺伝子ホモKO牛や対照牛の神経組織ホモゲネートを調製し、*in vitro*系での酸化反応系によって標本中のタンパクのカルボニル化を測定した。併行して、牛の神経組織ホモゲネートに活性酸素を発生させる目的で FeCl<sub>2</sub> を添加し、これに含まれる脂質の過酸化によって生じる malondialdehyde などの thiobarbituric acid 反応性物質を測定することで、脂質の過酸化の程度を評価した。

#### ③ 研究成果

牛の神経組織におけるタンパクの酸化(カルボニル化)および脂質の過酸化を *in vitro* 系で測定できる測定系を確立できた。まず最初にプリオン遺伝子ホモKO牛と対照牛の神経組織におけるタンパクカルボニル化を測定したところ、プリオン遺伝子ホモKO牛の神経組織では対照牛のそれより多くカルボニル化されていることが分かった

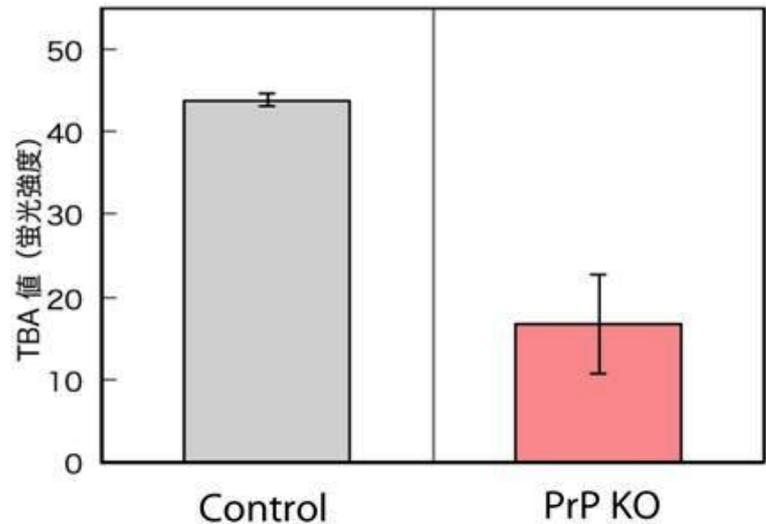


プリオン遺伝子ホモKO新生仔牛(PrPKO)の神経組織タンパクの酸化ストレスの代表的指標であるカルボニル化状態(Ox)を体細胞核クローン牛(Control)と比較したところ、PrPKO脳では数種のタンパクのカルボニル化が観察された(a and b)。

(右図)。このことは、平成20年度のプリオン遺伝子ホモKO牛の神経細胞では対照牛のそれより酸化されやすいという成果を分子機構レベルで裏づけるものであった。平成21年度開発した評価系を用いてカルボニル化神経タンパクの同定を行うことでプリオン遺伝子ホモKO牛の神経細胞がどのような機能を失いやすいか明らかにできるので、加齢に伴う変化を詳細に検討する。このことによってプリオン遺伝子ホモKO牛が成熟した後の神経疾患の予測をすることが可能となり、その疾患の防御策を講じることに役立つ。

併行して、プリオン遺伝子ホモKO牛と対照牛の延髄組織の脂質の過酸化を *in vitro* 測定系で比較した結果、脂質の酸化が抑制されていることが分かった。プリオンタンパクは神経系組織において脂質の酸化を亢進させる方向で影響をおよぼしていることが示唆された(下図)。この評価系を用いて過酸化した脂質が結合するタンパクの同定を進め、プリオンタンパクが脂質の酸化に関与して

いるか見極めることで、プリオンタンパクの神経細胞内での本来的役割の考察を進める。以上の結果より、健常な牛の神経組織においては、プリオンタンパクはタンパクが酸化されにくくしていることが濃厚となった。プリオンの遺伝子を欠失した牛の神経細胞では、タンパクが酸化され、その機能が傷害されやすくなって神経疾患に陥りやすくな



っていると考察された。しかしながら、プリオン遺伝子欠失牛の脂質は過酸化が抑制されており、プリオンタンパクが細胞膜上に位置している脂質の酸化に関与している可能性が高いことが示唆された。ただし、この結果は thiobarbituric acid 反応性物質 (TBA) の量を脂質過酸化物の量として測定した結果のみであり、プリオンタンパクが健常な牛の神経組織の脂質を酸化促進しているか否かを確認するためには脂質過酸化物によるタンパクの変性の確認等の複数の裏付けデータを得なくてはならないので、この点に注力して精査を進めている。

## (2) 全体の研究成果

平成19年11月に全国農業組合連合会の中央研究所と胚移植 (ET) センターの技術開発により、我が国で初めて bovine spongiform encephalopathy (BSE) の病因であるプリオンの遺伝子 (プリオン) をホモにノックアウト (KO) した黒毛和種の雌牛が生産された。米国では約2年先行してプリオンKOホルスタイン種雄牛が生産されたが、雌牛での成功は世界に先駆けたものであった。マウスと異なり牛の胚性幹細胞 (ES) 細胞は確立しておらず、かつ性成熟までの期間が長いので、KO牛の作出には手間と時間のかかる複雑なプロセスが必要である。具体的には、最初に、牛の発生初期の胎仔の線維芽細胞を体外で培養し、これを用いてヘテロプリオンKO細胞を作出する。この核をあらかじめ核を抜いておいた (脱核) 卵母細胞に移植 (核移植) して初期胚とし、これを胚盤胞まで体外で成熟培養したものを仮母牛 (レシーピエント牛・受胚牛) の子宮に移植 (胚移植) し、着床させて胚発生を進める (1次体細胞クローン牛の作出)。このようにして作出した発生初期の胎仔から再び線維芽細胞を調製して体外で培養し、これを用いてホモプリオンKO細胞を作出する。このホモKO細胞の核を脱核した卵母細胞に核移植してホモプリオンKO初期胚を作出する。この胚をレシーピエント牛の子宮に胚移植して2次体細胞

クローン牛を作出する（2次体細胞クローン牛の作出）。昨年度は、2次体細胞クローン牛（プリオン遺伝子ホモKO牛）作出のために5頭のレシーピエント牛を用い、各々にホモプリオンKO初期胚を2胚ずつ移植した。その結果4頭（うち2頭は双子妊娠）で着床が認められ、これらは順調に妊娠が推移して出産に漕ぎ着け、6頭のプリオンKO雌牛を作出することができた。しかしながら、6頭のうちの1頭は誕生の直後に原因不明で死亡し、1頭は過大仔で分娩時事故によって死亡した（牛や豚などの家畜だけでなくマウスなどの実験動物でも、体細胞核クローン動物の胎仔は巨大仔となり、分娩時期に流産したり、出産時に死産となることが多い）。残りの4頭は正常（健康体）であった。プリオン遺伝子ノックアウトの影響を生化学および病理学的に精査するために、これらの全てを経時的に安楽殺して全身の臓器を採取した（2頭は生後3ヶ月齢で、1頭ずつを5ヶ月齢と12ヶ月齢）。これらを用いてその特性の精査を継続し、下記の成果を得た。

- 1) 正常に誕生したプリオン遺伝子ホモKO牛のゲノムのPCR解析では、全ての諸臓器（脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管など）においてプリオンタンパクをコードする遺伝子領域が欠失していること、プリオン遺伝子ホモKO牛では loxP/Cre 組換え反応によりノックアウトベクター中の薬剤耐性遺伝子領域は完全に除去されているがベクター由来の loxP 配列を含む外来遺伝子（328 bp）が存在することが確認できた。これを除去するために、外来遺伝子除去に有効と考えられるベクターを数種類設計して有効性を検討しているが、未だ十分なものを構築するにいたっていないので、平成22年度も継続して取り組む。
- 2) プリオン遺伝子ホモKO牛の諸臓器のいずれにおいてもプリオン mRNA が検出されず、mRNA レベルでもノックアウトされていたが、多くの臓器において外来遺伝子の発現が認められ、これの完全な除去が必要であると考えられた。
- 3) プリオン遺伝子ホモKO牛のいずれの諸臓器においても病理組織学的異常所見は認められず、細胞と組織の形態形成は正常であると考えられた。
- 4) プリオンKO操作に起因するエピジェネティックな変化の有無を検討するため、諸臓器よりゲノムDNAを抽出してプリオン遺伝子のメチル化を調べた。48887 - 50730 の 1,844 bp 中に CpG island が存在することが推定できたので、バイサルファイト・シークエンス法を用いてメチル化部位の特定を進めたが、プリオン遺伝子ホモKO牛のゲノム上にmCの存在は確認できていない。
- 5) プリオンKO操作によるタンパクプロファイルの変化を主に2次元電気泳動法にて検索し、脾臓、脊髄などでは対照と類似していたが、大脳、扁桃では、プリオン遺伝子ホモKO牛に特有のスポットが認められた。ノックアウト操作により、タンパクプロファイルが変化する可能性が示唆された。
- 6) 平成20年度にタンパクの酸化ストレスの代表的指標であるカルボニル化状態をプリオン遺伝子ホモKO牛と対照牛間で比較したところ、プリオン遺伝子ホモKO牛の脳では数種のタンパクがカルボニル化していることが分かったので、この現象の機構を理解するためにタンパクのカルボニル化を *in vitro* 系で測定できる測定系を確立した。これを用いてプリオン遺伝子ホモKO牛と対照牛の神経組織におけるタンパクカルボニル化を測定したところ、プリオン遺伝子ホモKO牛の神経組織でより多くカルボニル化されていることが分かった。牛の神経組織に

おいては、プリオンタンパクはタンパクが酸化されにくくしていることが濃厚となった。ところが、両者の神経組織の脂質の過酸化を *in vitro* 測定系で比較したところ、プリオン遺伝子ホモKO牛とでは脂質酸化が抑制されていたことから、プリオンタンパクは神経系組織において脂質の酸化を亢進させる方向で影響を及ぼしていると考えられた。

## IV 平成22年度研究成果報告

### 1 平成22年度の研究目標

わが国で独自に開発された牛胎仔由来リサイクル体細胞核移植法により、プリオン遺伝子をホモノックアウトしたクローン牛（プリオン遺伝子KO牛）が胚移植により誕生した。加齢に伴いプリオン遺伝子の欠損が牛にどのような影響を与えるかを分子生物学的、臨床的、病理学的に評価し、牛における正常プリオンタンパクの機能を解明すること、性成熟に達した時点で、この遺伝形質が配偶子に安定して継代されるか否かを受精卵で確認すること、およびプリオン遺伝子を欠損する有用性を細胞などプリオン遺伝子を欠損する有用性を食品の原料、動物用医薬品の利用面からヒトへの健康影響評価をすることが目的である。そのために、プリオン遺伝子ホモKO牛、対照クローン牛作成法の改良遺伝子を検討、作出された牛を用いて、mRNAや、プリオンタンパクの発現の有無を確認する。また、プリオン遺伝子KO牛の臨床データの取得、臨床病理学的解析、生殖細胞の解析により、プリオン遺伝子KO牛の特性を解析する。さらに、血液成分、性ホルモン/代謝酵素系、薬物代謝系、脳内酸化変性タンパク等の網羅的解析を行い、プリオンタンパク欠失による生体内代謝酵素系や抗酸化作用等への影響を解明する。

### 2 平成22年度の主な研究成果

#### (1) 研究項目ごとの研究成果の概要

##### 1) 「プリオン遺伝子ホモKO牛の特性の解析」

(分担研究者：東京大学 眞鍋昇、吉川泰弘、小野憲一郎、  
協力研究者：濱崎裕子、小野山一郎)

##### ① 研究目的

プリオン遺伝子KO牛の発育に伴う臨床性状の確認およびプリオン遺伝子を欠失させることが加齢に伴ってどのような影響を与えるのか検討することを目的としている。

##### ② 研究方法

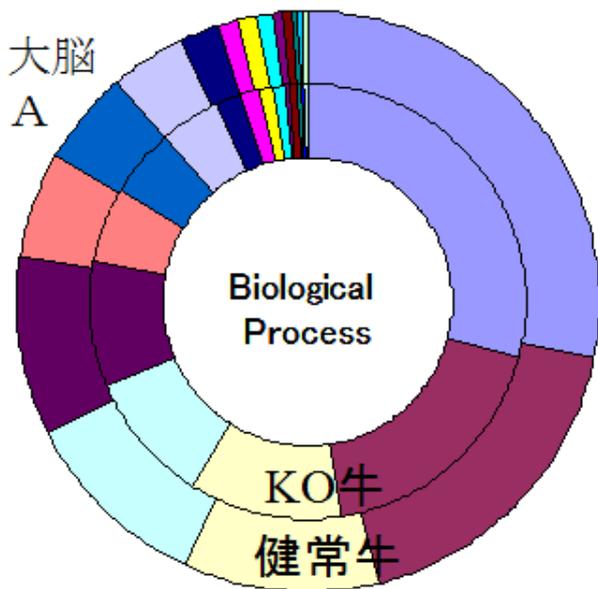
平成21年度までに得られたKO牛および対象健常牛2の脳、脊髄、扁桃などを用いて、それぞれの組織で発現しているタンパクをLC-MS/MSを利用したショットガン法により網羅的に解析した。

##### ③ 研究成果

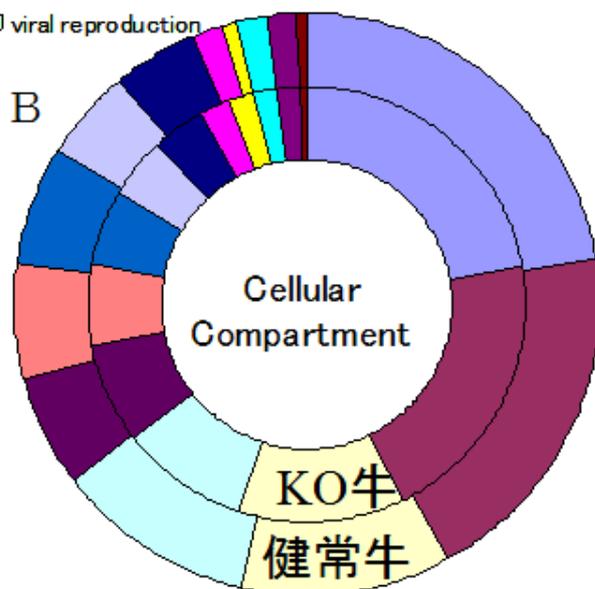
平成21年度、プロテオーム解析により変化の見られた脳、扁桃、および脊髄のプロテオーム解析を行った。LC-MS/MSから得られた、MSおよびMS/MSの値より、データベースとしてMascot (Matrix Science) を用い、タンパクの同定を行った。なお、Minimam Protein 99%, Min Peptide 95%、3個以上をタンパクの同定条件とした。また、全体における発現量を検討するために、解析には、スペクトラムのカウント数を基とする、Scaffold 3 (Proteome Software) の Quantitative Value を用いた。その結果、全体として、872タンパクが同定された。各組織における詳細な結果は以下のとおりである。

脳：脳においては、健常牛526タンパク、KO牛695タンパクがそれぞれ同定され、そのうち504タンパクは共通であった。同定されたタンパクのうち297タンパクでは、Gene Ontology (GO) が報告されている。biological processとしてはcellular process、metabolic process、biological regulation の順に多く検出された。cellular compartmentに関しては、cytoplasm、intracellular organelle、organelle part の順に多く、molecular

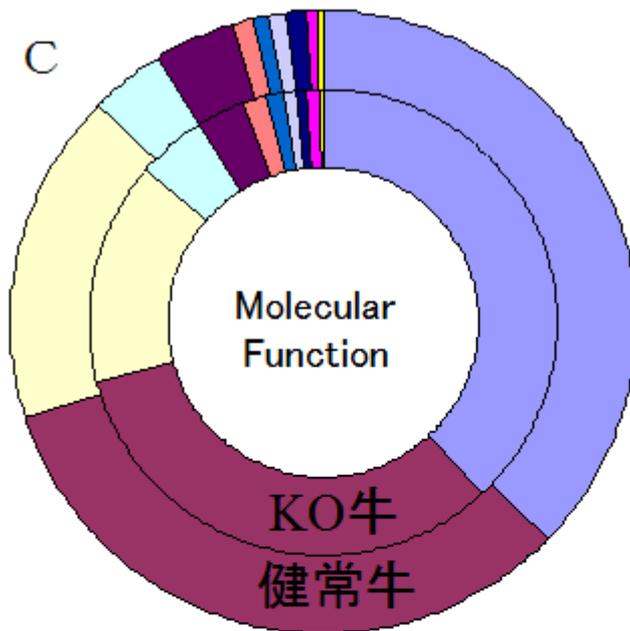
functionに関しては、molecular function, binding, catalytic activityの順に多く検出された（次頁からの図A、BおよびC参照）。



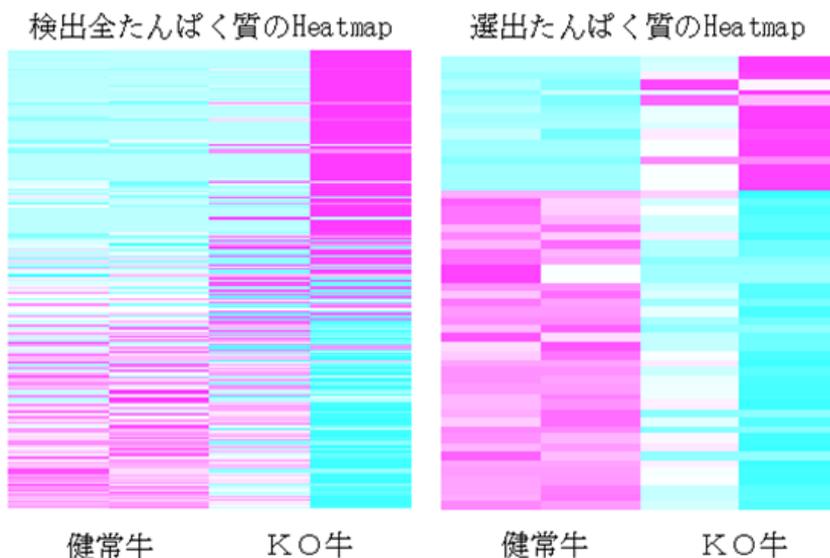
- |                                 |                                    |
|---------------------------------|------------------------------------|
| ■ cellular process              | ■ metabolic process                |
| ■ biological regulation         | ■ localization                     |
| ■ establishment of localization | ■ multicellular organismal process |
| ■ developmental process         | ■ response to stimulus             |
| ■ biological adhesion           | ■ immune system process            |
| ■ multi-organism process        | ■ locomotion                       |
| ■ reproduction                  | ■ reproductive process             |
| ■ pigmentation                  | ■ cell killing                     |
| ■ growth                        | ■ rhythmic process                 |
| ■ viral reproduction            |                                    |



- |                   |                           |                         |
|-------------------|---------------------------|-------------------------|
| ■ cytoplasm       | ■ intracellular organelle | ■ organelle part        |
| ■ membrane        | ■ nucleus                 | ■ cytoskeleton          |
| ■ plasma membrane | ■ mitochondrion           | ■ organelle membrane    |
| ■ ribosome        | ■ extracellular region    | ■ endoplasmic reticulum |
| ■ Golgi apparatus | ■ endosome                |                         |



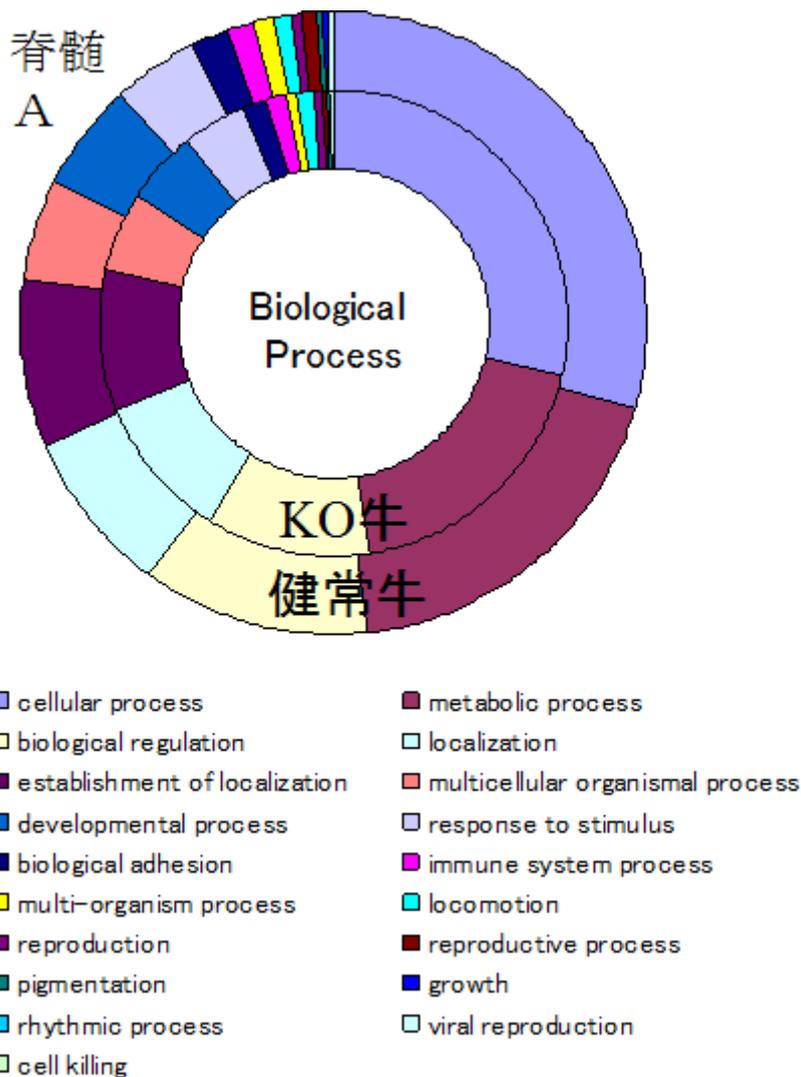
- molecular function
- catalytic activity
- transporter activity
- translation regulator activity
- molecular transducer activity
- electron carrier activity
- binding
- structural molecule activity
- enzyme regulator activity
- transcription regulator activity
- motor activity



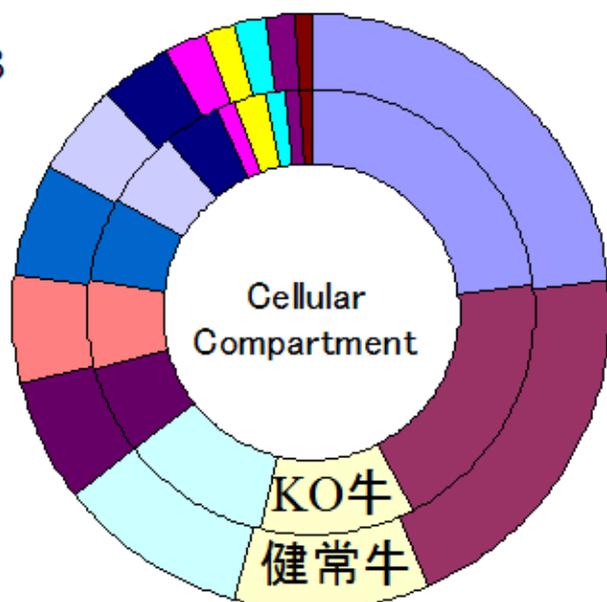
大脳組織から9M尿素を含む緩衝液で抽出したタンパクは、尿素を2.5Mまで希釈した後にトリプシンによる消化を行い、LC-MS/MS分析を行い、MSおよびMS/MSの値より、データベースとしてMassCotを用いてタンパクの同定を行った。ヒートマップ図はこうにして検出・同定した全タンパクの量的変化を比較したもので、赤色は増加したタンパクを、青色は減少したタンパクを示す。

また、大脳組織から尿素抽出とトリプシン消化して調製したタンパクをLC-MS/MSにて分析し、MSおよびMS/MSの値より同定するとともに量的変化を調べた。健常牛およびKO牛それぞれから検出されたタンパクに関する発現量の差異に関して比較解析した結果、G検定により158タンパクに有意差が認められた ( $p < 0.05$ ・前頁下図)。KO牛のうち1頭は健常牛と顕著に発現量の違うタンパクが検出されたが、もう1頭は健常牛とも発現パターンが似ており、KO牛特異的発現のパターンを示すタンパクとして、G検定にて優位差の認められたタンパクから、54タンパクを抽出、KO牛特異的発現パターンを示すタンパク候補とした。これらのKO牛特異的発現パターンを示すタンパク候補のGOの詳細は、functionとしてnucleotide binding、protein binding、hydrolase activityなど、processとしてneurofilament cytoskeleton organization、intermediate filament bundle assembly、microtubule cytoskeleton organizationなどであった。これらの結果より、今後は、細胞骨格系などに関連するタンパクを中心に、検討しなくてはならない。

脊髄：健常牛518タンパク、KO牛494タンパクがそれぞれ同定され、そのうち446タンパクは共通であった。同定されたタンパクのうちGene Ontology (GO) が報告されているものは、222タンパク存在した。Biological processとしてはcellular process、metabolic process、biological regulationの順に多く検出された(次頁からの図A、BおよびC参照)。

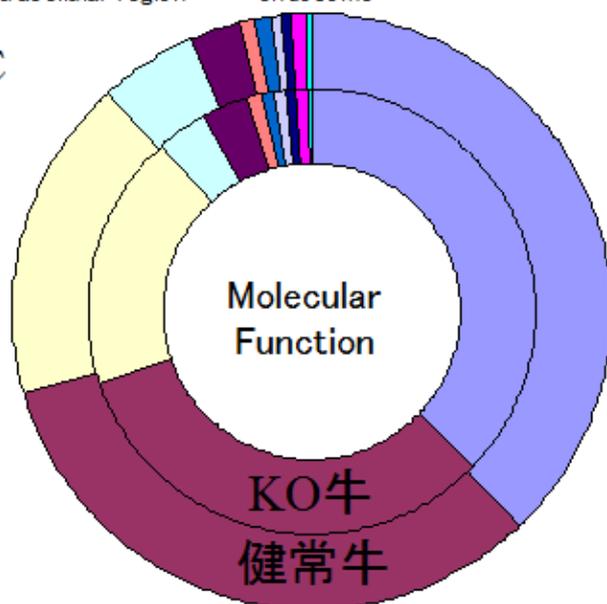


B



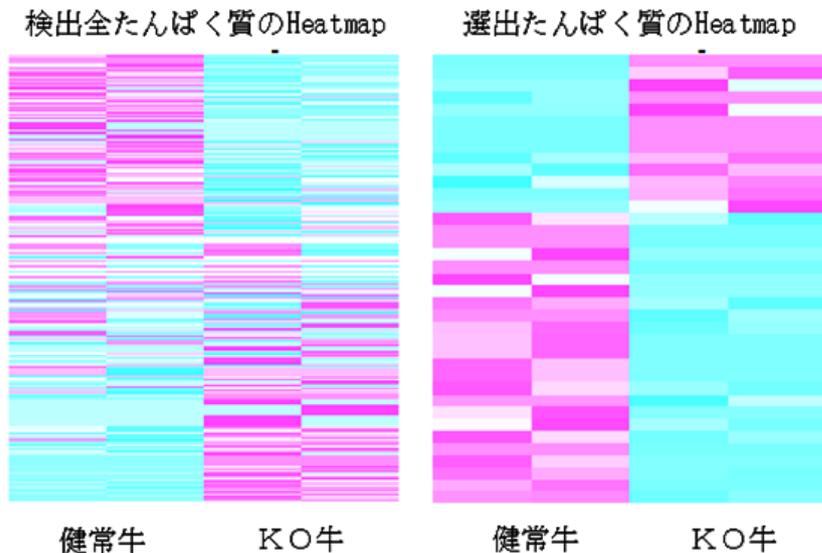
- |                      |                         |                       |
|----------------------|-------------------------|-----------------------|
| cytoplasm            | intracellular organelle | organelle part        |
| membrane             | cytoskeleton            | plasma membrane       |
| nucleus              | mitochondrion           | organelle membrane    |
| ribosome             | Golgi apparatus         | endoplasmic reticulum |
| extracellular region | endosome                |                       |

C



- |                                  |                                |
|----------------------------------|--------------------------------|
| molecular function               | binding                        |
| catalytic activity               | structural molecule activity   |
| transporter activity             | enzyme regulator activity      |
| molecular transducer activity    | motor activity                 |
| transcription regulator activity | translation regulator activity |
| antioxidant activity             | electron carrier activity      |

Cellular compartment に関しては cytoplasm、intracellular organelle、organelle part の順に多く、molecular function に関しては molecular function、binding、catalytic activity の順に多く検出された。



脊髄組織から9M尿素を含む緩衝液で抽出したタンパクは、尿素を2.5Mまで希釈した後にトリプシンによる消化を行い、LC-MS/MS分析を行い、MSおよびMS/MSの値より、データベースとしてMassCotを用いてタンパクの同定を行った。ヒートマップ図はこうにして検出・同定した全タンパクの量的変化を比較したもので、赤色は増加したタンパクを、青色は減少したタンパクを示す。

脊髄組織から尿素抽出とトリプシン消化して調製したタンパクをLC-MS/MSにて分析し、MSおよびMS/MSの値より同定するとともに量的変化を調べた。健常牛およびKO牛それぞれから検出されたタンパクに関する発現量の差異に関して比較解析した結果、G検定により40タンパクに有意差が認められた ( $p < 0.05$ ・上図参照)。KO牛のうち1頭は健常牛と顕著に発現量の違うタンパクが検出されたが、もう1頭は健常牛とも発現パターンが似ており、KO牛特異的発現のパターンを示すタンパクとして、G検定にて優位差の認められたタンパクから、37タンパクを抽出、KO牛特異的発現パターンを示すタンパク候補とした。これらのKO牛特異的発現パターンを示すタンパク候補のGOの詳細は、functionとして protein binding、serine-type endopeptidase inhibitor activity、nucleotide binding など、processとして transport、cell adhesion、vesicle-mediated transport などであった。これらの結果より、今後は、輸送、細胞接着などに関連するタンパクを中心に、検討しなくてはならない。

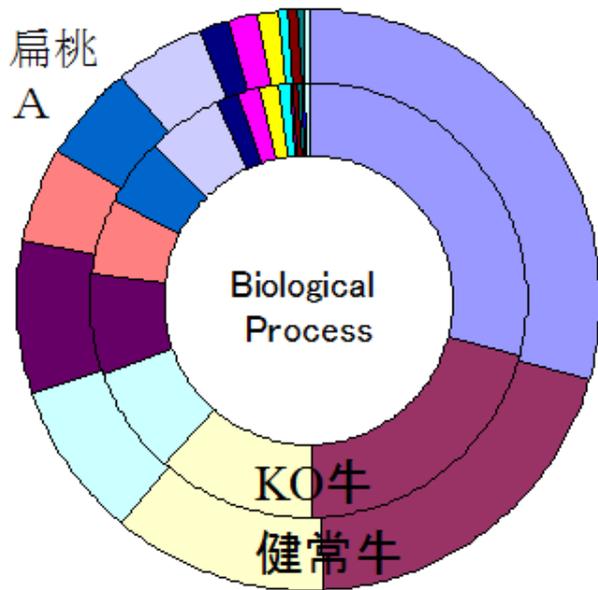
扁桃：健常牛598タンパク、KO牛621タンパクがそれぞれ同定され、そのうち572タンパクは共通であった。同定されたタンパクのうち、Gene Ontology (GO) が報告されているものは、252タンパク存在した。Biological process としてはcellular process、metabolic process、biological regulationの順に多く検出された。Cellular compartment に関しては、intracellular organelle、cytoplasm、organelle partの順に多く、molecular functionに関してはmolecular function、binding、catalytic activityの順に多く検出された (次頁からの図A、BおよびC参照)。

扁桃組織から尿素抽出とトリプシン消化して調製したタンパクをLC-MS/MSにて分

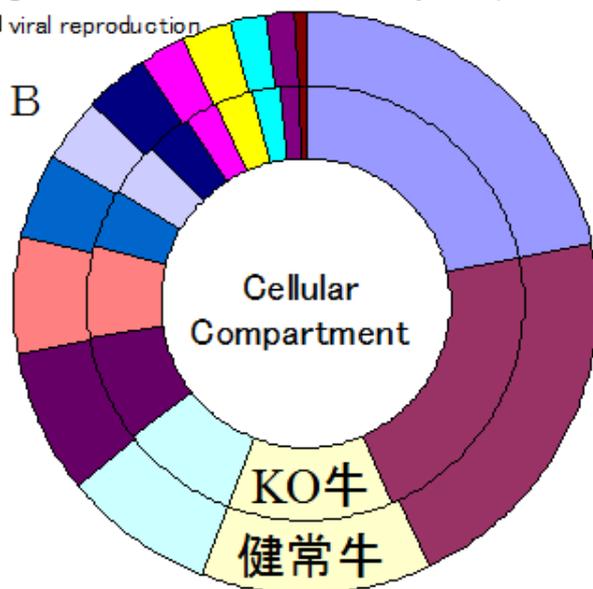
析し、MSおよびMS/MSの値より同定するとともに量的変化を調べた。健常牛およびKO牛それぞれから検出されたタンパクに関する発現量の差異に関して比較解析した結果、G検定により147タンパクに有意差が認められた ( $P < 0.05$ 、前頁下図)。KO牛のうち1頭は健常牛と顕著に発現量の違うタンパクが検出されたが、もう1頭は健常牛とも発現パターンが似ており、KO牛特異的発現のパターンを示すタンパクとして、G検定にて優位差の認められたタンパクから、137タンパクを抽出、KO牛特異的発現パターンを示すタンパク候補とした。これらのKO牛特異的発現パターンを示すタンパク候補のGOの詳細は、Functionとしてprotein binding、nucleotide binding、structural molecule activityなど、processとしてcell adhesion、transport、RNA splicingなどであった。これらの結果より、今後は細胞接着、輸送、転写後修飾などに関連するタンパクを中心に、検討していく必要がある。

扁桃組織から尿素抽出とトリプシン消化して調製したタンパクをLC-MS/MSにて分析し、MSおよびMS/MSの値より同定するとともに量的変化を調べた。

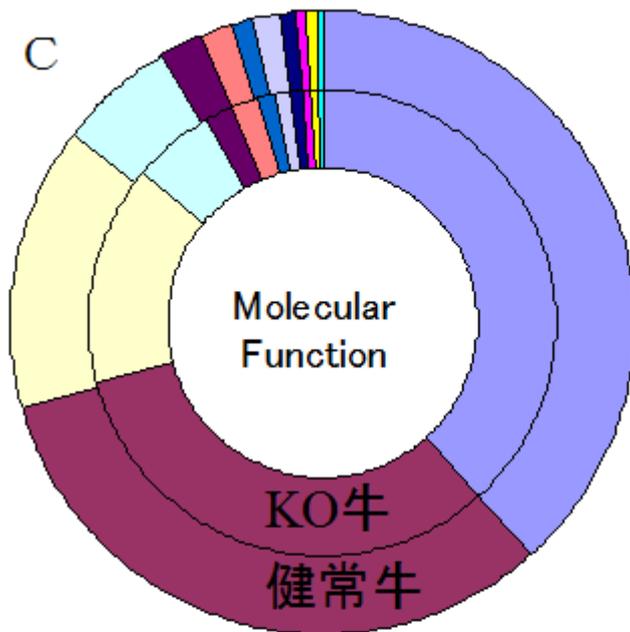
大脳、脊髄、扁桃の3組織に関して検討したが、プロテインプロファイルは、それぞれの組織で特徴的であった。さらにKO牛と健常牛との比較解析により、いくつかの特異的発現パターンを示すタンパク群も見つけられた。これらの候補の中には、他の疾患でも注目されているものもあり、KO牛と健常牛の臨床状態を調べていくうえでも、重要な情報が得られると考える。



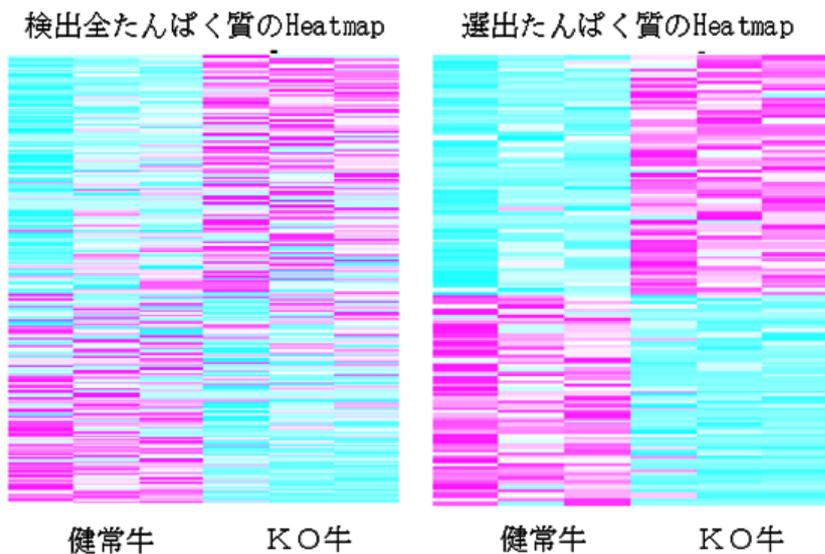
- |                               |                                  |
|-------------------------------|----------------------------------|
| cellular process              | metabolic process                |
| biological regulation         | localization                     |
| establishment of localization | multicellular organismal process |
| developmental process         | response to stimulus             |
| biological adhesion           | immune system process            |
| multi-organism process        | locomotion                       |
| pigmentation                  | reproduction                     |
| reproductive process          | cell killing                     |
| growth                        | rhythmic process                 |
| viral reproduction            |                                  |



- |                         |               |                       |
|-------------------------|---------------|-----------------------|
| intracellular organelle | cytoplasm     | organelle part        |
| nucleus                 | membrane      | cytoskeleton          |
| plasma membrane         | mitochondrion | organelle membrane    |
| extracellular region    | ribosome      | endoplasmic reticulum |
| Golgi apparatus         | endosome      |                       |



- molecular function
- binding
- catalytic activity
- structural molecule activity
- transporter activity
- enzyme regulator activity
- motor activity
- translation regulator activity
- transcription regulator activity
- molecular transducer activity
- electron carrier activity
- antioxidant activity



扁桃組織から9M尿素を含む緩衝液で抽出したタンパクは、尿素を2.5Mまで希釈した後にトリプシンによる消化を行い、LC-MS/MS分析を行い、MSおよびMS/MSの値より、データベースとしてMassCotを用いてタンパクの同定を行った。ヒートマップ図はこのような検出・同定した全タンパクの量的変化を比較したもので、赤色は増加したタンパクを、青色は減少したタンパクを示す。

2) 「プリオン遺伝子KO牛、対照クローン牛の作成と改良法の検討」

(分担研究者：全農飼料畜産中央研究所 千代豊、協力研究者：浦川真実、出田篤司)

① 研究目的

プリオン遺伝子ホモKO牛、および対照群として、同一の体細胞由来クローン牛を作成する。また、現在のプリオン欠損部位に残っているKOベクタープラスミド由来の塩基配列を除去する方法の検討を進める。

② 研究方法

外来遺伝子を残さないKO法の開発を進めた。即ち、現行のKO操作では、プリオン欠損部位にプラスミド由来の塩基配列（10xP配列を含むプラスミド由来の328塩基対）が残る。そこで本研究においては、ノックアウトベクター中に自殺遺伝子を導入した新規のベクターを構築し、2回の相同遺伝子組換え操作を経て外来遺伝子を除去する方法の検討を実施した。

③ 研究の成果

KOベクター中に自殺遺伝子である herpes virus thymidine kinase (TK) 遺伝子または大腸菌 (*E. coli*) の cytosine deaminase (C d A) 遺伝子を組み込んだベクターを使用し、最初の相同組換え操作においてプリオンヘテロKO-自殺遺伝子ノックイン (KI) 細胞株の樹立を行った。その結果、下表に示すように両者のベクターにおいて、高率にプリオンヘテロKO-自殺遺伝子ノックイン (KI) 細胞コロニーの出現が確認できた。

**表. PrP-KO-自殺遺伝子-KI細胞株樹立**

	細胞株	TV	TV(ng)	G418耐性コロニー	KOコロニー
試験1	#906	pPrP-TKO	20	92	26 (#1-5)
試験3	#906	pPrP-CKO	20	121	30 (#1-9, #1-30)

細胞数：1.5x10<sup>6</sup> 導入法：Electroporation (220V, 950nF)

細胞コロニー中で増殖性が優れたコロニーより細胞株の樹立を行い、プリオンヘテロKO-TK-

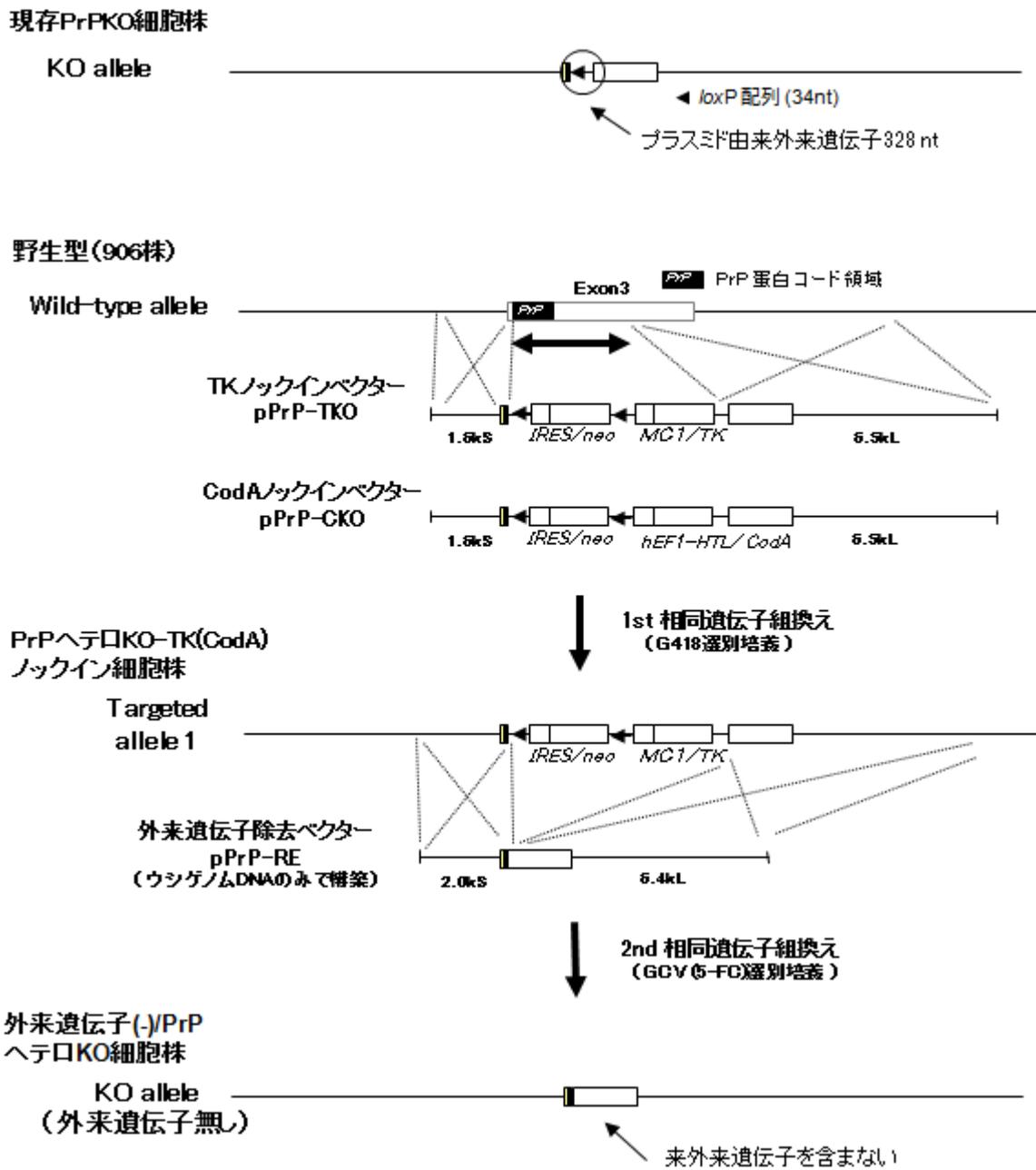
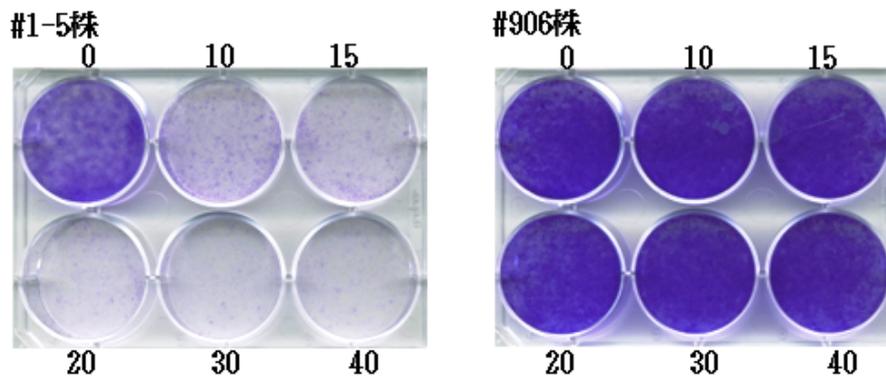


図. 外来遺伝子を残さないKO法の概略: 樹立した # 1-5 株および # 1-30 株を使用し、自殺遺伝子の選別効果(プリオンヘテロKO-TK-KI細胞の# 1-5 株に対してはガンシクロビル (GCV) 添加し、プリオンヘテロKO-CodA-KI細胞の# 1-30 株に対しては5-Fluorocytosine (5-FU) 添加して調べた。プリオンヘテロKO-TK-KI細胞# 1-5 株に対しGCV添加することにより細胞増殖が顕著に阻害された。一方野生型906株に対しては増殖抑制が起きない事が確認できた。しかしながら、プリオンヘテロKO-CodA-KI細胞# 1-30 株に対する5-FU添加は、野生型906株に対する5-FU添加とほぼ同一で、CodA遺伝子による細胞増殖抑制効果は確認出来なかった。

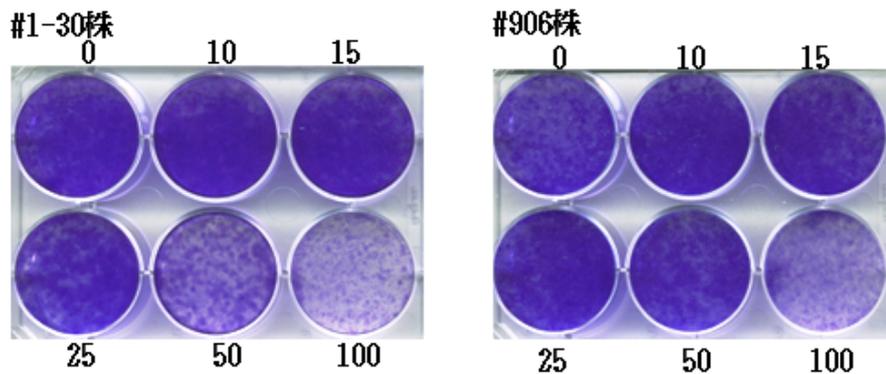
KI細胞として# 1-5 株を、プリオンヘテロKO-CodA-KI細胞として# 1-9 株および# 1-30 株を、それぞれ樹立した。ついでこのようにして樹立した# 1-5 株(プリオンヘテロKO-TK-KI細胞)と# 1-30 株(プリオンヘテロKO-CodA-KI細胞)を供試し、自殺遺伝子の選別効果を調べた。# 1-5 株に対してはガンシクロビル (GCV) 添加し、# 1-30 株に対しては5-Fluorocytosine (5-FU) 添加)を調査した。プリオンヘテロKO-TK-KI細胞である# 1-5 株に対してGCVを添加するこ

とにより細胞増殖が顕著に阻害された。しかし野生型906株に対してはGCVを添加しても増殖抑制が起きないことが確認できた。他方、プリオンヘテロKO-CodA-KI細胞である#1-30株と野生型906株に対して5-FCを添加した場合には、同程度に細胞増殖が抑制された。このように、5-FC添加ではCodA遺伝子による細胞増殖抑制効果は確認出来なかった。

### GCV選別 (mM)



### 5-FC選別 (mg/ml)



3,000細胞播種後6日培養：クリスタルバイオレット染色

## 図. プリオンヘテロKO-自殺遺伝子ノックイン(KI)細胞株の選別培養試験

細胞増殖阻害効果が確認できた#1-5株を使用し、外来遺伝子除去ベクターpPrP-REによる相同組換え試験を実施した結果、786well解析中1wellにおいてpPrP-REベクターとPrPヘテロKO-TKノックイン細胞ゲノム間で相同組換えが起きたことを示唆するPCR増幅が観察された。しかしながら、#1-5株は細胞増殖能力がかなり低下している(相同組換え操作を1回実施しており約30日間継続培養した状態にある)ことから、細胞株の樹立は不可能と判断された。

この問題を解決するため、#1-5株をドナーとした核移植・胎仔細胞樹立試験を実施した。その結果、1胎仔を回収し胎仔細胞株を樹立する事が出来た。樹立した#1-5由来胎仔細胞株を使用し、自殺遺伝子の選別効果を調査した。#1-5由来胎仔細胞株はオリジナルの#1-5株とは異なりGCV添加による細胞増殖阻害が起こらない細胞に変化した。ゲノム中のTK遺伝子の存在は確認できたことから、核移植操作、その後の発生過程でTK遺伝子のプロモーターであるMC1プロモーターが何らかの修飾を受けサイレンシングされた可能性が考えられる。今後、TK遺伝子のプロモーターをMC1から別のプロモーター(P

GK, SV40等)に変更し試験する必要がある。

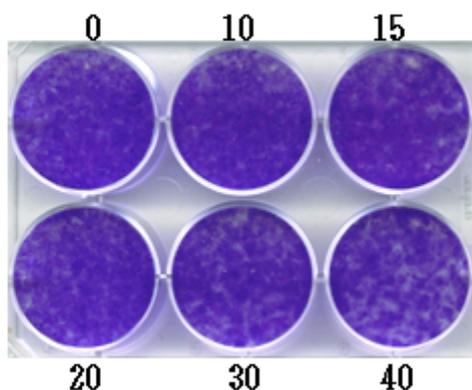
表. 外来遺伝子除去ベクターによる2nd 相同組み換え試験

	細胞株	TV	TV(ng)	解析Well数	KOコロニー
試験1	#1-5	pPrP-RE	20	786	1

細胞数:  $1.5 \times 10^6$  導入法: Electroporation (220V, 950nF)

### GCV選別 (mM)

#### #1-5由来胎子細胞株



3,000細胞播種、6日培養: クリスタルバイオレット染色

図. #1-5由来プリオンヘテロKO-TK-KI細胞株の選別培養試験

ノックアウトベクター中に自殺遺伝子 (TK) を導入したベクターシステムを用いることにより、外来遺伝子を含まないかたちでPrPを含む特定遺伝子のKOができる可能性が示唆された。今後、この可能性を検証するためベクターを再構築し、増殖能力の高いPrPヘテロKO-TKノックイン胎仔細胞株を樹立し、さらなる試験が必要と考えられる。

### 3) 「プリオン遺伝子KO牛の生化学的解析」

(分担研究者: 酪農学園大学 横田博、

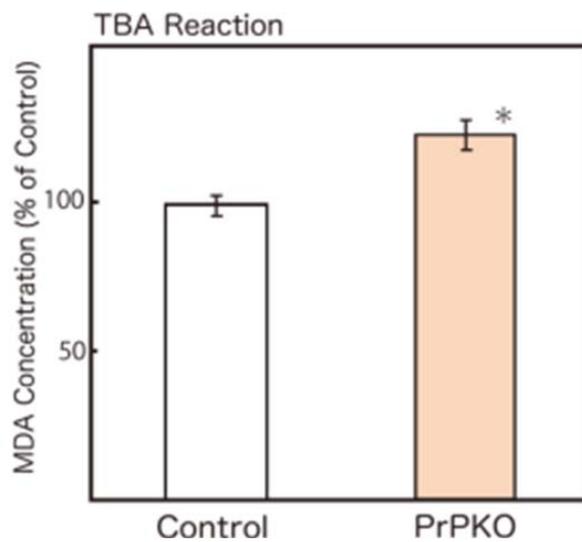
協力研究者: 松田一哉、宮庄拓、野村幸子、奥村佳奈子)

- ① 研究目的: プリオンは、細胞の酸化ストレスを防御する super oxide dismutase (SOD)

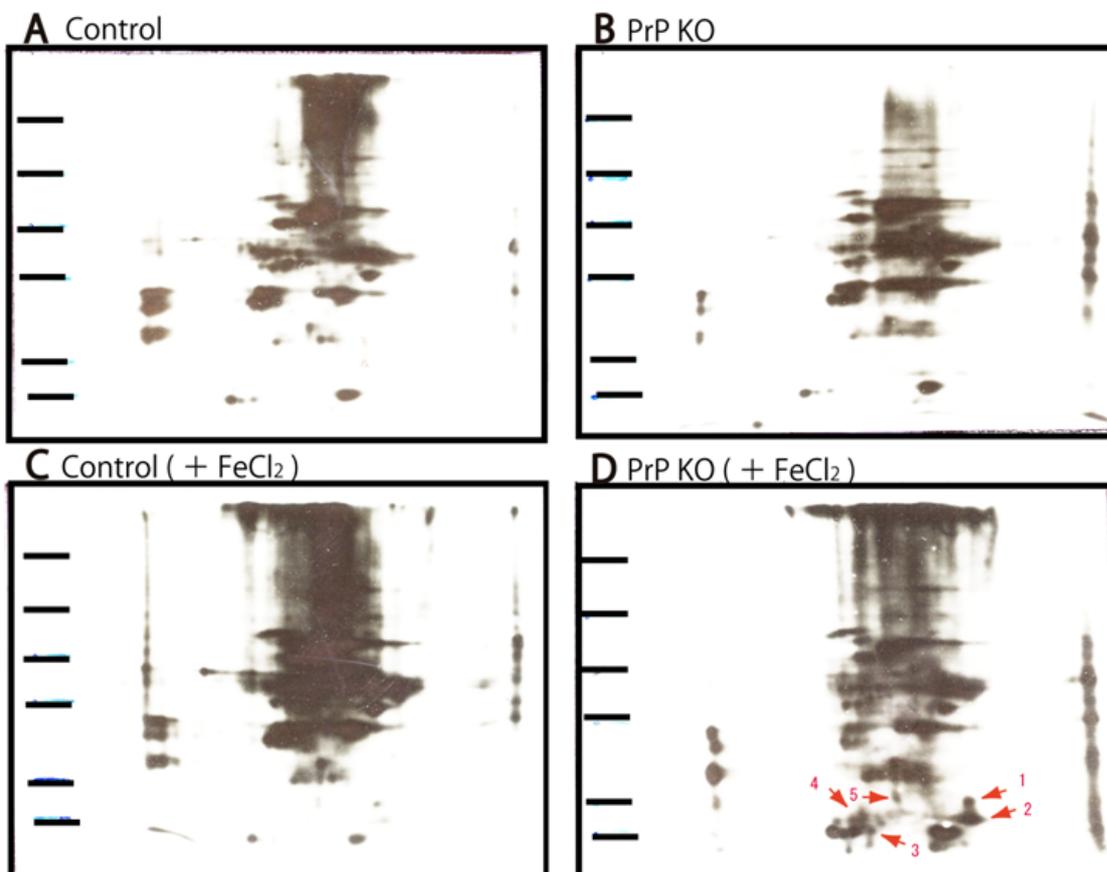
活性を担っており、プリオンをノックアウトしたマウスでは細胞の自然死であるアポトーシスが誘発されるという報告があるが、牛における役割は不明である。マウスと同様であれば、ホモプリオン遺伝子KO牛の神経細胞は酸化ストレスを受け易く、増殖・成長過程で重要な障害を受ける可能性がある。これを確認するために、これまでにホモプリオン遺伝子KO牛の神経（延髄）細胞中の酸化ストレスに関連している一群の酵素（SOD、Caspase-3、Caspase-7、protein disulfide isomerase：PDI）の活性をノックアウトしていない牛のそれと比較した。さらに神経組織内の酸化状態をカルボニル化タンパクを検出することで比較した。その結果、これら酸化ストレス関連酵素の活性は、両者間で有意な差異が認められなかったが、ホモプリオン遺伝子KO牛の神経組織では数種のタンパクのカルボニル化が観察された。この結果から、抗酸化作用を有するプリオンタンパクを欠失したことにより、神経タンパクの酸化が促進されたことが推察された。プリオンタンパク欠失による神経組織におけるタンパクの酸化促進を明らかにする目的で *in vitro* でのタンパク酸化反応系を確立し、プリオンタンパク欠失牛神経のタンパクが酸化を受けやすいか否かを確認し、併せて脂質の易酸化性も検討した。加えてプリオンタンパク欠損神経組織では、脂質過酸化およびタンパクの酸化が速く進み、酸化ストレスを受けやすいことが明らかとすることが目的である。

② 研究方法：ホモプリオン遺伝子KO牛や対照牛の神経組織ホモジネートを調製し、*in vitro* 系での酸化反応系によって標本中のタンパクのカルボニル化を測定した。併行して、牛の神経組織ホモジネートに活性酸素を発生させる目的でFeCl<sub>2</sub>を添加し、これに含まれる脂質の過酸化によって生じるmalondialdehydeなどのthiobarbituric acid反応性物質を測定することで、脂質の過酸化の程度を評価した。細胞のタンパクの酸化は様々な障害や疾病へと発展する引き金の役目を担っており、中でもタンパクのカルボニル化は不可逆的な反応で、アルギニンの分解を誘導するのでタンパクの機能障害を示唆する重要な指標である。試験管内フェントン反応系で、神経組織ホモジネートに活性酸素を発生させ、脂質過酸化物や神経タンパクの酸化（カルボニル化）を生じさせることに成功した。

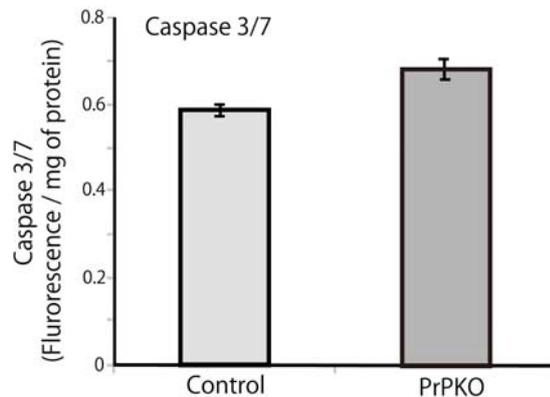
③ 研究成果：Caspase-3、Caspase-7、SOD活性にはコントロールに比べ変化は無かったが、PDI活性は上昇傾向にあった。神経組織における脂質過酸化物や神経タンパクのカルボニル化を測定（脂質過酸化反応の結果生じたMDA-TBAを測定）したところ、プリオンタンパクを欠失しているKO牛の神経ホモジネートの脂質過酸化割合はコントロール牛のそれより高く、プリオン遺伝子ホモKO牛神経細胞の方が酸化が進行していることが推測された（下図）。タンパクのカルボニル化もプリオン欠失神経細胞では速く進行し酸化され易い結果となった。



そこでカルボニル化タンパクを同定するために、二次元電気泳動を行った。その結果を次頁にします。図中のAとBは試験管内フェントン反応前のタンパクの電気泳動像、CとDは反応後のタンパクを二次元電気泳動し、カルボニル化を検出した像である。プリオンタンパクを欠失した牛の神経細胞のタンパクが多く酸化された(D)。特に20kDa附近の5種類の蛋白質(次頁の図中の赤矢)がプリオンタンパクの欠失により新たに酸化されたことが分かった。



プリオンタンパクを欠失した牛の神経細胞のタンパクに試験管内フェントン反応を施し、その後 Caspase3/7 活性を測定した。プリオン欠失ウシの神経細胞で Caspase3/7 活性が有為に上昇し、アポトーシスが進行していることが予測された（下図）。



牛において、プリオンタンパクは神経細胞の脂質やタンパクの酸化を抑制する働きを有していることが濃厚となった。よってプリオンタンパク遺伝子KO牛ではその飼育過程において、神経細胞の脂質過酸化やタンパク酸化が生じやすく、アポトーシスが生じて細胞傷害され、神経疾患に陥りやすいと考えられる。酸化タンパクの二次元電気泳動の結果、プリオン欠失により 20 kDa 附近の 5 つの低分子量タンパクが酸化されていた。今後このタンパクの特定を行うことにより、プリオンが酸化抑制しているタンパクが判明する。すなわちこの相互作用を解析することで、プリオンの生理的役割を更に詳しく解析出来る可能性がある。このようにすることで、プリオン欠失牛の飼育やその牛からの畜産製品の加工時などに留意する点が明確になってくる。

## (2) 全体の研究成果

### 1) 全体の研究成果の要旨

正常に誕生したプリオン遺伝子KO牛の全ての臓器（脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管など）でプリオンタンパクをコードする遺伝子領域が欠失していること、プリオン遺伝子KO牛では loxP/Cre 組換え反応によりノックアウトベクター中の薬剤耐性遺伝子領域は完全に除去されているがベクター由来の loxP 配列を含む外来遺伝子が存在することが確認できた。またプリオン遺伝子KO牛のいずれの諸臓器においてもプリオン mRNA が検出されず、mRNA レベルでもノックアウトされており、かつ病理組織学的異常所見は認められず、細胞と組織の形態形成は正常であると考えられた。プリオン遺伝子KO牛の脳ではカルボニル化しているタンパクがあることからプリオンタンパクはタンパクが酸化されにくくしていることが示唆されたが、プリオン遺伝子KO牛とでは脂質酸化が抑制されていたことから、プリオンタンパクは神経系組織において脂質の酸化を亢進させると考えられた。プリオン遺伝子KO操作により、タンパクプロファイルが変化する可能性が示唆された。

### 2) 研究成果

平成19年11月に全国農業組合連合会の中央研究所と胚移植（ET）センターの技術開発により、我が国で初めて bovine spongiform encephalopathy（BSE）の病因であるプリオン

の遺伝子（プリオン）をホモにノックアウト（KO）した黒毛和種の雌牛が生産された。米国では約2年先行してプリオン遺伝子KOホルスタイン種雄牛が生産されたが、雌牛での成功は世界に先駆けたものであった。マウスと異なり牛の胚性幹細胞（ES）細胞は確立しておらず、かつ性成熟までの期間が長いので、KO牛の作出には手間と時間のかかる複雑なプロセスが必要である。具体的には、最初に、牛の発生初期の胎仔の線維芽細胞を体外で培養し、これを用いてヘテロプリオン遺伝子KO細胞を作出する。この核をあらかじめ核を抜いておいた（脱核）卵母細胞に移植（核移植）して初期胚とし、これを胚盤胞まで体外で成熟培養したものを仮母牛（レシーピエント牛・受胎牛）の子宮に移植（胚移植）し、着床させて胚発生を進める（1次体細胞クローン牛の作出）。このようにして作出した発生初期の胎仔から再び線維芽細胞を調製して体外で培養し、これを用いてホモプリオン遺伝子KO細胞を作出する。このホモKO細胞の核を脱核した卵母細胞に核移植してホモプリオン遺伝子KO初期胚を作出する。この胚をレシーピエント牛の子宮に胚移植して2次体細胞クローン牛を作出する（2次体細胞クローン牛の作出）。平成21年度は、2次体細胞クローン牛（ホモプリオン遺伝子KO牛）作出のために5頭のレシーピエント牛を用い、各々にホモプリオン遺伝子KO初期胚を2胚ずつ移植した。その結果4頭（うち2頭は双子妊娠）で着床が認められ、これらは順調に妊娠が推移して出産に漕ぎ着け、6頭のプリオン遺伝子KO雌牛を作出することができた。しかしながら、6頭のうちの1頭は誕生の直後に原因不明で死亡し、1頭は過大仔で分娩時事故によって死亡した（牛や豚などの家畜だけでなくマウスなどの実験動物でも、体細胞核クローン動物の胎仔は巨大仔となり、分娩時期に流産したり、出産時に死産となることが多い）。残りの4頭は正常（健康体）であった。プリオン遺伝子ノックアウトの影響を生化学および病理学的に精査するために、これらの全てを経時的に安楽殺して全身の臓器を採取した（2頭は生後3ヶ月齢で、1頭ずつを5ヶ月齢と12ヶ月齢）。21年度は（1）プリオン遺伝子KO牛が性成熟の達するまでの成育過程における正常性を経時的にモニタリングすること、（2）性成熟に達した場合に性腺、生殖器官、生殖に関わる内分泌系（特に、脳下垂体系）が正常に機能することおよび（3）生殖細胞（卵母細胞）が正常に成熟して受精能を獲得していることの確認、ならびに（4）1次体細胞クローン牛作出効率の一段の改善法の開発のために新たにホモプリオン遺伝子KO牛を生産した。すなわち、対照群としては、胎仔から調製した線維芽細胞を用いて核移植を行った初期胚を2頭のレシーピエント牛の子宮に2胚ずつ移植した。なお、前回は体細胞核移植の効率がよくなかったため、これを高めるために細胞周期が初期G1期になるようコントロールしたドナー細胞を使用し、効率を大幅に向上させることができた。レシーピエント牛のうちの1頭は、妊娠212日（牛の妊娠期間は約280日で、妊娠初期と後期に流産し易い）で流産したが、残りの1頭は妊娠を維持して2頭（双子）を出産した。プリオン遺伝子KO牛生産のためには、上記のようにして作製したホモプリオン遺伝子KO初期胚を2頭のレシーピエント牛の子宮に2胚ずつ移植した。1頭は双仔で残りは単仔であった。これらは分娩期まで約280日間妊娠を維持できたが、プリオン遺伝子KO胎仔を2仔妊娠したレシーピエント牛は、分娩時に難産となり、残念ながら2胎仔とも死産となってしまった（臓器を病理組織学的に調べたが、特記すべき異常所見は得られておらず、死産の原因は体細胞クローン胎仔特有の過剰発育に起因する可能性が高い）。プリオン遺伝子KO胎仔を1仔妊娠したレシーピエント牛は、分娩予定日を越えても明確な分娩兆候が確認出来なかったため、緊急に帝王切開術を施して仔牛を救命した。このように、1頭のプリオン遺伝子KO牛と2頭の対照牛の作出に成功した。1回目のプリオン遺伝子KO牛は、いずれも次世代の配偶子を取るまで飼育しなかったため、2回目の牛は、性成熟に達するまで経時的に臨床検査などを継続して発育過程の生理特性を明らかにするとともに、性成熟後は、生殖系や内分泌系および雌性生殖細胞の正常性を見極めようとしている。臨床所見として、第1回目と2回目のホモプリオン遺伝子KO牛は、下半身、特

に腰部と大腿部の発育が悪く、脆弱であり、離乳期を経た後も気管支炎などを発症し易く、しばしば下痢気味になるなど免疫系および消化器系が脆弱である兆候を示していた。ただし、対照の体細胞核クローン牛でも腰部の脆弱性がうかがわれるので、両者を比較して、用いた線維芽細胞に起因するものなのか、遺伝子のホモノックアウト操作過程で細胞のゲノムに生じた変異に起因するものなのか、あるいはプリオン遺伝子のホモノックアウトそのものに起因するものなのか精査している。加えて、平成21年度に安楽死させた第1回目のホモプリオン遺伝子KO牛を用いてその特性の精査を継続して得た成果は下記のとおりである。

(1) プリオン遺伝子ホモKO牛の特性の解析：本研究では、プリオン遺伝子KO牛の性状の確認、および、プリオン遺伝子を欠失させることが、加齢に伴い牛にどのような影響を与えるかを検討することを目的としている。平成22年度は、3ヶ月齢雌2頭、5ヶ月齢雌1頭、および1歳齢雌1頭、計4頭のプリオン遺伝子KO牛から得られた脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管などの各臓器を用いて、プリオン遺伝子KO牛の臨床病理学的解析、および、プリオン遺伝子の発現解析を行った。プリオン遺伝子KO牛の全身状態を確認するため、サンプリングにより得られた各臓器を、パラホルムアルデヒド溶液で固定後、パラフィンブロックを作成した。1歳齢のプリオン遺伝子KO牛以外の3頭のサンプルについては、脳など代表的な組織に関して、薄切後、HE染色を行ったが、現在のところ、特に異常と思われる所見は得られていない。一方で、凍結保存された各サンプルを用いて、RT-PCRを行い、プリオン遺伝子のmRNAの発現を確認した。まず、対照として2ヶ月齢ホルスタイン雄のサンプルを用いたRT-PCRによりcDNAを合成した。得られたcDNAのうち、大脳、および肝臓のcDNAを用いてPCRの各条件を検討、決定した。この条件下で、各臓器由来サンプルを用いて行ったPCRにより、ホルスタイン牛では多くの臓器でプリオン遺伝子のmRNAの発現があり、その発現量は、臓器により差異があることが確認された。次に、プリオン遺伝子KO牛を用いて同様の検討を行った。このプリオン遺伝子KO牛は、最終的には、プリオン遺伝子のうち、エクソン3の一部（ORFの大部分を含む2914bp）が欠損し、その代わりに、loxPを含む外来遺伝子をプリオン遺伝子ORF領域に含む。プリオン遺伝子KO牛のどの臓器からも、プリオン遺伝子の欠失プリオンタンパク部分のmRNAは、検出されず、きちんとノックアウトされていることが確認された。さらに、プリオン遺伝子KO牛のみに発現している外来遺伝子部分を用いて、プリオン遺伝子KO牛の各臓器におけるプリオン遺伝子の転写状況を確認するため、外来遺伝子に置換された領域を含むようなプリオン遺伝子のORF部分を含む領域を増幅させるPCRを試みたところ、多くの臓器において、この領域のmRNAの発現が確認された。現在、1歳例のプリオン遺伝子KO牛のサンプルを用いて、それぞれの解析を進めており、今年度中には、プリオン遺伝子KO牛におけるプリオン遺伝子の発現、および、プリオン遺伝子の転写状況の経時的なmRNAの発現の変化について検討できると考えている。今後は、パラフィン切片を用いて、病理組織学的にプリオン遺伝子KO牛を評価すること、プリオン遺伝子（mRNA）の臓器による発現パターン、量的または経時的な変化に関して検討していく予定であり、エピジェネティックな解析も試みたいと考えている。さらに、プロテオーム解析により、プリオンタンパクが発現されないことにより、細胞内の発現タンパクのプロファイルがどのように変化しているのかを解析していく予定である。

(2) プリオン遺伝子KO牛、対照クローン牛の作成と改良法の検討：プリオン遺伝子KO牛の作出：プリオン遺伝子（プリオン）KO牛の作出は培養体細胞を用いた遺伝子ノックアウト操作と得られたノックアウト体細胞を使用した核移植クローン操作により実施した。牛プリ

オン遺伝子は3つのエクソンより構成されており、プリオンタンパクをコードする領域はエクソン3に位置している。今回、プリオン遺伝子をノックアウトするために使用したノックアウトベクターは、プリオンタンパクをコードする領域を除去するようにデザインし構築した。また、ノックアウトベクターは、選択マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子）を挟むかたちに10xP配列が位置しており、Cre組換え酵素処理（Cre発現アデノウイルス）することにより選択マーカー遺伝子を除去できる構造となっている。このようなベクターを使用することにより、1種類（本来は2種類必要）のノックアウトベクターを使用してホモノックアウト体細胞株を比較的短期間で樹立することが可能となる。牛胎子由来細胞（線維芽細胞）を出発材料として2回のノックアウト操作によりホモノックアウト細胞株が得られた。さらに、このホモノックアウト細胞をドナーとした核移植クローン操作によりプリオン遺伝子ホモKO牛を作出した。ノックアウト操作の開始からホモKO牛の誕生まで、おおよそ14ヶ月を要したが、この作出法は通常の繁殖法（性成熟後のヘテロKO牛のかけ合わせ）と比べると非常に短期間に作出できる方法と考えられる。樹立されたプリオンホモノックアウト細胞（#H2-14Cre）及び当該細胞をドナーとして作出したクローン胎子由来の細胞（#H2-14CreN）におけるゲノム上のプリオン遺伝子の存在様式をRT-PCR法により解析した。樹立されたプリオンホモノックアウト細胞（#H2-14Creおよび#H2-14CreN）はプリオンタンパクをコードする遺伝子領域を完全に欠失しており、プリオンタンパク領域の遺伝子を発現していないことが確認できた。プリオンホモノックアウト細胞（#H2-14CreN）をドナーとして作出したプリオン遺伝子ホモKO牛の作出成績では、5頭の受胎牛にプリオン遺伝子KO胚を2胚ずつ移植し、4頭が妊娠を継続し（うち2頭は双子妊娠）、6頭のプリオン遺伝子KO牛を作出することができた。6頭中、1頭は生後直死、1頭は分娩事故による死産となり、最終的に4頭が正常（健康体）に誕生した。正常に誕生した4頭のプリオン遺伝子ホモKO牛のゲノム遺伝子のPCR解析の結果では、4頭全てにおいてプリオンタンパクをコードする領域が欠失していることが確認できた。また、死亡した2頭においても同様の解析結果が得られた。

- (3) プリオン遺伝子KO牛の生化学的解析:プリオンタンパクは細胞の酸化ストレスを防御するSuper oxide Dismutase (SOD) 活性を担っているという報告が有るので、プリオン遺伝子をKOすると、細胞の自然死であるアポトーシスが誘発される可能性が考えられる。プリオン遺伝子をノックアウトした牛の神経は酸化ストレスを受け易く、増殖/成長過程で重要な障害を受ける可能性を示している。平成22年度は生後数ヶ月のKO牛の神経（延髄）細胞中の酸化ストレスに関連している下記酵素活性をKOしていない牛のそれと比較した。さらに、同組織内の酸化状態をカルボニル化タンパクを検出することで比較した。プリオン遺伝子KO新生仔牛神経組織のSOD、Caspase-3、Caspase-7、PDI活性を測定した結果、どの酵素活性もクローン牛のそれと大きな差はなかった。プリオンの本来の機能として予測される抗酸化作用について明らかにするために、今後、成長過程を追ってこれらの酵素活性をモニターしてゆくことが求められる。また、プリオンタンパクが抗酸化作用を有しているとすると、プリオン遺伝子KO新生仔牛神経組織は酸化ストレスを受け易いことが予測される。タンパクの酸化ストレスの代表的指標であるカルボニル化状態をクローン牛のそれと比較したところ、プリオン遺伝子KO新生仔牛脳では数種のタンパクのカルボニル化が観察された。この結果は、抗酸化作用を有するプリオンを欠失したことにより、これらのタンパクの酸化が防御できなかつたと推察される。よって、プリオン遺伝子KO新生仔牛の神経細胞ではいろんなタンパクが酸化ストレスを受けやすく成長後様々な障害が出現する可能性が考えられる。

### 3) 考察及び結論

- (1) 正常に誕生したプリオン遺伝子KO牛のゲノムのPCR解析では、全ての諸臓器（脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管など）においてプリオンタンパクをコードする遺伝子領域が欠失していること、プリオン遺伝子KO牛では loxP/Cre 組換え反応によりノックアウトベクター中の薬剤耐性遺伝子領域は完全に除去されているがベクター由来の loxP 配列を含む外来遺伝子 (328 bp) が存在することが確認できた。これを除去するために、外来遺伝子除去に有効と考えられるベクターを数種類設計して有効性を検討しているが、未だ十分なものを構築するにいたっていないので、平成23年度も継続して取り組む必要がある。
- (2) プリオン遺伝子KO牛の諸臓器のいずれにおいてもプリオン mRNA が検出されず、mRNA レベルでもノックアウトされていたが、多くの臓器において外来遺伝子の発現が認められ、これの完全な除去が必要であると考えられた。
- (3) プリオン遺伝子KO牛のいずれの諸臓器においても病理組織学的異常所見は認められず、細胞と組織の形態形成は正常であると考えられた。
- (4) プリオン遺伝子KO操作に起因するエピジェネティックな変化の有無を検討するため、諸臓器よりゲノムDNAを抽出してプリオン遺伝子のメチル化を調べた。48887 - 50730 の 1,844 bp 中に CpG island が存在することが推定できたので、バイサルファイト・シークエンス法を用いてメチル化部位の特定を進めたが、ホモプリオン遺伝子KO牛のゲノム上にmCの存在は確認できていない。
- (5) プリオン遺伝子KO操作によるタンパクプロファイルの変化を主に2次元電気泳動法にて検索し、脾臓、脊髄などでは対照と類似していたが、大脳、扁桃では、ホモプリオン遺伝子KO牛に特有のスポットが認められた。ノックアウト操作により、タンパクプロファイルが変化する可能性が示唆された。
- (6) 平成21年度にタンパクの酸化ストレスの代表的指標であるカルボニル化状態をホモプリオン遺伝子KO牛と対照牛間で比較したところ、プリオン遺伝子KO牛の脳では数種のタンパクがカルボニル化していることが分かったので、この現象の機構を理解するためにタンパクのカルボニル化を *in vitro* 系で測定できる測定系を確立した。これを用いてホモプリオン遺伝子KO牛と対照牛の神経組織におけるタンパクカルボニル化を測定したところ、ホモプリオン遺伝子KO牛の神経組織でより多くカルボニル化されていることが分かった。牛の神経組織においては、プリオンタンパクはタンパクを酸化されにくくしていることが濃厚となった。ところが、両者の神経組織の脂質の過酸化を *in vitro* 測定系で比較したところ、ホモプリオン遺伝子KO牛とでは脂質酸化が抑制されていたことから、プリオンタンパクは神経系組織において脂質の酸化を亢進させる方向で影響を及ぼしていると考えられた。

## V 研究期間を通じた全体の研究成果

### 1. 3年間の主な研究成果

#### (1) 研究項目ごとの研究成果の概要

##### 1) 「プリオン遺伝子ホモKO牛の特性の解析」(分担研究者: 東大; 眞鍋昇、吉川泰弘、小野憲一郎、協力研究者: 濱崎裕子、小野山一郎)

本研究でプリオン遺伝子KO牛の性状の確認、およびプリオン遺伝子を欠失させることが、加齢に伴い牛にどのような影響を与えるかを検討した。

北海道士幌町にある全農ETセンターで誕生後6ヶ月間飼育され、その後茨城県にある東大牧場へ移動された動物を用い、12ヶ月齢にて採材のために安楽殺されるまで経時的に臨床性状を調べるとともに、3ヶ月齢2頭、5ヶ月齢1頭および12ヶ月齢1頭のプリオン遺伝子KO牛から得られた脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管などの各臓器を用いてプリオン遺伝子KO牛の臨床病理学的解析、およびプリオン遺伝子の発現解析を行った。

脳など代表的な組織に関して、切片に一般染色、免疫染色、*in situ* hybridizationなどを施して病理組織学的検査を行ったところ、異常と思われる病理組織学的所見は得られなかった。

プリオン遺伝子エクソン3の一部(ORFの大部分を含む2,914 bp)を欠損し、その代わりにloxPを含む外来遺伝子をプリオン遺伝子ORF領域に含む手法でKOしたプリオン遺伝子KO牛の各種臓器におけるプリオン遺伝子のmRNAの発現をRT-PCR法にて調べた結果、どの臓器からもプリオン遺伝子の欠失プリオンタンパク部分のmRNAは検出されず、きちんとノックアウトされていることが確認された。さらに、プリオン遺伝子KO牛のみに発現している外来遺伝子部分(ノックアウト操作に用いたベクターに依然1つ含まれているloxP配列を含むプラスミド由来の328残基の外来遺伝子)を指標として用いて、プリオン遺伝子KO牛の各臓器におけるプリオン遺伝子の転写状況を確認するために外来遺伝子に置換された領域を含むようなプリオン遺伝子のORF部分を含む領域を増幅させるPCRを試みた結果、多くの臓器においてこの領域のmRNAの発現が確認された。

プリオン遺伝子ホモKO牛においてはタンパクの発現もないことを確認したが、プリオンタンパクが発現されないことによって細胞内の発現タンパクのプロファイルがどのように変化しているのかプロテオーム解析(タンパクをLC-MS/MSを利用したショットガン法により網羅的に解析)およびエピジェネティック解析の面から精査した。多くの臓器においては明瞭な変化が認められなかったが、脳、脊髄、扁桃においていくつかのタンパクの発現に異常が惹起されることが分かった。今後その生理的意義を精査しなくてはならない。

最後に、初めに供したプリオン遺伝子ホモKO牛は、免疫系および消化器系が脆弱である兆候を示したので、作出のプロセスを検証するために、再度プリオン遺伝子ホモKO牛およびその対照牛(胎仔線維芽細胞の核を用いた体細胞核クローン牛)を作出し、誕生直後からの臨床生化学的な臨床性状を詳細にフォローし、プリオン遺伝子ホモKO牛が臨床診断面では健常であることを確認した。

##### 2) 「プリオン遺伝子KO牛、対照クローン牛の作成と改良法の検討」(分担研究者: 全農飼料畜産中央研究所 千代豊)

牛プリオン遺伝子は3つのエクソンより構成されている。プリオンタンパクをコードするエクソン3領域を除去するようにデザインしたコンストラクトを作製しノックアウトベクターとした。このノックアウトベクターは選択マーカ遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子(薬剤耐性遺伝子)を挟むかたちにloxP配列を配置させており、Cre組換え酵素処理(Cre発現アデノウイルス)することによりノックアウト後には不必要となる選択マーカ遺伝子を除去できる構造とした。このベクターにより1種類(本来は2種類必要)のノックアウトベクターを使用し

てホモノックアウト体細胞株を比較的短期間で樹立することが可能となった。

牛胎子由来の線維芽細胞を出発材料として2回のノックアウト操作を繰り返すことにより、ホモノックアウト細胞株を得られた。このホモノックアウト細胞をドナーとした核移植クローン操作により、プリオン遺伝子ホモKO牛の作出に成功した。作出したクローン胎子由来の細胞におけるゲノム上のプリオン遺伝子の存在様式をRT-PCR法により解析した結果、樹立されたプリオンホモノックアウト細胞では確かにプリオンタンパクをコードする遺伝子領域を完全に欠失しており、プリオンタンパク領域の遺伝子を発現していないことを確認できたので、プリオンホモノックアウト細胞をドナーとしてプリオン遺伝子ホモKO牛を作出した。

プリオン遺伝子ホモKO牛のゲノム遺伝子のPCR解析の結果、全てにおいてプリオンタンパクをコードする領域が欠失していることが確認できた。

ところがプリオン遺伝子ホモKO牛ではプラスミド由来の外来性の塩基配列がプリオン遺伝子欠損部位に残っていることが判明し、これを除去しなくてはならないので、これを除去する方法の開発を進めた。すなわちノックアウトベクター中に自殺遺伝子を導入した新規ベクターを構築し、2回の相同遺伝子組換え操作を経て外来遺伝子を除去する方法を開発した。

初回のプリオン遺伝子ホモKO牛作出に際して行った体細胞核移植の効率がよくなかったので、初期G1期に細胞周期コントロールしたドナー細胞（除核した卵母細胞）を使用して体細胞核移植することで、成功率を大幅に向上できた。

### 3) 「プリオン遺伝子KO牛の生化学的解析」(分担研究者：酪農学園大学横田博、協力研究者：松田一哉、宮庄拓、野村幸子、奥村佳奈子)

プリオンタンパクは、細胞の酸化ストレスを防御する super oxide dismutase (SOD) 活性を担っているという報告が有る。マウスでは、プリオン遺伝子をKOすると細胞の自然死であるアポトーシスが誘発され易くなる。すなわちプリオン遺伝子KO動物の神経は酸化ストレスを受け易く、増殖・成長過程で重要な障害を受ける可能性を示している。プリオン遺伝子KO牛の脳組織内の神経細胞中の酸化ストレスに関連している(SOD、Caspase-3、Caspase-7、protein disulfide-isomerase: PDI) 酵素活性とカルボニル化タンパクを指標として同組織内の酸化状態を調べた。

プリオンKO牛の神経組織における抗酸化を担う一群の酵素の活性は、どれも対照の体細胞核クローン牛と有意差がなかった。しかし、プリオンKO牛の脳では数種のタンパクのカルボニル化(カルボニル化は不可逆反応であり、アルギニンの分解を誘導するので、タンパクの機能障害を示唆する重要な指標である)が認められた。これから抗酸化作用を有するプリオンを欠失したことにより、タンパクの酸化が防御できなくなってしまったことが推察される。

そこでプリオンタンパク欠失による神経組織におけるタンパクの酸化促進を精査するためにまず *in vitro* でのタンパク酸化反応系を確立した。この反応系を供してプリオンタンパク欠失牛の神経のタンパクが酸化を受け易いことが確認できた。

脂質の易酸化性[組織ホモゲネートに活性酸素を発生させる目的で FeCl<sub>2</sub> を添加後、脂質の過酸化によって生じる malondialdehyde などの thiobarbituric acid 反応性物質(TBA)を測定]も検討し、酸化亢進状態にあることが分かった。今後、加齢にともなう臨床症状を精査しなくてはならない。

## (2) 全体の研究成果

### 1) 全体の研究成果の要旨

経口的に感染するのみならず孤発性も確認されている牛海綿状脳症(BSE)の統御には病原体であるプリオンタンパクを発現しないようにプリオン遺伝子をホモKOした牛の作出しか

方策がない。プリオン遺伝子KO牛作出とその特性解明を目的とする本研究開発事業は、食の安全の担保、牛生体材料を利用した様々な医薬・医療品などの安全確保にとって必須である。プリオン遺伝子KO牛では体細胞核移植の効率が悪いので、大幅に改善する手法を開発した。またプラスミド由来の外來性の塩基配列がプリオン遺伝子欠損部位に残っているのでKOベクターに自殺遺伝子を導入し、残存外來遺伝子を大幅に減少させることができた。プリオン遺伝子KO牛でも体細胞核クローン牛に共通に認められる大きな胎仔と胎盤、自然分娩の困難、新生仔における高死亡率などは認められるものの、対照（体細胞核クローン牛）と比較した場合、胎仔においては臨床レベルでの異常、様々な臓器における病理学的異常、生化学的脳神経系における抗酸化系酵素活性の異常などの明瞭な異常は認められなかった。しかし詳細に調べると、プリオン遺伝子KO牛では、KO操作にともなって脳を含む様々な臓器の多様なタンパクの発現が影響を受けていること、神経系細胞において多くのタンパクの酸化変性や脂質酸化の抑制が生じていることが判明し、加齢に伴う変化や次世代における健全性を見極めなくてはならないことが分かった。

## 2) 研究成果

全体を通した研究成果を3つの課題別にまとめ以下に述べる。

- (1) 分担課題：「プリオン遺伝子ホモKO牛の特性の解析」（分担研究者：東京大学 眞鍋昇、吉川泰弘、小野憲一郎、協力研究者：濱崎裕子、小野山一郎）

本課題の研究目的は、わが国で独自に開発された牛胎児由来リサイクル体細胞核移植法により、プリオン遺伝子をホモにノックアウト（KO）したクローン黒毛和種（プリオン遺伝子KO牛）が作出できた。具体的には黒毛和種雌牛の胎児線維芽細胞を用いてプリオンホモノックアウト細胞（#H2-14CrN）を作製し、これをドナーとして、脱核した未受精卵に核移植を行い、体細胞由来クローン胚を作出した。平成20年度には、5頭のメス牛（レシーピエント牛・借腹牛）にプリオンKO初期胚を2胚ずつ合計10胚を移植した結果4頭が妊娠し（うち2頭は双子を妊娠）、その結果、6頭のプリオンKO雌黒毛和種を作出することができた。このようにして生産したプリオン遺伝子ホモKO牛の発育・加齢に伴いプリオン遺伝子の欠損が牛にどのような影響を与えるかを分子生物学的、臨床的、病理学的に評価し、牛における正常プリオンタンパクの機能を解明すること、性成熟に達した時点で、この遺伝形質が配偶子に安定して継代されるか否かを受精卵で確認すること、およびプリオン遺伝子を欠損する有用性を細胞などプリオン遺伝子を欠損する有用性を食品の原料、動物用医薬品の利用面からヒトへの健康影響評価をすることが本研究課題の目的である。そのために、プリオン遺伝子ホモKO牛を用いて、mRNAや、プリオンタンパクの発現の有無を確認する。またプリオン遺伝子KO牛の臨床データの取得、臨床病理学的解析、生殖細胞の解析などによりプリオン遺伝子KO牛の特性を解析する。さらに、血液成分、性ホルモン／代謝酵素系、薬物代謝系、脳内酸化変性タンパク等の網羅的解析を行い、プリオンタンパク欠失による生体内代謝酵素系や抗酸化作用等への影響を解明することも重要な目的である。

平成20年度は6頭のうちの4頭（3ヶ月齢雌2頭、5ヶ月齢雌1頭および1歳齢雌1頭）のプリオン遺伝子KO牛から得られた脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管などの各臓器を用いて、プリオン遺伝子KO牛の臨床病理学的解析、およびプリオン遺伝子の発現解析を行った。このプリオン遺伝子KO牛は、最終的には、プリオン遺伝子のうち、エクソン3の一部（ORFの大部分を含む2914bp）が欠損し、その代わりに、loxPを含む外來遺伝子をプリオン遺伝子ORF領域に含む。プリオン遺伝子KO牛の全身状態を確認するため、サンプリングにより得られた各臓器を、パラホルムアルデヒド溶液で固定後、パラフィンブロックを作成した。1歳齢のプリオン遺伝子KO牛以外の3頭のサンプル

については、脳など代表的な組織に関して、薄切後、HE染色を行った。凍結保存した各サンプルを用いて、RT-PCRを行い、プリオン遺伝子のmRNAの発現を確認した。まず、対照として2ヶ月齢ホルスタイン雄のサンプルを用いたRT-PCRによりcDNAを合成した。得られたcDNAのうち、大脳、および肝臓のcDNAを用いてPCRの各条件を検討・決定した。

平成20年度作出したプリオン遺伝子ホモKO牛（1回目）は、北海道士幌町にある全農ETセンターで誕生後6ヶ月間飼育され、その後茨城県にある東大牧場に移動されたために、この後から12ヶ月齢にて採材のために安楽殺されるまで経時的に臨床性状を調べた。このため、免疫系および消化器系が脆弱である兆候を示すプリオン遺伝子ホモKO牛の特性を理解するために重要な出生直後（誕生直後から1週間の初乳哺乳期は特に免疫系の確立に重要な時期である）、その後の哺乳時期（1週齢から50週齢まで）、徐々に反芻胃が発育して粗飼料を摂食し始める50週齢以降から性成熟（黒毛和種の初回発情は早くても12ヶ月齢）に達するまでの一連の推移を詳細に検討できなかった。

平成21年度には2回目のプリオン遺伝子ホモKO牛を生産した。すなわち、平成20年2月に胚移植した妊娠中の母牛を妊娠安定期に北海道の全農ETセンターから東大牧場に移送して飼育して、プリオン遺伝子ホモKO牛およびその対照牛（胎仔線維芽細胞の核を用いた体細胞核クローン牛）の出産、誕生直後からの臨床生化学的な情報臨床性状を詳細にフォローしている。この牛が性成熟に達した後は、雌性配偶子の解析、体外授精、初期胚の体外成熟培養、レシーピエント牛子宮への胚移植を試み、次世代（F1）個体におけるプリオン遺伝子ノックアウトの影響を的確に評価する基盤を確立しようとしている。具体的には、平成22年度に生まれたプリオン遺伝子ホモKO牛と対照牛の体尺測定、体温測定、心拍数測定などを行って臨床所見を随時記録するとともに、定期的に採血して臨床血液学・生化学検査を行って、健全性のモニタリングを行った。

併行して、平成21年度得られたプリオン遺伝子ホモKO牛（出産直後1頭、3ヶ月齢2頭、5ヶ月齢1頭、12ヶ月齢1頭）のサンプルを用いた基盤情報の集積を昨年度に引き続いて行った。平成21年度生まれたプリオン遺伝子ホモKO牛の諸臓器（脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管など）におけるプリオン遺伝子およびノックアウト操作に用いたベクターに依然1つ含まれているloxP配列を含むプラスミド由来の外来遺伝子（328残基）などの発現解析を行うとともに、エピジェネティック変動の解析およびプロテオーム解析を行った。加えて、諸臓器を定法に従って組織切片として一般染色、免疫染色、*in situ* hybridizationなどを施して病理組織学的異常の有無を検索した。

平成22年度には平成21年度までに得られたプリオン遺伝子ホモKO牛および対象健康牛の大脳、脊髄、扁桃などを用いて、それぞれの組織で発現しているタンパクをLC-MS/MSを利用したショットガン法により網羅的に解析した。

これらの研究を行った結果を以下にまとめる。平成20年度に得たプリオンKO仔牛6頭のうち、1頭は誕生直後に死亡した。また1頭は分娩時の事故による死産となったため、最終的に4頭が正常（健康体）に誕生した。4頭のうち2頭は生後3か月で安楽殺し、全身の臓器を採取した。解剖時に腰部の構造に脆弱性が認められた。また、残りの1頭も腰部・後肢に脆弱性を示し、飼育柵に挟まれる事故のため切迫と殺した。最後の1頭は東大牧場で飼育したが、慢性肝機能障害で栄養状態が悪く、ヘルニアを起こしたため開腹手術を実施した。開腹時に腹腔内に大きな膿瘍が認められた。生誕時の臍帯の化膿が原因と考えられた。衰弱が激しく手術中に心停止した。本研究では、プリオン遺伝子KO牛の性状の確認、および、プリオン遺伝子を欠失させることが、加齢に伴い牛にどのような影響を与えるかを明らかにした。

平成20年度および平成21年度に作出したプリオンKO仔牛を用いて血液生化学的検査、血液学的検査、グロス病理学的検査および脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管などの各臓器標本を用いた病理組織学的検査を行った結果、いずれのパラメータにおいても正常値を外れる異常値は検出されず、各臓器の病理組織学的にも異常と思われる所見は得られなかった。加えてプリオン遺伝子ホモKO牛を、その対照として通常の体細胞核クローニングのみを行ったクローン対照ならびに全くの自然分娩によって出産した正常牛（黒毛和種とホルスタイン種の雌牛）と比較して、各臓器由来サンプルを用いて行ったRT-PCRにより、KOしていない牛の多くの臓器でプリオン遺伝子のmRNAとタンパクの発現があり、その発現量は、臓器により差異があることが確認された。プリオン遺伝子の欠失プリオンタンパク部分のmRNAは検出されず、きちんとノックアウトされていることが確認された。プリオン遺伝子KO牛は、最終的には、プリオン遺伝子のうち、エクソン3の一部（ORFの大部分を含む2,914bp）が欠損し、その代わりに、10xPを含む外来遺伝子をプリオン遺伝子ORF領域に含む。このプリオン遺伝子KO牛のみに発現している外来遺伝子部分を用いて、プリオン遺伝子KO牛の各臓器におけるプリオン遺伝子の転写状況を確認するため、外来遺伝子に置換された領域を含むようなプリオン遺伝子のORF部分を含む領域を増幅させるPCRを試みたところ、多くの臓器において、この領域のmRNAの発現が確認された。対照胚（体細胞核クローン）とホモプリオンKO胚を各々2頭のレシーピエント牛に2胚ずつ移植し、着床した。対照胚移植レシーピエント牛のうちの1頭は妊娠212日で流産したが、残りは11月に双子を出産した。ホモプリオンKO胚移植レシーピエント牛は2頭とも分娩期まで妊娠を維持できたが、片方は分娩時に死産となり、残り1頭は分娩予定日を越えても明確な分娩兆候が確認出来なかったので帝王切開して1頭のプリオン遺伝子ホモKO牛を得た。これら仔牛の成長にともなう臨床特性の推移を調べた。第1回目と同様に2回目のプリオン遺伝子ホモKO牛も下半身、特に腰部と大腿部の発育が悪い。哺乳初期から気管支炎などを発症し易く、しばしば下痢気味であるため成長が悪い。このように形態形成異常と免疫系および消化器系の脆弱兆候が認められる。ただし対照牛でも腰部の脆弱性がうかがわれるので、両者を比較してこれらの異常が何に起因するものなのか精査したが、未解明である。上述のように平成20年度のプリオン遺伝子ホモKO牛の諸臓器の病理組織学的検索の結果、特記すべき異常所見は得られなかったが、平成22年度死産となってしまった個体の病理組織学的検索の結果も同様であり、死産の原因は体細胞クローン胎仔特有の過剰発育に起因する可能性が高い。

プリオンKO操作に起因するエピジェネティックな変化の有無を検討するため、第1回目のプリオン遺伝子ホモKO牛の各臓器よりゲノムDNAを抽出し、それにおける遺伝子のメチル化状況について検索した。プリオン遺伝子のメチル化を確認するため、データベースより得られたゲノムシーケンス(AJ298878\_1)を用いてCpG islandであると予測される部位を推測した（条件：300 bp<length of island<2,000 bp、C+Gs/total bases>50%、CpG observed/CpG expected>0.6）。その結果、48,887-50,730の1,844 bp中にCpG islandが存在することが推定できた。そこで、この部位に対して実際のゲノムのメチル化の状況を確認するため、バイサルファイト・シーケンス法を用いてメチル化部位を特定することを試みた。ゲノム配列からプライマーとなりうる範囲を検索し、およそ49,300-50,240の範囲でシーケンスを行った。バイサルファイト処理によってメチル化されていないCはTに変換されるため、全体としてAT/GC比が極端に大きくなり、PCRやDNAシーケンスを行うことが極端に困難となるため、実際には300~500 bpの小さな領域ずつのシーケンスを行っている。現在までにプリオン遺伝子ホモKO牛のゲノム上に<sup>m</sup>Cの存在は確認できていない。また、プリオン遺伝子以外のエピジェネティックな変化の解析として、

網羅的にメチル化を解析するために抽出したゲノムをメチル化感受性酵素HpaIIで処理した後、末端にアダプターを付加し、この末端アダプターを利用してPCRによりゲノムの増幅を行っている。このようにして得られたゲノム増幅産物を用いて、加齢に伴うメチル化の推移を検討した。併行して、諸臓器におけるタンパクプロファイルの変化を主に2次元電気泳動法にて検索した。プリオン遺伝子ホモKO牛（3ヶ月齢）と健常牛の諸臓器からタンパクを抽出して2次元電気泳動を行ったところ、脾臓、脊髄などでは両者間でタンパクプロファイルが類似していたが、大脳、扁桃では、プリオン遺伝子ホモKO牛に特有のスポットが認められた。プリオン遺伝子のノックアウトにより、タンパクのプロファイルが変化することが示唆された。より詳細なプロテオーム解析を行うことにより、プリオン遺伝子ホモKO牛のタンパク発現レベルでの生化学的特性の把握が可能になると考えられる。

プロテオーム解析により変化の見られた大脳、脊髄および扁桃の解析を行った。LC-MS/MSから得られた、MSおよびMS/MSの値より、データベースとしてMascot (Matrix Science) を用い、タンパクの同定を行った。なお、Minimam Protein 99%、Min Peptide 95%、3個以上をタンパクの同定条件とした。また、全体における発現量を検討するために、解析には、スペクトラムのカウント数を基とする、Scaffold 3 (Proteome Software) のQuantitative Valueを用いた。その結果、全体として、872タンパクが同定された。

大脳においては、健常牛526タンパク、KO牛695タンパクがそれぞれ同定され、そのうち504タンパクは共通であった。同定されたタンパクのうち297タンパクでは、Gene Ontology (GO) が報告されている。biological processとしてはcellular process、metabolic process、biological regulationの順に多く検出された。cellular compartmentに関しては、cytoplasm、intracellular organelle、organelle partの順に多く、molecular functionに関しては、molecular function、binding、catalytic activityの順に多く検出された。健常牛およびKO牛それぞれから検出されたタンパクに関する発現量の差異に関して比較解析した結果、G検定により158タンパクに有意差が認められた。脊髄においては、健常牛518タンパク、KO牛494タンパクがそれぞれ同定され、そのうち446タンパクは共通であった。同定されたタンパクのうちGene Ontology (GO) が報告されているものは、222タンパク存在した。Biological processとしてはcellular process、metabolic process、biological regulationの順に多く検出された。Cellular compartmentに関してはcytoplasm、intracellular organelle、organelle partの順に多く、molecular functionに関してはmolecular function、binding、catalytic activityの順に多く検出された。検出されたタンパクに関する発現量の差異に関して比較解析した結果、G検定により40タンパクに有意差が認められた。KO牛のうち1頭は健常牛と顕著に発現量の違うタンパクが検出されたが、もう1頭は健常牛とも発現パターンが似ており、KO牛特異的発現のパターンを示すタンパクとして、G検定にて優位差の認められたタンパクから、37タンパクを抽出、KO牛特異的発現パターンを示すタンパク候補としてあげられた。扁桃においては、健常牛598タンパク、KO牛621タンパクがそれぞれ同定され、そのうち572タンパクは共通であった。同定されたタンパクのうち、Gene Ontology (GO) が報告されているものは、252タンパク存在した。Biological processとしてはcellular process、metabolic process、biological regulationの順に多く検出された。Cellular compartmentに関しては、intracellular organelle、cytoplasm、organelle partの順に多く、molecular functionに関してはmolecular function、binding、catalytic activityの順に多く検出された。発現量の差異に関して比較解析した結果、G検定により147タンパクに有意差が認められた。KO牛のうち1頭は健常牛と顕著に発現量の違うタンパクが検出されたが、もう1頭は健常牛とも発現パターンが似ており、KO牛特異的発現のパターンを示すタンパクとして、G検

定にて優位差の認められたタンパクから、137タンパクを抽出、KO牛特異的発現パターンを示すタンパク候補とした。

大脳、脊髄、扁桃のプロテインプロファイルは、それぞれの組織で特徴的で、KO牛と健常牛との比較解析によりいくつかの特異的発現パターンを示すタンパク群も見つけられた。これらの候補の中には、他の疾患でも注目されているものもあり、KO牛と健常牛の臨床状態を調べていくうえでも、重要な情報が得られると考える。

(2) 分担課題：「プリオン遺伝子KO牛、対照クローン牛の作成と改良法の検討」

(分担研究者：全農飼料畜産中央研究所 千代豊、協力研究者：浦川真実、出田篤司)

プリオン遺伝子ホモKO牛および対照群として同一の胎仔由来線維芽細胞の体細胞核を用いて作製した胚由来クローン牛を作成するとともに、現在の欠損部位に残っているプラスミド由来の外來性の塩基配列を除去する方法の検討を進めることである。加えて作製効率を大幅に改善する作出方法の開発を進めた。すなわち、プリオン遺伝子をノックアウトするために使用したノックアウトベクターは、プリオンタンパクをコードする領域を除去するようにデザインし構築したものであるが、選択マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子）を挟むかたちに1oxP配列が位置しており、Cre組換え酵素処理（Cre発現アデノウイルス）することにより選択マーカー遺伝子を除去できる構造となっている。このベクターを使用することによって1種類（本来は2種類必要）のノックアウトベクターを使用してホモノックアウト体細胞株を比較的容易に樹立することが可能となり、牛胎仔由来線維芽細胞を出発材料として2回のノックアウト操作によりホモノックアウト細胞株が得られた。さらに、このホモノックアウト細胞をドナーとした核移植クローン操作によりプリオン遺伝子ホモKO牛を作出してきた。ノックアウト操作の開始からホモKO牛の誕生まで、おおよそ14ヶ月を要した。この作出法は通常の繁殖法（性成熟後のヘテロKO牛のかけ合わせ）と比べると非常に短期間に作出できる方法であるが、1年以上も必要であるので、格段の改善が必要である。

平成20年度に作出した第1回目のプリオン遺伝子ホモKO牛は、樹立されたプリオンホモノックアウト細胞（#H2-14Cre）及び当該細胞をドナーとして作出したクローン牛であるが、由来細胞（#H2-14CreN）におけるゲノム上のプリオン遺伝子の存在様式をRT-PCR法により解析したところ、樹立されたプリオンホモノックアウト細胞（#H2-14Creおよび#H2-14CreN）はプリオンタンパクをコードする遺伝子領域を完全に欠失しており、プリオンタンパク領域の遺伝子を発現していないことが確認できた。このプリオンホモノックアウト細胞（#H2-14CreN）をドナーとして作出したプリオン遺伝子ホモKO牛の作出成績では、5頭の受胎牛にプリオンKO胚を2胚ずつ移植し、4頭が妊娠を継続し（うち2頭は双子妊娠）、6頭のプリオン遺伝子ホモKO牛を作出することができた。6頭中、1頭は生後直死、1頭は分娩事故による死産となり、最終的に4頭が正常（健康体）に誕生した。正常に誕生した4頭のプリオン遺伝子ホモKO牛のゲノム遺伝子のPCR解析の結果では、4頭全てにおいてプリオンタンパクをコードする領域が欠失していることが確認できた。また、死亡した2頭においても同様の解析結果が得られた。

第2回目では、プリオンKO樹立に使用したオリジナル細胞（胎仔由来線維芽細胞#906株）をドナーとした核移植クローン牛（対照牛）の作出も併せ行った。核移植の結果、#906株を用いた核移植において23個の核移植胚中の11個（47.8%）の胚が移植可能胚（胚盤胞）へと発生した。#H2-14CreN株を用いた核移植においては、23個の核移植胚中、12個（52.2%）の胚が移植可能胚へと発生し、両者間で差異はなかった。この高い胚発生率は、体細胞核移植に用いる核を提供するドナー細胞の細胞周期を初期G1期に同期できるコントロール法の確立が大きく寄与していると考えられた。子宮に移植

可能な胚を用いた作出の結果は、対照牛作出において2頭のレシーピエント牛にそれぞれ2個の移植可能胚を移植し、1頭の受胚牛は妊娠212日目で流産したが、残りの1頭は妊娠を継続して2頭（双子）の対照牛を出産に至ることができた。プリオン遺伝子ホモKO牛作出においては、2頭のレシーピエント牛にそれぞれ2個の移植可能胚を移植し、2頭（双子および単子）とも分娩期まで妊娠を継続できた。しかし、プリオンKO2胎仔（双子）を妊娠した受胚牛は分娩において、難産となり2胎仔とも死産となり、プリオンKO単子妊娠牛は分娩予定日を越えても明確な分娩兆候が確認出来なかったため緊急に帝王切開して仔牛を摘出した。このように、最終的に1頭のプリオン遺伝子ホモKO牛と2頭の対照牛が作出できた。最後に作出したプリオン遺伝子ホモKO牛では、1 o x P / C r e 組換え反応によりKOベクター中の薬剤耐性遺伝子領域は完全に除去されているが、依然外来遺伝子（1 o x P 配列を含むプラスミド由来の328 b p 残基）が1つ含まれている。これを除去しなくてはならないので、この外来遺伝子除去法の開発を進めた。文献情報等を調査して外来遺伝子の除去に有効と考えられるベクターを設計し、数種類のベクターを構築して有効性を検討したが、不十分なものであった。そこで平成22年度には、再度基本にもどってベクターの構築を進めて有効性の確認に取り組んだ。すなわち、KOベクター中に自殺遺伝子である herpes virus thymidine kinase (TK) 遺伝子または大腸菌 (*E. coli*) の cytosine deaminase (CodA) 遺伝子を組み込んだベクターを使用し、最初の相同組換え操作においてプリオンヘテロKO-自殺遺伝子ノックイン (KI) 細胞株の樹立を行った。その結果、表に示すように両者のベクターにおいて、高率にプリオンヘテロKO-自殺遺伝子ノックイン (KI) 細胞コロニーの出現が確認できた。細胞コロニー中で増殖性が優れたコロニーより細胞株の樹立を行い、プリオンヘテロKO-TK-KI細胞として#1-5株を、プリオンヘテロKO-CodA-KI細胞として#1-9株および#1-30株を、それぞれ樹立した。ついでこれまでにすでに樹立している#1-5株（プリオンヘテロKO-TK-KI細胞）と#1-30株（プリオンヘテロKO-CodA-KI細胞）を供試し、自殺遺伝子の選別効果を調べた。#1-5株に対してはガンシクロビル (GCV) 添加し、#1-30株に対しては5-Fluorocytosine (5-FC) 添加を調査した。プリオンヘテロKO-TK-KI細胞である#1-5株に対してGCVを添加することにより細胞増殖が顕著に阻害された。しかし野生型906株に対してはGCVを添加しても増殖抑制が起きないことが確認できた。他方、プリオンヘテロKO-CodA-KI細胞である#1-30株と野生型906株に対して5-FCを添加した場合には、同程度に細胞増殖が抑制された。このように、5-FC添加ではCodA遺伝子による細胞増殖抑制効果は確認出来なかった。細胞増殖阻害効果が確認できた#1-5株を使用し、外来遺伝子除去ベクター pPrP-RE による相同組換え試験を実施した結果、786well解析中1wellにおいてpPrP-REベクターとPrPヘテロKO-TKノックイン細胞ゲノム間で相同組換えが起きたことを示唆するPCR増幅が観察された。しかしながら、#1-5株は細胞増殖能力がかなり低下している（相同組換え操作を1回実施しており約30日間継続培養した状態にある）ことから、細胞株の樹立は不可能と判断された。この問題を解決するため、#1-5株をドナーとした核移植・胎仔細胞樹立試験を実施した。その結果、1胎仔を回収し胎仔細胞株を樹立する事が出来た。樹立した#1-5由来胎仔細胞株を使用し、自殺遺伝子の選別効果を調査した。#1-5由来胎仔細胞株はオリジナルの#1-5株とは異なりGCV添加による細胞増殖阻害が起らない細胞に変化した。ゲノム中のTK遺伝子の存在は確認できたことから、核移植操作、その後の発生過程でTK遺伝子のプロモーターであるMC1プロモーターが何らかの修飾を受けサイレンシングされた可能性が考えられる。今後、TK遺伝子のプロモーターをMC1から別のプロモーター (PGK, SV40等) に変更し試験する必要がある。

ノックアウトベクター中に自殺遺伝子（TK）を導入したベクターシステムを用いることにより、外来遺伝子を含まないかたちでPrPを含む特定遺伝子のKOができる可能性が示唆された。今後この可能性を検証するためベクターを再構築し、増殖能力の高いPrPヘテロKO-TKノックイン胎仔細胞株を樹立し、さらなる試験が必要である。

(3) 分担課題：「プリオン遺伝子KO牛の生化学的解析」

（分担研究者：酪農学園大学 横田博、

協力研究者：松田一哉、宮庄拓、野村幸子、奥村佳奈子）

プリオンタンパクが細胞の酸化ストレスを防御する super oxide dismutase (SOD) 活性を担っており、プリオンをノックアウトしたマウスでは細胞の自然死であるアポトーシスが誘発されるという報告があるがこれの牛における役割は不明であるので、もしもマウスと同様であれば、プリオン遺伝子ホモKO牛の神経細胞は酸化ストレスを受け易く、増殖・成長過程で重要な障害を受ける可能性があることを確認することにある。平成20年にプリオン遺伝子ホモKO牛の神経（延髄）細胞中の酸化ストレスに関連している一群の酵素（SOD、Caspase-3、Caspase-7、protein disulfide isomerase：PDI）の活性をノックアウトしていない牛のそれと比較した。さらに神経組織内の酸化状態をカルボニル化タンパクを検出することで比較した。その結果、これら酸化ストレス関連酵素の活性は、両者間で有意な差異が認められなかったが、プリオン遺伝子ホモKO牛の神経組織では数種のタンパクのカルボニル化が観察された。この結果から、抗酸化作用を有するプリオンタンパクを欠失したことにより、神経タンパクの酸化が促進されたことが推察されたので平成21年度と平成22年度には、プリオンタンパク欠失による神経組織におけるタンパクの酸化促進を明らかにする目的で、*in vitro*でのタンパク酸化反応系を確立し、プリオンタンパク欠失牛の神経タンパクが酸化受けやすいか否かを確認し、併せて脂質の易酸化性も検討した。

平成20年度に、牛の神経組織におけるタンパクの酸化（カルボニル化）および脂質の過酸化を *in vitro* 系で測定できる測定系を確立した。そこで、プリオン遺伝子をホモKOした新生仔牛の神経組織のSOD、Caspase-3、Caspase-7、PDI活性を測定した結果、どの酵素活性もクローン牛のそれと大きな差はなかった。プリオンの本来の機能として予測される抗酸化作用について明らかにするために、今後、成長過程を追ってこれらの酵素活性をモニターしてゆくことが求められる。また、プリオンタンパクが抗酸化作用を有しているとする、プリオンKO新生仔牛神経組織は酸化ストレスを受け易いことが予測される。タンパクの酸化ストレスの代表的指標であるカルボニル化状態をクローン牛のそれと比較したところ、プリオンKO新生仔牛脳では数種のタンパクのカルボニル化が観察された。この結果は、抗酸化作用を有するプリオンを欠失したことにより、これらのタンパクの酸化が防御できなかったと推察される。よって、プリオンKO新生仔牛の神経細胞ではいろんなタンパクが酸化ストレスを受けやすく成長後様々な障害が出現する可能性が考えられる。まず、最初にプリオン遺伝子ホモKO牛と対照牛の神経組織におけるタンパクカルボニル化を測定したところ、プリオン遺伝子ホモKO牛の神経組織では対照牛のそれより多くカルボニル化されていることが分かった。このことは、前年度のプリオン遺伝子ホモKO牛の神経細胞では対照牛のそれより酸化されやすいという成果を分子機構レベルで裏づけるものであった。平成22年度開発した評価系を用いてカルボニル化神経タンパクの同定を行うことでプリオン遺伝子ホモKO牛の神経細胞がどのような機能を失いやすいか明らかにできるので、加齢に伴う変化を詳細に検討する。このことによってプリオン遺伝子ホモKO牛が成熟した後の神経疾患の予測をすることが可能となり、その疾患の防御策を講じることに役立つ。併行して、プリオン遺伝子ホモKO牛と対照牛の延髄組織の脂質の過酸化を *in vitro* 測定系で比較した結果、脂

質の酸化が抑制されていることが分かった。プリオンタンパクは神経系組織において脂質の酸化を亢進させる方向で影響をおよぼしていることが示唆された)。この評価系を用いて過酸化した脂質が結合するタンパクの同定を進め、プリオンタンパクが脂質の酸化に関与しているか見極めることで、プリオンタンパクの神経細胞内での本来的役割の考察を進めた。

以上の結果より、健常な牛の神経組織においては、プリオンタンパクはタンパクが酸化されにくくしていることが濃厚となった。プリオンの遺伝子を欠失した牛の神経細胞では、タンパクが酸化され、その機能が傷害されやすくなって神経疾患に陥りやすくなっていると考察された。しかしながら、プリオン遺伝子欠失牛の脂質は過酸化が抑制されており、プリオンタンパクが細胞膜上に位置している脂質の酸化に関与している可能性が高いことが示唆された。ただし、この結果は thiobarbituric acid (TBA) 反応性物質の量を脂質過酸化物の量として測定した結果のみであり、プリオンタンパクが健常な牛の神経組織の脂質を酸化促進しているか否かを確認するためには脂質過酸化物によるタンパクの変性の確認等の複数の裏付けデータを得なくてはならないので、この点に注力して精査を進めなくてはならない。

最後に Caspase-3、Caspase-7、SOD 活性にはコントロールに比べ変化は無かったが、PDI 活性は上昇傾向にあった。神経組織における脂質過酸化物や神経タンパクのカルボニル化を測定 (脂質過酸化反応の結果生じたMDA-TBAを測定) したところ、プリオンタンパクを欠失しているKO牛の神経ホモジネートの脂質過酸化割合はコントロール牛のそれより高く、プリオン遺伝子KO牛神経細胞の方が酸化が進行していることが推測された。タンパクのカルボニル化もプリオン欠失神経細胞では速く進行し酸化され易い結果となった。そこでカルボニル化タンパクを同定するために、二次元電気泳動を行った。プリオンタンパクを欠失した牛の神経細胞のタンパクが多く酸化された。特に20kDa附近の5種類の蛋白質がプリオンタンパクの欠失により新たに酸化されたことが分かった。プリオンタンパクを欠失した牛の神経細胞のタンパクに駿管内フェントン反応を施し、その後 Caspase-3 と Caspase-7 活性を測定した。プリオン欠失ウシの神経細胞ではアポトーシス実行酵素である Caspase-3 と Caspase-7 活性が有為に上昇していることからアポトーシスが進行していることが予測された。

牛において、プリオンタンパクは神経細胞の脂質やタンパクの酸化を抑制する働きを有していることが濃厚となった。よってプリオンタンパク遺伝子KO牛ではその飼育過程において、神経細胞の脂質過酸化やタンパク酸化が生じやすく、アポトーシスが生じて細胞傷害され、神経疾患に陥りやすいと考えられる。酸化タンパクの二次元電気泳動の結果、プリオン欠失により20kDa附近の5つの低分子量タンパクが酸化されていた。今後このタンパクの特定を行うことにより、プリオンが酸化抑制しているタンパクが判明する。この相互作用を解析することで、プリオンの生理的役割を更に詳しく解析出来る可能性がある。このようにすることで、プリオン欠失牛の飼育やその牛からの畜産製品の加工時などに留意する点が明確になってくる。

### 3) 考察及び結論

- (1) 正常に誕生したプリオン遺伝子KO牛のゲノムのPCR解析では、全ての諸臓器 (脳、脊髄、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓、筋肉、消化管など) においてプリオンタンパクをコードする遺伝子領域が欠失していること、プリオン遺伝子KO牛ではloxP/Cre組換え反応によりノックアウトベクター中の薬剤耐性遺伝子領域は完全に除去されているが、ベクター由来のloxP配列を含む外来遺伝子 (328bp) が存在することが確認できた。これを除去するために、外来遺伝子除去に有効と考えられるベクターを数種類設計して有効性のあるものを開発できたものの、未だ十分なものではないので、今後も継続して取り組まな

くてはならない。

- (2) プリオン遺伝子KO牛の諸臓器のいずれにおいてもプリオン mRNA が検出されず、mRNA レベルでもノックアウトされていた。しかしながら多くの臓器においてKOベクター由来の外来遺伝子の発現が認められ、これの完全な除去が必要である。なお、残存している外来遺伝子は、ノックアウトベクターに含まれる選択マーカー遺伝子としてのネオマイシン耐性遺伝子（薬剤耐性遺伝子）とそれを挟むかたちに配置させたLoxP配列、およびノックアウト後には不必要となる選択マーカー遺伝子を除去するためのCre組換え酵素処理（Cre発現アデノウイルス）の断片である。なお、本研究開発事業で開発したノックアウトベクターは、1種類（本来は2種類必要）のベクターでホモノックアウト体細胞株を比較的短期間で樹立することが可能とできた優れたものであるため、その構造を改変することは容易ではない。
- (3) プリオン遺伝子KO牛のいずれの諸臓器においても病理組織学的異常所見は認められず、細胞と組織の形態形成は正常に行われたと考えられた。
- (4) プリオン遺伝子KO操作に起因するエピジェネティックな変化の有無を検討するため、諸臓器よりゲノムDNAを抽出してプリオン遺伝子のメチル化を調べたところ、48,887 - 50,730 の1,844 bp中にCpG islandが存在することが推定できたので、バイサルファイト・シーケンス法を用いてメチル化部位の特定を進めたが、ホモプリオン遺伝子KO牛のゲノム上にmCの存在は確認できていないので、特段のエピジェネティック異常は生じていないと考えられる。
- (5) プリオン遺伝子KO操作によるタンパクプロファイルの変化を2次元電気泳動法やLC-MS/MS法にて検索し、脾臓、脊髄などでは対照と類似していたが、大脳、扁桃では、ホモプリオン遺伝子KO牛に特有のスポットが認められた。ノックアウト操作により、タンパクプロファイルが変化することが示唆され、このようなプリオンKOによって多数のタンパク産生が影響をうけることがプリオン遺伝子KOマウスで知られている表現型の多様性（日欧米の複数の研究機関でいくつかのノックアウトベクターを用いてプリオン遺伝子をノックアウトしたマウスが作出されたが、研究機関毎に表現型が異なる）と関連するものと推測された。
- (6) タンパクの酸化ストレスの代表的指標であるカルボニル化状態をホモプリオン遺伝子KO牛と対照牛間で比較したところ、プリオン遺伝子KO牛の脳では数種のタンパクがカルボニル化していることが分かった。この現象の機構を理解するためにタンパクのカルボニル化を *in vitro* 系で測定できる測定系を開発し、これを用いてホモプリオン遺伝子KO牛と対照牛の神経組織におけるタンパクカルボニル化を測定したところ、ホモプリオン遺伝子KO牛の神経組織でより多くカルボニル化されていることが分かった。牛の神経組織においては、プリオンタンパクはタンパクを酸化アタックから保護して酸化変性を防いでいることが濃厚となった。ところが、両者の神経組織の脂質の過酸化を *in vitro* 測定系で比較したところ、ホモプリオン遺伝子KO牛とでは脂質酸化が抑制されていたことから、プリオンタンパクは神経系組織においては脂質の酸化を亢進させる方向に影響を及ぼしていると考えられた。

## 2. 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

- Yasuhisa Ano, Hiroyuki Nakayama, Yusuke Sakai, Akikazu Sakudo, Maiko Endo, Shogo Ebisu, Jun-You Li, Koji Uetsuka, Noboru Manabe, Takashi Onodera. Incorporation of  $\beta$ -amyloid protein through the bovine ileal epithelium before and after weaning: model for orally transmitted amyloidoses. *Microbiology and Immunology*, 52: 429-434, 2008.
- Xiao-Bo Zhu, Shogo Matoba, Kenshiro Hara, Yasuhisa Ano, Shin-ichi Kobayashi, Naoki Tsunekawa, Yoshiakira Kanai, Noboru Manabe, Takashi Onodera, Masamichi Kurohmaru. Ratio of peripheral nervous tissues in tongues, skeletal muscles and intestines in cows. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 85: 73-77, 2008.
- Sachiko Nomura, Taku Miyasho, Norikazu Maeda, Hiroshi Yokota. Autoantibody to glial fibrillary acidic protein in the sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy. *Proteomics*, 9: 4029-4035, 2009.
- Noboru Manabe, Jun-You Li, Ichiro Onoyama, Chun-Xiang Piao, Hua-Zi Jin, Kannika Wongpanit, Takashi Onodera, Yasuhiro Yoshikawa. Leading edge of animal reproductive biotechnology: Production of prion knockout cows and their characteristics. In: *Proceedings of the International Symposium on Food Safety*, Yanbien University, Yanji, China, 26-38 (2009).
- Shin-Ichi Kobayashi, Yasuhisa Ano, Akikazu Sakudo, Masayoshi Yukawa, Katsuaki Sugiura, Noboru Manabe, Hiroyuki Nakayama, Takashi Onodera. Quantification of prion C in bovine peripheral tissues: Analysis in wild-type and prion C-deficient cattle. *Molecular Medicine Reports*, 2: 561-566, 2009.
- Noboru Manabe, Jun-You Li, Ichiro Onoyama, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi, Takashi Onodera, Yasuhiro Yoshikawa. Role of prion homo-knockout cattle on prevention of spontaneous bovine spongiform encephalopathy. In: *Proceedings of DASAN Conference*, Jeju, Korea, pp 52-61 (2009).
- Noboru Manabe, Jun-You Li, Ichiro Onoyama, Kannika Wongpanit, Chun-Xiang Piao, Hua-Zi Jin, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi, Takashi Onodera, Yasuhiro Yoshikawa. Production of prion, bovine spongiform encephalopathy (BSE) pathogen, knockout cows and their characteristics. In: *Proceedings of the 6th Asian Reproductive Biotechnology (ARB) Conference*, Siem Reap City, Cambodia, pp 77-87/206 (2009)
- Noboru Manabe, Ichiro Onoyama, Jun-You Li, Chun-Xiang Piao, Hong-Mei Gao, Yasufumi Goto, Takashi Onodera, Yasuhiro Yoshikawa, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi. Characteristics of prion, bovine spongiform encephalopathy pathogen, gene knockout cows. In: *Proceedings of the Joint Conference of Chinese, Japanese and Korean Societies of Animal Reproduction and the 15<sup>th</sup> Annual Meeting of Chinese Society of Animal Reproduction*, Tianjin, China pp 204-208/752 (2010).
- Noboru Manabe, Ichiro Onoyama, Junyou Li, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi. Production of prion gene homo knockout, BSE free, cows and their characteristics. In: *Proceedings of the 14th Animal Science Congress of the Asian - Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP)*. Pingtung, Taiwan, Republic of China, pp385-388/650 (2010).
- Noboru Manabe, Ichiro Onoyama, Junyou Li, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi. Characteristics of prion, bovine spongiform encephalopathy (BSE) pathogen, homo-knockout cow. In: *Czech-Japan Joint Symposium for Animal Reproduction From gametes to stem cells*. 20th - 21st September, 2010, Liblice Castle, Czech Republic 44-45/79 (2010).
- Noboru Manabe, Ichiro Onoyama, Jun-You Li, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi, Takashi Onodera,

Yasuhiro Yoshikawa. New trends in animal reproduction: Production of prion gene knockout cow for prophylaxis of BSE infection. In: Proceedings of Korea-Japan Joint Symposium on Animal Reproduction-Tradition meets Hightechnology, Seoul, Korea, pp 43-53 (2010).

### 3. 本研究を基にした学会発表の実績

Noboru Manabe, Jun-You Li, Ichiro Onoyama, Chun-Xiang Piao, Hua-Zi Jin, Kannika Wongpanit, Takashi Onodera, Yasuhiro Yoshikawa. Leading edge of animal reproductive biotechnology: Production of prion knockout cows and their characteristics. International Symposium on Food Safety, Yanbien University, Yanji, China, 18 July, 2009.

Noboru Manabe, Jun-You Li, Ichiro Onoyama, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi, Takashi Onodera, Yasuhiro Yoshikawa. Role of prion homo-knockout cattle on prevention of spontaneous bovine spongiform encephalopathy. DASAN Conference, Jeju, Korea, 18-20 November, 2009.

Noboru Manabe, Jun-You Li, Ichiro Onoyama, Kannika Wongpanit, Chun-Xiang Piao, Hua-Zi Jin, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi, Takashi Onodera, Yasuhiro Yoshikawa. Production of prion, bovine spongiform encephalopathy (BSE) pathogen, knockout cows and their characteristics. The 6<sup>th</sup> Asian Reproductive Biotechnology (ARB) Conference, Siem Reap City, Cambodia, 16-17 November, 2009.

Noboru Manabe, Ichiro Onoyama, Jun-You Li, Chun-Xiang Piao, Hong-Mei Gao, Yasufumi Goto, Takashi Onodera, Yasuhiro Yoshikawa, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi. Characteristics of prion, bovine spongiform encephalopathy pathogen, gene knockout cows. The Joint Conference of Chinese, Japanese and Korean Societies of Animal Reproduction and the 15<sup>th</sup> Annual Meeting of Chinese Society of Animal Reproduction, Tianjin, China, 16-18 August, 2010.

Noboru Manabe, Ichiro Onoyama, Junyou Li, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi. Production of prion gene homo knockout, BSE free, cows and their characteristics. The 14<sup>th</sup> Animal Science Congress of the Asian - Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP). Pingtung, Taiwan, Republic of China, 23-26 August, 2010.

Noboru Manabe, Ichiro Onoyama, Junyou Li, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi. Characteristics of prion, bovine spongiform encephalopathy (BSE) pathogen, homo-knockout cow. Czech-Japan Joint Symposium for Animal Reproduction From gametes to stem cells. 20-21 September, 2010, Liblice Castle, Czech Republic.

Noboru Manabe, Ichiro Onoyama, Jun-You Li, Yutaka Sendai, Yoshito Aoyagi, Takashi Onodera, Yasuhiro Yoshikawa. New trends in animal reproduction: Production of prion gene knockout cow for prophylaxis of BSE infection. Korea-Japan Joint Symposium on Animal Reproduction-Tradition meets Hightechnology, Seoul, Korea, 14 February, 2011.

### 4. 特許及び特許出願の数と概要

全国農業組合連合会（飼料畜産中央研究所）：体細胞を用いたホモノックアウトの作出と体細胞核移植クローン胚技術を用いたノックアウト・クローン牛の作成方法の開発

### 5. その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）の実績

- ・「日本のBSEとその対策について」吉川泰弘：平成21年6月フランス、パリで開催されたOIE会議に招待され、我が国のBSE対策の現況とプリオン遺伝子ホモKO牛の研究の一部を紹介した。
- ・茨城新聞・読売新聞など（平成21年）に東大牧場で飼育されているプリオン遺伝子ホモKO牛が紹介された。

- ・東京大学広報誌（平成21年）にプリオン遺伝子ホモKO牛の紹介記事（表紙に仔牛の写真）が掲載された。
- ・「プリオン遺伝子ホモKO牛の作出とその有用性」眞鍋昇ら：平成21年11月カンボジアで開催された第5回アジア動物バイオテクノロジー学会にて招聘講演を行い、プリオン遺伝子ホモKO牛研究の一部を紹介した。

## 6. 今後の問題点等

平成20年度に作出したプリオン遺伝子ホモKO牛を性成熟に達する以前に採材のために安楽殺したため、次世代の受精卵（初期胚）・個体を作成することが出来なかった。平成21年度に作出したのも性成熟には達しなかった。今後、経時的に採血、超音波画像診断などの非侵襲性臨床検査を行いながら性成熟に達するまでの発育を臨床獣医学的に精査し、性成熟後は生殖器の機能や雌性配偶子の発育・成熟と受精能などを評価するとともに、体外受精・体外成熟培養によって得られた初期胚由来の次世代仔の健全性を見極めなくてはならない。これまで体細胞核クローン動物では、初代には様々な異常が報告されているが、次世代は健全であり、異常を検出できていないので、プリオンKO牛を厳密に評価するためには、次世代、次々世代を生産して、それらについて精査しなくてはならない。このように寿命が長く、成熟までに長い時間を要する体細胞核クローン牛および遺伝子KO牛を用いて体細胞核クローンと遺伝子ノックアウトの安定性、安全性を解析するには、さらに長い時間が必要である。

プリオン遺伝子KO牛の諸臓器のいずれにおいてもプリオン mRNA が検出されず、mRNA レベルでもノックアウトされていたが、ノックアウトベクターを構成する外来遺伝子の一部が遺伝子KO牛の多くの臓器には残存していることが確認され、これを完璧に除去する手法の開発の重要性も理解でき、改善を進めたが未だ不十分である。残存している外来遺伝子は、ノックアウトベクターに含まれる選択マーカー遺伝子としてのネオマイシン耐性遺伝子（薬剤耐性遺伝子）とそれを挟むかたちに配置させた loxP 配列、およびノックアウト後には不必要となる選択マーカー遺伝子を除去するための Cre 組換え酵素処理（Cre 発現アデノウイルス）の断片であるが、本研究開発事業で開発したノックアウトベクターは1種類（本来は2種類必要）のベクターでホモノックアウト体細胞株を比較的短期間で樹立することが可能とできる極めて優れたものであるため、その構造を改変することは容易ではない。

プリオン遺伝子KO牛の神経組織ではタンパクが酸化され易いことが確認できたが、分子メカニズムは未解明である。逆に脂質の過酸化は抑制されていることが分かり、マウスなどの短寿命の動物とは機能がことなることが示唆され、益々実際にKO牛を作成してこれを用いる研究の重要性が示された。加齢に伴うタンパクのカルボニル化の推移を精査することでプリオン遺伝子ホモKO牛の神経細胞がどのような機能を失い易いか明らかにしなくてはならない。また神経組織の脂質過酸化によるタンパクの変性の精査も重要な研究課題である。これらの研究成果は、成熟後の神経疾患の予測が可能となってその疾患の防御策を講じることに貢献する。加えて、ノックアウト操作に起因する遺伝子のエピジェネティック修飾に関してもほとんど解明されていないままであるので、長期飼育、加齢の影響を検索する必要がある。

近年、通常のBSE（定型BSE）と異なる非定型（孤発性）BSEが欧州、日本、米国などで、少なくとも40頭報告されている。起源は現在まで明らかになっていないが、フランスのデータによれば発生頻度はH型で成牛100万頭あたり0.41頭、L型で0.35頭（但し8歳超ではH型で1.9頭、L型で1.7頭）と推定される。H・L型ともマウス脳内接種により伝達性が確認され、L型はヒト型トランスジェニックマウスで伝達可、H型は伝達不可との報告がある。非定型BSEがMRMのリスクに与える影響は相当程度低いと考えられるが、利用できるデータが限られており不確実な部分が多く、病原性や伝達性などについて研究が進展して新知見が集積されれば再評価する必要があるため、評価に長い時間が必要なプリオン遺伝子ホモKO牛の特性を着実な研究を重ねて明らかにしておく必要がある。

平成21年11月に東大牧場で誕生したプリオン遺伝子ホモKO牛は、誕生直後から経時的に採血、超音波画像診断などの非侵襲性臨床検査を性成熟に達するまで継続して、発育過程の特性を明らかにしようとしている。性成熟（初回発情）後は生殖器の機能、雌性配偶子の発育・成熟と受精能などを評価するとともに、体外受精・体外成熟培養によって得られた次世代の初期胚の健全性をも見極めなくてはならない。